

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

ACUMULACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEINASAS EN  
CEBADA INFESTADA POR ÁFIDOS

JOSÉ ANTONIO CASARETTO VARGAS

1996



UCH-FC  
MAG-B  
C335a  
C.1

**ACUMULACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEINASAS EN  
CEBADA INFESTADA POR ÁFIDOS**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar el grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica

Facultad de Ciencias

por

**JOSE ANTONIO CASARETTO VARGAS**

Mayo, 1996

01-0195492

Director de Tesis: Dr. Luis Corcuera Pérez

**A mi esposa**

**A mis padres**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

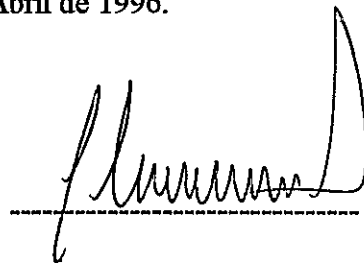
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por el candidato:

JOSÉ ANTONIO CASARETTO VARGAS

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el Día 26 de Abril de 1996.

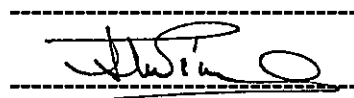
Director de Tesis:

Dr. Luis Corcuera P.



Comisión de Evaluación de la Tesis:

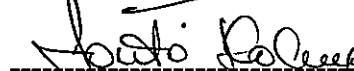
Dra. Liliana Cardemil (Presidente)



Dra. Luz María Pérez



Dra. Miren Alberdi



Dra. Loreto Holuige



## Agradecimientos

Al Dr. Luis Corcuera, quien me hizo sentir en casa, me brindó su ayuda y apoyo durante todos mis estudios e hizo crecer en mí un interés por diversos temas en Botánica

A los académicos de Botánica, en especial a la Dra. Liliana Cardemil y a Víctor Hugo Argandoña, quienes compartieron conmigo sus conocimientos útiles en mi formación.

A la comisión calificadora de tesis, por todas las sugerencias aportadas desde el inicio de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología Vegetal, con quienes compartí momentos de estudio y alegrías. En especial a León Bravo, Gustavo Zúñiga, Juan Velozo, Marino Cabrera y Danny Acevedo, quienes me ayudaron durante toda mi estadía no sólo en la realización de esta tesis, sino además en el trabajo en el laboratorio.

A todas las personas que de alguna u otra forma brindaron su ayuda y facilitaron a que esta tesis haya resultado exitosa.

A las instituciones que me apoyaron en la realización de mis estudios en la Universidad de Chile y de la presente tesis: la Red Latinoamericana de Botánica (Beca de Magister M6-93 y Beca de Tesis 94-SP2), el Departamento de Postgrado y Postítulo,

Vicerrectoría Académica y Estudiantil de la Universidad de Chile (Beca de Tesis PG-087-94) y Fondecyt (Proyectos 1147-92 y 1950302).

## Índice

|  |      |
|--|------|
| Título .....   | i    |
| Dedicatoria .....  | ii   |
| Agradecimientos .....  | iii  |
| Índice .....   | v    |
| Lista de tablas .....  | viii |
| Lista de figuras .....                                       | ix   |
| Abreviaturas .....   | xi   |
| RESUMEN .....  | 1    |
| ABSTRACT .....   | 4    |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 6    |
| 1.1. Respuestas de defensa de la planta y de la cebada ..... | 6    |
| 1.2. Los inhibidores de proteinasas (IPs) .....              | 7    |
| 1.2.1. Propiedades generales .....                           | 8    |
| 1.2.2. Distribución y papel fisiológico .....                | 9    |
| 1.2.3. Inhibidores de proteinasas presentes en plantas ..... | 10   |
| 1.2.4. Inhibidores de proteinasas en cebada .....            | 11   |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.2.5. Regulación de la inducción de inhibidores de proteinasas en la defensa de la planta ..... | 13        |
| 1.2.6. Los inhibidores de proteinasas en la defensa de las plantas contra insectos .....         | 17        |
| Hipótesis .....  | 19        |
| Objetivo general .....   | 19        |
| Objetivos específicos .....  | 20        |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>21</b> |
| 2.1. Material Vegetal .....  | 21        |
| 2.2. Infestación con áfidos .....  | 21        |
| 2.3. Tasa de crecimiento poblacional de los áfidos .....   | 22        |
| 2.4. Tratamientos con daño mecánico .....  | 22        |
| 2.5. Tratamientos con ácido jasmónico (JA) .....   | 22        |
| 2.6. Tratamientos con ácido abscísico (ABA) .....  | 23        |
| 2.7. Tratamientos con ácido cloro etil-fosfórico .....   | 23        |
| 2.8. Contenido de clorofila .....  | 23        |
| 2.9. Contenido de proteínas solubles .....   | 24        |
| 2.10. Contenido de ácido abscísico (ABA).....  | 24        |
| 2.11. Actividad de inhibidores de proteinasas .....  | 24        |
| 2.12. Cromatografía de exclusión molecular .....   | 26        |
| 2.13. Dietas artificiales .....  | 27        |
| <b>3. RESULTADOS .....</b>   | <b>28</b> |



|  |    |
|--|----|
| 3.1. Susceptibilidad de los cultivares de cebada a la infestación por áfidos ..... | 28 |
| 3.2. Actividad de IPs en plantas sanas .....                                       | 30 |
| 3.3. Actividad de IPs en plantas de cebada infestada con áfidos .....              | 30 |
| 3.4. Actividad de IPs en plantas de cebada con dañomecánico .....                  | 37 |
| 3.5. Acumulación sistémica de la actividad de IPs en cebada .....                  | 40 |
| 3.6. Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la actividad de los IPs .....          | 42 |
| 3.7. Efecto del ácido jasmónico (JA) sobre la actividad de los IPs .....           | 46 |
| 3.8. Tratamientos con ácido cloro etil-fosfórico .....                             | 46 |
| 3.9. Separación de los IPs por cromatografía líquida .....                         | 46 |
| 3.10. Dietas artificiales .....  | 55 |
| 4. DISCUSIÓN .....   | 59 |
| 5. CONCLUSIONES .....  | 69 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA .....  | 72 |

## Lista de Tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Susceptibilidad de algunos cultivares de cebada al áfido <i>S. graminum</i> .....   | 29 |
| Tabla 2. Efecto del ABA sobre la actividad de inhibidores de quimotripsina y su relación<br>con el contenido de ABA endógeno en hojas de cebada cv. Frontera ..... | 44 |
| Tabla 3. Pérdida de actividad de los inhibidores de proteinasas por desnaturalización<br>con distintos tratamientos .....  | 52 |

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Actividad inhibitoria de quimotripsina y tripsina en hojas sanas de cebada de distinta edad .....  | 31 |
| Figura 2. Actividad inhibitoria de quimotripsina y tripsina en hojas de plantas de cebada infestadas con <i>S. graminum</i> .....  | 33 |
| Figura 3. Actividad inhibitoria de quimotripsina en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera infestadas con <i>S. graminum</i> .....                             | 35 |
| Figura 4. Actividad inhibitoria de tripsina en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera infestadas con <i>S. graminum</i> .....                                  | 36 |
| Figura 5. Actividad inhibitoria de quimotripsina y tripsina en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera infestadas con <i>S. graminum</i> y <i>R. padi</i> ..... | 38 |
| Figura 6. Actividad inhibitoria de quimotripsina y tripsina en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera con daño mecánico .....                                  | 39 |
| Figura 7. Acumulación sistémica de inhibidores de quimotripsina y tripsina en plantas de cebada cv. Frontera de once días de edad .....                                  | 41 |
| Figura 8. Acumulación sistémica de inhibidores de quimotripsina y tripsina en la primera hoja de plantas de cebada cv. Frontera de siete días de edad .....              | 43 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 9. Actividad de inhibidores de quimotripsina y de tripsina en cebada tratada con ABA exógeno .....   | 45 |
| Figura 10. Actividad de inhibidores de quimotripsina y de tripsina en cebada tratada con ácido jasmónico (JA) .....   | 47 |
| Figura 11. Acumulación sistémica de inhibidores de tripsina por ácido jasmónico (JA).   | 48 |
| Figura 12. Tratamientos con ácido cloro etil-fosfórico .....  | 49 |
| Figura 13. Actividades inhibitorias de quimotripsina y tripsina de extractos de hojas de cebada cv. Frontera infestada con <i>S. graminum</i> y determinadas después de una filtración en Sephadex G-15 ..... | 51 |
| Figura 14. Cromatografía en Sephadex G-75 de inhibidores de proteinasas de hojas de cebada cv. Aramir sanas e infestadas con <i>S. graminum</i> .....   | 53 |
| Figura 15. Cromatografía en Sephadex G-75 de inhibidores de proteinasas de hojas de cebada cv. Frontera sanas e infestadas con <i>S. graminum</i> .....   | 54 |
| Figura 16. Efecto de proteínas de extractos de cebada sobre la sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales .....   | 56 |
| Figura 17. Efecto de IPs de cebada sobre la sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales .....  | 58 |

## Abreviaturas

|       |  |
|-------|--|
| ABA   | Ácido abscísico                          |
| BSA   | Albúmina de suero de bovino              |
| cv.   | Cultivar                                 |
| HPLC  | Cromatografía líquida de alta resolución |
| IN-QT | Inhibidor de quimotripsina               |
| IN-T  | Inhibidor de tripsina                    |
| IPs   | Inhibidores de proteinasas               |
| JA    | Ácido jasmónico                          |

## RESUMEN

Entre las proteínas relacionadas con la defensa de las plantas contra insectos y microorganismos, los inhibidores de proteinasas (IPs) son considerados un grupo importante. La cebada contiene inhibidores de serín-proteasas principalmente en la semilla, aunque también están presentes en los tejidos vegetativos en un nivel basal.

Se estudió la capacidad de estos IPs (inhibidores de quimotripsina y tripsina) de ser acumulados por la planta luego de ataque de áfidos, daño mecánico, o factores químicos como ácido abscísico, ácido jasmónico y etileno. De los cuatro cultivares estudiados, el cultivar Frontera mostró ser el más resistente al ataque de áfidos, mientras que el cultivar Aramir fue uno de los más susceptibles. Se encontró que los niveles basales de los IPs en las hojas son constantes en las primeras dos semanas de edad de la planta y no variaron significativamente entre los cultivares estudiados. La infestación con el áfido *Schizaphis graminum* no produjo incrementos significativos de actividad inhibidora de tripsina. Sin embargo, se duplicó la actividad inhibidora de quimotripsina en el cultivar Frontera al ser infestado con más de 40 áfidos por planta; mientras que en Aramir sólo se encontró un 38% más que en plantas control. El incremento máximo de esta actividad se registró entre las 48 y 72 horas de infestación, dependiendo del número de áfidos. Tanto los niveles basales como la acumulación de IPs mostraron una

correlación con la susceptibilidad de los cultivares a la infestación por áfidos. Al infestar ambos cultivares con el áfido *Rhopalosiphum padi*, se alcanzaron niveles siempre menores a los encontrados en infestaciones con *S. graminum*. Esto se debió quizás a la distinta conducta de alimentación de estos áfidos y al distinto daño que causan en las hojas. En experimentos con daño mecánico no se produjeron incrementos significativos de IPs. Los niveles siempre fueron menores a los encontrados en las infestaciones. No se pudo comprobar la acumulación sistémica de IPs en hojas sanas de una planta infestada o dañada. Además de aumentar la actividad de IPs en zonas infestadas, también se detectó incremento en zonas libre de infestación en una hoja infestada.

En plantas infestadas se acumuló siete veces más ácido abscísico (ABA) que en plantas control. Aunque se encontraron niveles altos de ABA endógeno en plantas tratadas con ABA exógeno y plantas sometidas a estrés hídrico, ABA sólo causó incrementos de actividad inhibidora de quimotripsina en un 40%, lo que no ocurrió en plantas sometidas a estrés hídrico. En tratamientos con ácido jasmónico (JA), se incrementó la actividad inhibidora de tripsina (51% sobre el control) y no de quimotripsina. El efecto de JA también tuvo una respuesta sistémica. Estas respuestas diferenciales indicarían que dos mecanismos de regulación estarían operando en la inducción de los IPs en cebada. Tal como se ha descrito en la literatura, etileno no tiene efecto sobre la acumulación de IPs, lo cual fue corroborado en los cultivares de cebada.

La separación de las actividades de los IPs de cebada por cromatografía de exclusión molecular, reveló dos picos de actividad de inhibidores de quimotripsina y uno de inhibidor de tripsina. Las masas moleculares estimadas para estas proteínas fueron de 8

y 19 KDa y de 13 KDa, respectivamente, similares a las masas de los IPs presentes en semillas de cebada. Los IPs no afectaron la sobrevivencia de *S. graminum* en dietas artificiales, pero sí la de *R. padi*.



## ABSTRACT

Proteinase inhibitors (PIs) are considered to be an important group among proteins involved in defense of plants against insects and microorganisms. Barley contains inhibitors of serin-proteinases specially in seeds, although a basal level can be found in vegetative tissues.

This study focused on the ability of chymotrypsin and trypsin inhibitors to be accumulated in barley after aphid attack, mechanical wounding, or chemical factors such as abscisic acid, jasmonic acid and ethylene. Out of four cultivars, cv. Frontera showed to be the most resistant to aphid attack, and cv. Aramir one of the most susceptible. Basal levels of PIs were found to be almost constant during the first two weeks of age and did not varied among cultivars. Infestation with the aphid *Schizaphis graminum* did not produce any significant increase of inhibitory activity towards trypsin. Inhibitory activity against chymotrypsin was doubled in cv. Frontera when infested with 40 or more aphids per plant, meanwhile cv. Aramir reached only a 38% of increase over controls. The maximum increase of this activity was observed at 48 to 72 hours of infestation and depended on aphid density. Both, basal PI levels and PI accumulation, showed a correlation with barley susceptibility to aphid infestation. When plants were infested with the aphid *Rhopalosiphum padi*, PI levels were always lower than those observed in

infestations with *S. graminum*. In mechanical wounding experiments, no significant increments in PI levels could be induced, being always lower than in infestations. No systemic accumulation of PIs could be proved in healthy leaves of an infested or damaged plant. Besides the increase of PI activity found in infested zones, it was also detected in a non infested zone of an infested leaf.

Abscisic acid (ABA) accumulated seven times more in infested plants than in controls. Eventhough high endogenous ABA levels was detected in ABA treated plants or in water stressed plants, ABA could only cause an increment of 40% of inhibitory activity of chymotrypsin, and no increment was found in plants under water stress. Inhibitory activity of trypsin, but not chymotrypsin, was increased (51% over controls) by jasmonic acid (JA) treatments. This effect of JA had also a systemic response. These two different responses suggest that two mechanisms would be operating in the PI induction in barley. As reported in the literature, ethylene has no effect on PI accumulation. This also occurred in barley cultivars.

Separation of PI activities in barley leaves by gel filtration chromatography revealed two peaks of activity against chymotrypsin and one peak against trypsin. The molecular weights estimated for these proteins were about 8 and 19 kDa and 13 KDa, respectively. These values are similar to those mass weights calculated for PIs in barley seeds. PIs had no effect, compared to that of BSA, on survival of the aphid *S. graminum* reared on artificial diets, but affected survival of *R. padi*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Respuestas de defensa de las plantas y de la cebada

Bajo distintas condiciones de estrés, las plantas responden con cambios en la expresión de genes. Varios son los genes involucrados en forma directa o indirecta en la protección de las plantas a daños bióticos o abióticos. Existen genes relacionados con la protección morfológica y la reparación de la planta, como los que codifican para proteínas ricas en prolina o en glicina, peroxidasa, enzimas de la síntesis de componentes de pared, etc. (Bowles, 1990). Otro grupo de genes lo constituyen aquellos que actuarían en el reconocimiento de patógenos (Staskawicz y col., 1995). Un tercer grupo son los llamados genes de defensa, relacionados con una actividad deterrente o antimicrobiana, como los que codifican para hidrolasas, tioninas, proteínas de la biosíntesis de fitoalexinas, proteínas de la vía fenilpropanoide, proteínas relacionadas con patogénesis (PRPs) como quitinasas y glucanasas, y los inhibidores de proteinasas (Bowles, 1990; Lamb, 1989).

La inducción de los inhibidores de proteinasas ha sido descrita cuando las plantas sufren el ataque de insectos herbívoros (Green y Ryan, 1972), hongos (Peng y Black, 1976; Rickauer y col., 1992), virus (Jongsma y col., 1994), o simplemente daño mecánico

(Graham y col., 1986). En algunos casos, la inducción por heridas de estas proteínas ocurre tanto en la zona de daño como en el resto de la planta (Peña-Cortés y col., 1988).

La cebada, como la mayoría de los cereales, presenta características morfológicas de defensa, como son las ceras y la pectina en la superficie foliar (Corcuera, 1993). Además, existen factores bioquímicos que estarían relacionados con la resistencia de la cebada al ataque de insectos y patógenos. Estos incluyen metabolitos secundarios como el alcaloide gramina (Zúñiga y Corcuera, 1986) y compuestos fenólicos (Dreyer y Jones, 1981). La cebada también presenta normalmente polipéptidos que han sido involucrados en sistemas de defensa, entre ellos las tioninas y los inhibidores de proteinasas (Kumari y Chandrashekar, 1992). Las tioninas son polipéptidos de bajo peso molecular con actividad antifúngica (Bohlmann y Apel, 1991). Los inhibidores de proteinasas se describirán en el próximo párrafo.

## **1.2. Los inhibidores de proteinasas (IPs)**

Los inhibidores de proteinasas (IPs) son proteínas que inhiben enzimas proteolíticas, inhibiendo a las proteinasas en una forma competitiva. Los IPs se encuentran frecuentemente en muchos órganos y tejidos de plantas, animales y microorganismos. Los IPs han sido estudiados por varias razones: como inhibidores de enzimas digestivas de animales encontrados en cultivos agrícolas, como una herramienta para entender el mecanismo de las interacciones proteína-proteína, y en el campo médico, como posibles agentes terapéuticos. En las últimas décadas, han aparecido nuevas e

interesantes áreas de estudio sobre los IPs: las posibles funciones en el metabolismo de las plantas y como contribuyentes a la defensa de las plantas contra el ataque de insectos y patógenos.

La información general sobre los IPs ha sido revisada varias veces (Bode y Huber, 1992; Casaretto y Corcuera, 1995; Laskowski y Kato, 1980; Richardson, 1977; Ryan, 1973, 1981, 1990). En los últimos años, la literatura se ha dedicado a la caracterización de los IPs de plantas y a su expresión génica (Ryan, 1990, 1992).

### **1.2.1. Propiedades generales**

Los IPs de plantas son polipéptidos o proteínas típicas. Al contrario de aquellos que se encuentran en animales (Laskowski y Kato, 1980), los IPs de plantas normalmente no se presentan como glicoproteínas. Los tamaños moleculares de los IPs de plantas varían entre 4.000 y 80.000 Da, aunque la mayoría de ellos son de 8.000 a 20.000 Da.

Los IPs poseen un sitio de reacción el cual se une a los residuos del sitio catalítico de la proteinasa de una manera similar a como se unen los substratos. Muchos IPs tienen sus sitios activos como una 'horquilla' de unión expuesta, la cual se encuentra estabilizada por interacciones entre los residuos que bordean al sitio activo, a través de varios puentes de hidrógeno y generalmente por puentes disulfuro en el centro hidrofóbico del inhibidor (Bode y Huber, 1992). Los IPs de plantas son moléculas estables y frecuentemente resistentes al calor, a extremos de pH y a proteólisis por proteasas, aún por aquellas que no inhiben (Ryan, 1981). Su estabilidad ha sido atribuida

en parte a la alta proporción de residuos de cisteína presentes como uniones disulfuro, y a interacciones no covalentes (Laskowski y Kato, 1980; Ryan, 1981). También es usual encontrar duplicación génica, lo que origina inhibidores con dos mitades similares, cada una con un sitio activo, es decir, un 'inhibidor doble' capaz de inhibir dos moléculas de enzima al mismo tiempo (Ryan, 1981).

### 1.2.2. Distribución y papel fisiológico

Aunque los IPs de plantas están distribuidos en todo el reino vegetal, son especialmente abundantes en tejidos que son importantes fuentes de alimento, como las semillas de las leguminosas, tubérculos de papa y en granos de cereales.

La localización celular de muchos de los IPs de plantas es aún incierta. Algunos de ellos son parte de los cuerpos proteicos de origen vacuolar (e.g. inhibidor I en Solanáceas) (Walker-Simmons y Ryan, 1977). Algunos inhibidores de tripsina están asociados con cuerpos proteicos de semillas de leguminosas, aunque no se ha descartado que ellos puedan provenir del citoplasma (Richardson, 1977). IPs también han sido encontrados en cotiledones de soja (Ryan, 1973) y en endospermas y embriones de cereales (Boisen y Djurtoft, 1982).

