

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGIA

EFFECTO DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA
EXPANSINA EXL1 DE *Pectobacterium carotovorum*
EN BACTERIAS DE *Rhizobium* SOBRE EL
CRECIMIENTO DE LEGUMINOSAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

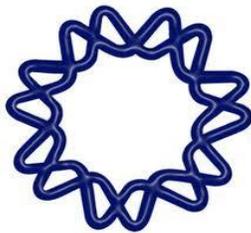
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

ACOSTA HERNÁNDEZ LUIS ARMANDO

Tutor: Dra. Claudia Martínez Anaya

Tutor: Dr. Jorge Luis Folch Mallol



CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE, 2017

Este trabajo fue desarrollado bajo la tutoría de la Dra. Claudia Martínez Anaya del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM y del Dr. Jorge Luis Folch Mallol del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM. Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto (No. de CVU 743760).

DEDICATORIA

Este trabajo se lo quiero dedicar a mi mamá, mi papá, Hugo, Dana, que siempre han confiado en mí y me han apoyado en todas las decisiones que he tomado.

A Marley que es la luz de mis ojos, que llegó a cambiar mi vida y a Karina porque eres una persona maravillosa, mi mejor amiga, mi mejor compañía.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en especial al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) por la oportunidad de realizar un posgrado, a todos los doctores que fueron parte fundamental para cumplir esta meta y a todas las personas que tuve el gusto de conocer.

A la Dra. Claudia Martínez Anaya quiero agradecerle por todo el apoyo y conocimiento que me brindo, realmente fue un placer trabajar con usted y aprender de una gran persona e investigadora como lo es usted, muchas gracias.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol por la oportunidad de ser mi co-tutor y enriquecer al presente trabajo.

A la Dra. Irene Perea Arango y al Dr. Luis Caspeta Guadarrama por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por sus innumerables consejos para la realización de este proyecto.

Agradezco al Dr. Lorenzo Segovia por los consejos oportunos para el mejoramiento del proyecto.

A la Dra. Isabel López Lara por apoyarme con material necesario para llevar a cabo el proyecto además de sus conocimientos acerca del tema.

A la Dra. Mabel Rodríguez González quiero agradecerle por el apoyo académico, consejos, trabajo y su amistad incondicional.

Quiero agradecer al M. C. Carlos Alberto González Chávez por todo el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A la Biol. Olivia Santana Estrada por todo su apoyo técnico y su gran amistad.

A la QFB Lourdes Martínez Aguilar por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Delia, Fernando, Iris, Juan, Omar, Rafa, Blanca Ramos, Raquel, Garduño, Yasmín, Giselle, Andrés, Ale, con los que compartí muchos momentos gratos y que indudablemente fueron participe de esta gran etapa; agradecer también a la señora Leo y la señora Francis porque con todo su apoyo en el laboratorio facilitó mucho la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros de generación, Fernanda, Thalía, Magaly, Natalia, Silvia, Edmi, Marisol, Paty, Luis Alfredo, Víctor, con los que compartí muchos gratos momentos. También quiero agradecer al Lic. en Informática Víctor Martínez Valdez por el apoyo académico a lo largo de mi estancia en el CEIB.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Generalidades de las expansinas.....	12
1.1.1 Expansinas de plantas.....	13
1.1.2 Expansinas bacterianas.....	14
1.2 <i>Rhizobium</i>	19
1.3 Biofilm.....	24
2. ANTECEDENTES.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVO GENERAL.....	36
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
7. METODOLOGÍA.....	37
7.1 Clonación de PcEx1 en un vector de expresión constitutiva.....	37
7.2 Conjugación del plásmido pTB93-PcEx1 en bacteria de <i>Rhizobium</i>	38
7.3 Análisis de la producción de biofilm.....	38
7.4 Ensayos de colonización de <i>P. vulgaris</i> con <i>R. tropici</i>	39
7.4.1 Método de esterilización y germinación de las semillas.....	39

7.4.2 Preparación de las macetas con vermiculita.....	40
7.4.3 Inoculación de las plantas	40
7.5 Ensayos de colonización de <i>M. sativa</i> con <i>S. meliloti</i>	41
7.5.1 Método de esterilización y germinación de las semillas.....	41
7.5.2 Preparación de los tubos de vidrio con las plantas.....	41
7.5.3 Inoculación de las plantas	42
8. RESULTADOS.....	43
8.1 Construcción de conjugantes que expresan Exl1	43
8.2 Conjugación del plásmido pTB93-PcExl1 en células de <i>Rhizobium</i>	45
8.3 Análisis de la producción de biofilm.....	48
8.4 Ensayos de colonización de <i>Phaseolus vulgaris</i> con <i>Rhizobium tropici</i>	55
8.5 Ensayos de colonización de <i>Medicago sativa</i> con <i>Sinorhizobium meliloti</i>	60
9. DISCUSIÓN.....	65
Exl1 aumenta la cantidad de biofilm en <i>R. tropici</i>	66
10. CONCLUSIONES	74
11. PERSPECTIVAS.....	75
12. ANEXOS.....	76
13. BIBLIOGRAFÍA.....	78

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C:	grados Celsius
μl:	microlitro
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
CBM:	módulos de unión a carbohidratos
c-di-GMP:	ácido diguanílico cíclico
cDNA:	ADN complementario
cm:	Centímetro
CMCasa:	actividad carboximetilcelulasa
CW:	pared celular
CW-P:	pared celular carente de pectina
CW-P-HC:	pared celular carente de pectina y hemicelulosa
D1:	dominio 1
D2:	dominio 2
ej.:	Ejemplo
EPS:	exopolisacáridos
EXLA:	expansina tipo α
EXLB:	expansina tipo β
EXPA:	α expansinas
EXPB:	β expansinas
Factor Nod:	factor de nodulación

FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBN:	fijación biológica de nitrógeno
GFP:	proteína verde fluorescente
Gr4:	células de <i>S. meliloti</i> Gr4
h:	Hora
H ₂ SO ₄ :	ácido sulfúrico
hrs:	Horas
KCl:	cloruro de potasio
kDa:	Kilodaltón
LCOs:	lipochitooligosacaridos
LPSs:	lipopolisacáridos
LVDT:	transductor de posición sensible
MgSO ₄ :	sulfato de magnesio
min:	Minutos
ml:	Mililitros
mM:	Milimolar
MPM:	marcador de peso molecular
N ₂ :	nitrógeno molecular
ng:	Nanogramo
NH ₄ ⁺ :	ión amonio
nm:	Nanómetro
O ₂ :	oxígeno diatómico

OD:	densidad óptica
pb:	pares de bases
Pc:	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR:	Rizobacterias promotoras del crecimiento
pH:	potencial de hidrógeno
PY:	Medio de cultivo Peptona y extracto de levadura
rpm:	revoluciones por minuto
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SI:	sin inocular
Tm:	temperatura de alineamiento
trp:	Triptófano
UDP-glucosa:	uridina difosfato glucosa
UNAM:	Universidad Nacional Autónoma de México
wt:	cepa silvestre
X- gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
YM:	manitol extracto de levadura
YMA:	agar manitol extracto de levadura

RESUMEN

Las expansinas son proteínas no hidrolíticas de la pared celular identificadas por primera vez en plantas donde están ampliamente distribuidas y participan en diversas funciones fisiológicas como el crecimiento, maduración de frutos, formación del tubo polínico, entre otros, resultado de su capacidad de unión y extensión de la pared celular, que por ser una estructura rígida requiere ser modificada en estos procesos.

En diversos hongos y bacterias se han identificado genes de expansinas, su función en estos organismos aún no está completamente clara. Mutantes nulas de expansina de bacterias promotoras de crecimiento vegetal o patógenas de plantas pierden su capacidad colonizadora o de generar síntomas de enfermedad, lo que ha llevado a pensar que pudieran participar en procesos de interacción microorganismo-planta.

De los cientos de genomas secuenciados de bacterias hasta la fecha, solo algunos (aproximadamente en 45 especies) codifican genes de expansinas; de los cuales alrededor del 50% son bacterias que tienen una relación estrecha con las plantas. Sin embargo, existen otras bacterias que se relacionan con las plantas, pero no tienen genes de expansinas presentes en su genoma, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* o *Rhizobium*, siendo este último género el estudiado en el presente trabajo.

Nuestro grupo ha trabajado con la expansina ExI1 de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, que es un patógeno de plantas y tiene una gran importancia agronómica debido a los diversos cultivos que puede infectar. Para este trabajo nos enfocamos en analizar los efectos de expresar una expansina exógena en bacterias que naturalmente no la codifican y que tienen relación con las plantas, para lo cual se clonó *PcExI1* en el vector pTB93F (pTB93-PcExI1) que es de expresión constitutiva en estas bacterias, se conjugó en las cepas de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Sinorhizobium meliloti* 1021.

Para la cepa de *S. meliloti* no se pudo comprobar la expresión de la expansina por ensayos de Western blot, mientras que *R. tropici* si expresó la expansina y fue detectada por este mismo método. Se realizaron análisis del fenotipo de biosíntesis de biofilm por ensayos de tinción de celulosa (polisacárido de mayor composición en el biofilm) utilizando rojo Congo y cristal violeta, además de ensayos de floculación. La cepa de *R. tropici* que expresó la expansina PcEx1 presentó una modesta, pero mayor producción de biofilm comparada con la cepa silvestre y los controles, mientras que análisis del mismo tipo indicaron que *S. meliloti* no presentó cambios del fenotipo de formación de biofilm.

Se analizó la colonización de las leguminosas *Phaeolus vulgaris* (frijol) y *Medicago sativa* (alfalfa), por *R. tropici* y *S. meliloti* (respectivamente) conjugadas con el gen PcEx1. Los resultados obtenidos en ambos ensayos no demostraron ningún efecto benéfico sobre la colonización en ninguno de los casos, ni tampoco efectos posteriores en el crecimiento o fenotipo de las leguminosas, lo que sugiere que el efecto sobre el crecimiento de las plantas no parece depender de la expresión de la expansina PcEx1, sin embargo, es necesario repetir los ensayos para corroborar estos resultados.

Finalmente, este trabajo constituye el primer reporte sobre una posible interacción entre una expansina y enzimas encargadas de la biosíntesis de biofilm *in vivo* de bacterias que naturalmente no las codifican, abriendo una puerta a entender más adelante el mecanismo molecular por el cual actúan las expansinas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las expansinas

Las expansinas son proteínas que afectan la estructura de la pared celular de las plantas, con un uso potencial en la agricultura y en la industria energética. Se ha propuesto que debido a la actividad relacionada con la re-estructuración de la pared celular de las plantas aflojando los polímeros que la conforman, las expansinas podrían ser usadas como un aditivo en las mezclas de enzimas hidrolíticas para la liberación de azúcares fermentables a bioetanol, siendo este un tipo de fuente de energía renovable para reemplazar parcialmente el uso de los combustibles fósiles, además que el material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y su alta disponibilidad en diversos climas y localidades. Por otra parte, existen evidencias de que las expansinas microbianas participan en el proceso de infección de plantas por bacterias promotoras del crecimiento o por bacterias patógenas, lo que las hace un blanco interesante de control biológico (Georgelis N., Nikolaidis N. y Cosgrove D. 2014) además de otros papeles biológicos que actualmente se les ha atribuido como el factor de virulencia, alérgeno de polen y potenciador de las celulasas (Cosgrove D. J. 2017). La investigación de las características mencionadas daría respuestas de una manera más precisa a la forma en la que actúan estas proteínas, para el beneficio de procesos industriales y la agricultura.

Las expansinas son proteínas con un peso molecular que varía de 23 a 28 kDa, formadas por dos dominios estructurales conservados: un sitio pseudo-activo (ya que carece de la estructura adecuada para la actividad hidrolítica) en la región amino terminal similar al de las endoglucanasas de la familia 45, llamado dominio 1 o D1; y un dominio de unión a polisacáridos constituido por una región rica en aminoácidos aromáticos hacia el carboxilo terminal y que se conoce como dominio 2 o D2. Estas proteínas cuentan con un péptido señal de exportación extracelular en el amino terminal (que las dirige hacia la pared celular de la planta o hacia el medio exterior de la célula bacteriana). Las expansinas fueron descubiertas inicialmente en algunas plantas como el arroz, maíz, *Arabidopsis* y actualmente se

sabe que están en todo el reino vegetal incluyendo los musgos (Li Y., Jones L. y McQueen-Mason S. 2003). En plantas, las expansinas se clasifican en α expansinas (EXPA), β expansinas (EXPB), expansina tipo α (EXLA) y expansina tipo β (EXLB) (Figura 1A) (Lee H. J. et al. 2010; Quiroz-Castañeda R. E. y Folch-Mallol J. L. 2011; Sampedro J. y Cosgrove D. J. 2005).

1.1.1 Expansinas de plantas

En las plantas, la pared celular es una estructura fundamental para la forma de la célula, proporciona resistencia mecánica y rigidez además de actuar como una barrera contra patógenos.

La estructura de la pared celular primaria de las plantas está formada por microfibrillas de celulosa ancladas en una matriz hidratada, integrada mayoritariamente por polisacáridos neutros y ácidos tales como pectinas, hemicelulosa (xilanos, glucanos, galactanos, mananos, fructanos, xiloglucanos, glucomananos, arabinosilanos, calosaglucanos), además de proteínas estructurales (Figura 1B) (Quiñones Valles C. 2009).

La pared celular en crecimiento tiene una combinación importante de flexibilidad y resistencia y este crecimiento de la pared se produce por deslizamiento o reordenamiento de los polímeros de la matriz que recubren las microfibrillas de celulosa manteniéndolas en su sitio; anteriormente se creía que estas modificaciones se producían principalmente por hidrólisis enzimática de los polisacáridos de la matriz y no fue hasta el descubrimiento de las expansinas que se pensó en un mecanismo diferente debido a que estas proteínas tienen como blanco los enlaces débiles que unen estas estructuras.

Las expansinas se encuentran ampliamente distribuidas en el grupo de las plantas, donde se pueden encontrar más de un gen de expansinas como lo fue en el arroz (Cho y Kende, 1997), se han identificado también genes de expansina en tomate (Rose J., Lee H. y Bennett A. 1997), fresa (Civello *et al*, 1999), soya (Downes y Crowell, 1998), en maíz (Wu et al. 2001), etcétera. Por otra parte, se sabe que la

distribución de las expansinas dentro de las plantas es muy amplia, se pueden encontrar en las fibras de algodón y en el polen, y su expresión es diferencial que depende del órgano, el tejido y la célula, además se regulan bajo condiciones hormonales específicas y factores ambientales (Cosgrove *et al.* 2002; Cosgrove 2005).

Por otra parte, se ha estudiado y analizado que las expansinas actúan en pH bajos (entre 4-7) y existe una dependencia de este factor ya que se sabe que el crecimiento celular ocurre es a estos pH ácidos: un fenómeno denominado "crecimiento ácido". Las auxinas, clásicas hormonas de crecimiento en plantas, estimulan rápidamente el crecimiento de la pared celular activando las H⁺-ATPasas de la membrana plasmática, disminuyendo el pH de la pared, activando a las expansinas que trabajan en un pH óptimo bajo (Cosgrove, D. J. 2000a) lo que apoya la afirmación de que las expansinas son los principales mediadores del crecimiento ácido y que también están asociadas con la respuesta a la sequía de las plántulas de maíz aumentando su expresión en estas condiciones.

1.1.2 Expansinas bacterianas

Como se mencionó anteriormente, las expansinas son proteínas pequeñas que están implicadas en el aflojamiento de la pared celular de las plantas y los materiales celulósicos sin actividad lítica, a pesar de que los mecanismos biofísicos siguen siendo enigmáticos debido a la limitada comprensión de la estructura de la pared celular. Estas proteínas se encuentran en los genomas de solamente algunas bacterias y hongos que tienen relación con las plantas, como patógenos, mutualistas o saprofitos (Cosgrove, D. J. 2017).

Las secuencias de expansinas en microorganismos se denominan EXLX (Figura 1A) y presumiblemente participan en la infección o colonización de plantas; por ejemplo, en el hongo *Aspergillus nidulans* se identificó una endoglucanasa hipotética que presenta un D2 similar a las expansinas (Bouzarelou *et al.* 2008); en *Trichoderma reesei* se encontró una proteína que fue denominada Swollenina que

tiene una alta homología en secuencia y en el mecanismo de acción de las expansinas canónicas (Saloheimo *et al.* 2002); estudios *in silico* en *Laccaria bicolor* identificaron diversas secuencias de expansinas (Martin *et al.* 2008). En el nemátodo *Globodera rostochiensis* (Kudla *et al.* 2005) y en la ameba *Dictyostelium discoideum* (Darley C., Li Y., Schaap P. y McQueen-Mason S. 2003), se identificaron β -expansinas y proteínas similares a α -expansinas respectivamente; en este último caso, la homología a la familia de las expansinas es alta, pero su función aún no es del todo clara.

Se ha propuesto que las expansinas microbianas actúan en las paredes celulares de la planta de la misma manera que actúan sus expansinas endógenas, interviniendo en la interfase celulosa-hemicelulosa (McQueen Mason S. J. y Cosgrove D. J. 1995), que son los polímeros que proporcionan soporte mecánico y determinan la forma de las células vegetales, y que también están involucrados en el crecimiento de la planta (Georgelis N., Nikolaidis N. y Cosgrove D. 2014). Estas proteínas rompen los enlaces no covalentes en sitios precisos (hotspots) que unen a los diferentes polisacáridos que conforman la pared celular de las plantas, sin hidrolizarlos ya que carecen de actividad lítica. La acción de las expansinas facilita el deslizamiento y la separación de las microfibrillas de celulosa en respuesta a la tensión mecánica de la pared celular, dando como resultado su relajamiento y estiramiento; se ha comprobado que paredes celulares aisladas de algunos tejidos celulares bajo la acción de estas proteínas se extiende de forma irreversible hasta dos veces, lo que supera la tasa de crecimiento normal de los tejidos vegetales vivos (Cosgrove, D. J. 2017). Por otra parte, se ha reportado que las expansinas bacterianas tienen una actividad de hasta diez veces menor que las de plantas (Quiñones Valles C. 2009; Olarte *et al.* 2014), pero es complicado entender detalles de su actividad debido a la complejidad de la estructura de la pared celular y a la falta de actividad enzimática detectable para las expansinas (Georgelis N., Nikolaidis N. y Cosgrove D. 2014).

La actividad o función de las expansinas se miden tradicionalmente por la inducción de la extensión lenta e irreversible de las paredes celulares o de otros materiales

celulósicos similares que son expuestos a tensión (por ejemplo, el papel filtro), el tratamiento con expansinas induce un comportamiento viscoso-elástico y al inactivar estas proteínas las paredes dejan de estirarse y vuelven a un comportamiento sólido pero la deformación permanece (Cosgrove, D. J. 2017).

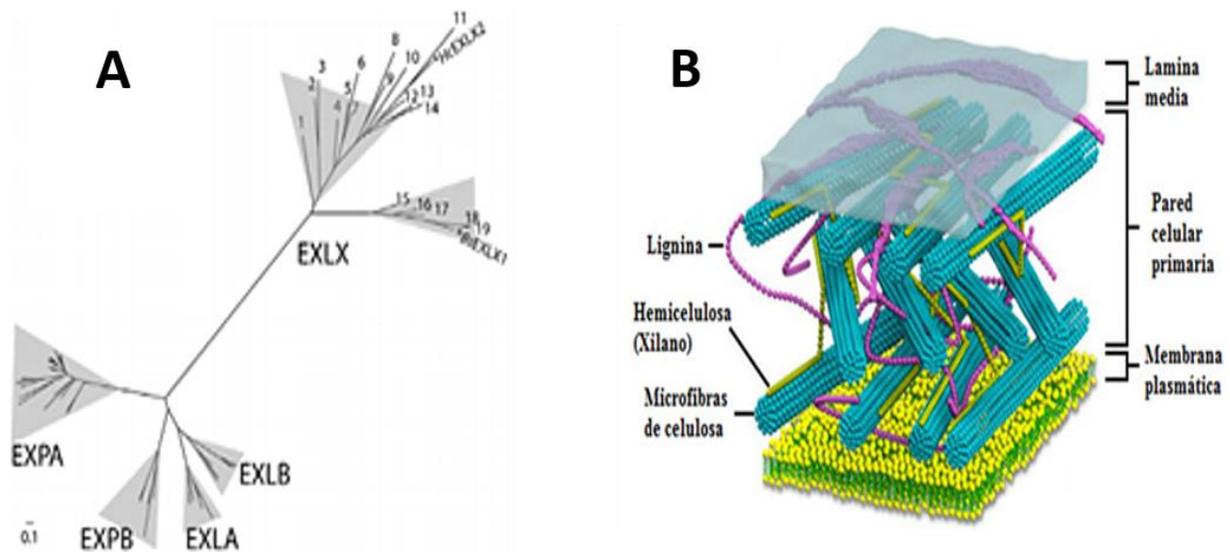


Figura 1. A) Clasificación de la familia de las expansinas de las plantas: α expansinas (EXPA), β expansinas (EXPB), proteínas tipo expansina α (EXLA) y proteínas tipo expansina β (EXLB); y EXLX de microorganismos patógenos o colonizadores de plantas (modificado de Lee H. J. et al. 2010). B) Principales componentes de la pared celular primaria de la planta (lignina, hemicelulosa, xilano, microfibrillas de celulosa).

La evidencia más clara del posible rol de las expansinas bacterianas en la infección de los tejidos de plantas se ha obtenido con EXLX1 de *Bacillus subtilis* donde la deleción de este gen (*exlx1*⁻) resulta en una capacidad reducida (>80%) de colonizar a las raíces de maíz con respecto a la cepa silvestre (Figura 2B) (Kerff et al. 2008). Mientras que en *Clavibacter michiganensis* (patógeno de plantas) se analizó un gen multimodular CelA, cuyo dominio carboxilo terminal corresponde a un módulo de expansina; versiones truncas del gen son incapaces de producir síntomas de

infección en plantas de tomate (Jahr *et al.* 2000) (Figura 2A). Estos resultados, junto con la presencia de secuencias de expansinas en otros patógenos importantes como *Xanthomonas*, *Xylella*, *Ralstonia*, etc., dan evidencia de que estas proteínas puedan tener un papel relevante en el proceso de infección, además, una comprensión más profunda de las expansinas microbianas podría beneficiar al proceso de utilización de la biomasa y el control biológico contra enfermedades de las plantas.

