



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Método de inducción, aislamiento y selección de proteínas HRP de bacterias fitopatógenas, una fuente potencial de inductores de resistencia vegetal.

Method of induction, isolation, and selection of HRP proteins from phytopathogenic bacteria, a potential source of inducers of plant resistance.

Valerio-Landa, Sergio David¹; Quiñones-Aguilar, Evangelina Esmeralda¹; Enriquez-Vara, Jhony Navat¹; Hernández-Gutiérrez, Rodolfo¹; Hernández-Montiel, Luis Guillermo² y Rincon-Enriquez, Gabriel^{1*}.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ)
2. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

*Correspondencia. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Camino Arenero 1227, Col. El Bajío del Arenal, Jalisco, México. CP. 45019 Tel. +52 (33) 33 45 52 00, grincon@ciatej.mx

Resumen

Xanthomonas vesicatoria es una bacteria Gram negativa y patógena de una gran variedad de especies vegetales, entre ellas especies de importancia económica para México como chile (*Capsicum annuum*) y jitomate (*Solanum lycopersicum*). El grupo de genes *hrp* es conservado entre especies de *Xanthomonas*, dentro de este grupo de genes está el que codifica para el sistema de secreción tipo III y efectores patógenos, componentes clave en los procesos de infección de las células bacterianas a su planta huésped. Particularmente, proteínas HRP de *Xanthomonas* son producidas *in situ* en su planta hospedera durante los procesos de infección o *in vitro* en medios mínimos de crecimiento que imitan condiciones similares a su hospedero. El objetivo de este trabajo fue establecer un método de inducción, aislamiento y selección de proteínas HRP de bacterias fitopatógenas. Para ello, se diseñaron medios de inducción de proteínas HRP para *Xanthomonas* que comprenden tejido vegetal liofilizado de plantas hospederas como única fuente de carbono y nutrientes. *Xanthomonas vesicatoria* cepa BV801 (XAN801) fue capaz de crecer en los medios de inducción denominados AWSL y AWCA,

Abstract

Xanthomonas vesicatoria is a Gram-negative bacterium and pathogen of a great variety of plant species, among them species of economic importance for Mexico such as pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*). The group of genes *hrp* is conserved among *Xanthomonas* species, within this group of genes is the one that codes for the type III secretion system and pathogenic effectors, key components in the infection processes of bacterial cells to their host plant. *Xanthomonas* HRP proteins are produced *in situ* in their host plant during infection processes or *in vitro* in minimal growth media that mimic conditions like their host. The aim of this work was to establish a method of induction, isolation, and selection of HRP proteins from phytopathogenic bacteria. For this, HRP protein induction media were designed for *Xanthomonas* that comprise lyophilized plant tissue of host plants as the sole source of carbon and nutrients. *Xanthomonas vesicatoria* strain BV801 (XAN801) was able to grow in induction media named AWSL and AWCA; contained at least 0.1% lyophilized tissue of *S. lycopersicum* and *C. annuum* respectively. The protein profile of XAN801

conteniendo al menos 0.1% de tejido liofilizado de *S. lycopersicum* y *C. annuum* respectivamente. El perfil de proteínas de XAN801 se resolvió por SDS-PAGE. Se demostró la inducción de bandas de proteínas en XAN801 cultivada en medios AWSL y AWCA. El aislamiento de bandas de proteínas inducidas se realizó por exclusión de geles de poliacrilamida después de su separación por SDS-PAGE. Las bandas de proteínas inducidas mantuvieron actividad biológica de respuesta hipersensible en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*). Los resultados de este trabajo son clave en la búsqueda y selección de proteínas HRP de bacterias fitopatógenas con capacidad de activar el sistema de defensa vegetal, lo cual puede conducir al fenómeno de resistencia fisiológica a fitopatógenos en plantas.

Palabras claves: *Xanthomonas*, proteómica, control biológico, inducción de resistencia.

was resolved by SDS-PAGE. Induction of protein bands was demonstrated in XAN801 grown on AWSL and AWCA media. The isolation of induced protein bands was performed by exclusion of polyacrylamide gels after their separation by SDS-PAGE. The induced protein bands maintained biological activity of hypersensitive response in tobacco leaves (*Nicotiana benthamiana*). The results of this work are key in the search and selection of HRP proteins from phytopathogenic bacteria with the ability to activate the plant defense system, which can lead to the phenomenon of physiological resistance to phytopathogens in plants.

Keywords: *Xanthomonas*, proteomics, biocontrol, resistance induction.

Introducción

El género *Xanthomonas* comprende a bacterias Gram negativas, muchas de las cuales son fitopatógenas de especies vegetales incluidas especies de importancia agrícola como arroz, trigo, plátano, jitomate, cítricos y algodón [1]. En México *Xanthomonas vesicatoria* (anteriormente clasificada como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) es el agente causal de la mancha bacteriana, una de las enfermedades que afecta a las principales zonas productoras de Chile (*Capsicum annuum*) y jitomate (*Solanum lycopersicum*) de México, causando pérdidas de hasta 80-90% en la producción [2,3]. La infección de *X. vesicatoria* inicia cuando ingresa a su hospedero a través de estomas, hidatodos o lesiones en hojas, una vez dentro coloniza el tejido vegetal y lo necrosa, dando lugar a la aparición de manchas necróticas en hojas o frutos que son típicas de la enfermedad. Al final se libera nuevo inoculo al ambiente reiniciando el ciclo bacteriano.

