



Artículo Científico

# Proteínas Hrp como bioinductores para el control biológico de enfermedades bacterianas en plantas de jitomate y chile bajo invernadero

**María del Sol Cuellar Espejel, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez\***. Laboratorio de Fitopatología, Unidad de Biotecnología Vegetal. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Camino el Arenero Núm. 1227. Col. El Bajío del Arenal. C.P. 45019, Zapopan Jalisco México. **Rodolfo Hernández Gutiérrez**. Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ. Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, México. **Juan Carlos Mateos Díaz**. Unidad de Biotecnología Industrial, CIATEJ. Camino el Arenero Núm. 1227. Col. El Bajío del Arenal. C.P. 45019, Zapopan Jalisco México. **Sergio David Valerio Landa**. COSMOCEL, Vía Matamoros 1501, Col. Industrial Nogalar San Nicolás de la Garza, Monterrey, Nuevo León, C.P. 66484, México.

\*Autor de correspondencia:  
Gabriel Rincón-Enríquez  
grincon@ciatej.mx

Sección:  
Número Especial

Recibido:  
15 Noviembre, 2024

Aceptado:  
30 Enero, 2025

Publicado:  
13 Febrero, 2025

Cita:  
Cuellar-Espejel MDS,  
Quiñones-Aguilar EE,  
Rincón-Enríquez G,  
Hernández-Gutiérrez R,  
Mateos-Díaz JC y Valerio-  
Landa SD. 2025. Proteínas  
Hrp como bioinductores  
para el control biológico de  
enfermedades bacterianas  
en plantas de jitomate y  
chile bajo invernadero.  
Revista Mexicana de  
Fitopatología 43(4): 54.  
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-25>



## RESUMEN

**Antecedentes/Objetivo.** Las enfermedades como la peca bacteriana en jitomate (*Solanum lycopersicum*) y la mancha bacteriana en chile (*Capsicum annuum*) causan graves pérdidas económicas globales. Una alternativa sustentable para su control es el uso de inductores proteicos (proteínas Harpin=Hrp) que activan la respuesta de defensa de las plantas al ser reconocidas por el sistema de inmunidad vegetal, induciendo mecanismos de defensa en contra de patógenos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad biológica y la dosis óptima de aplicación del inductor biológico BioFensa (a base de proteínas Hrp), producido en planta piloto para controlar estas enfermedades.

**Materiales y Métodos.** Se realizaron tres experimentos en invernadero para evaluar la efectividad biológica de Biofensa ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); para ello se probó el inductor proteico para el control de la mancha bacteriana (*X. euvesicatoria* cepa BV865 [1] y BV801 [2]), así como para la peca bacteriana (*P. syringae* pv. *tomato*, cepa DC3000 [3]). Cada experimento incluyó 5 tratamientos y 11 repeticiones. Además, se realizó un experimento para determinar la dosis óptima de BioFensa ( $0.01$ ,  $0.1$  y  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) contra *X. euvesicatoria* cepa BV801, con 7 tratamientos y 8 repeticiones [4]. En los cuatro experimentos en total, las plantas fueron asperjadas con BioFensa ( $3 \text{ mL}$  por planta) 24 h antes de la infección y se evaluaron los síntomas después de 30 días contando manchas en el tejido foliar.

**Resultados.** BioFensa fue efectivo en reducir significativamente el daño en plantas de chile y tomate (LSD,  $p \leq 0.05$ ). A una concentración alta ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) logró prevenir la aparición de manchas en plantas de jitomate en un 53%, mientras que para plantas de chile contra la cepa BV865 previno en un 60%. Por otro lado, para plantas de chile contra la cepa BV801, a concentraciones bajas ( $0.01$  y  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), los síntomas se redujeron significativamente entre un 38-41%, mientras que a una concentración más alta ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) este efecto no se mantuvo, sugiriendo un límite en la percepción de inductores por las plantas.

**Conclusión.** Los resultados sugieren que BioFensa tiene el potencial de ser una alternativa efectiva para controlar enfermedades en cultivos hortícolas como jitomate y chile.

**Palabras clave.** Control biológico, inductor de resistencia, mancha bacteriana, sistema de defensa vegetal, peca bacteriana.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas son vulnerables a diversos ataques de fitopatógenos, los cuales generan grandes pérdidas en el rendimiento y la productividad. Una vez que el patógeno se ha establecido en las áreas cultivadas, es difícil erradicarlo y en general se implementan medidas preventivas para evitar la propagación de los patógenos (Catara y Bella, 2020). Comúnmente, el uso de bactericidas y antibióticos con formulaciones químicas que contienen cobre resultan ineficaces debido a la acumulación de productos químicos en el ambiente y la resistencia, por lo que estas alternativas son poco rentables, provocan contaminación de suelos-aguas y resultan poco efectivas. Esto provoca pérdidas significativas en el rendimiento de cultivos de gran valor económico, afectando negativamente la agricultura, la economía y la seguridad alimentaria (Khan y Ahma, 2024). Dentro de estos patógenos se encuentran las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas euvesicatoria*, ambas especies son Gram negativas e incluyen diversos patovares con la capacidad de infectar un grupo característico de plantas hospedantes, siendo capaces de superar múltiples defensas del huésped en diferentes etapas de la infección, multiplicarse y causar enfermedades, principalmente por poseer el sistema de secreción tipo III, el cual es de gran relevancia en términos de virulencia (Cardoso *et al.*, 2020). Estos fitopatógenos afectan a cultivos como el jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*), mostrando síntomas en hojas, frutos y tallos por medio de halos cloróticos (amarillos) y/o manchas necróticas, así como provocar la caída prematura de hojas, afectando el crecimiento y desarrollo de la planta e inclusive la

