

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS DE
DEFENSA EN TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis philadelphica* Lam) Y
SU INDUCCIÓN POR HERBIVORÍA, DAÑO MECÁNICO Y
MOLECULAS SEÑALES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA
MARIANA ANDRADE MEDINA

DIRECTORA:
DRA. CARLA VANESSA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

OCTUBRE 2012.



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-035/2012

C. MARIANA ANDRADE MEDINA
PRESENTE

Marijuana Andrade Medina, estudiante de la licenciatura en Biología, inscrita en el COMITÉ DE TITULACIÓN DE TESIS E INFORMES (tesis) TESIS DE GRADUACIÓN "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS DE DEFENSA EN TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis philadeiphica* Lam) Y SU INDUCCION POR HERBIVORIA, DAÑO MECÁNICO Y MOLECULAS SEÑALES", para obtener el título de licenciatura en Biología.

A propuesta de la Comisión de Examen de Tesis y Examen de Grado, se recomienda la titulación de la Dra. Carla Vanessa Sanchez Hernández.

Con fines de cumplimiento de trámite, se recomienda la siguiente acción:

ACORDADO EN
COMISIÓN Y TRABAJO

Las Agradas, Nayarit, Jalisco, México, a 15 de febrero del 2012



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARÍA DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

FORMA F

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.

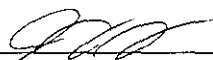
Presente.-

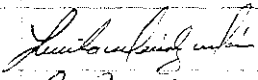
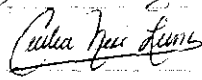
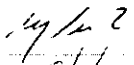

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad: **TESIS E INFORME** opción **Tesis** con el título: **“Determinación de la actividad de proteínas de defensa en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam) y su inducción por herbivoría, daño mecánico y moléculas señales”** que realizó la pasante **Mariana Andrade Medina** con número de código **206413749** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

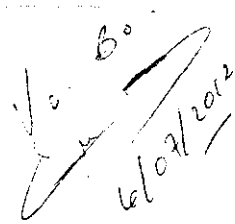
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco., Junio de 2012.


 Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
 Directora del trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Lucila Méndez Morán		07/JUL/2012
Dra. Cecilia Neri Luna		04/JULIO/2012
Q.F.B. Cinthya Guadalupe Temores Ramirez		04/VII/12
Supl. Dra. Ofelia Vargas Ponce		3 de Julio 2012


 6/07/2012

DEDICATORIAS

A mis padres: Rosalía Medina Hernández y Mario Andrade Godínez por ser ustedes el pilar en el cual me sustentó. Por estar cerca de mí cuando los necesite. Porque gracias a su apoyo, he realizado una de mis mejores metas. Ustedes, que sin esperar nada, lo dieron todo. Porque nunca estuve sola, siempre conté con su confianza. Por tratarme como un ser independiente y darme las alas para volar. Por todo esto, quiero que sientan que el objetivo logrado, también es suyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo, fue su amor: con cariño y admiración.

A mi hermana Rosalía Andrade Medina, por encaminarme en los ámbitos de la biología, quien es mi apoyo y mi compañera de vida.

A mi hermano Carlos Alberto Andrade Medina, que me demostró que el amor y la amistad no sólo son conceptos, sino entrega noble y desinteresada. Por darme la oportunidad de conocer el amor de una tía.

Al término de esta etapa de mi vida. Quiero expresar todo mi agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión, me alentaron a lograr esta realidad. Mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara por haber sido mi casa todos estos años y haberme dado la formación necesaria para enfrentarme al mundo real.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de licenciatura con clave de registro 83859.

A mi directora de tesis Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández, por mostrarme los caminos de la investigación, fomentar en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfar. Mi gratitud por sus consejos y críticas.

A mis sinodales: Dra. Lucila Méndez Morán, Dra. Cecilia Neri Luna, Q.F.B. Cinthya Guadalupe Temores Ramírez y Dra. Ofelia Vargas Ponce, por sus aportaciones a este trabajo de investigación.

A todos mis amigos, compañeros y maestros de la Universidad de Guadalajara, gracias por su apoyo, su compañía y sus buenos consejos, por estar siempre a mi lado y tener una palabra de aliento cuanto las necesite.

El presente trabajo de tesis fue llevado a cabo en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos, Departamento de Producción Agrícola, CUCBA-Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	I
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	IV
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Defensa en plantas	1
1.2 Jasmonatos	2
1.2.1 <i>Biosíntesis de ácido jasmónico</i>	3
1.2.2 <i>Acumulación y distribución del ácido jasmónico</i>	3
1.2.3 <i>Respuesta de defensa asociada a ácido jasmónico</i>	4
1.3 Proteínas relacionadas con la resistencia a insectos	7
1.3.1 Inhibidores de proteasa	7
1.3.1.1 <i>Clasificación de los Inhibidores de proteasas</i>	9
1.3.2 Polifenoloxidasas	17
1.3.3 Peroxidasas	20
1.4 Tomate de cáscara	23
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 Material biológico	28
4.1.1 <i>Plantas e insectos</i>	28

4.2 Inducciones	28
4.2.1 <i>Herbivoría</i>	28
4.2.2 <i>Daño mecánico</i>	29
4.2.3 <i>Aplicación de ácido jasmónico y ácido salicílico</i>	29
4.3 Preparación de extractos	30
4.4 Ensayos de actividad enzimática	30
4.4.1 <i>Actividad inhibitoria de serine proteasa (tipo tripsina)</i>	30
4.4.2 <i>Determinación enzimática de polifenoloxidasas</i>	31
4.4.3 <i>Determinación enzimática de peroxidasas</i>	32
4.5 Determinación de proteína total	33
4.6 Análisis estadístico	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 Actividad de inhibidores de proteasas, polifenoloxidasas y peroxidasas en respuesta a hervivoría	35
5.2 Actividad de inhibidores de proteasas, polifenoloxidasas y peroxidasas en respuesta a daño mecánico	38
5.3 Actividad de inhibidores de proteasas, polifenoloxidasas y peroxidasas en respuesta a tratamientos exógenos con moléculas señales.	41
6. CONCLUSIONES	45
7. LITERATURA CONSULTADA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ruta biosintética del ácido jasmónico	4
Figura 2. Respuesta de defensa a insectos dependiente de ácido jasmónico	5
Figura 3. Efecto de dos tipos de herbivoría sobre la actividad de proteínas relacionadas con defensa	36
Figura 4. Efecto del daño mecánico generado sobre la actividad de proteínas relacionadas con defensa	40
Figura 5. Efecto de moléculas señales sobre la actividad de proteínas relacionadas con defensa	44

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Clasificación de IPs de origen vegetal	10
Cuadro 2. Inducción de la actividad de PPO en respuesta a herbivoría en diferentes plantas	19
Cuadro 3. Características de las distintas clases de peroxidasas de plantas	21

ABREVIATURAS

AE	actividad específica
AJ	ácido jasmónico
AS	ácido salicílico
ASA	ácido acetilsalicílico
BApNA	N-benzoil-arginina-p-nitroanilida
BM	blanco muestra
BSA	albúmina de suero bovino
BTH	Benzotiadiazol
d	días
defl	de sus siglas en inglés, <u>defenseless 1</u>
DM	daño mecánico
DO	densidad óptica
h	horas
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
IBB	inhibidores Bowman-Birk
IPs	inhibidores de proteasas
Jai1	de sus siglas en inglés, <u>jasmonate insensitive 1</u>
JAR1	de sus siglas en inglés <u>jamonic acid resistant 1</u>
JMT	de sus siglas en inglés, <u>jamonic acid methyl transferase</u>
KDa	kilodaltón
LOX	Lipoxigenasa
min	minutos
MJ	metil jasmonato
Nm	nanómetro
OPDA	ácido 12-oxofitodienoico
Pin1	inhibidor de proteasa 1
Pin2	inhibidor de proteasa 2
POD	Peroxidasas
PPO	Polifenoloxidasas

PR	proteínas relacionadas a patogénesis
rpm	revoluciones por minuto
SAR	resistencia sistémica adquirida
seg	Segundos
UI	unidades de inhibición

RESUMEN

Durante su ciclo de vida, desde la semilla hasta su madurez, las plantas son utilizadas como alimento o refugio por diversos microorganismos parásitos, insectos y otros invertebrados. En respuesta a la herbivoría las plantas han desarrollado un sistema defensivo basado tanto en la erección de barreras estructurales como la síntesis de proteínas y metabolitos defensivos. Estas defensas que pueden tener un efecto directo en el desarrollo, crecimiento, vitalidad y longevidad del organismo agresor, o intervenir en la activación de otras respuestas que activan una intrincada red de señalización, la cual puede manifestarse como cambios en los niveles de expresión génica o como aumentos en la resistencia a futuros ataques. La resistencia inducida contra herbívoros muestra especificidad en términos de los agentes inductores y los organismos que son afectados por dichas respuestas.

Uno de los mecanismos de defensa que las plantas emplean contra insectos herbívoros involucra la rápida acumulación de proteínas que de alguna manera previenen o reducen el daño causado por futuros ataques. Las proteínas de defensa exhiben patrones de expresión altamente regulados. Éstas incluyen a las proteínas relacionadas con la patogénesis, enzimas involucradas en la síntesis de alcaloides y fitoalexinas, inhibidores de proteasas, enzimas oxidativas como: fenoloxidasas, polifenoloxidasas, peroxidasas y lipoxigenasas y péptidos antimicrobianos como las defensinas y tioninas.

La información que se tiene sobre *Physalis philadelphica* Lam. referente a los mecanismos de defensa presentes en dicha planta son limitados, por tal motivo, en un primer esfuerzo para caracterizar las defensas endógenas del tomate de cáscara se plantea analizar los niveles constitutivos e inducibles de diversas proteínas relacionadas con defensa. Para ello, evaluamos la inducción de inhibidores de proteasas, polifenoloxidasas y peroxidasas en respuesta a herbivoría por insectos, a daño mecánico y en respuesta a tratamientos exógenos con distintos evocadores bióticos relacionados con defensa. Los resultados presentados indican que los patrones de inducción de las proteínas de defensa son similares en los tratamientos de AJ, herbivoría (*Manduca sexta*) y daño mecánico. En contraste, la interacción con *Trialeurodes vaporariorum* presenta niveles similares a las plantas control. Estos datos corresponden con el modelo de señalización planteado para otras solanáceas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Defensa en plantas

Las plantas e insectos han coexistido desde hace aproximadamente unos 350 millones de años y durante este tiempo han desarrollado una serie de interacciones que van desde el mutuo beneficio, como: la polinización, la dispersión de semillas y micorrizas, entre otras hasta las parásitas o dañinas; sin embargo, la interacción más frecuente es la depredación de las plantas por los insectos o herbivoría. Las plantas en respuesta a este estrés, han desarrollado complejos mecanismos de defensa que le permiten contrarrestar los efectos negativos y sobrevivir. Entre estas defensas, se incluyen la síntesis de compuestos orgánicos y proteínas que pueden llegar a causar un efecto directo sobre la biología de los insectos, al afectar procesos de asimilación de nutrimentos, desarrollo o fertilidad (Walling, 2000; Gatehouse, 2002). En conjunto, estas respuestas pueden manifestarse en un incremento en los niveles de expresión génica, la activación en la síntesis de compuestos químicos y/o en el aumento en la resistencia a futuros ataques (Karban y Baldwin, 1997).

La demanda de energía en la planta para la inducción de las defensas aumenta, lo que conlleva a una reasignación de los mismos, por ende los mecanismos de defensa son costosos. La planta, entonces tiene que encontrar el balance para asegurar su sobrevivencia inmediata y contra ataques posteriores sin sacrificar su vitalidad, longevidad y reproducción (Walling, 2000).

Los mecanismos de defensa en plantas se pueden clasificar en: a) constitutivos, cuando dicha característica es expresada de manera invariable durante el desarrollo de la planta; y b) inducibles, cuando se activan solo en respuesta a la presencia de un organismo invasor. Las defensas inducibles requieren de un sistema de detección, el cual permita el reconocimiento del daño o agresor, que a su vez active un sistema de transducción de señales y una respuesta metabólica regulada a nivel transcripcional (Lamb *et al.*, 1989). Algunas respuestas defensivas de las plantas son muy rápidas, presentándose su activación en segundos o minutos después del estímulo (respuestas tempranas), mientras que otras se inducen más lentamente, horas o días después del daño (respuestas tardías) y regularmente

éstas últimas pueden permanecer activas durante varios días (Baldwin *et al.*, 2001). El reconocimiento del herbívoro ocasiona de manera rápida eventos tempranos como la apertura de canales iónicos, cambios en la concentración de calcio citosólico, alteración del potencial de membrana (despolarización o hiperpolarización), producción de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de proteínas. Como consecuencia de dichos procesos, ocurre la síntesis de ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y/u otros compuestos de señalización necesarios para la inducción de las respuestas locales y/o sistémicas en la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

La resistencia inducida contra herbívoros muestra especificidad a los agentes inductores y organismos que son afectados por dichas respuestas (Walling, 2000). Las plantas utilizan rutas de transducción de señales para inducir respuestas defensivas específicas. Los factores esenciales de una ruta de transducción comprenden un receptor (elemento de reconocimiento) capaz de detectar un estímulo, un segundo mensajero (elementos de transducción) como cascadas de calcio o fosforilación y elementos de respuesta (factores de transcripción). En las células completamente diferenciadas se requiere de una ruta de transducción que pueda responder de forma específica y rápida, incrementando o disminuyendo de manera selectiva la expresión de ciertos genes. Sin embargo, aun cuando la ruta de transducción posee elementos únicos para una respuesta en particular, esto no excluye la posibilidad de interacciones, comunicación entrecruzada, efectos inhibitorios o sinérgicos entre componentes de la ruta (Doares *et al.*, 1995; Graham y Graham, 1996; Schweizer *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 1999).

1.2 Jasmonatos

El ácido jasmónico (AJ) es una de las moléculas señales más importantes en la respuesta de defensa contra insectos herbívoros. Estructuralmente son ciclopentanonas sustituidas con dos cadenas laterales producidas a partir del ácido linolénico (18:3) y se encuentra en la mayoría de las plantas superiores. Su presencia se ha relacionado con diversos procesos fisiológicos como son: maduración, senescencia, floración y respuesta defensiva asociada a daño mecánico, herbivoría y patógenos (Creelman y Mullet, 1997).

1.2.1 Biosíntesis de AJ

La síntesis del AJ comienza con la liberación del ácido linolénico (18:3), a partir de los glicolípidos de las membranas cloroplásticas por acción de una lipasa. La síntesis se lleva a cabo a través de una serie de reacciones conocida con el nombre de la ruta de los ácidos octadecanoicos. El ácido linolénico es oxigenado por acción de la enzima 13-lipoxigenasa, reacción de la cual resulta el ácido 13-hidroperoxilínolénico, el cual actúa como sustrato de las enzimas aleno oxido sintasa (AOS) y aleno oxido ciclasa (AOC), para formar el ácido 12-oxofitodienoico (OPDA). Este intermediario es transformado en AJ mediante una reducción en el anillo de ciclopentanonas y tres rondas de β -oxidación (Vick y Zimmerman, 1987). Posteriormente el AJ es metabolizado y transformado a sus derivados más comunes. La enzima carboxil metiltransferasa del AJ (JMT) conduce a la formación de una forma volátil, conocida como metil jasmonato (MJ). El MJ participa en la señalización sistémica, debido a su capacidad de difundirse desde el sitio de síntesis, hasta las partes distantes de la planta, o bien mediante migración intercelular, posiblemente a través de floema. Además el AJ puede conjugarse a diversos aminoácidos, tales como leucina (AJ-Leu), fenilalanina (AJ-Phe), valina (AJ-Val) e isoleucina (AJ-Ile), siendo este último el conjugado predominante. Además, se conoce que su síntesis es regulada positivamente por el ácido abscísico (ABA) (Herde *et al.*, 1996), etileno (ET) (O'Donnell *et al.*, 1996), H₂O₂ (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001), oligogalacturónidos (OGA) (Doares *et al.*, 1995), luz UV (Conconi *et al.*, 1996) y ácidos grasos conjugados a aminoácidos (FAC) (Turlings *et al.*, 1995), mientras que negativamente es regulado por el ácido salicílico (AS)(Figura 1).