Una mejor comprensión de los mecanismos de virulencia implicados en la interacción patógeno-planta es clave en el desarrollo de estrategias efectivas de control de patógenos y así mantener la seguridad alimentaria. Como muchas bacterias fitopatógenas, *X. vesicatoria* ha evolucionado con un sistema de secreción tipo III (SST3); el cual es una jeringa molecular que facilita la secreción de proteínas efectoras y toxinas dentro de las células vegetales de su hospedero, estas proteínas permiten modular las funciones celulares de su hospedante para establecer la infección [4]. En *Xanthomonas* los genes *hrp* (del acrónimo en inglés; *hypersensitive response and*

pathogenicity) codifican al SST3 y efectores patógenos. Por otro lado, los genes *hrp* conservados entre diversos géneros de bacterias se denominan genes *hrc* (*hrp* and conserved), los genes *hrp* y *hrc* se agrupan en una región cromosómica que abarca de 20 a 30 kb denominadas como islas de patogenicidad [5]. Se sabe que la regulación de la expresión de genes *hrp* y *hrc* puede darse en respuesta a una variedad de señales ambientales: temperatura, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes, presencia de cationes divalentes (en particular Ca^{2+}), pH y fase de crecimiento [4]. Por otra parte, se ha demostrado que proteínas HRP de *Xanthomonas* pueden ser producidas *in situ* en su planta hospedera durante los procesos de infección [6] o *in vitro* en medios mínimos de crecimiento y de baja osmolaridad que imitan condiciones similares a su hospedero denominados como medios de inducción de proteínas HRP (medio IPH) [7].

Por otra parte, el uso de proteínas HRP como inductores del sistema de defensa vegetal que conduce a un estado fisiológico de resistencia en plantas ha surgido como una alternativa al control químico de patógenos y ha ganado interés en los últimos años. Específicamente, el fenómeno de resistencia es un mecanismo de inmunidad inducido en plantas que confiere protección sistémica de amplio espectro y larga duración contra la infección de patógenos [8]. Las primeras proteínas HRP que demostraron este potencial fueron las proteínas *harpin* aisladas de *Erwinia amylovora*, las cuales demostraron ser inductores de respuesta hipersensible y que inducen en planta un estado fisiológico de resistencia contra patógenos, insectos y mejoran la respuesta de plantas

al estrés ambiental [9]. En este trabajo nosotros establecimos un método de inducción, aislamiento y selección de proteínas HRP para *Xanthomonas*, además, establecimos un método para evaluar su actividad biológica mediante ensayos de respuesta hipersensible (HR). Las metodologías propuestas en este trabajo son clave para la búsqueda de nuevas proteínas HRP de bacterias fitopatógenas y su uso como posibles inductores de resistencia vegetal.

Descripciones metodológicas y resultados

Diseño y evaluación de medios de inducción de proteínas HRP

En este trabajo proponemos la siguiente metodología para el diseño de un medio de cultivo para *Xanthomonas* spp. capaz de inducir en esta bacteria la expresión de proteínas HRP. El medio IPH para *Xanthomonas* comprende como única fuente de

carbono y nutrientes mineral el tejido vegetal de una planta hospedante como jitomate (*S. lycopersicum*) o chile (*C. annuum*), un agente gelificante para generar una matriz de soporte y obtener un medio sólido, y un diluyente. Para la obtención de biomasa vegetal se sembraron semillas de jitomate cultivar Maya (Seminis®) y de chile cultivar Ancho San Luis (Pacific Seed Company®) en macetas de 2.5 L con sustrato estéril, que comprende una mezcla de suelo, arena, perlita y turba (4:4:1:1, volúmenes de proporción) y se mantuvieron en invernadero durante 45 días hasta su cosecha. El material vegetal cosechado fue liofilizado (Freeze Dryer, ilShinBioBase®) durante 96 h, posteriormente fue pulverizado con ayuda de un mortero y pistilo de porcelana, el material fue cernido para separarlo del material vegetal no macerado y el pulverizado vegetal se almacena en frascos herméticos en oscuridad a temperatura ambiente hasta por un año (**Figura 1**).



Figura 1. Diagrama del proceso para la obtención de tejido vegetal pulverizado utilizado como fuente única de carbono y nutrientes para el medio IPH para *Xanthomonas* spp.

Posteriormente, se formuló el medio de inducción, como se muestra en la **tabla 1**, en donde, AWSL comprende agar (Sigma-Aldrich®), agua ultrapura y tejido pulverizado de *S. lycopersicum*; AWCA comprende agar (Sigma-Aldrich®), agua ultrapura y tejido pulverizado *C. annuum*. Una vez mezclados los

componentes para la elaboración de los medios de cultivo el pH fue ajustado a 7.0 y esterilizados en autoclave por 15 min a 120°C y 1.05 kg·cm⁻². El medio de cultivo fue vertido en placas Petri y se dejó gelificar dentro de campana de flujo laminar.