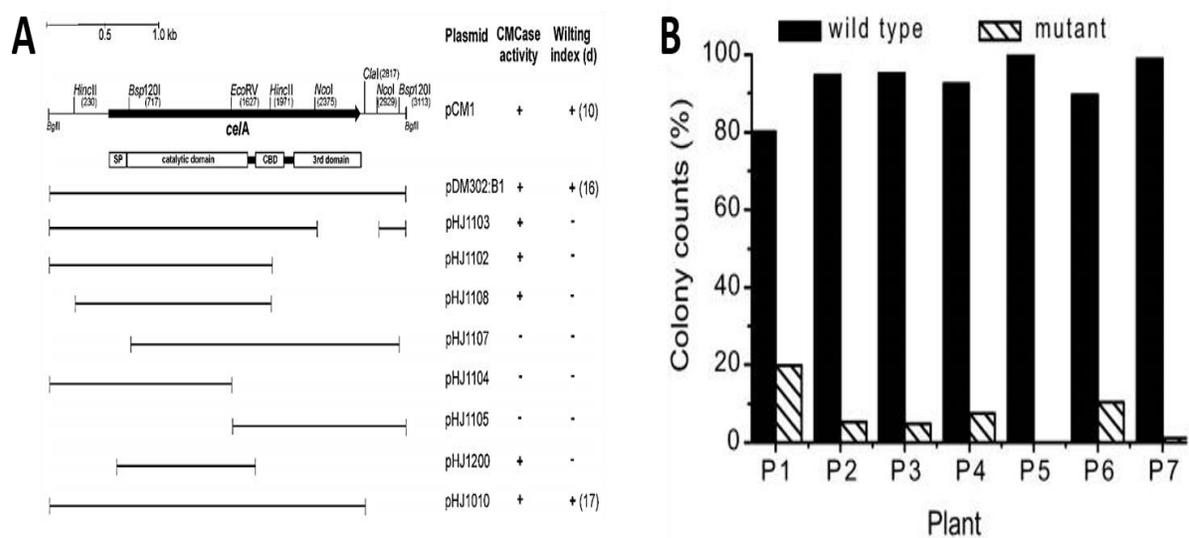


Figura 2. A) Mutantes del plásmido pCM1 con delección de diferentes segmentos de *celA* donde se comprobó la pérdida de actividad CMCasa (situada en la región amino-terminal de la proteína), la capacidad de marchitar plantas o ambas de *C. michiganensis* (Jahr *et al.* 2000). B) En esta gráfica se muestra la tasa de colonización de raíces de maíz por *B. subtilis* tipo silvestre y una mutante donde se deletó el gen de la expansina: observando una disminución de la colonización de las raíces en esta última, por lo que se concluye la importancia de este gen para la infección de las plantas (Kerff *et al.* 2008).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo a cargo de la Dra. Claudia Martínez Anaya, se caracterizó la expansina EXL1 de *Pectobacterium carotovorum* (Pc) (Figura 3A) que es un patógeno vegetal aislado de una planta de nopal (*Opuntia*)

(Olarte *et al.* 2014). PcEXL1 es una proteína ácida que une celulosa (Figura 3B) y debilita el papel filtro dependiente del residuo D82 del dominio D1, y W125, W126 y Y157 del dominio D2 (Figura 3C) (Kerff *et al.* 2008; Georgelis *et al.* 2011, Olarte *et al.* 2014). Evidencias recientes indican que esta proteína, al igual que BsEXLX1 también participa en la infección de apio y papa, ya que la sobreexpresión del gen genera mayor maceración del tejido, mientras que una mutante nula provoca menos maceración (resultados no publicados).

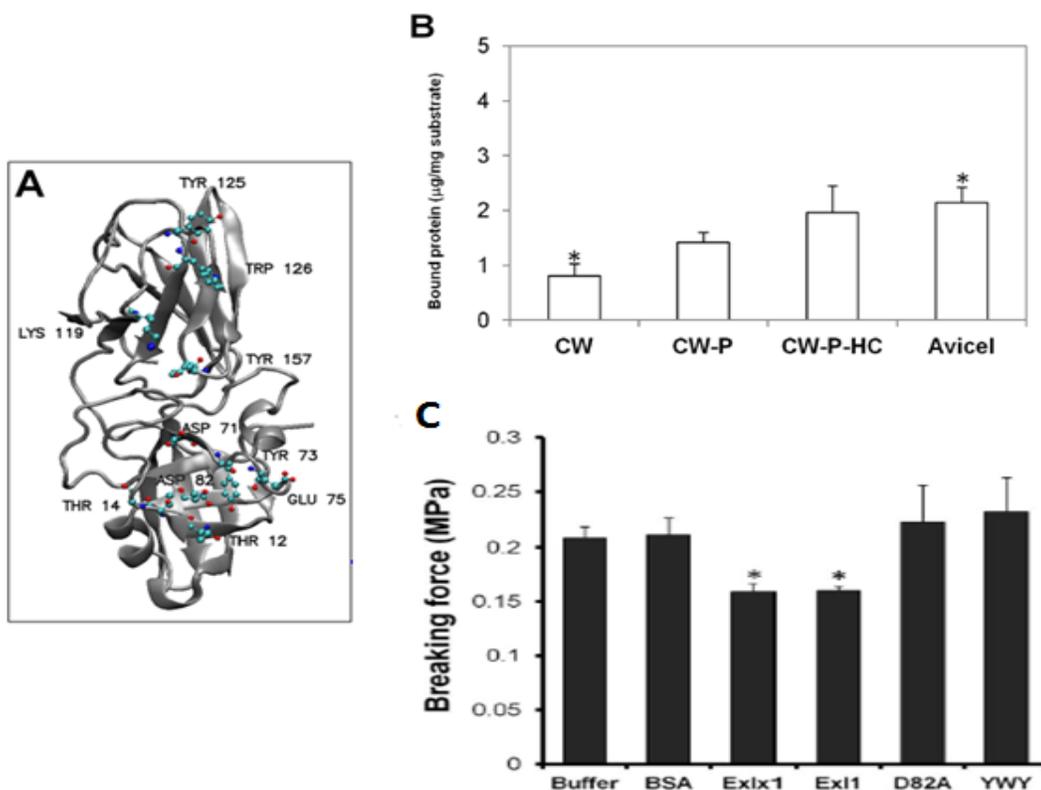


Figura 3. A) Estructura obtenida por modelaje *in silico* de la expansina de *P. carotovorum* donde se muestran los dominios que forman a la proteína: arriba el D2 de unión a celulosa (CBM), abajo el D1, en donde se encuentra el sitio pseudo-catalítico (Olarte *et al.* 2014). B) Unión de PcExl1 a diferentes sustratos, pared celular (CW); pared celular carente de pectina (CW-P); pared celular carente de pectina y hemicelulosa (CW-P-HC), Avicel. En este experimento se comprueba que PcExl1 tiene mayor afinidad a celulosa cristalina (Olarte *et al.* 2014). C) Cuantificación de la fuerza de ruptura de papel filtro al ser tratado con expansinas bacterianas Exlx1 de *B. subtilis* y PcExl1, silvestres o mutantes D82A y YWY; se observa que la actividad de la PcExl1 silvestre depende de los residuos importantes, antes mencionados.

1.2 *Rhizobium*

Las bacterias con genes de expansina en su genoma incluyen patógenas de plantas, promotoras de crecimiento, productoras de celulasas y xilanasas, etc. (Tabla 1) (Pastor N., *et al.* 2014). La actividad celulolítica o la estrecha relación de las bacterias con las plantas apoya la teoría de la participación de las expansinas durante la infección de los tejidos vegetales. Sin embargo, muchas otras bacterias que también infectan o se asocian con plantas carecen de estas proteínas, tal es el caso del género *Rhizobium*.

Estas bacterias rizobianas pertenecen a una gran variedad de especies asociadas a las raíces de las plantas y tienen la capacidad de proporcionar un efecto benéfico en su crecimiento, por lo que son conocidas como Rizobacterias Promotoras del crecimiento (PGPR por sus siglas en inglés; Sessitsch *et al.* 2002; Díaz Alcántara C. A. 2010). Las rizobacterias tienen la capacidad de inducir en las raíces de las leguminosas estructuras especializadas llamadas nódulos que son un componente esencial en el establecimiento de la simbiosis (Díaz Alcántara C. A. 2010; Cuadrado B., Rubio G. y Santos W. 2009), a través de un diálogo molecular complejo entre la raíz de la planta y las bacterias (Figura 4). Esta comunicación empieza con la liberación de metabolitos secundarios por las leguminosas que son exudados por la semilla y raíz a la rizosfera (área del suelo inmediata a la raíz), estos compuestos son principalmente de naturaleza flavonoide (naringenina, genisteína y daidzeína), además de ácidos aldónicos y betaínas, y atraen específicamente a los rizobios hacia la región apical de los pelos radiculares. Cuando la rizobia reconoce los flavonoides activa la transcripción de los genes de nodulación (genes nod), en este proceso está involucrada la proteína reguladora NodD producida por la rizobia que cambia su conformación en presencia de los flavonoides y permite la expresión de los genes de nodulación (Kamboj D. V. *et al.*, 2010). La expresión de estos genes da como resultado la producción de un conjunto enzimático para la síntesis y secreción de los factores de nodulación (factores Nod). Estos factores de nodulación son lipoquitooligosacaridos (LCOs) que consisten en un esqueleto de 3, 4 o 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina que están unidos por enlaces β -1,4 y están decorados

químicamente dependiendo de cada especie rizobiana, estas decoraciones químicas incluyen adición de grupos metilo, acetilo, sulfato, algunos ácidos grasos y azúcares modificados. Todas estas modificaciones proporcionan a cada especie rizobiana el poder para establecer la simbiosis con especies determinadas de leguminosas (Quinto C. y Cárdenas L., 2007; Gough C. y Cullimore J., 2011).

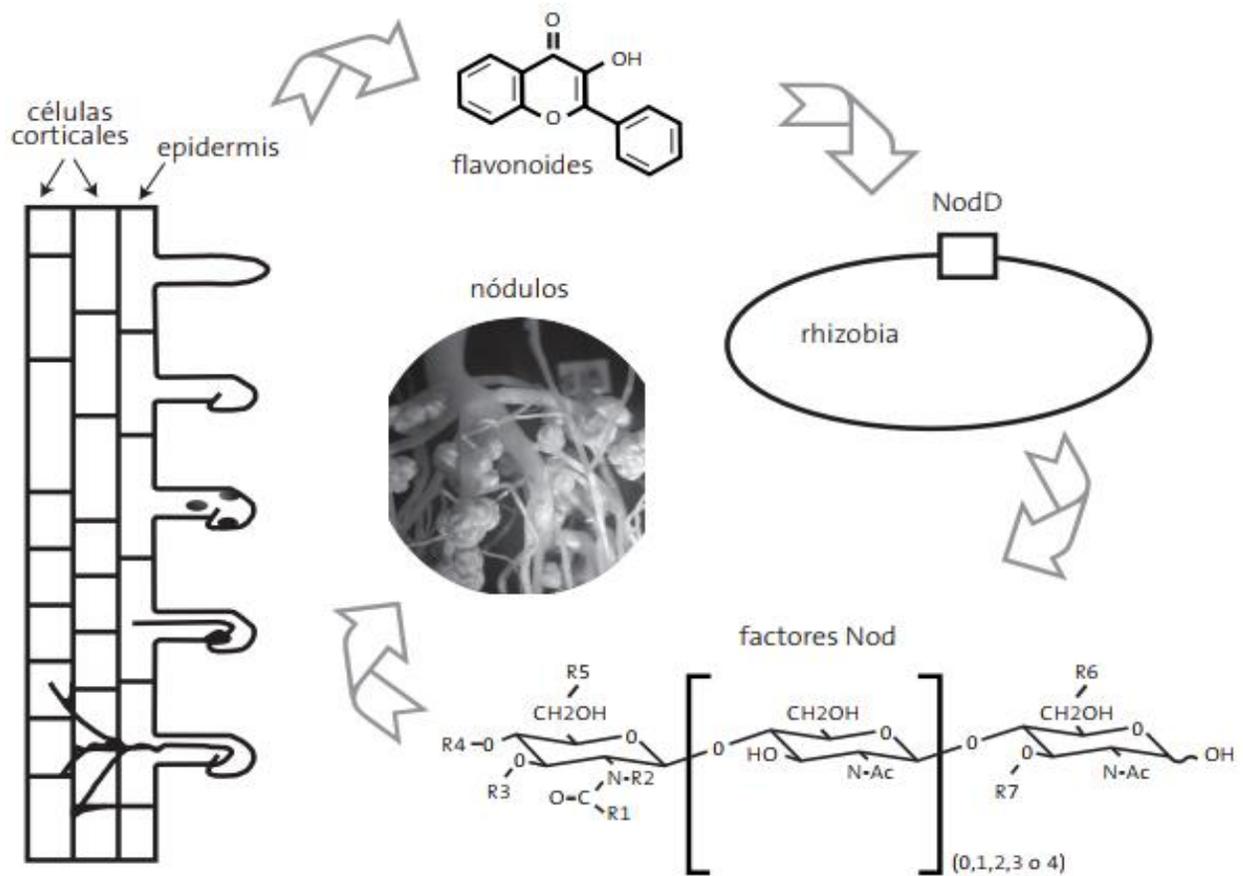


Figura 4. Diagrama general del diálogo molecular en la simbiosis planta-rizobia, donde se ejemplifican las señales implicadas para la formación del nódulo para la posterior fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Quinto C. y Cárdenas L., 2007).

Tabla 1. Ejemplos de bacterias que en sus genomas contienen genes de expansinas (Pastor et al. 2014).

BACTERIAS CON GENES DE EXPANSINA EN SU GENOMA		
Productores de celulasas o xilanasas	Patógenos de plantas	Bacterias promotoras del crecimiento
- <i>Actinoplanes missouriensis</i>	- <i>Ralstonia solanacearum</i>	- <i>Bacillus subtilis</i>
- <i>Clostridium clariflavum</i> (2 genes)	- <i>Xanthomonas oryzae</i>	- <i>Frankia sp.</i>
- <i>Amycolatopsis mediterranei</i>	- <i>Xanthomonas campestris</i>	- <i>Micromonospora aurantiaca</i>
- <i>Amycolatopsis mediterranei</i>	- <i>Xanthomonas albilineans</i>	- <i>Micromonospora sp.</i>
- <i>Paenibacillus terrae</i>	- <i>Xylella fastidiosa</i>	
<i>Sorangium cellulosum</i> (2 genes)	- <i>Dickeya dadantii</i>	
	- <i>Pectobacterium carotovorum</i>	
	- <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	
	- <i>Pectobacterium wasabie</i>	
	- <i>Clavibacter michiganensis</i> (2 genes)	
	- <i>Streptomyces scabiei</i>	
	- <i>Acidovorax avenae</i>	
	- <i>Acidovorax citrulli</i>	
	- <i>Dickeya zeae</i>	

Los factores nod al ser reconocidos por la planta huésped inducen cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radiculares de la planta formando una estructura denominada hilo de infección que es por donde se adentra la rizobia al citoplasma de la célula vegetal hasta llegar al nódulo previamente formado; es aquí donde las bacterias rizobianas sufren cambios morfológicos convirtiéndose en bacteroides en la nueva estructura llamada simbiosoma. En dicho proceso la leghemoglobina capta concentraciones parciales de O₂ lo que crea un ambiente microanaeróbico que permite la actividad de la enzima nitrogenasa del bacteroide y la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Quinto C. y Cárdenas L., 2007).

A pesar de ser bacterias simbióticas de plantas, no se han encontrado genes de expansina en su genoma, por lo que es posible que al expresar una proteína de esta naturaleza podría ayudar de alguna forma en el mutualismo y al mismo tiempo ayudaría a comprender mejor la función biológica de las expansinas.

La asociación que existe entre *Rhizobium* y las plantas leguminosas es un proceso del que se cuenta con mucha información y es de las más estudiados por su importancia agronómica, económica y social, ya que está involucrado en el cultivo de un gran número de plantas como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), alfalfa (*Medicago sativa*), etc. (Díaz Alcántara C. A. 2010). En México según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), la producción de frijol se ha incrementado en las últimas décadas ya que es importante en la canasta básica alimenticia, lo que implica una importancia económica y nutricional (FAO, 2007). La necesidad de mantener altos niveles en la producción de estos alimentos ha provocado la utilización de grandes cantidades de fertilizantes químicos, esta actividad ha desencadenado la contaminación de las tierras de cultivo y mantos acuíferos en algunas áreas.

La alternativa usada para evitar el uso excesivo de fertilizantes químicos es la utilización de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por su alta eficiencia, siendo un proceso que ha sido aplicado ya varios años para cultivos agrícolas. Este proceso es llevado a cabo por las α -proteobacterias del suelo que pertenecen a la familia de las rhizobacterias las cuales ocupan un complejo multienzimático que se

conoce como nitrogenasa que convierte el nitrógeno molecular en su forma reducida, ión amonio (NH_4^+) que es el compuesto nitrogenado asimilable; creando con la planta una simbiosis de tipo mutualista o también llamada cooperación interespecífica donde las dos especies se ven beneficiadas (Díaz Alcántara C. A. 2010).

La asociación entre *Rhizobium* y las plantas leguminosas no es obligatoria, pero ambas especies se benefician porque los microorganismos ayudan a la fijación del nitrógeno en forma de amonio útil que la planta utiliza en la síntesis de diferentes aminoácidos como la glutamina, aspartato o alanina, al tiempo que obtienen de la planta esqueletos carbonados para su metabolismo (Díaz Alcántara C. A., 2010; Lodwig E. y Poole P., 2003).

Las leguminosas (familia Leguminosae) ocupan el segundo lugar en el mundo en área de siembra total, justo después de la familia Poaceae. Una de las relaciones simbióticas más eficaces entre las bacterias fijadoras de N_2 y las leguminosas es la que se lleva a cabo entre la alfalfa (*M. sativa* L.) y *Sinorhizobium meliloti* (bacteria Gram negativa), que es un simbiote fijador de nitrógeno de crecimiento rápido; por otra parte, se ha registrado que las especies de *Medicago* tienen un grado de moderado a alto en especificidad del huésped (Silva C., Kan F. L., y Martínez-Romero E., 2006). La alfalfa es una de las leguminosas perennes con mayor importancia en la agricultura, especialmente en la ganadería en la alimentación de ganado bovino en las regiones áridas y semiáridas de México, por su excelente valor nutritivo, alto rendimiento de forraje, su valor proteico (20%) y su alta digestibilidad (Silva C., Kan F. L., y Martínez-Romero E., 2006; Mendoza *et al.*, 2010; Delić D., Stajković-Srbinić O., y Knežević-Vukčević J., 2016). Por otra parte, esta leguminosa tiene una gran importancia en la rotación de cultivos ya que enriquece el suelo con nitrógeno y tiene un efecto positivo en la estabilización de microorganismos del suelo necesarios para la mineralización de la materia orgánica.

Se considera que la fertilización simbiótica de nitrógeno puede llegar a tener beneficios importantes en el área de la agricultura, ya que su principal ventaja es la

de ser un proceso natural, cuyo uso no repercute negativamente en el medio ambiente.

La capacidad de cepas de *Rhizobium* para asociarse, promover el desarrollo y crecimiento de diferentes plantas se ha estudiado para entender si la fijación de nitrógeno podría suceder en plantas no leguminosas y obtener los beneficios propios de una simbiosis cotidiana.

1.3 Biofilm

Los biofilms son comunidades bacterianas (que pueden contener una o más especies, característicos en condiciones naturales) contenidas en una matriz polimérica extracelular producida por las mismas células, para lo que se necesita la unión inicial a una superficie donde comienza la formación de microcolonias, posteriormente continua con la maduración donde se secretan los exopolisacáridos que constituyen el biofilm y finalmente la migración que permite la liberación de bacterias para la colonización de otra superficie (Russo D. M. *et al.*, 2015) (Figura 5). La mayoría de las bacterias forman biofilm y este modo de crecimiento multicelular predomina en la naturaleza, ya que es un probable mecanismo protector contra condiciones ambientales poco favorables que permite a las bacterias no esporulantes unirse a superficies bióticas y abióticas (Rinaudi L. *et al.*, 2006; Dixit S. *et al.*, 2017). Las rizobacterias no son la excepción, por lo que también son productoras de biofilm.

Para entender como es la unión de las bacterias rizobiales a las raíces y la importancia de este proceso para el paso siguiente de nodulación, se han realizado diversos estudios indirectos que miden las características del biofilm que producen usando bacterias radiomarcadas, ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y otros ensayos biológicos en los que se estima el número de bacterias unidas *in situ* por alguna característica que se lo permita; por otra parte están los métodos de observación directa de los cuales destacan la microscopía confocal, microscopía

electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido (Rinaudi L. *et al*, 2006).

Por otra parte, otros estudios analizan la producción de biofilm por las bacterias rizobianas y su implicación en la colonización de las raíces ya que sólo una fracción de los rizobios del suelo pueden colonizar las plantas huésped, lo que sugieren que deben tener alternativas para sobrevivir en diferentes ambientes y en diferentes condiciones (Russo D. M. *et al.*, 2015).



Figura 5. Etapas en el proceso de formación de biofilm. 1: Adherencia de las bacterias a la superficie, posteriormente se comienzan a dividir y se extienden formando una micro colonia similar a lo que ocurre en placas de agar. 2: La bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm (en bacterias rizobianas el principal constituyente es la celulosa). 3: Por último, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan para poder iniciar el proceso de colonización y desarrollo de biofilm en otra superficie (Lasa I. *et al.*, 2005).

Algunos de los componentes característicos de los biofilms incluyen exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPSs), glucanos β -1,2-cíclico y señales funcionales bacterianas, pero uno de los principales componentes y de mayor abundancia son las fibrillas de celulosa que son las responsables de la adhesión firme de las bacterias a los pelos de las raíces (Robledo M. *et al*, 2012; Dixit S. *et al*, 2017). En diversas bacterias incluidas rizobiales, se ha identificado una región en el cromosoma involucrada en la biosíntesis de celulosa que conforma el biofilm,

denominada *celABC* que codifica para las proteínas CelA, CelB y CelC. La proteína CelA es homóloga a las glucosil transferasas, mientras que CelC es homóloga a las endoglucanasas.

El primer gen del operón es *bcsA* (síntesis de celulosa bacteriana) también llamado *acsA* o *celA*, codifica para una celulosa sintasa la cual tiene un dominio β -glucosiltransferasa 2 y se une al sustrato UDP-glucosa, es también la proteína más conservada codificada por el operón *absA* entre las diferentes especies. El segundo gen es *bcsB* (*acsB* o *celB*) que codifica para una proteína de unión a ácido diguanílico cíclico (c-di-GMP) la cual está menos conservada; finalmente el último gen *bcsZ* que también se denomina *celC* en otras bacterias (*Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) codifica para una celulasa de la familia 8 de las glucosil hidrolasas presente en todas las especies productoras de celulosa (Robledo M. *et al*, 2012).

En las bases de datos se puede encontrar que todos los genomas de las Rhizobiaceae poseen genes que codifican la celulosa sintasa (GT2) y curiosamente estos genes se encuentran localizados cerca de los homólogos a la endoglucanasa CelC (perteneciente a la familia de glicosil hidrolasas 8) que forman el operón *celABC* o cerca de genes de celulasa de la familia glicosil hidrolasa 26 (Robledo M. *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

En trabajos previos realizados por nuestro equipo de trabajo se construyó el plásmido pBBR1MCS2-Cel-PcEx1 donde se clonó el gen de la expansina Ex11 de *P. carotovorum*, con un péptido señal de CelC2 de *R. leguminosarum* bv *trifolii*, que permitió expresar Ex11 en células de *Escherichia coli* BL21 DE3, obteniéndola tanto en el periplasma como en el medio de cultivo (figura 6A y 6B), en forma activa ya que fue capaz de unir celulosa cristalina (Avicel) (Figura 6C). Este plásmido se transfirió por conjugación biparental a *R. tropici* para infectar plantas de frijol y analizar las características fenotípicas de las plantas.