Se ha sugerido que los IPs cumplen una función importante en la regulación de proteinasas endógenas (Ryan, 1973). Aunque los IPs de algunas semillas no han mostrado inhibición de proteinasas endógenas, existen algunas evidencias en semillas de

lechuga y cebada donde ellos sí inhiben estas endoproteinasas (Kirsi y Mikola, 1971; Ryan, 1973).

Debido a que los IPs están presentes en grandes cantidades en tubérculos y semillas, ellos también pueden ser considerados proteínas de reserva. En granos de cebada y tubérculos de papa, los IPs representan hasta un 10% del total de las proteínas (Kirsi y Mikola, 1971; Ryan, 1973). Esta función de reserva también puede ser válida en otros tejidos de la planta como las hojas, tallos, raíces, flores y brotes.

Más compleja es la función que cumplen contra el ataque de insectos y microorganismos. Parece ser que aquellos IPs que se encuentran como proteínas de reserva, estarían también involucrados en la protección de la planta. Este papel será discutido más adelante.

### **1.2.3. Inhibidores de proteinasas presentes en plantas**

Las endopeptidasas o proteinasas cortan enlaces peptídicos internos, y están clasificados en cuatro clases dependiendo de la naturaleza de su sitio activo: serín-proteinasa (tripsina, quimotripsina, trombina, plasmina y elastasa), cisteín o sulfidril-proteinasa (papaína, bromeláina, ficina y cistatinas), proteinasas-aspártico ácidas (pepsina, renina y catepsina E) y metalo-proteinasa (carboxipeptidasas A y B, aminopeptidasas y catepsina D) (Richardson, 1977; Ryan, 1990). Las plantas tienen inhibidores para serín-proteinasa, sulfidril-proteinasa y proteinasa ácida. Aunque no se ha informado la existencia de inhibidores de aminopeptidasas en plantas ni animales,

éstas han sido encontradas en microorganismos (Richardson, 1977). Los IPs de plantas inhiben proteinasas de origen animal, bacteriano y fúngico y ocasionalmente inhiben proteinasas vegetales (Ryan, 1973).

La clase a la cual un inhibidor pertenece, está determinado por su capacidad de inhibir proteinasas específicas y por su similitud con otros inhibidores que están bien caracterizados. Se han sugerido por lo menos diez familias de inhibidores de proteinasas en plantas (García-Olmedo y col., 1987; Laskowski y Kato, 1980; Ryan 1973, 1990).

Comparaciones de la secuencia de aminoácidos de los IPs no sólo han provisto de información sobre características estructurales y funcionales, sino que también han elucidado aspectos sobre la evolución de los IPs en plantas. Los investigadores que han estudiado la familia de inhibidores Bowman-Birk, concuerdan que estos inhibidores dobles de las legumbres provienen de un gen ancestral común (Laskowski y Kato, 1980; Odani e Ikenaka, 1977). La aparición de IPs con similares características en otras familias de inhibidores también puede explicarse por un origen evolutivo común.

#### **1.2.4. Inhibidores de proteinasas en cebada**

Los IPs en cereales también suelen presentarse como inhibidores dobles y además comparten varias similitudes estructurales con otras familias, como el inhibidor I de papa y los inhibidores tipo Bowman-Birk (Svendson y col., 1982). Otro ejemplo lo constituyen los inhibidores bifuncionales de proteasa y  $\alpha$ -amilasa presentes en granos de cereales. Algunos de ellos pueden ser considerados dentro de la familia de los inhibidores Kunitz y



otros en la familia del inhibidor de tripsina de cebada. Un estudio profundo sobre este grupo de inhibidores bifuncionales en cereales ha sido publicado por Carbonero y col. (1994) y García-Olmedo y col. (1987, 1992). En una revisión hecha por Boisen (1983), se compara la existencia de IPs en semillas de cebada y otros cereales que han sido caracterizados previamente.

Las semillas de cebada contienen tres tipos de IPs: unos que inhiben tripsina, otros que inhiben quimotripsina y proteasas microbianas, y otros que inhiben proteasas endógenas (Boisen y col., 1981; Kirsi, 1973). Kirsi y Mikola han determinado que un inhibidor de tripsina abunda en el embrión (Kirsi, 1974); inhibidores de quimotripsina están presentes en el embrión, hojas jóvenes, raíces, pero son especialmente abundantes en el endosperma. Además un inhibidor de proteasa de *Aspergillus* también está presente en el endosperma y en hojas, y que algunos inhibidores de proteasas endógenas están presentes también en el embrión (Kirsi y Mikola, 1971). Durante la germinación, la actividad de éstos últimos decae y, sólo la actividad contra tripsina y quimotripsina pueden detectarse en niveles basales (Kirsi y Mikola, 1971; Kirsi, 1974). Los autores también establecieron que la actividad del inhibidor contra tripsina en hojas jóvenes correspondería al mismo inhibidor de tripsina encontrado en el embrión. En cambio, la actividad contra quimotripsina encontrada en el endosperma, correspondería a inhibidores distintos de los que aparecen en tejidos vegetativos (Kirsi y Mikola, 1977).

### 1.2.5. Regulación de la inducción de inhibidores de proteinasas en la defensa de la planta

Los IPs son inducibles por ataque de insectos, microorganismos o por daño mecánico. Como también se mencionó, su acumulación ocurre en toda la planta. Para explicar la inducción sistémica de los IPs, se ha propuesto la existencia de una señal, la cual llevaría la información desde los tejidos dañados hacia el resto de la planta, donde también ocurre la expresión de los IPs. En este proceso, han sido involucrados inductores químicos, procesos físicos y algunas hormonas vegetales, como el ácido abscísico y el ácido jasmónico (Ryan, 1992). La identidad del llamado factor inductor de inhibidores de proteinasas (PIIF, por sus siglas en inglés), ha sido objeto de amplia discusión. Durante años, algunos compuestos han sido descartados por no comportarse como buenas señales móviles (Baydoun y Fry, 1985; Ryan, 1992), mientras que otros, como la sistemina, han probado lo contrario (McGurl y col., 1992; Pearce y col., 1991). La sistemina, un polipéptido de 18 aminoácidos, está bien caracterizada en solanáceas y se ha sugerido que participaría en la vía de transducción de señales propuesta por Farmer y Ryan (1992). Experimentos recientes con tomate transgénico han apoyado el papel de la sistemina en la resistencia contra insectos (Orozco-Cárdenas y col., 1993). Un tomate transgénico que sobreexpresa constitutivamente el gen de la prosistemina, produjo inhibidores I y II por activación de sus rutas biosintéticas (Constabel y col., 1995; McGurl y col., 1994). Otros estudios sobre la traslocación de la sistemina, también han ayudado a demostrar su participación en la señal sistémica (Narváez-Vásquez y col., 1995; Narváez-Vásquez y

col., 1994). Curiosamente, se halló que la bestatina, un inhibidor de aminopeptidasas presente en hongos, desencadena la inducción de los inhibidores I y II en tomate (con la misma magnitud que la sistemina), pero actuando directamente sobre la expresión génica (Schaller y col., 1995).

De acuerdo con lo descrito en experimentos con heridas (Graham y col., 1986; Peña-Cortés y col., 1988), la inducción sistémica de los IPs debe involucrar un transporte rápido de la señal. Se ha sugerido que el transporte sería por el floema (Peña-Cortés y col., 1988), pero algunos autores han descrito que probablemente también estarían involucradas señales eléctricas (Peña-Cortés y col., 1995; Wildon y col., 1992) y mecanismos hidráulicos (Alarcón y Malone, 1994; Boari y Malone, 1993; Malone 1992), los que han sido demostrados en varias especies (Boari y Malone, 1993).

ABA, ácido salicílico, auxinas, etileno y JA han sido probados por varios investigadores. Aunque algunos experimentos con auxinas, sugirieron que habría inducción del gen del inhibidor II de papa (Kernan y Thornburg, 1989; Taylor y col., 1993), la participación de las auxinas está ampliamente rechazada (Sanchez-Serrano y col., 1991; Thornburg y Li, 1990). Sólo ABA y JA han mostrado regular positivamente los IPs. ABA induce al inhibidor II en papa y en plantas de papa y tomate mutantes que no producen ABA, en niveles similares que con daño mecánico (Hildmann y col., 1992, Peña-Cortés y col., 1989).

JA es conocido como un modulador de distintas condiciones de estrés (Parthier, 1990; Staswick, 1992; Sambder y Parthier, 1993; Reinbothe y col., 1994; Creelman y

Mullet, 1995) y como inductor de las llamadas proteínas inducidas por jasmonatos (JIPs, por sus siglas en inglés) en varias especies vegetales (Reinbothe y col., 1994). Un grupo de estas proteínas están relacionadas con la defensa de la planta, como los IPs. JA al igual que su éster de metilo inducen IPs en solanáceas (Farmer y col., 1992). Más aún, el jasmonato de metilo puede actuar como una señal volátil, provocando la acumulación de IPs en plantas cercanas (Farmer y Ryan, 1990). Se ha descubierto que las tioninas, polipéptidos antifúngicos, se inducen por JA (Andresen y col., 1992) y también algunas proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs, por sus siglas en inglés), las cuales estarían involucradas en resistencia a patógenos, en un mecanismo similar a la respuesta de hipersensibilidad (Reinbothe y col., 1994). En soja, JA también incrementa los niveles de mRNA de otros genes que responden a heridas, como los de la chalcona sintetasa y una proteína de pared rica en prolina (Creelman y col., 1992).

Para entender la regulación de la inducción de IPs, se ha propuesto que las señales localizadas o sistémicas sensadas por la planta, activarían la vía octadecanoide. En esta ruta metabólica se acciona la enzima lipoxigenasa, terminando en la síntesis del JA en las células, el cual a su vez, sería responsable de la expresión de los genes de IPs (Ryan, 1992; Peña-Cortés y col., 1995). Se ha demostrado que fragmentos de pared de la planta (oligogalacturónidos) y de hongos que atacan la planta, también activarían una señal en membranas celulares a través de esta ruta (Doares y col., 1995b). Ultimamente, se ha mostrado que la sistemina causa incremento de ABA y estos dos incrementan los niveles endógenos de JA (Peña-Cortés y col., 1995). Este modelo también se ve reforzado por la

capacidad de inducción de IPs que poseen varios intermediarios de la ruta biosintética del JA (Farmer y Ryan, 1992) y de algunas moléculas relacionadas químicamente con el JA (Ishikawa y col., 1994). Además se conoce que el ácido salicílico, importante en la expresión de la respuesta sistémica adquirida (Vernooij y col., 1994), resulta ser inhibidor de la inducción de IPs, pues parecería bloqueando la vía octadecanoide, impidiendo la síntesis y acción de los jasmonatos en la expresión génica de IPs (Doares y col., 1995a).

Se han descubierto IPs de cereales que se asemejan a los presentes en dicotiledóneas. Por ejemplo, una proteína similar al inhibidor de tripsina tipo Bowman-Birk, se acumula en maíz por estrés mecánico (Eckelkamp y col., 1993). La secuencia de este inhibidor mostró gran homología con los inhibidores de cereales tipo Bowman-Birk, especialmente en el centro activo. Estos autores también demostraron la translocación del transcrito entre los órganos de la plántula de maíz, aunque este comportamiento ocurrió básicamente en dirección acropétala. Otro inhibidor, también obtenido del maíz (MPI), se induce bajo infección por hongos, daño mecánico, ABA y JA (Cordero y col., 1994). La expresión del gen del MPI muestra además inducción local y sistémica. La secuencia aminoacídica de esta proteína revela homología con la secuencia de inhibidores de la familia del inhibidor I de papa, pero, la mayor homología (60%) fue hallada con los inhibidores CI-1 y CI-2 de cebada.

### 1.2.6. Los inhibidores de proteinasas en la defensa de la planta contra insectos

Los insectos tienen varias enzimas digestivas, pero comúnmente una de ellas predomina. Los insectos cuyo tracto digestivo es de pH neutro o alcalino, normalmente tienen serín-proteasas, mientras que aquellos con tracto de pH ácido, usan cisteín-proteasas o proteinasas aspártico-ácidas (Boulter, 1993). Como existe gran variabilidad en las proteasas que usa principalmente un insecto, es difícil esperar que un inhibidor sea efectivo contra insectos de distintas familias. Más aún, no todos los insectos tienen proteasas digestivas. Algunos de ellos, como los áfidos, dependen principalmente de azúcares y aminoácidos libres que pueden absorber desde el floema de la planta. Sin embargo, en algunas especies de áfidos, se ha informado la presencia de un tipo de tripsina, catepsina y de otras proteinasas básicas, además de las amilasas y pectinasas que degradan la pared celular (Auclair, 1963).

Varios ejemplos sobre el efecto de los IPs en los insectos han sido publicados, pero el conocimiento detallado de las proteinasas de los insectos es escaso. El inhibidor I de tomate afecta al gusano minador de la betarraga *Spodoptera exigua* (Broadway y col., 1986) e incrementa las defensas naturales contra larvas de *Manduca sexta* en tabaco transgénico (Johnson y col., 1989). En este sistema de ingeniería genética, también se ha visto que el inhibidor de tripsina de *Vigna unguiculata* (tipo Bowman-Birk) afecta al gusano del tabaco *Heliothis virescens* (Hilder y col., 1987) y a larvas de *Helicoverpa zea* (Hofmann y col., 1992). Este inhibidor tiene además efectos negativos sobre el metabolismo y desarrollo del escarabajo *Callosobruchus maculatus* (Gatehouse y

Boulter, 1983). El crecimiento de larvas de *Heliothis zea* y *S. exigua* ha sido inhibido con dietas con 10% de los inhibidores puros de tripsina de soja y el inhibidor II de papa (Broadway y Duffey, 1986). Otros estudios han demostrado actividad deterrente de inhibidores tipo serín-proteinasas en el crecimiento y desarrollo del grillo *Teleogryllus commodus* (Burgess y col., 1994) y de la polilla *Cydia pomonella* (Markwick y col., 1995). Los coleópteros usan normalmente cisteín-proteasas para la digestión proteica (Michaud y col., 1993; Wolfson y Murdock, 1987). Así, un gran contenido de inhibidores tipo cisteín-proteinasas en hojas de *Brassica napus* ha podido disminuir la tasa de alimentación del escarabajo pulga *Phyllotetra cruciferae* (Bodnaryk y Rymerson, 1994). Las cistatinas (una clase de inhibidores tipo cisteín-proteinasas) presentes en el arroz, son eficaces en inhibir la catepsina H del escarabajo de papa *Leptinotarsa decemlineata* (Michaud y col., 1993). Entonces, es de esperar que, transformando genéticamente plantas de papa con genes de la cistatina del arroz, se podría alcanzar un control relativo del escarabajo, el cual usa cisteín-proteasas para su digestión.

Como se mencionó anteriormente, la cebada contiene niveles basales de IPs en los tejidos vegetativos. En algunas variedades, se ha intentado correlacionar estos niveles basales de IPs con la susceptibilidad de la cebada al ataque del saltamontes *Campanula pellucida* (Weiel y Hapner, 1976). Estos autores han sugerido que los niveles basales o la inducción de IPs podrían afectar la elección de una planta huésped por el insecto, aunque no se ha comprobado ni la inducción de IPs por dicho insecto, ni algún efecto deterrente hacia él.

La información sobre la actividad e inducción de IPs en cereales es escasa. La acumulación de IPs en cebada por infestación con insectos succionadores como los áfidos, no ha sido descrita aún.

## **HIPÓTESIS**

En cebada existen niveles basales de inhibidores de proteinasas, los cuales se incrementarían cuando ésta es infestada por áfidos. Los niveles basales y acumulados de inhibidores, estarían relacionados con la susceptibilidad de la cebada a la infestación por áfidos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la acumulación de inhibidores de proteinasas en cebada infestada por áfidos, daño mecánico y algunos factores químicos.



## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el contenido de inhibidores de proteinasas (inhibidores de tripsina y quimotripsina) en algunos cultivares de cebada y correlacionarlo con la susceptibilidad de estos cultivares al ataque por áfidos.
2. Estudiar si los niveles de estos inhibidores aumentan por infestación con los áfidos *Schizaphis graminum* y *Rhopalosiphum padi*, daño mecánico o por exposición a factores químicos como ácido jasmónico, ácido abscísico y etileno.
3. Determinar si los inhibidores de proteinasas aislados de cebada reducen la sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Material Vegetal:

Semillas de cebada *Hordeum vulgare* L. cv. Aramir, Frontera, Libra y Leo fueron sembradas en maceteros con vermiculita y regadas con solución nutritiva (Phostrogen<sup>®</sup>) tres veces por semana. Las plántulas fueron crecidas en una cámara de cultivo a 24°C y con 14 horas de luz.

### 2.2. Infestación con áfidos:

Se infestaron plantas de cebada de siete días de edad con distinta cantidad de individuos por planta de los áfidos *Schizaphis graminum* Rondani biotipo C y *Rhopalosiphum padi* L. por 12 a 120 horas. Como control se tuvieron maceteros con plantas libres de infestación. Se realizaron dos tipos de experimentos de acumulación sistémica. En uno se usaron plantas de once días de edad, en las cuales se infestó sólo la primera hoja, separando la segunda hoja con una malla transparente para aislar los áfidos, mientras que en el segundo se usaron plantas de siete días a las que se infestó sólo la mitad inferior de la primera hoja, dejando la mitad superior libre de áfidos.

### 2.3. Tasa de crecimiento poblacional de los áfidos:

Para estimar la susceptibilidad de los cultivares, se infestaron plantas de cebada cv. Aramir, Frontera, Libra y Leo de siete días de edad con tres áfidos iniciales por un período de seis días, al cabo de los cuales se contaron los áfidos. La tasa de crecimiento poblacional se calculó según la fórmula:

$$k = \ln(N_f/N_i)/\Delta t$$

donde:  $N_f$  = número final de áfidos,  $N_i$  = Número inicial de áfidos y  $\Delta t$  = tiempo en días.

### 2.4. Tratamientos con daño mecánico:

En los ensayos con daño mecánico se usaron plantas de siete días de edad. El tratamiento consistió en realizar pinchazos con la punta fina de una aguja de vidrio (0,1mm). Se hicieron 10, 20 y 40 pinchazos por planta cada día, durante cinco días. Para probar acumulación sistémica se usaron los mismos diseños experimentales que en los ensayos de acumulación sistémica por infestación con pulgones.

### 2.5. Tratamientos con ácido jasmónico (JA):

Se usaron plantas de siete días de edad, a las que se les aplicó una solución acuosa de ( $\pm$ )-ácido jasmónico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 5, 20, 40, 80, 160  $\mu$ M de dos formas: por incubación de sus hojas en tubos con JA por 24 horas en luz constante, o por aspersión de las mismas soluciones a plantas completas cerradas en una cámara por

24 horas en luz constante. En los ensayos de acumulación sistémica se utilizaron plantas de once días de edad, incubando sólo la primera hoja con JA en un tubo sellado.

#### **2.6. Tratamientos con ácido abscísico (ABA):**

Se preparó una solución etanólica 100 mM de ( $\pm$ )-ácido abscísico (Sigma Chemical Co). A partir de ésta se prepararon soluciones acuosas de ABA 1, 10, 50 y 100  $\mu$ M las que se aplicaron a plantas de siete días de edad por aspersión o por incubación de sus hojas por 24 horas en luz continua.

#### **2.7. Tratamientos con ácido cloro etil-fosfórico:**

Se utilizó el ácido 2-cloro etil-fosfórico (o etefón) (Sigma Chemical Co.) como un agente liberador de etileno, el cual se aplicó en soluciones de 15 y 30  $\mu$ M por aspersión a plantas de siete días de edad dentro de una cámara cerrada de 5 litros.

#### **2.8. Contenido de clorofila:**

La determinación de clorofila se realizó según el método descrito por Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los extractos se obtuvieron moliendo 0,5 g de tejido foliar con 10 ml de etanol al 96%. El extracto fue filtrado con papel filtro Watman N°2 y se hicieron lecturas de absorbancia a 649 y 665 nm. El cálculo de la clorofila total se obtuvo según la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{g/ml}) = 18,08 (A_{649}) + 6,63 (A_{665})$$

## **2.9. Contenido de proteínas solubles:**

La determinación de las proteínas solubles se realizó según el método de Bradford (1976), usándose albúmina de suero de bovino (BSA) como proteína estándar en la curva de calibración.