1.2.2 Acumulación y distribución de AJ

El AJ fue aislado por primera vez a partir del hongo *Lasiodiplodia theobromae*; sin embargo, el interés comercial surgió a partir del aislamiento de su forma volátil, el metil jasmonato (MJ) del jazmín (*Jasminum grandiflorum*) (Crabalona, 1967; Aldridge *et al.*, 1971). No obstante, el papel que desempeña el AJ/MJ en defensa comenzó a estudiarse a principio de la década de los 90's. El AJ se ha identificado en 160 familias de diferentes plantas, que en su mayoría se agrupan entre las angiospermas (Sembdner y Parthier, 1993), cabe señalar que los niveles endógenos de AJ en planta, varían dependiendo del tejido, estado de desarrollo de la planta y en respuesta a estímulos ambientales y se estima que se

encuentra presente en concentraciones $<10 \mu\text{M}$ (Mason *et al.*, 1992). Las concentraciones más altas de AJ se han detectado en flores y tejido en desarrollo como: meristemos y yemas laterales, mientras que los niveles más bajos se han reportado en hojas maduras y raíces. El AJ puede traslocarse en la planta a través del floema, o bien, en fase de vapor, vía MJ. Se ha determinado que los cambios en la expresión de genes son inducidos por AJ/MJ en concentraciones comprendidas entre los rangos nano y micro molar. En algunos casos, el incremento de AJ por efecto de daño es rápido, pero temporal, además se ha observado que el mantenimiento continuo de niveles altos no siempre es requerido para su actividad, por lo que la modulación de los niveles de AJ juega un papel importante en la regulación de la inducción controlada por esta señal.

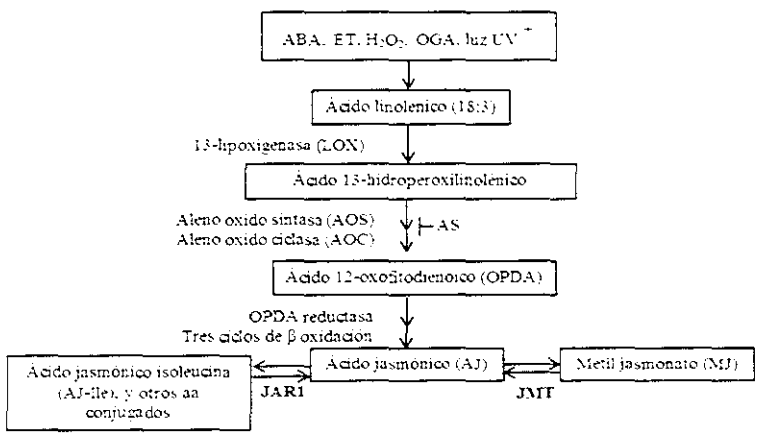


Figura 1. Ruta biosintética del ácido jasmónico en plantas (ruta octadecanoica).

1.2.3 Respuesta de defensa asociada a AJ

La ruta octadecanoica que produce AJ como producto final, ha sido relacionada directamente con la resistencia a insectos herbívoros y daño mecánico. Los productos génicos asociados con la regulación o establecimiento de una respuesta defensiva incluyen la inducción de proteínas relacionadas con defensa, como son: los inhibidores de proteasas (IPs), polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasas (POD); enzimas que participan en la síntesis

de AJ: proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP): enzimas involucradas en la producción de fitoalexinas y metabolitos secundarios: proteínas que refuerzan la pared celular y proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) (Creelman y Mullet, 1997)(Figura 2).

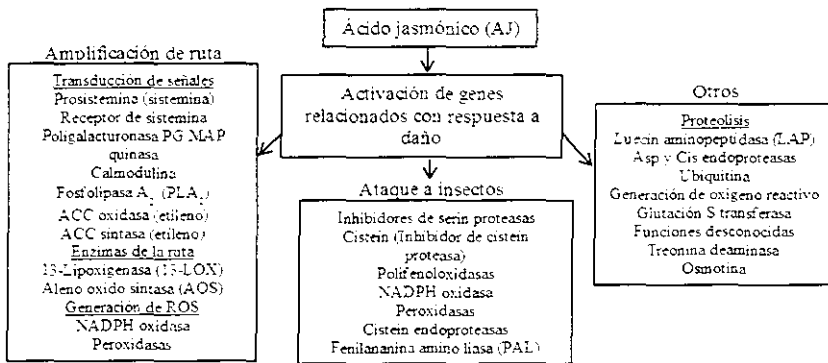


Figura 2. Respuesta de defensa a insectos dependiente de AJ.

La respuesta defensiva dependiente de AJ que se ha estudiado con más detalle, es la inducción de IPs por daño y herbivoría en especies solanáceas, particularmente en jitomate (Ryan, 1990). En este modelo, se logra explicar la activación de esta respuesta, que involucra la liberación de sistemina a nivel local, un polipéptido de 18 aminoácidos, obtenido a partir de un precursor llamado prosistemina. La recepción de sistemina en las células blanco causa la liberación del ácido linolénico de las membranas, induciendo la síntesis de AJ, activando la transcripción de los inhibidores de proteasas 1 y 2 (*Pin1* y *Pin2*). Aunque la sistemina es requerida para inducir la biosíntesis de AJ por daño o herbivoría, no es la señal móvil requerida a larga distancia para la activación sistémica de los IPs. La sistemina debe actuar cerca del sitio de daño para incrementar los niveles de AJ requeridos para la producción de señales de transporte sistémicas. En este sentido, Howe (2004) postuló que el AJ o un compuesto relacionado con la ruta del ácido octadecanoico es el que puede actuar como señal sistémica.

Se ha establecido que las respuestas mediadas por AS son inducidas principalmente en respuesta a patógenos biotróficos e insectos succionadores, mientras que las respuestas en las cuales se involucra la síntesis del AJ, están relacionadas con heridas y en respuesta a daño por insectos masticadores (Walling, 2000; Howe, 2004; Thaler *et al.*, 2010).

Peña-Cortes *et al.* (1993) sugirieron que la vía de señalización mediada por AS, bloquea la síntesis de AJ en el sitio de conversión del ácido 13-hidroperoxilinolénico a OPDA en plantas de jitomate. Stout *et al.* (1998) y Thaler *et al.* (2002a) demostraron que plantas de jitomate tratadas con BTH, un análogo sintético del AS, redujo la expresión de inhibidores de proteasas (IPs) y polifenoloxidasas (POD), originando por consecuencia un incremento en el daño causado por la larva *Helicoverpa zea* y *Spodoptera exigua*. Sin embargo, la señalización por AS y la ruta octadecanoica es complementaria en algunas plantas. Lo que sugiere que la relación que existe entre la resistencia a insectos y la resistencia a patógenos depende de la especie de planta, del insecto herbívoro y del patógeno involucrado (Felton y Korth, 2000).

Tomando en cuenta la importancia del AJ en respuesta al daño causado por herbívoros y a los producidos por heridas, se han generado mutantes afectadas en la ruta de su biosíntesis. Entre las mutantes insensibles a AJ, cabe destacar *jail*, mutante generada en tomate que alberga una deleción en el gen homólogo de la coratina insensitiva 1 de *Arabidopsis* (Coi1), la cual es requerida para la germinación de la semilla, respuestas de defensa mediadas por AJ y el desarrollo de tricomas glandulares (Li *et al.*, 2004). Otra mutante producida en jitomate es la *defl* la cual esta bloqueada en la actividad enzimática de la conversión del ácido 13-hidroxiperoxilinolénico a OPDA, resultando en plantas que se encuentran incapacitadas para sintetizar AJ (Howe *et al.*, 1996). Esto confirma que los productos generados por esta ruta metabólica son esenciales en la vía de señalización que regula la inducción de *Pin2*, los cuales a su vez desempeñan un papel importante en la protección de la planta contra insectos herbívoros (Bergey *et al.*, 1996).

De manera general, los estímulos bióticos inducen un incremento en los niveles de AJ, mayores que aquellos presentes en la respuesta a daño mecánico. En plantas de papa, la regurgitación de la larva, *Manduca sexta* colocada sobre la herida producida mecánicamente, induce la acumulación de transcritos en niveles similares a los obtenidos

por herbivoría (Korth y Dixon 1997). La respuesta diferencial al daño mecánico y al daño generado por herbivoría se ha asociado al reconocimiento de compuestos específicos presentes en las secreciones orales de ciertos insectos. La volicitina aislada a partir de las secreciones orales de larvas de *Spodoptera exigua* y una β -glucosidasa aislada de larvas de *Pieris brassicae*, se han caracterizado como los compuestos responsables del incremento en la emisión de conjugados volátiles que favorecen la atracción de insectos depredadores en plantas sometidas a herbivoría (Mattiacci *et al.*, 1995; Alborn *et al.*, 1997).

1.3 Proteínas relacionadas con resistencia a insectos

Uno de los mecanismos de defensa que las plantas emplean contra insectos herbívoros, es aquel que involucra la rápida acumulación de proteínas que de alguna manera previenen o reducen el daño causado por futuros ataques. Entre estas proteínas encontramos a los IPs, enzimas oxidativas, proteínas de pared celular y enzimas involucradas en la síntesis de fenilpropanoides.

1.3.1 Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas (IPs) son proteínas con gran afinidad por enzimas proteolíticas, capaces de inhibir fuerte y específicamente su actividad enzimática. Se caracterizan por ser proteínas de bajo peso molecular y se han descrito principalmente en tejidos de almacenamiento como semillas o tubérculos; sin embargo, también han sido identificados en tejidos aéreos de la planta (De Leo *et al.*, 2002). La acumulación de IPs puede ser inducible en respuesta al daño producido por herbívoros y patógenos (Ryan, 1990). Se han propuesto que estos IPs, son reguladores de proteasas endógenas en plantas y constituyen una de las principales estrategias de defensa, como consecuencia de los efectos antinutritivos en los insectos al interferir con el proceso digestivo. Son particularmente efectivos en la inhibición de proteasas digestivas de insectos herbívoros y/o proteasas secretadas por microorganismos fitopatógenos, causando una reducción en la disponibilidad

y asimilación de aminoácidos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Lawrence y Koundal, 2002).

En 1947, surgieron los primeros indicios del papel insecticida de los IPs de plantas, cuando Mickel y Standish observaron que las larvas de ciertos insectos eran incapaces de desarrollarse normalmente en productos derivados de la soya. Más tarde, se determinó que los inhibidores de tripsina de soya mostraban toxicidad en larvas del escarabajo *Tribolium confusum* (Lipke *et al.*, 1954). Posteriormente se comprobó que los IPs estaban involucrados en la defensa de plantas, al estudiar su acumulación local y sistémica en tejido foliar de papa expuesta a daño por el escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Green y Ryan, 1972). Desde entonces, se ha demostrado en muchos casos la actividad de IPs en diferentes especies de insectos, tanto en ensayos *in vitro*, utilizando proteasas del tracto digestivo de estos organismos, como en ensayos *in vivo* con dietas artificiales o con plantas transgénicas que sobreexpresan IPs (Koiwa *et al.*, 1997; Habib y Fazili, 2007). Los genes codificantes para inhibidores de serín, cisteín y metalo proteasas de distintos orígenes, en plantas transgénicas se han expresado establemente, con resultados positivos en la protección contra insectos plaga (Gutiérrez-Campos *et al.*, 1999; Vishnudasán *et al.*, 2005; Álvarez-Alfageme *et al.*, 2007; Quilis *et al.*, 2007). No obstante, la flexibilidad metabólica presente en los insectos, ha reducido la efectividad que la sobreexpresión pudiera tener en el control de insectos a largo plazo.

Además de afectar a las proteasas del tracto digestivo de insectos, los IPs son activos frente a las proteasas de microorganismos fitopatógenos. Lo anterior se ha demostrado ya que IPs aislados de plantas de cebada inhiben el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gramminicola*, y *Plectosphaerella cucumerina*, ya que regulan la actividad de enzimas endógenas (Valueva y Mosolov, 2004; Martínez *et al.*, 2005a) y también han comprobado su efectividad frente a nematodos (Stepek *et al.*, 2007), virus (Gholizadeh *et al.*, 2005) y bacterias (Charity *et al.*, 2005).

1.3.1.1 Clasificación de los IPs

La actividad de los IPs se basa en su capacidad de formar complejos estables con las proteínas blanco, bloqueando, alterando o previniendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. Debido a que las proteasas se clasifican en función de los aminoácidos o metales que poseen en su centro activo, tradicionalmente se clasificó a los IPs como inhibidores de serín, cisteín, aspartil, metalo, glutámico y treonin proteasas (Koiwa *et al.*, 1997; De Leo *et al.*, 2002; Rawlings, 2008). Además, su nomenclatura se ha basado en su origen y actividad en principalmente: tripsina, quimotripina y subtilisina. No obstante, recientemente debido a la presencia de IPs bi y multifuncionales, Rawlings *et al.* (2008) proponen la agrupación de estos en 68 familias y subfamilias de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos, la topología de sus puentes disulfuros y la localización del sitio reactivo. Cabe destacar que en esta agrupación solo 13 familias incluyen miembros de especies vegetales (Cuadro 1).

El dominio inhibidor se define como el fragmento de la secuencia aminoacídica que contiene un sitio reactivo simple después de la eliminación de las partes no involucradas directamente en la actividad inhibitoria. Según esta definición podemos encontrar dos categorías de inhibidores: a) simples, con un único dominio inhibidor o b) inhibidores complejos, con múltiples dominios inhibidores. Dentro de la segunda categoría encontramos 11 familias con miembros que contienen entre 2 y 15 dominios inhibidores. Cuando los inhibidores contienen dominios pertenecientes a una única familia se denominan homotípicos y en contraste son heterotípicos cuando contienen dominios de diferentes familias (Frexler *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Clasificación de IPs de origen vegetal (Habib y Fazili, 2007).

Nombre común	Ejemplo	Origen	Proteasas inhibidas
Kunitz (plantas)	Inhibidor de tripsina de soya	<i>Glycine max</i>	T, Q
	Inhibidor de subtilisina de cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	S, α -A
	Inhibidor de quimotripsina de frijol alado	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	α -Q
	Inhibidor de Kunitz cistein peptidasa	<i>Solanum tuberosum</i>	C
Kunitz (plantas)	Inhibidor de proteasa A	<i>Sagittaria sagittifolia</i>	T, Q
	Inhibidor de Kunitz subtilisina	<i>Canavalia lineata</i>	S
	Inhibidor de catepsina D	<i>Solanum tuberosum</i>	Cat-D, T
	Inhibidor de tripsina	<i>Acacia confusa</i>	T, α -Q
Cereal	Inhibidor de tripsina/ α -amilasa	<i>Eleusine coracana</i>	α -A
	Inhibidor de tripsina/factor XIIa de cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	α -A, T
	Inhibidor de tripsina/ α -amilasa de trigo	<i>Triticum aestivum</i>	α -A, T
	Inhibidor de tripsina/factor XIIa de maiz	<i>Zea mays</i>	T de mamifero
Calabaza	Inhibidor de tripsina MCTI-I	<i>Momordica charantia</i>	E de páncreas
	Inhibidor de tripsina MCTI-II	<i>Momordica charantia</i>	T
	Inhibidor de tripsina macrociclica de calabaza	<i>Momordica cochinchinensis</i>	T
	Inhibidor de tripsina CSTI-IV	<i>Cucumis sativus</i>	T
Papa tipo I	Inhibidor de quimotripsina I	<i>Solanum tuberosum</i>	T, Q
	Inhibidor de glutamil peptidasa II	<i>Momordica charantia</i>	S
	Inhibidor de subtilisina-quimotripsina C1-1A	<i>Hordeum vulgare</i>	Q, S
	Inhibidor de subtilisina-quimotripsina de trigo	<i>Triticum aestivum</i>	S, α -Q
Mostaza	Inhibidor de tripsina de mostaza	<i>Sinapis alba</i>	β -T
	Inhibidor de tripsina-2 de mostaza	<i>Brassica hirta</i>	β -T bovina, T,
	Inhibidor de tripsina	<i>Brassica napus</i>	Q, α -Q
Cystatin	Oncocistatina	<i>Onchocerca volvulus</i>	C
	Orizacistatina II	<i>Oryza sativa</i>	C
Kininogen	Sarcocistatina	<i>Sarcophaga peregrina</i>	C
Bowman-Birk	Inhibidor de tripsina de planta unidad 1 B-B	<i>Glycine max</i>	T, Q
	Inhibidor de tripsina/quimotripsina B-B	<i>Arachis hypogaea</i>	T, Q
	Inhibidor de tripsina ciclica de girasoles	<i>Helianthus annuus</i>	T, Cat-G, E, Q
Papa tipo II	Inhibidor de proteasa II	<i>Solanum tuberosum</i>	T, Q
	Inhibidor de peptidasa de papa II unidad 1	<i>Solanum tuberosum</i>	T, Q
	Inhibidor de peptidasa de tomate II unidad 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	T, Q
	Inhibidor de peptidasa de tomate II unidad 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	T, Q

T=tripsina, Q=quimotripsina, S=subtilisina, C=cistein. E=elastina, Cat=catepsina. A=amilasa.