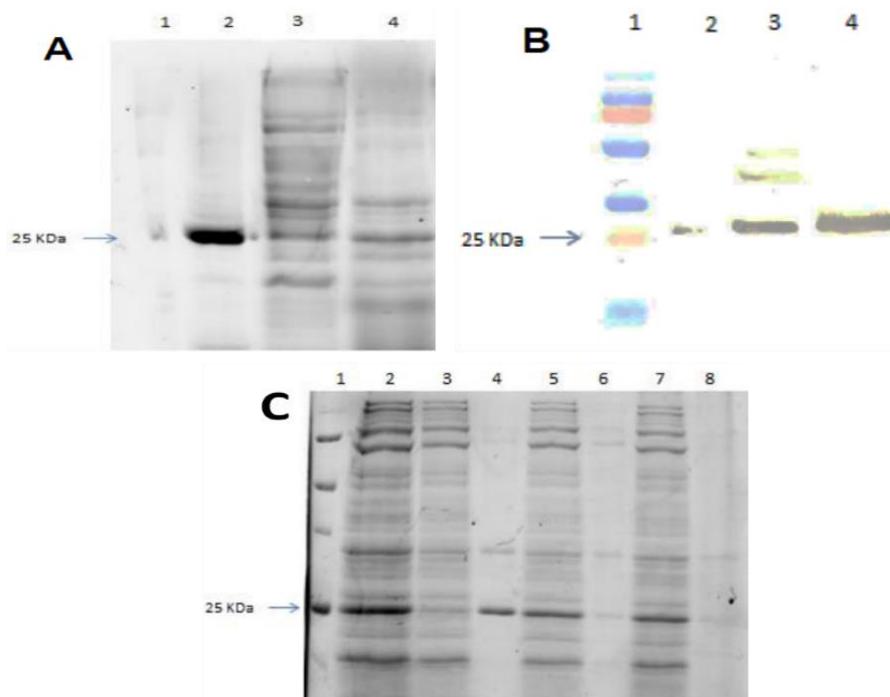
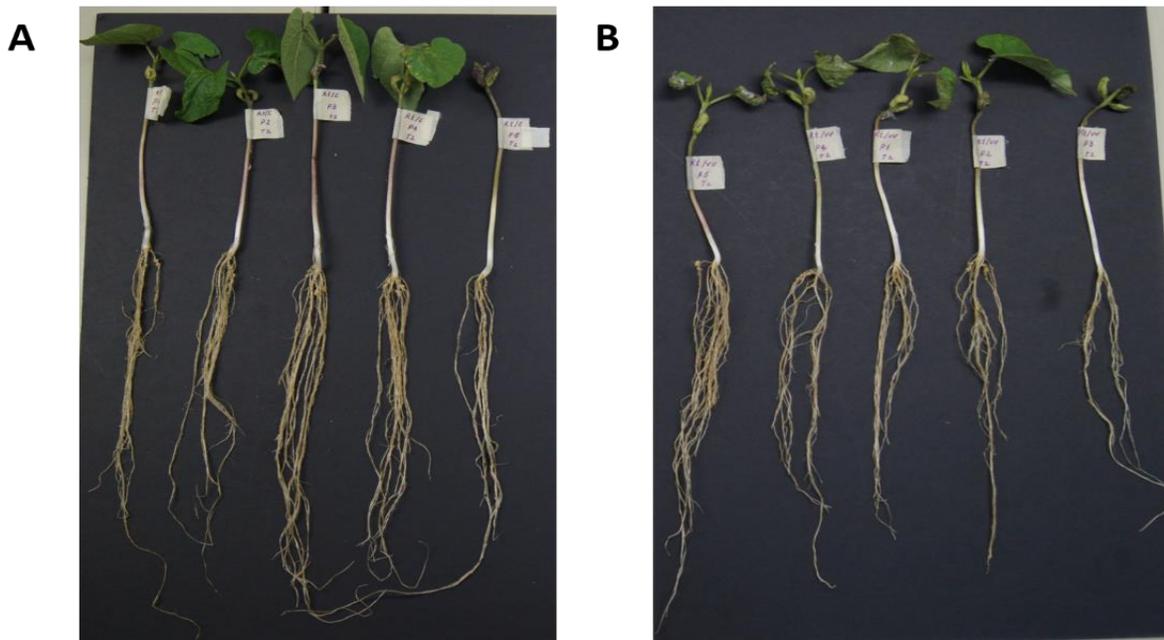


Figura 6. A) Análisis por SDS-PAGE al 12% de la expresión de la proteína PcEx11 en *E. coli* BL21-DE3. Carril 1: MPM; 2: PcEx11 purificada usando el plásmido pET22-PeIB-PcEx11; 3: Lisado celular de *E. coli* BL21 con pBBR1MCS2-Cel-PcEx11; 4: Medio de cultivo de *E. coli* BL21 con pBBR1MCS2-Cel-PcEx11. B) Análisis por *Western-blot* de la expresión de la proteína PcEx11 en *E. coli* BL21. El orden de los carriles es igual que en (A). C) Análisis por SDS-PAGE al 12% de la funcionalidad de la expansina en unión a celulosa (Avicel), pared celular de trigo y papel filtro. Se incubó el medio de cultivo concentrado con los sustratos durante una hora y se centrifugó, después se analizó el sobrenadante de esa incubación (carriles 3, 5 y 7) y el

precipitado (4, 6 y 8). Carril 1: MPM; 2: sobrenadante del medio de cultivo concentrado; 3: Sobrenadante de Avicel; 4: proteína unida a Avicel; 5: Sobrenadante de papel filtro; 6: proteína unida al papel filtro; 7: Sobrenadante de pared celular de trigo; 8: proteína unida a la pared celular de trigo (Datos no publicados).

Resultados preliminares del efecto de la expresión de PcExl1 por parte de las bacterias en el crecimiento de su planta hospedera, mostraron plantas con mejor follaje y tamaño cuando fueron inoculadas con el plásmido que expresa PcExl1 en comparación con el plásmido vacío o con plantas no inoculadas (Figura 7). Sin embargo, este fenotipo no pudo repetirse en dos experimentos subsecuentes debido en parte a la variabilidad intrínseca de las plantas de frijol, pero también podría ser debido a una muy baja expresión de la proteína PcExl1, que no pudo ser observada en ensayos de *Western blot* a pesar de que determinamos que el gen sí se transcribe (Figuras 8 y 9, respectivamente). Proponemos que al lograr una mejor expresión de *PcExl1* (al expresarlo bajo un promotor constitutivo fuerte) en *Rhizobium*, el fenotipo será más claro.



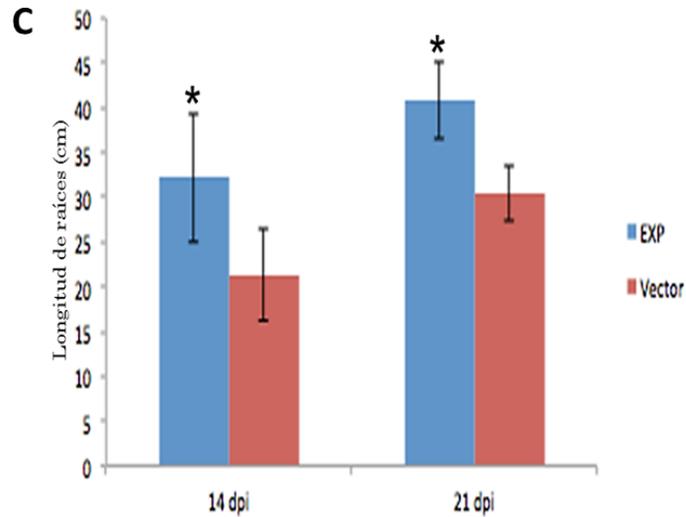


Figura 7. A) *P. vulgaris* inoculadas con células de *R. tropici* CIAT 899 con el plásmido pBBR1MCS2-Cel-PcExl1 presentan un mejor follaje que las plantas inoculadas con *Rhizobium* que tiene un vector vacío como control (B). C) En la longitud de las raíces se observó el mismo efecto que en el follaje, las cuales fueron analizadas a los 14 ($p=0.0255$) y 21 ($p=0.007$) días post-inoculación (ANOVA de una vía) (Datos no publicados).

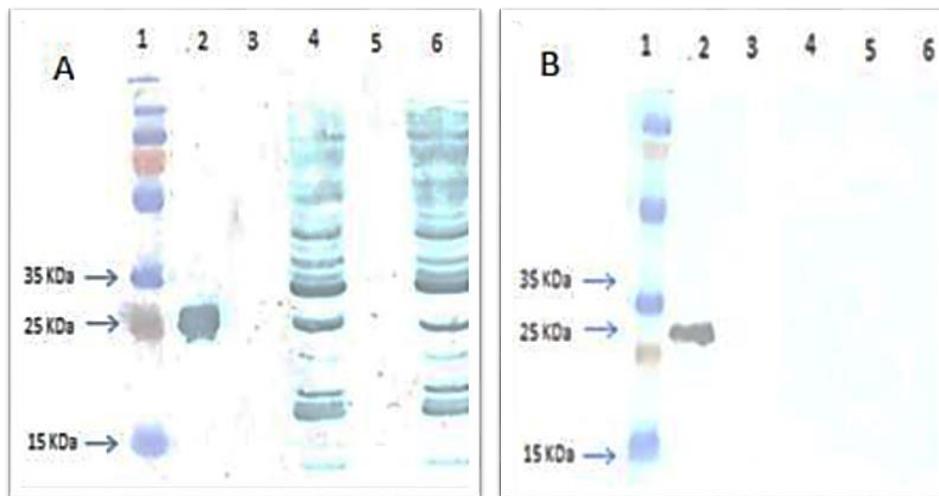


Figura 8. A) Análisis por *Western-blot* de la expresión de la expansina PcEXL1 en células de *R. tropici* con una dilución de anticuerpo de 1: 30 000. Carril 1: MPM, 2: PcExl1 purificada a partir del plásmido pET22-PeIB-PcExl1; 3: Medio de cultivo de *R. tropici* con pBBR1MCS2-Cel-PcExl1, 4: Lisado celular de *R. tropici* con pBBR1MCS2-Cel-PcExl1, 5: Medio de cultivo de *R. tropici* silvestre, 6: Lisado celular de *R. tropici* silvestre. B) Análisis por *Western-blot* de la expresión de la expansina PcEXL1 en células de *R. tropici* con una dilución de anticuerpo de 1: 40 000, carriles iguales que en el experimento (A) (Datos no publicados).

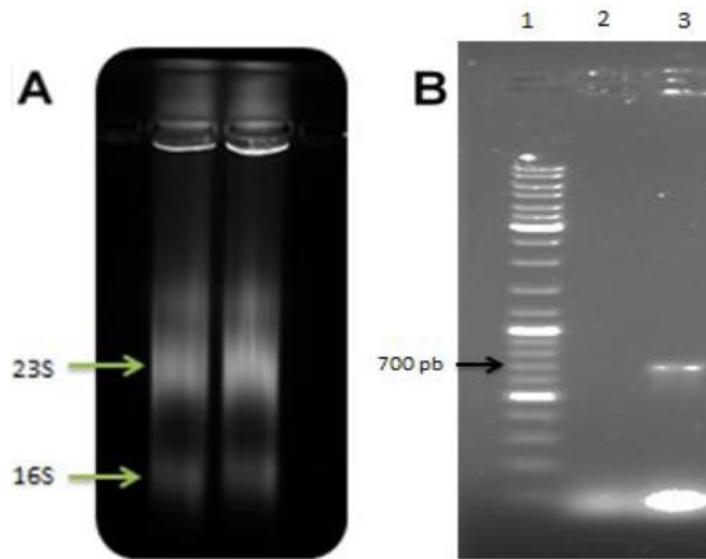


Figura 9. A) Análisis de ARN total extraído de *R. tropici* por gel de agarosa/formaldehído al 1%. Se comprobó la integridad del ARN teniendo las dos bandas correspondientes al RNAr subunidad 16S y 23S, esta última con una intensidad del doble de la subunidad 16S. B) Análisis por gel de agarosa 0.1% de productos de PCR donde se amplificó cADN para comprobar la presencia de transcrito de PcEXL1. Carril 1: MPM (GeneRuler™ DNA Ladders Mix), 2: *R. tropici* silvestre, 3: *R. tropici* con pBBR1MCS2-Cel-PcExl1.

Se ha propuesto la relevancia del papel que juegan las expansinas en conjunto con otras proteínas, especialmente con celulasas, en procesos fisiológicos dadas las características de acción que tienen las expansinas de plantas y que podría atribuirse también a las expansinas de diferentes microorganismos; aunque todavía se requieren mayores evidencias de esta hipótesis.

Muchos reportes informan que la adición de expansina (principalmente de plantas) puede magnificar la actividad de las celulasas de 20% hasta el 100%, por ejemplo, la expansina purificada del pepino mostró una mejora en la acción de la celulasa sobre Avicel (celulosa comercial) (Cosgrove, 2001); la β -expansina de polen de maíz (*Zea mays*) a pequeñas cantidades (0.1 mg por gramo de celulosa) muestra un pequeño cambio pero aparentemente real en la velocidad de conversión de celulosa en azúcares (Baker, *et al.*, 2000). También se ha expresado la α -expansina de tomate (LeEXPA2) en la levadura *Pichia pastoris* aumentó la hidrólisis de

celulosa (con una conversión <1%) en mezclas de reacción con papel filtro/celulosa (Liu, *et al.*, 2014). Se comprobó que las expansinas endógenas de pepino y avena a pH bajo inducen una extensión en paredes celulares de hipocótilos y paredes celulares de coleóptilo (respectivamente), medidos con un extensómetro bajo una fuerza de extensión constante (Figura 10).

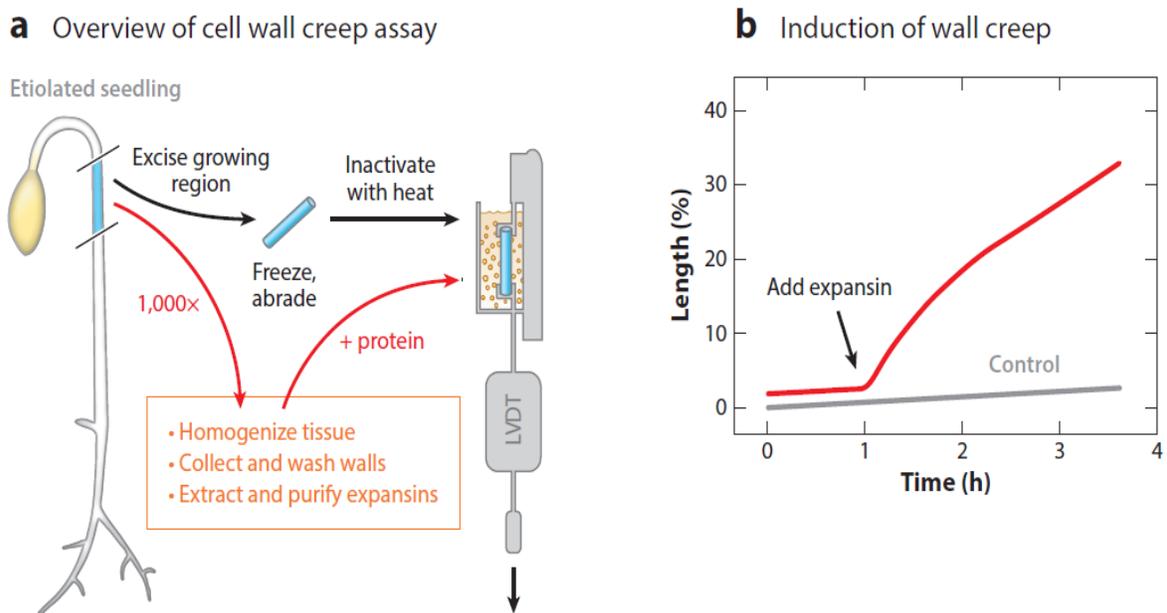


Figura 10. Diagrama esquemático del ensayo "creep" en paredes celulares de planta originalmente usado para probar e identificar expansinas de plantas, basados en McQueen-Mason et al. (1992). a) Una muestra de la pared celular (azul) se prepara a partir de la región de crecimiento de una plántula joven (por ejemplo, un hipocótilo etiolado de una plántula de pepino) y sujeta en un extensómetro a una fuerza constante que mide los cambios en la longitud de una muestra de pared celular con un transductor de posición sensible (LVDT). (Recuadro naranja) Las expansinas son extraídas de una gran masa de tejido de hipocótilo y añadidas a la cubeta que rodea a la muestra de pared celular. b) Curso de tiempo para observar los cambios de la longitud de la pared celular en una muestra control de pared celular no tratada y una muestra de pared celular tratada con α -expansina de planta. La expansina induce rápidamente, irreversiblemente y por tiempo-dependiente una extensión (*creep*) en la pared celular. (Figura tomada de Cosgrove D. J. 2017)

Se tiene conocimiento de que la expansina del hongo basidiomiceto *Schyzophyllum commune* ha reportado un pequeño aumento de actividad sinérgica con celulasas y quitinasas después de 24 horas de pretratamiento con la proteína sobre fibras de algodón (Tovar-Herrera, *et al.*, 2015); este es el único reporte de acción sinérgica de una expansina de hongo con enzimas hidrolíticas. A las expansinas bacterianas aún no se les ha podido comprobar esa característica sinérgica con otras enzimas celulolíticas, además de que se ha comprobado que tienen 10 veces menor actividad que las expansinas de plantas en ensayos de debilitamiento y extensibilidad de la pared celular de plantas (*creep*), lo que pudiera ser la razón de la falta de efecto. Otra posibilidad es que el efecto sinérgico se pueda visualizar en experimentos *in vivo*, en condiciones naturales como por ejemplo en procesos de colonización de plantas por bacterias con otras capacidades hidrolíticas necesarias dependientes de expansinas que aún no se hayan identificado. Es por esta razón que las bacterias de la familia Rhizobiaceae son un buen modelo para analizar esta hipótesis, ya que no se han encontrado genes de expansinas en su genoma, por lo que resulta interesante analizar el efecto de la expresión heteróloga de una expansina en estas bacterias sobre el crecimiento de las leguminosas con las que realizan simbiosis.

Tomando en cuenta lo anterior, se sabe que *Rhizobium* produce una celulasa (CelC2 celulasa rhizobiana) que está implicada en la relación simbiótica *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843-*Trifolium repens* (trébol blanco); el sustrato específico de esta celulasa es la celulosa no cristalina o amorfa. Se han propuesto dos roles importantes para la celulasa, el primero tiene que ver con la adhesión de la bacteria a la superficie de la planta y el pelo radicular, ya que está implicada en la modificación de la longitud de las microfibrillas de celulosa que son importantes en la correcta formación del biofilm. Robledo *et al.* (2012) realizaron una comparación de la producción de biofilm con una tinción de rojo Congo de cepas del género *Rhizobium* (Figura 11a), además, realizaron mutantes de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 (Figura 11a, parte inferior) eliminando el gen de la celulasa y también realizaron la sobre-expresión de la misma, en la mutante nula (ANU843 Δ C2) que presentó un color rojo más intenso comparado con la cepa

silvestre, indicando un exceso de producción de biofilm ya que se había perdido el control en la longitud de las cadenas de celulosa; por otra parte, la cepa sobre-expresante (ANU843C2⁺) tuvo una tonalidad mucho más clara debido al exceso de actividad celulasa y la incapacidad de formar biofilm con características parecidas a la cepa silvestre.

El segundo rol está relacionado con la infección primaria, ya que *celC2* es esencial para la entrada del rizobio erosionando la pared celular en el ápice de los pelos radiculares. Esta erosión es controlada y permite la entrada de la bacteria a la planta hospedera para iniciar el proceso de infección y la posterior liberación de las bacterias de los hilos de infección hacia los nódulos (Robledo M. et al. 2011; Robledo M. et al. 2012; Gutiérrez E. M. 2014). La comparación de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 silvestre y el knock-out de *celC2* mostró un pobre crecimiento del trébol blanco infectado con la cepa mutante (Figura 11b) (Robledo et al. 2008).

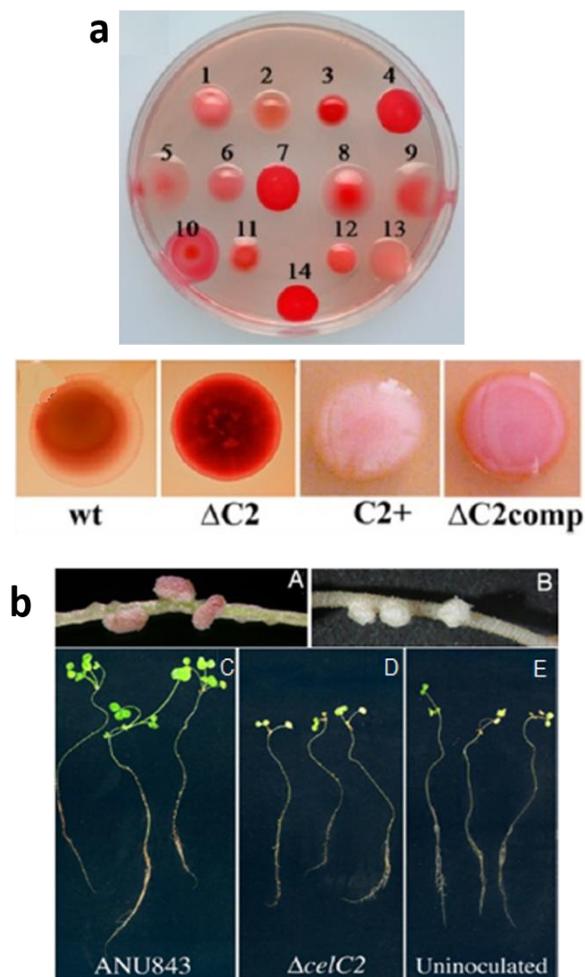


Figura 11. a) Absorción de rojo Congo por colonias simbiotes de leguminosas formadoras de nódulos de raíz, cepas representativas del género *Rhizobium*: 1. *R. hainanense* I66T, 2. *R. leguminosarum* ATCC10004T, 3. *R. galegae* ATCC 43677T, 4. *R. etli* CFN 42T, 5. *R. lusitanum* P1-7T, 6. *R. loessense* CCBAU 7190BT, 7. *R. giardinii* H152T, 8. *R. mongolense* USDA 1844T, 9. *R. indigoferae* CCBAU 71042T, 10. *R. tropici* CIAT 899T, 11. *R. yanglingense* CCBAU 71623, 12. *R. huatlense* SO2T, 13. *R. gallicum* R602spT, 14. *R. cellulosilyticum* ALA10B2T. En la parte inferior se muestra la cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. (silvestre) y sus derivados ANU843ΔC2 (ΔC2), ANU843C2+ (C2+) y ANU843ΔC2 complementado (ΔC2comp) (Tomada y modificada de Robledo et al., 2012). b) Nodulación de la raíz de trébol blanco con las células ANU843 wild-type con coloración rosada característica de la fijación del nitrógeno (A); la mutante celC2- provocó nódulos blancos indicando la nula invasión de las raíces por parte de *Rhizobium* (B). Se ve un mayor crecimiento de la planta inoculada con la cepa ANU843 wild-type (C) en comparación con la mutante celC2- (D) y un control no inoculado (E) (Tomada y modificada de Robledo et al. 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Los análisis de actividad de aflojamiento de las paredes celulares por parte de expansinas bacterianas en reacciones *in vitro*, no permite saber el mecanismo por el cual pudiera relacionarse con el proceso de infección por parte de especies simbiotes o patógenas. Por esta razón es necesario caracterizar el efecto producido al mutar los genes de expansina, o analizar el efecto de expresarla en un organismo que naturalmente no codifica expansinas, para en su caso caracterizar el fenotipo resultante que pueda dar pistas sobre otros componentes involucrados en el proceso.

4. HIPÓTESIS

La sobre expresión de la expansina Ex11 de *Pectobacterium carotovorum* (PcEx11) en células de *Rhizobium* tendrá un efecto positivo en la colonización de raíces de las leguminosas, que se verá reflejado en el fenotipo de la planta, teniendo un mejor crecimiento.