## **2.10. Contenido de ácido abscísico (ABA):**

Para la determinación de ABA por HPLC, se realizó una extracción incubando tejido foliar fresco (0,5 g) en 1,5 ml de etanol al 85 % (v/v) por 24 horas a temperatura ambiente según el método previamente descrito por Kettner and Dörffling (1987). Extracciones subsiguientes de las hojas mostraron una recuperación del 90% del ABA endógeno en la primera extracción. Los extractos fueron filtrados con un filtro Millipore de 0,2  $\mu\text{m}$ . Se inyectaron muestras de 20  $\mu\text{l}$  en una columna Lichosphere 100 RP 18 (Merck) (Lipp, 1991). Se usó una fase móvil isocrática de acetonitrilo:agua (45:55, v/v) con un flujo de 1.5 ml/min. La cuantificación fue hecha por medición de la absorbancia a 236 nm. Para la curva estándar se usó ( $\pm$ ) cis, trans-ABA (Sigma Chemical Co.). La identidad del ABA separado por HPLC, fue confirmada por una inyección directa en un espectrómetro de masas (HP 5989A).

## **2.11. Actividad de inhibidores de proteinasas:**

Los extractos de las hojas fueron tomados de plantas controles y de los distintos tratamientos. La extracción se hizo con amortiguador Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (3 ml de

amortiguador/g tejido fresco) conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y PVP-40 al 5 % (Kirsi y Mikola, 1977). La mezcla fue molida en un mortero en frío y luego filtrada. El extracto fue centrifugado a 20.000 x g a 4°C por 30 minutos. La solución sobrenadante se utilizó como extracto con actividad inhibidora. La actividad de los inhibidores fue medida espectrofotométricamente a través de la inhibición de la actividad esterasa de tripsina y quimiotripsina usando el método de Schwert y Takenaka (1955). Ambas actividades enzimáticas se midieron a 25°C.

Los ensayos se iniciaron con una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente de 0,1 ml del extracto con 5 µg de tripsina (Sigma Chemical Co.) o con 20 µg de quimiotripsina (Sigma Chemical Co.) en HCl 1 mM y amortiguador Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0 para tripsina y pH 7,0 para quimiotripsina), en un volumen final de 0,2 ml (Ryan, 1974). El ensayo de los inhibidores de tripsina, consistió en añadir a esta mezcla 3 ml del sustrato N-benzoil-L-arginina etil éster (Sigma Chemical Co.) 1 mM con CaCl<sub>2</sub> 0,02 M en amortiguador Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Las mediciones se hicieron a 256 nm. Para los inhibidores de quimiotripsina, se añadió a la preincubación 3 ml del sustrato L-tirosina etil éster (Sigma Chemical Co.) 1 mM con CaCl<sub>2</sub> 0,02 M en amortiguador Tris-HCl 0,05 M pH 7,0. Las lecturas se hicieron a 235 nm.

La actividad de los inhibidores fue expresada como unidades de inhibidor por mg de proteína total del extracto. Las unidades de inhibidor fueron definidas como: una unidad de inhibidor es igual a la cantidad de inhibidor que reduce la hidrólisis de 1 µmol

de sustrato por minuto en condiciones estándares. Como control se usaron las enzimas incubadas con el amortiguador de extracción.

### **2.12. Cromatografía de exclusión molecular:**

Para la separación de la fracción proteica del extracto con actividad inhibitoria de proteinasas, se ensamblaron dos columnas de exclusión molecular. Una columna de 1 cm x 15 cm fue rellena con Sephadex G-15 (Sigma Chemical Co.) y equilibrada con amortiguador Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. En ella se aplicó 1 ml de extracto crudo obtenido de plantas control e infestadas por 48 horas con 40 áfidos por planta. Se recogieron fracciones de 1 ml de eluído. La presencia de proteínas se determinó midiendo la concentración de ellas en cada fracción. Las fracciones de alta masa molecular que contenían las proteínas fueron concentradas por centrifugación en tubos concentradores Centricon® (corte a 3 KDa) (Amicon Inc., Beverly, MA) aproximadamente 20 veces.

Se tomaron volúmenes de 0,5 ml de estas muestras concentradas para ser aplicadas a otra columna de 1 cm x 30 cm rellena con Sephadex G-75 (Sigma Chemical Co.) que permite separar proteínas de masa molecular entre 3 y 70 KDa. Esta columna fue equilibrada con amortiguador Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 y calibrada con azul de dextrano (2000 KDa) y las siguientes proteínas estándar: aprotinina (6,5 KDa), citocromo C (12,4 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa) y albúmina de suero de bovino (66 KDa) (Sigma Chemical Co.). Se colectaron fracciones de 0,5 ml las cuales fueron concentradas

5 veces en tubos concentradores Centricon<sup>®</sup> (Amicon Inc.). Luego se determinó la concentración de proteína de cada fracción y la actividad de inhibidores de proteinasas.

### **2.13. Dietas artificiales:**

Se realizaron ensayos de dietas artificiales a las que se aplicaron extractos proteicos de plantas de cebada. Las dietas consistieron en una mezcla de aminoácidos, sales, vitaminas y sacarosa al 15%, según descrito por Dadd y Mittler (1966). Se utilizaron dietas sólo con amortiguador o con albúmina de suero de bovino como controles y con extractos purificados con actividad inhibidora de proteinasas. Los áfidos fueron colocados en una cápsula cilíndrica de vidrio y luego mantenidos en oscuridad. La dieta se colocó entre dos láminas de papel Parafilm M en un extremo de la cápsula. La sobrevivencia de los áfidos fue registrada durante dos días.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Susceptibilidad de los cultivares de cebada a la infestación por áfidos:

Se midió la pérdida de clorofila para evaluar el grado de daño en cada uno de los cultivares estudiados cuando fueron infestados con *Schizaphis graminum* y la tasa de crecimiento de la población de áfidos para estimar la susceptibilidad de los cultivares (Tabla 1). Como los contenidos de clorofila en plantas sanas no son similares entre los cultivares, la pérdida de clorofila fue expresada como porcentaje respecto a las plantas sin infestar. Los cultivares Aramir y Leo fueron los que manifestaron mayor pérdida de clorofila (17% a 18%), mientras que Frontera fue el que presentó menor pérdida (12%). Visualmente el cultivar Aramir fue el que se mostraba más dañado. Se encontraron mayores diferencias al comparar las tasas de reproducción de los áfidos en los distintos cultivares. Nuevamente en los cultivares Aramir y Leo, se observaron los mayores índices de reproducción de los áfidos y en Frontera el menor índice.

De acuerdo a la pérdida de clorofila y a las tasas de crecimiento de las poblaciones de áfidos en los cultivares de cebada, se pudo considerar al cultivar Frontera como el menos susceptible al ataque por áfidos.

TABLA 1. Susceptibilidad de algunos cultivares de cebada al áfido *S. graminum*. Las mediciones del contenido de clorofila y de la tasa de reproducción de los áfidos se hicieron después de seis días de infestación con tres áfidos por planta.

| Cultivar | Clorofila <sup>a</sup> |                            | Áfidos <sup>b</sup> |                              |
|----------|------------------------|----------------------------|---------------------|------------------------------|
|          | µg/g p.f.              | % del control no infestado | Nº final por planta | Reproducción (ln[Nf/Ni]/día) |
| Frontera | 14,5 ± 0,3             | 87,5 %                     | 18,2 ± 1,2          | 0,30 ± 0,01                  |
| Aramir   | 14,3 ± 0,2             | 82,9 %                     | 28,5 ± 0,9          | 0,38 ± 0,01                  |
| Libra    | 13,2 ± 0,3             | 84,1 %                     | 24,6 ± 0,3          | 0,35 ± 0,00                  |
| Leo      | 13,5 ± 0,4             | 82,3 %                     | 27,1 ± 1,3          | 0,37 ± 0,01                  |

<sup>a</sup>Promedio de tres mediciones ± error estándar.

<sup>b</sup>Promedio de tres maceteros (10 plantas cada uno) ± error estándar.

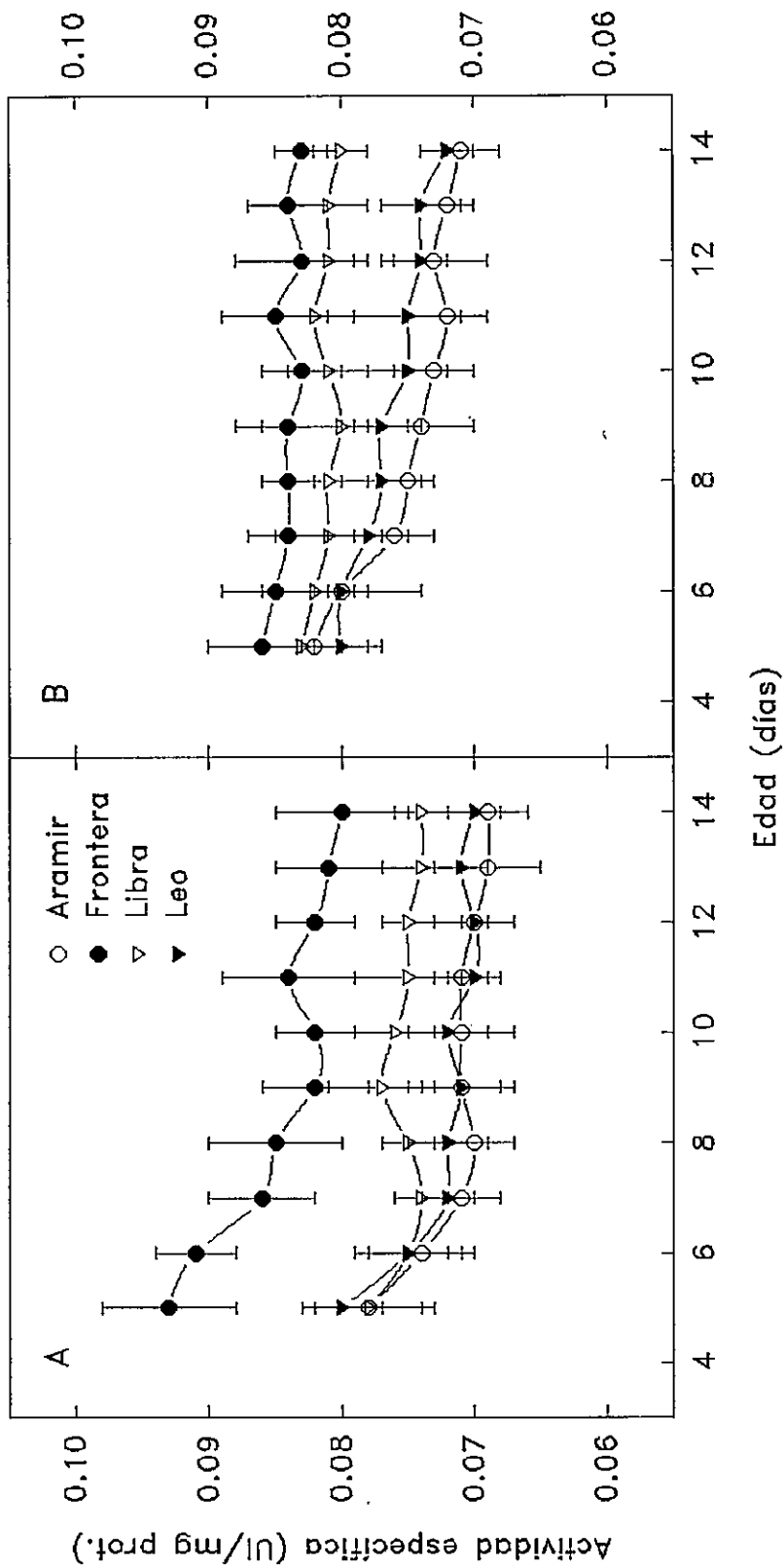
### 3.2. Actividad de IPs en plantas sanas:

Debido a que la actividad de inhibidores tipo serín-proteasas presentes en cebada decrece durante la germinación y se mantiene en un nivel basal en las plántulas (Kirsi, 1973), se realizaron las primeras mediciones de IPs en plantas sanas de 5 a 14 días de edad. Los resultados muestran que, pese a haber una leve tendencia a disminuir la actividad de los inhibidores de quimotripsina (Figura 1 A) y de tripsina (Figura 1 B) en los primeros días de estudio, estos niveles de actividad aparecen constantes. Considerando todos los cultivares, las actividades contra quimotripsina fluctuaron entre 0,068 y 0,094 UI/mg proteína y contra tripsina variaron entre 0,071 y 0,087 UI/mg de proteína (Figura 1).

La actividad de inhibidores de quimotripsina fue muy similar en los cultivares Aramir, Libra y Leo, mientras que en Frontera fue ligeramente mayor que en el resto. En la actividad de inhibidores de tripsina, hubo menor diferencia entre Frontera y el resto de los cultivares.

### 3.3. Actividad de IPs en plantas de cebada infestada con áfidos:

Los cuatro cultivares mencionados en el párrafo anterior, se usaron para ver si el daño provocado por la infestación con áfidos, aumentaría la actividad de IPs sobre los niveles basales. Para probar esto, plantas de siete días de edad fueron infestadas con 10 individuos de *Schizaphis graminum* por cada planta y la actividad de IPs se midió a las 12 horas de iniciada la infestación y luego cada 24 horas durante cinco días. Un experimento



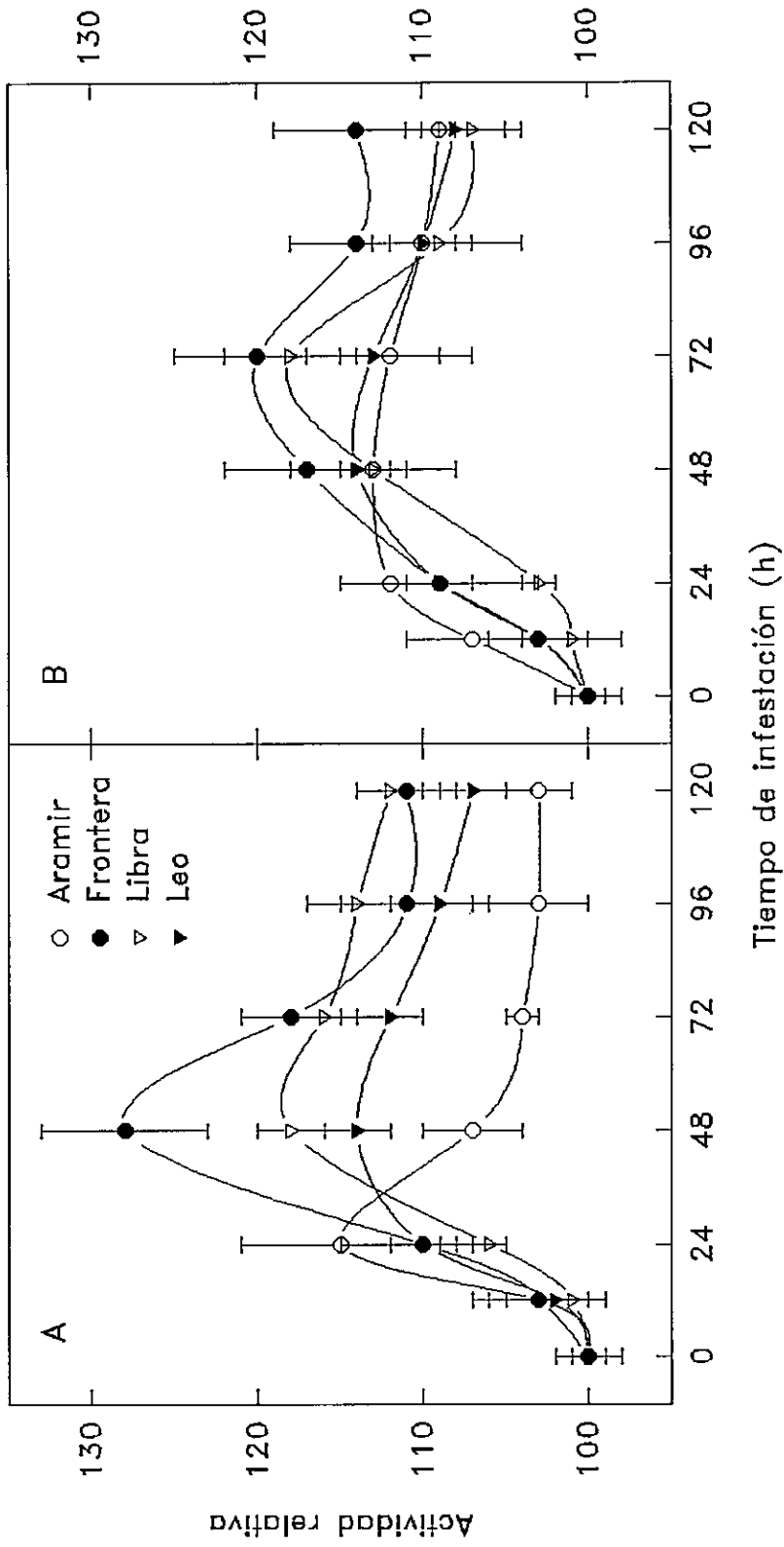
**Figura 1.** Actividad inhibitoria de quimotripsina (A) y tripsina (B) en hojas sanas de cebada de distinta edad. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.

inicial mostró que no existían variaciones de actividad durante las primeras 12 horas de infestación (datos no mostrados).

Debido a que los niveles basales no eran iguales entre los cultivares, para poder comparar los valores acumulados, estos fueron expresados como actividad relativa (en porcentaje del control). En la Figura 2A se observan los patrones de actividad de inhibidores de quimotripsina en los cuatro cultivares infestados. Los cultivares Aramir, Libra y Leo no mostraron más de 20% de incremento sobre las plantas control, mientras que Frontera aumentó 29% sobre el control. Los incrementos máximos de esta actividad se registraron a las 48 horas de infestación, a diferencia de Aramir en el que fue a las 24 horas. En la Figura 2B se presentan los niveles de actividad contra tripsina para los mismos experimentos. Nuevamente, Frontera mostró mayor aumento de actividad (20% sobre el control) similar a Libra (18%), y menores fueron los aumentos de Aramir (13%) y Leo (14%). Los niveles máximos no fueron los mismos entre los cultivares, pero fueron siempre entre las 24 a 72 horas de iniciada la infestación.

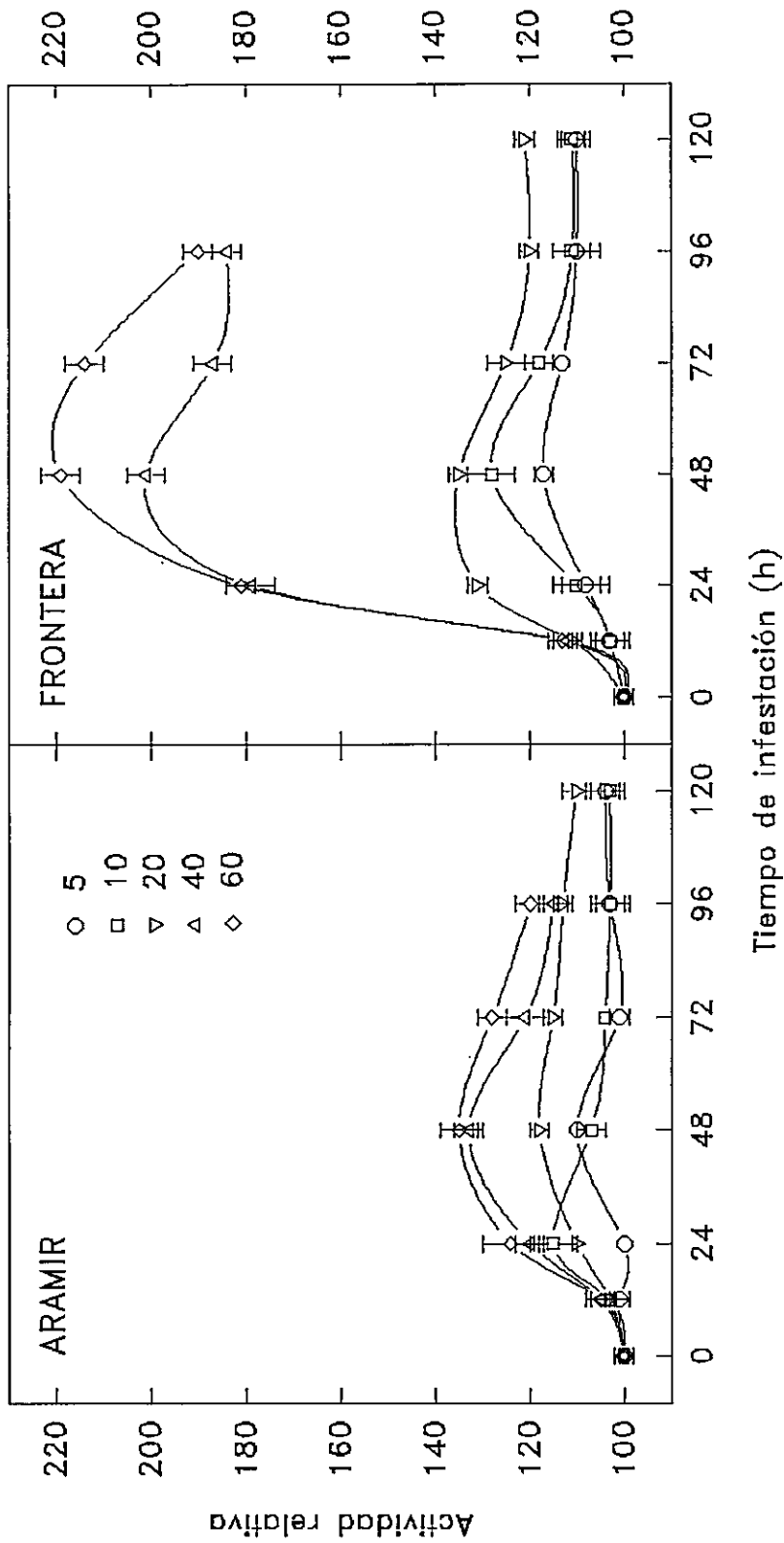
Según estos aumentos de actividad en plantas infestadas, los cultivares Aramir y Frontera fueron elegidos para continuar con el estudio de inducción de los IPs. Aramir tuvo el menor aumento de actividad de ambos tipos inhibidores y Frontera el mayor; además Aramir y Frontera son los que presentaron más diferencia entre los niveles de actividad en plantas sanas (Figura 1) y en la susceptibilidad a los áfidos (Tabla 1).

