



Acta Universitaria

ISSN: 0188-6266

actauniversitaria@ugto.mx

Universidad de Guanajuato

México

Blanco-Labra, Alejandro; Aguirre Mancilla, César
Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas
Acta Universitaria, vol. 12, núm. 3, septiembre-diciembre, 2002, pp. 3-28
Universidad de Guanajuato
Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41612201>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

RESUMEN / ABSTRACT

Las plantas careciendo de un sistema de defensa basado en anticuerpos similar al que existe en animales, basan su protección en características físicas y en una serie de componentes que la propia planta sintetiza. Dentro de esos compuestos, las proteínas constituyen una de las principales fuentes de defensa, no sólo por su elevada especificidad y eficiencia, sino porque además algunas de ellas son altamente reguladas, respondiendo su síntesis al ataque de los depredadores (insectos) o de los patógenos. Estas proteínas representan una interesante alternativa para producir plantas con mejores características de resistencia, ya que a través de mecanismos de fitomejoramiento o bien introduciendo el gen a plantas sensibles, por medio de la ingeniería genética. El conocimiento de sus mecanismos de acción representa una forma importante para aprender a combatir plagas y enfermedades de las plantas, sin tener que utilizar compuestos altamente contaminantes, como son los insecticidas comerciales.

The plants lacking a defense system based on similar antibodies to which exists in animals, bases their protection on physical characteristics and in a series of components that the own plant synthesizes. Inside those compounds, the proteins constitute one of the main defense sources, not only for their high specificity and efficiency, but because some of them are also highly regulated, their synthesis responding to the attack of the insects or by pathogens. These proteins represent an interesting alternative to produce plants with better resistance characteristics, since through breeding mechanisms or introducing the gene a susceptible plant, by means of the genetic engineering. The knowledge of its action mechanisms represents an important form to learn how to combat plagues and illnesses of the plants, without having to use compound highly polluting, like the commercial insecticides.

¹ Artículo por invitación.

* Cinvestav-Unidad Irapuato. km 9.6 libramiento norte carretera Irapuato-León, C.P. 36500, Irapuato, Gto. México.

Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas¹.

Alejandro Blanco-Labra* y César Aguirre Mancilla*.

INTRODUCCIÓN

El constante ataque de insectos y de patógenos sobre las plantas y granos almacenados, produce pérdidas muy elevadas para los agricultores, quienes han tenido que recurrir tradicionalmente al uso intensivo de pesticidas. Sin embargo, su utilización presenta grandes problemas, ya que al no ser específicos contra una clase particular de organismos, y dado que su toxicidad abarca una amplia variedad de organismos, han generado daños considerables tanto a la ecología, como a los organismos superiores, debido a que éstos también son blanco de su toxicidad. Además, al llegar las lluvias, éstas arrastran a los insecticidas remanentes, produciendo serias contaminaciones de los mantos freáticos. Es por ello que es necesario estudiar mecanismos alternos que nos permitan generar plantas con mayor resistencia al ataque de insectos y de patógenos, tales como los hongos, virus y nematodos, buscando mecanismos naturales que tengan una elevada selectividad y que además, en las condiciones en las que el producto se ingiere, no presenten toxicidad contra los humanos o contra los animales. Las plantas han generado con la evolución una serie de sistemas de defensa contra el ataque de insectos y patógenos basados en barreras estructurales o químicas o generando una respuesta metabólica activa. La resistencia de la plantas está frecuentemente dividida por lo tanto en defensa constitutiva, expresada como una característica normal del desarrollo de la planta, o defensa inducible, la cual se activa al contacto con un organismo invasor. Este último requiere un sistema de vigilancia, el cual permita el reconocimiento de la amenaza, generando un sistema de transducción de señales y una ruta de respuesta, usualmente regulada a nivel transcripcional por medio de la expresión de genes relacionados con la defensa (Lamb y col. 1989). Existe un número elevado de proteínas que han sido descritas como parte de los mecanismos de defensa de las plantas, las cuales, sólo actuarían sobre los depredadores que ataquen a la planta o a los granos, no produciendo ningún efecto sobre otros organismos. Por esta razón, es importante considerar que estos

PALABRAS CLAVE: Mecanismos de defensa de plantas; Proteínas de defensa; Inhibidores de enzimas.

KEYWORDS: Defense mechanisms; Defense proteins; Enzyme inhibitors.

mecanismos alternos no deben ocasionar daño cuando el hombre o los animales los utilizan como alimento. Esto puede ocurrir debido a su inactivación durante el proceso de cocimiento, o bien, debido a su estricta selectividad que le permita reconocer como blanco solamente al insecto o patógeno correspondiente.