5.OBJETIVO GENERAL

Expresar la expansina exógena Exl1 de la bacteria patógena de plantas *Pectobacterium carotovorum*, en células de *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium* y caracterizar el fenotipo de formación de biofilm y colonización de las leguminosas *Phaseolus vulgaris* y *Medicago truncatula*, respectivamente.

6.OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtener una construcción que permita la expresión del gen Exl1 de *Pectobacterium carotovorum* en células de *Rhizobium*.
- ❖ Determinar el efecto de la expresión de la expansina Exl1 por células de *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium* sobre la formación de su biofilm.
- ❖ Determinar el efecto de la expresión de la expansina Exl1 por células de *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium* sobre el crecimiento de leguminosas.
- ❖ En caso de observar algún fenotipo, caracterizarlo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Clonación de PcExl1 en un vector de expresión constitutiva

Se realizó la amplificación del gen de la expansina Exl1 de *P. carotovorum* a partir del plásmido pBBR1MCS2-Cel-PcExl1 por reacción de cadena de la polimerasa (PCR) con los oligonucleótidos Exl1 *Xho* I pBBR1 (5'-ctc gag tgc gcg gcc gct taa agc-3') y Exl1 pET22 *Sal* I (5'-gtt gtt gtc gac taa ctt taa gaa gga gat ata cat-3') que incluyen secuencias de restricción para *Xho*I y *Sal*I respectivamente (T_m de alineamiento= 52 °C). El fragmento amplificado se purificó de banda con el Kit High Pure PCR Product Purification de ROCHE y se mandó a secuenciar para descartar cualquier mutación en el proceso de amplificación.

Posteriormente el gen se clonó en el vector intermedio pCR™2.1-TOPO® de Thermo Fisher Scientific, donde se interrumpe el gen *lacZ* lo que evita la degradación de X-gal y sirve como indicador de aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa, las células que tuvieron el gen interrumpido tuvieron una coloración blanca y se seleccionaron como positivas a tener el inserto.

Teniendo esta construcción se realizó una doble digestión en los vectores TOPO y pTB93F con las enzimas *Xho*I y *Sal*I a 37°C por una hora. Del vector TOPO se obtiene el gen de la expansina y la doble digestión en pTB93F es con el fin de quitar el gen de la GFP y por ligación introducir el gen de la expansina.

La ligación se hizo con ayuda del programa NEBioCalculator™ de NEW ENGLAND BioLabs, se utilizaron \approx 60 ng del gen de la expansina Exl1 y \approx 100 ng de pTB93F (relación 5:1 respectivamente) y se incubó a 22°C por una hora.

Se transformaron células de *E. coli* XL1Blue y se seleccionó con los antibióticos cloranfenicol, espectinomicina y estreptomycin. Para confirmar la presencia del inserto se realizó una doble digestión con *Xho* I y *Sal* I a 37°C por una hora.

7.2 Conjugación del plásmido pTB93-PcEx11 en células de *Rhizobium*

Una vez habiendo comprobado la correcta clonación del gen de PcEx11 en el plásmido pTB93, se realizó la conjugación biparental utilizando la cepa quimiocompetente S17.1 de *E. coli* como cepa donadora para transferir el plásmido pTB93-PcEx11 y el plásmido pTB93F (que se utilizará como control en experimentos posteriores) a células de *R. tropici* y *S. meliloti*, la primera que coloniza *P. vulgaris* (frijol) y la segunda al género *Medicago*.

Se analizó la expresión de la expansina mediante ensayos de Western blot, de las células de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11 o con el plásmido pTB93-GFP como control negativo, para lo que se incubaron cultivos celulares de 10 ml en medio PY líquido, se toman 2 ml, se centrifugan a 14 000 rpm, se retira el sobrenadante y se guarda, mientras que el pellet se resuspendió en reactivo BugBuster® Master Mix (Millipore SIGMA) para la lisis celular que permite una recuperación máxima de la proteína soluble activa tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, las muestras obtenidas se corren mediante SDS-PAGE al 10% para su análisis por *western blot* con un anticuerpo específico para la proteína PcEx11 (GenScript).

7.3 Análisis de la producción de biofilm

Una vez que se tuvieron células conjugantes con el plásmido experimental y el control, se realizó el análisis cualitativo de producción de biofilm formado por las bacterias en cajas Petri conteniendo cultivos celulares en medio YMA (Yeast Manitol Agar) a las cuales se les añadió 6.25 mg/l de rojo Congo que tiñe la celulosa, principal componente del biofilm, sintetizado por las bacterias. No se agregó antibiótico a las placas (debido a que la cepa silvestre no tiene plásmido) y se analizó el color de la colonia formada al inocular las cepas en una gota de 5 µl con una densidad óptica ajustada a 0.2 y se incubó a 30 °C por 5 días (Robledo *et al.*, 2012). Se tomaron fotos y se analizaron.

Para el primer análisis cuantitativo se realizaron ensayos de floculación, para lo cual se crecieron la cepa de *S. meliloti silvestre* y sus conjugantes en medio PY durante dos días, posteriormente se ajustó una densidad óptica de aproximadamente 0.6 en 10 ml de medio YM (Yeast Manitol). Se dejaron 24 horas a temperatura ambiente a 1 xg y se midió la densidad óptica del sobrenadante pasado el tiempo de incubación (Robledo *et al.*, 2012).

Para el segundo análisis cuantitativo, las cepas de *S. meliloti* se crecieron en medio PY durante dos días, posteriormente realizó una dilución con medio YM para obtener una $OD_{600}=0.2$ (1×10^7 células/ml). Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos (Corning Incorporated, Costar® 3599) donde se agregaron 150 μ l del cultivo celular a la densidad óptica mencionada, se sellaron con parafilm y se incubaron a 30 °C durante 24, 48, 72 y 96 horas. Pasados los diferentes tiempos de incubación se removió el medio de cultivo y las células no unidas a los pozos, el biofilm adherido a la pared de los pozos fue cuantificado por tinción con cristal violeta al 0.3% (peso/volumen) por 10 minutos, después de lavar el exceso de colorante con agua destilada tres veces se solubilizó con una solución de etanol-acetona (80%-20%). La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 570 nm (Robledo *et al.*, 2012).

7.4 Ensayos de colonización de *P. vulgaris* con *R. tropici*

Con las cepas conjugantes con los plásmidos pTB93F *PcEx11* y pTB93F de *R. tropici* CIAT899 se realizó la colonización de plantas de *P. vulgaris* (frijol común) siguiendo el protocolo a continuación descrito:

7.4.1 Método de esterilización y germinación de las semillas

Se utilizaron semillas de frijol negro Jamapa de la marca Verde Valle, se escogieron las mejores semillas en apariencia visual (forma, cutícula intacta, color negro), se lavaron en una solución de 20% cloro (marca Cloralex ®) durante 20 minutos y posteriormente se lavó con bastante agua para quitar cualquier residuo de cloro. En

charolas de metal estériles y con tapa de aluminio se colocaron servitoallas en el fondo y, posteriormente se agregó medio *Fahraeus* sin nitrógeno hasta quedar totalmente humedecidas; sobre estas se colocaron las semillas de forma ordenada (se realizó una segunda selección de las mejores semillas después del tratamiento de esterilización ya que muchas sufren daños que disminuyen la viabilidad) dejando espacio de 5-7 cm entre cada una, se taparon con aluminio y se dejaron crecer a 30 °C en incubadora durante 2 días, tiempo en el que la raíz alcanzó una longitud de aproximadamente 2 cm.

7.4.2 Preparación de las macetas con vermiculita

Se utilizaron macetas de plástico de aproximadamente 10.5 x 15 centímetros (largo x ancho) a las cuales se les agregó vermiculita como material de soporte completamente lleno, se lavó con agua destilada para quitar las partículas más finas y que quedara humedecida perfectamente la vermiculita, se compacta lo mejor posible y se tapa con papel aluminio para esterilizar.

7.4.3 Inoculación de las plantas

Dos días posteriores de haber germinado las semillas, éstas se colocaron en las macetas haciendo un hueco en la vermiculita, e introduciendo la semilla con la raíz hacia abajo dentro del hueco, se colocaron 3 plántulas por maceta.

Para la inoculación de las raíces se crecieron los cultivos bacterianos toda la noche hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.7 nm (fase exponencial), estos fueron diluidos con medio *Fahraeus* sin nitrógeno a 0.05 nm y se inoculó cada planta con un mililitro de esta dilución directamente sobre la raíz y su alrededor, se cubrió el hueco con la vermiculita y se incubaron en invernadero a temperatura controlada de 25 °C durante 21 días. Pasado 3 días post inoculación se regaron las plantas con 20 ml de medio *Fahraeus* sin nitrógeno por planta y posteriormente se regaron cada tercer día (ej. Lunes, miércoles y viernes).

7.5 Ensayos de colonización de *M. sativa* con *S. meliloti*

También se realizó la conjugación en *S. meliloti* proporcionada por el Doctor Oswaldo Valdez López de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, con estas tres cepas se realizó el ensayo de colonización en plantas de *M. sativa* c.v. Moapa siguiendo el protocolo indicado a continuación (Olivares *et al.*, 1980):

7.5.1 Método de esterilización y germinación de las semillas

Las semillas de *M. sativa* se lavaron con ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) durante 15 min en un matraz, pasado ese tiempo se lavaron tres veces con agua estéril. Posteriormente se agregó una solución de Cloralex (Cloro comercial) al 25% y se dejó durante 15 min, posteriormente fueron lavadas cinco veces con agua estéril; finalmente las semillas se colocaron en placas de agua-agar al 1.5%, se cubrieron con papel aluminio y se incuban a 4 °C hasta tener una raíz de aproximadamente 1 cm de largo (4-7 días).

7.5.2 Preparación de los tubos de vidrio con las plantas

Se utilizaron tubos de ensaye de 20 cm de largo por 2.2 cm de diámetro, dentro de los cuales se puso un pedazo de papel filtro de 14 x 1.9 cm donde las raíces de las semillas se adhieron y se sostuvieron. Se agregan 20 ml de medio Rigaud and Puppo que es medio utilizado para pruebas de nodulación (Olivares *et al.*, 1980), se cerraron con un tapón de algodón y esterilizaron un día antes de utilizarse.

Cuando las semillas tenían la raíz del tamaño deseado se pasaron a los tubos colocando dos plántulas en cada tubo y se cubrieron con un papel opaco (papel Kraft) para proteger las raíces de la luz. Se dejaron a temperatura ambiente y en total obscuridad durante dos días, pasado este tiempo se cambiaron a un cuarto de cultivo a una temperatura alrededor de 22-26 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

7.5.3 Inoculación de las plantas

Seis días después de que las plántulas fueran transferidas a los tubos, se inocularon las raíces. Se partió de una densidad óptica del cultivo bacteriano de aproximadamente 0.5-0.6 (fase exponencial), la cual se diluyó 100 veces en MgSO_4 10 mM, con la cual se inoculó cada tubo con un mililitro.

Una condición de plantas control (no inoculadas) se realizó inoculando cada tubo con 1 ml de una dilución 1:100 del medio de cultivo únicamente. El análisis del fenotipo de colonización de raíces por las cepas bacterianas se realizó a los 30-40 días post-inoculación.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó ANOVA de una vía para comprobar la significancia de los resultados.

8.RESULTADOS

8.1 Construcción de conjugantes que expresan ExI1

El vector pTB93F permite una fuerte expresión constitutiva de genes dependiente del promotor de triptófano (*trp*) de *Salmonella typhimurium* en bacterias de la familia Rhizobiaceae, particularmente en *S. meliloti* en las que se observaron altos niveles de la proteína GFP (Gage D. J., Bobo T. y Long S. R., 1996). En este trabajo se pretende realizar la sobreexpresión de la expansina ExI1 de *P. carotovorum*, para lo cual el gen se subclonó bajo el mismo promotor *trp* en el vector pTB93F.

El gen de la expansina *PcExI1* con el péptido señal de la celulasa CelC2 de *R. leguminosarum* bv *trifolii* (obtenido por PCR) se clonó en un vector intermediario (pCR™2.1-TOPO®) y posteriormente se realizó el análisis de restricción donde se confirmó la correcta inserción del fragmento, y por último la secuenciación mostró que no ocurrió ninguna mutación en el proceso de amplificación (Figura 12).

A partir del vector intermediario (pCR™2.1-TOPO®), el gen *PcExI1* se subclonó en pTB93F intercambiándolo por el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). En la figura 13A se muestra el proceso general de subclonación, indicando las enzimas de restricción usadas (*XhoI* y *SalI*) para permitir una clonación direccional del gen. Para confirmar que la clonación hubiera ocurrido correctamente se digirió el plásmido obtenido de células resistentes a cloranfenicol y espectinomicina (marcadores de selección que tiene el vector pTB93F), obteniendo el patrón que se muestra en la figura 13B lo que indica que el gen *PcExI1* se clonó correctamente.

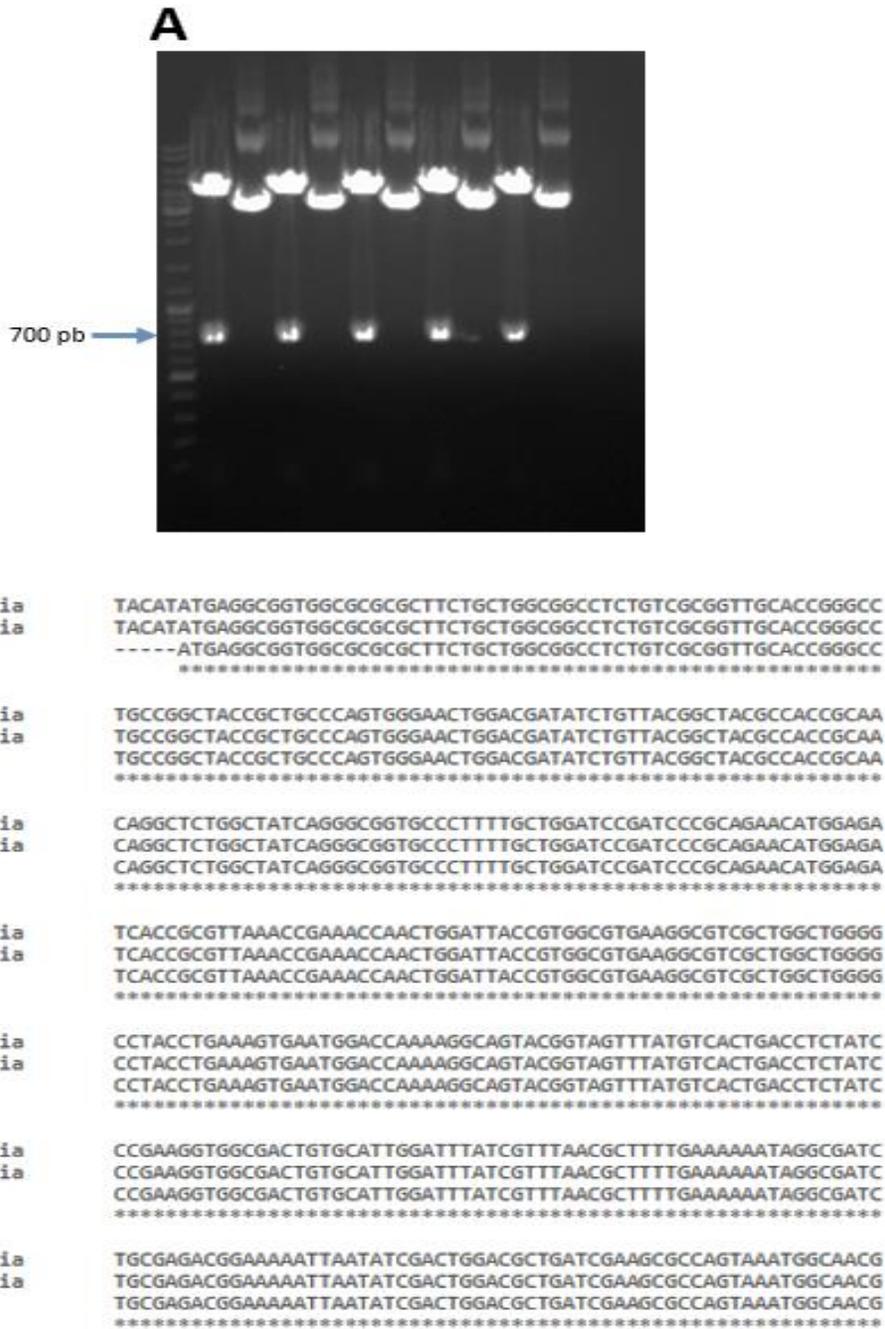


Figura 12. A) Doble digestión de vector TOPO con *Xho* I y *Sal* I, se obtiene un fragmento de 700 pb perteneciente al gen de la expansina Ex11. B) Alineamiento de la secuencia de expansina Ex11 con los fragmentos obtenidos de la doble digestión. No hubo ninguna mutación en las secuencias.

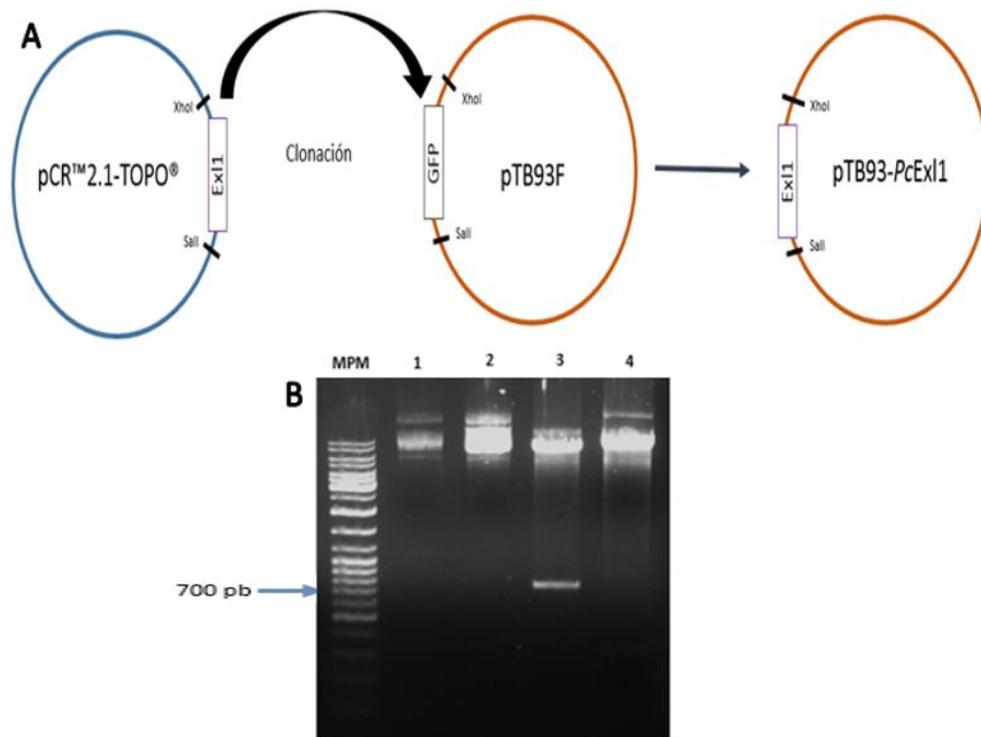


Figura 13. A) Esquema del proceso de clonación de Exl1 en el vector pTB93F. Teniendo la clonación de la expansina Exl1 en el vector TOPO, se realiza una doble digestión con *Xho* I y *Sal* I y de igual manera el vector pTB93F para liberar el gen de proteína verde fluorescente (GFP) para finalmente realizar la ligación y obtener el vector pTB93-PcExl1. B) La clonación positiva se confirma con una doble digestión del vector con *Xho* I y *Sal* I. En el carril 3 se observa la liberación de un fragmento de 700 pb perteneciente al gen de la expansina (de la clona 1 analizada) y en el carril 4 el plásmido sin digerir (control). Carril 1: Digestión de plásmido extraído de la clona 2. 2: plásmido sin digerir de la clona 2 (control).

8.2 Conjugación del plásmido pTB93-PcExl1 en células de *Rhizobium*

Como se mencionó en la sección de metodología, se realizó la conjugación del vector pTB93-PcExl1 y pTB93F en células de *S. meliloti* (cuya identidad se comprobó con análisis del gen 16S amplificado por PCR mediante búsquedas de Blast, figura 14), *R. tropici* y *R. etli*. A partir de cultivos líquidos de las cepas conjugantes se obtuvo el sobrenadante que se concentró 30 veces y al pellet celular se le extrajo la proteína total. Hemos observado que es más fácil detectar la proteína cuando esta es precipitada por unión a celulosa cristalina insoluble (*pull down*), por lo que con las muestras obtenidas se realizó este ensayo utilizando Avicel como

sustrato y se analizó por *Western blot*, donde detectamos que sólo en el pellet celular de *R. tropici* hubo una banda que coincide con el peso molecular de la expansina Ex11 (Figura 15a) (el pellet celular de *R. etli* también presentó la banda que coincide con la expansina, aunque no se muestra este resultado). Este resultado indica que la proteína no se expresa a niveles que puedan ser detectados en el sobrenadante, lo que coincide con reportes de que CelC2 (que es la proteína de la que se tomó el péptido señal de exportación) es principalmente periplásmica, lo que explicaría que al analizar las proteínas provenientes del lisado celular total sí haya señal de Ex11.

Experimentos equivalentes y analizando con este mismo método no se pudo visualizar la expresión de la proteína en células de *S. meliloti* (Figura 15b) a pesar de haber analizado varias clonas conjugantes; desconocemos la causa de la falta de expresión. Para comprobar la presencia del plásmido en esta especie, se purificó ADN plasmídico y posteriormente se realizó un PCR con los oligos Sfi y R1 que hibridan en el gen de la expansina. El resultado indica la presencia del gen de la expansina en *S. meliloti* (Figura 15c), pero este resultado no contesta porqué la falta de expresión de la proteína.

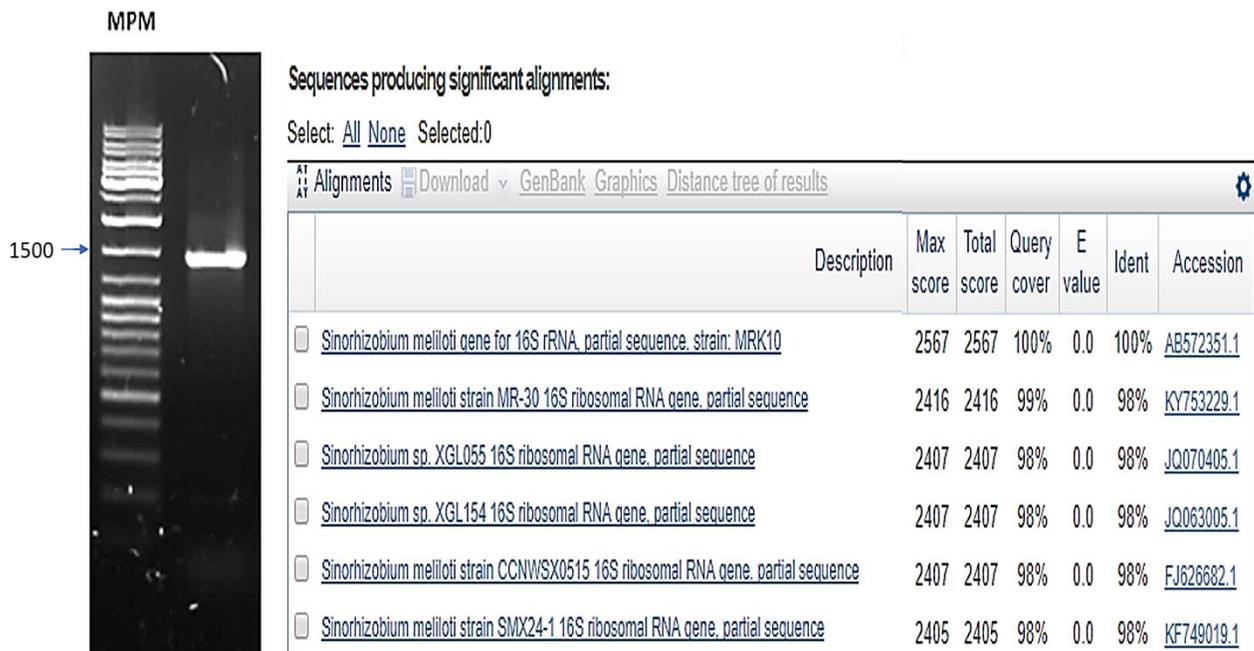


Figura 14. Izquierda: Amplificación del gen 16S de la cepa *S. meliloti* proporcionadas por el Dr. Oswaldo Valdez López, teniendo un producto de aproximadamente 1500 pb la cual se secuenció. Derecha: Resultados del blast realizado con la secuencia del 16S teniendo una identidad del 100% con cepas de *S. meliloti*.