Con estos dos cultivares, se estudió el efecto de la densidad de la infestación sobre la actividad de los IPs. Se hicieron infestaciones con diferente número de áfidos (5,



**Figura 2.** Actividad inhibitoria de quimotripsina (A) y tripsina (B) en hojas de plantas de cebada de siete días de edad infestadas con *S. graminum* (10 áfidos por planta). Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar. La actividad absoluta de los controles corresponde a valores indicados en la Figura 1.

10, 20, 40 y 60 áfidos por planta). Las mediciones de actividad se realizaron a los mismos intervalos de tiempo que en el experimento anterior. Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos con Aramir y Frontera al infestarse con *S. graminum* para inhibidores de quimotripsina y tripsina, respectivamente. En el cultivar Aramir, la actividad de inhibidores de quimotripsina sólo alcanzó un máximo de 38% sobre el control con 40 y 60 áfidos por planta a las 48 horas post-infestación (Figura 3). Incrementos diferentes a los controles se registraron entre las 24 y 120 horas con 20 ó más áfidos y a las 48 y 72 horas con 5 y 10 pulgones, respectivamente (prueba t,  $p < 0,05$ ). En cambio, Frontera sí mostró grandes diferencias de incremento de actividad de inhibidores de quimotripsina conforme se iba incrementando el número de áfidos. Los niveles fueron máximos a las 48 horas y alcanzaron un 100% sobre el control al infestar con 40 áfidos por planta y un 120% con 60 áfidos. Los incrementos de actividad fueron significativamente distintos de los controles a las 48 y 72 horas con 5 y 10 pulgones (prueba t,  $p < 0,05$ ) y a partir de las 12 horas de infestación con 20 ó más pulgones (prueba t,  $p < 0,01$ ). Por otro lado, los incrementos de la actividad contra tripsina no fueron tan notorios con distintas densidades de pulgones en ambos cultivares (Figura 4). En Aramir nunca superó el 18% sobre el control con el número máximo de pulgones y en Frontera no superó el 25% sobre el control con ningún nivel de infestación. Los incrementos fueron significativamente distintos de los controles desde las 24 horas de iniciada la infestación, con 20 ó más pulgones en Aramir y con 10 ó más pulgones en Frontera (prueba t,  $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Actividad inhibitoria de quimotripsina en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera de siete días de edad infestadas con *S. graminum* (5, 10, 20, 40 y 60 áfidos por planta). Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar. La actividad de los controles corresponde a valores indicados en la Figura 1.



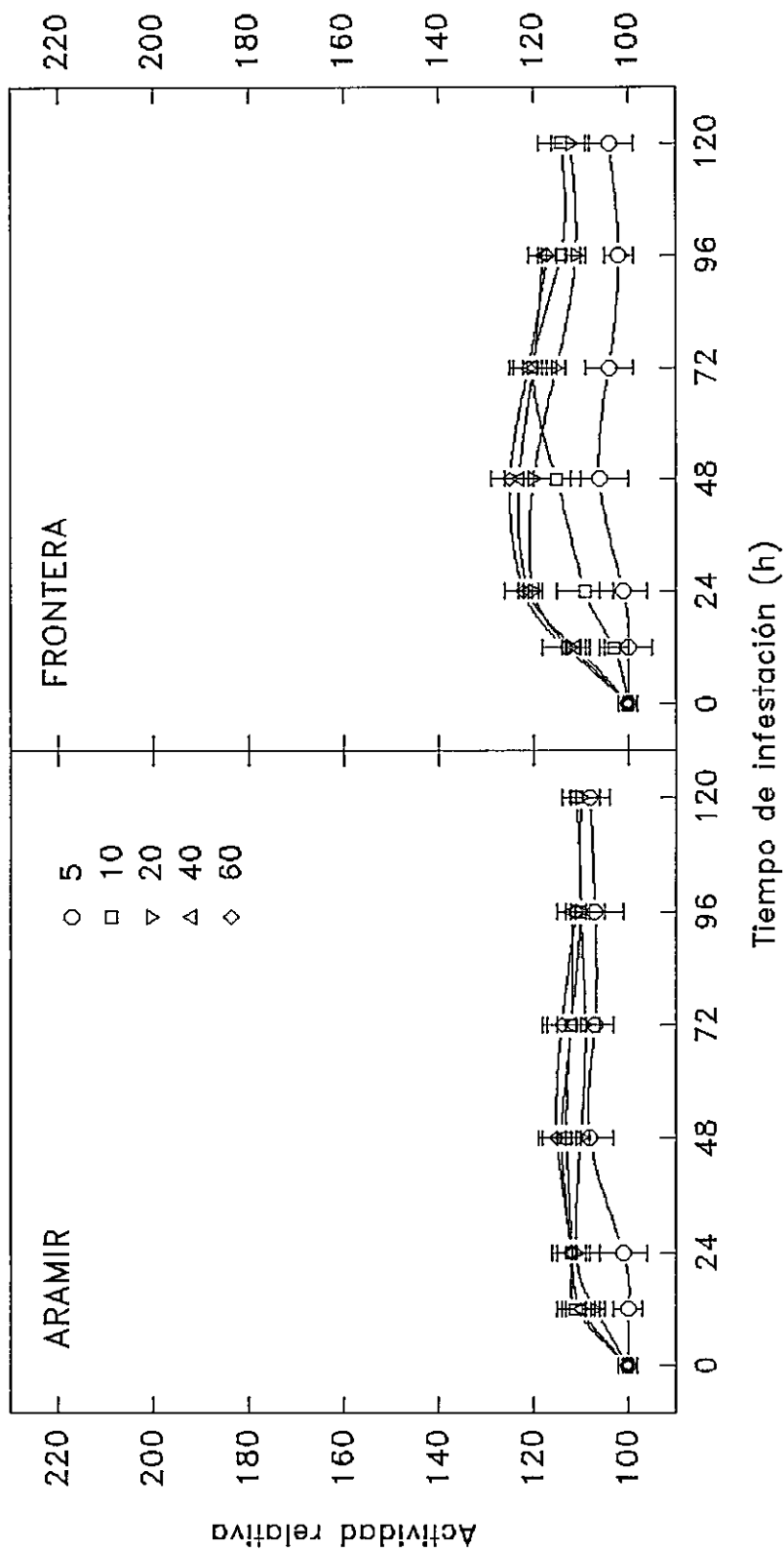
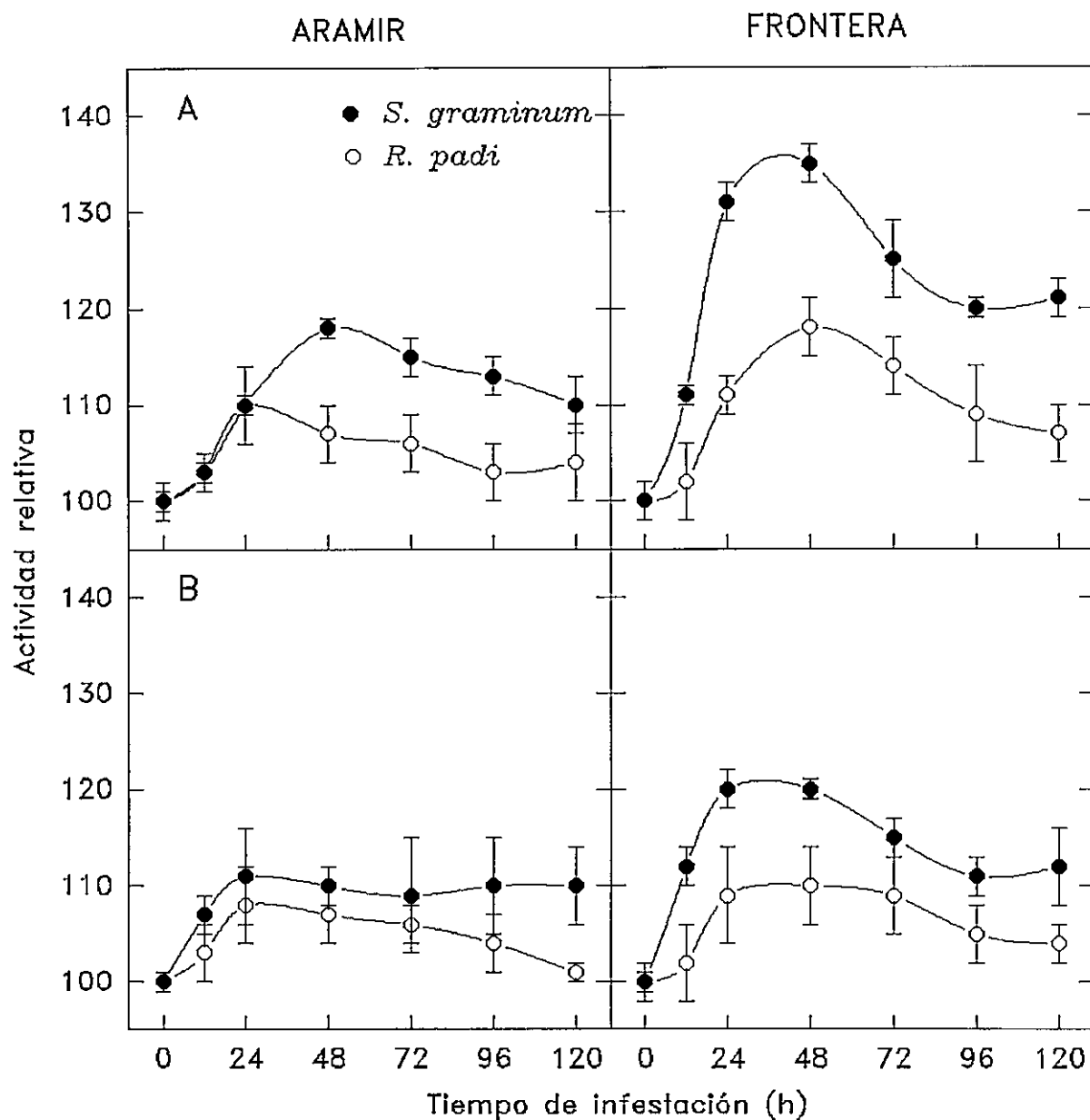


Figura 4. Actividad inhibitoria de tripsina en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera de siete días de edad infestadas con *S. graminum* (5, 10, 20, 40 y 60 áfidos por planta). Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar. La actividad absoluta de los controles corresponde a valores indicados en la Figura 1.

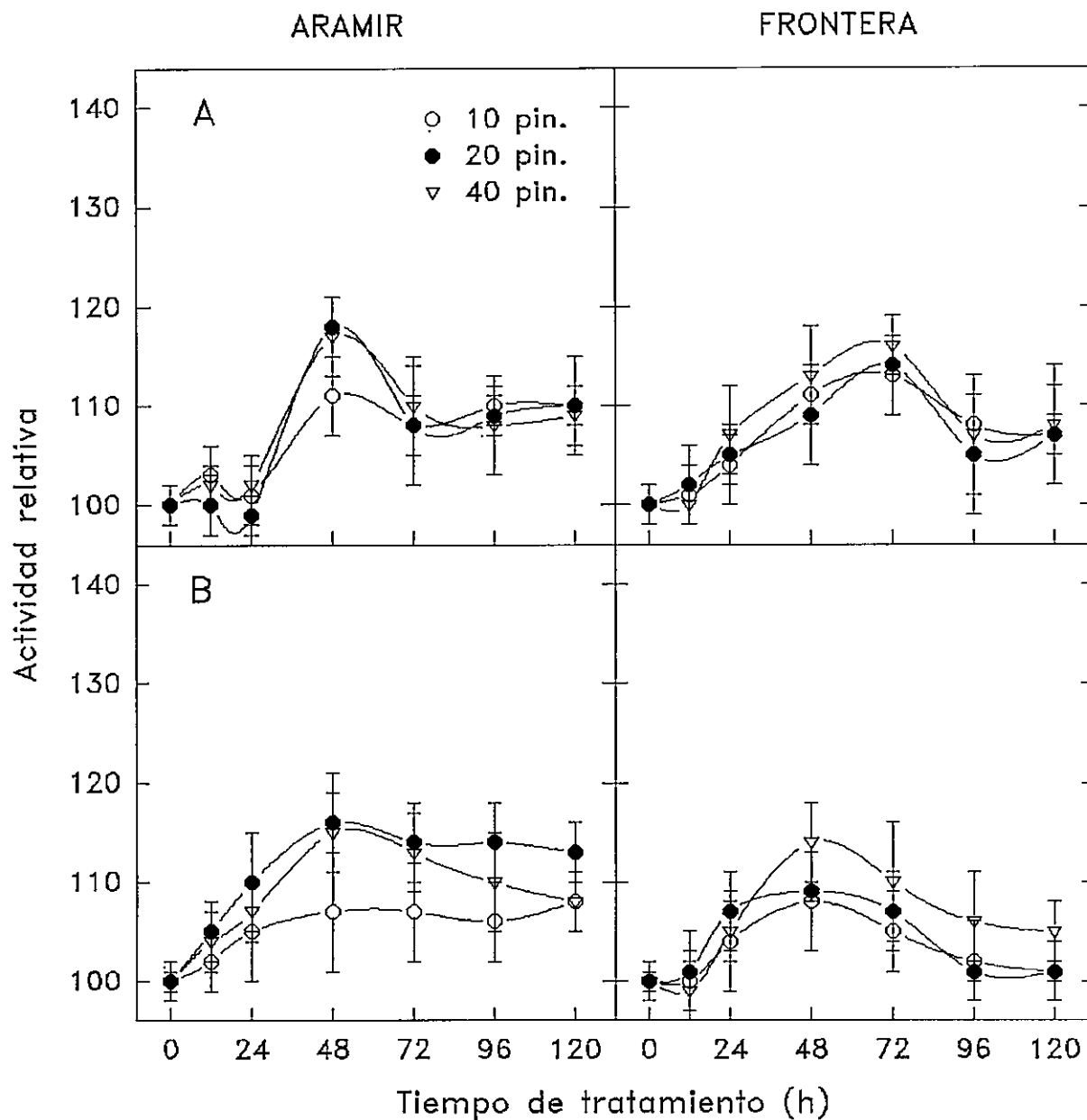
Otro pulgón que daña a la cebada es *Rhopalosiphum padi*. Se quiso comprobar si la infestación con esta especie de pulgón, ocasionaría también un incremento de la actividad de los IPs ensayados. En la Figura 5 se comparan los resultados de experimentos con las dos especies de áfidos. Aunque la máxima actividad detectable ocurrió entre las 24 y 72 horas después de la infestación, para ambos cultivares de cebada y para los dos tipos de inhibidores ensayados, los aumentos de la actividad cuando se infestó con *R. padi*, fueron mucho más discretos que cuando los cultivares fueron infestados con *S. graminum*. Con *R. padi*, sólo el incremento de actividad contra quimotripsina en Frontera fue significativamente distinto del control entre las 48 y 72 horas de infestación (prueba t,  $p < 0,05$ ).

#### **3.4. Actividad de IPs en plantas de cebada con daño mecánico:**

El factor estresante que desencadena la respuesta de inducción de IPs en plantas es la herida en el tejido vegetal. En plantas dicotiledóneas el estrés de tipo mecánico induce la expresión de genes de IPs (Peña-Cortés y col. 1988). Un objetivo de este trabajo era evaluar si heridas hechas mecánicamente, influían en la acumulación de IPs. Para probar esto, plantas de siete días de edad de los cultivares Aramir y Frontera fueron sometidos a distintos niveles de daño mecánico. Se aplicaron 10, 20, y 40 pinchazos en la lámina foliar de cada planta con la punta fina de una aguja de vidrio cada día. Los tratamientos se hicieron hasta por cinco días. En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos con los dos cultivares. En ambos, las respuestas de actividad inhibitoria



**Figura 5.** Actividad inhibitoria de quimotripsina (A) y tripsina (B) en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera de siete días de edad infestadas con *S. graminum* o *R. padi* (20 áfidos por planta). Cada punto representa al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar. La actividad absoluta de los controles corresponde a valores indicados en la Figura 1.



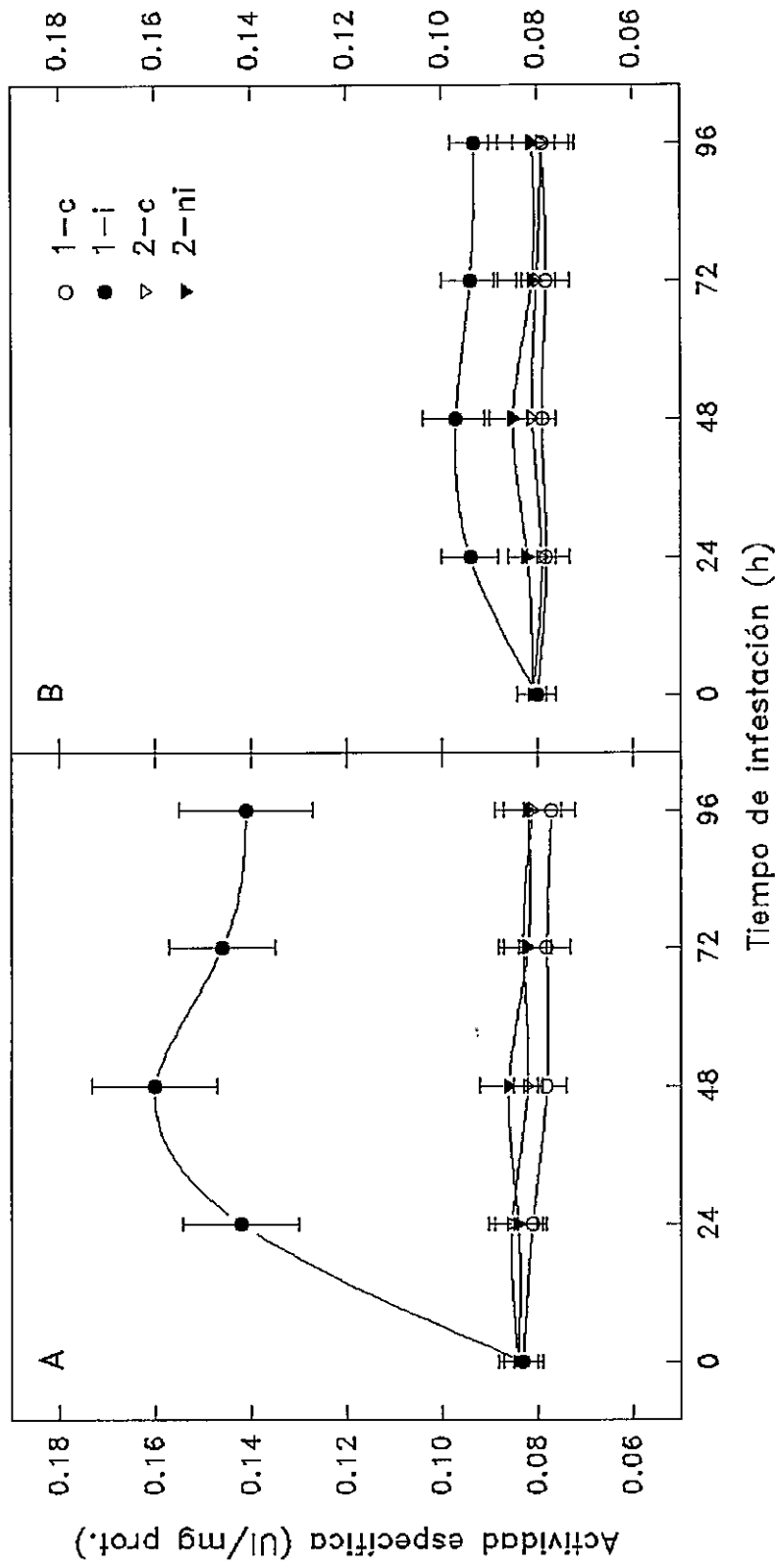
**Figura 6.** Actividad inhibitoria de quimotripsina (A) y tripsina (B) en hojas de plantas de cebada cv. Aramir y Frontera de siete días de edad a las cuales se les hirió mecánicamente con una aguja de vidrio con 10, 20 y 40 pinchazos por planta por día. Cada punto representa al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar. La actividad absoluta de los controles corresponde a valores indicados en la Figura 1.

producto del tratamiento fueron similares entre ellos y los niveles nunca incrementaron más de un 16% sobre el control en ambos tipos de inhibidores. Estos pequeños aumentos también ocurrieron entre las 48 y 72 horas de tratamiento (2° y 3° día) y fueron significativamente distintos de los controles (prueba t,  $p < 0,05$ ). Para el cultivar Frontera, fueron menores que cuando era infestado con pulgones.