reducción de la fotosíntesis (Fang y Yang, 2013; Cardoso *et al.*, 2020). *P. syringae* incluye alrededor de 60 patovares con una variedad de hospedantes; sin embargo, infecta al tomate (*P. syringae* pv. *tomato*) y es conocida por causar la enfermedad de las pecas o tizón bacteriano (Fang y Yang, 2013). Por otro lado, *Xanthomonas* causan numerosas enfermedades en más de 400 especies vegetales huésped, siendo patógenos dominantes de los cultivos de jitomate y chile en todo el mundo por la enfermedad de la mancha foliar o mancha bacteriana (Larrahondo *et al.*, 2022; Cardoso *et al.*, 2020). Ambas especies bacterianas comparten el tipo de colonización, por lo que inicialmente crecen de manera epífita, colonizando la superficie de plantas sanas antes de entrar en el tejido de las hojas a través de estomas o heridas y una vez en el apoplasto (fase endofítica), suprimen las respuestas de defensa básicas del hospedero mediante la introducción de proteínas de virulencia o efectores directamente en las células vegetales (Xin *et al.*, 2018). Muchas de estas proteínas efectoras inhiben las vías inmunes del huésped, mientras que otras modifican la señalización y la fisiología celular de diferentes maneras, incluyendo la supresión de la expresión de genes de inmunidad, haciendo al tejido vegetal más susceptible al crecimiento del fitopatógeno y favoreciendo el desarrollo de enfermedades (Raffener *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Sin embargo, los elicitores o inductores pueden activar respuestas defensivas y adaptativas en las plantas cuando se administran en cantidades reducidas, estimulando la producción de metabolitos secundarios, permitiendo a las plantas desarrollar mecanismos de tolerancia para enfrentar entornos adversos y experimentar cambios mínimos en su estructura física (Caicedo *et al.*, 2021). Estos compuestos de origen biológico promueven la salud vegetal, lo que puede mejorar el desarrollo, crecimiento y producción de las plantas, lo que es beneficioso para la agricultura tanto en la fase pre como post cosecha, en algunos casos, pueden transmitir la resistencia a nuevas generaciones de plantas (Todd *et al.*, 2022, 2023). Por lo que, en la actualidad el uso de proteínas inductoras para el control de enfermedades en cultivos agrícolas son una alternativa para implementar una estrategia ecológica logrando reducir los peligros relacionados con los pesticidas químicos (Khan y Ahma, 2024).

Las proteínas harpinas (Hrp) según Liu *et al.* (2020) y Joshi *et al.* (2022) son codificadas por los genes *hrp* (respuesta de hipersensibilidad y patogenicidad) de bacterias Gram negativas y liberadas a través del sistema de secreción tipo III durante las interacciones entre patógenos y plantas. Estas proteínas tienen varias propiedades en común (ricas en glicina, libres de cisteína, son ácidas y termoestables) y se clasificadas en cinco grupos según la similitud de proteínas y las estructuras de dominio (grupo HrpN, HrpZ1, HrpW1, Hpa1). Dada la importancia de las proteínas Hrp en la respuesta de las plantas a las infecciones bacterianas, se ha desarrollado un método para inducir, aislar y seleccionar estas proteínas de bacterias fitopatógenas. Valerio-Landa *et al.* (2021a) demostraron que el uso de estas proteínas puede

reducir la formación de lesiones necróticas en el tejido foliar tratado en plantas de jitomate. Valerio-Landa (2021) y Valerio-Landa *et al.* (2021b) avanzaron en esta línea de investigación desarrollando un método específico para inducir, aislar y seleccionar proteínas Hrp de *Xanthomonas*, utilizando tejido vegetal liofilizado de plantas hospederas como la única fuente de carbono y nutrientes según la solicitud de patente MX/a/2020/013638 (Valerio-Landa *et al.*, 2020). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad biológica de inductores proteicos Hrp de *X. euvesicatoria* (cepa BV801) producidos en planta piloto (fermentación sólida), para el control de la peca bacteriana en plantas de jitomate y la mancha bacteriana en plantas de chile en condiciones controladas de invernadero. La aplicación de estos inductores podría ofrecer una solución práctica para la gestión de enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas, aprovechando las propiedades únicas de las proteínas Hrp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento del experimento

**Material vegetal.** 166 plantas de chile (*C. annuum*) ancho variedad San Luís (Pacific Seed Company<sup>®</sup>) y 55 de jitomate (*S. lycopersicum*) variedad Rio Grande (CIIASA Seeds<sup>®</sup>) fueron colocadas en macetas con capacidad de 2 L, con una mezcla de sustrato (55 % arena, 40 % suelo y 5 % de agrolita) previamente esterilizado en autoclave (120 °C / 103421.4 Pa / 6 h), se mantuvieron en condiciones de invernadero.

**Material microbiológico.** Las bacterias fitopatógenas BV801 y BV865, aisladas simultáneamente del tejido enfermo de plantas de chile afectadas por mancha bacteriana (López-Vielma *et al.*, 2016) y determinadas como causantes de la enfermedad (Rico-Aguilar *et al.*, 2019), estas cepas bacterianas fueron obtenidas de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Las bacterias fueron reactivadas de crioconservación de -80 °C en medios de cultivo líquido. Para *X. euvesicatoria* cepa BV801 y BV865 se utilizó el medio NYG (0.5 % peptona, 0.3 % extracto de levadura, 2 % glicerol, 7.0 pH, agar 1.6 % cuando se requirió). Por otro lado, *P. syringae* pv. *tomato* cepa DC3000, se colocó en medio líquido King (KB) (2 % peptona, 0.8 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [1 M], 0.6 % MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O [1 M], 1.2 % glicerol, 7.2 pH, agar 1.6 % cuando se requirió). Posteriormente, los medios se incubaron a 28 °C, durante 24 h, en oscuridad y en agitación a 250 rpm. Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido por toda la noche (18-20 h), después

fueron cosechadas por centrifugación a 10000 rpm por 5 min. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo sobrenadante y se realizó un lavado con agua desionizada estéril, repitiendo el proceso de centrifugación y de lavado por tres veces. Posteriormente, se realizó el ajuste de la concentración de las células bacterianas a una densidad óptica (OD) de 600 nanómetros (nm), OD<sub>600</sub> de 1.0 (OD<sub>600</sub>=1.0≈1x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) con espectrofotómetro (Eppendorf<sup>®</sup>, BioPhotometer).