Tabla 1. Formulación de los medios de cultivo AWSL (agar, agua, *Solanum lycopersicum*) y AWCA (agar, agua, *Capsicum annuum*).

Clave	Fuente vegetal		Agente gelificante	
	Tipo	Concentración final (%)	Tipo	Concentración final (%)
AWSL	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.1 a 0.4	Agar	1.5
AWCA	<i>Capsicum annuum</i>	0.1 a 0.4	Agar	1.5

Método de cultivo de *Xanthomonas* spp. en medio de inducción de proteínas HRP

Para esta metodología se utilizó a *Xanthomonas vesicatoria* cepa BV801 (XAN801) la cual se obtuvo de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ, la cepa fue aislada de lesiones asociadas con la mancha bacteriana en cultivos de chile en la región productora de Jalisco. La

bacteria proveniente de crioconservación fue reactivada en medio sólido NYGA (peptona al 0.5%, extracto de levadura al 0.3%, glicerol al 2%, agar 1.5%, pH de 7.0) o medio M9 (Na₂HPO₄ 6 g/L; KH₂PO₄ 3 g/L; NaCl 0.5 g/L; NH₄Cl 1 g/L; suplementado con CaCl₂ 0.1 mM y MgSO₄·7H₂O 1.0 mM, fructosa al 0.2% como fuente de carbono, agar 1.5%) después de la esterilización por autoclave el medio se vertió en placas de Petri, la bacteria se

sembró por estriado e incubó a 28°C por 24 h en oscuridad.

El método de crecimiento de *X. vesicatoria* en medio de inducción AWSL o AWCA se describen en la **Figura 2**. Específicamente, se aisló una única colonia de *X. vesicatoria* de medio rico NYGA después de su reactivación de crioconservación. La bacteria se sembró en medio líquido NYG (peptona al 0.5%, extracto de levadura al 0.3%, glicerol al 2%, pH de 7.0) e incubó a 28°C a 200 rpm por 24 h en oscuridad. Las células bacterianas fueron cosechadas de medio líquido por centrifugación a 8000 rpm por 5 min en centrifugadora (Thermo Fisher Scientific®), se eliminó el medio de cultivo sobrenadante y se realizaron 3 lavados con agua desionizada estéril, repitiendo el proceso de centrifugación entre los lavados. Posteriormente, la concentración de bacterias

fue ajustada a una densidad óptica (OD) $OD_{600}=1.0$ (1×10^7 UFC, unidades formadoras de colonia/mL) mediante un espectrofotómetro (Eppendorf®, BioPhotometer), 100 μ L de esta solución de bacterias fueron sembradas por extensión en medios de cultivo con tejido vegetal (AWSL y AWCA) desarrollados en el ejemplo anterior y medios control (NYGA y M9+fructosa). La incubación de las placas inoculadas con XAN801 se realizó a 28°C en oscuridad (incubadora SEV-PRENDO®, DBO-13) y la cosecha de células para su evaluación se realizó a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Las bacterias fueron cosechadas de medio sólido mediante el raspado de los tapetes bacterianos y lavados con búfer de fosfatos (PBS) 1X ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 2.56 g/L; NaCl 8 g/L; KCl 0.2 g/L; KH_2PO_4 0.2 g/L) para facilitar la recolección de células (**Figura 2**).