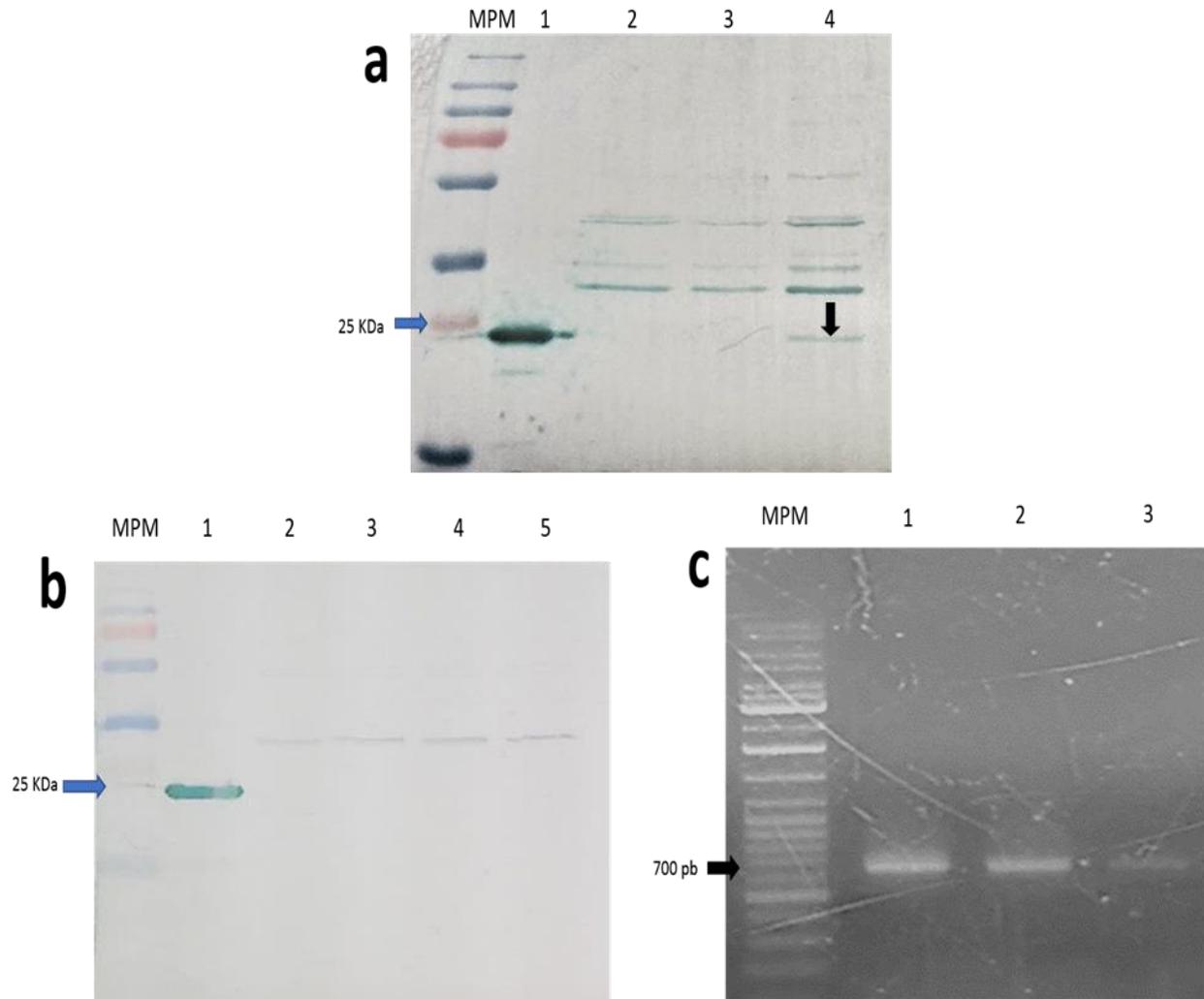


Figura 15. a) Análisis por *Western-blot* de la expresión de la proteína PcExl1 en células de *R. tropici*, se puede observar en el carril 4 una banda correspondiente al peso molecular de la expansina Exl1 (25 kDa) (señalada con flecha negra). Carril 1: PcExl1 purificada expresada por el plásmido pET22-PeIB-PcExl1 (control positivo), 2: Células de *R. tropici* silvestre, 3: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93F, 4: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93-PcExl1. b) Análisis por *Western-blot* de la expresión de la proteína PcExl1 en células de *S. meliloti* donde no se aprecia ninguna banda que coincida con el peso molecular. Carril 1: PcExl1 purificada expresada por el plásmido pET22-PeIB-PcExl1 (control positivo), 2: Células de *S. meliloti* silvestre, 3: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido

pTB93F, 4: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx1 (clona 1), 5: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx1 (clona 2). c) Dado que en las células de *S. meliloti* no se veía una expresión de Ex1 (700 pb), se extrajo ADN plasmídico para corroborar la presencia del plásmido pTB93-PcEx1 y realizar un PCR con los oligos Sfi y R1. Carril 1: Amplificación del gen de la expansina del vector pBBR1MCS2-Cel-PcEx1, 2: Clona 1 de *S. meliloti* con plásmido pTB93-PcEx1, 3: Clona 2 de *S. meliloti* con plásmido pTB93-PcEx1.

8.3 Análisis de la producción de biofilm

Las expansina eucariotes y procariotes se unen a la celulosa cristalina a través de tres residuos aromáticos en el D2, y en algunos casos se ha reportado que al incubar este sustrato con expansina y una celulasa se observa el aumento de azúcares reductores, lo que indica que la expansina modifica de alguna manera la celulosa. Por esta razón, es interesante estudiar el efecto que tendría la expansina sobre la modificación del biofilm (mayoritariamente compuesto de celulosa) producido por bacterias que están asociadas con las plantas, tal es el caso de las bacterias de la familia Rhizobiaceae cuyo biofilm está implicado en el proceso de su adherencia a la raíz de las plantas lo que constituye un paso importante para la colonización y la posterior formación de nódulos.

Para poder analizar la presencia de un fenotipo se realizan diversos experimentos que tienen el fin de medir la concentración de biofilm sintetizado por las cepas que expresan Ex1 y su comparación con un control de células no transformadas o transformadas con un plásmido control. El primero de estos métodos se llevó a cabo con las cepas de *R. tropici* en placas de medio YMA adicionado con Rojo Congo que tiene una gran afinidad por las fibras de celulosa, por esta razón la intensidad del color rojo de las colonias varía según la cantidad de celulosa, y el tamaño o densidad de las cadenas en el biofilm, como se observa en la figura 16a. Realizando el análisis de imagen de la intensidad de color de las colonias sembradas en medio de cultivo sólido conteniendo el colorante, se cuantificaron y promediaron los píxeles, resultando en una diferencia pequeña pero significativa entre la cepa de *R. tropici* que expresa la expansina sobre la cepa silvestre o la conjugante control (que tiene el plásmido pTB93F; entre estas últimas no existió diferencia). Este pequeño

aumento de la intensidad del color rojo lo interpretamos como una mayor cantidad de celulosa en el biofilm (Figura 16b).

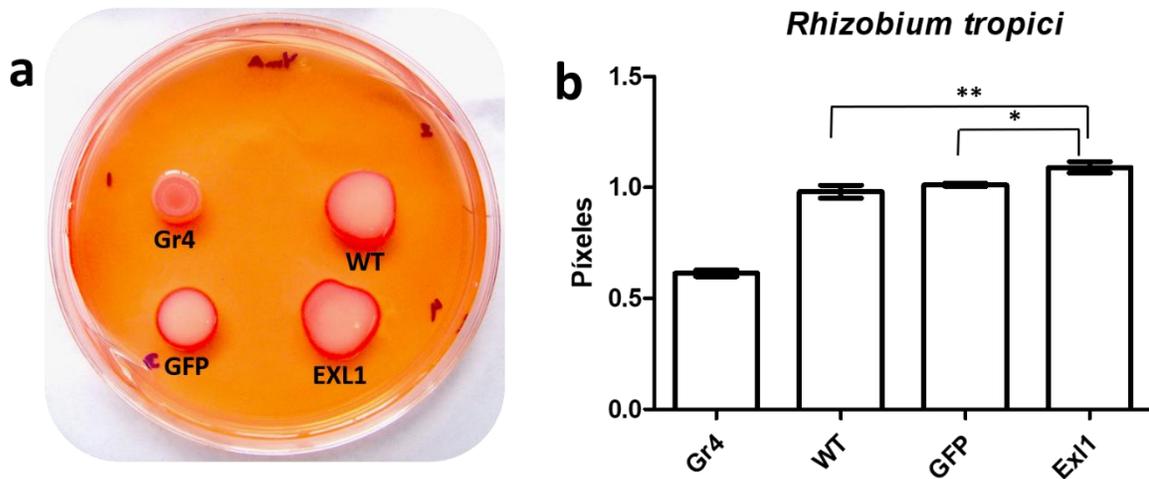


Figura 16. Las imágenes fueron modificadas en brillo y contraste para poder analizar de mejor manera los anillos rojos que representa el biofilm de la colonia, con el programa de edición de imágenes GIMP 2.8. A) Cajas de medio YMA con Rojo Congo; las cepas de *R. tropici* y la cepa de *S. meliloti* Gr4 se colocaron en forma de gota y se dejaron en incubación por 5 días. B) Usando ImageJ se realizó el análisis de las imágenes, cuantificando los píxeles en el anillo de formación de biofilm y comparando entre las diversas cepas se puede notar que existe una diferencia significativa entre la cepa que expresa la expansina ($p=0.007059$) en comparación con la cepa silvestre y la conjugante control (entre las cuales no hay diferencia significativa). Gr4: Células de *S. meliloti* Gr4, WT: Células de *Rhizobium tropici* silvestre, GFP: Células de *Rhizobium tropici* conjugadas con el plásmido pTB93F, EXL1: Células de *Rhizobium tropici* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11 (para ambas imágenes).

En otro ensayo se analizó la floculación de las células para saber si la posible modificación del biofilm por la expansina podría influir en la sedimentación de las células. Esto es debido a reportes previos que demuestran que cuando las cadenas de celulosa exceden cierta longitud (en este caso debido a la mutación de una

celulasa que controla el tamaño de las cadenas) las células flocculan a mayor velocidad. Debido a la observación de que el biofilm es marginalmente más abundante con la presencia de Exl1, se llevó a cabo el experimento. Se crecieron cultivos de las cepas conjugantes y silvestre de *R. tropici*, se incubaron 24 y 48 horas a temperatura ambiente sin agitación, ya que en esta condición las células tienden a ir al fondo, posteriormente se midió la densidad óptica del sobrenadante y se compararon las diferencias. Las mediciones de los cultivos a las 24 horas no mostraron ninguna diferencia (Figura 17a), sin embargo, a las 48 horas se pudo visualizar una diferencia pequeña en el cultivo de *R. tropici* que expresa la expansina donde las lecturas de la densidad óptica de los sobrenadantes fueron menores que los demás cultivos, lo que implica una mayor flocculación de este cultivo (Figura 17b). Este resultado concuerda con la mayor tinción con rojo Congo, y ambos presentan diferencias del mismo nivel.

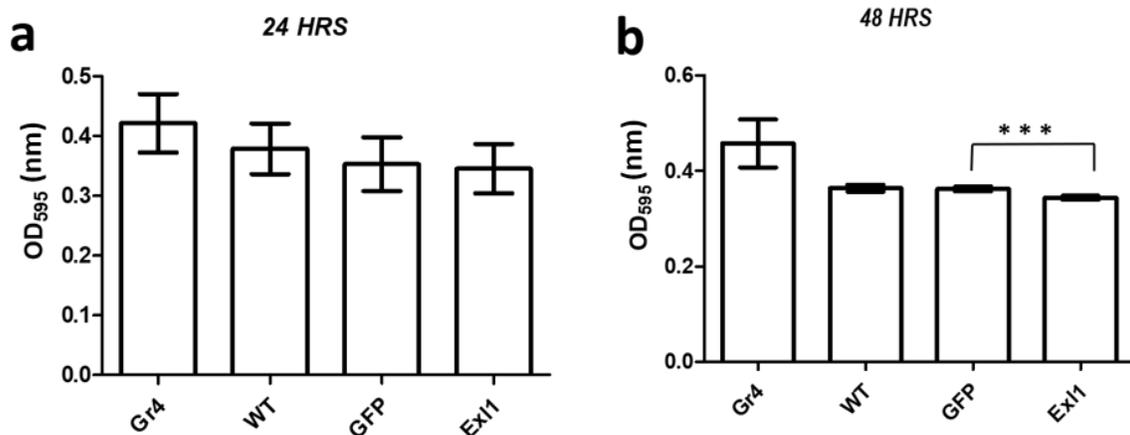


Figura 17. Análisis de flocculación de las células, donde se puede apreciar que a las 48 la cepa conjugante que expresa la expansina tuvo una ligera diferencia en la flocculación obteniendo densidades ópticas menores que significa una mayor flocculación ($p < 0.0001$). a) Ensayo de flocculación a las 24 horas. b) Ensayo de flocculación a las 48 horas. Gr4: Células de *S. meliloti* Gr4, WT: Células de *R. tropici* silvestre, GFP: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93F, EXL1: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93-PcExl1 (para ambas imágenes).

Los análisis anteriores son indicativos de la posible cantidad de celulosa presente en el biofilm con diferencias pequeñas, por lo que las comparaciones se complementaron usando otra técnica que se basa en la cuantificación de la intensidad de polímeros en el biofilm tiñendo con cristal violeta a partir de cultivos en cajas de 96 pozos. La figura 18 muestra la gráfica de determinación de la intensidad de biofilm a diferentes tiempos. Observamos que a las 48 y 72 horas hubo una producción mayor de biofilm de la cepa *R. tropici* que expresa la expansina en comparación de *R. tropici* silvestre y la conjugante control (entre las cuales no existe una diferencia significativa). La cepa *R. tropici* con el plásmido pTB93-PcEx1 muestra una mayor formación de biofilm de alrededor de 7-15%. Sin embargo, después de 72 horas de cultivo esta diferencia se pierde.

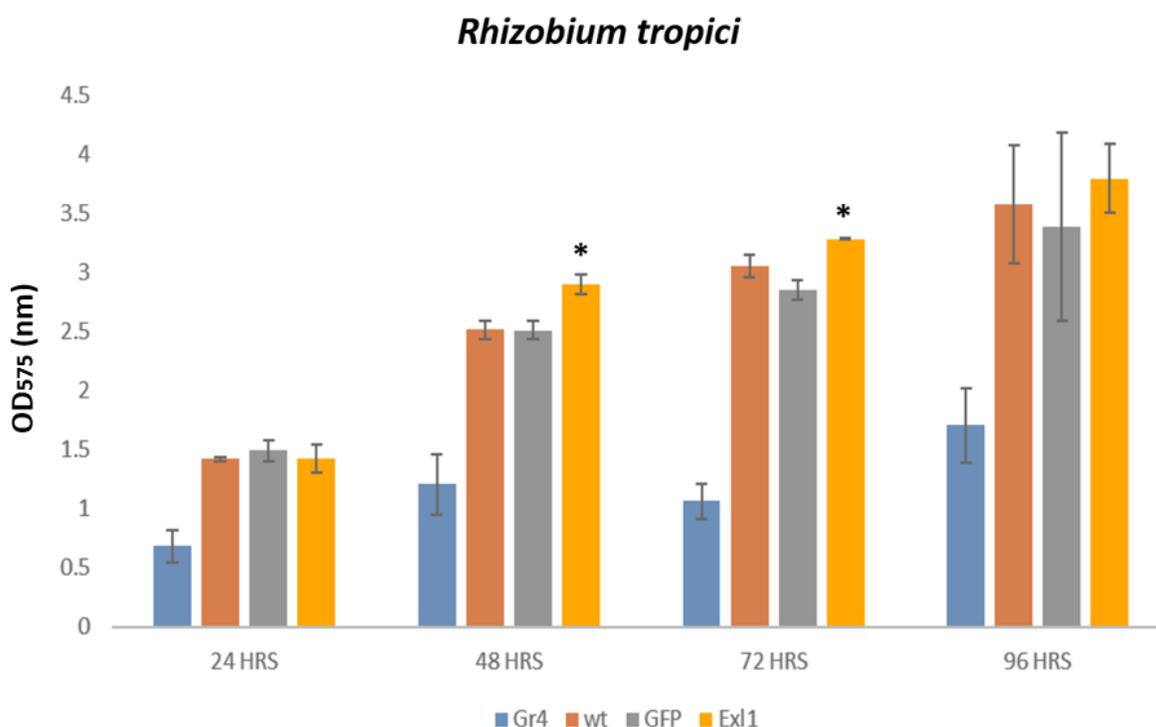


Figura 18. Análisis de la producción de biofilm con tinción de Cristal Violeta. Los análisis realizados a las 48 y a las 72 horas demuestran que la cepa de *R. tropici* que expresa la expansina tiene aparentemente una mayor producción de biofilm comparada con la cepa *R. tropici* silvestre y la conjugante control ($p < 0.05$). Gr4: Células de *S. meliloti* Gr4, WT: Células de *R. tropici* silvestre, GFP: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93F, EXL1: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx1.

Los resultados anteriores demuestran que la cepa que de *R. tropici* que expresa la expansina tiene un efecto sobre la producción de biofilm aparentemente aumentando su producción, lo cual se pudo apreciar en los tres experimentos anteriores. Estos resultados fueron sorprendentes ya que, según el modelo de actividad de las expansinas, esperaríamos que, si su función es la de aflojar las interacciones entre las cadenas de celulosa, esta sería tal vez más fácilmente digerida por una celulasa, lo que acortaría su tamaño y la cantidad de biofilm se vería disminuida. Hasta este momento no tenemos una explicación para esta observación, excepto que algunos reportes de la literatura, y nuestros propios resultados indican que de hecho en incubaciones de Exl1 con celulasa, esta disminuye su actividad, y se ha propuesto que esto podría deberse a que la enzima compite por los mismos sitios de unión con la expansina. De ser el caso, las cadenas sufrirían menor cantidad de cortes, y tendrían mayor longitud.

Tomando en cuenta esta diferencia en la cantidad de biofilm comparando la cepa silvestre y la conjugante control se podría asumir que Exl1 le brinda una ventaja ante el estrés a *R. tropici* que expresa la expansina para la mayor formación de biofilm, ya que esta estructura (el biofilm) otorga resistencia a diversos factores abióticos o condiciones adversas. Para probar esta hipótesis se realizó una prueba de resistencia de las células al choque osmótico sembrando en medio sólido YMA adicionado con KCl a diferentes concentraciones. En este experimento vimos que a concentraciones de 100 y 250 mM no hubo diferencia del crecimiento entre ninguna cepa analizada (Figura 19), mientras que a 500 mM ya no hubo crecimiento bacteriano (imagen no mostrada). Estas condiciones no permitieron ver diferencias por la presencia de la expansina, pero existe la posibilidad de que las células expresantes de Exl1 pudieran presentar ventajas en alguna otra situación de estrés.

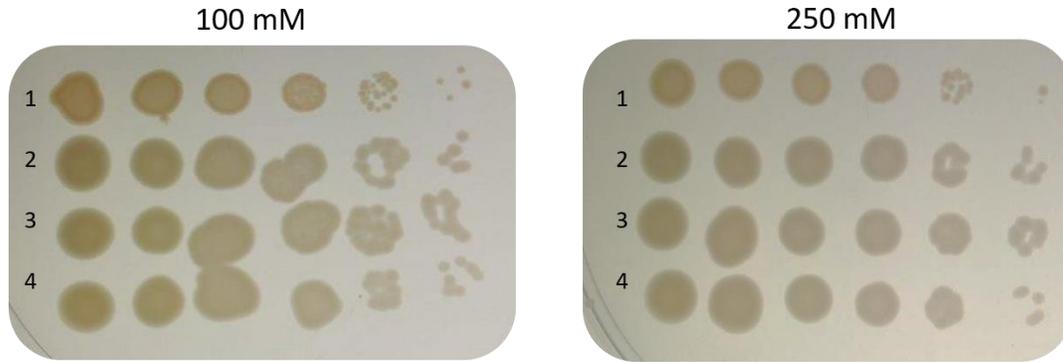


Figura 19. Se analizó la resistencia al shock osmótico en 100 mM (izquierda) y 250 mM (derecha) de KCl de las cepas, y como se puede apreciar no hay diferencias entre la cepa de *R. tropici* silvestre y sus conjugantes. 1: Células de *S. meliloti* Gr4, 2: Células de *R. tropici* silvestre, 3: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93F, 4: Células de *R. tropici* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11.

Experimentos equivalentes a los anteriores fueron realizados también con la especie de *S. meliloti* con los que se analizó la producción de biofilm de la cepa nativa y las conjugantes. Ninguno de los análisis realizados mostró diferencias entre las cepas analizadas para la producción de biofilm (Figura 20 a-c) y tampoco en la resistencia a shock osmótico (Figura 20d). Esto lo atribuimos a la falta de expresión de la expansina en la cepa conjugada con el plásmido pTB93-PcEx11 como se mostró anteriormente.