**Producción de proteínas Hrp en planta piloto:** Las proteínas Hrp se produjeron en planta piloto con base a la metodología de Valerio-Landa *et al.* (2021a), extrapolado para la aplicación en un biorreactor de fermentación sólida tipo bandeja (45x30x3.5 cm). La bacteria *X. euvesicatoria* cepa BV801 previamente crecida en medio rico NYG y ajustada a OD<sub>600</sub> = 1.0 (≈1x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), se colocaron 2.5 mL de solución bacteriana a cada bandeja para posteriormente sembrarlas por extensión en el medio de inducción (0.2 % de tejido pulverizado de *C. annuum*, 1.5 % de agar grado alimenticio, pH de 7.0). La bandeja fue cerrada con papel Kraft y sellada con cinta; se esterilizó la bandeja con el medio de inducción; posteriormente de la inoculación bacteriana se colocaron en el biorreactor de fermentación sólida, se incubó a 28 °C +/-3 °C en oscuridad. La cosecha de las células bacterianas se realizó a las 48 h mediante el raspado y la recolección de los tapetes bacterianos con agua desionizada estéril. Finalmente se realizaron dos lavados con agua desionizada estéril para eliminar el xantano a 10000 rpm por 30 min a 4 °C. Se realizó la lisis bacteriana por medio de sonicación en un tiempo de exposición de 15 min con un procesador ultrasónico de líquidos (Sonics VCX 130), usando una frecuencia de 20 Khz, una amplitud del 40 %, ciclos de 30 s encendido / 30 s apagado a 130 W, colocando las muestras en hielo. Posteriormente a la lisis bacteriana se continuó con el protocolo para extracción de proteínas de acuerdo con Valerio-Landa *et al.* (2021a); las proteínas extraídas constituyeron el producto denominado BioFensa (solicitud de patente de invención MX/a/2020/013638; Valerio-Landa *et al.*, 2023).

**Diseño experimental.** Para evaluar la efectividad biológica de BioFensa (BF), se probó contra la cepa DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* en plantas de tomate (experimento 1); y en contra de *X. euvesicatoria* (cepas BV801 y BV865) en plantas de chile (experimentos 2 y 3). Se realizaron tres experimentos en diseños experimentales completamente al azar, cada uno con cinco tratamientos (11 repeticiones por tratamiento): (1) planta enferma (PE, con inóculo bacteriano); (2) planta sana (PS, sin inóculo bacteriano); (3) un inductor químico comercial (Actigard<sup>®</sup>, 0.003 g mL<sup>-1</sup>); (4) un inductor de proteínas Harpin αβ comercial (Messenger Gold<sup>®</sup>, 0.003 g mL<sup>-1</sup>); (5) BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>). Por otro lado, para determinar la dosis óptima de aplicación de BioFensa contra *X. euvesicatoria* cepa BV801 en plantas de chile (experimento 4), se hizo un bioensayo en un diseño experimental completamente al

azar con siete tratamientos (ocho repeticiones): (1) planta enferma (PE); (2) planta sana (PS); (3) un inductor químico (Actigard®); (4) un inductor de proteínas Harpin  $\alpha\beta$  (Messenger Gold®), BioFensa a 0.01 (5); 0.1 (6) y 1 (7)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cuadro 1). Para todos los tratamientos de inducción (Actigard®, Messenger Gold®, BioFensa), en todos los casos, se aplicó 24 h antes de la infección con las bacterias. Los tratamientos fueron aplicados con un atomizador manual 3 mL en todas las hojas de las plantas (adaxial y abaxial).

**Cuadro 1.** Composición de los tratamientos del experimento 4 para determinar el efecto de distintas dosis de los inductores proteicos bajo condiciones de invernadero para plantas de Chile.

	Controles		Inductor		
	Sano	Enfermo	Actigard®	Messenger Gold®	BioFensa
Ingrediente	Sin fitopatógeno	Con fitopatógeno	Acibenzolar-S-metilo	Harpinas comerciales	Inductor proteico de <i>X. euvesicatoria</i>
Dosis (3 mL/planta)	No aplica	10 <sup>8</sup> UFC/mL	0.0003 g/mL	0.03 g/mL	0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/mL}$

**Variables de respuesta fitopatológicas.** Para la evaluación de la severidad de la enfermedad, 30 días después de iniciado el experimento se registraron las variables de respuesta por medio de la cuantificación de manchas: número de manchas cloróticas y necróticas; así como el número de las manchas totales que se observaron en las hojas con síntomas de enfermedad.

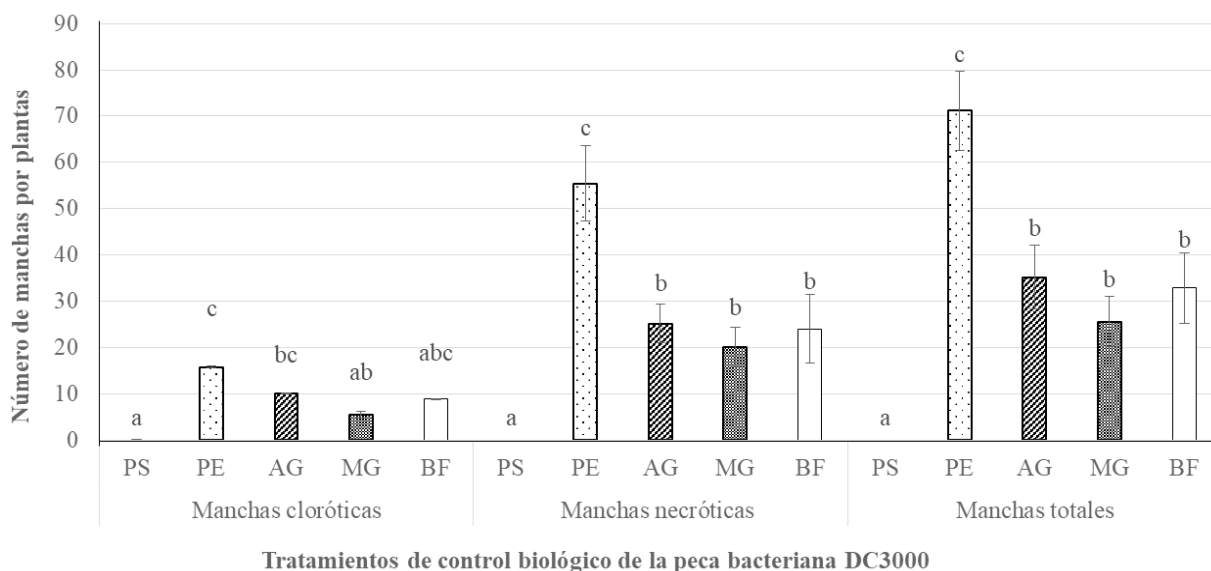
**Análisis estadístico de datos.** Los datos obtenidos de las variables de respuesta se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía y pruebas LSD, todas las pruebas estadísticas fueron evaluadas a un nivel de significancia del 5 % ( $p \leq 0.05$ ). La información fue procesada mediante el paquete para análisis estadístico Statgraphics Centurion ver. XV.II (<http://www.statgraphics.com/>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectividad biológica de BioFensa para el control de *P. syringae* pv. *tomato*, cepa DC3000