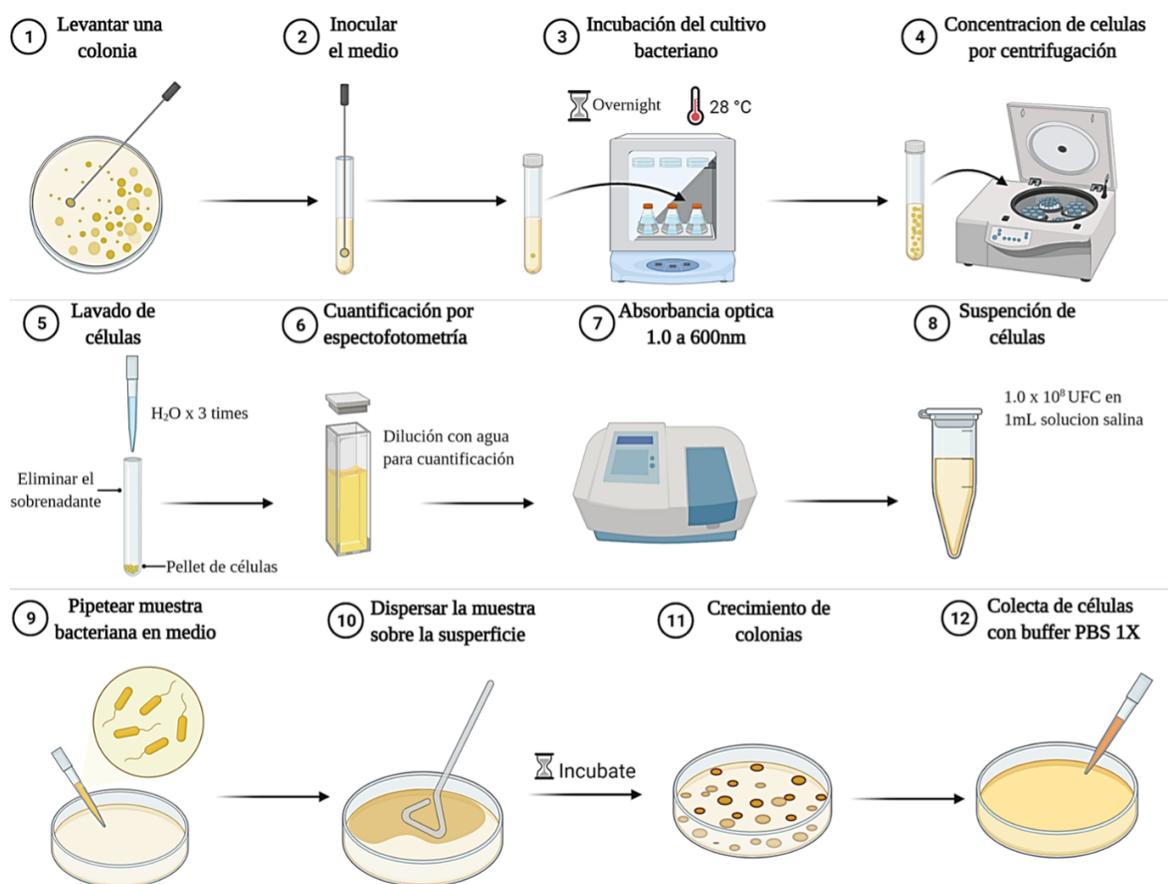


Figura 2. Diagrama de proceso para el cultivo de *Xanthomonas* spp. en medio de crecimiento de inducción de proteínas HRP y método de cosecha de células.

Método de extracción de proteínas totales de *Xanthomonas* spp.

El método para la extracción de proteínas totales a partir de *X. vesicatoria* se describe en la **Figura 3**. El proceso consistió en realizar el lisado de bacterias con búfer SDS-Tris (SDS 0.1%; Tris-base 100 mM; pH 9.5), se utilizó 1 mL de búfer SDS-Tris por cada 0.1 g. Las células se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 14000 rpm por 30 min a 4°C; se recuperó el sobrenadante de SDS-Tris con las proteínas solubles. La precipitación de proteínas fue hecha con acetona pura (5 mL de acetona por 1 mL de proteínas),

incubando a la muestra a -80°C por 2 h. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por decantación y evaporación. Finalmente, la muestra de proteínas se resuspendió en 0.25 mL de buffer de muestra Laemmli (2X) por cada 0.1 g de células utilizadas al inicio de la extracción. Las muestras de proteínas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de colorimetría de Bradford y el estándar de proteína BSA [10]. Para determinar el perfil proteico se ajustó una solución de proteínas a una concentración de 200 µg/mL.

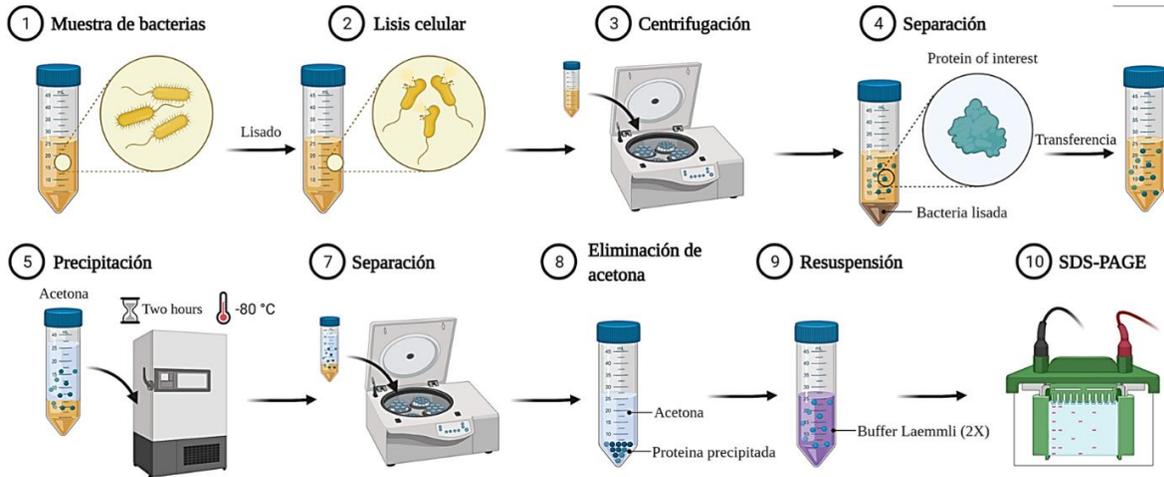


Figura 3. Diagrama del proceso para la extracción de proteínas totales de *Xanthomonas* spp.