Serpinas (inhibidores de serín proteasas)

La familia de las serpinas es la más numerosa y extensa dentro de los IPs, ya que se han identificado miembros de esta familia en casi todos los organismos, incluyendo virus, bacterias, plantas y animales (Rawlings *et al.*, 2008). Estas proteínas son en su mayoría inhibidores irreversibles de serín proteasas de la familia de la quimotripsina, pero existe una minoría que inhibe otro tipo de serín proteasa e incluso algunas también son capaces de inhibir cisteín proteasas (Gettins, 2002).

En plantas, se identificó por primera vez una serpina en semillas de cebada (Hejgaard *et al.*, 1985) y desde entonces se han aislado o identificado más de 20 serpinas en semillas de cereales como trigo, centeno y avena (Hejgaard, 2001; Hejgaard y Hauge 2002; Hejgaard *et al.*, 2005). También se han aislado serpinas a partir de polen y exudados de floema de calabaza, en donde se observa un incremento como respuesta a herbivoría por el pulgón *Myzus persicae* (Yoo *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* se han identificado 29 genes de serpinas; sin embargo, su expresión se ha relacionado con la inducción de resistencia a patógenos, no en acción directa sobre las proteasas de los microorganismos, sino como elementos de las rutas involucradas en la inducción de la respuesta inmune (Law *et al.*, 2006).

Al parecer esta familia de IPs está presente en todo el reino vegetal; sin embargo, existe poca información acerca de su función fisiológica. En semilla, se les ha relacionado con defensa, al ejercer un efecto directo sobre las proteasas exógenas de insectos, microorganismos y aves (Hejgaard, 2001). Posiblemente las serpinas del floema juegan un papel importante en el mantenimiento e integridad de péptidos o proteínas implicadas en señalización (Yoo *et al.*, 2000) o regulación de la muerte celular programada (la Cour Petersen *et al.*, 2005).

Inhibidores tipo Bowman Birk (IBB)

Los IBB forman otra familia de inhibidores de serín proteasas. Esta familia lleva su nombre en tributo a sus descubridores, quienes identificaron y caracterizaron por primera vez un

miembro de esta familia en soya (Birk *et al.*, 1963; Bowman, 1964). Los inhibidores de esta familia se han identificado en leguminosas y gramíneas (Tanaka *et al.*, 1997), aunque también se ha reportado un miembro de esta familia en girasol (Korsinezky *et al.*, 2001). Cabe destacar que principalmente se encuentran en la semilla de forma constitutiva aunque pueden expresarse en hoja como respuesta a daño (Eckelkamp *et al.*, 1993).

Estos inhibidores provenientes de dicotiledóneas son polipéptidos sencillos de 8kDa con dos dominios homólogos que contienen diferentes sitios reactivos. Estos inhibidores interaccionan independientemente, pero de forma simultánea, con dos proteasas de distintos tipos (Birk, 1985). Generalmente, uno de los centros reactivos es específico para tripsina, quimotripsina y elastina (Qi *et al.*, 2005); sin embargo, la afinidad relativa por una proteasa se altera cuando uno de los centros activos está ocupado. Por ejemplo, el inhibidor de cacahuate no tiene actividad frente a quimotripsina cuando uno de sus centros activos está ocupado por tripsina y viceversa (Tur *et al.*, 1972). Por su parte, los inhibidores de monocotiledóneas pueden ser de dos tipos: a) péptidos de una sola cadena, con un peso aproximado de 8kDa y con un solo sitio activo; y b) proteínas de mayor tamaño, con un peso de alrededor de 16kDa y con dos sitios reactivos (Tashiro *et al.*, 1987).

El potencial efecto como insecticida de los IBB, se ha evaluado extensamente. Por ejemplo, en las leguminosas *Cajanus cajan* y *Vigna mungo*, los inhibidores redujeron significativamente el peso y el porcentaje de supervivencia de las larvas de *Achaea janata*. Además, mostraron actividad inhibitoria contra las enzimas digestivas de *Helicoverpa armígera* y *Spodoptera litura* (Prasad *et al.*, 2010). Así mismo, los IPs presentes en *Vigna unguiculata* inhibieron tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad proteolítica de tripsina y quimotripsina en el coleóptero *Anthonomus grandis* (Franco *et al.*, 2003).

El inhibidor de tripsina de *Tamarindus indica*, inhibió la actividad de proteinasas de los coleópteros *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* y *Anthonomus grandis* ocasionando una mayor tasa de mortalidad y de inanición (Araújo *et al.*, 2005).

Inhibidores tipo Kunitz

En base a la homología los inhibidores de tipo Kunitz forman una familia separada. sus componentes son mayoritariamente activos frente a serín proteasas, ya que inhiben tripsina, quimotripsina y subtilisina (Park *et al.*, 2005), aunque también son activas frente a otras proteasas como la aspartil proteasa, catepsina D y la cisteín proteasa papaina. Estos inhibidores se caracterizan por tener un peso entre 18-22kDa, dos puentes disulfuro y un centro reactivo. En la unión con la proteasa forma un complejo fuerte que se disocia muy lentamente. Estos inhibidores se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, habiéndose descrito en leguminosas, gramíneas y solanáceas (Laskowski y Kato, 1980; Ishikawa *et al.*, 1994). Además, también se inducen en condiciones de estrés, como se ha descrito en tubérculos de papa (Park *et al.*, 2005; Ledoigt *et al.*, 2006).

El inhibidor de tripsina-Kunitz aislado de *Adenantha pavonica* inhibió *in vitro* la actividad papaina de *Callosobruchus maculatus*, *Acanthoscelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus* y en bioensayos produjo 50% de mortalidad de *Callosobruchus maculatus* cuando se le incorporó en una dieta artificial (Macedo *et al.*, 2004). Además, el inhibidor tripsina-papaina de *Pithecelobium dumosum* inhibió la actividad proteolítica de *Zabrotes subfasciatus* y *Callosobruchus maculatus* (Oliveira *et al.*, 2007). En general, el patrón de expresión, la evolución aparentemente rápida de los genes de inhibidores y la actividad inhibitoria, son consistentes con un papel en defensa contra los insectos herbívoros (Haruta *et al.*, 2001).

Inhibidores de calabaza

Esta familia de inhibidores se ha descrito solo en cucurbitáceas (Hamato *et al.*, 1995; Lee y Lin, 1995; Felizmenio *et al.*, 2001) y son activos frente a serín proteasas. Su actividad contra las proteasas digestivas de insectos herbívoros, ha sido demostrada contra el coleóptero *Epilachna borealis* (Tamally, 1985). Estos inhibidores son péptidos sencillos de 28-30 aminoácidos con un tamaño de entre 3 y 3.5kDa y con 3 puentes disulfuro (Heitz *et al.*, 2001). El pequeño tamaño de estos inhibidores sumado a su poder inhibitorio resultan atractivos para el estudio de las interacciones proteasa-inhibidor.

Inhibidor de tripsina/ α -amilasa de cereales

Los inhibidores de tripsina/ α -amilasa son polipéptidos sencillos con cinco puentes disulfuro y aproximadamente 12-16kDa, importante en el endospermo de cereales. Se han caracterizado más de 20 miembros en diferentes especies de la familia Poaceae (ejemplo: cebada, trigo, centeno, maíz y mijo africano) (Carbonero y García-Olmedo, 1999). Su expresión ocurre durante el desarrollo del grano, donde su síntesis precede a la de las proteínas de reserva y se degradan rápidamente durante la germinación de la semilla. Los miembros de esta familia son activos frente a serín proteasas y/o α -amilasa (Gourinath *et al.*, 2000). Cabe señalar que un gran número de estos inhibidores solo son activos frente α -amilasa pero existen inhibidores de algunas especies como cebada y centeno que son activos frente a tripsina (Odanj *et al.*, 1983) u otros como los de maíz y mijo que muestran una actividad dual de serín proteasas y α -amilasa (Shivraj y Pattabiraman, 1981; Mahoney *et al.*, 1984).

Es importante señalar que la actividad inhibitoria de las amilasas puede llegar a causar efectos drásticos en el ciclo de vida de los insectos herbívoros, debido a que estas enzimas son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Estudios llevados a cabo con plantas transgénicas de chícharo (*Pisum sativum*) y de frijol azuki (*Vigna angularis*), sobreexpresantes del inhibidor de α -amilasa α -AI-I de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), generaron semillas resistentes a tres especies de gorgojos, *Callosobruchus maculatus*, *Callosobruchus chinensis* y *Bruchus pisorum* (Shade *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 2000).

Inhibidores tipo tripsina de mostaza

Esta familia de inhibidores está compuesta por polipéptidos con un tamaño de aproximadamente 7kDa que inhiben serín proteasas. Se han aislado de crucíferas y se han podido caracterizar de un gran número de especies incluyendo la mostaza y canola (Ascenzi *et al.*, 1999; Volpicella *et al.*, 2000). Estos inhibidores se expresan en semillas durante el desarrollo, sin embargo también se inducen en respuesta a herida (De Leo *et al.*, 2001). Plantas de tabaco y *Arabidopsis* sobreexpresantes presentaron diferente grado de

resistencia contra *Plutella xylostella*, *Mamestra brassicae* y *Spodoptera littoralis*. Mientras que *Mamestra brassicae* y *Spodoptera littoralis*, mostraron retraso en el desarrollo y baja en la tasa de fertilidad, en *Plutella xylostella* se incremento su mortalidad (De Leo *et al.*, 2001).

Inhibidor tipo I y II de papa

Los inhibidores de esta familia se han aislado en numerosas especies vegetales como: papa (Ryan y Ball, 1962), tomate (Ryan, 1990) y calabaza (Murray y Christeller, 1995) y se ha demostrado su inducción en respuesta a herida y herbivoría en las hojas de tomate (Lee *et al.*, 1986). Tienen un tamaño de 8kDa, normalmente son monoméricos y por lo que no forman puentes disulfuro (Cai *et al.*, 1995). Estos inhibidores se componen de 1 a 8 unidades múltiples repetidas y se caracterizan por inhibir tripsina, quimotripsina, elastina, orizaina, pronasa E y subtilisina (Antcheva *et al.*, 2001). Los inhibidores tipo II se han identificado exclusivamente en solanáceas: donde inicialmente, se describieron en tubérculos de papa y posteriormente se identificaron en hojas, flores, frutos, semillas, raíces y floema de diferentes especies de solanáceas entre las que se incluyen: la berenjena (Richardson, 1979), papa (Bryant *et al.*, 1976), tomate (Gustafson y Ryan, 1976), tabaco (Pearce *et al.*, 1993) y *Solanum americanum* (Xu *et al.*, 2001). Pueden expresarse de forma constitutiva, como el inhibidor presente en flores de tabaco (Atkinson *et al.*, 1993) o inducirse en respuesta a herida (Pearce *et al.*, 1993).

Niveles altos de *Pin1* y *Pin2* se correlacionan positivamente con la mortalidad o disuasión de los insectos (Ryan, 1990). Al sobreexpresar los inhibidores *Pin1* y *Pin2* de tomate y papa, en plantas de tabaco se encontró que la expresión de *Pin2* presentaba un mayor efecto sobre el crecimiento de larvas de *Manduca sexta* (Johanson *et al.*, 1989). Sin embargo las plantas sobreexpresantes del gen *Pin1*, provocan la disminución en el crecimiento de larvas de *Chrysodeixis eriosoma* (McManus *et al.*, 1994). La expresión de *Pin2* utilizando un promotor inducible por daño en plantas de arroz, aumento la resistencia contra *Sesamina inferens* durante 5 generaciones (Duan *et al.*, 1996).

Inhibidores de aspartil y metaloproteasas

Existen dos familias de inhibidores de metaloproteasas en plantas: la familia de inhibidores de metalocarboxipeptidasas en tomate y papa (Rancour y Ryan, 1968; Graham y Ryan, 1997) y la familia del inhibidor de catepsina D en papa (Keilova y Tomasek, 1976). Son pequeños péptidos de 38-39 aminoácidos y un tamaño de aproximadamente 4.2kDa (Hass y Hermodson, 1981). Son capaces de inhibir cinco de las proteasas digestivas más importantes: tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B de animales superiores y de muchos insectos (Holländer-Czytko *et al.*, 1985). Este grupo de inhibidores se acumula en tubérculos de papa durante su desarrollo y en hojas se incrementan sus niveles en respuesta a herida (Holländer-Czytko *et al.*, 1985; Graham y Ryan, 1997). Los inhibidores de aspartil proteasas se han identificado en flores de girasol (Park *et al.*, 2000), en semillas de trigo y cebada (Galleschi *et al.*, 1993), alcachofa (Frazao *et al.*, 1999), hojas de tomate y tabaco (Graham y Ryan, 1997). *Vicia sativa* (Roszkowska-Jakimiec y Bankowska, 1998) y en tubérculos de papa (Graham y Ryan 1997). Algunos miembros de esta familia son capaces de inhibir la actividad proteolítica de determinadas enzimas digestivas de insectos, por ejemplo el inhibidor de peptatina aislado de *Aspergillus japonicus* inhibe las proteasas digestivas del escarabajo que afecta a la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Wolfson y Murdock, 1987).

Cistatinas (inhibidores de cisteín proteasas)

Las cistatinas son un grupo de proteínas identificadas en vertebrados, invertebrados, plantas y algunos microorganismos que inhiben la actividad de cisteín proteasas (Oliveira *et al.*, 2003). Según la homología entre sus secuencias, el tamaño molecular y el número de puentes disulfuro se agrupan en 4 familias (Turk y Bode, 1991). En particular, solo en la familia IV se incluyen las cistatinas de plantas o fitocistatinas, las cuales se caracterizan por no poseer puentes disulfuro y por estar formada por más de 80 miembros descritos en plantas mono y dicotiledóneas, que se agrupan en una rama independiente del árbol evolutivo de esta familia de proteínas. La mayoría posee un peso molecular entre 11-16kDa y un solo dominio inhibidor (Martínez *et al.*, 2005b).

Las fitocistatinas se han purificado principalmente de semillas (Abe *et al.*, 1987; Gaddour *et al.*, 2001) aunque también se han descrito en hojas (Pernas *et al.*, 2000), raíces (Gaddour *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2005b), tubérculos (Waldrom *et al.*, 1993), tallos (Pernas *et al.*, 2000), polen (Martínez *et al.*, 2005b), botones florales (Li *et al.*, 1996) y frutos (Ryan *et al.*, 1998). Además se han identificado cistatinas que se inducen tanto por heridas como por tratamientos exógenos con MJ (Grunden *et al.*, 1997; Pernas *et al.*, 2000). Sin embargo, en jitomate se han caracterizado y purificado cistatinas inducibles por AJ, cuyos niveles de expresión no responden a daño mecánico (Wu y Haard, 2000).

1.3.2 Polifenoloxidasas

La polifenoloxidasa (PPO), es una metaloenzima ampliamente distribuida en la escala filogenética, encontrándose tanto en organismos procariontes como eucariotes, esta enzima se encuentra considerablemente en el reino vegetal, identificándose en algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas y angiospermas (Mayer y Harel, 1979) y también son conocidas como tirosinasas, fenoloxidasas, monofenoloxidasas o cresolasas. Son proteínas de 54-62kDa (Constabel *et al.*, 1996), responsables de las reacciones de pardeamiento enzimático, catalizando la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles, y su posterior oxidación a ortoquinonas, las cuales se polimerizan dando lugar a pigmentos color marrón, rojo o negro, dependiendo de los componentes naturales presentes en los tejidos vegetales. Estas reacciones modifican las características organolépticas y nutricionales de los alimentos, depreciando su calidad (Friedman, 1996).

La actividad de PPO se ha encontrado en diversas plantas de interés agronómico, como son: manzana, aguacate, plátano, pepino, uva, piña, mango, durazno, albaricoque, berenjena, calabaza, lechuga, papa, betabel, té negro, café y cacao (Yoruk y Marshall, 2003). Se acumulan principalmente en raíz, hoja, flor y tejido vascular (Constabel *et al.*, 1996; Mayer, 2006) aunque los niveles de esta proteína varían dependiendo de la especie, cultivar, estadio de maduración y estadio fenológico (Amiot *et al.*, 1995).