Los resultados indican que la sintomatología de la peca bacteriana (*P. syringae* pv. *tomato*, cepa DC3000) en plantas de jitomate, evaluada mediante el número de hojas con manchas necróticas y cloróticas, así como el número de manchas totales por planta (Figura 1), las cuales disminuyeron significativamente con la aplicación





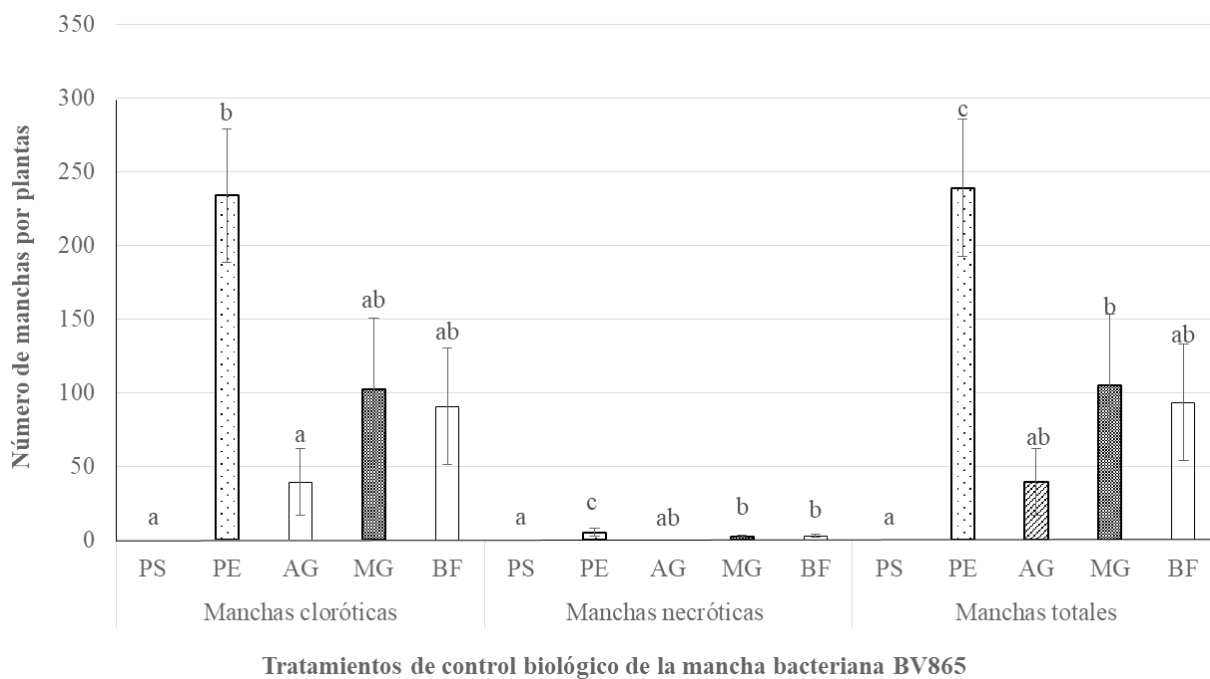
**Figura 1.** Efectividad biológica de distintos tratamientos biológicos para el control de *P. syringae* pv. *tomato*, cepa DC3000 (peca bacteriana) en plantas de jitomate en condiciones de invernadero, según la cantidad de manchas necróticas, cloróticas y totales por planta. PS=Planta sana; PE=Planta enferma; AG=Actigard® (0.003 g mL<sup>-1</sup>); MG= Messenger Gold® (0.003 g mL<sup>-1</sup>); BF= BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>). Letras distintas dentro de cada variable de repuesta indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ( $p \leq 0.05$ ). Las barras en el rectángulo indican  $\pm$  el error estándar.

de BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>). En comparación con las plantas enfermas no tratadas, el tratamiento con BioFensa previno la aparición de manchas en un 53 % (LSD,  $p \leq 0.05$ ). Específicamente, el número promedio de manchas totales por planta tratada fue de  $15 \pm 3$ , en comparación con  $32 \pm 4$  en el control enfermo (PE).

#### Efectividad biológica de BioFensa para el control de *X. euvesicatoria* (cepa BV801 y BV865)

Por otro lado, para la mancha bacteriana en plantas de chile ancho tratadas con BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>) retadas con la cepa BV865 de *X. euvesicatoria* (Figura 2), mostraron menor número de manchas totales similares a los inductores de resistencia comercial (Messenger Gold® y Actigard®); de manera específica las plantas tratadas con BioFensa mostraron una disminución significativa (LSD,  $p \leq 0.05$ ) del 60 % en la cantidad de manchas totales, en comparación con el control enfermo (PE).