Método para caracterizar el perfil de proteínas de *Xanthomonas* spp. por SDS-PAGE

El método para caracterizar el perfil de proteínas *X. vesicatoria* se describe en la **Figura 4**. La caracterización de proteínas de *Xanthomonas* sp. se realizó a través de la resolución por SDS-PAGE tal como describe Laemmli (1970) [11]. El gel de empaquetamiento contuvo 4% de acrilamida (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS w/v) y el gel de resolución contuvo 12% de acrilamida (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS w/v). Las muestras de 5 µL de soluciones de proteínas (200 µg/mL) se cargaron con 4.75 µL de buffer de muestra Laemmli y 0.25 µL de β-mercaptoetanol, con desnaturalización a 95°C durante 5 min en Thermoblock (Eppendorf®). La electroforesis se realizó en búfer SDS-PAGE 1X (Tris 250 mM, glicina 1.92 M, SDS al 1%, pH 8.3). Las

condiciones de electroforesis fueron 120 volts por 100 min. Se realizó la tinción del gel con Coomassie R-250 (50% de metanol, 10% de ácido acético, 0.25% de azul de coomassie R-250). Se eliminó el exceso de tinte con solución de desvanecimiento (45% de metanol, 10% de ácido acético). Se realizó la visualización y captura de imágenes de los gels de proteínas resueltos en un fotodocumentador (Bio-Rad®, Gel Doc XR System). A pesar de que los métodos de secuenciación de siguiente generación son los métodos actualmente usados para los grandes proyectos genómicos, la secuenciación por el método de Sanger o de terminadores se sigue utilizando ampliamente para experimentos de menor escala, secuenciación de regiones pequeñas o unos cuantos genes y para completar regiones que con otras metodologías aún son difíciles de secuenciar [10,14].

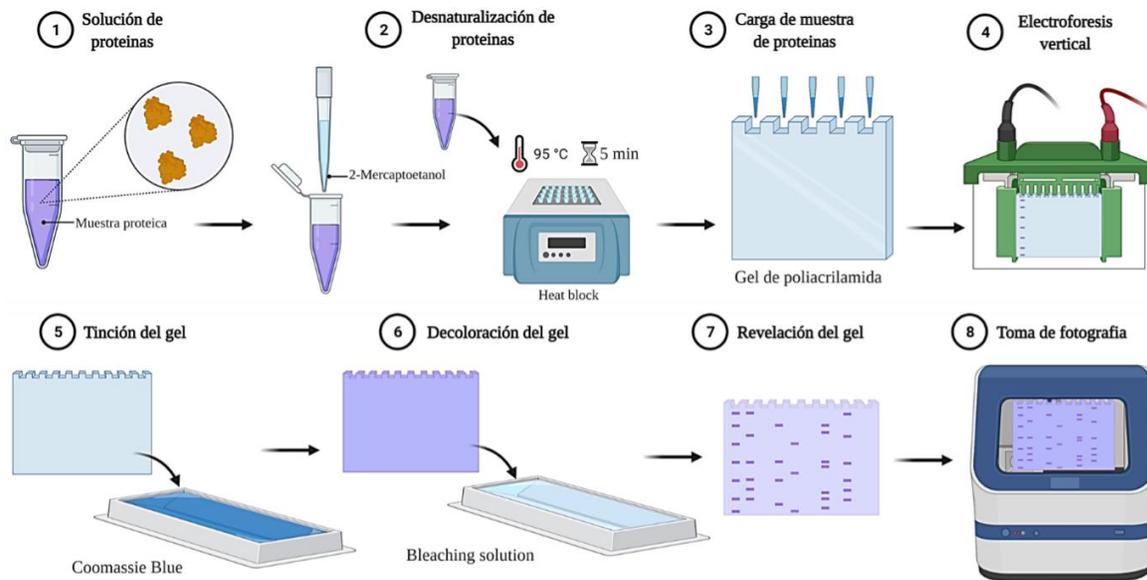


Figura 4. Diagrama del proceso para la resolución del perfil de proteínas de *Xanthomonas* spp. por SDS-PAGE.

El perfil de proteínas de XAN801 resuelto por SDS-PAGE se muestra en la **Figura 5a**, la técnica permitió evaluar la acumulación constante de bandas de proteínas, tal y como lo demuestra la comparación de diferentes perfiles de proteínas obtenidos de la misma bacteria a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. También, la técnica permitió evaluar la capacidad de medios de

inducción como AWSL y AWCA para modificar el proteoma de *Xanthomonas* spp. e inducir de forma estable bandas de proteínas de aproximadamente 12, 15, 20, 24 y 26 kDa; esto en comparación al perfil de proteínas obtenidos de los medios control de NYGA y M9 (**Figura 5b**).