También se realizaron ensayos usando otro tipo de daño mecánico como la aplicación de una pinza en la lámina foliar. Los resultados fueron similares (datos no mostrados). Sin embargo, este último diseño no se siguió aplicando debido a que la hoja de cebada se doblaba y quebraba con facilidad por ser muy delgada y frágil.

### **3.5. Acumulación sistémica de la actividad de IPs en cebada:**

Debido a que los IPs pueden ser acumulados sistémicamente en dicotiledóneas y gramíneas (Cordero y col., 1994), se intentó determinar si este fenómeno ocurría también en cebada. Se trabajó con plantas de once días de edad, cuando ya presentan la segunda hoja crecida y a las cuales se les hizo tratamientos de infestación o de daño mecánico en la primera hoja. El experimento consistió en aislar la segunda hoja de las plantas con una malla para evitar que los áfidos la infestara. Al medir la actividad de IPs, no se encontraron diferencias significativas entre la segunda hoja de plantas control y la segunda hoja sin infestar de plantas con la primera hoja infestada o dañada mecánicamente (prueba t,  $p < 0,05$ ). En la Figura 7 se observan sólo los resultados con las infestaciones.



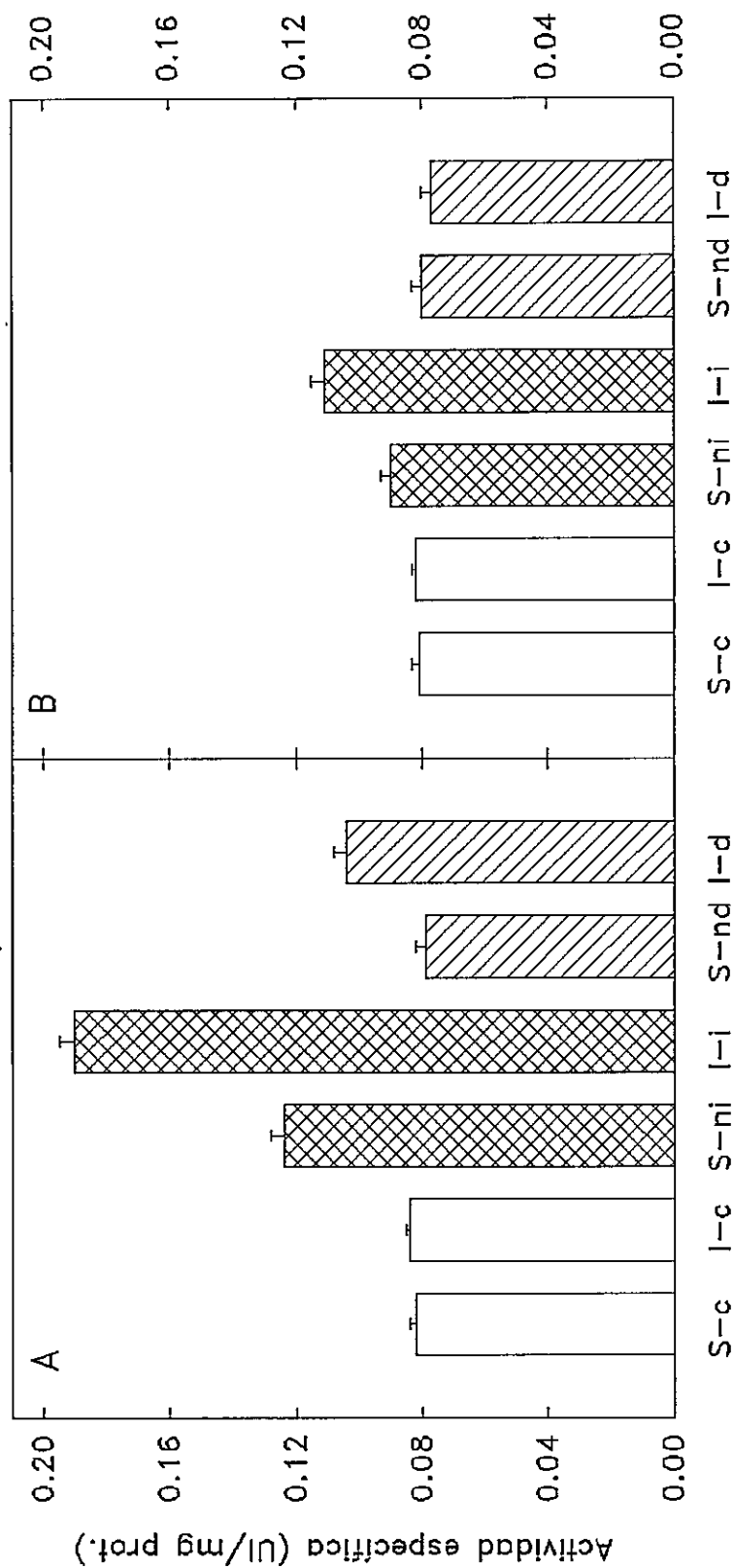
**Figura 7.** Acumulación sistémica de inhibidores de quimotripsina (A) y tripsina (B) en plantas de cebada cv. Frontera de once días de edad. Sólo la primera hoja fue infestada (1-i) por 48 horas con *S. graminum* (40 áfidos por planta). La actividad se midió también en la segunda hoja no infestada (2-ni). 1-c y 2-c son hojas control. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.

Aumento de la actividad sólo se pudo detectar en la mitad superior de una hoja del cultivar Frontera, a la cual se infestó su mitad inferior (Figura 8) Ambos tipos de inhibidores mostraron diferencias significativas respecto a los controles (prueba t,  $p < 0,05$ ). Con este diseño experimental, el tratamiento con daño mecánico en la mitad inferior de la hoja no produjo un aumento significativo de actividad de los IPs.

### **3.6. Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la actividad de los IPs:**

Debido a que los pulgones provocan deshidratación en los tejidos (Cabrera y col., 1995a) y a que el ABA y JA inducen IPs (Hildmann y col., 1992; Farmer y col., 1992), se estudió el posible papel de estos compuestos en la inducción de IPs en cebada. En el tejido infestado se encontró un incremento significativo de ABA, siete veces más que el control y un incremento no tan pronunciado en el tejido no infestado de una planta infestada (Tabla 2).

Cuando se estudió el efecto del ABA sobre la actividad de los IPs en la cebada, éste incrementó sólo los niveles de actividad de los inhibidores de quimotripsina hasta un 51% sobre las plantas no tratadas (Tabla 2 y Figura 9). Los tratamientos con ABA se realizaron por incubación de las hojas en la solución de la hormona o por aspersión de las plantas. Con ambos tratamientos se encontraron los mismos incrementos de actividad. Plantas sometidas a varios días de estrés hídrico y que, llegaban a contener 668 pmoles de ABA por gramo de peso fresco, no mostraron un incremento de actividad de IPs (Tabla 2). En los tratamientos con ABA, pese a que los niveles de la hormona eran cercanos a



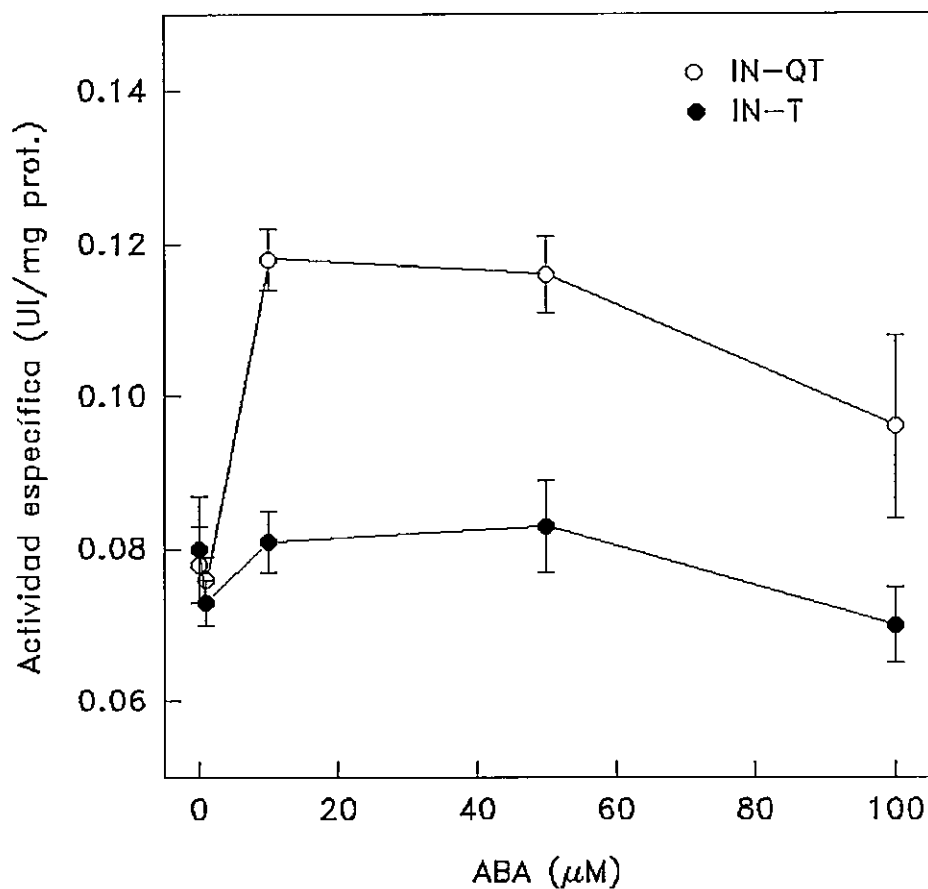
**Figura 8.** Acumulación sistémica de inhibidores de quimotripsina (A) y tripsina (B) en la primera hoja de plantas de cebada cv. Frontera de siete días de edad. Sólo la mitad inferior de la primera hoja fue infestada (I-i) con *S. graminum* (40 áfidos por planta) por 48 horas o dañada mecánicamente (I-d) con 40 pinchazos por hoja por día por 48 horas. La actividad se midió también en la mitad superior no infestada (S-ni) o no dañada (S-nd). I-c y S-c corresponden a los controles. Cada barra corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.



TABLA 2. Efecto del ABA sobre la actividad de inhibidores de quimotripsina y su relación con el contenido de ABA endógeno en hojas de cebada cv. Frontera. Plantas de siete días de edad fueron infestadas sólo en la mitad inferior con *S. graminum* (40 pulgones por planta) por 48 horas. El ensayo de estrés hídrico consistió suspender el riego por 4 días. Los tratamientos con ABA exógeno se hicieron incubando las hojas con ABA por 24 horas.

| Tratamiento                 | ABA <sup>a</sup><br>(pmoles/g p. f.) | Actividad inhibitoria de<br>quimotripsina <sup>a</sup><br>(Actividad relativa) |
|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| Hoja completa control       | 83 ± 3                               | 100 ± 2  |
| Mitad inferior control      | 68 ± 1                               | 100 ± 2  |
| Mitad superior control      | 93 ± 3                               | 99 ± 2   |
| Mitad inferior infestada    | 567 ± 32                             | 220 ± 6  |
| Mitad superior no infestada | 141 ± 4                              | 150 ± 5  |
| Estrés hídrico              | 668 ± 17                             | 99 ± 2   |
| ABA exógeno 1 μM            | 140 ± 4                              | 97 ± 3   |
| ABA exógeno 10 μM           | 252 ± 5                              | 151 ± 4  |
| ABA exógeno 50 μM           | 376 ± 10                             | 149 ± 3  |
| ABA exógeno 100 μM          | 592 ± 4                              | 125 ± 2  |

<sup>a</sup> Promedio de tres mediciones ± error estándar.



**Figura 9.** Actividad de inhibidores de quimotripsina (IN-QT) y de tripsina (IN-T) en cebada tratada con ácido abscísico (ABA) exógeno. Hojas de cebada cv. Frontera fueron incubadas con ABA 1, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas.

los alcanzados en hojas infestadas, la actividad inhibitoria de quimotripsina era siempre menor que en las infestaciones.

### **3.7. Efecto del ácido jasmónico (JA) sobre la actividad de los IPs:**

JA provocó un aumento de actividad de los inhibidores de tripsina pero no de quimotripsina en ambos cultivares, Aramir y Frontera (Figura 10). El incremento máximo alcanzado fue alrededor de un 40% sobre las plantas control. Este mismo incremento se encontró a las 24 y 48 horas de tratamiento (datos no mostrados). El efecto positivo sobre la actividad anti-tripsina, fue también detectado en la segunda hoja de plantas cuya primera hoja fue incubada con una solución de JA (Figura 11).

Estos experimentos con JA también se hicieron de dos formas: incubando hojas directamente con la solución de JA por 24 horas o asperjando las plantas dentro de una cámara sellada. Ambos tratamientos produjeron respuestas similares.

### **3.8. Tratamiento con etefón:**

Los ensayos con etefón (ácido cloroetilfosfórico) no tuvieron efecto sobre ningún tipo de inhibidor (Figura 12), lo que estaría indicando que etileno no incrementaría la actividad de los IPs de la cebada.

### **3.9. Separación de los IPs por cromatografía líquida:**

Los ensayos de filtración en gel con extractos crudos, mostraron que la actividad de ambos inhibidores fue recuperada en la fracción de alta masa molecular cuando fueron

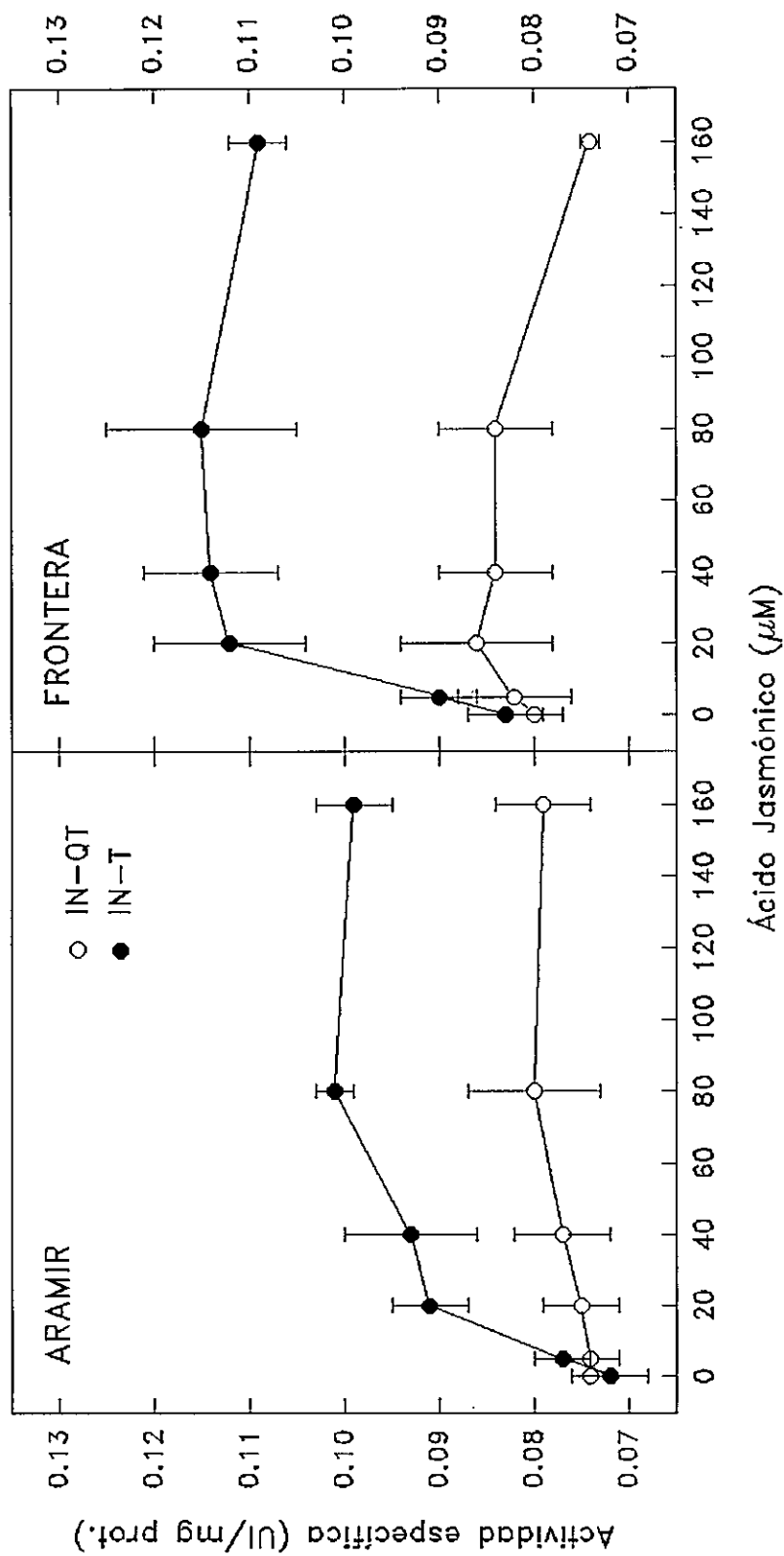
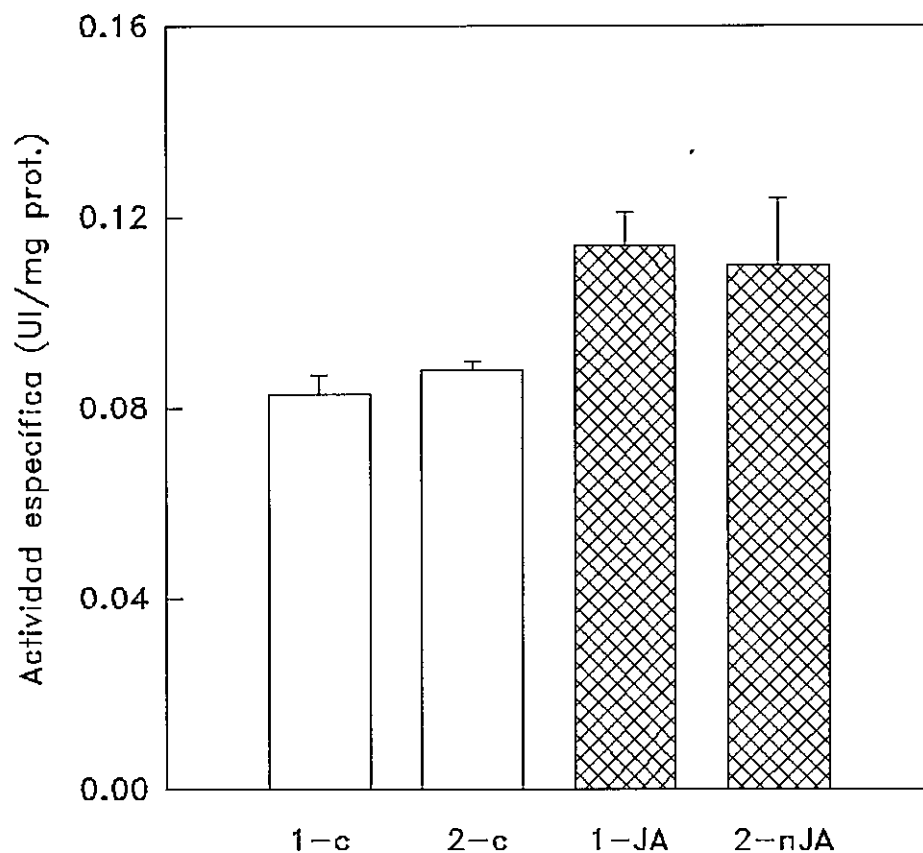
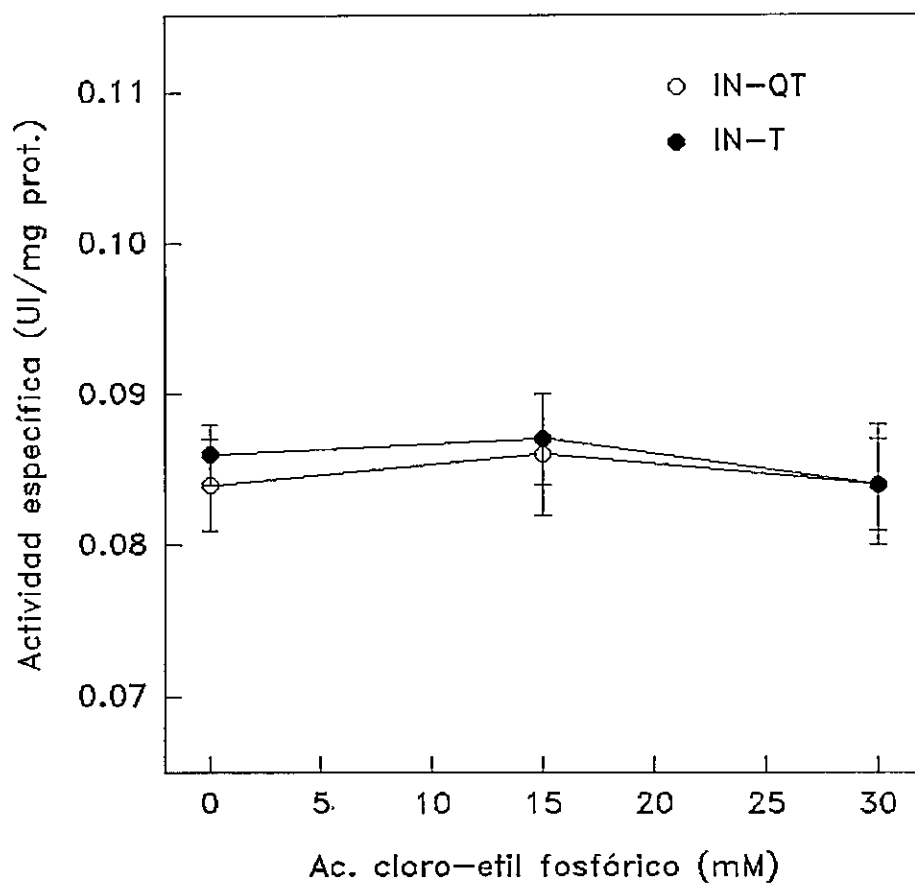


Figura 10. Actividad de inhibidores de quimotripsina (IN-QT) y de tripsina (IN-T) en cebada tratada con ácido jasmónico (JA). Hojas de cebada cv. Aramir y Frontera fueron incubadas con JA 5, 20, 40, 80 y 160  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.