Los análisis de varianza y las pruebas LSD ( $p \leq 0.05$ ) indican que el tratamiento con BioFensa previene el grado de enfermedad al mostrar menor aparición de síntomas de manchas en el tejido foliar como las manchas cloróticas hasta la presencia de necrosis mediante la visualización como se indica en Rico-Aguilar *et al.* (2019); por lo cual la aplicación de proteínas Hrp (BioFensa) previene significativamente



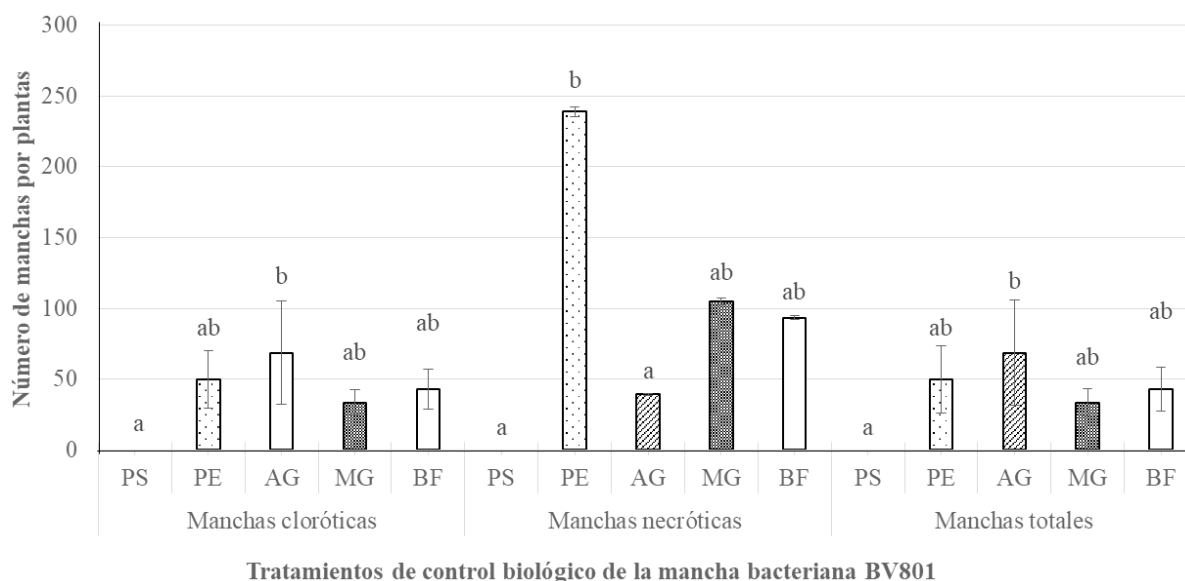
**Figura 2.** Efectividad biológica de distintos tratamientos biológicos para el control de *X. euvesicatoria*, cepa BV865 en plantas de chile ancho variedad San Luis en condiciones de invernadero, según la cantidad de manchas necróticas, cloróticas y totales por planta. PS=Planta sana; PE=Planta enferma; AG=Actigard® (0.003 g mL<sup>-1</sup>); MG= Messenger Gold® (0.003 g mL<sup>-1</sup>); BF= BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>). Letras distintas dentro de cada variable de repuesta indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ( $p \leq 0.05$ ). Las barras en el rectángulo indican  $\pm$  el error estándar.

la incidencia de *P. syringae* pv. *tomato*, DC3000 (peca bacteriana) en plantas de tomate y de *X. euvesicatoria*, cepa BV865 (mancha bacteriana) en plantas de chile.

La concentración de 1 µg mL<sup>-1</sup> de BioFensa fue suficiente para disminuir el nivel de manchas de las enfermedades, lo cual podría atribuirse a la actividad de los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) presentes en las proteínas Hrp de BioFensa. Estos resultados son consistentes con estudios previos de Valerio-Landa *et al.* (2021b) que sugieren que las proteínas Hrp pueden ser reconocidas por los receptores de inmunidad de las plantas, desencadenando una respuesta de defensa robusta por parte de las plantas.

En la evaluación de la cepa BV801 de *X. euvesicatoria* en plantas de chile tratadas con BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>), se observó una reducción de apenas un 13 % en el número de manchas totales, lo cual no fue estadísticamente significativa (LSD,  $p \leq 0.05$ ) con el tratamiento enfermo (PE) (Figura 3). Esto sugiere que la concentración de 1 µg mL<sup>-1</sup> de BioFensa pudo no haber sido óptimo para el caso de la cepa BV801, en comparación con la cepa BV865 (Figura 2). La variabilidad en la