En tejidos vegetales intactos las PPOs y sus sustratos fenólicos permanecen en compartimentos separados, como es el caso de cloroplastos y vacuolas respectivamente, por

lo que no ocurre reacción alguna. La pérdida de la integridad celular ocurre de forma natural durante el proceso de senescencia; sin embargo, sus niveles se incrementan en respuesta a heridas y daño mecánico lo que favorece el contacto de la enzima y sus sustratos. El papel de las PPO en plantas aun no es claro, no obstante se han asociado con la defensa hacia patógenos y herbívoros. Los argumentos con mayor evidencia indican que la acumulación de melanina (en forma de costra), presente por la polimerización de o-quinonas, puede prevenir infecciones por patógenos, inclusive se ha documentado un incremento en los niveles de PPO en interacciones incompatibles de hospedero-patógeno. Además, la unión de las o-quinonas con aminoácidos básicos o sulfurados provoca una precipitación de estas proteínas alterando de manera significativa la digestión y asimilación de las mismas (Dongfens *et al.*, 2004). La inducción de PPO en respuesta a daño o herida, ha sido documentada en numerosas plantas incluyendo: manzana, papa, tabaco y jitomate (Thipyapong y Steffens, 1997; Constabel y Ryan, 1998).

Los trabajos de Felton y Duffey, (1989) reportaron el papel que desempeñan las PPO en defensa contra insectos herbívoros, ya que demostraron que plantas de jitomate expuestas a herbivoría por *Heliothis zea* mostraban niveles altos de esta enzima en tejido foliar. La inducción de PPO en jitomate por insectos y MJ han sido repetidos tanto en laboratorio como en estudios de campo (Stout *et al.*, 1998; Thaler *et al.*, 1996, 2002b). Además esta inducibilidad ha sido confirmada en otras plantas, incluyendo cultivos herbáceos y árboles (Constabel y Ryan, 1998).

Felton y Duffey (1992), demostraron que plantas de jitomate y papa expuestas a herbivoría por el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) inducían niveles de PPO de 3 a 7 veces mayores que los presentes en plantas control. Resultados similares se obtuvieron con plantas de mora negra, frijol común y té, expuestas a daño por herbivoría de insectos pertenecientes a diferentes gremios alimenticios (Tscharrntke *et al.*, 2001; Alba-Meraz y Choe, 2002; Chakraborty y Chakraborty, 2005). Esta respuesta también se observó con la especie arbórea *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* (álamo), donde los niveles de PPO se incrementaron significativamente en el tejido foliar a causa del daño generado por el lepidóptero *Malacosoma disstria* (Constabel *et al.*, 2000). Por el contrario, diversos trabajos presentan un nulo incremento en la actividad oxidativa en respuesta a daño por

herbivoría. Tal es el caso de lo reportado en soya y algodón expuesta a herbivoría por *Helicoverpa zea* y *Ceratoma trifurcata* (Felton *et al.*, 1994; Bi y Felton, 1995; Bi *et al.*, 1997). En pastos y cereales expuestos a infestación con insectos succionadores, no se encontró un patrón claro en la inducción de la actividad de PPO (Ni *et al.*, 2001; Heng-Moss *et al.*, 2004). Los resultados de inducción en siete de doce experimentos, demuestran que la actividad de PPO es consistente con la hipótesis de que esta enzima esta relacionada con la defensa contra insectos herbívoros: sin embargo, no se ha determinado un patrón de expresión específico regulado por el gremio alimenticio al que pertenecen dichos insectos. En el cuadro 2 se presentan algunos ejemplos de inducción de PPO en respuesta a herbivoría en diferentes plantas.

Cuadro 2. Inducción de la actividad de PPO en respuesta a herbivoría en diferentes plantas (Constabel y Barbehenn, 2008).

Planta (taxa)	Especie de insecto (orden)	Inducción	Gremio alimenticio
Tomate	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (C)	~2X	Masticador
Papa	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> + SO	~3-7X	
Mora negra	<i>Agelastica alni</i> (C)	~3X	
Soya	<i>Ceratoma trifurcata</i> (C)	No detectado	
Álamo poplar (hibrido)	<i>Malacosoma disstria</i> (L)	~12X	
Soya	<i>Helicoverpa zea</i> (L)	No detectado	
Algodón	<i>Helicoverpa zea</i>	No detectado	
Frijol común	<i>Melanoplus differentialis</i> (O)	~2X	
Pasto bufel	<i>Blissus occiduus</i> (H)	No detectado	Succionador
Soya	<i>Spissistilus festinus</i> (H)	1.6X	
Té	<i>Helopeltis theivora</i> (H)	~2-3X	
Cebada, trigo, avena	<i>Diuraphis noxia</i> (Ho)	No detectado	

C=Coleoptera, L=Lepidoptera, H=Heteroptera, Ho=Homoptera, O=Orthoptera SO=Secreciones Orales

Además de presentarse una alta actividad de esta enzima en el tejido foliar de diversas especies vegetales. Kowalski *et al.* (1992) demostraron que algunas especies como *Solanum berthaultii* y *Solanum tuberosum* presentan una intensa actividad de PPO en tricomas, donde el papel de defensa no estaba relacionado con el efecto antinutritivo sino con la presencia de un polímero pegajoso que se forma a partir de la ruptura de los tricomas seguida de una rápida oxidación y polimerización de compuestos fenólicos en donde los insectos quedan atrapados.

En hojas de tomate se ha demostrado que moléculas señales relacionadas con la respuesta de defensa a insectos, como la sistemina y el AJ, inducen la transcripción y acumulación de PPO (Constabel *et al.*, 1998). Al evaluar genotipos de papa con diferentes niveles de PPO, se observó que los genotipos con niveles altos en PPO fueron más resistente al escarabajo que afecta a la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Castanera *et al.*, 1996). En contraste altos niveles en PPO en tejido foliar de café no presentaron resistencia ante la herbivoría por *Leucoptera coffeella* (Melo *et al.*, 2006). Líneas transgénicas sobreexpresantes de PPO generadas en jitomate mostraron un efecto negativo en el desarrollo de *Heliothis armigera* y *Spodoptera litura*. Mientras que las líneas suprimidas de PPO, presentaron efectos contrarios (Li y Steffens, 2002).

1.3.3 Peroxidasas

Las peroxidasas (PODs) son enzimas, ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal, que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el peróxido de hidrógeno o hidroperóxido orgánico como molécula aceptora de electrones. Las reacciones en las que están implicadas las peroxidasas son las bisustratos y las que siguen un mecanismo "ping-pong". Todas ellas se caracterizan por tener en el centro activo de la enzima un grupo prostético y un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX), con Fe (III) pentacoordinado (Passardi *et al.*, 2005, 2007). Las PODs se agrupan en base a dos criterios, uno en función a su estructura y secuencia aminoacídica y otro por su capacidad de unirse a diferentes iones metálicos (Smith y Veitch, 1998). La superfamilia de peroxidasas de plantas se divide en tres grandes grupos:

Clase I. Peroxidasas de origen procariotica. en donde se incluyen proteínas intracelulares. que muestran dos tipos de actividades enzimáticas catalasa-peroxidasa y ascorbato-peroxidasa. La primera relacionada con la protección de la célula frente al estrés oxidativo (Welinder. 1992). y la segunda asociada con la eliminación de H₂O₂ en cloroplastos y citosol de plantas superiores (Dalton. 1991).

Clase II. Peroxidasas fúngicas. esta categoría engloba proteínas de secreción como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (o peroxidasa dependiente de Mn²⁺) (MnP) producidas por los hongos ligninolíticos (Hatakka. 1994). Las peroxidasas fúngicas maduras presentan de 40-60 residuos adicionales en su dominio C-terminal. cuatro puentes disulfuro conservados y en su secuencia no aparece ninguna tirosina. poseen dos iones calcio y están glicosiladas.

Clase III. Peroxidasas de secreción en plantas. este grupo incluye proteínas con funciones fisiológicas muy variadas y específicas del tejido en el que se producen. Pueden participar en la oxidación de compuestos tóxicos. en la biosíntesis de la pared celular. en el catabolismo del ácido 3-indolacético. en la biosíntesis de etileno. etc. (Campa. 1991). Estructuralmente son muy similares a las proteínas de la clase II. son glicoproteínas monoméricas. poseen dos iones calcio y cuatro puentes disulfuro conservados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de las distintas clases de peroxidasas de plantas (Welinder. 1992).

Elementos	Clase I	Clase II	Clase III
Grupo hemo	Si	Si	Si
Carbohidratos	No	0-5%	0-25%
Iones metálicos	No	Ca ²⁺ (2)	Ca ²⁺ (2)
Puentes disulfuro	No	4	4
Señal peptídica de secreción	No	En el extremo N-terminal	En el extremo N-terminal
Propéptidos en el extremo C-terminal	No	No	Si

En el interior de una planta existen distintas formas de peroxidasas (isoenzimas). cada una de ellas involucrada en diferentes funciones dependiendo de su localización subcelular. Hay isoenzimas que se encuentran localizadas en pared celular y por ello intervienen en procesos de crecimiento y endurecimiento de la misma, y otras, en cambio, son más abundantes en el citoplasma y están implicadas en reacciones de oxidación que ocurren al interior de la célula.

Las PODs de plantas superiores de la clase III están relacionadas con diversos procesos fisiológicos durante el ciclo de vida de las plantas, desde la germinación hasta la senescencia. Esto debido a la variedad de isoformas presentes, así como a la regulación de la expresión de las mismas (Passardi *et al.*, 2005). Entre los procesos en los cuales participan dichas proteínas se encuentra el desarrollo y endurecimiento de la pared celular, la lignificación y suberización, catabolismo de auxinas y protección contra estrés oxidativo y ataque de patógenos (Kawano, 2003). El rol de las PODs en defensa también se relaciona con la formación de barreras físicas en la pared celular, al promover la acumulación de lignina, suberina, polisacáridos y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Bowles, 1990). Además de regular el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno que participan como moléculas señales y agentes antimicrobianos (Kawano y Muto, 2000), también promueven una mayor producción de fitoalexinas (Kristensen *et al.*, 1999). Generalmente, múltiples PODs son inducidas durante la infección en respuesta a patógenos (Chittoor *et al.*, 1997), lo que sugiere un papel específico para cada una, durante el proceso de defensa.

Se ha demostrado un aumento en los niveles de proteínas o de transcrito en respuesta a daño mecánico o a diversos patógenos. En diversas plantas como: tabaco, tomate, papa, pepino, frijol chino, arroz, rábano picante, cacahuete, frijol y camote se ha documentado un aumento en la actividad foliar en respuesta a daño (Hiraga, 2001). Además se ha reportado la inducción de PODs en respuesta a diversos patógenos, hongos (Harrison *et al.*, 1995), bacterias (Rasmussen *et al.*, 1995), virus (Hiraga *et al.*, 2000) y viroides (Vera *et al.*, 1993), o inductores de defensa (Thaler *et al.*, 1996; Délano-Frier *et al.*, 2004). Esta enzima fue clasificada como una PR en tabaco (PR-9) (van Loon *et al.*, 1994), en donde se encontró una correlación positiva entre la actividad y aumento de POD con la resistencia a la

infección por *Pseudomonas syringae* pv tabaco (Simons y Ross, 1970). Debido a la presencia de diversas formas de PODs y su inducción por patógenos y/o daño, se ha sugerido que las PODs desempeñan un papel importante en los sistemas de defensa de las plantas. Duffey y Felton (1991) evaluaron los niveles de POD en tejido foliar de plantas de jitomate, inducidas por diferentes insectos y observaron que las plantas con mayores niveles de POD, causaban efectos negativos en el desarrollo de los insectos que se alimentaban de ellas. Stout *et al.*, (1994), observaron inducción de POD en tejido foliar de jitomate en respuesta a herbivoría por *Liriomyza trifolii* y *Aculops lycopersici*, pero no por el masticador *Helicoverpa zea*, concluyendo que las plantas responden de manera diferencial ante el tipo de daño generado por los distintos herbívoros. En estudios posteriores en la misma planta y por el mismo grupo de trabajo, se demostró la inducción de esta enzima únicamente por el áfido *Macrosiphum euphorbiae* (Stout *et al.*, 1998). Otros panoramas relacionados con defensa en los que participan estas enzimas posiblemente se basa en el proceso de lignificación y suberización, las cuales contribuyen a la defensa a través del reforzamiento de la pared celular, aumentando la dureza de la hoja, lo que repercute en el acceso a nutrimentos (Coley, 1983).

1.4 Tomate de cáscara

En la actualidad, al menos 19 especies de *Physalis* se recolectan para el consumo de su fruto (Santiaguillo *et al.*, 2009). En el caso particular del tomate de cáscara (*Physalis philadelphica*) también llamado tomate, tomate verde, tomate de hoja o tomatillo, ha cobrado gran importancia agronómica en los últimos 20 años. Se cultiva comercialmente y su producción se destina al mercado nacional y/o de exportación. *Physalis philadelphica* es una planta diploide con 24 cromosomas, monoica con flores hermafroditas o perfectas que crecen solitarias y salen de la dicotomía de las ramas, el tamaño varía según raza y variedad, son pentámeras de color amarillo brillante, presentan igual número de máculas de color café oscuro, las anteras son azules o azul-verde. La aparición de la primera flor suele ser entre los 17 a 21 días después de la siembra, alrededor de los 52 días puede alcanzar la cantidad máxima de flores que puede ser de hasta 125, reduciéndose en los siguientes días de su desarrollo fenológico (Sánchez *et al.*, 2006). La planta se puede encontrar de manera

silvestre, cultivada e incluso asociada con cultivos como calabaza, frijol y maíz principalmente.

En México existe una gran variedad genética que ha sido agrupada en ocho razas: Silvestre, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla (Peña, 1992; Peña y Santiaguillo, 1999). En 2011 la superficie sembrada con esta hortaliza fue de 47,427 ha con un rendimiento promedio de 14.08 ton/ha. Este cultivo se produce en casi todas las entidades de la República Mexicana: siendo Sinaloa el principal estado productor, seguido de Sonora, Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Jalisco (SIAP, 2011).

El tomate de cáscara se caracterizaba por su rusticidad y se consideraba una hortaliza privilegiada por las pocas plagas que la atacaban: sin embargo, debido a cambios en los esquemas tradicionales de producción, en años recientes se han incrementado las pérdidas por plagas (Sánchez *et al.*, 2006). Las principales plagas reportadas para el tomate de cáscara son: el barrenador de fruto del tomate de cáscara (*Heliothis subflexa*), la paratrioza (*Bectericera cockerelli*), la mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii*), el picudo del toloache (*Trichobaris mucorea*), el mayate del tomate de cáscara (*Lema trilineata*), la pulga saltona (*Epitrix* sp.), la mosca del tomate de cáscara o arrocillo (*Melanogramyza tomatae*), el minador de la hoja (*Liriomyza* sp.) y trips (Jiménez *et al.*, 1992; Morales *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2006).

Dentro de la constitución química de las especies del género *Physalis* destacan las sustancias derivadas del ergostano denominadas withaesteroides, entre los cuales los withanólidos y las ixocarpalactonas son las más abundantes (Su *et al.*, 2002). Estos compuestos presentan actividad antinutritiva contra numerosos herbívoros (Waiss *et al.*, 1993); sin embargo, la eficiencia de estos metabolitos en defensa es cuestionable, debido a que los niveles presentes en el fruto disminuyen a medida que este se va desarrollando y a la presencia de mecanismos de desintoxicación presentes en algunos insectos como es el caso de *Heliothis subflexa* (Bado *et al.*, 2005). En lo que respecta a la acumulación externa de metabolitos, se han encontrado algunas flavononas glicosiladas derivadas del kaempferol, quercitina y myrcitina en los exudados de tricomas presentes en *Physalis peruviana* y *Physalis angulata* (Wollenweber *et al.*, 2005). Otros metabolitos secundarios con función defensiva contra patógenos e insectos son los glicoalcaloides esteroidales, que

se encuentran ampliamente distribuidos en plantas solanáceas como son el jitomate, la papa y la berenjena (Friedman, 2006). En frutos de *Physalis philadelphica* se ha reportado la presencia de α -tomatina, el glucoalcaloide más representativo del jitomate (Friedman y Levin, 1995). Se considera que la toxicidad de la α -tomatina está relacionada con la formación de complejos con el colesterol y la desintegración de membranas celulares así como con la inhibición de la colinesterasa (Hollister *et al.*, 2001). No obstante, también se han observado efectos sobre el comportamiento en la elección de hospederos o durante la oviposición (Zhang y Mitchell, 1997).

2. HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis

Las plantas de *Physalis philadelphica* expuestas a herbivoría, daño mecánico y tratamientos con ácido jasmónico y ácido salicílico inducirán en el tejido foliar la actividad de proteínas relacionadas con defensa (inhibidores de proteasas, polifenoloxidasas y peroxidasas).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la actividad enzimática de proteínas relacionadas con defensa en hojas de *Physalis philadelphica* en respuesta a herbivoría, daño mecánico y tratamientos con moléculas señales (AJ y AS).