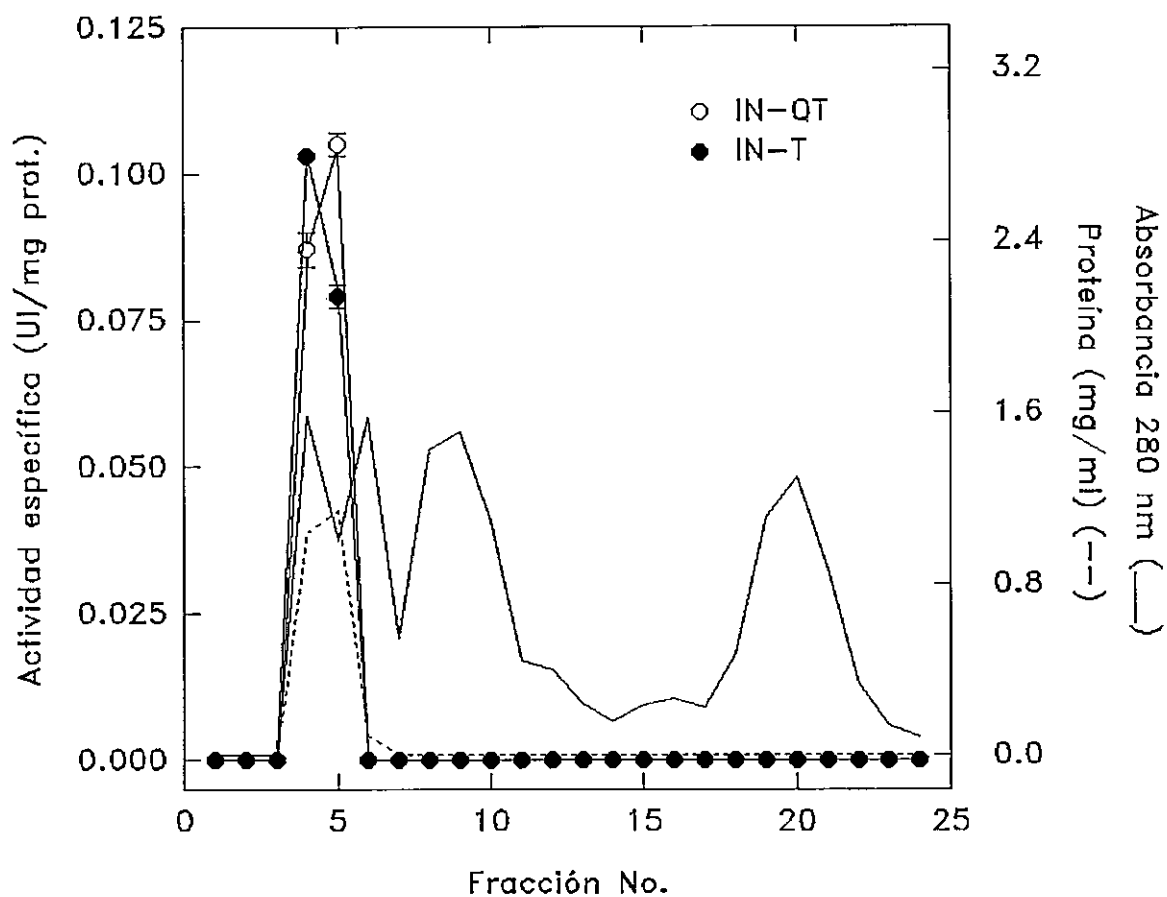
**Figura 11.** Acumulación sistémica de inhibidores de tripsina por ácido jasmónico (JA). La primera hoja de plantas de cebada cv. Frontera fue incubada con JA 40  $\mu$ M por 24 horas (1-JA) y la actividad también fue medida en la segunda hoja (2-nJA). 1-c y 2-c corresponden a la primera y segunda hoja control, respectivamente. Cada barra corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar



**Figura 12.** Tratamientos con ácido cloro-etil fosfórico. Actividad de inhibidores de quimotripsina (IN-QT) y de tripsina (IN-T) en hojas de cebada cv. Frontera tratadas con ácido cloro-etil fosfórico (etefón) por 24 horas. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.

separados en una columna de Sephadex G-15. La Figura 13 presenta el resultado con un extracto crudo obtenido de plantas del cultivar Frontera infestadas durante 48 horas con 20 áfidos por planta. En las fracciones donde eluyen las proteínas del extracto se encontró el total de actividad de ambos tipos de inhibidores. Para comprobar la identidad proteica de los IPs, se sometió el extracto a distintos tratamientos para la desnaturalización de las proteínas. Se sabe que los IPs de cebada son, al igual que la mayoría de los IPs de plantas, bastante resistentes al calor y a la digestión por proteasas (Boisen y col., 1981; Mikola y Suolinna, 1969). Los tratamientos elegidos consistieron en calentar el extracto largos períodos a 100° C, tratarlo con altas concentraciones de 2-mercaptoetanol o digerirlo con papaína. Los dos últimos tratamientos no disminuyeron la actividad de los IPs, pues probablemente se estaría afectando también la hidrólisis de los sustratos usados en los ensayos. Sin embargo la pérdida de actividad se observó cuando se hervía el extracto por períodos prolongados (Tabla 3).

La mismas separaciones en columna de Sephadex G-15, se hicieron con extractos de plantas control e infestadas por 48 horas con 40 áfidos por planta. Las fracciones de alto peso molecular, con la actividad de los IPs, fueron recuperadas y concentradas para separar las proteínas por masa molecular en una columna de Sephadex G-75. En ambos cultivares y en plantas control e infestadas, los extractos dieron el mismo perfil de elución cuando se midió la actividad de ambos tipos de inhibidores variando sólo el nivel de actividad (Figuras 14 y 15).



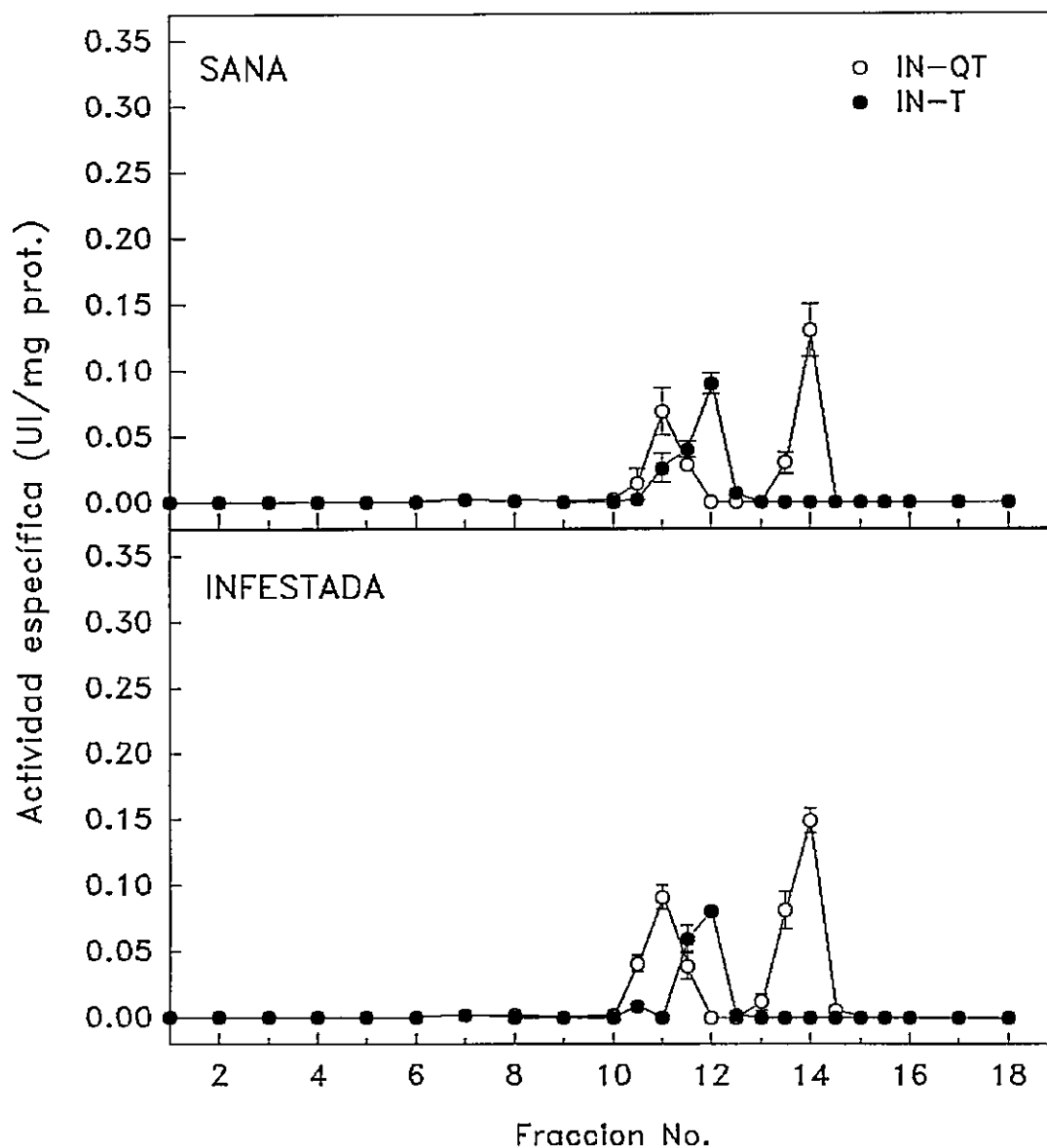
**Figura 13.** Actividades inhibitorias de quimotripsina (IN-QT) y de tripsina (IN-T) de extractos de hojas de cebada cv. Frontera infestada por 48 horas con *S. graminum* (20 áfidos por planta) y determinadas después de una filtración en una columna de Sephadex G-15. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.



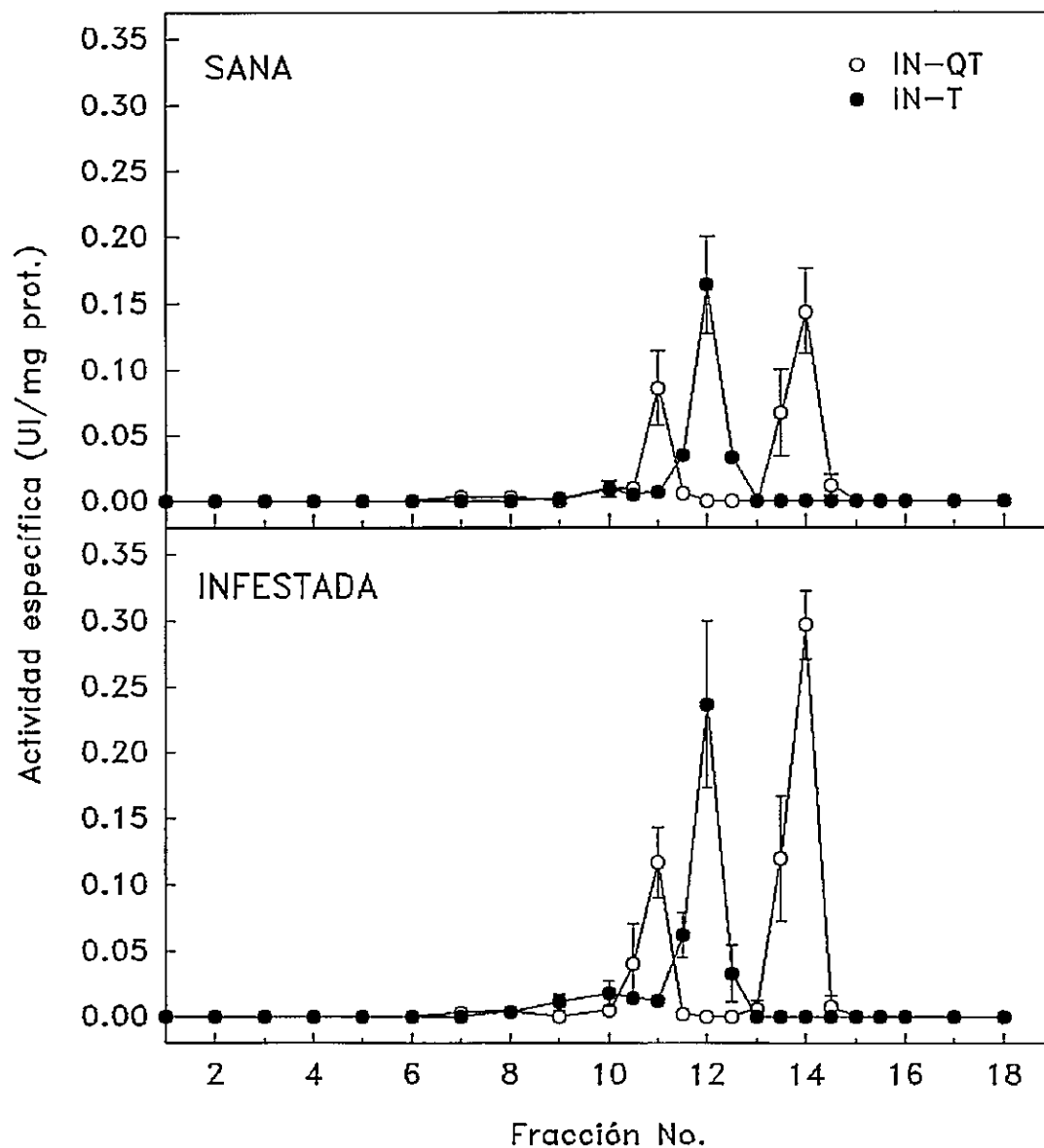
**TABLA 3.** Pérdida de actividad de los inhibidores de proteinasas por desnaturalización con distintos tratamientos. Los extractos fueron hervidos a 100° C inmediatamente después de la extracción o previa filtración en Sephadex G-15. En todos los ensayos se aplicaron cantidades iguales de proteína.

| Tratamiento                                       | Inhibidores de quimotripsina |                 | Inhibidores de tripsina |                 |
|---|------------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|   | UI/ml <sup>a</sup>           | % de inhibición | UI/ml <sup>a</sup>      | % de inhibición |
| Extracto crudo                                    | 0,19 ± 0,02                  | 100             | 0,17 ± 0,01             | 100             |
| Hervido 1 hora                                    | 0,14 ± 0,03                  | 74              | 0,14 ± 0,02             | 82              |
| Hervido 2 horas                                   | 0,10 ± 0,03                  | 53              | 0,11 ± 0,04             | 65              |
| Fracciones 4 y 5 de columna G-15 hervidas 1 hora  | 0,08 ± 0,02                  | 42              | 0,11 ± 0,04             | 65              |
| Fracciones 4 y 5 de columna G-15 hervidas 2 horas | 0,02 ± 0,01                  | 11              | 0,07 ± 0,02             | 41              |

<sup>a</sup> Promedio de tres mediciones ± error estándar.



**Figura 14.** Cromatografía en Sephadex G-75 de inhibidores de proteinasas de hojas de cebada cv. Aramir sanas e infestadas por 48 horas con *S. graminum* (40 áfidos por planta). El extracto fue previamente filtrado en Sephadex G-15, concentrado y luego aplicado a la columna con Sephadex G-75. El eluido fue concentrado antes de medir las actividades de inhibidores de quimotripsina (IN-QT) y de tripsina (IN-T). Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.



**Figura 15.** Cromatografía en Sephadex G-75 de inhibidores de proteinasas de hojas de cebada cv. Frontera sanas e infestadas por 48 horas con *S. graminum* (40 áfidos por planta). El extracto fue previamente filtrado en Sephadex G-15, concentrado y luego aplicado a la columna con Sephadex G-75. El eluido fue concentrado antes de medir las actividades de inhibidores de quimotripsina (IN-QT) y de tripsina (IN-T). Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.

La actividad inhibitoria de quimotripsina fue encontrada en dos picos de actividad, (principalmente en las fracciones N° 11 y 14). Según la calibración de la columna con proteínas de masas moleculares conocidas, se estimaron masas moleculares de 7.000 Da a 8.000 Da y de 19.000 Da para estos dos inhibidores de quimotripsina, respectivamente. Por otro lado, la actividad inhibitoria de tripsina eluyó en un solo pico de actividad (principalmente en la fracción N° 12) estimándose una masa molecular de 13.800 Da.

En la parte superior de las figuras 14 y 15, se muestran los perfiles de elución obtenidos con extractos de plantas sana de cebada cv. Aramir y Frontera, respectivamente, con actividades de inhibición similares. Sin embargo, en las plantas infestadas, el cultivar Aramir mostró los tres picos con menor actividad que el cultivar Frontera (Figuras 14 y 15). Este resultado corroboró las diferencias encontradas cuando se midieron las actividades en los extractos crudos.