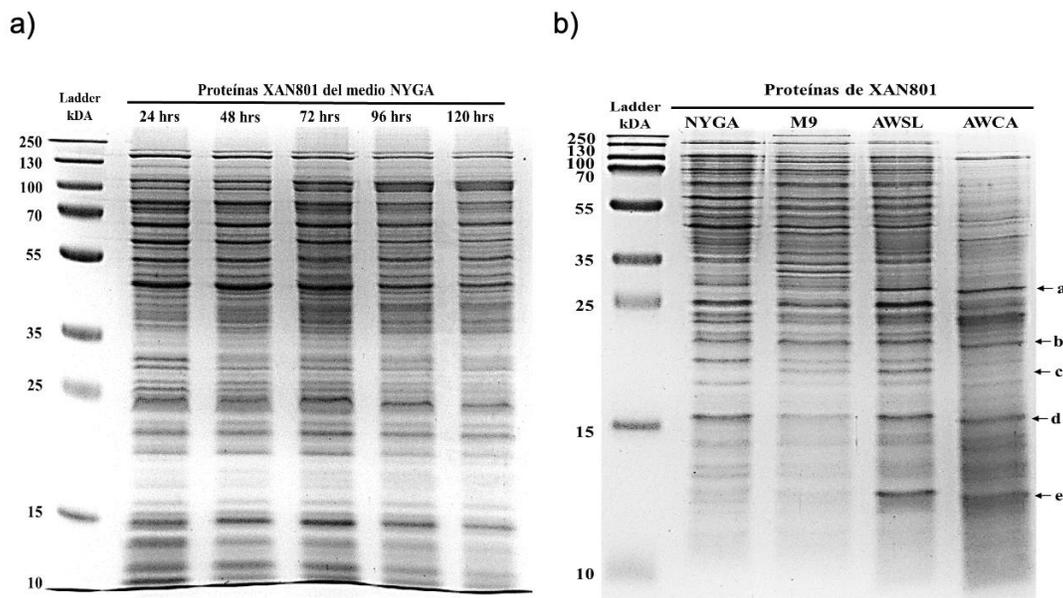


Figura 5. Perfiles proteómicos. a) Perfil de proteínas de XAN801 obtenida de medio NYGA, resolución al 12%, el tiempo del cultivo de la bacteria en horas se indica en la parte superior; b) Comparación del perfil de XAN801 obtenida de medios control NYGA y M9 y medios de inducción AWSL y AWCA a las 72 h de cultivo, resolución al 18%. Las flechas de la derecha indican las bandas de proteínas inducidas de aproximadamente 12 (e), 15 (d), 20 (c), 24 (b) y 26 (a) kDa. Para ambos geles el marcador de peso molecular se indica de lado izquierdo.

Método de aislamiento de proteínas y evaluación de su actividad biológica

El método para el aislamiento de las proteínas inducidas y la evaluación de su actividad biológica mediante ensayo de respuesta hipersensible en hojas de tabaco (*Nicotina benthamiana*) se describe en la **Figura 6**. Después de la electroforesis se procedió a extraer del gel las fracciones de proteínas inducidas, para ello, se utilizó un bisturí limpio para cortar el gel de poliacrilamida de forma horizontal tomando como referencia el marcador de peso pre teñido PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa (Thermo Fisher Scientific®). La dilución de las proteínas embebidas en la matriz de gel se realizó agregando 2 mL de buffer de elución (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) por cada gramo de gel.

Las piezas de gel se trituraron con un mortero limpio e incubaron en un agitador rotatorio a 25°C durante toda la noche. Concluida la incubación, la muestra de proteínas se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4°C y se colectó el sobrenadante. La actividad biológica de las proteínas aisladas se determinó mediante ensayos de respuesta hipersensible (HR), en donde se usaron hojas de tabaco sanas, recién colectadas y completamente desarrolladas. Las soluciones de proteína cruda (200 µg/mL) se cargaron en una jeringa de 1 mL sin aguja; de los cuales 20 µL de la solución se inyectaron en la parte posterior de las hojas, además, se inyectó tampón Tris-SDS como control negativo. Después de su incubación en cámara húmeda por 36 h se observó la formación de lesiones necróticas en las zonas tratadas del tejido foliar de las plantas de tabaco.