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la actividad de IPs y la actividad enzimática de PPO y POD en plantas expuestas a herbivoría por el masticador *Manuca sexta* y *Trialeurodes vaporariorum*.
2. Determinar la actividad de IPs y la actividad enzimática de PPO y POD en plantas expuestas a daño mecánico.
3. Determinar la actividad de IPs y la actividad enzimática de PPO y POD en plantas tratadas con AJ y AS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Plantas e insectos

Las semillas de *Physalis philadelphica* var. Morada fueron donadas por el MC. José Sánchez Martínez del CUCBA-Universidad de Guadalajara. Para el cultivo de las plantas, las semillas se colocaron en charolas de germinación y se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16h luz a 28°C y 8h de oscuridad a 16°C. Aproximadamente dos semanas después, las plántulas fueron transplantadas a macetas de 350mL, con sustrato compuesto de partes iguales de suelo agrícola, tezontle, perlita (Dicamex) y peat moss (Sunshine). Éstas fueron regadas regularmente y fertilizadas semanalmente con una solución de 20-20-20 (N-P-K, Profesional Solution Scotts) y mantenidas bajo condiciones controladas (descritas previamente), evitando cualquier tipo de estrés. En todos los experimentos se utilizaron al menos ocho plantas, con un tamaño entre 12 y 15cm, con 4 o 5 hojas desarrolladas.

Las larvas del insecto masticador *Manduca sexta* fueron proporcionadas por el insectario del Cinvestav- Unidad Irapuato. Las larvas crecieron con una dieta semi-sintética a 26°C y 90% de humedad relativa bajo un fotoperíodo de 16h luz y 8h oscuridad. Las moscas blancas (*Trialeurodes vaporariorum*), fueron obtenidas a partir de una colonia previamente establecida en el laboratorio de marcadores moleculares del CUCBA-Universidad de Guadalajara. La colonia es mantenida en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Río Fuego), con un fotoperíodo de 16h luz y 8h de oscuridad a 25°C. Para los experimentos con mosca blanca siempre se utilizaron adultos recién emergidos (1 a 5 días).

4.2 Inducciones

4.2.1 Herbivoría

Los ensayos de herbivoría se realizaron mediante el contacto directo de las plantas con los insectos herbívoros. Para los ensayos de inducción con *Manduca sexta* se colocaron de 3 a 4 larvas en 2º instar en las hojas más desarrolladas de cada planta. Las larvas se alimentaron libremente hasta presentarse una pérdida de aproximadamente un 30% del tejido foliar total y llegado ese nivel de herbivoría las larvas fueron retiradas. Las muestras fueron colectadas después de 24h o 5d de haber comenzado el daño (primera mordida). Durante el ensayo las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento en condiciones controladas.

Para las inducciones por infestación con *Trialeurodes vaporariorum*, las plantas se colocaron dentro de la colonia de mosca en el punto de mayor emergencia de adultos, durante 24h o 5d. Para estimular que las moscas volaran hacia las plantas de tomate de cáscara se procedió a sacudir violentamente las plantas de jitomate. En cada planta durante la colecta se observaron entre 200 a 300 moscas; sin embargo, a pesar de los altos niveles de infestación, no se observaron señales evidentes de daño, como lesiones necróticas o cloróticas. En todos los ensayos de herbivoría, las muestras fueron colectadas en nitrógeno y fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. Como controles experimentales se incluyeron plantas intactas.

4.2.2 Daño mecánico (DM)

El tratamiento con DM se realizó haciendo heridas con pinzas acerradas presionando dos veces de manera perpendicular sobre la nervadura central en todas las hojas de la planta. El tejido foliar fue colectado 24h después del daño y colocado en nitrógeno, posteriormente las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. Como control se incluyeron plantas sin dañar.

4.2.3 Aplicación de ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS)

Para los tratamientos con moléculas señales se utilizaron soluciones de AJ a 1mM (Sigma) y AS a 0.25mM (Sigma) de acuerdo a lo reportado por Thaler *et al.* (1996). Para favorecer

la solubilidad del A.J. este fue diluido previamente con metanol, para obtener una concentración a 1M. en ambos casos las soluciones fueron preparadas justo antes de su aplicación. La aplicación de cada solución se realizó por aspersión sobre el tejido foliar hasta el punto de saturación (o corrimiento). Las concentraciones utilizadas no mostraron síntomas de fitotoxicidad. Una vez transcurrido el tiempo de inducción (24h), el tejido foliar de cada planta fue colectado en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C, hasta su análisis posterior. Como control se utilizaron plantas intactas crecidas en las mismas condiciones.

4.3 Preparación de extractos

Para la determinación de la actividad inhibitoria, de PPO y POD, se prepararon extractos proteicos acuosos: partiendo de 200mg de tejido pulverizado con nitrógeno líquido y 400µL de agua bidestilada, la mezcla se homogenizó a 1300rpm en un agitador de tubos de microcentrifuga (Eppendorf termomixer) a 4°C, durante 15min. Posteriormente, el homogenizado se centrifugó durante 20min a 13000rpm (Eppendorf 5415D), se procedió a recuperar el sobrenadante y continuar con los ensayos colorimétricos. Para las determinaciones se emplearon extractos recién preparados.

4.4 Ensayos de actividad enzimática

4.4.1 Actividad inhibitoria de serin proteasa (tipo tripsina)

La actividad inhibitoria se determinó de acuerdo al método de Erlanger *et al.* (1961), con algunas modificaciones. En este método, la actividad proteasa se establece en base al incremento en la absorbancia a 405nm, causada por la reacción específica de la enzima (tripsina) sobre el sustrato N-benzoil-arginina-P-nitroanilina (BAPNA). Esto corresponde al grado de hidrólisis y liberación del grupo p-nitroanilina, que presenta una coloración amarillenta lo que permite seguir por espectrofotometría el progreso de la reacción.

La actividad inhibitoria se determino en placas de 96 pozos, utilizando una solución amortiguadora de Tris 0.1M pH8, colocando para la reacción un alícuota variable de ésta solución, una alícuota variable de la enzima (tripsina 0.1mg/mL) y una alícuota de 30µL del extracto acuoso (inhibidor o muestra), se preincubó 15min a 37°C. Posteriormente, se agregó 20µL de sustrato (BAPNA 0.01M) y se ajustó el volumen final a 200µL. Se incubó 20min a 37°C y se tomó lectura a 405nm en el espectrofotómetro (ELX800, Bio-tek). En todas las mediciones se incluyó una lectura de blanco de muestras (BM), correspondiente a una alícuota de 30µL de muestra y 170µL de solución amortiguadora, para restar el valor de absorbancia de los extractos foliares. La actividad inhibitoria fue definida como el decremento en la absorbancia a 405nm bajo las condiciones anteriormente descritas.

Una unidad de actividad inhibitoria fue considerada como el número de unidades de enzimas (tripsina) inhibidas (UI) por mL. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{a) UI/mL} = (\text{DO}_{\text{tripsina}} - \text{DO}_{\text{muestra}}) / (0.01 * \text{Ve})$$

Donde:

$\text{DO}_{\text{muestra}}$ = Densidad óptica de la muestra – Densidad óptica del BM

Ve = Volumen de muestra = 30µL

$\text{DO}_{\text{tripsina}}$ = Densidad óptica de la enzima en ausencia de inhibidor, valor ajustado a ~0.5

Partiendo de las UI se determino la actividad específica (AE) utilizando la siguiente ecuación, para lo cual se determinó la proteína total utilizando el método de Bradford (ver apartado 4.5).

$$\text{b) AE} = \text{UI} / \text{Proteína total}$$

4.4.2 Determinación enzimática de polifenoloxidasas (PPO)

La actividad enzimática se determinó de acuerdo al protocolo reportado por Thaler *et al.* (1996). Este método se basa en la medición del cambio de coloración que ocurre a

consecuencia de la oxidación del ácido cafeico y formación de o-quinonas, las cuales se asocian en polímeros complejos que generan el color típico marrón rojizo, característico del pardeamiento enzimático. La determinación de la actividad enzimática se realizó en placas de 96 pozos utilizando una alícuota de 200 μ L de ácido cafeico (2.92mM), preparado en una solución amortiguadora de fosfato de potasio (0.1M pH8), más 30 μ L de extracto acuoso (muestra) y se dejó reposar por 3min. en seguida se realizó la medición en el espectrofotómetro (ELX800, Bio-tek) a 450nm. El blanco de muestras (BM) incluyó volúmenes equivalentes de muestra y solución amortiguadora de fosfato de potasio. La actividad enzimática de PPO es reportada como el cambio en la absorbancia a 450nm entre el tiempo de reacción en relación a la proteína total del extracto (Bradford ver apartado 4.5). El cálculo se realizó utilizando a la siguiente ecuación:

$$DO_{\text{muestra}} / \text{T tiempo de reacción} / \text{Proteína total}$$

Donde:

DO_{muestra} = Densidad óptica de la muestra - BM

Tiempo de reacción = 3 (expresado siempre en min)

Proteína total = mg/mL

4.4.3 Determinación enzimática de peroxidasa (POD)

La actividad enzimática se determinó de acuerdo al protocolo reportado por Thaler *et al.* (1996). Este método se basa en la medición del cambio de coloración, debido a que la enzima cataliza la oxidación de ciertos compuestos fenólicos (guayacol) en presencia del H₂O₂. Teniendo como resultado el desarrollo de un complejo de tetraguayacol, que genera el color rojo ladrillo. La determinación de la actividad enzimática se realizó en placas de 96 pozos utilizando una alícuota de 200 μ L de guayacol (2.92mM), preparado en una solución amortiguadora de fosfato de potasio (0.1M pH8), mas una alícuota de 30 μ L del extracto acuoso (muestra) y por último 10 μ L de H₂O₂. A los 30seg se realizó la medición en el espectrofotómetro (ELX800, Bio-tek) a 450nm. El blanco muestra (BM) incluyó

volúmenes equivalentes de muestra y solución amortiguadora de fosfato de potasio. La actividad enzimática de POD es reportada como el cambio en la absorbancia a 450nm entre el tiempo de reacción en relación a la proteína total del extracto (Bradford ver apartado 4.5). El cálculo se realizó utilizando a la siguiente ecuación:

$$DO_{\text{muestra}} / \text{Tiempo de reacción} / \text{Proteína total}$$

Donde:

DO_{muestra} = Densidad óptica de la muestra - BM

Tiempo de reacción = 0.5 (expresado siempre en min)

Proteína total = mg/mL

4.5 Determinación de proteína total

Para estimar la cantidad de proteína total en los extractos foliares se utilizó el método de Bradford (Sigma). El método se basa en la unión entre un colorante aniónico ácido (azul de Coomassie R-250) y las proteínas que forman un complejo que puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 630nm. El colorante azul de Coomassie presenta afinidad con aminoácidos básicos y aromáticos, particularmente con la arginina. La curva estándar de proteína se preparó a partir de una solución de albúmina de suero bovina (BSA Sigma) e incluía un rango de 0.25 a 1.4mg/mL. Para la determinación se mezclaron 5µL de cada muestra con 250µL del reactivo comercial de Bradford (Sigma). se incubó a temperatura ambiente durante 10min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 590nm.

4.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos incluyeron al menos 8 plantas por tratamiento y en todos los casos se realizaron repeticiones independientes de los mismos. Para determinar el efecto de los

tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer. El programa estadístico empleado fue JMP, versión 3.1.6.2.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Actividad de IPs, PPO y POD en respuesta a herbivoría

Dependiendo del gremio alimenticio al que pertenezcan, los insectos herbívoros pueden causar diferentes tipos de daños. La acumulación de IPs en tejido foliar, como parte de los mecanismos de defensa en las plantas ante el ataque de insectos masticadores, ha sido documentado previamente en diversas especies vegetales (Ryan, 1990; Stout y Duffey, 1996). Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con *Manduca sexta*, mostraron una inducción significativa en los niveles de IPs y este incremento fue observado desde las 24h posteriores al daño, no obstante los niveles más altos se detectaron a los 5d (Figura 3a). Por el contrario, en respuesta a la infestación con mosca blanca (MB) no se observaron cambios en los niveles de estas proteínas (Figura 3d). El incremento en los niveles de IPs, detectado horas posteriores al daño, en respuesta a herbivoría fue documentado por primera vez en plantas de jitomate (Green y Ryan, 1972). Posteriormente se identificaron IPs inducibles en tejido foliar de papa (Ryan, 1990), tabaco (Lindhorst *et al.*, 1993) y maíz (Cordero *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos en este trabajo representan el primer reporte de la actividad inducible de IPs en *Physalis philadelphica* en respuesta a herbivoría. Es importante resaltar que, no siendo *Manduca sexta* una plaga comúnmente asociada al cultivo de *Physalis philadelphica*, se descarta la posibilidad de que la inducción de la actividad inhibitoria se manifieste como una respuesta específica frente a la interacción de la planta con un herbívoro especialista. Esto permite insinuar que la inducción en la actividad inhibitoria se presenta como una respuesta general al daño causado por herbívoros masticadores. Aun así, experimentos con insectos relacionados con el cultivo de *Physalis philadelphica* y otras plagas generalistas deberán llevarse a cabo para evaluar más ampliamente la respuesta de la actividad inhibitoria frente a daño causado por herbivoría.

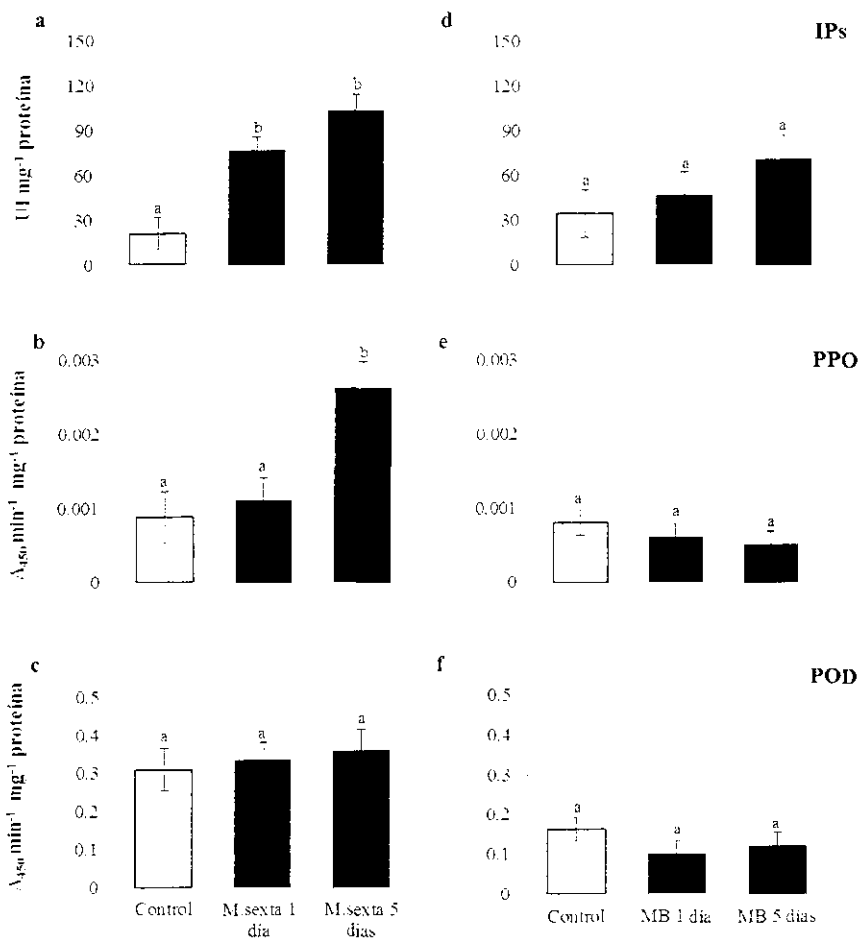


Figura 3. Efecto de dos tipos de herbivoría sobre la actividad de proteínas relacionadas con defensa. Medición de los niveles de IPs y la actividad de PPO y POD en extractos proteicos de hojas de *Physalis philadelphica* expuestas 24h o 5d a herbivoría por larvas de *Manduca sexta* y adultos de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*. En todos los casos se utilizaron plantas intactas como control. Cada barra corresponde a la media \pm ee de $n \geq 8$. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$, utilizando una prueba de ANOVA-Tukey-Kramer).

La falta de inducción de IPs en las plantas infestadas con *Trialeurodes vaporariorum* (Figura 3d), podría estar relacionada con el poco daño ocasionado por el insecto succionador durante el proceso de alimentación. Resultados similares se han observado en interacciones con los áfidos *Macrosiphum euphorbiae* (Stout *et al.*, 1998) y *Myzuz persicae* (Fidantsef *et al.*, 1999).