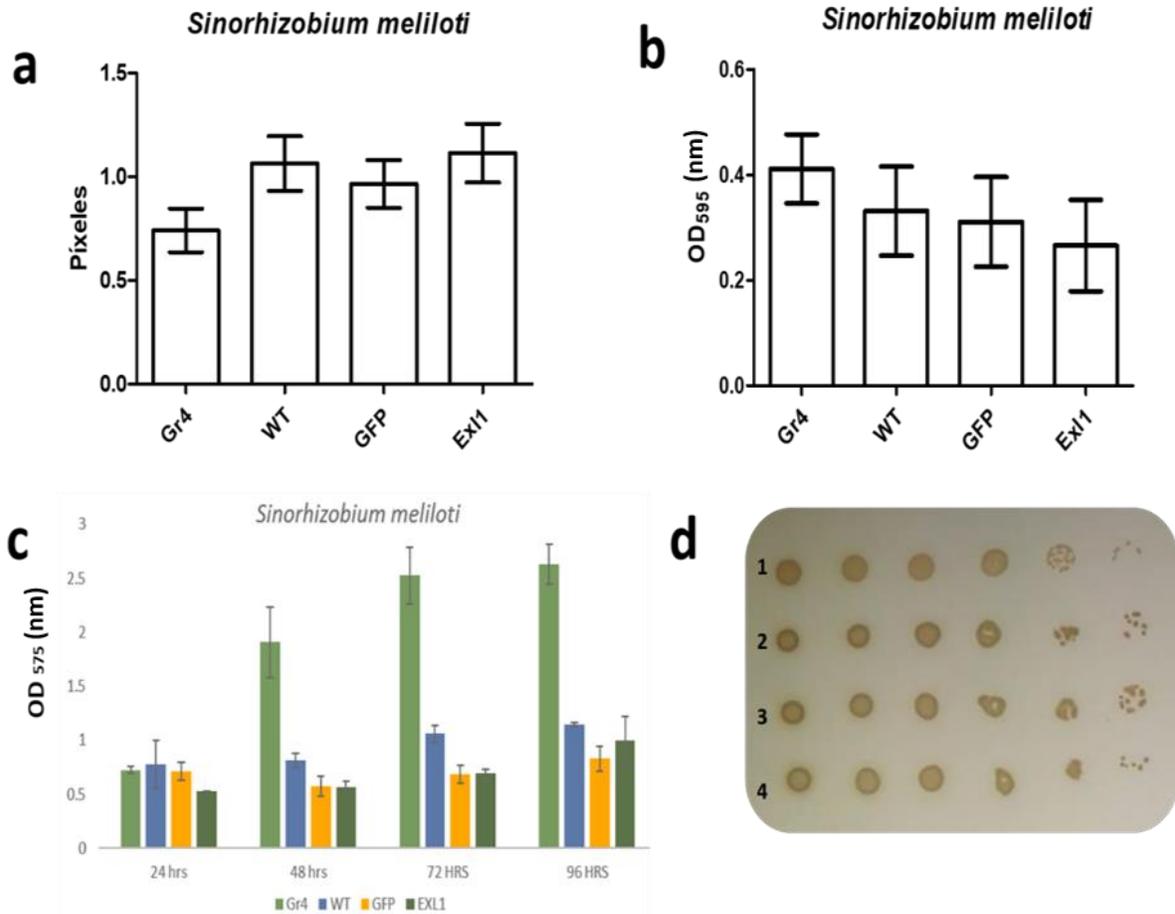


Figura 20. Los análisis realizados para *R. tropici* fueron probados de igual manera en bacterias de *S. meliloti* para probar la posible participación de la expansina en la formación de biofilm de esta bacteria. a) En el experimento de Rojo Congo, mediante el análisis de imagen y cuantificación de píxeles no hubo ninguna deferencia significativa. b) Se analizó el sobrenadante de los cultivos para comprar el grado de floculación de las cepas y sus conjugantes, estadísticamente tampoco existe una diferencia en la densidad celular que quiere decir que el grado de floculación podría ser igual. c) En el ensayo de tinción con Cristal Violeta los análisis demuestran que no hay una diferencia significativa de la cepa conjugada con el plásmido pTB93F y la conjugada con pTB93-PcEx11. Gr4: Células de *S. meliloti* Gr4, WT: Células de *S. meliloti* silvestre, GFP: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93F, Ex11: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11 (para figuras de a-c). d) En el análisis de resistencia al shock osmótico a 250 mM de KCl no se observaron diferencias entre las cepas. 1: Células de *S. meliloti* Gr4, 2: Células de *S. meliloti* silvestre, 3: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93F, 4: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11

Estos experimentos brindan un panorama más grande y de forma cuantitativa sobre la posible participación de la expansina en la modificación de la estructura del biofilm, posiblemente a nivel de la longitud de las cadenas de celulosa, que hasta donde se sabe, es el polímero principal en este ecosistema microbiano y el blanco principal de las expansinas. Los datos obtenidos las cepas de *R. tropici* que expresan la expansina muestran un efecto en la cantidad de biofilm analizado con diferentes métodos de tinción, en las que probablemente haya aumentado la longitud de las cadenas del biofilm. Por otra parte, no se logramos expresar la expansina heterológamente en las cepas de *S. meliloti*, y esta situación de alguna manera explica la falta de fenotipo en comparación con *R. tropici*, ya que no se vieron diferencias entre la cepa silvestre y las cepas conjugantes de *S. meliloti*.

8.4 Ensayos de colonización de *Phaseolus vulgaris* con *Rhizobium tropici*

Se realizó el ensayo de colonización de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) con la cepa de *R. tropici* y las variantes obtenidas en el presente trabajo. Se incluyeron cuatro juegos experimentales: plantas sin inocular, plantas inoculadas con la cepa silvestre, plantas inoculadas con bacterias conjugadas con el vector pTB93F, y la condición de prueba de plantas inoculadas con bacterias conjugadas con el vector pTB93-*PcExl1*. Cada juego experimental contó con 5 macetas y cada maceta como se mencionó en la metodología tenía tres plantas (Figura 21). Las macetas se dejaron crecer en invernadero y el experimento concluyó a los 21 días post inoculación y en este punto se realizó el análisis fenotípico de las plantas.



Figura 21. Las plantas de frijol se colocaron en macetas de plástico, 3 plantas por maceta y se dejaron crecer en invernadero a temperatura controlada.

Se analizaron las características fenotípicas de las plantas de frijol: longitud del tallo (Figura 22a), ancho de las hojas (que abarca de un borde a otro) (Figura 22b) y largo de las hojas (que abarca de la base al ápice) (Figura 22c), y se determinó la relación entre el ancho y largo de las hojas (Figura 22d). También se registró el peso tanto húmedo como seco de todos los tallos y todas las hojas.

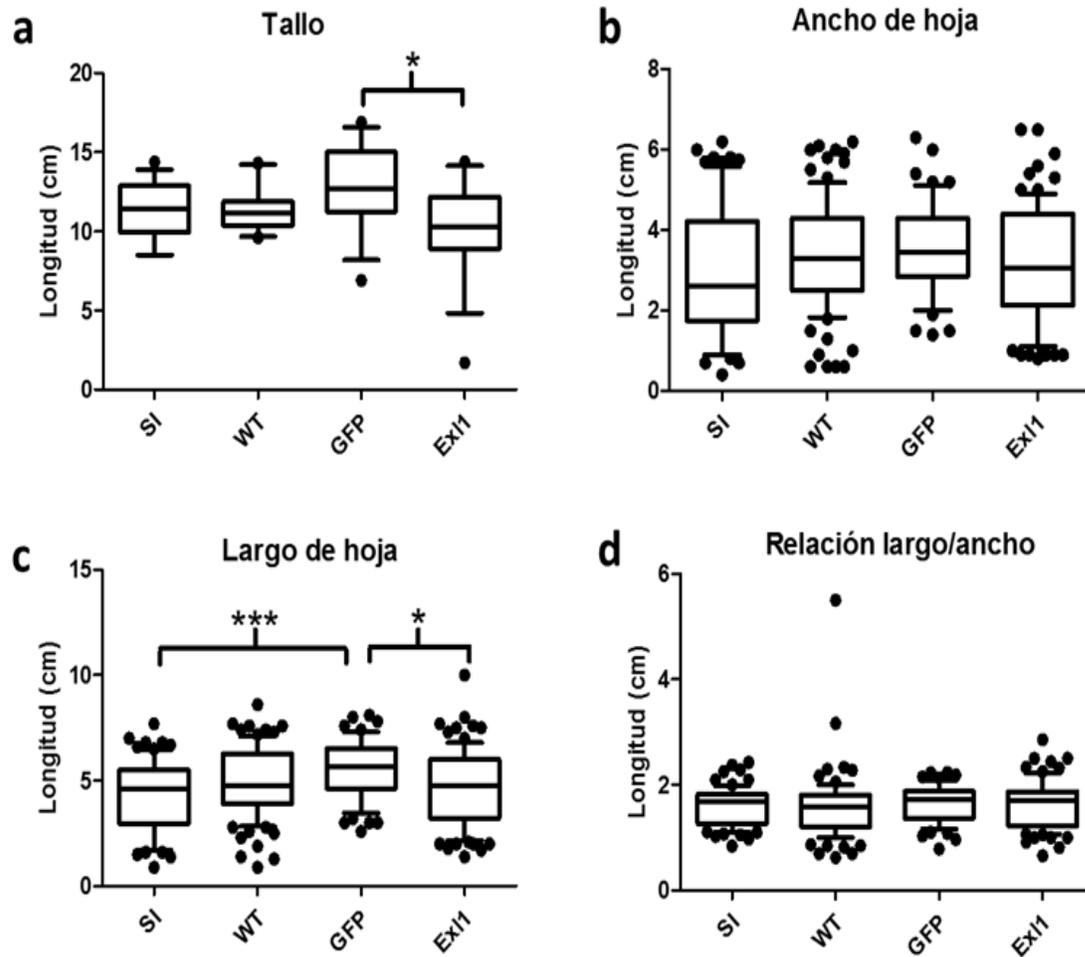


Figura 22. Se realizó el análisis fenotípico de diferentes características de la planta después de ser inoculadas con la cepa silvestre *R. tropici* y sus variantes. a) Se midió la longitud de los tallos de las plantas donde se encuentra que el tallo es más pequeño en las plantas inoculadas con la cepa que expresa la expasina comparada con la cepa control ($p=0.0103$), pero no así con la cepa silvestre. b) En la medición del ancho de la hoja no hubo diferencia alguna. c) Para el análisis del largo de la hoja hubo algunas diferencias significativas pero ninguna relevante ($p=0.0003$). d) Finalmente se realizó la relación largo/ancho de la hojas pero sin ninguna diferencia significativa.

Sin embargo, no fue posible medir la longitud de las raíces ni hacer el conteo y registro del número y morfología de los nódulos debido a que las raíces se enredaron de forma irrecusable e indistinguible en la gasa que se colocó en el fondo de las macetas para prevenir la fuga de vermiculita por error. Aun así, una vez que el material se secó logramos separar el tejido (aunque no íntegro) de la gasa, se colectó y secó a 37 °C al igual que los tallos y se analizó el peso seco (Figura 23). El análisis de los datos colectados de todas estas mediciones no encontró ninguna diferencia entre los tratamientos, lo que indica que en las condiciones de este único experimento la expresión de Ex11 por *R. tropici* no le resultó benéfico a la planta.

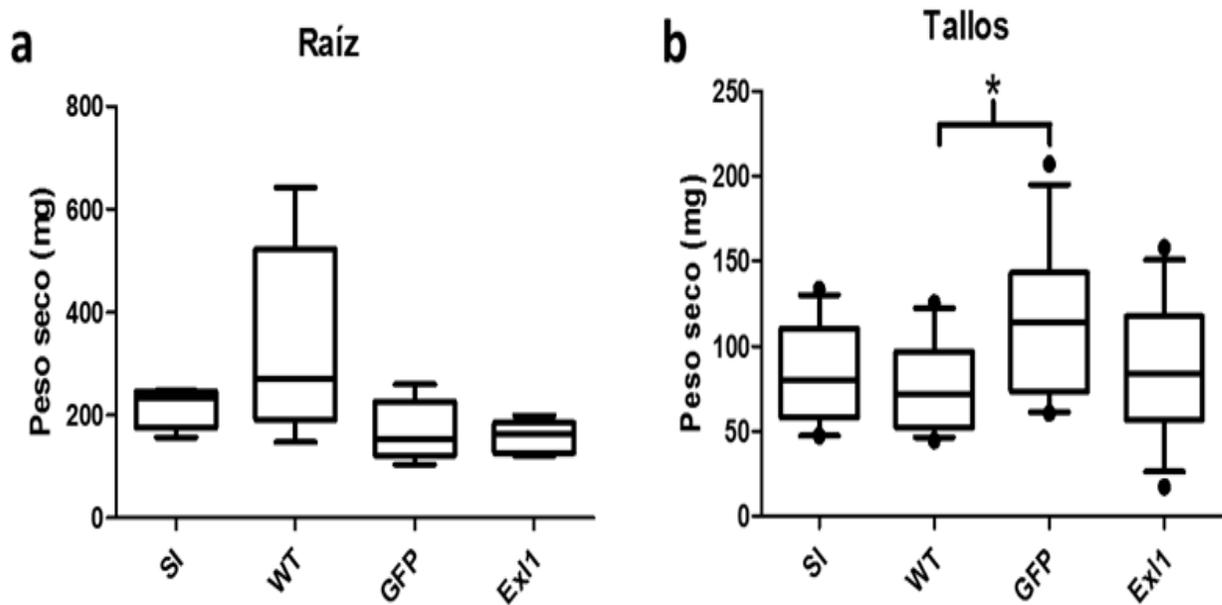


Figura 23. Se realizó la medición del peso seco de las raíces (a) y tallos (b) de los grupos estudiados sin encontrar ninguna diferencia significativa de la cepa que expresa la expansina comparada con los controles.

De cualquier forma, debido a la variedad en tamaño de hojas que presentaba una sola planta se decidió analizar los tamaños separando las hojas por rangos de tamaño. Se clasificó por rangos de tamaño tomando en cuenta el largo de la hoja, en las siguientes categorías: <3 cm, de 3-5 cm, de 5-7 cm y por último >7 cm, y se comparó entre tratamientos (Figura 24). Sin embargo, no hubo diferencia entre los tratamientos. Tampoco vimos diferencia al analizar el ancho de las hojas cuando se dividieron en rangos (Figura 25).

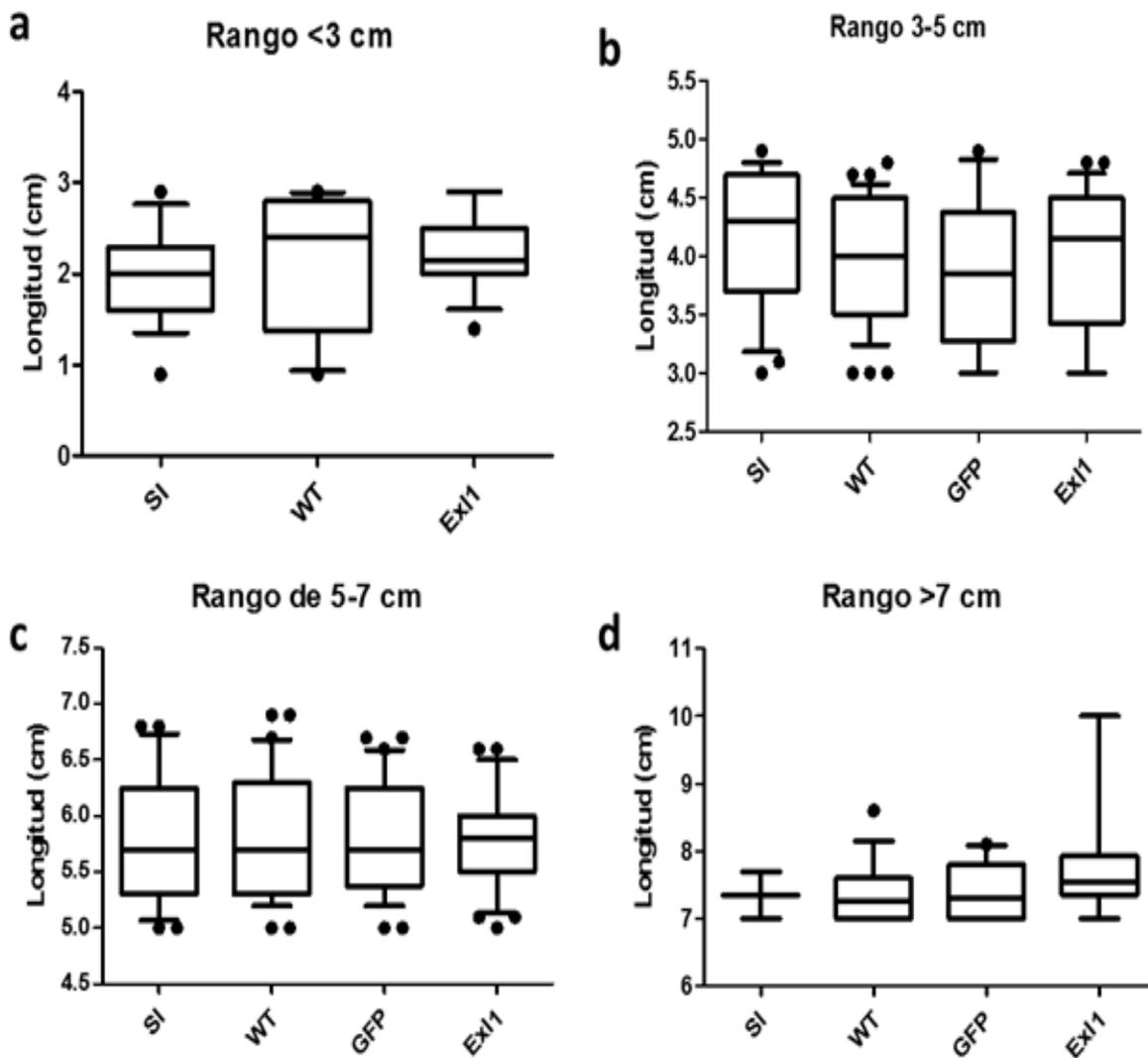


Figura 24. Realizando los rangos y separando las hojas según su largo no se pudo encontrar alguna diferencia significativa. a) Rango de hojas menor a 3 cm. b) Rango de hojas entre 3 y 5 cm. c) Rango de hojas entre 5-7 cm. d) Rango de hojas mayor a 7 cm.

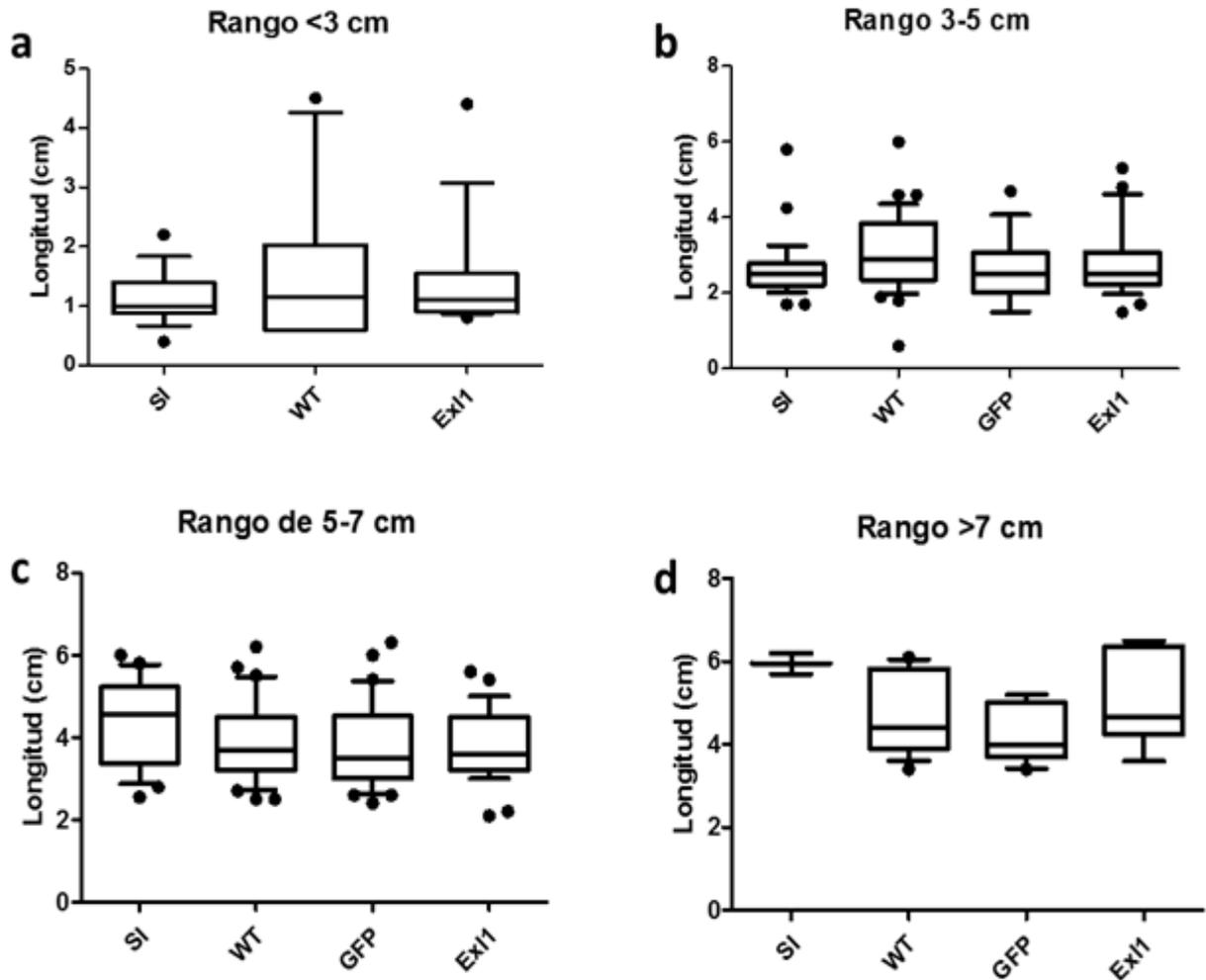


Figura 25. También se realizaron los rangos para el ancho de las hojas de las plantas en donde no se visualizó ninguna diferencia en ninguno de los rangos evaluados. a) Rango de hojas menor a 3 cm. b) Rango de hojas entre 3 y 5 cm. c) Rango de hojas entre 5-7 cm. d) Rango de hojas mayor a 7 cm.

Desafortunadamente en este experimento no se pudo comprobar el efecto benéfico de la expresión de la expansina en bacterias de *R. tropici* como se había visto en experimentos anteriores, en los que parecía que las plantas tenían un mejor crecimiento a pesar de que la expresión a nivel de proteína no había sido detectada. Es necesario contar con más repeticiones del experimento controlando las condiciones de crecimiento de las plantas (evitando usar gasa), usando un número mayor de individuos.

8.5 Ensayos de colonización de *Medicago sativa* con *Sinorhizobium meliloti*

Debido a la variabilidad intrínseca en el crecimiento de las plantas de frijol, se decidió usar paralelamente otra especie de leguminosa que tuviera un fenotipo más homogéneo. Por esa razón también generamos cepas conjugantes de *S. meliloti* con la capacidad de nodular plantas de *M. truncatula* y *M. sativa* (alfalfa). Debido a que en los ensayos para establecer las condiciones de nodulación de las plantas, *M. truncatula* no mostró una buena capacidad de nodulación, los experimentos se realizaron con alfalfa. Primeramente, se realizó el ensayo de colonización de las plantas de alfalfa (*M. edicago sativa*) con la sepa de *S. meliloti* silvestre para comprobar la capacidad de nodular de la cepa y encontrar las condiciones apropiadas para este proceso, este ensayo se realizó en tubos de ensaye de 20 cm de largo por 2.2 cm de diámetro con medio Fahraeus solido sin nitrógeno. A los 15 días post-inoculación se observaron nódulos en las raíces de solamente algunas de las plantas inoculadas, por lo que entonces se siguió otro protocolo donde el cambio importante es la protección de las raíces contra la luz (establecido por Olivares et al 1980, proporcionado por la Dra. Isabel López del Centro de Ciencias Genómicas UNAM), que es el indicado en la sección de Materiales y Métodos. En este caso el número de plantas que lograron formar nódulos fue de aproximadamente 90%, que en nuestra opinión es un buen número para la realización del experimento.