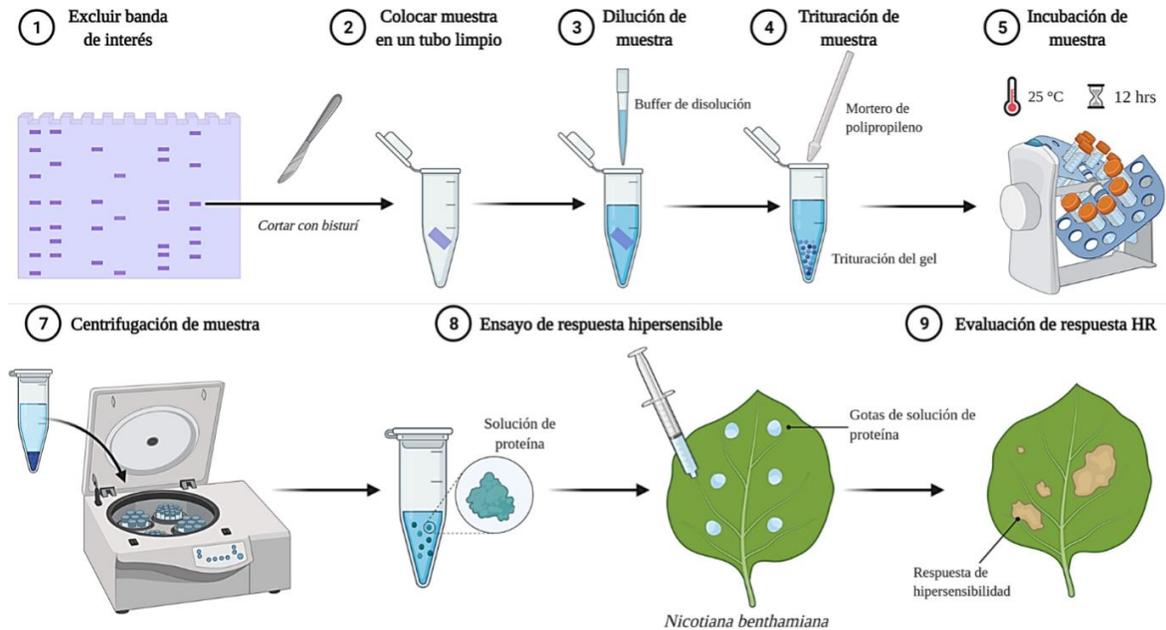


Figura 6. Diagrama del proceso de aislamiento de proteínas tipo HRP a partir de geles de poliacrilamida y su evaluación de la actividad biológica mediante ensayo de respuesta hipersensible en hojas de tabaco.

Los resultados de esta metodología permitieron aislar dos fracciones proteicas (FI #1 y FI #2) del total del proteoma de XAN801, estas fracciones contuvieron bandas de proteínas de aproximadamente 12 y 26kDa; las cuales son inducidas en el medio de cultivo AWSL y AWCA (**Figura 7a**). Por otra parte, el método para evaluar la actividad biológica de

proteínas mediante ensayos de respuesta hipersensible (HR) permitió demostrar la presencia del producto de genes tipo *hrp*, como son proteínas HRP y que están asociadas con la respuesta de hipersensibilidad generada en hojas de tabaco (**Figura 7b**). La plataforma 3500 puede correr aplicaciones de secuenciación y de análisis de fragmentos.

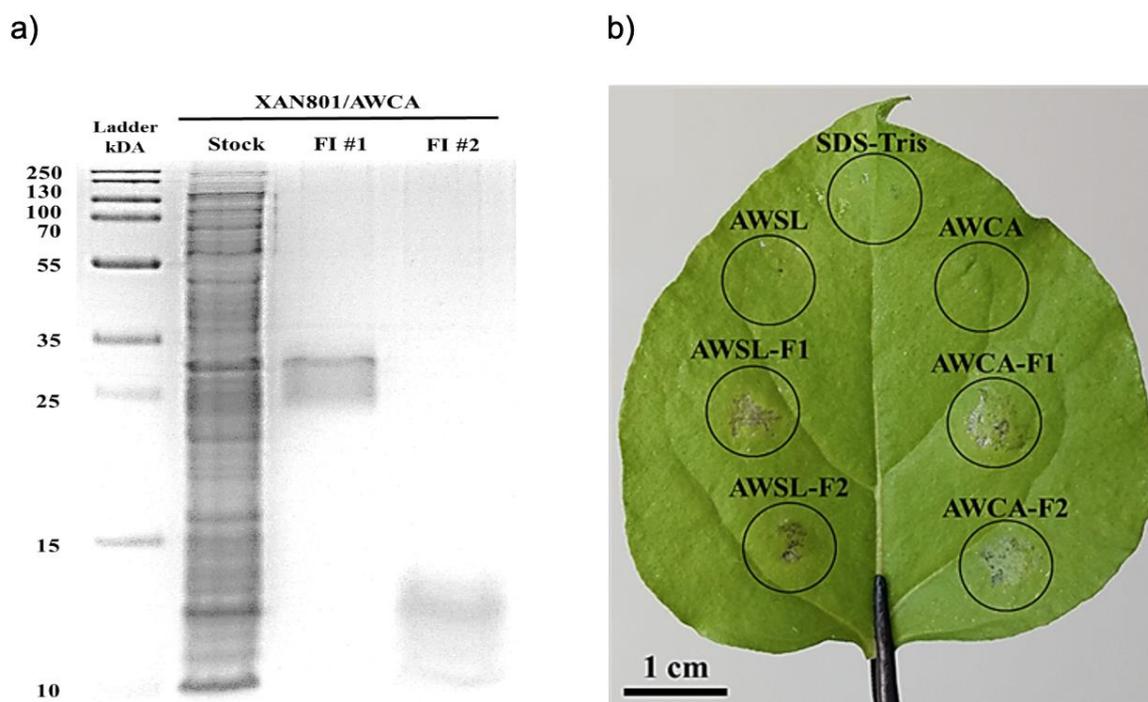


Figura 7. Resultados del aislamiento de las proteínas inducidas y la evaluación de su actividad biológica mediante ensayo de respuesta hipersensible en hojas de tabaco (*Nicotina benthamiana*). a) Perfil de proteínas XAN801 obtenida de medio AWCA y fraccionada en dos secciones, resolución al 13%. El marcador de peso molecular se indica de lado izquierdo.; b) Ensayos de actividad biológica hipersensible en hojas de tabaco (*N. benthamiana*), los círculos muestran el área de la hoja tratada y la leyenda indica el tratamiento de proteínas aplicado y el control negativo de SDS-Tris utilizado como buffer de proteínas.