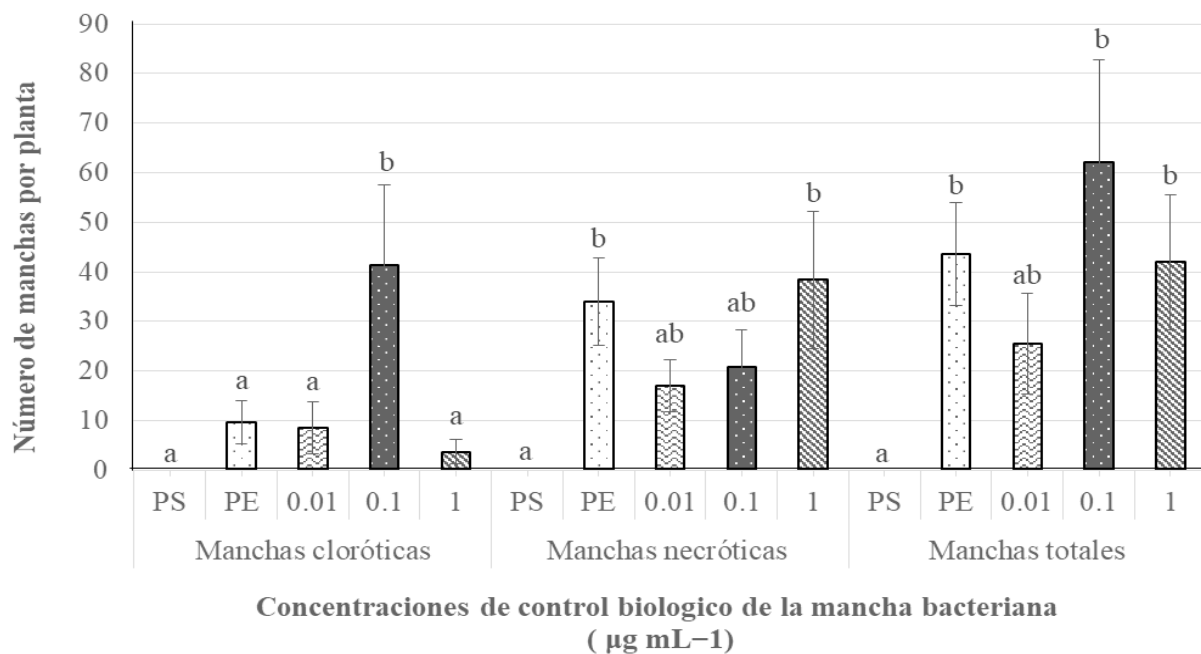




Tratamientos de control biológico de la mancha bacteriana BV801

**Figura 3.** Efectividad biológica de distintos tratamientos biológicos para el control de *X. euvesicatoria*, BV801, en plantas de chile ancho variedad San Luis en condiciones de invernadero, según la cantidad de manchas necróticas, cloróticas y totales por planta. PS=Planta sana; PE=Planta enferma; AG=Actigard® (0.003 g mL<sup>-1</sup>); MG= Messenger Gold® (0.003 g mL<sup>-1</sup>); BF= BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>). Letras distintas dentro de cada variable de repuesta indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ( $p \leq 0.05$ ). Las barras en el rectángulo indican  $\pm$  el error estándar.

eficacia observada podría deberse a la virulencia intrínseca de la cepa BV801 y la saturación de los receptores de PMAP en las plantas, lo que concuerda con estudios que indican que concentraciones elevadas de inductores pueden llevar a la desensibilización de los receptores de defensa (Boller y Felix, 2009; Abdul *et al.*, 2020). Al comparar los diferentes tratamientos, se observó una mayor disminución de manchas foliares en plantas de jitomate con la cepa DC3000 y en plantas de chile con la cepa BV865. Esto ya que la cepa BV801 presentó un mayor grado de virulencia de la enfermedad; de igual manera al comparar con el efecto de los inductores comerciales se observó un comportamiento similar entre Messenger Gold® y BioFensa, con relación a las manchas necróticas (Figura 3). Además, el tratamiento con Actigard® mostró un mayor grado de enfermedad que el control enfermo (PE) con relación a las manchas totales (Figura 3). Aquellas plantas pretratadas con BioFensa (1 µg mL<sup>-1</sup>) mostraron el mismo grado de enfermedad que aquellas plantas de control enfermo (PE); este resultado podría deberse a que la capacidad de las plantas de chile para percibir inductores PMAP y activar estado fisiológico de resistencia (EFR), pareció verse afectada por altas concentraciones de las proteínas Hrp durante este trabajo de investigación; para probar esta hipótesis se realizó un experimento con el fin de evaluar el efecto de distintas dosis de BioFensa en plantas de chile infectadas con la cepa BV801 de *X. euvesicatoria* (Figura 4).



**Figura 4.** Efecto de distintas dosis de BioFensa (0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre el control de *X. euvesicatoria*, cepa BV801 en plantas de chile ancho variedad San Luís en condiciones de invernadero. PS=Planta sana; PE=Planta enferma. Letras distintas indican dentro de cada variable de respuesta diferencias significativas de acuerdo con la prueba LSD ( $p \leq 0.05$ ). Las barras en el rectángulo indican  $\pm$  el error estándar.

Las plantas tratadas con diferentes concentraciones de soluciones proteicas (0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para el control de *X. euvesicatoria*, cepa BV801 en plantas de chile ancho (Figura 4) mostraron pocos síntomas de la enfermedad cuando se utilizó la concentración de 0.01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con relación a las manchas totales en las hojas, logrando un 41 % de disminución de la enfermedad; para las manchas necróticas se encontró una disminución del 51 %, para la concentración de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se encontró un 38 % y a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no hubo diferencias significativas en comparación con el control enfermo (-15 % del tratamiento 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en comparación con PE) por lo que no se registró efectividad biológica, provocando con esta concentración un efecto negativo en la planta (Figura 4, manchas necróticas). Al respecto, Zehra *et al.* (2021) mencionan que la efectividad de los inductores puede variar según una serie de factores, incluido el tipo de inductor, la especie de planta y las condiciones ambientales. Lo anterior concuerda con los resultados de la Figura 4, por lo que podría deberse a que los inductores o efectores en las plantas funcionan mejor a menores concentraciones debido a que las plantas tienen un número limitado de receptores, y a bajas concentraciones, estos permiten activar la respuesta defensiva adecuada. A concentraciones más altas, los receptores se saturan y pueden activar

mecanismos de regulación negativa, causar toxicidad, desorganizar la señalización y desviar recursos energéticos de otros procesos vitales como el crecimiento generando un desgaste energético (Boller y Felix, 2009; Abdul *et al.*, 2020).