Con estas condiciones, se realizó el experimento de colonización de alfalfa con *S. meliloti* silvestre y las cepas obtenidas en las conjugaciones, para intentar ver algún fenotipo a pesar de la falta de detección de la expansina en la conjugada con el vector pTB93-*PcEx11* (sabemos que el método colorimétrico usado en los ensayos de *Western blot* no es muy sensible, en el orden de microgramos). De igual manera que en el experimento anterior se establecieron cuatro juegos experimentales (plantas sin inocular, plantas inoculadas con la cepa silvestre, plantas inoculadas con bacterias conjugadas con el vector pTB93F y plantas inoculadas con bacterias conjugadas con el vector pTB93-*PcEx11*). Las plantas de alfalfa se dejaron crecer en un cuarto de cultivo con las condiciones especificadas en la metodología (Figura

26a), con lo que confirmamos que aproximadamente a los 15 días después de realizar la inoculación ya había ocurrido la nodulación (Figura 26b), por lo que se continuó incubando, y a los 40 días post-inoculación se analizaron las características fenotípicas.

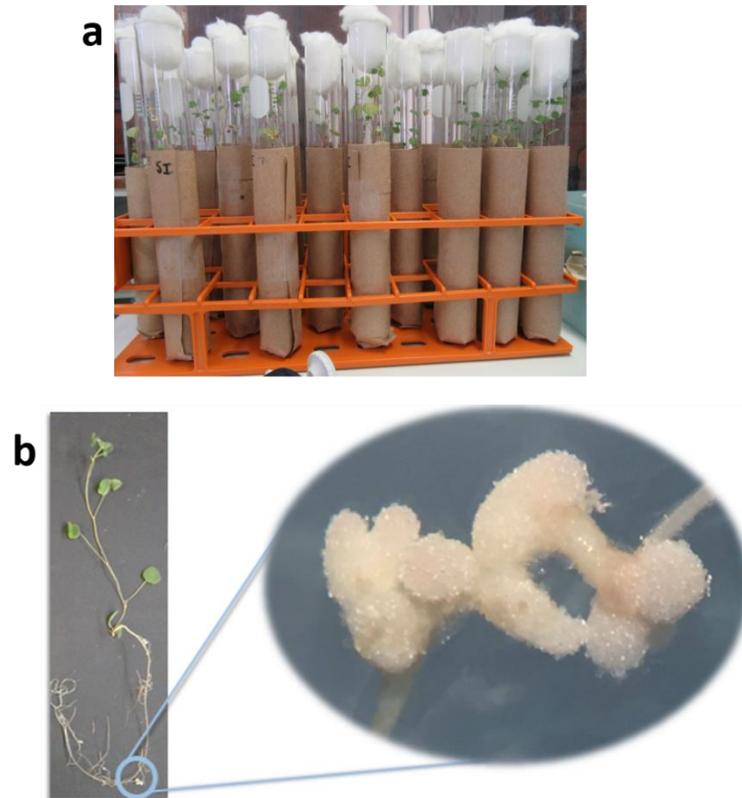


Figura 26. a) Las raíces de las plantas se cubren evitando la exposición a la luz de forma directa. b) Nodulación de alfalfa (*M. sativa*) en presencia de *S. meliloti*, se puede notar una tonalidad rosácea característica del proceso de fijación de nitrógeno.

En este caso, sí logramos analizar las raíces y contar el número de nódulos de las plantas de los cuatro grupos experimentales; sin embargo, el análisis de los datos obtenidos indicó que no existía una diferencia en la cantidad de nódulos entre las cepas (Figura 27; las plantas sin inocular no se muestran en la gráfica ya que ninguna planta tuvo nódulos).

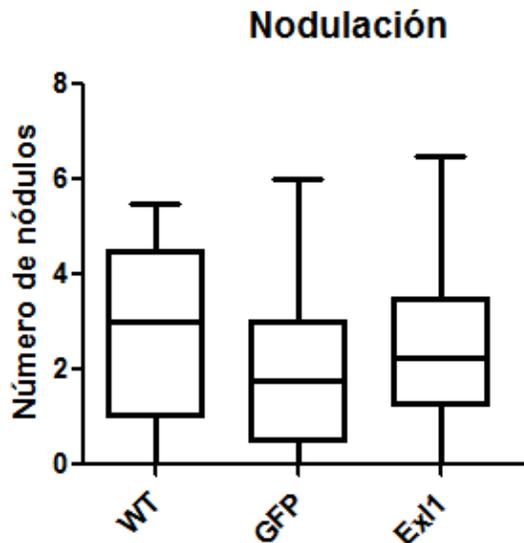


Figura 27. Conteo de nódulos de las plantas de alfalfa 40 días post-inoculación, no existe diferencia entre las plantas inoculadas con *S. meliloti* silvestre y las inoculadas con las conjugantes de la bacteria. WT: Células de *S. meliloti* silvestre, GFP: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93F, Ex11: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11.

También se midió la longitud de las raíces de las plantas y el tallo, observando que el tamaño de las raíces varió significativamente entre las cepas estudiadas (Figura 28a); mientras que el tamaño de los tallos si mostró una diferencia significativa, en donde las plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* silvestre tuvieron mejor crecimiento del tallo en comparación con las plantas inoculadas con las bacterias conjugantes (Figura 28b). Es posible explicar este efecto ya que debido a que la cepa silvestre contenía de por sí un plásmido, y al ser conjugada con el nuevo plásmido pTB93 su carga metabólica pudo haber aumentado de forma que el crecimiento fue más lento, incluso en medio rico conteniendo agar, por lo que notamos que las colonias conjugantes siempre crecieron muy lentamente en comparación con la silvestre; esto pudo haber influido también en el crecimiento de las plantas. Por último, las plantas se dejaron secar a temperatura ambiente y se analizó el peso seco en donde determinamos que la cantidad de biomasa fue menor en las plantas sin inocular (al carecer de nitrógeno el medio influyó en este parámetro ya que es un elemento importante y no contaron con el beneficio

proporcionado por las bacterias), mientras que las plantas inoculadas con cualquiera de las tres cepas utilizadas presentaron ninguna diferencia significativa (Figura 29).

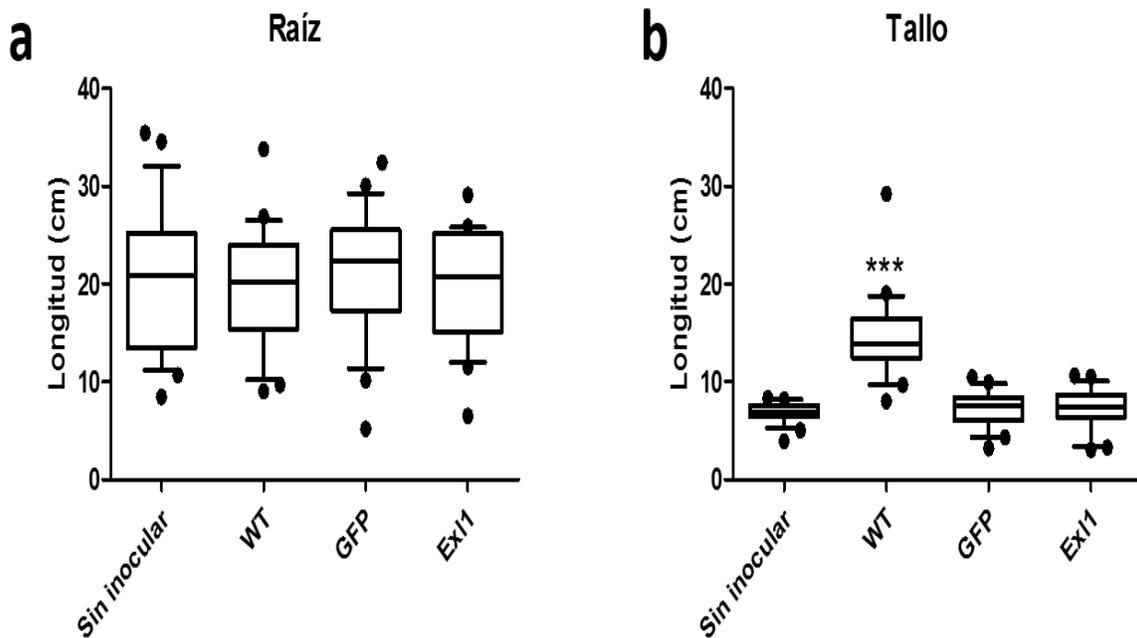


Figura 28. Se midió la longitud de la raíz y el tallo de plantas de *M. sativa*. a) En el tamaño de la raíz no hubo alguna diferencia significativa entre los cuatro grupos experimentales analizados. b) En la medición del tallo el grupo de plantas inoculadas con *S. meliloti* silvestre fue significativamente más grandes que las inoculadas con las cepas conjugantes y también las plantas sin inocular ($p < 0.0001$). WT: Células de *S. meliloti* silvestre, GFP: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93F, Ex11: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcEx11 (para ambas imágenes).

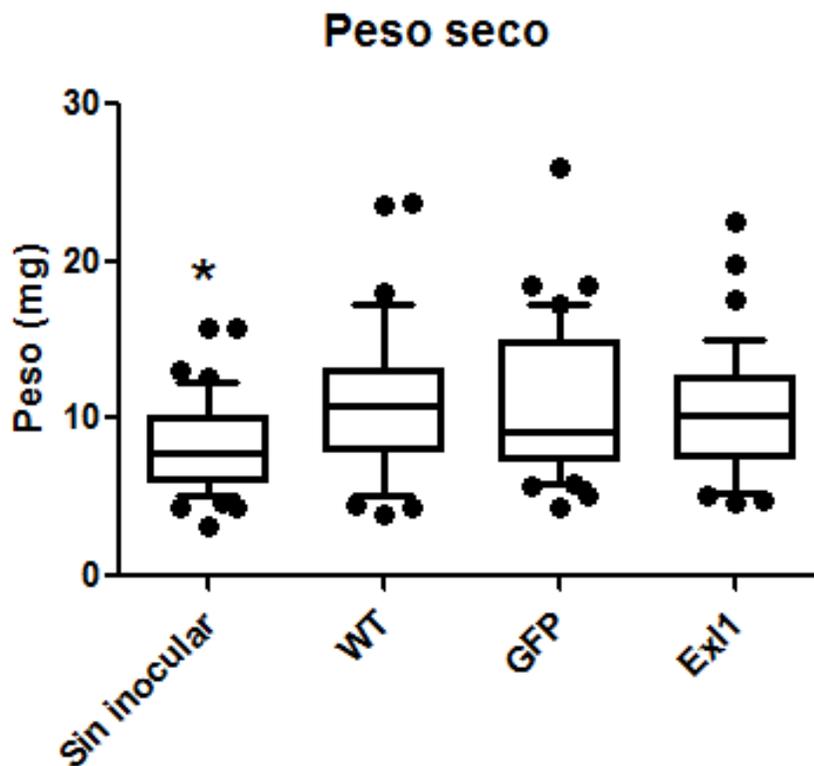


Figura 29. En los análisis de peso los tres grupos inoculados con *S. meliloti* no presentaron diferencia significativa, solo se observó menor cantidad de biomasa en plantas no inoculadas ($p=0.0064$). WT: Células de *S. meliloti* silvestre, GFP: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93F, ExI1: Células de *S. meliloti* conjugadas con el plásmido pTB93-PcExI1.

Todos estos resultados apuntan a que, en las condiciones trabajadas aquí, la presencia de la expansina exógena no proporciona ningún beneficio a las bacterias. Esto podría deberse a dos cosas: a) que la expresión de la expansina sea muy baja, por lo que en realidad no se esperaría ver ninguna diferencia, como sucedió. b) que la expresión, aunque no la hayamos detectado en *western blot* fuera suficiente, pero que la proteína no tiene ninguna relevancia para las rizobacterias, ya que estas no tienen otros factores necesarios para la actividad de la proteína.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo se propuso ver el efecto provocado por la expresión de la expansina PcEx11 en bacterias que naturalmente no codifican genes de expansina, pero que sí tienen alguna relación con las plantas como otras especies que también son benéficas y promotoras del crecimiento tal como representantes del género *Bacillus*. Para analizar esta pregunta se eligieron las bacterias de la familia Rhizobaceae, *R. tropici* y *S. meliloti* que tienen la capacidad formar una relación simbiótica con especies leguminosas como *P. vulgaris* y el género *Medicago*, respectivamente, que son leguminosas modelos de estudio comúnmente usadas en los laboratorios de investigación. La hipótesis de la que se partió en este estudio fue la de que una proteína que modifica los polímeros de la pared celular de las plantas, con ayuda de una enzima hidrolítica debería mostrar un efecto en la colonización que resultara en algún cambio fenotípico en el crecimiento de las plantas propiciado por la expresión de la expansina exógena. Pensamos que el efecto podría darse en dos niveles: 1) en los factores implicados en la colonización de las raíces de las leguminosas por la interacción directa de la expansina sobre la pared celular vegetal, o 2) por efecto sobre la biosíntesis del biofilm de celulosa sintetizado por la bacteria y que se sabe que es importante en la colonización primaria de las raíces como lo menciona Robledo et al. (2012).

Debido a nuestros resultados de los antecedentes en los que en un experimento inicial con *R. tropici* que muy seguramente expresaba Ex11 a tan bajo nivel que no logramos detectarla en *Western blot*, pero que resultó en plantas de mayor tamaño y mejor aspecto en general en comparación con las plantas inoculadas con el plásmido control, pensamos que este efecto sería más evidente al lograr una mejor expresión. Por lo tanto, el primer objetivo fue clonar el gen PcEx11 de *P. carotovorum* en el plásmido pTB93F, que es un vector con una amplia gama de huéspedes además de que cuenta con un promotor fuerte y de expresión constitutiva en cepas de *Rhizobium* (promotor *trp*). Esto se logró en células de *R. tropici*, pero no en *S. meliloti* (aun habiendo confirmado que el plásmido con el gen de la expansina

estaba presente en las colonias analizadas). Esta falta de expresión por parte de *S. meliloti* habla de factores diferentes entre las dos especies, uno de los cuales pudiera deberse al uso diferente de codones entre *P. carotovorum* (Tabla 2) y *S. meliloti* (Tabla 3), que resultara en un problema en el proceso de traducción de la proteína. Pero el análisis realizado en el servidor Sequence Manipulation Suite (SMS) (Stothard P, 2000) no mostró diferencias importantes en el uso de codones por estas dos especies bacterianas, por lo que hasta el momento no sabemos el motivo de la falta de expresión de la expansina, ya que en trabajos anteriores se logró la expresión de la proteína verde fluorescente bajo el mismo promotor *trp* y en la cepa de *S. meliloti* utilizada en este trabajo (antes llamada *R. meliloti*) donde se observaron las bacterias fluorescentes (Gage D. J., Bobo T., y Long S. R., 1996), lo que indicaría que al menos a nivel de transcripción no debería haber habido problema. Es posible que exista algún control en la expresión a nivel de traducción de la expansina en esta bacteria, por ejemplo, una alta degradación por mal plegamiento o falta de exportación, y por ende la baja concentración. Debido a estos resultados para la siguiente discusión nos enfocaremos en gran medida a la cepa de *R. tropici*.

Exl1 aumenta la cantidad de biofilm en *R. tropici*

Como se mencionó, se ha propuesto que las expansinas actúan potenciando la actividad de otras proteínas como las celulasas sobre sus sustratos (Junior A. T., Dolce L. G., de Oliveira Neto M. y Polikarpov I. 2015). Este efecto se ha estudiado bajo dos premisas, la primera está dada por la necesidad de mejorar la conversión bioquímica de la biomasa celulósica para su aprovechamiento como materia prima de productos de utilidad como el bioetanol; mientras que otros estudios se han basado en este efecto como un método de medición de la actividad de las expansinas que carecen de actividad catalítica. Algunos estudios han reportado un bajo porcentaje de conversión de celulosa a azúcares al incubar expansinas de plantas con celulasas a bajas concentraciones para hidrolizar Avicel (Cosgrove 2001; Baker et al. 2000), lo que algunos han interpretado como la modificación del sustrato

(celulosa) por parte de la expansina. Un trabajo reciente con la expansina del hongo basidiomiceto *Schizophyllum commune* reportó sinergismo con celulasa y quitinasa al pretratar 24 horas, con resultados también de bajo porcentaje de conversión (Tovar-Herrera et al. 2015). Trabajos similares con expansinas bacterianas de *B. subtilis* (Kerff et al. 2008; Kim et al. 2009; Bunterngsook et al. 2015; Lin et al. 2013; Wang et al. 2014; Yan et al. 2012), *Hahella chejuensis* (Lee et al. 2010; Bunterngsook et al. 2014), *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia solanacearum*, *C. michiganensis* (Georgelis et al. 2014) y también con la expansina de *P. carotovorum* la cual es utilizada en este trabajo (Olarde-Lozano et al. 2014) con resultados contradictorios ya que algunos reportan relación sinérgica con otras celulasas, pero otros indican que incluso podría inhibir la actividad catalítica de las celulasas o xilanasas.

Debido a lo mencionado anteriormente se decidió analizar el efecto de PcEx11 expresada por *R. tropici* sobre la modificación de la longitud de las cadenas de celulosa presentes en el biofilm formado por esta bacteria, ya que está bien establecido que la celulosa es el blanco de unión de las expansinas (a través de su D2) y que la celulosa es el polímero más abundante en el biofilm de *R. tropici* (Robledo et al. 2012). La longitud de las cadenas de celulosa, mediada por la celulasa CelC2, está bastante regulada, debiendo ser de un tamaño tal que permita un biofilm estable. Este es un punto donde esperábamos encontrar algún efecto por la presencia de la expansina.

Nuestros resultados mostraron una modesta, pero recurrente mayor concentración de biofilm de *R. tropici* expresando PcEx11 mediante al menos 3 métodos diferentes. El hecho de que la concentración de biofilm fuera mayor en lugar de disminuir en comparación con la cepa silvestre podría deberse a la competencia con CelC2 por los sitios de unión, disminuyendo su actividad. Aunque en realidad nuestros experimentos no permiten saber si en realidad las cadenas de celulosa son de mayor longitud o si simplemente hay más de ellas. Para poder contestar esto, sería necesario observar directamente la celulosa bajo el microscopio, experimentos que ya han sido realizados en el reporte en el que se eliminó el gen de CelC2, y en el

que se tiñó con blanco de calcofluor para la comparación. Nuestra hipótesis va en el sentido de tener cadenas más largas, ya que no vemos cómo la expansina podría inducir una mayor síntesis de biofilm.

La modificación de las características de biofilm tiene un efecto sobre diferentes procesos, y en el caso de *R. tropici* es crítico para mantener una densidad celular adecuada y permitir la localización o adherencia específica de las células por periodos suficientes para iniciar la interacción benéfica con la planta hospedera (Danhorn T. y Fuqua C. 2007). Conocer con más detalle cómo fue afectado el biofilm en nuestros experimentos es importante no solamente para la interacción de *R. tropici* con su hospedero, sino también para otras especies, ya que muchas de ellas también forman este tipo de matrices para la interacción que establecen, por ejemplo, bacterias que son de nuestro interés como *B. subtilis* (Yu Y. et al. 2016; Mielich- Süß B. y Lopez D. 2015), *P. carotovorum* (Haque M. M. et al. 2017) y *Rhizobium* (Robledo et al. 2012). Lo que sí se confirmó con nuestros resultados comparados con los obtenidos por Robledo et al. (2012) es que la expresión de PcExl1 no afectó de forma importante la cantidad de biofilm, como ocurre con una cepa mutante o sobre expresante de la celulasa CelC2 de *R. leguminosarum* que tuvo cambios muy drásticos en la cantidad, forma y consecuencia de haber modificado el biofilm. Esto concuerda con todos los reportes de la literatura que hablan de que las expansinas no tienen actividad hidrolítica, y que el efecto que pudieran estar realizando sería a un nivel que compromete poco la integridad del biofilm.

Una ventaja de sintetizar biofilm por parte de las bacterias, es que brinda protección contra estrés ambiental como la desecación, la depredación y el efecto de antibióticos (Donot F. et al. 2012); además, de que los exopolisacáridos han despertado interés en los últimos años ya que estos componentes tienen aplicaciones comerciales importantes en salud, bionanotecnología, industria alimenticia, cosmética y sector ambiental. Por estas razones, el estudio de los biofilms resulta de suma importancia para la identificación de nuevos biopolisacáridos, además de que se buscan técnicas novedosas para optimizar su

producción (Castellane T. C. L., Lemos M. V. F. y de Macedo Lemos, E. G. 2014). Los resultados de nuestro estudio se podrían enfocar en el trabajo con cepas de *Rhizobium* buscando optimizar las condiciones para aumentar la producción de biofilm, y competir con cepas comerciales con alta producción de exopolisacáridos (ej. *R. tropici* SEMIA 4080 vendida en Brasil) (Hungria et al., 2000).

Lo que también es un hecho que pudimos confirmar en nuestro trabajo, es que tanto en el caso de *R. tropici* que sí expresó Exl1, y aumentó la cantidad de biofilm, como en el de *S. meliloti* que no tuvo fenotipo, es que ninguna de las dos especies permitió una mejoría o incluso ningún efecto adverso sobre el crecimiento de sus plantas hospedadoras. Como se mencionó antes, en el caso de *S. meliloti*, la razón podría ser simplemente que la falta de expresión de Exl1 fuera la responsable del resultado. Pero para *R. tropici*, sugerimos que el cambio tan pequeño en el aumento del biofilm pudiera no haber sido suficiente para provocar cambio a la interacción de la bacteria con el frijol. Otro aspecto es que algunos estudios sugieren que para *R. tropici* CIAT899 los exopolisacáridos componentes del biofilm, no son de extrema importancia para la nodulación de frijol común, pero puede contribuir a la competitividad de la cepa. Aunque sí podemos decir que el aumento observado no dio ventajas a un factor abiótico a las bacterias, ya que al menos a concentraciones altas de KCl las células que expresaban PcExl1 fueron igual de sensibles que las no expresantes, posiblemente porque para resistir más sería necesario una mayor concentración de biofilm de lo que logramos en este trabajo.

Finalmente, recientemente se han analizado mutantes de expansinas no quiméricas (que no están fusionadas a un dominio endoglucanasa contrario a las expansinas quiméricas). Muchas bacterias contienen solo una versión como la patógena vascular de tomate *R. solanacearum* la cual tiene únicamente la versión no quimérica RsEXLX1 (Nikolaidis et al., 2014), mientras que otra especie patógena de tomate, *C. michiganensis subsp. Michiganensis*, contiene las dos versiones, la quimérica (CmEXLX1) y la no quimérica (CmEXLX2) (Georgelis et al., 2015; Nikolaidis N., Doran N. y Cosgrove D.J. 2014). En el trabajo realizado por Tancos M. A. et al (2017) hicieron la mutante nula de la expansina no quimérica de ambas

especies, y sorpresivamente aumentó la virulencia de las dos cepas sobre las plantas de tomate contrario a lo analizado con la expansina quimérica de *C. michiganensis* (Jahr et al. 2000) donde la mutante nula perdió la capacidad virulenta en las plantas de tomate. La razón del incremento de necrosis de las cepas carentes de expansina no quimérica no es clara, pero podría ser una estrategia interesante en el análisis de otras bacterias que tienen relación con las plantas, tratando de expresar una expansina quimérica, y contrastarlo con la expresión de una expansina "no quimérica" (como la bacteria de *R. tropici* obtenida en este trabajo).

Tabla 2. Análisis de uso de codones de *P. carotovorum*, donde se representa la fracción de los codones para codificar un aminoácido (para cada aminoácido la suma representa 1 o 100%).