### 3.10. Dietas artificiales:

Con los experimentos de dietas, se pretendió examinar si los IPs presentes en los extractos de hojas podían de alguna forma afectar la alimentación de los áfidos y por ende la sobrevivencia de estos. Debido a que los áfidos se alimentan preferentemente del floema, su dieta está basada principalmente de azúcares y aminoácidos libres. Es por esto que primero se quiso determinar si la presencia de proteínas en las dietas afectaba la alimentación de los áfidos. En la Figura 16 se observa que la sobrevivencia de *S. graminum* era similar con BSA y

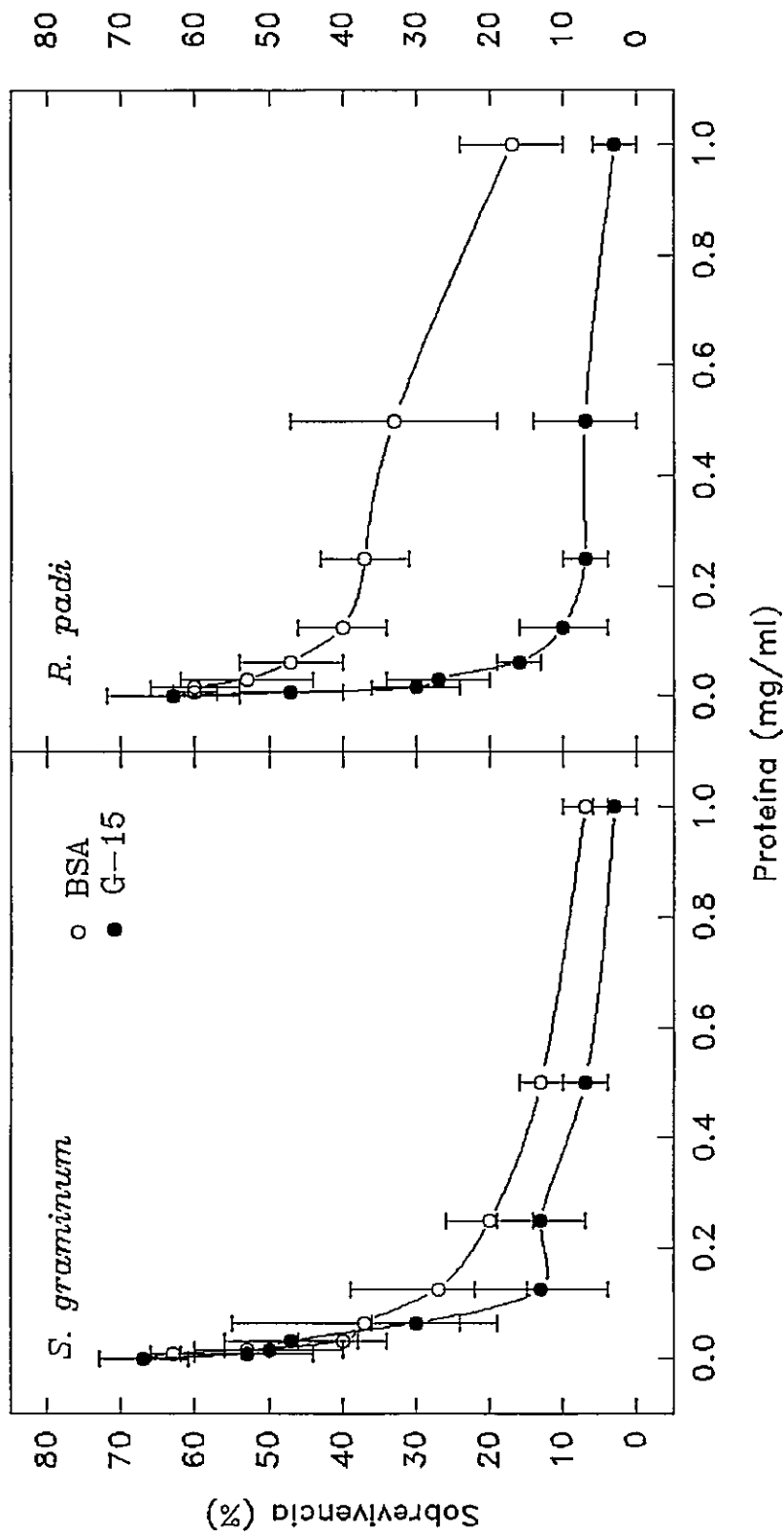


Figura 16. Efecto de proteínas de extractos de cebada sobre la sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales. Diez individuos de los áfidos *S. gramininum* o *R. padi* fueron alimentados por 48 horas en dietas artificiales conteniendo BSA o proteínas de cebada separadas en una columna G-15. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.

con un extracto proteico de cebada. Como concentraciones altas de proteína afectaban la sobrevivencia de los pulgones, se analizó el efecto de las distintas fracciones con actividad de IPs y que fueron separadas por cromatografía líquida, pero sólo en concentraciones bajas de proteínas (Figura 17). Nuevamente no se observan diferencias significativas entre el efecto de las fracciones y el control con BSA con *S. graminum* (prueba t,  $p < 0,05$ ). En cambio, *R. padi* aparecía como más tolerante a la presencia de proteínas en su dieta (Figura 16). Se encontraron diferencias significativas entre dietas con BSA y dietas con proteínas de cebada en todas las concentraciones probadas y entre dietas con BSA y dietas con fracciones con actividad de IPs en una concentración mayor de 0,1 mg/ml (prueba t,  $p < 0,05$ ). Cabe indicar que, por la actividad de las distintas fracciones, en la planta se encuentran niveles que corresponderían a concentraciones entre 0,05 y 0,1 mg/ml. Se estudió luego el efecto de dietas con BSA y de fracciones con actividad de IPs pero en dietas sin aminoácidos. En estos ensayos la sobrevivencia de los áfidos fue un poco menor, pero no se encontraron diferencias significativas (prueba t,  $p < 0,05$ ) entre las dietas con BSA o IPs (datos no mostrados).

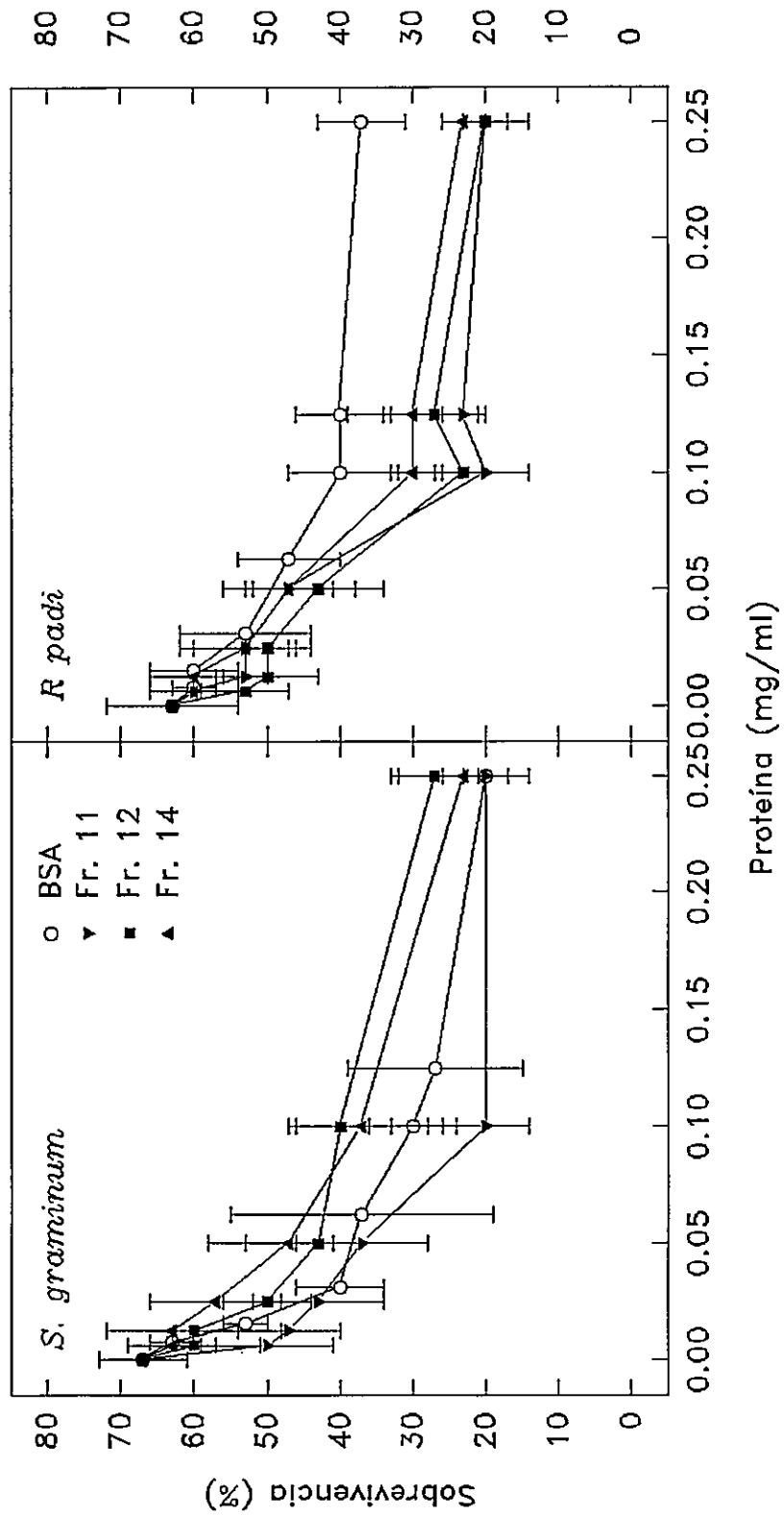


Figura 17. Efecto de IPs de cebada sobre la sobrevivencia de áfidos en dietas artificiales. Diez individuos de los áfidos *S. graminum* o *R. padi* fueron alimentados por 48 horas en dietas artificiales conteniendo BSA o proteínas de las fracciones con actividad inhibitoria de proteinasas separadas en una columna G-75. Cada punto corresponde al promedio de tres mediciones  $\pm$  error estándar.

## DISCUSIÓN

Los niveles basales de actividad de IPs en las hojas de la cebada fueron en general constantes durante las dos primeras semanas de edad en que se realizaron las mediciones (Figura 1). Aunque Frontera mostró una actividad de IPs ligeramente mayor que el resto de los cultivares, la mayor diferencia se encontró en la actividad de inhibidores de quimotripsina en las plantas infestadas. Tanto la actividad basal como la acumulación de IPs en plantas infestadas mostraron una correlación positiva con la susceptibilidad de los cultivares al ataque de áfidos. El cultivar Frontera resultó ser el que acumuló más inhibidores de quimotripsina, fue el más tolerante a la infestación (Tabla 1) y visualmente mostró menos daño producto de la infestación. De los cuatro cultivares, Aramir siempre resultó más deteriorado por la infestación con áfidos, mientras que los cultivares Leo y Libra un nivel intermedio.

Varios estudios en cebada han establecido que los niveles basales de IPs en semillas dependen del cultivar (Boisen y col., 1981). Weiel y Hapner (1976) han correlacionado los niveles basales de IPs en hojas de cebada con la susceptibilidad de algunos cultivares al saltamontes *Campanula pellucida*. Ellos hallaron que, de seis cultivares, uno presentaba mayor actividad contra quimotripsina y era el más resistente al



saltamontes. Sin embargo, los autores no encontraron acumulación de IPs por el ataque del insecto, ni demostraron algún efecto deletéreo contra él.

Aramir y Frontera fueron escogidos para ensayos de infestación con grandes cantidades de pulgones. Fue interesante observar que sólo Frontera respondió acumulando más inhibidores de quimotripsina con cantidades crecientes de pulgones. En este cultivar, a partir de las 12 horas de iniciada la infestación con 20 ó más pulgones por planta, ya se observaron diferencias significativas con respecto a las plantas sin infestar. Este incremento de la actividad concuerda con el tiempo de 4 horas calculado para el inicio de la transcripción de los genes de IPs en tomate (Ryan, 1990). Al igual que en dicotiledóneas, heridas constantes, tal como lo representa la infestación con pulgones, provocaron que la acumulación vaya aumentando con el tiempo.

El descenso de la actividad de IPs después de las 72 horas, puede deberse a una inestabilidad de estas proteínas y a que la síntesis proteica en las células esté afectada cuando el deterioro de la planta se hace severo. La falta de acumulación de IPs podría estar asociada a la ausencia de puentes disulfuro en el caso de los inhibidores de quimotripsina (Boisen y col., 1981). Esta baja estabilidad reduciría la vida media de los IPs en la célula vegetal. En todos los cultivares, la actividad máxima de IPs se registró entre las 24 y 72 horas, casi siempre a las 48 horas. Pese a haber incrementado el número de áfidos en Aramir y Frontera, no se disminuyó el tiempo de máxima actividad a menos de 48 horas.

Mientras los IPs en plantas dicotiledóneas son inducidos por heridas, en cebada los IPs parecen no responder a este tipo de estrés (Kirsi y Mikola, 1977; Weiel y Hapner, 1976). Esta incapacidad de la cebada de acumular IPs por heridas fue verificada. Esto podría deberse a un mecanismo de regulación distinto al que existiría en dicotiledóneas, donde las heridas provocan un aumento de IPs que, dependiendo del nivel de daño, puede ser entre 5 a 20 veces el control (Graham y col., 1986). En los experimentos de esta tesis, sólo la infestación con áfidos provocó una respuesta significativa, aunque con un nivel de inducción más discreto con respecto al que ocurre en las dicotiledóneas. Parece ser que el daño causado por estos insectos es más severo para las células, pudiendo desencadenar una señal que lleve a la acumulación de IPs. La infestación con el áfido *R. padi* derivó en menores actividades de IPs que con *S. graminum*. Esto puede deberse a la distinta conducta de alimentación de estas dos especies de pulgones. Mientras *S. graminum* se alimenta en toda la lámina de la hoja, *R. padi* se ubica principalmente en la vaina de la hoja. Aunque ambos se alimentan preferentemente del floema, *S. graminum* puede causar mayor daño en las células del mesófilo debido a la mayor actividad de las pectinasas que posee en su saliva, ocasionando manchas cloróticas en las zonas de daño (Dreyer y Campbell, 1987). Esto también explicaría por qué las plantas de cebada lucieron más dañadas cuando se infestan con *S. graminum*.

Aunque la respuesta a heridas fue mínima, se esperaba que, con las infestaciones, ocurriría un incremento de actividad de los inhibidores de quimotripsina en el resto de la planta, lo cual no sucedió (Figura 7). Era difícil esperar entonces que, con daño de tipo

mecánico, se pueda lograr una acumulación sistémica. Kirsi y Mikola (1977) también han señalado que no habría inducción sistémica de IPs en la cebada en respuesta a heridas. El hecho de detectar sólo actividad de IPs en la misma hoja dañada (Figura 8), indicaría que la acumulación sistémica de IPs en cebada parece comportarse de una manera más localizada. Esto hace pensar en la probable función de los fragmentos de pared sobre la inducción de IPs (Ryan, 1990) que podrían estar liberándose cuando el áfido destruye células, sumado además a que en cebada, existiría una deficiencia de las señales que estimulan la síntesis de IPs en otros tejidos lejos del daño.

Se sabe que los inhibidores de quimotripsina CI-1 y CI-2 de cebada se asemejan al inhibidor I de papa, el cual sí se acumula en hojas de tomate y papa bajo estrés por heridas (Ryan, 1992; Svendsen y col., 1982). Al igual que estos inhibidores de cebada, el inhibidor I de papa tiene un contenido alto de lisina y bajo de cisteína (Boisen y col., 1981) en contraste de lo que ocurre en la mayoría de los IPs en vegetales. También los inhibidores CI-1 y CI-2 tienen homología con el inhibidor MPI de maíz que responde a ABA, JA, daño mecánico y a daño por hongos (Cordero y col., 1994). La menor respuesta de acumulación de los inhibidores en la cebada podría residir en cambios en el gen, haciendo que su expresión disminuya, o en la proteína, haciéndola menos estable.

Debido a que las heridas producto de la infestación con áfidos, pueden liberar etileno en cebada, se probó la capacidad del ácido cloro-etil-fosfórico (agente liberador de etileno) de incrementar la actividad de IPs, pero no se obtuvieron resultados positivos. Esto concuerda con lo descrito en la literatura, donde también aparece descartada la

participación del etileno en la inducción de IPs (Rickauer y col., 1992; Sanchez-Serrano y col., 1991).

En cebada, se encontró que ABA sólo tenía efecto sobre los inhibidores de quimotripsina (Figura 9), los mismos que incrementaron con la infestación. Debe notarse que tal inducción en cebada no es tan notable como en las solanáceas (Hildmann y col., 1992). En las plantas infestadas se acumuló ABA debido al estrés hídrico, pero se desconoce aún si esta acumulación de ABA es responsable en parte del incremento de los inhibidores de tipo quimotripsina en cebada. Se trató de simular los altos niveles de ABA endógeno con un tratamiento de estrés hídrico, pero las plantas no mostraron incremento de actividad de IPs. Lo mismo se ha informado para plantas de tomate sometidas a estrés de agua (Sánchez-Serrano y col., 1991). Hildmann y col. (1992) han sugerido que el ABA actuaría directamente sobre respuestas de estrés osmótico, pero que, simultáneamente, podría estar involucrado en la transcripción de genes de defensa, una función más compleja donde el ABA actuaría a través de otros factores como el JA. Debe notarse también que, con ABA exógeno se alcanzó niveles de ABA en las hojas similares a los encontrados en hojas infestadas, pero la actividad de inhibidores de quimotripsina sólo llegó a un 50% sobre el control. Esto sugeriría que, además del ABA, otros factores estarían afectando la acumulación de estas proteínas. Una explicación para esto es que, con las infestaciones se produciría ABA en las células, el cual induciría más directamente la síntesis de IPs. En cambio, con la aplicación de ABA, aún después de 48 horas (datos

no mostrados), éste puede quedar distribuido en distintos tejidos de la hoja sin incidir tanto en la síntesis proteica.

Fue interesante encontrar que el JA sólo pudo afectar la actividad anti-tripsina, inclusive con niveles superiores, en los dos cultivares, a los hallados en los experimentos de infestación. También fue peculiar observar que el JA pudo causar la acumulación sistémica de este tipo de inhibidor en otras hojas que no fueron tratadas con JA (Figura 11), lo que no ocurrió en las infestaciones. Nuevamente, el efecto del JA en la cebada fue muy inferior al encontrado en tomate, en el cual el inhibidor I se acumula hasta 40 veces más (Farmer y col., 1992).

Los primeros experimentos sobre la capacidad de inducir IPs se han realizado con extractos crudos, donde se presumía reside el factor inductor o PIIF. La actividad de extractos de tomate no tienen efecto en plantas de cebada. Pero, extractos de cebada tienen mayor actividad inductora de IPs en plantas de tomate que los mismos extractos del tomate (McFarland y Ryan, 1974). La existencia de un poder inductor en cebada y de inhibidores de proteinasas que no responden como en otros sistemas, indicaría que la capacidad de acumular IPs ha sido perdida durante la evolución. Si el JA es la señal principal, parece ser que en cebada, y quizás en otros cereales, esta señal también estaría disminuída. Se ha descrito que la cebada es poco sensible a JA volátil exógeno (Andresen y col., 1992). Esto, sumado a que se ha encontrado niveles bajos de JA endógeno en hojas de cebada (Andresen y col., 1992), indicaría que sería improbable que haya comunicación entre plantas vía JA como ocurre en tomate (Farmer y Ryan, 1990). Sería

interesante estudiar los niveles endógenos de JA cuando las plantas sufren infestación o algún daño físico.

Estos resultados con ABA y JA en cebada, sugerirían que distintos mecanismos estarían participando en la regulación de la inducción de estos inhibidores. El asociar al JA con la acumulación de inhibidores de tripsina, y al ABA con la de inhibidores de quimotripsina, sugeriría que, o la vía de transducción de señales es distinta, o que la respuesta a estas hormonas a la expresión génica, también es diferencial. En solanáceas, en cambio, se ha establecido una cadena de eventos, donde participan ABA y JA, tal como se describió en la introducción.

Los inhibidores de quimotripsina CI-1 y CI-2 de cebada han sido estudiados por Boisen y col. (1981), quienes estimaron masas moleculares de 6.500 a 9.000 Da para las formas monoméricas de ambos inhibidores y una masa cerca de 22.000 y 24.000 Da para las isoformas de los dímeros. En la presente tesis se separaron dos picos de actividad contra quimotripsina de los extractos de hojas (Figura 5). Las masas moleculares calculadas por cromatografía de exclusión molecular (7.000 a 8.000 Da y 19.000 Da) son semejantes a los valores reportados por estos autores. Estas proteínas separadas podrían corresponder a iso-inhibidores que aparecerían en los tejidos vegetativos juveniles (Kirsi y Mikola, 1977). El pico de actividad contra tripsina que eluyó en la columna, también tiene una masa molecular (13.000 a 14.000 Da) similar al valor reportado para el inhibidor de tripsina presente en el embrión. Un valor de 14.400 Da ha sido estimado por Mikola y Suolinna (1969), mientras que Boisen y Djurtoft (1982) encontraron que la

masa molecular era de aproximadamente 16.000 Da. Odani y col. (1983), al secuenciar el inhibidor, determinaron una masa molecular de 13.305 Da. Nuestro valor estimado coincide con la observación que el inhibidor de tripsina del embrión sería el mismo que está presente en las hojas de cebada (Kirsi, 1974).