Los hallazgos de este estudio muestran que una concentración de 0.01 o 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de BioFensa fue suficiente para inducir el EFR y reducir significativamente la severidad de la peca y la mancha bacterianas en plantas de jitomate y chile, respectivamente (LSD,  $p \leq 0.05$ ). Esta respuesta puede estar relacionada con la actividad de los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) presentes en las proteínas Hrp, que son reconocidos por los receptores de inmunidad innata de las plantas, activando así las respuestas de defensa. Estudios previos como los de Boller y Felix (2009), han demostrado que proteínas similares, como la flagelina (*flg22*) e inclusive péptidos como la sistemina (18 aminoácidos), pueden inducir respuestas defensivas en concentraciones subnanomolares. Diversos estudios, incluyendo la revisión de Zehra *et al.* (2021) han demostrado que los elicitores microbianos, como lo son las proteínas y péptidos, pueden desencadenar la Resistencia Sistémica Inducida (RSI, mediada por ácido jasmónico y etileno). Este fenómeno, caracterizado por un estado de alerta generalizado y duradero, prepara a la planta para responder de manera más rápida y efectiva a un amplio espectro de patógenos. La activación de la RSI es desencadenada por la percepción de elicitores, que actúan como señales de peligro y ponen en marcha la maquinaria de defensa de la planta (PMAP) al ser reconocidas por receptores específicos en la superficie de las células vegetales, iniciando una cascada de señalización intracelular que culmina en la activación de genes de defensa, así como al establecimiento de resistencia local y sistémica, y la producción de proteínas efectoras. En este contexto, la proteína harpina Hpa1 ha demostrado tener varios efectos benéficos en las plantas, incluyendo la promoción del crecimiento y la inducción de resistencia a fitopatógenos. Investigaciones previas como las de Wang *et al.* (2020) revelaron que Hpa1 puede mitigar significativamente los síntomas del virus del mosaico del tabaco (TMV) en *Pinellia ternata*, sugiriendo una estimulación efectiva de la resistencia a la enfermedad, mostrando que Hpa1 posee una actividad antiviral significativamente superior al control y que su efecto protector supera al curativo. Además, Hpa1 indujo un notable aumento en la actividad de enzimas relacionadas con la defensa (polifenol oxidasa, peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa), así como en la expresión de genes asociados a la resistencia a enfermedades por parte de la planta (PR1, PR3, PR5 y PDF1.2). Esto sugiere que las proteínas Hrp de BioFensa podrían estar actuando a través de un mecanismo similar, desencadenando la producción de defensas antimicrobianas y fortaleciendo las barreras celulares.

Además, la variabilidad en la respuesta a diferentes concentraciones y tipos de patógenos subraya la importancia de optimizar las dosis de inductores de resistencia para maximizar su efectividad. En este sentido, la literatura también sugiere

que la combinación de inductores de resistencia con otros tratamientos biológicos o químicos podría ofrecer una estrategia más robusta para el manejo de enfermedades (Walters *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la efectividad del inductor biológico BioFensa (proteínas Hrp) en la reducción de la peca bacteriana en plantas de jitomate y la mancha bacteriana en plantas de chile ancho están en concordancia con la literatura existente sobre el uso de inductores de resistencia en plantas. Boller y Felix (2009), destacaron que PMAPs como la flagelina son reconocidos por receptores específicos y actúan como potentes elicitores de respuestas de defensa a concentraciones subnanomolares, un mecanismo similar al observado con BioFensa, que mostró mayor efectividad a concentraciones bajas ( $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Este fenómeno también ha sido documentado por Abdul *et al.* (2020) quienes señalaron que la eficacia de los inductores de resistencia puede depender de la concentración utilizada y del tipo de patógeno, reflejando los hallazgos de este estudio donde concentraciones más altas no siempre mejoraron la respuesta defensiva. Además, Walters *et al.* (2013) discutieron los desafíos y la necesidad de optimizar las dosis de inductores para maximizar su efectividad, una recomendación que resuena con los resultados acerca que BioFensa fue más eficaz a concentraciones bajas ( $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La capacidad de los inductores de resistencia para activar respuestas de defensa sistémica en plantas ha sido bien documentada (Ryals *et al.*, 1996; Durrant y Dong, 2004) y los resultados aportan evidencia adicional de que BioFensa puede inducir un estado fisiológico de resistencia, reduciendo significativamente la severidad de las enfermedades. Estos hallazgos sugieren que BioFensa podría ser una herramienta valiosa en el control biológico de patógenos causantes de enfermedades promoviendo una agricultura más sostenible y reduciendo la dependencia de pesticidas químicos (Pieterse *et al.*, 2012; Van Loon *et al.*, 2006).

Por lo tanto, se requieren evaluaciones posteriores para analizar las concentraciones más efectivas para la disminución de enfermedades en jitomate provocada por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, así como en chile para *X. euvesicatoria* cepa BV865 basado en los resultados de *X. euvesicatoria* cepa BV801 donde a menor concentración de aplicación de inductores a base de proteínas Hrp mostró mayor efectividad en la reducción de la mancha bacteriana, siendo así BioFensa una alternativa como posible herramienta en el control de bacterias fitopatógenas de importancia en la producción agrícola.

## CONCLUSIONES

La aplicación del inductor biológico BioFensa (proteínas Hrp) demostró ser efectiva en la reducción de la severidad de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (peca

bacteriana) en plantas de jitomate y *X. euvesicatoria* (cepas BV865 y BV801), causante de la mancha bacteriana en plantas de chile ancho, mostrando una efectividad comparable a los inductores comerciales Actigard® y Messenger Gold®. Los resultados sugieren que concentraciones bajas de BioFensa ( $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) son más eficaces, especialmente en plantas de chile ancho, mientras que concentraciones altas ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no siempre mejoran la respuesta defensiva. BioFensa tiene el potencial de ser una herramienta valiosa para el manejo integrado de enfermedades bacterianas, promoviendo una agricultura más sostenible y reduciendo la dependencia a pesticidas químicos. Sin embargo, el estudio se realizó en condiciones controladas de invernadero, lo que podría limitar la generalización de los resultados a condiciones de campo. Por lo que se requieren estudios adicionales en campo abierto para explorar la efectividad biológica de BioFensa, tanto solo como en combinación con otros tratamientos biológicos o químicos para maximizar su efectividad y validar su uso en el manejo fitosanitario de enfermedades bacterianas de plantas de importancia agrícola.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para los estudios de doctorado (CVU 664582) por parte de MS Cuellar-Espejel; así como a distintos proyectos del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ y proyecto 10428-2023 de la convocatoria de la Ciencia al Mercado del COECYTJAL por el financiamiento de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Abdul MNA, Kumar IS and Nadarajah K. 2020. Elicitor and receptor molecules: orchestrators of plant defense and immunity. *International Journal of Molecular Sciences* 21(3): 963. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>
- Boller T and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.57.032905.105346>
- Caicedo LLH, Aranda ALV, Sáenz de la OD, Gómez CEZ, Márquez EE and Zepeda HR. 2021. Elicitors: bioethical implications for agriculture and human health. *Revista Bioética* 29: 76-86. <https://doi.org/10.1590/1983-80422021291448>
- Cardoso JLS, Souza AA and Vieira MLC. 2022. Molecular basis for host responses to *Xanthomonas* infection. *Planta* 256: 84. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03994-0>
- Catara V and Bella P. 2020. Bacterial diseases. In: Gullino M, Albajes R, Nicot P. (eds). *Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Plant Pathology in the 21st Century*, vol 9. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5_2)
- Conrath U, Beckers GJ, Langenbach CJ and Jaskiewicz MR. 2015. Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology* 53: 97-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- Durrant WE and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Fang XX and Yang SH. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology* 51: 473-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>