Figura 1. Maíz infestado con *Sitotroga cerealella*.



Figura 2. Almacenamiento inadecuado de maíz. El maíz en las comunidades rurales tiende a ser almacenado en muchas ocasiones al aire libre, lo cual ocasiona que las plagas (aves, insectos y microorganismos) tengan libre acceso a éste.

A.- Interacciones de plantas con parásitos y depredadores.

Existe una enorme variedad de agentes bióticos con el potencial de depredar o parasitar tejidos de plantas, entre los que se incluyen invertebrados, especialmente insectos, nemato-



Figura 3. Almacenes de Granos en el Edo. de Zacatecas.

dos y microorganismos tales como hongos, bacterias, micoplasmas y virus. Las relaciones entre estos agentes y la planta huésped también varían ampliamente desde transitorias en tejidos expuestos, hasta asociaciones íntimas de largo tiempo con un alto grado de dependencia y especificidad. Muchos hongos parásitos de plantas, algunos nematodos e insectos y todos los virus y hongos son completamente dependientes de células vegetales vivas para completar su ciclo de replicación. La relación planta-parásito involucra la adquisición de nutrientes de células y tejidos vivos, la cual puede ser directamente contrastada con aquella en la que la célula huésped es rápidamente destruida o desintegrada. El primero es usualmente descrito como asociación biotrófica y el último, como necrotrófica. La importancia de esta distinción radica en la naturaleza de la interfase planta-parásito involucrada y el grado al cual el organismo colonizante es expuesto a diferentes componentes de la célula huésped.

Una segunda característica importante de las interacciones planta-invertebrado y planta-microorganismo, es que muchos son tejidos o células específicos. Generalmente, la planta huésped no es explotada de manera indiscriminada, aun los insectos que las consumen (por masticación), usualmente exhiben preferencias por ciertos órganos o tejidos de la planta. Los agentes biotróficos, tales como hongos (parásitos obligados), adoptan rutas de penetración altamente específicas en el huésped, seguidas por un pa-

trón ordenado de crecimiento en sus tejidos (Shewry y Lucas 1997).

Mientras un sistema de clasificación no pueda acomodar toda la diversidad biológica observada en las interacciones planta-plaga y planta-patógeno, se pueden hacer ciertas generalizaciones. Los invertebrados plaga pueden ser ampliamente agrupados en los que se alimentan de tejidos vegetales, consumiendo tanto material extracelular como contenido celular y los que adoptan un sitio de alimentación más localizado. Los gastrópodos tales como babosas y caracoles poseen sistemas digestivos capaces de degradar muchos sustratos de plantas. Muchos insectos del orden Orthoptera y larvas de Lepidoptera, también mastican y consumen tejidos de plantas, ingiriendo pared celular, citoplasma y contenidos vacuolares. En contraste, otros insectos como áfidos y chapulines o langostas (Hemiptera), extraen la savia de elementos vasculares por medio de estiletes. El tejido dañado es así mantenido a un mínimo. Una distinción similar se aplica también a los nematodos, donde consumidores migratorios que desintegran células y después se mueven a otras partes, pueden ser contrastados con endoparásitos sedentarios que inducen y mantienen sitios de alimentación en el tejido del huésped (Burrows y Jones, 1993). Estos últimos son verdaderos biótropos, los cuales actúan disminuyendo los nutrientes asimilados por el huésped. El mantenimiento de una interfase viable huésped-patógeno es esencial para completar su ciclo reproductivo.

Las relaciones planta-microorganismo son extremadamente diversas, pero pueden describirse con base en dos criterios: modo de adquisición de nutrientes (necrotróficos y biotróficos) y localización celular (Shewry y Lucas 1997).

El rango de hongos fitopatógenos va desde los que colonizan invadiendo por daño, hasta los biótropos especializados que colonizan tejidos vivos intactos. Los primeros son típicamente necrotróficos, los cuales crecen como hifas no modificadas en espacios intercelulares, secretan

enzimas y toxinas, y adquieren los nutrientes por la digestión de los polímeros de la planta. En contraste, los biótropos tales como hongos, también conocidos como mohos (rusas), mohos vellosos y polvosos, forman una serie de estructuras de infección modificadas permitiéndoles la penetración a la epidermis de la planta, o la entrada vía estomas (Mendgen y Deising, 1993). El subsecuente desarrollo es principalmente intercelular, con producción de haustorios intracelulares. Estas estructuras rompen la pared celular e invaginan la membrana plasmática de la célula huésped, la cual permanece viable. La adquisición de nutrientes involucra la toma de azúcares y otros solutos a través de la membrana extrahaustorial. La secreción de enzimas líticas es altamente localizada y el daño al huésped es mínimo, al menos en las etapas tempranas de la infección.