Perspectivas del uso de proteínas HRP como inductores de resistencia vegetal

El uso de proteínas HRP como inductores del sistema de defensa vegetal para promover un estado fisiológico de resistencia en plantas ha mostrado ser una estrategia efectiva de control de patógenos [12,13,14]. Los mecanismos de control de patógenos asociados al fenómeno de resistencia en planta son diversos, indicándose un aumento en la expresión de genes relacionados con patogénesis (*genes-PR*) [15]. También, se ha reportado un aumento general en la actividad de enzimas relacionadas con la defensa celular como la fenilalanina amoniaco-liasas y peroxidasa y el contenido total de compuestos

fenólicos [16]. Además, la acumulación de lignina y callosa, es un mecanismo inducido de resistencia que sirven como barreras fisicoquímicas que limitan el avance de patógenos [17], así como la generación de especies reactivas de oxígeno y que en el caso de la respuesta hipersensible limitan la infección de patógenos en los sitios de infección [18]. Los resultados de las metodologías propuestas en este trabajo son clave para la búsqueda y selección de proteínas HRP de bacterias fitopatógenas y que además mantengan actividad biológica asociada con la activación del fenómeno de resistencia en plantas contra patógenos.

Referencias

1. Robin, G. P., Ortiz, E., Szurek, B., Brizard, J. P., and Koebnik, R. (2014). Comparative proteomics reveal new HrpX-regulated proteins of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Proteomics*, **97**, 256-264. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.010>
2. López-Vielma, C., Solís-Sánchez, A., Quiñones-Aguilar, E., Qui-Zapata, J., and Rincón-Enríquez, G. (2016). Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de Chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán. *Biocología y Sustentabilidad*, **1**, 141-144. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/bioteconologiaysust/issue/view/faltante/1ro>
3. Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Espinoza-Mancillas, M. G., Leyva-López, N. E., Martínez-Valenzuela, C., Martínez-Álvarez, J. C., and Herrera-Rodríguez, G. (2012). Halo-spot and external stem necrosis of tomato caused by *Pseudomonas syringae* in Sinaloa, Mexico. *Phytoparasitica*, **40**, 403-412. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0242-4>
4. Galán, J. E., and Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells.

- Science*, **284**, 1322-1328. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1322>
5. Kim, J. G., Park, B. K., Yoo, C. H., Jeon, E., Oh, J., and Hwang, I. (2003). Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, **185**, 3155-3166. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.3155-3166.2003>
 6. González, J. F., Degrassi, G., Devescovi, G., De Vleeschauwer, D., Höfte, M., Myers, M. P., and Venturi, V. (2012). A proteomic study of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice xylem sap. *Journal of Proteomics*, **75**, 5911-5919. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.019>
 7. Valerio-Landa, S. D., Rincon-Enriquez, G. and Quiñones-Aguilar, E. E. (2020). Solicitud de patente: Método para la obtención y aplicación de un inductor de resistencia contra agentes fitopatógenos en plantas. *Solicitud No. MX/E/2020/087009*. Ciudad de México; México; Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
 8. Fu, Z. Q., and Dong, X. (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 839-863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
 9. Choi, M., Kim, W., Lee, C., and Oh, C. (2013). Harpins, multifunctional proteins secreted by Gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **26**, 1115-1122.
 10. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
 11. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **228**, 680-685.
 12. Akbudak, N., and Tezcan, H. (2009). Incidence of verticillium and plant development in pepper as affected by the bioactivator harpin. *International Journal of Vegetable Science*, **15**, 253-263. <https://doi.org/10.1080/19315260902815547>
 13. Obradovic, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Jackson, L. E., Balogh, B., ... Iriarte, F. B. (2005). Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, **89**, 712-716. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0712>
 14. Zhu, Z., and Zhang, X. (2016). Effect of harpin on control of postharvest decay and resistant responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **112**, 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.007>
 15. Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., and De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 941-950. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>
 16. Abhayashree, M. S., Murali, M., and Amruthesh, K. N. (2016). Abiotic elicitors mediated resistance and enhanced defense related enzymes in *Capsicum annum* L. against anthracnose disease. *Scientia Horticulturae*, **204**, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.004>
 17. Wu, S., Shan, L., and He, P. (2014). Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, 1-9.
 18. Torres, M. A., Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**, 373-378. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079467.conjunction>



DR. GABRIEL RINCÓN ENRÍQUEZ
ID ORCID: 0000-0001-7594-6077

Ingeniero agrónomo por la Universidad Autónoma Chapingo; maestría en ciencias en genética por el Colegio de Postgraduado; especialista en estadística

aplicada por el IIMAS-UNAM; doctorado en ciencias en microbiología, biología vegetal y biotecnologías por la Universidad de Marsella II y el CNRS en Francia.

Desde 2008, el Dr. Rincón es investigador titular en el Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. El Dr. Gabriel Rincón es autor de 11 capítulos de libros y de más 45 artículos científicos o de divulgación.

Su interés en la investigación es el control biológico de enfermedades de plantas de importancia agrícola empleando distintas estrategias: bacteriófagos, extractos vegetales, actinomicetos, inductores de defensa, hongos micorrízicos arbusculares y bacterias benéficas. El Dr. Rincón es investigador nacional nivel 1 del Sistema Nacional de Investigadores desde 2015. El Dr. Rincón ha financiado sus investigaciones por el concurso y aprobación de fondos gubernamentales mexicanos y de empresas privadas.