Éstos resultados coinciden con los datos obtenidos por Walling (2000) y Estrada-Hernández *et al.* (2009), quienes reportan la ausencia de expresión de los genes *Pin2* en respuesta al daño de cualquier estadio larvario de la mosca blanca *Bemisia tabaci*.

En conjunto con la determinación de IPs se evaluó la inducción de enzimas oxidativas, proteínas que juegan un papel importante en la protección de brotes nuevos (Thiyapong *et al.*, 1997). Como se muestra en la Figura 3b, los niveles de PPO se incrementaron más del doble en respuesta al daño provocado por *Manduca sexta*: sin embargo, este aumento fue significativo a los 5 días. La actividad de POD en los ensayos con *Manduca sexta* fueron semejantes a la actividad presente en las plantas control (Figura 3c). Resultados similares en la inducción de la actividad de PPO han sido reportados en plantas de jitomate dañadas por larvas de *Helicoverpa zea* (Thaler *et al.*, 1996; 2002b; Stout *et al.*, 1998) y confirmados en diversos árboles y plantas de interés agronómico, pertenecientes a varias taxa (Constabel y Ryan, 1998; Constabel y Barbehenn, 2008). Además, el incremento en los niveles de transcrito en respuesta a herbivoría y/o daño mecánico se han reportado en: papa (Thiyapong *et al.*, 1995), jitomate (Thiyapong *et al.*, 1997), manzana (Boss *et al.*, 1995) y álamo (Constabel *et al.*, 2000).

La generación de plantas transgénicas sobreexpresantes de PPO en jitomate (Thiyapong *et al.*, 2006) y álamo (Wang y Constabel, 2004), han demostrado la importancia de éstas proteínas en la resistencia a insectos herbívoros. Las larvas de *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua* y *Heliothis armigera* alimentadas a partir de plantas de jitomate transgénicos mostraron efectos negativos en su desarrollo y mortalidad: mientras que las plantas con el gen reprimido presentaron efectos contrarios, con un mayor consumo de follaje y talla (Bhonwong *et al.*, 2009).

La ausencia de actividad de enzimas oxidativas en respuesta a la infestación con mosca blanca (Figura 3e y f) podría estar relacionada con el tipo de daño que genera este insecto durante el proceso de alimentación. Thaler *et al.* (2010) reportan una represión de genes codificantes para PPO, treonina desaminasa e IPs en plantas de jitomate expuestas por el áfido (*Macrosiphum euphorbiae*). Resultados similares fueron presentados por Stout *et al.* (1998), quienes encontraron un incremento en la actividad de PPO e IPs solo en respuesta a un insecto masticador y no en presencia de áfidos (*Macrosiphum euphorbiae*), no obstante, en respuesta al áfido solo se indujo actividad de POD.

Los resultados en la actividad de PPO (Figura 3e) difieren de los trabajos reportados para otra especie de mosca blanca, *Bemisia argentifolii* (Mayer *et al.*, 2002). Posiblemente esto se deba a diferencias en los niveles de infestación, estadio de crecimiento del insecto o señales (inductores) específicas presentes en la saliva de ésta especie (Walling, 2000; Estrada-Hernández *et al.*, 2009). Esta especie es caracterizada por su voracidad durante el proceso de alimentación, es altamente agresiva, produce un exceso de excreta y está asociada con la aparición distintiva del síntoma “plateado de la hoja” (Puthoff *et al.*, 2010).

En general, se sabe que la respuesta de las plantas a los herbívoros masticadores de hojas, es similar a la inducida ante la respuesta por heridas. Mientras que los herbívoros succionadores que se alimentan de floema, tienden a inducir respuestas que están más relacionadas a patógenos (Walling, 2000). Los insectos que se alimentan directamente del floema son altamente especializados en sus hábitos alimenticios y presentan un tipo de estrés particular a la planta (Kempema *et al.*, 2007).

5.2 Actividad de IPs, PPO y POD en respuesta a daño mecánico

Las plantas reaccionan al daño mecánico mediante la activación de distintas respuesta y pueden ser similares a las que se activan en respuesta a herbivoría, estando posiblemente involucrados en defensa y restablecimiento del tejido dañado. Los resultados obtenidos en los ensayos de daño mecánico, mostraron una inducción significativa en los niveles de IPs (Figura 4a). Por el contrario, en los niveles de enzimas oxidativas no se encontró ninguna

diferencia en la actividad presente entre plantas control con respecto a las plantas dañadas (Figuras 4b y c).

Moura y Ryan (2001) observaron un incremento de 2.6 veces en los niveles de proteína en respuesta a daño mecánico y una inducción de transcrito a partir de las 4h posteriores al daño, no obstante permanecieron altos durante 48h. Resultados semejantes se han reportado en papa, jitomate (Ryan, 1990), maíz (Cordero *et al.*, 1994), alfalfa (Brown *et al.*, 1985) y álamo (Bradshaw *et al.*, 1989). El incremento en la actividad inhibitoria encontrado en las hojas de *Physalis philadelphica* dañadas y en respuesta a *Manduca sexta* corresponde al modelo de señalización planteado para jitomate: donde, se observa que en respuesta a daño y herbivoría con insectos masticadores se induce de manera local y sistémica la expresión de los genes *Pin1* y *Pin2* (Ryan, 1990, 2000) y en consecuencia la actividad de IPs (Green y Ryan, 1972; Ryan, 1990) a través de una ruta de transducción de señales mediada por AJ (Berger *et al.*, 1996; Ryan, 2000). Inevitablemente el proceso de alimentación de los insectos herbívoros conlleva cierto grado de daño en la planta; sin embargo, numerosos trabajos han demostrado que algunas respuestas son inducidas específicamente y/o con mayor rapidez solo en plantas expuestas a herbivoría (Stout *et al.*, 1994; McCloud y Baldwin, 1997). Korth y Dixon (1997) demostraron una mayor acumulación de transcritos de *Pin2* y HMGR (reductasa de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) en tejido foliar de papa expuestas a herbivoría respecto a las plantas dañadas mecánicamente. Sin embargo, la actividad inhibitoria detectada en *Physalis philadelphica* requiere de una mayor caracterización, la identificación de los genes involucrados y la confirmación de la inducción sistémica de la respuesta.

Por un lado, la inducción nula de la actividad de PPO en respuesta a daño mecánico ha sido reportada previamente en diversas plantas, como: mostaza negra, canola, soya, chile y sauce llorón (Constabel y Ryan, 1998). Además otra posibilidad de explicar los resultados obtenidos se relaciona con la muestra utilizada durante las determinaciones, ya que para jitomate se ha reportado que la inducción de PPO en respuesta a daño se presenta exclusivamente en tejido joven (Thipyaong y Steffens, 1997), y durante los ensayos con *Physalis philadelphica* se colectó todo el tejido foliar.

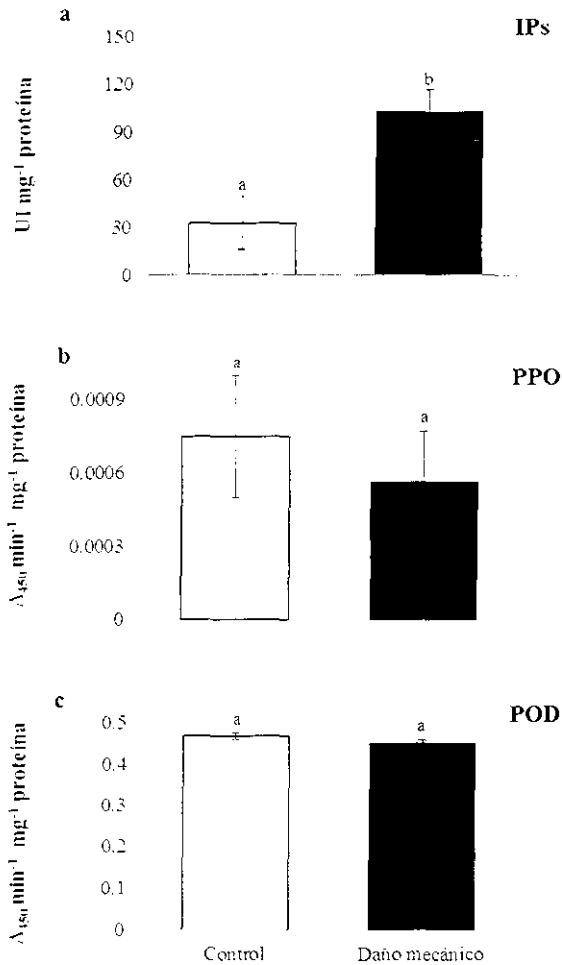


Figura 4. Efecto del daño mecánico generado sobre la actividad de proteínas relacionadas con defensa. Medición de los niveles de IPs y de la actividad de PPO y POD en extractos proteicos de hojas de *Physalis philadelphica* colectadas 24h después de haber empezado el daño. En todos los casos se utilizaron plantas intactas como control. Cada barra corresponde a la media \pm ee de $n \geq 8$. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$, utilizando una prueba de t-Student).

Cabe señalar que los resultados en la actividad de POD difiere de lo reportado para otras especies de plantas, donde la inducción de esta enzima ha sido documentada en tabaco, jitomate, papa, pepino, frijol, arroz y rábano (Hiraga *et al.*, 2001), no obstante en plantas de pepino y de tabaco, está documentada la acumulación de POD por herbivoría, pero poco se sabe si hay inducción inducida por daño mecánico (Lagrimini y Rothstein 1987; Rasmussen *et al.*, 1995).

5.3 Actividad de IPs, PPO y POD en respuesta a tratamientos de AJ y AS

El reconocimiento del daño como consecuencia del proceso de herbivoría activa una o más rutas de transducción de señales que conllevan a cambios en la expresión de genes de defensa y/o síntesis de metabolitos. La regulación de las rutas involucradas en la respuesta a herbivoría, incluye la presencia de una o más señales endógenas, entre las que destacan el AJ y el AS. Si se presentan respuestas distintas a diferentes herbívoros la ruta de transducción debe poseer elementos únicos para una respuesta en particular, aun así esto no excluye la posibilidad de interacciones, comunicación entrecruzada, efectos inhibitorios o sinérgicos entre componentes de la ruta de transducción (Howe, 2004; Walling, 2000).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con AJ mostraron una inducción significativa en los niveles de IPs (Figura 5a). Este incremento fue tres veces mayor respecto a las plantas control. Resultados similares han sido reportados en plantas de jitomate expuestas a tratamientos de AJ en concentraciones que van de 0.1 a 10mM (Thaler *et al.*, 1996). Con la finalidad de establecer la concentración adecuada de AJ a utilizar en los ensayos con *Physalis philadelphica*, se realizaron ensayos preliminares utilizando dos concentraciones (1mM y 10mM), en donde se observó que la concentración mayor provocaba efectos fitotóxicos (Datos no mostrados). La inducción foliar de IPs en respuesta a tratamiento con AJ o su forma volátil (MJ) se ha documentado en plantas pertenecientes a diferentes taxas entre las que se incluye: trigo (Dutt *et al.*, 2011), tabaco, alfalfa (Farmer *et al.*, 1992), papa, frijol y algodón (Creelman y Mullet, 1995; Bleichert *et al.*, 1995; Karban y Baldwin, 1997).

El uso potencial del AJ y del AS como inductor de resistencia contra insectos herbívoros ha sido evaluado exitosamente en cultivos agrícolas de tomate (Thaler *et al.* 2010), algodón (Benedict y Chang, 1991) y amaranto (Délano-Frier *et al.*, 2004). No obstante, el uso de estas moléculas tiene que evaluarse en función de los costos/beneficios que representa para la planta mantener niveles altos de defensa (Thaler, 1999; Délano-Frier *et al.*, 2004). Además, estas moléculas pueden ejercer efectos positivos sobre las poblaciones de los enemigos naturales (Thaler, 1999).

Similar a los resultados obtenidos en los ensayos con herbivoría, los patrones de inducción en respuesta a AJ, concuerdan con los resultados reportados previamente para jitomate, en donde se induce la actividad de IPs y PPO acompañada de la disminución en la actividad de POD (Thaler *et al.*, 1996). Posiblemente, las respuestas defensivas de *Physalis philadelphica* comparten muchos elementos con otras especies de solanáceas ya que la relación antagonista entre el AS y AJ está documentada en respuestas asociadas a daño mecánico (Doares *et al.*, 1995; Peña-Cortés *et al.*, 1993). También se han encontrado evidencias del efecto antagonista del AS en las respuestas defensivas a patógenos inducidos por AJ en *Arabidopsis* (Walling, 2000; Thaler *et al.*, 2010).

El tratamiento de jitomate con AJ induce varias enzimas oxidativas relacionadas con defensa aumentando la resistencia a plagas. En *Physalis philadelphica*, la aplicación de AJ exógeno, no incrementó los niveles en la actividad de PPO (Figura 5b), lo que potencialmente puede estar relacionado con la edad de la planta, ya que Cipollini y Redman (1999), demostraron que plantas de jitomate de 8 semanas tratadas con AJ, tenían niveles más altos en la actividad de PPO respecto a plantas de 4 semanas.

La disminución en la actividad de POD observados en las plantas tratadas con AJ (Figura 5c), son similares a los resultados reportados por Thaler *et al.* (1996), quienes también encuentran una disminución en la actividad de esta enzima en plantas de jitomate tratadas con AJ. Estos resultados coinciden con el argumento planteado por Farmer *et al.* (1992), quienes discuten que la respuesta de POD ante daño o AJ probablemente no se encuentra regulada de la misma manera que IPs y PPO.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en jitomate, en donde el AS o el ASA inhiben la síntesis de IPs inducida en respuesta a daño (Doherty *et al.*, 1998). El incremento en los niveles de AS en respuesta a la infección por patógenos se encuentra asociada con la expresión sistémica de varias PR y con el establecimiento de un estado de resistencia a futuros ataques por una amplia gama de patógenos (SAR). En los ensayos realizados en los cuales se evaluó el papel del AS respecto a la inducción de IPs, PPO y POD, no se presentan diferencias en la actividad de las enzimas evaluadas (Figura 5d, e y f).

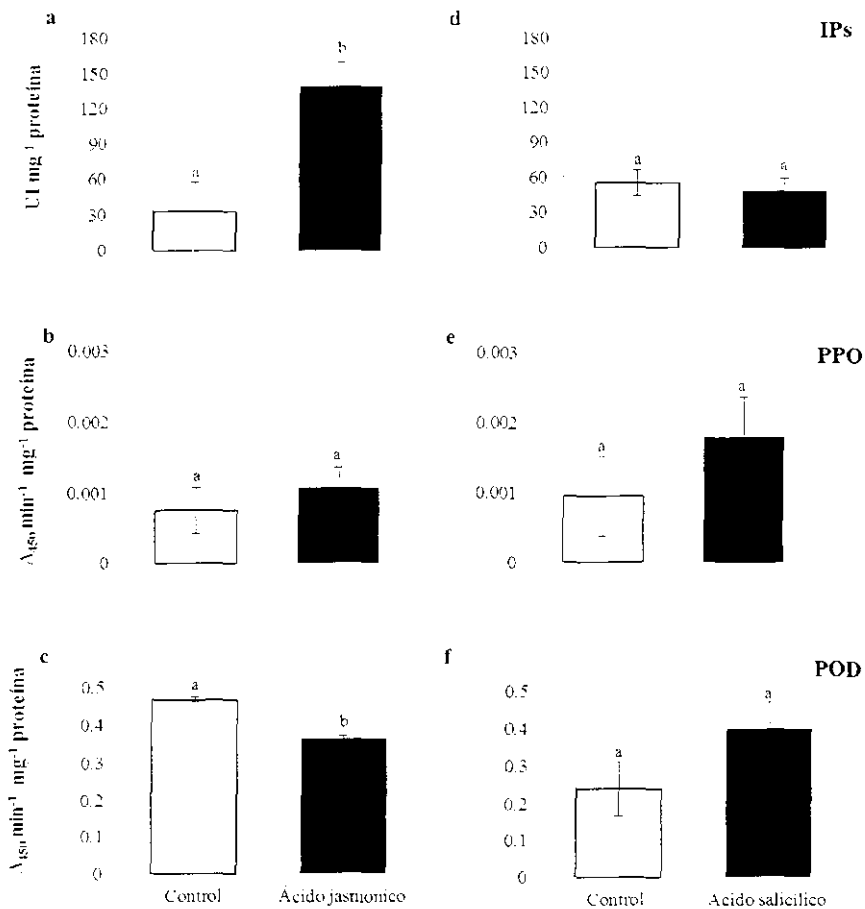


Figura 5. Efecto de moléculas señales sobre la actividad de proteínas relacionadas con defensa. Medición de actividad en extractos proteicos de hojas de *Physalis philadelphica* inducidas con AJ (0.1mM) y AS (0.25mM) colectadas 24h después del tratamiento. Cada barra corresponde a la media \pm ee de $n \geq 8$. Las plantas control corresponden a plantas intactas. La actividad inhibitoria de cada tratamiento se comparó mediante un análisis de varianza de una vía ANOVA ($p < 0.05$) acompañado de una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey-Kramer. Letras diferentes señalan diferencias significativas.