La mayoría de las bacterias que infectan plantas crecen en espacios intercelulares y adquieren nutrientes, al menos inicialmente, de fluidos apoplásticos o de sustratos en la pared celular de la planta. Muchos son necrotróficos y causan lesiones por absorción de agua, y la célula vegetal muere debido a la acción de toxinas o enzimas líticas. La entrada o penetración es típicamente por daños o aperturas naturales tales como los estomas.

Los virus son parásitos moleculares, los cuales sólo pueden replicarse en células vivas del huésped. El ciclo de replicación varía, dependiendo de la naturaleza del genoma viral, sin embargo, involucra transcripción y traducción del genoma y síntesis de proteínas virales (Scholthof y col., 1993). Estos procesos ocurren en el núcleo o citoplasma del huésped, dependiendo del tipo de virus, y requieren componentes de la célula huésped para completarse. La dispersión del virus a células adyacentes, frecuentemente involucra una proteína de movimiento, especializada para facilitar el transporte a través del plasmodesmo (Lucas y Gilbertson, 1994). La infección sistémica de la planta huésped, requiere del movimiento de grandes distancias del virus a través de tejidos del floema

(Hull, 1989). Las interacciones planta-virus, son mecanísticamente distintas de otros agentes bióticos y las bases de resistencia son probablemente diferentes también.

B.- Tipos de defensa de plantas.

Una de las principales revelaciones de la investigación de la defensa de las plantas, es que la resistencia a plagas y patógenos es usualmente compleja y basada en la acción combinada de varios factores, más que de un simple componente. Una distinción fundamental es frecuentemente trazada entre las características preexistentes o constitutivas de la planta, y los sistemas inducibles que se prenden por el ataque de una plaga o patógeno. Éstos, pueden ser además subdivididos en defensa estructural, basada en características anatómicas de la pared celular y defensa química, basado en compuestos biológicamente activos de altos o bajos pesos moleculares. Tales distinciones no son absolutas, sin embargo, algunos componentes de la defensa constitutiva pueden ser también producidos durante una respuesta activa, e inhibidores químicos pueden, por ejemplo, ser precursores de polímeros tales como la lignina, la cual es incorporada en barreras estructurales.

En la resistencia a invertebrados plaga, tal como sucede con los insectos, se incluyen factores que modifican el comportamiento del animal sobre la planta huésped, así como los que afectan la calidad de la planta como fuente de alimentación. Así, los componentes estructurales o químicos, pueden actuar para repeler o disuadir al insecto de la planta seleccionada como fuente de alimento (Smith, 1989). Si tales defensas fallan, entonces, otros componentes tales como los antinutricionales, pueden asegurar que la planta sea un huésped pobre en cuanto a valor nutricional, limitando así el grado de daño. La respuesta activa al ataque incluye efectos sistémicos tales como la síntesis de inhibidores de proteasas en tejidos lejanos al sitio inicial de daño.

Los factores constitutivos, tanto anatómicos como químicos tales como: cutícula, pared ce-

lular e inhibidores enzimáticos preformados, son utilizados para prevenir la colonización de tejidos de la planta, por la mayoría de los microorganismos no patógenicos. Si ocurriera una penetración por parte del microorganismo, entonces los sistemas de defensa inducibles serían activados. Esto incluye una rápida generación de especies activas de oxígeno (Levine y col., 1994), cambios en los polímeros de pared celular, síntesis de compuestos de bajo peso molecular como las fitoalexinas (Dixon, 1986), producción de proteínas relacionadas con la defensa, y muerte celular hipersensitiva. Colectivamente estos sistemas primero inhiben y después sellan al colonizador potencial. En términos genéticos es usual distinguir entre genes de reconocimiento, los cuales codifican proteínas receptoras o asociadas con rutas de transducción de señales (Lamb, 1994), y genes de respuesta, los cuales codifican proteínas que actúan como factores de defensa o como enzimas biosintéticas en rutas que dirigen a la producción de compuestos de defensa (Kombrink y col., 1993). Tal respuesta puede estar localizada en el sitio de conflicto, o ser expresados sistémicamente en otros órganos y tejidos.

Las proteínas de plantas además tienen papeles claves en muchos aspectos de la defensa, tanto como factores constitutivos de resistencia, como formando parte de la compleja cascada de respuesta de resistencia.

C.- Proteínas protectoras - propiedades generales.