Results for 4410 residue sequence "*Pectobacterium carotovorum*" starting "AAAATCATGA"

AmAcid	Codon	Number	/1000	Fraction..
Ala	GCG	41.00	27.89	0.34
Ala	GCA	21.00	14.29	0.17
Ala	GCT	33.00	22.45	0.28
Ala	GCC	25.00	17.01	0.21
Cys	TGT	11.00	7.48	0.22
Cys	TGC	38.00	25.85	0.78
Asp	GAT	29.00	19.73	0.72
Asp	GAC	11.00	7.48	0.28
Glu	GAG	12.00	8.16	0.29
Glu	GAA	30.00	20.41	0.71
Phe	TTT	23.00	15.65	0.48
Phe	TTC	25.00	17.01	0.52
Gly	GGG	15.00	10.20	0.15
Gly	GGA	22.00	14.97	0.23
Gly	GGT	30.00	20.41	0.31
Gly	GGC	30.00	20.41	0.31
His	CAT	18.00	12.24	0.55

His	CAC	15.00	10.20	0.45
Ile	ATA	21.00	14.29	0.34
Ile	ATT	27.00	18.37	0.44
Ile	ATC	14.00	9.52	0.23
Lys	AAG	22.00	14.97	0.49
Lys	AAA	23.00	15.65	0.51
Leu	TTG	26.00	17.69	0.21
Leu	TTA	17.00	11.56	0.14
Leu	CTG	45.00	30.61	0.37
Leu	CTA	11.00	7.48	0.09
Leu	CTT	9.00	6.12	0.07
Leu	CTC	14.00	9.52	0.11
Met	ATG	30.00	20.41	1.00
Asn	AAT	16.00	10.88	0.39
Asn	AAC	25.00	17.01	0.61
Pro	CCG	35.00	23.81	0.43
Pro	CCA	22.00	14.97	0.27
Pro	CCT	15.00	10.20	0.19
Pro	CCC	9.00	6.12	0.11
Gln	CAG	30.00	20.41	0.57
Gln	CAA	23.00	15.65	0.43
Arg	AGG	22.00	14.97	0.12
Arg	AGA	16.00	10.88	0.09
Arg	CGG	39.00	26.53	0.21
Arg	CGA	40.00	27.21	0.22
Arg	CGT	30.00	20.41	0.16
Arg	CGC	39.00	26.53	0.21
Ser	AGT	15.00	10.20	0.12
Ser	AGC	30.00	20.41	0.24
Ser	TCG	23.00	15.65	0.18
Ser	TCA	29.00	19.73	0.23
Ser	TCT	19.00	12.93	0.15
Ser	TCC	9.00	6.12	0.07
Thr	ACG	25.00	17.01	0.32
Thr	ACA	14.00	9.52	0.18
Thr	ACT	20.00	13.61	0.26
Thr	ACC	19.00	12.93	0.24
Val	GTG	23.00	15.65	0.27
Val	GTA	16.00	10.88	0.19
Val	GTT	25.00	17.01	0.30
Val	GTC	20.00	13.61	0.24

Trp	TGG	34.00	23.13	1.00
Tyr	TAT	20.00	13.61	0.51
Tyr	TAC	19.00	12.93	0.49
End	TGA	35.00	23.81	0.57
End	TAG	7.00	4.76	0.11
End	TAA	19.00	12.93	0.31

Tabla 3. Análisis de uso de codones de *S. meliloti*.

Results for 11274 residue sequence "*Shinorhizobium meliloti*" starting "GATCTTCCGG"

AmAcid	Codon	Number	/1000	Fraction..
Ala	GCG	123.00	32.73	0.30
Ala	GCA	79.00	21.02	0.20
Ala	GCT	101.00	26.88	0.25
Ala	GCC	101.00	26.88	0.25
Cys	TGT	29.00	7.72	0.28
Cys	TGC	75.00	19.96	0.72
Asp	GAT	88.00	23.42	0.62
Asp	GAC	55.00	14.64	0.38
Glu	GAG	50.00	13.30	0.35
Glu	GAA	91.00	24.22	0.65
Phe	TTT	47.00	12.51	0.42
Phe	TTC	66.00	17.56	0.58
Gly	GGG	50.00	13.30	0.16
Gly	GGA	91.00	24.22	0.29
Gly	GGT	61.00	16.23	0.19
Gly	GGC	111.00	29.54	0.35
His	CAT	81.00	21.55	0.56
His	CAC	63.00	16.76	0.44
Ile	ATA	21.00	5.59	0.17
Ile	ATT	33.00	8.78	0.26
Ile	ATC	72.00	19.16	0.57
Lys	AAG	53.00	14.10	0.58
Lys	AAA	38.00	10.11	0.42

Leu	TTG	34.00	9.05	0.13
Leu	TTA	11.00	2.93	0.04
Leu	CTG	61.00	16.23	0.23
Leu	CTA	35.00	9.31	0.13
Leu	CTT	78.00	20.76	0.29
Leu	CTC	50.00	13.30	0.19
Met	ATG	48.00	12.77	1.00
Asn	AAT	36.00	9.58	0.43
Asn	AAC	47.00	12.51	0.57
Pro	CCG	110.00	29.27	0.40
Pro	CCA	56.00	14.90	0.21
Pro	CCT	62.00	16.50	0.23
Pro	CCC	44.00	11.71	0.16
Gln	CAG	50.00	13.30	0.39
Gln	CAA	78.00	20.76	0.61
Arg	AGG	53.00	14.10	0.09
Arg	AGA	44.00	11.71	0.07
Arg	CGG	151.00	40.18	0.24
Arg	CGA	183.00	48.70	0.30
Arg	CGT	62.00	16.50	0.10
Arg	CGC	124.00	33.00	0.20
Ser	AGT	21.00	5.59	0.06
Ser	AGC	61.00	16.23	0.18
Ser	TCG	95.00	25.28	0.28
Ser	TCA	51.00	13.57	0.15
Ser	TCT	54.00	14.37	0.16
Ser	TCC	55.00	14.64	0.16
Thr	ACG	38.00	10.11	0.37
Thr	ACA	24.00	6.39	0.23
Thr	ACT	19.00	5.06	0.18
Thr	ACC	22.00	5.85	0.21
Val	GTG	29.00	7.72	0.26
Val	GTA	9.00	2.39	0.08
Val	GTT	32.00	8.52	0.29
Val	GTC	40.00	10.64	0.36
Trp	TGG	57.00	15.17	1.00
Tyr	TAT	38.00	10.11	0.66
Tyr	TAC	20.00	5.32	0.34
End	TGA	64.00	17.03	0.66
End	TAG	14.00	3.73	0.14
End	TAA	19.00	5.06	0.20

10. CONCLUSIONES

1. Se logró la expresión de la expansina PcEx11 de *P. carotovorum* clonada en el vector pTB93F (pTB93-PcEx11) bajo un promotor de fuerte expresión en bacterias de *R. tropici*. En bacterias de *S. meliloti* conjugadas con el mismo vector no se pudo detectar la expresión de PcEx11 a pesar de que análisis de PCR con plásmido purificado de la bacteria comprobaba su presencia.

2. *R. tropici* que expresa la expansina PcEx11 tuvo una modesta mejora en la formación de biofilm (alrededor de 7-15%) comprobado mediante experimentos de tinción con rojo Congo y cristal violeta, además de un experimento de floculación. Realizando los mismos análisis para la cepa de *S. meliloti* no se comprobó este mismo comportamiento.

3. Los ensayos realizados de colonización de leguminosas con la cepa de *R. tropici* y *S. meliloti* no mostraron diferencia alguna de las cepas que contenían el plásmido con el gen de la expansina comparadas con las que no, lo que sugiere que podría no ser el único factor implicado en mejorar el crecimiento de las plantas.

11. PERSPECTIVAS

1. Realizar análisis de microscopía electrónica con la cepa de *R. tropici* que expresa la expansina PcEx1 para analizar el fenotipo de formación de biofilm, además de su adherencia a las raíces y objetos inertes.

2. Realizar tinciones con blanco de Calcofluor el cual es un compuesto afín a la celulosa y poder medir la longitud de las cadenas de celulosa presente en el biofilm de *R. tropici*.

3. Repetir los ensayos de colonización de plantas de *P. vulgaris* con *R. tropici* que expresa la expansina PcEx1, para mejorar el procedimiento utilizado y aumentar las unidades observacionales con el fin de obtener un resultado contundente.

4. Realizar conjugaciones del vector pTB93-PcEx1 en otras cepas de *R. tropici*, *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, etcétera, para observar y comparar el fenotipo de biosíntesis de biofilm de estas bacterias y con las ya reportadas.

12. ANEXOS

Medio PY	
Bacto-Peptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
Para medio sólido agregar 1.5 g de agar por cada 100 ml de medio.	
Se adiciona 1 ml de CaCl ₂ 0.7 M (100X) por cada 100 ml de medio esterilizado (Si no se agrega el CaCl ₂ no crecen las bacterias).	

Medio YMA	
Manitol	7 g/l
Extracto de levadura	2 g/l
K ₂ HPO ₄	0.2 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2 g/l
Para medio sólido agregar 1.5 g de agar por cada 100 ml de medio.	

Medio Fahraeus	
	<u>Stock 1000X</u>
K ₂ HPO ₄ 1%	10 g/ 100 ml
MgSO ₄ · 7 H ₂ O 1.2%	12 g/ 100 ml
CaCl ₂ 1%	10 g/ 100 ml
Na ₂ HPO ₄ 1.5%	15 g/ 100 ml
Citrato Férrico 0.05%	0.5 g/ 100 ml
* Trazas Gibson 1000X	1 ml de stock en 1 litro de agua
Se agrega 1 ml de cada solución stock por cada litro de agua estéril.	
* TRAZAS GIBSON 1000X	
H ₃ BO ₃	1.43 gr/ 500 ml
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	1.015 gr/ 500 ml
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.110 gr/ 500 ml
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.04 gr/ 500 ml
H ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0.04 gr/ 500 ml

Medio Rigaud and Puppo	
K₂HPO₄	0.044 g/l
MgSO₄ · 7 H₂O	0.1258 g/l
CaSO₄	0.120 g/l
K₂SO₄	15 g/l
KH₂PO₄	0.068 g/l
EDTA-Fe	50 mg/l
* Micronutrientes 1000X	1 ml de stock en 1 litro de agua
Ajustar a pH 7.5 con KOH y autoclavar	
* Micronutrientes 1000X	
H₃BO₃	2.85 g/l
MnSO₄ · H₂O	3.07 g/l
ZnSO₄ · 7 H₂O	0.55 g/l
CuSO₄ · 5 H₂O	0.2 g/l
Na₂MoO₄ · 2 H₂O	0.110 g/l

13. BIBLIOGRAFÍA

Ariel F., Brault-Hernandez M., Laffont C., Huault E., Brault M., Plet J., Moison M., Blanchet S., Laurent Ichanté J., Chabaud M., Carrere S., Crespi M., L. Chan R. y Frugier F. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 24(9), 3838-3852.

Baker J. O., King M. R., Adney W. S., Decker S. R., Vinzant T. B., Lantz, S. E., Nieves R. E., Thomas S. R., Li L. C., Cosgrove D. J. y Himmel M. E. (2000). Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 84(1), 217-223.

Boscari A., del Giudice J., Ferrarini A., Venturini L., Zaffini A. L., Delledonne M. y Puppo, A. (2013). Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide?. *Plant physiology*, 161(1), 425-439.

Bouzarelou D., Billini M., Roumelioti K. y Sophianopoulo V. (2008). EglD, a putative endoglucanase, with an expansin like domain is localized in the conidial cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* (45), 839–850.

Bunterngsook B., Mhuantong W., Champreda V., Thamchaipenet A. y Eurwilaichitr L. (2014) Identification of novel bacterial expansins and their synergistic actions on cellulose degradation. *Bioresour Technol* 159C:64–71.

Bunterngsook B., Eurwilaichitr L., Thamchaipenet A. y Champreda V. (2015) Binding characteristics and synergistic effects of bacterial expansins on cellulosic and hemicellulosic substrates. *Bioresour Technol* 176:129–135.

Castellane T. C. L., Lemos M. V. F. y de Macedo Lemos E. G. (2014). Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. *Carbohydrate polymers*, 111, 191-197.

Cho H. T. y Kende, H. (1997). Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *The Plant Cell*, 9(9), 1661-1671.

Civello P. M., Powell A. L., Sabehat A. y Bennett A. B. (1999). An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, 121(4), 1273-1279.

Cosgrove D. J. (2000a). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321.

Cosgrove, D. J. (2001). U.S. Patent No. 6,326,470. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Cosgrove D. J., Li L. C., Cho H. T., Hoffmann-Benning S., Moore R. C. y Blecker D. (2002). The growing world of expansins. *Plant and Cell Physiology*, 43(12), 1436-1444.

Cosgrove D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. Nature reviews. *Molecular cell biology*, 6(11), 850.

Cosgrove D. J. (2017). Microbial Expansins. *Annual Review of Microbiology*, 71(1).

Cuadrado B., Rubio G. y Santos W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. vol. 38 (1), 78-104.

Danhorn, T. y Fuqua C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 401-422.

Darley C., Li Y., Schaap P. y McQueen-Mason S. (2003). Expression of a family of expansin-like proteins during the development of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Letters* (546), 416-418.

Delić D., Stajković-Srbinović O., y Knežević-Vukčević J. (2016). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Sinorhizobium meliloti*: prospects of using rhizobial inoculants in Serbia. *Botanica Serbica*, 40(1).

Díaz Alcántara, C. A. (2010). Aislamiento, caracterización y selección de rizobias autóctonas que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. (Tesis doctoral). Departamento de ingeniería y ciencias agrarias. Universidad de León.

Dixit S., Dubey R. C., Maheshwari D. K., Seth P. K. y Bajpai V. K. (2017). Roles of quorum sensing molecules from *Rhizobium etli* RT1 in bacterial motility and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Donot F., Fontana A., Baccou J. C. y Schorr-Galindo S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962.

Downes B. P. y Crowell D. N. (1998). Cytokinin regulates the expression of a soybean β -expansin gene by a post-transcriptional mechanism. *Plant molecular biology*, 37(3), 437-444.

Gage D. J., Bobo T. y Long S. R. (1996). Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of bacteriology*, 178(24), 7159-7166.

Georgelis N., Nikolaidis N. y Cosgrove D. (2014). Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydrate Polymer* (100), 17-23.

Georgelis N., Nikolaidis N. y Cosgrove D.J. (2015) Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 3807–3823.

Gutiérrez E. M. (2014). Colonización, infección y nodulación en la interacción mutualista *Ensifer-Medicago*: análisis molecular y funcional de la implicación del gen celC (Doctoral dissertation, Universidad de Salamanca).

Haque M. M., Oliver M. M. H., Nahar K., Alam M. Z., Hirata H. y Tsuyumu S. (2017). CytR Homolog of *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* Controls Air-Liquid Biofilm Formation by Regulating Multiple Genes Involved in Cellulose Production, c-di-GMP Signaling, Motility, and Type III Secretion System in Response to Nutritional and Environmental Signals. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Hungria M., Andrade D. S., Chueire L. M. O., Probanza A., Guttierrez-Manero F. J. y Megías M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1515–1528.

Junior A. T., Dolce L. G., de Oliveira Neto M. y Polikarpov I. (2015). *Xanthomonas campestris* expansin-like X domain is a structurally disordered beta-sheet macromolecule capable of synergistically enhancing enzymatic efficiency of cellulose hydrolysis. *Biotechnology letters*, 37(12), 2419-2426.

Kamboj D. V., Bhatia R., Pathak D. V. y Sharma P. K. (2010). Role of nodD gene product and flavonoid interactions in induction of nodulation genes in *Mesorhizobium ciceri*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(1), 69-77.

Kim E. S., Lee H. J., Bang W. G., Choi I. G. y Kim K. H. (2009) Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng* 102(5):1342–1353.

Kryvoruchko I. S., Sinharoy S., Torres-Jerez I., Sosso D., Pislariu C. I., Guan D., Murray J. Benedito V. A., Frommer W. B. y Udvardi M. K. (2016). MtSWEET11, a nodule-specific sucrose transporter of *Medicago truncatula* root nodules. *Plant physiology*, pp-01910.

Kudla U., Qin L., Milac A., Maissen C., Overmars H., Popeijus H., Roze E., Petrescu A., Smant G., Bakker J. y Helder J. (2005). Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Federation of European Biochemical Societies* (579), 2451-2457.

Lasa I., Del Pozo J. L., Penades J. R. y Leiva J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. In Anales del Sistema Sanitario de Navarra (Vol. 28, No. 2, pp. 163-175). Gobierno de Navarra. *Departamento de Salud*.

Lee H. J., Lee S., Ko H. J., Kim K. H. y Choi I. G. (2010). An expansin-like protein from *Hahella chejuensis* binds cellulose and enhances cellulase activity. *Molecules and cells*, 29(4), 379-385.

Li Y., Jones L. y McQueen-Mason S. (2003). Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 603-10.

Liu X., Liu C., Ma Y., Hong J. y Zhang M. (2014). Heterologous expression and functional characterization of a novel cellulose-disruptive protein LeEXP2 from *Lycopersicon esculentum*. *Journal of biotechnology*, 186, 148-155.

Lin H., Shen Q., Zhan J. M., Wang Q. y Zhao Y. H. (2013) Evaluation of bacterial expansin EXLX1 as a cellulase synergist for the saccharification of lignocellulosic agro-Industrial wastes. *Plos One* 8(9): e75022.

Lodwig E. y Poole P. (2003). Metabolism of Rhizobium bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22 (1), 37–78.

Marino D., Andrio E., Danchin E. G., Oger E., Gucciardo S., Lamber A., Puppo A. y Pauly, N. (2011). A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytologist*, 189(2), 580-592.

Martin F., Aerts A., Ahrén D., Brun A., Danchin E. G. J., Duchaussoy F., Gibon J., Kohler A., Lindquist E., Pereda V., Salamov A., Shapiro H. J., Wuyts J., Blaudez D., Buée M., Brokstein P., Canbäck B., Cohen D., Courty P. E., Coutinho P. M., Delaruelle C., Detter J. C., Deveau A., DiFazio S., Duplessis S., Fraissinet-

Tachet L., Lucic E., Frey-Klett P., Fourrey C., Feussner I., Gay G., Grimwood J., Hoegger P. J., Jain P., Kilaru S., Labbé J., Lin Y. C., Legué V., Le Tacon F., Marmeisse R., Melayah D., Montanini B., Muratet M., Nehls U., Niculita-Hirzel H., Oudot-Le Secq M. P., Peter M., Quesneville H., Rajashekar B., Reich M., Rouhier N., Schmutz J., Yin T., Chalot M., Henrissat B., U. Kües, Lucas S., Van de Peer Y., Podila G. K., Polle A., Pukkila P. J., Richardson P. M., Rouzé P., Sanders I. R., Stajich J. E., Tunlid A., Tuskan G. y Grigoriev I. V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Letters* (452), 88-92.

McQueen-Mason S. J., Durachko D. M. y Cosgrove D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4:1425–33.

McQueen Mason S. J. y Cosgrove D. (1995). Expansin mode of action on cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology* 107, 87-100.

Mielich- Süß B. y Lopez D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental microbiology*, 17(3), 555-565.

Mitra R. M. y Long S. R. (2004). Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant physiology*, 134(2), 595-604.

Nikolaidis N., Doran N. y Cosgrove D.J. (2014) Plant expansins in bacteria and fungi: evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Mol. Biol. Evol.* 31, 376–86.

Oger E., Marino D., Guignonis J. M., Pauly N. y Puppo A. (2012). Sulfenylated proteins in the *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Journal of proteomics*, 75(13), 4102-4113.

Olarte Lozano M., Mendoza Ñunez M. A., Pastor N., Segovia L., Folch Mallo J. y Martínez Anaya C. (2014). PcExl1 a Novel Acid Expansin-Like Protein from the Plant Pathogen *Pectobacterium carotovorum*, Binds Cell Walls Differently to BsEXLX1. *Plos One*, vol. 9 (4).

Pastor N., Davila S., Perez Rueda E., Segovia L. y Martínez-Anaya C. (2014). Electrostatic analysis of bacterial expansins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 83:215–223.

Quinto C. y Cárdenas L. (2007). Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. López Munguía A, Rebolledo F. *Una ventana al quehacer científico*. México: Biotecnología UNAM, 273-279.

Quiñones Valles, C. (2009). Identificación de genes que codifican para expansinas similares en varios organismos simbiotes y patógenos de plantas. (Tesis de maestría). Centro de ciencias básicas. Universidad autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.

Quiroz-Castañeda R. E. y Folch-Mallol J. L. (2011). Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. *Biotechnol Appl*, 28, 205-15.

Rinaudi L., Fujishige N. A., Hirsch A. M., Banchio E., Zorreguieta A., y Giordano W. (2006). Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in microbiology*, 157(9), 867-875.

Robledo M., Jiménez-Zurdo JI., Soto M. J., Velázquez E., Dazzo F., Martínez-Molina E., Mateos P. F. (2011). Development of functional symbiotic White clover root hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase celC2. *Mol Plant Microbe Interact*, 24:798–807.

Robledo M., Rivera L., Jiménez-Zurdo J. I., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch Ann M. y Mateos P. F. (2012). Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11(1), 125.

Rose J. K., Lee H. H. y Bennett A. B. (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5955-5960.

Russo D. M., Abdian P. L., Posadas D. M., Williams A., Voza N., Giordano W., Kannenberg E., Downie J. A. y Zorreguieta A. (2015). Lipopolysaccharide O-chain core region required for cellular cohesion and compaction of in vitro and root biofilms developed by *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), 1013-1023.

Saloheimo M., Paloheimo M., Hakola S., Pere J., Nyssönen E., Bhatia A., Ward M. y Penttilä M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* (269), 4202–4211.

Sampedro J. y Cosgrove D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, vol. 6(12), 1.

Sessitsch J., Howieson X., Perret H., Antoun H. y Martínez-Romero E. (2002). Advances in *Rhizobium* Research. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21 (4), 323-378.

Silva C., Kan F. L., y Martínez-Romero E. (2006). Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago spp.* in Mexico. *FEMS microbiology ecology*, 60(3), 477-489.

Sinharoy S., Liu C., Breakspear A., Guan D., Shailes S., Nakashima J., Zhang S., Wen J., Torres-Jerez I., Oldroyd G., Murray J. D. y Udvardi M. K. (2016). A *Medicago truncatula* Cystathionine- β -synthase-like domain-containing protein is required for rhizobial infection and symbiotic nitrogen fixation. *Plant physiology*, 170(4), 2204-2217.

Tancos M. A., Lowe-Power T. M., Peritore-Galve F. C., Tran T. M., Allen C. y Smart C. D. (2017). Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato vascular pathogens. *Molecular Plant Pathology*.

Tovar-Herrera O. E., Batista-García R. A., del Rayo Sánchez-Carbente M., Iracheta-Cárdenas M. M., Arévalo-Niño K. y Folch-Mallol J. L. (2015). A novel expansin protein from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*. *PLoS one*, 10(3), e0122296.

Wang W. C., Liu C., Ma Y. Y., Liu X. W., Zhang K. y Zhang M. H. (2014) Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. *Biochem Eng J* 84:16–27.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. y Lane D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*. 173(2), 697-703.

Wu Y., Meeley R. B. y Cosgrove D. J. (2001). Analysis and expression of the α -expansin and β -expansin gene families in maize. *Plant Physiology*, 126(1), 222-232.

Yan Z., He M. X., Bo W., Hu Q. C., Li Q. y Zhao J. (2012) Recombinant EXLX1 from *Bacillus subtilis* for enhancing enzymatic hydrolysis of corn stover with low cellulase loadings. *African J Biotech* 11: 11126–11131.

Yu Y., Yan F., Chen Y., Jin C., Guo J. H. y Chai Y. (2016). Poly- γ -glutamic acids contribute to biofilm formation and plant root colonization in selected environmental isolates of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in microbiology*, 7.