6. CONCLUSIONES

- *Physalis philadelphica* en respuesta a herbivoría por larvas de *Manduca sexta*, indujo los niveles de IPs y PPO.
- *Physalis philadelphica* en respuesta a *Trialeurodes vaporarorium* y tratamientos con AS no indujo la actividad de ninguna de las proteínas evaluadas.
- *Physalis philadelphica* en respuesta a daño mecánico y a tratamientos con AJ únicamente incrementó la actividad de IPs.
- Los tratamientos de herbivoría por *Manduca sexta*, daño mecánico y AJ indujeron la actividad de IPs en niveles similares.

7. LITERATURA CONSULTADA

- Abe, M., Kondo, H., y Atai, S. (1987). Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 2763-2768.
- Alba-Meraz, A., y Choe, H. T. (2002). Systemic effect on oxidative enzymes in *Phaseolus vulgaris* leaves that have been wounded by the grasshopper *Melanoplus differentialis* (Thomas) or have had a foliar application of jasmonic acid. *Sciences* 163: 317-328.
- Alborn, H. T., Turlings, T. C., Jone, T. H., Stenhagen, G., Loughrin, J. H., y Tumlinson, J. H. (1997). An elicitor of plant volatile from beet armyworm oral secretion. *Science* 276: 945-949.
- Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D., y Turner, W. D. (1971). Metabolites of *Lasioidiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society* 1623-1627.
- Álvarez-Alfageme, F., Martínez, M., Pascual-Ruiz, S., Castañera, P., Díaz, I., y Ortego, F. (2007). Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Research* 16: 1-13
- Amiot, M., Tacchini, M., Aubert, S., y Oleszek, W. (1995). Influence of cultivar maturity stage and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning in pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1132-1137.
- Antcheva, N., Pintar, A., Pathy, A., Simoncsits, A., Barta, E., y Tchobanov, B. (2001). Proteins of circularly permuted sequence present within the same organism: the major serine proteinase inhibitor from *Capsicum annuum* seeds. *Science* 10: 2280-2290.
- Araújo, C., Bezerra, I., Oliveira, A., Moura, F., Macedo, L., y Gomes, C. (2005). In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (fruit fly) and *C. maculatus* (Cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4381-4387.
- Ascenzi, P., Ruoppolo, M., Amoresano, A., Pucci, P., Consinni, R., y Zetta, L. (1999). Characterization of low-molecular-mass trypsin isoinhibitors from oil-rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) seed. *European Journal of Biochemistry* 261 (1): 275-284.
- Atkinson, A. H., Heath, R. L., Simpson, R. J., Clarke, A. E., y Anderson, M. A. (1993). Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell* 5: 203-213.
- Bado, S. G., Cerri, M., y Vilella, F. (2005). Fauna insectil asociada a cultivos de dos especies de *Physalis* (Solanaceae) en argentina. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 31: 321-333.
- Baldwin, I., Halitschke, R., Kessler, A., y Schittko, U. (2001). Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 351-358.
- Benedict, J. H., y Chang, J. F. (1991). Bacterially induced changes in the cotton plant-boll weevil paradigm. En D. W. Tallamy, y M. J. Raupp. *Phytochemical induction by herbivores* (págs. 379-401). New York: John Wiley and sons Inc.

- Berger, D. R., Howe, G. A., y Ryan, C. A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12053-12058.
- Bhonwong, A., Stout, M. J., Attajarusit, J., y Tantasawat, P. (2009). Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *Journal of Chemical Ecology* 35: 28-38.
- Bi, J. L., y Felton, G. W. (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites and reactive oxygen species as component of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* 21: 1511-1530.
- Birk, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *International Journal of Peptide and Protein Research* 25: 113-131.
- Birk, Y., Gertler, A., y Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soybean. *Biochemistry* 87: 281-284.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., y Müller, M. J. (1995). The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4099-4105.
- Boss, P. K., Gardner, R. C., Janssen, B., y Ross, G. S. (1995). An apple polyphenol oxidase cDNA es up-regulated in wounded tissues. *Plant Molecular Biology* 27: 429-433.
- Bowles, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 837-907.
- Bowman, D. E. (1964). Differentiation of soybean antitryptic factor. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 63: 547-550.
- Bradshaw, H. D., Hollick, J. J., Parsons, T. J., Clarke, H. R., y Gordon, M. P. (1989). Systemically wound-responsive genes in poplar trees encode proteins similar to sweet potato sporamins and legume kunitz trypsin inhibitors. *Plant Molecular Biology* 14: 51-59.
- Brown, W. E., Takio, K., Titani, K., y Ryan, C. A. (1985). Wound-induced trypsin inhibitors in alfalfa leaves: identify as a member of the bowman-birk inhibitor family. *Biochemistry* 24: 2105-2108.
- Bryant, J., Green, T. R., Gurusaddaiah, S., y Ryan, C. A. (1976). Proteinase inhibitor II from potatoes: isolation and characterization of its promoter components. *Biochemistry* 15: 345-378.
- Cai, M., Gong, Y., Kao, J. L., y Krishnamoorthi, R. (1995). Three-dimensional solution structure of *cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34 (15): 5201-5211.
- Campa, A. (1991). Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. En J. Everse, K. E. Everse, y M. B. Grisham, *Peroxidases III chemistry and biology* (págs. 25-50). Boca Raton: CRC Press.
- Carbonero, P., y García-Olmedo, F. (1999). A multigene family of trypsin/alpha-amylase inhibitors from cereals. En S. P. R., *Seed proteins* (págs. 617-633). The Netherlands: Kluwer Academic.
- Castanera, P., Steffens, J. C., y Tingey, W. M. (1996). Biological performance of Colorado potato beetle larvae on potato genotypes with differing levels of polyphenol oxidase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 91-101.

- Chakraborty, U., y Chakraborty, N. (2005). Impact of environmental factors in infestation of tea leaves by *Helopeltis theivora* and associated changes in flavonoid flavor components and enzyme activities. *Phytoparasitica* 33: 88-96.
- Charity, J. A., Hughes, P., Anderson, M. A., Bittisnich, D. J., Whitecross, M., y Higgins, T. J. (2005). Pest and disease protection conferred by expression of barley B-hordothionin and *Nicotiana glauca* proteinase inhibitor genes in transgenic tobacco. *Functional Plant Biology* 32: 35-44.
- Chittoor, J. M., Leach, J. E., y White, F. F. (1997). Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 10: 861-871.
- Cipollini, D. F., y Redman, A. M. (1999). Age-dependent effects of jasmonic acid treatment and wind exposure on foliar oxidase activity and insect resistance in tomato. *Journal of Chemical Ecology* 25: 271-281.
- Coley, P. D. (1983). Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological monographs* 53: 209-233.
- Conconi, A., Smerdon, M., Howe, G., y Ryan, C. A. (1996). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* 383:826-829.
- Constabel, C. P., Bergery, D. R., y Ryan, C. A. (1996). Polyphenol oxidase as a component of the inducible defense response in tomato against herbivores. En J. T. Romeo, J. A. Saunders, y P. Barbosa, *Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions* (págs. 231-252). Nueva York: Plenum Press.
- Constabel, C. P., y Barbehenn, R. (2008). Defensa roles of polyphenol oxidase in plants. En A. Schaller, *Induced plant resistance to herbivory* (págs. 253-268). Germany: Springer.
- Constabel, C. P., Yip, L., Patton, J. J., y Christopher, M. E. (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* 124: 285-295.
- Constabel, C. P., y Ryan, C. A. (1998). A survey of wound-and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry* 47: 507-511.
- Cordero, M. J., Raventos, D., y San-Segundo, B. (1994). Expression of a maize proteinase inhibitor genes is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant Cell* 6: 141-150.
- Craballona, L. (1967). Presence of levorotatory methyl jasmonate, methyl cis-2-(-2-penten-1-yl)-3-oxocyclopentenyl acetate in the essential oil of Tunesian rosemary. *Les Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences* 264: 2074-2076.
- Creelman, R. A., y Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 92: 4114-4119.

- Creelman, R. A., y Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant Physiology* 48: 355-381.
- Dalton, D. A. (1991). Ascorbate peroxidase. En J. Everse, K. E. Everse, & M. B. Grisham, *Peroxidases in chemistry and biology* (págs. 139-153). Boca Raton: CRC Press.
- De Leo, F., Ceci, L. R., Jouanin, L., y Gallerani, R. (2001). Analysis of mustard trypsin inhibitor-2 gene expression in response to developmental or environmental induction. *Planta* 212: 710-717.
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., y Ceci, R. (2002). Plant PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research* 1: 347-348.
- Déllano-Frier, J., Martínez, N. A., Martínez, O., Salas, M. D., Barbosa, E. R., Torres, A., Vargas, P., y Borodanenko, A. (2004). The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. *Journal of Chemical Ecology* 30: 1001-1034.
- Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W., y Ryan, C. A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 407-411.
- Doherty, H. M., Selvendran, R. R., y Bowles, D. J. (1998). The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 377-384.
- Dongfens, L., Feng, Y., y Jiang, D. (2004). Characterization of polyphenol oxidase from plants. *Progress in Natural Science* 14: 553-561.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-El-Saminoácidos, M., Xu, D., y Wu, R. (1996). Transgenic rice plants harboring and introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14: 494.
- Duffey, S. S., y Felton, G. W. (1991). Enzymatic antinutritive defenses of the tomato plant against insect. En P. Hedin, *Naturally occurring pest bioregulators* (págs. 167-197). Washington: ACS Press.
- Eckelkamp, C., Ehmann, B., y Schopfer, P. (1993). Wound-induced systemic accumulation of a trypsin coding for a Bowman-Birk trypsin inhibitor-related protein in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *FEBS letters* 323: 73-76.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.
- Estrada-Hernández, M. G., Valenzuela, H., Ibarra, E., y Déllano-Frier, J. P. (2009). Differential gene expression in whitefly *Bemisia tabaci*-infested tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at progressing developmental stages of the insect's life cycle. *Physiologia Plantarum* 137: 44-60.
- Farmer, E. E., Johnson, R. R., y Ryan, C. A. (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* 98: 995-1002.
- Felizmenio, Q., Daly, N. L., y Craik, D. J. (2001). Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 22875-22882.

- Felton, G. W., y Duffey, S. S. (1992). Avoidance of antinutritive plant defense: role of midgut pH in Colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology* 18: 571-583.
- Felton, G. W., y Korth, K. L. (2000). Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Plant Biology* 3: 309-314.
- Felton, G. W., Summers, C. B., y Mueller, A. J. (1994). Oxidative response in soybean foliage to herbivory by bean leaf beetle and three-cornered alfalfa hopper. *Journal of Chemical Ecology* 20: 639-650.
- Fidantsef, A. L., Stout, M. J., Thaler, J. S., Duffey, S. S., y Bostock, R. M. (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxigenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 97-114.
- Franco, O. L., dos Santos, R. C., Batista, J. A., Mendes, A. C., y de Araújo, M. A. (2003). Effects of black-eyed pea trypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* 63: 343-349.
- Frazao, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C. M., Verissimo, P., y Faro, C. (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cyanara cardunculus* L. *Biological Chemistry* 274: 27694-27701.
- Friedman, M. (1996). Food Browning and its prevention: an overview. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 1091-1096.
- Friedman, M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8655-8681.
- Friedman, M., y Levin, C. (1995). Alpha-tomatine content in tomato and tomato products determined by HPLC with pulsed amperometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1507-1511.
- Gaddour, K., Vicente-Carbajosa, J., Lara, P., Isabel-Lamonedá, I., Díaz, I., y Carbonero, P. (2001). A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*lcy*) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Molecular Biology* 45: 599-608.
- Gallechi, L., Friggeri, M., Repiccioli, R., y Come, D. (1993). Aspartic proteinase inhibitor from wheat: some properties. En *Proceeding of fourth international workshop seeds: basic and applied of seed biology* (págs. 207-211). Angers, France: Corbinau F.
- Gatehouse, J. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* 156: 145-169.
- Gettins, P. G. (2002). Mechanism of serpin inhibitor. En *Molecular and cellular aspects of the serpinopathies and disorders in serpin activity* (págs. 67-100). Nueva Jersey: Silverman G. A y Lomas D. A.
- Gholizadeh, A., Santha, I. M., Köhnehrouz, B. B., Lodha, M. L., y Kapoor, H. C. (2005). Cystatins may confer viral resistance in plants by inhibition of a virus-induced cell death phenomenon in which cysteine proteinases are active: cloning and molecular characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor (celostatin) from *Celosia cristata* (crested cock's comb). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42: 197-204.

- Gourinath, S., Alam, N., Srinivasan, A., Betzel, C., y Singh, T. (2000). Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and alpha-amylase from ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographic* 56 (3): 287-293.
- Graham, J. S., y Ryan, C. A. (1997). Accumulation of metallocarboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101: 1164-1170.
- Graham, T. L., y Graham, M. Y. (1996). Signalling in soybean phenylpropanoid responses-dessection of primary, secondary and conditioning effects of light, wounding and elicitor treatments. *Plant Cell Physiology* 110: 1123-1133.
- Green, T. R., y Ryan, C. A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves-possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.
- Grunden, K., Strukelj, B., Ravnikar, M., Poljsak-Prijatelj, M., Marvic, I., y Brzin, J. (1997). Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Molecular Biology* 34: 317-323.
- Gustafson, G., y Ryan, C. A. (1976). Specificity of protein turnover in tomato leaves. *Journal of Biological Chemistry* 205: 201-228.
- Gutiérrez-Campos, R., Torres-Acosta, J. A., Saucedo-Arias, L. J., y Gómez-Lim, M. A. (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature* 17: 1223-1226.
- Habib, H., y Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68-85.
- Hamato, N., Koshiha, T., Pham, T. N., Tatsumi, Y., Nakamura, D., y Takano, R. (1995). Trypsin and elastase inhibitors from bitter melon (*Momordica charantia* L.) seeds: purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. *Biochemistry* 117: 432-437.
- Hammond-Kosack, K. E., y Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Harrison, S. J., Curtis, M. D., McIntyre, C. L., Maclean, D. J., y Manners, J. M. (1995). Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Nyctanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 398-406.
- Haruta, M., Major, I. T., Christopher, M. E., Patton, J. J., y Constabel, C. P. (2001). A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Molecular Biology* 46: 347-359.
- Hass, G. M., y Hermodson, M. A. (1981). Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry* 20: 2256-2260.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi. Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology* 13: 125-135.

- Heitz, A., Hernández, J. F., Gagnon, J., Hong, T. T., Pham, T. T., y Nguyen, T. M. (2001). Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCOT1-II. A new family for cyclic knottins. *Biochemistry* 40: 7973-7983.
- Hejgaard, J. (2001). Inhibitory serpins from rye grain with glutamine as P-1 and P-2 residues in the reactive center. *FEBS Letters* 488: 149-153.
- Hejgaard, J., y Hauge, S. (2002). Serpins of oat (*Avena sativa*) grain with distinct reactive centres and inhibitory specificity. *Physiologia Plantarum* 116: 155-163.
- Hejgaard, J., Laing, W. A., Marttila, S., Gleave, A. P., y Roberts, T. H. (2005). Serpins in fruit and vegetative tissues of apple (*Malus domestica*): expression of four serpins with distinct reactive centres and characterisation of a major inhibitory seed form, MdZ1b. *Functional Plant Biology* 32: 517-527.
- Hejgaard, J., Rasmussen, S. K., Brandt, A., y Svendsen, I. (1985). Sequence homology between barley endosperm protein Z and protease inhibitors of the alpha-1-antitrypsin family. *FEBS Letters* 180: 89-94.
- Heng-Moss, T., Sarath, G., Baxendale, F., Novak, D., Bose, S., y Ni, X. H. (2004). Characterization of oxidative enzyme changes in buffalograsses challenged by *Blissus occiduus*. *Journal of Economic Entomology* 97: 1086-1095.
- Herde, O., Atzorn, R., Fisahn, J., Wasternack, C., Willmitzer, L., y Peña-Cortes, H. (1996). Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic. *Plant Physiology* 112:853-860.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., y Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42: 462-468.
- Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., y Honma, M. (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Letters* 471: 245-250.
- Holländer-Czytko, H., Andersen, J. L., y Ryan, C. A. (1985). Vacuolar localization of wound-induced carboxy peptidase inhibitor in potato leaves. *Plant Physiology* 78: 76-79.
- Hollister, B., Dickens, J. C., Pérez, F., y Deahl, K. L. (2001). Differential neurosensory response of adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* to glycoalkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1105-1118.
- Howe, G. A. (2004). Jasmonates as signals in the wound responses. *Plant Growth Regulation* 23: 223-237.
- Howe, G. A., Lightner, J., Browse, J., y Ryan, C. A. (1996). An octadecanoid pathway mutants (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8: 2067-2077.
- Ishikawa, A., Ohta, S., Matsuoka, K., Hattori, T., y Nakamura, K. (1994). A family of potato genes that encode Kunitz type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant cell physiology* 35: 303-312.
- Jiménez, P. M., Ramírez, J. M., Kohashi-Shibata, J., y Mojica, H. B. (1992). Plagas insectiles del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) en Chapingo, México. *Chapingo* 77: 75-79.