- Joshi JB, Senthamilselvi D, Maupin-Furlow JA and Uthandi S. 2022. Microbial protein elicitors in plant defense. *In*: Kumar A. (eds). Microbial biocontrol: sustainable agriculture and phytopathogen management. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-87512-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-87512-1_10)
- Khan E and Ahma IZ. 2024. Production and commercialization of biocontrol products. pp. 1665-180. *In*: Kumar A, Santoyo G, Singh J (eds). In plant and soil microbiome, biocontrol agents for improved agriculture, Academic Press Pages. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15199-6.00004-X>
- Larrahondo V, Villarraga DM and Moreno-Sarmiento N. 2019. Control biológico: camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología* 21(1): 2-5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80860>
- López-Vielma C, Solís-Sánchez A, Quiñones-Aguilar E, Qui-Zapata J y Rincón-Enríquez G. 2016. Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán. *Biotecnología y Sustentabilidad* 1 (1): 143-146. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/biotecnologiaysust/issue/view/faltante/1ro>
- Liu Y, Zhou X, Liu W, Huang J, Liu Q, Sun J, Cai X and Miao W. 2020. Hpa Xpm, a novel harpin of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, acts as an elicitor with high thermal stability, reduces disease, and promotes plant growth. *BMC Microbiology* 20(1): 4. <https://doi.org/doi:10.1186/s12866-019-1691-4>
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A and Van Wees SC. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 489-521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Raffener M, Üstün S, Guerra T, Spinti D, Fitzner M, Sonnwald S, Baldermann S and Börnke F. 2022. The *Xanthomonas* type-III effector XopS stabilizes CaWRKY40 a to regulate defense responses and stomatal immunity in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell* 34(5):1684-1708. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac032>
- Rico-Aguilar JC, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, Guizar-Gonzalez C, Morales-García JL, Gómez-Dorantes N y López-Pérez L. 2019. Escala cualitativa de severidad de *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar becán. *Revista Biotecnología y Sustentabilidad* 4(1): 47-54. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v4i1.680>
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8(10): 1809-1819. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>
- Sticher L, Mauch-Mani B and Metraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.pyto.35.1.235>
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I and Canto-Canché B. 2022. Microbial effectors: key determinants in plant health and disease. *Microorganisms* 10: 1980. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101980>
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Couoh-Dzul OJ, de los Santos-Briones C and Canto-Canché B. 2023. Effectors: key actors in phytopathology. *Revista Mexicana de Fitopatología* 41(2). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-4>
- Valerio-Landa SD, Quiñones-Aguilar EE y Rincón-Enríquez G. 2020. Método para la obtención y aplicación de un inductor de resistencia contra agentes fitopatógenos en plantas. Patente de Invención MX/a/2020/013638 ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (Sometido el 14 de diciembre de 2020 ante el IMPI). <https://vidoc.impi.gob.mx/visor?d=MX/E/2020/087009>
- Valerio-Landa SD, Quiñones-Aguilar EE, Enriquez-Vara JN, Hernández-Gutiérrez R, Hernández-Montiel LG y Rincon-Enriquez G. 2021a. Método de inducción, aislamiento y selección de proteínas HRP de bacterias fitopatógenas, una fuente potencial de inductores de resistencia vegetal. *Mensaje Bioquímico* 45: 70-78. <https://10.22201/fm.0188137xe.2021.45.07>
- Valerio-Landa SD, Quiñones-Aguilar EE, Enriquez-Vara JN, Hernández-Gutiérrez R, Hernández-Montiel LG and Rincon-Enriquez G. 2021b. Protein solutions from *Xanthomonas* as resistance inducers for the control of bacterial spot in tomato. *Revista Fitoecnia Mexicana* 44:609-616. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.4.609>
- Valerio-Landa SD. 2021. Proteínas Hrp de *Xanthomonas* y su evaluación como inductores para la resistencia fisiológica en plantas contra fitopatógenos. Tesis doctoral. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Zapopan, Jalisco, México. 307 p.
- Valerio-Landa SD, Quiñones-Aguilar EE, Hernández-Gutiérrez R y Rincón-Enríquez G. 2023. Inductor biológico proteico para el control de enfermedades de plantas. Patente de Invención MX-a-2023-008646 ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (Sometido el 21 de julio de 2023 ante el IMPI).
- Van Loon LC, Rep M and Pieterse CM. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>



- Walters DR, Ratsep J and Havis ND. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64(5): 1263-1280. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>
- Wang D, Wang B, Wang J, Wang S, Wang W and Niu Y. 2020. Exogenous application of harpin protein Hpa1 onto *Pinellia ternata* induces systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 110(6): 1189-1198. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-19-0463-R>
- Zehra A, Raytekar NA, Meena M and Swapnil P. 2021. Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: a review. *Current Research in Microbial Sciences* 2: 100054. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100054>
- Zhang S, Li C, Si J, Han Z and Chen D. 2022. Action mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction. *International Journal of Molecular Sciences* 23(12): 6758. <https://doi.org/10.3390/ijms23126758>