Es poca la información acerca de la acumulación de inhibidores de proteasas en cereales causada por un agente agresor. Los datos presentados en este trabajo sugieren cierta tendencia que podría ocurrir en cebada. Sin embargo, queda aún caracterizar mejor a los inhibidores que estarían dando cuenta de esta mayor actividad durante la infestación.

Como se mencionó antes, se conoce la existencia de algunas proteasas y peptidasas en algunas especies de áfidos (Auclair, 1963). Se ha informado que *Myzus persicae*, *Eriosoma lanigerum*, *Pterocomma populae*, *R. padi* y *Schizolachmus* sp. presentan actividad de tripsina, catepsina y peptidasas ácidas en la glándula salival y en el estómago. En el áfido *Viteus vitifoliae* se encuentra también una actividad proteásica en el intestino (Srivastava, 1987). Los ensayos con los IPs de cebada en dietas artificiales, mostraron que tienen poco efecto sobre la sobrevivencia de los áfidos. Aunque algunas especies pueden tener actividad proteásica en el tracto digestivo, es aceptado que la mayoría de áfidos no requerirían de proteasas, debido a que la presencia de proteínas en su alimento obtenido del floema es escasa o nula. La mayor tolerancia presentada por *R. padi* a dietas con proteínas podría estar explicada por cierta actividad proteásica que existiría en su tracto digestivo (Srivastava, 1987). Si los IPs son factores de resistencia contra *R. padi*, es algo que aún debe ser estudiado. Los áfidos pueden evitar organelos

ricos en compuestos repelentes cuando se alimentan de la planta, sin penetrar las vacuolas, o degustando entre las células (Dreyer y Campbell, 1987).

La presencia de IPs en hojas de cebada podría representar sólo otro factor de resistencia. La menor susceptibilidad de algunos cultivares es el resultado del papel de varios factores tales como: barreras morfológicas en las hojas, metabolitos secundarios pre-existentes como la gramina, o metabolitos inducibles como compuestos fenólicos y flavonoides (Corcuera, 1993). El alcaloide gramina ha demostrado ser un compuesto disuasivo para la alimentación de áfidos (Zúñiga y Corcuera, 1986). La mayor resistencia mostrada por Frontera podría estar también determinada por la presencia de gramina. Mientras Frontera tiene  $1,44 \pm 0,07$  mmoles/Kg peso fresco de gramina, el resto de los cultivares estudiados tienen niveles no detectables (datos no publicados). Sin embargo, se conocen otros cultivares de cebada con más del doble de niveles de este alcaloide (Corcuera, 1990). En cultivares más susceptibles puede ser importante el papel de sólo algunos compuestos. Por ejemplo, en Aramir se acumulan compuestos fenólicos como el ácido ferúlico el cual afecta la sobrevivencia de áfidos (Cabrera y col., 1995b). La infestación con áfidos también provoca la activación de la vía fenil-propanoide y la acumulación de flavonoides, los cuales han probado ser deletéreos para los áfidos (Corcuera, 1993). Su importancia en la cebada sigue siendo investigada. Factores ambientales también afectan la susceptibilidad de la cebada a los pulgones. Por ejemplo, el estrés hídrico incrementa la susceptibilidad (Zúñiga y Corcuera, 1987) y la presencia de



sales, como el cloruro de sodio, incrementan la resistencia de la cebada a los áfidos (Araya, 1987).

Se puede pensar que, debido a la existencia de varios factores de resistencia en el cultivar Frontera, los áfidos hacen más heridas en las hojas buscando alimento y evitando compuestos deletéreos. Esto activaría la maquinaria de defensa en este cultivar más que en otro cultivar menos resistente, como la acumulación de IPs que, además, podría ser más funcional que en otros cultivares. No obstante, cabe indicar que la inducción de IPs en plantas aparece como una respuesta general, independientemente del agente causante del daño. En cebada, la acumulación de IPs inducida por cualquier daño como el causado por los áfidos, podría actuar como una barrera contra otro patógeno o plaga que ataque a la planta vulnerable.

En los últimos años se ha avanzado bastante en el conocimiento de los mecanismos de defensa de las plantas, entre ellos los IPs. En la investigación en esta área, se ha demostrado el efecto contra proteasas de origen animal (bovino o porcino). Para conocer el real espectro de acción de los IPs de plantas, los estudios deben ampliarse a las proteinasas de los enemigos naturales. Quedan muchos otros IPs de los cuales se desconocen sus propiedades o posible uso en contrarrestar el ataque de insectos y patógenos. Parece que este potencial recién está siendo explotado.

## CONCLUSIONES

1. En cebada existen niveles basales de inhibidores de proteinasas (IPs) que son constantes en las primeras dos semanas de edad de la planta y que no variaron significativamente entre los cultivares estudiados. Sin embargo, tanto los niveles basales como la acumulación de IPs mostraron una correlación con la susceptibilidad de los cultivares a la infestación por áfidos: el cultivar Frontera mostró una mayor acumulación de inhibidores de quimotripsina cuando es infestado con áfidos.
2. Al infestar con el áfido *Rhopalosiphum padi*, las actividades de ambos inhibidores de proteasas fueron menores que cuando se infestó con *Schizaphis graminum*. La actividad máxima de los IPs se observaron entre las 48 y 72 horas de infestación.
3. Con daño mecánico en las hojas de cebada, se registró un leve aumento de las actividades de los inhibidores de proteinasas, el que fue siempre menor que en las infestaciones.

4. A diferencia de la respuesta sistémica que se conoce para dicotiledóneas, en cebada no se pudo detectar actividad de inhibidores en una hoja sana de una planta dañada, pero sí en una zona sin daño de una hoja dañada.
5. En zonas infestadas y libres de infestación también se acumuló ABA. Tratamientos con ABA exógeno, causaron sólo aumento de la actividad de inhibidores de quimotripsina. Sin embargo, plantas sometidas a estrés hídrico, con elevado nivel de ABA endógeno, no acumularon IPs.
6. Con ácido jasmónico, se obtuvo un aumento de actividad contra tripsina, mas no contra quimotripsina. Los resultados obtenidos con ABA y JA sugerirían que en cebada existe un mecanismo diferente de regulación de la acumulación de estos dos tipos de inhibidores.
7. Al igual que en otras familias de plantas, etileno no aumentó la actividad de inhibidores de proteinasas en cebada.
8. En el fraccionamiento de las proteínas solubles, se lograron separar dos actividades de inhibición de quimotripsina, correspondiendo a masas moleculares de aproximadamente 8 y 19 KDa y un tipo de inhibidor de tripsina de 13 KDa. Estos

valores estimados son muy similares a las masas de los inhibidores de proteinasas que se conocen en semillas de cebada.

9. Ensayos con dietas artificiales, mostraron que los inhibidores de proteinasas de cebada no tuvieron efecto en la sobrevivencia de *S. graminum*, pero sí en la de *R. padi*.

#### **Conclusión General:**

La infestación con los áfidos *S. graminum* y *R. padi*, provoca la acumulación de IPs en hojas de cebada, siendo los inhibidores de quimotripsina más acumulados que los de tripsina. El mecanismo de acumulación y el significado biológico de estos IPs en cebada, son aspectos cuyo estudio aún debe ser profundizado.

## BIBLIOGRAFIA

Alarcón, J-J. y Malone, M. 1994. Substantial hydraulic signals are triggered by leaf biting insects in tomato. *J. Exp. Bot.* 45: 953-957.

Andresen, Y., Becker, W., Schlüter, K., Burges, J., Parthier, B. y Apel, K. 1992. The identification of a leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol. Biol.* 19: 193-204.

Araya, F. 1987. Salinidad y resistencia de gramíneas cultivadas y silvestres al ataque de áfidos. Tesis de Magister, Universidad de Chile.

Auclair, J. L. 1963. Aphid feeding and nutrition. *Annu Rev. Entomol.* 8: 439-490.

Baydown, E. A. y S. C. Fry. 1985. The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta* 165: 269-276.

Boari, F. y Malone, M. 1993. Wound-induced hydraulic signals: survey of occurrence in a range of species. *J. Exp. Bot.* 44: 741-746.

Bode, W. y Huber, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204: 433-451.

Bodnaryk, R. P. y Rymerson, R. T. 1994. Effect of wounding and jasmonates on the physico-chemical properties and flea beetle defence responses of canola seedlings, *Brassica napus* L. *Can. J. Plant Sci.* 74: 899-907.

Bohlmann, H. y Apel, K. 1991. Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 227-240.

Boisen, S. 1983. Protease inhibitors in cereals. Occurrence, properties, physiological role, and nutritional influence. *Acta Agric. Scand.* 33: 369-381.

Boisen, S., Andersen, C. Y. y Hejgaard, J. 1981. Inhibitors of chymotrypsin and microbial serine proteases in barley grains. *Physiol. Plant.* 52: 167-176.

- Boisen, S. y Djurtoft, R. 1982. Protease inhibitor from barley embryo inhibiting trypsin and trypsin-like microbial proteases. Purification and characterization of two isoforms. *J. Sci. Food Agric.* 33: 431-440.
- Boulter, D. 1993. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry* 34: 1453-1466.
- Bowles, D. J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Broadway, R. M. y Duffey, S. S. 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32: 827-833.
- Broadway, R. M., Duffey, S. S., Pearce, G. y Ryan, C. A. 1986. Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? *Entomol. Exp. Appl.* 41: 33-38.
- Burgess, E. P., Main, C. A., Stevens, P. S., Christeller, J. T., Gatehouse, A. M. y Laing, W. A. 1994. Effects of proteinase inhibitors concentration and combination on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. *J. Insect Physiol.* 40: 803-811.
- Cabrera, H. M., Argandoña, V. H. y Corcuera, L. J. 1995a. Effect of infestation by aphids on the water status of barley and insect development. *Phytochemistry* 40: 1083-1088.
- Cabrera, H. M., Muñoz, O., Corcuera, L. J. y Argandoña, V. H. 1995b. Changes in ferulic acid and lipid content in aphid-infested barley. *Phytochemistry* 39: 1023-1026.
- Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J., Royo, J., Medina, J., Martínez de Ilarduya, O., Acevedo, F., Gadour, K., Oñate, L. y Díaz, I. 1994. A multigene family from barley encoding inhibitors of trypsin and heterologous  $\alpha$ -amilases: gene characterization and expression. En: *Proceedings of the International Meeting of Wheat Kernel Proteins, Molecular and Functional Aspects.* pp. 121-127.
- Casaretto J. A. y Corcuera, L. J. 1995. Plant proteinase inhibitors: a defensive response against insects. *Biol. Res.* 28: 239-249.

Constabel, P., Bergey, D. R. y Ryan, C. A. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signalling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 407-411.

Corcuera, L. J. 1990. Plant chemicals and resistance of cereals to aphids. *AMBIO* 19: 365-367.

Corcuera, L. J. 1993. Biochemical basis for the resistance of barley to aphids. *Phytochemistry* 33: 741-747.

Cordero, M. J., Raventós, D. y San Segundo, B. 1994. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J.* 6: 141-150.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4114-4119.

Creelman, R. A., Tierney, M. L. y Mullet, J. E. 1992. Jasmonic acid / methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4938-4941.

Dadd, R. H. y Mittler, T. E. 1966. Permanent culture of an aphid on a totally synthetic diet. *Experientia* 22: 832-835.

Doares, S. H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A. y Ryan, C. A. 1995a. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 108:1741-1746.

Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W. y Ryan, C. A. 1995b. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4095-4098.

Dreyer, D. L. y Campbell, B. C. 1987. Chemical basis of host-plant resistance to aphids. *Plant Cell Environ.* 10: 353-361.

Dreyer, D. L. y Jones, K. C. 1981. Feeding deterrency of flavonoids and related phenolics toward *Schizaphis graminum* and *Myzus persicae*: aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry* 20: 2489-2493.

Eckelkamp, C., Ehmann, B. y Schopfer, P. 1993. Wound-induced systemic accumulation of a transcript coding for a Bowman-Birk trypsin-related protein in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *FEBS Lett.* 323: 73-76.

Farmer, E. E. y Ryan, C. A. 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716.

Farmer, E. E. y Ryan, C. A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134.

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 Physiol.* 98: 995-1002.

García-Olmedo, F., Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Gómez, L., Royo, J., Carbonero, P. 1987. Plant proteinaceous inhibitors of proteases and  $\alpha$ -amilases. *Oxf. Surv. Plant. Mol. Cell. Biol.* 4: 275-334.

García-Olmedo, F., Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Hernández-Lucas, C., Carmona, M. J., López-Fando, J. J., Fernandez, J. A., Gómez, L., Royo, J., García-Maroto, F., Castagnaro, A., Carbonero, P. 1992. Trypsin /  $\alpha$ -amilase inhibitors and thionins: possible defence proteins from barley. En: *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. Shewry P. R. Eds. Wallingford: C.A.B. International. pp. 335-350.

Gatehouse, A. M. y Boulter, D. 1983. Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the burchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *J. Sci. Food Agric.* 34: 345-350.

Graham, J. S., Hall, G., Pearce, G. y Ryan, C. A. 1986. Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta* 169: 399-405.

Green, T. R. y Ryan, C. A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.

Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Baker, R. F. y Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.

Hildmann, T., Ebneith, M., Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J., Willmitzer, L. y Prat, S. 1992. General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4: 1157-1170.

Hoffmann, M. P., Zalom, F. G., Wilson, L. T., Smilanick, J. M., Malyj, L. D., Kiser, J. Hilder, V. A. y Barnes, W. M. 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 2516-2522.



- Ishikawa, A., Yoshihara, T. y Nakamura, K. 1994. Structure-activity relationships of jasmonates in the induction of expression of two proteinase inhibitor genes of potato. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 544-547.
- Johnson, R., Narváez, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9871-9875.
- Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Visser, B. y Stiekema, W. J. 1994. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. *Planta* 195: 29-35.
- Kernan, A. y Thornburg, R. W. 1989 Auxin levels regulate the expression of a wound inducible proteinase inhibitor-II-chloramphenicol acetyl transferase gene fusion *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol.* 91: 73-78.
- Kettner, J. y Dörffling, K. 1987. Abscisic acid metabolism in *Ceratocysti coerulescens*. *Physiol. Plant.* 63: 278-282.
- Kirsi, M. y Mikola, J. 1971. Occurrence of proteolytic inhibitors in various tissues of barley. *Planta* 96: 281-291.
- Kirsi, M. 1973. Formation of proteinase inhibitors in developing barley grain. *Physiol. Plant.* 29: 141-144.
- Kirsi, M. 1974. Proteinase inhibitors in germinating barley embryos. *Physiol. Plant.* 32: 89-93.
- Kirsi, M. y Mikola, J. 1977. Occurrence and heterogeneity of chymotrypsin inhibitors in vegetative tissues of barley. *Physiol. Plant.* 39: 110-114.
- Kumari, S. y Chandrashekar, A. 1992. Proteins in developing sorghum endosperm that may be involve in resistance to grain moulds. *J. Sci. Food Agric.* 60: 275-282.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M. y Dixon, R. A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215-224.
- Laskowski, M. y Kato, Y. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 593-626.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.

- Lipp, J. 1991. Detection of ABA and proline in pollen. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. 187: 211-216.
- Malone, M. 1992. Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings. *Planta* 187: 505-510.
- Markwick, N. P., Reid, S. J. Laing, W. A. y Cristeller, J. T. 1994. Effects of dietary protein and protease inhibitors on codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 33-39.
- McFarland, D. y Ryan, C. A. 1974. Proteinase inhibitor-inducing factor in plant leaves. A phylogenetic survey. *Plant Physiol.* 54: 706-708.
- McGurl, B., Pearce, G. Orozco-Cárdenas, M. y Ryan, C. A. 1992. Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255: 1570-1573.
- McGurl, B., Orozco-Cárdenas, M., Pearce, G. y Ryan, C. A. 1994. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9799-9802.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B. y Yelle, S. 1993. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatin I and II. *FEBS Lett.* 331: 173-176.
- Mikola, J. y Suolinna, E. M. 1969. Purification and properties of a trypsin inhibitor from barley. *Eur. J. Biochem.* 9: 555-560.
- Narváez-Vásquez, J., Orozco-Cárdenas, M. L. y Ryan, C. A. 1994. A sulphydryl reagent modulates systemic signalling for wound-induced and systemin-induced proteinase inhibitor synthesis. *Plant Physiol.* 105: 725-730.
- Narváez-Vásquez, J., Pearce, G., Orozco-Cárdenas, M. L., Franceschi, V. R. y Ryan, C. A. 1995. Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic traslocation of systemin in tomato plants. *Planta* 195: 593-600.
- Odani, S. e Ikenaka, T. 1977. Studies on soybean trypsin inhibitors. X. Isolation and partial characterization of four soybean double-headed proteinase inhibitors. *J. Biochem.* 82: 1513-1522.
- Odani, S., Koide, T y Ono, T. 1983. The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 258: 7998-8003.

Orozco-Cárdenas, M., McGurl, B. y Ryan, C. A. 1993. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8273-8276.

Parthier, B. 1990. Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *J. Plant Growth Regul.* 9: 57-63.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. y Ryan, C. A. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.

Peng, J. H. y Black, L. L. 1976. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*. *Physiol. Biochem.* 66: 958-963.

Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J., Rocha-Sosa, M. y Willmitzer, L. 1988. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. *Planta* 174: 84-89.

Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J-J., Martens, R., Willmitzer, L. y Prat, S. 1989. Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 9851-9855.

Peña-Cortés, H., Fisahn, J. and Willmitzer, L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 4106-4113.

Reinbothe, S., Mollenhauer, B. y Reinbothe, C. 1994. JIPS and RIPS: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6: 1197-1209.

Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry* 16: 159-169.

Rickauer, M., Bottin, A. and Esquerré-Tugayé, M-T. 1992. Regulation of proteinase inhibitor induction in tobacco cells by fungal elicitors, hormonal factors and methyl jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 579-584.

Ryan, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 173-196.

Ryan, C. A. 1974. Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitor-inducing factor, a wound hormone. *Plant Physiol.* 54: 328-332.

- Ryan, C.A. 1981. Proteinase inhibitors. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol 6 (Eds) p. 351. Academic Press, New York.
- Ryan, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425-449.
- Ryan, C. A. 1992. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* 19: 123-133.
- Sambder, G. y Parthier, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589.
- Sánchez-Serrano, J. J., Amati, S., Ebner, M., Hildmann, T., Mertens, R., Peña-Cortés, H., Prat, S. y Willmitzer, L. 1991. The involvement of ABA in wound responses of plants. En: *Abscisic Acid, physiology and biochemistry*. W. J. Davis y H. G. Jones Eds. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, pp. 201-216.
- Schaller, A., Bergey, D. R. y Ryan, C. A. 1995. Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *Plant Cell* 7: 1893-1898.
- Schwert, G. W. y Takenaka, Y. 1955. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta* 16: 570-575.
- Srivastava, P. N. 1987. Nutritional physiology. En: *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Vol A. Minks, A. K. y Harrewijn, P. Eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 107-108.
- Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. C. y Jones, J. D. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Staswick, P. E. 1992. Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol* 99: 804-807.
- Svendsen, Y., Boisen, S. y Hejgaard, J. 1982. Amino acid sequence of serine protease inhibitor CI-1 from barley. Homology with the barley inhibitor CI-2, potato inhibitor I and leech eglin. *Carlsberg Res. Commun.* 47: 45-53.
- Taylor, B. H., Young, R. J. y Scheuring, C. F. 1993. Induction of a proteinase inhibitor II-class gene by auxin in tomato roots. *Plant. Mol. Biol.* 23: 1005-1014.
- Thornburg, R. W. y Li, X. 1990. Auxin levels decline in tobacco foliage following wounding. *Plant Physiol.* 93: 500-504.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. y Ryals, J. 1994. Salicylic acid is not the traslocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6: 959-965.

Walker-Simmons, M. y Ryan, C. A. 1977. Immunological identification of proteinase inhibitors I and II in isolated tomato leaf vacuoles. *Plant Physiol.* 60: 61-63.

Weiel, J. y Hapner, K. D. 1976. Barley proteinase inhibitors: a possible role in grasshopper control. *Phytochemistry* 15: 1885-1887.

Wildon, D. C., Thain, J. F., Minchin, P., Gubb, L. R., Reily, A. J., Skipper, Y. D., Doherty, H. M., O'Donnell, P. J. y Bowles, D. J. 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360: 62-65.

Wolfson, J. L. and Murdock, L. L. 1987. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. *Entomol. exp. appl.* 44: 235-240.

Zúñiga, G. E. y Corcuera, L. J. 1986. Effect of gramine in the resistance of barley seedlings to the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Ent. Exp. Appl.* 40: 259-262.

Zúñiga, G. E. y Corcuera, L. J. 1987. Glycine betaine accumulation influences susceptibility of water stressed barley to the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* 26: 367-369.