- Johnson, R., Narvaez, J., An, G., y Ryan, C. A. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9871-9875.
- Karban, R., y Baldwin, I. T. (1997). Induced resistance against herbivores. En *Induced responses to herbivory* (págs. 104-118). Chicago: University of Chicago Press.
- Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* 21: 829-837.
- Kawano, T., y Muto, S. (2000). Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco suspension culture. *Experimental Botany* 51: 685-693.
- Keilova, H., y Tomasek, V. (1976). Isolation and properties of cathepsin D inhibitor from potatoes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 41: 489-497.
- Kempema, L., Cui, X. P., Holzer, F. M., y Walling, L. (2007). *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology* 143: 849-865.
- Koiwa, H., Bressan, R. A., y Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Science* 2: 379-384.
- Korsinezky, M. L., Schirra, H. J., Rosengern, K., West, J., Condie, B. A., Anderson, M. A., y Craik, D. J. (2001). Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-from sunflower seeds and an acyclic permutant. *Molecular Biology* 311: 579-591.
- Korth, K. L., y Dixon, R. A. (1997). Evidence for Chewing Insect-Specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology* 115: 1299-1305.
- Kowalski, S. P., Eannetta, N. T., Hirzel, A. T., y Steffens, J. C. (1992). Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiology* 100: 677-684.
- Kristensen, B. K., Bloch, H., y Rasmussen, S. K. (1999). Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiology* 120: 501-512.
- la Cour Petersen, M., Hejgaard, J., Thompson, G. A., y Schulz, A. (2005). Cucurbit phloem serpins are grafitraminoacidosismissible and appear to be resistant to turnover in the sieve element-companion cell complex. *Journal of Experimental Botany* 56: 3111-3120.
- Lagrimini, L. M., y Rothstein, S. (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 84: 438-442.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., y Dixon, R. A. (1989). Signals and transduction mechanism for activation of plant defense against microbial attack. *Plant Cell* 56: 215-224.
- Laskowski, M., y Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry* 49: 593-626.
- Law, R., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., y Wong, W. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology* 7 (5): 216.

- Lawrence, P. K., y Koundal, K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Biotechnology* 5: 93-109.
- Ledoigt, G., Griffaut, B., Debito, E., Vian, C., Mustel, A., y Evray, G. (2006). Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *Biological Macromolecules* 38: 268-271.
- Lee, C. F., y Lin, J. Y. (1995). Amino acid sequences of trypsin inhibitors from the melon (*Cucumis melo*). *Biochemistry* 118 (1): 18-22.
- Lee, J. S., Brown, W. E., Graham, J. S., Pearce, G., Fox, E. A., Dreher, T. W. (1986). Molecular characterization and phylogenetic studies of a wound-inducible proteinase inhibitor I gene in *Lycopersicon* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7277-7281.
- Li, L., y Steffens, J. C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., y Whalon, M. E. (2004). The tomato homolog of coronatine-insensitive1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16: 126-143.
- Li, Z., Sommer, A., Dingermann, T., y Noe, C. R. (1996). Molecular cloning and sequences analysis of a cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor from *Sorghum bicolor* seedlings. *Molecular General Genetics* 251: 499-502.
- Lindhorst, H. J., Brederode, F. T., Van der Does, C., y Bol, J. F. (1993). Tobacco proteinase inhibitors are locally, but not systemically, induced by stress. *Plant Molecular Biology* 21: 985-992.
- Lipke, H., Fraenkel, G. S., y Liener, I. E. (1954). Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2: 410-415.
- Macedo, M. L., De sa, C. M., Freire, M. G., y Parra, J. R. (2004). A kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenantha pavonica* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2533-2540.
- Mahoney, W. C., Hermodson, M. A., Jones, B., y Powers, D. D. (1984). Amino acid sequences and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman factor. *Biological Chemistry* 259: 8412-8416.
- Martinez, M., Abraham, Z., Carbonero, P., y Diaz, I. (2005b). Comparative phylogenetic analysis of cystatin gene families from *Arabidopsis*, rice and barley. *Molecular Genetics and Genomics* 273: 423-432.
- Martinez, M., Abraham, Z., Gambardella, M., Echaide, M., Carbonero, P., y Diaz, I. (2005a). The strawberry gene *Cyfl* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany* 56: 1821-1829.
- Mason, H. S., DeWald, D. B., Creelman, R. A., y Mullet, J. E. (1992). Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. *Plant Physiology* 98: 859-867.

- Mattiacci, L., Dicke, M., y Posthumus, M. A. (1995). B-glucosidase: an elicitor of herbivore induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *The proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2036-2040.
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidase in plants and fungi: going places? *Phytochemistry* 67: 2318-2331.
- Mayer, A. M., y Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- Mayer, R., Invar, M., McKenzie, C., Shatters, R., Borowicz, V., y Albrecht, U. (2002). Multitrophic interactions of the Silverleaf whitefly, host plants, competing. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51:151-169.
- McCloud, E. S., y Baldwin, I. T. (1997). Herbivory and caterpillar regurgitants amplify the wound-induced increases in jasmonic acid but not nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 203: 430-435.
- McManus, M. T., White, D. W. R., y McGregor, P. G. (1994). Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pest. *Transgenic Research* 3: 50-58.
- Melo, G. A., Shimizu, M. M., y Mazzafera, P. (2006). Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry* 67: 277-285.
- Mickel, C. E., y Standish, J. (1947). Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. *Experimental station technical bulletin* 178: 1-20.
- Morales, O., Bautista, N., Valdez, J., y Carrillo, J. (2002). Identificación, biología y descripción de *Melanogromyza tomatata* Steyskal, barrenador del tomate *Physalis ixocarpa* Brot. *Acta Zoologica Mexicana* 86: 145-153.
- Morton, R. L., Schroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong, E., y Higgins, T. (2000). Bean α -amylase inhibitor1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *The proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3820-3825.
- Moura, D. S., y Ryan, C. A. (2001). Wound-inducible proteinase inhibitors in pepper. Differential regulation upon wounding, systemin and methyl jasmonate. *Plant Physiology* 126: 289-298.
- Murray, C., y Christeller, J. T. (1995). Purification of a trypsin inhibitor (PFTI) from pumpkin phloem exudate and isolation of putative trypsin and chymotrypsin inhibitor cDNA clones. *Biological Chemistry* 376: 281-287.
- Ni, X., Quisenberry, S. S., Heng-Moss, T., Markwell, J., Sarath, G., Klucas, R. (2001). Oxidative response of resistance and susceptible cereal leaves to symptomatic and nonsymptomatic cereal aphid (Hemiptera: Aphididae) feeding. *Journal of Economic Entomology* 94: 743-751.
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M., y Bowles, D. J. (1996). Ethylene as signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- Odani, S., Koide, T., y Ono, T. (1983). The complete amino acid sequences of barley trypsin inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* 258: 7998-8003.
- Oliveira, A. S., Filho, J. X., y Sales, M. P. (2003). Cysteine proteinases cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (1): 91-104.

- Oliveira, A. S., Migliolo, L., Aquino, R. O., Ribeiro, J. K., Macedo, L. L., y Andrade, L. B. (2007). Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insects pest. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 858-865.
- Orozco-Cardenas, M., Narvaez-Vasquez, J., y Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13:179-191.
- Park, H., Yamanaka, N., Mikkonem, A., Kusakabe, I., y Kobayashi, H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64: 931-999.
- Park, Y., Choi, B. H., Kwak, J. S., Kang, C. W., Lim, H. T., y Chcong, H. S. (2005). Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6491-6496.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., y Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell* 24:255-265.
- Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., y Obinger, C. (2007). Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are these patches of order in chaos? *Gene* 397:101-113.
- Pearce, G., Johnson, S., y Ryan, C. A. (1993). Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase iso-inhibitors of the potato inhibitor II family. *Plant Physiology* 102: 639-644.
- Peña, A. (1992). Caracterización de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Memoria del XIV congreso nacional de fitogenética*, (pág. 511). Tuxtla, Gutierrez, Chiapas, México.
- Peña, L., y Santiaguillo, J. F. (1999). Variabilidad Genética de tomate de cáscara en México. Departamento de Fitotecnia. *Universidad Autónoma de Chapingo* 3: 26-29.
- Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E. W., y Willmitzer, L. (1993). Aspirin prevents wound induced gene-expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191: 123-128.
- Pernas, M., Sánchez-Monge, R., y Salcedo, G. (2000). Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Letters* 467: 206-210.
- Prasad, E. R., Dutta-Gupta, A., y Padmasree, K. (2010). Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pest. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 80-88.
- Puthoff, D. P., Holzer, F. M., Perrin, T. M., y Walling, L. (2010). Tomato pathogenesis-related protein genes are expressed in response to *Traleurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* biotype B feeding. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1271-1285.
- Qi, R. F., Song, Z., y Chi, C. (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochemica et Biophysica* 37 (5): 283-292.

- Quilis, J., Meynard, D., Vila, L., Avilés, F. X., Guiderdoni, E., y San segundo, B. (2007). A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5: 537-553.
- Rancour, J. M., y Ryan, C. A. (1968). Isolation of a carboxypeptidase B inhibitor from potatoes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 299: 205-218.
- Rasmussen, J. B., Smith, J. A., Williams, S., Burkhart, W., Ward, E., y Somerville, S. C. (1995). cDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to disease in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 389-400.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J., y Barret, A. J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acid Research* 36: 320-325.
- Richardson, M. (1979). Chymotryptic inhibitor from potatoes. The amino acid sequence of subunit A. *Biochemistry* 137: 101-112.
- Romeis, T., Piedras, S., Zhang, D. F., Klessig, H. H., y Jones, J. (1999). Rapid Avr9- and cf-9-dependent activation of MAP kinase in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance genes, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell* 11: 273-287.
- Roszkowska-Jakimiec, W., y Bankowska, A. (1998). Cathepsine D inhibitor from *Vicia sativa* L. *Roczniki Akademii Medycznej Białymstoku* 43: 245-249.
- Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defense against insect pathogens. *Annual Reviews Phytopathology* 28: 425-449.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 112-121.
- Ryan, C. A., y Balls, A. K. (1962). An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behavior toward trypsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48: 1839-1844.
- Ryan, S. N., Laing, W. A., y McManus, M. T. (1998). A proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry* 49: 957-963.
- Sánchez, J., Padilla, J. M., Bojorquez, B. A., Arriaga, M. C., Arellano, M. C., y Sandoval, E. (2006). Tomate de cáscara cultivado y silvestre del occidente de México. *SAGARPA, dirección general de vinculación y desarrollo tecnológico y servicio nacional de inspección y certificación de semillas (SNICS)* (pág. 176). Guadalajara, Jalisco, México: Impresión publicitaria prometeo .
- Schroeder, H. E., Gollash, S., Moore, A., Tabe, L. M., Craig, S., y Hardie, D. C. (1995). Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum*). *Plant Physiology* 107: 1233-1239.
- Schweizer, P., Buchala, A., Silverman, P., Seskar, M., Raskin, O., y Metraux, J. P. (1997). Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonate levels. *Plant Cell Physiology* 114: 79-88.
- Sembdner, G., y Parthier, B. (1993). The biochemistry, physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 569-589.

- Shade, R. E., Schroeder, H. E., Pueyo, J. J., Tabe, L. M., Murdock, L. L., y Higgins, T. J. (1994). Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Biotechnology* 12: 793-796.
- Shivraj, B., y Pattabiraman, T. N. (1981). Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual α -amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Gaertn). *Biochemical* 193: 29-36.
- SIAP. (2011). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Recuperado el 4 de junio de 2012, de SAGARPA: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350
- Simons, T. J., y Ross, A. F. (1970). Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. *Phytopathology* 60: 383-384.
- Smith, A. T., y Veitch, N. C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2: 269-278.
- Stepek, G., Curtis, R. H., Kerry, B. R., Shewry, P. R., Clark, S., y Lowe, A. E. (2007). Nematicidal effects of cysteine proteinase against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology* 134: 1831-1838.
- Stout, M. J., y Duffey, S. S. (1996). Characterization of induced resistance in tomato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79: 273-283.
- Stout, M. J., Fidantsef, A. L., Duffey, S. S., y Bostock, R. M. (1998). Plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 115-130.
- Stout, M. J., Workman, J., y Duffey, S. S. (1994). Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. *Chemical Ecology* 20: 2575-2594.
- Stout, M. J., Workman, K. V., Bostock, R. M., y Duffey, S. S. (1998). Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 113: 74-81.
- Su, B., Misico, R., Park, E. J., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., y Fong, H. H. (2002). Isolation and characterization of bioactive principles of the leaf and stems of *Physalis philadelphica*. *Tetrahedron* 58: 3453-3466.
- Tamally, D. W. (1985). Squash beetle feeding behavior: an adaptation against induced cucurbit defense. *Ecology* 66: 1574-1579.
- Tanaka, A. S., Sampaio, M. U., Marangoni, S., De Oliveira, B., Novello, J. C., y Oliva, M. L. (1997). Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. *Biological Chemistry* 378: 273-281.
- Tashiro, M., Hashino, K., Shiozaki, M., Ibuki, F., y Maki, Z. (1987). The complete amino acid sequence of rice bran trypsin inhibitor. *Biochemistry* 102: 297-306.
- Thaler, J. S. (1999). Jasmonate-inducible plant defense cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399: 686-688.
- Thaler, J. S., Agrawal, A. A., y Halitschke, R. (2010). Salicylate-mediated interactions between pathogens and herbivores. *Ecology* 91: 1075-1082.
- Thaler, J. S., Farag, M. A., Paré, P. W., y Dicke, M. (2002b). Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defenses against herbivores. *Ecology Letters* 5: 764-774.

- Thaler, J. S., Fidantsef, A. L., y Bostock, R. M. (2002a). Antagonism between jasmonate and salicylate mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Chemical Ecology* 28: 1131-1159.
- Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R., y Duffer, S. S. (1996). Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. *Chemical Ecology* 22: 1767-1781.
- Thipyapong, P., Joel, D. M., y Steffens, J. C. (1997). Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiology* 113: 707-718.
- Thipyapong, P., Mahanil, S., Bhonwong, A., Attajarusit, J., Stout, M. J., y Steffens, J. C. (2006). Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. *Acta Horticulturae* 724- 29-38.
- Thipyapong, P., y Steffens, J. C. (1997). Tomato polyphenol oxidase. Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology* 115: 409-418.
- Trexler, M., Banyai, L., y Patthy, L. (2001). A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3705-3709.
- Tscharntke, T., Thiessen, S., Dolch, R., y Boland, W. (2001). Herbivory, induced resistance and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 1025-1047.
- Tur Sinal, A., Birk, Y., Gertler, A., y Rigbi, M. (1972). A basic trypsin and chymotrypsin inhibitor from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Biochimica et Biophysica Acta* 263: 666-672.
- Turk, V., y Bode, W. (1991). The cysteins: protein inhibitors of cysteine proteinase. *FEBS Letters* 285: 213-219.
- Turlings, T. C., Oughrin, J. H., McCall, P. J., Rose, U. S., Lewis, W. J., y Tumlinson, J. H. (1995). How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4169-4174.
- Valueva, T. A., y Mosolov, V. V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganism. *Biochemistry* 69: 1305-1309.
- van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., y Conejere, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245-264.
- Vera, P., Tomero, P., y Conejero, V. (1993). Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidases from tomato plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* 6: 790-794.
- Vick, B. A., y Zimmerman, D. C. (1987). Oxidative systems for the modification if fatty acids. En P. K. Stumpf, & E. E. Conn, *The biochemistry of plants* (págs. 9: 53-90). Nueva York: Academic press.
- Vishnudasán, D., Tripathi, M. N., Rao, U., y Khurana, P. (2005). Assessment of nematode resistance in wheat transgenic plants expressing potato proteinase inhibitor (PIN2) gene. *Transgenic Research* 14: 665-675.