Las proteínas protectoras pueden ser divididas en dos grandes grupos basados en sus patrones de expresión, aunque hay una considerable sobreposición entre ellas. El primer grupo de proteínas puede ser descrito como constitutivo o tejido-específico, y su expresión no está relacionada a la infección o daño, aunque pueden estar restringidos a órganos, tejidos o tipos de células específicos. Éstos están particularmente diseminados en semillas y otros tejidos de almacenamiento donde su presencia podría estar confiriendo resistencia al daño o infección en pre- y

post-cosecha. Sin embargo, también podrían estar en algunos tejidos vegetativos, en gomas y látex.

Las proteínas protectoras constitutivas/tejido-específicas más ampliamente estudiadas son los inhibidores de enzimas hidrolíticas, principalmente de proteasas y amilasas. Estos inhibidores, los cuales están frecuentemente presentes en altas cantidades, actúan como proteínas de reserva (Richardson, 1991).

Los inhibidores de enzimas de plantas están clasificados en familias, basados en la secuencia de aminoácidos, estructura y sus especificidades (Tabla 1). En el caso de los inhibidores de proteasas, los mejor estudiados han sido los de serín proteasas como tripsina, quimotripsina y subtilisina. Estos incluyen los inhibidores más ampliamente estudiados como son los Bowman-Birk y Kunitz, los cuales constituyen los principales componentes en semillas y leguminosas como la soya. Sin embargo, también se han caracterizado inhibidores de otra clase meca-

nística de proteasas, como carboxipeptidasas y cisteín proteasas. Estas últimas llamadas cistatinas, han sido analizadas en mayor detalle en arroz y son de particular interés en relación a la protección contra invertebrados plaga. Los inhibidores de α -amilasa han sido también caracterizados, aunque estos pueden ser altamente específicos para enzimas de una particular fuente (por ejemplo, algunos tipos de insectos, bacterias, hongos, plantas, mamíferos o aves). En algunos casos, tales proteínas son bifuncionales, inhibiendo tanto proteasas como α -amilasas. Por ejemplo, en semillas de trigo y cebada se encontró un inhibidor de α -amilasa y tripsina de la superfamilia de los cereales (llamados proteínas CM) (García-Olmedo y col., 1992a), un inhibidor bifuncional del mismo tipo está presente en ragi (Shivaraj y Pattabiraman, 1981) y en maíz el inhibidor de 12 kDa mostró tener ambas funciones (Blanco-Labra y col., 1995). Richardson (1991) ha enfatizado que además de la ya demostrada actividad inhibitoria, tiene mucha más amplia especificidad que la inicialmente pensada, como ejemplo, un inhibidor de

α -amilasa de semilla de lágrimas de Job (*Coix lachryma-jobi* L.), también exhibe actividad de endoquitinasa (Ary y col., 1989). Algunos inhibidores podrían tener otras actividades como puede inducirse por su semejanza con secuencias de aminoácidos de proteínas conocidas. Así, el inhibidor I-2 de α -amilasa de ragi (*Eleusine coracana*), está relacionado a un grupo supuesto de proteínas que transfieren fosfolípidos (LTPs phospholipid transfer proteins) (Bernhard y Somerville, 1989). Los inhibidores de proteasas están también presentes en tubérculos de papa, en bulbos de otras plantas, en secreciones como la goma arábiga, en látex y en tejido vegetativo (Xavier-Filho y Campos, 1989).

Tabla 1. Familia de inhibidores de proteasas.

Familia	Monómero		Enzimas inhibidas	Distribución
	kDa	Cisteínas		
1.- Bowman-Birk	8-9(14)	14(18)	Tripsina Quimotripsina Elastasa	Leguminosas Gramíneas
2.- Kunitz	21-22	4	Tripsina Quimotripsina Subtilisina Kalikreina Amilasa	Leguminosas Gramíneas Aráceas Alismatáceas
3.- Papa I	8-9	0-2	Quimotripsina Tripsina Subtilisina	Solanáceas Gramíneas Leguminosas Poligonáceas Cucurbitáceas
4.- Papa II	6(12)	8	Tripsina Quimotripsina	Solanáceas
5.- Cucúrbitas	3	6	Tripsina Factor Hageman	Cucurbitáceas
6.- Superfamilia Cereales	12-13	10	Amilasa Tripsina Factor Hageman	Gramíneas Crucíferas Euforbiáceas Lecitidáceas Leguminosas
7.- Ragi AI2/cebada arroz(LTP)	12-13	7-8	Amilasa ¿Proteasa?	Gramíneas
8.- Carboxi-peptidasas	4	6	Carboxipeptidasa	Solanáceas
9.- Tipo Cistatina	12	0	Cisteín Proteasa	Gramíneas Animales

Tomado de Richardson (1991) con modificación de Shewry y Lucas (1997).

Las semillas son ricas fuentes de muchas otras proteínas que tienen funciones protectoras. Por ejemplo: la cebada, la cual se ha estudiado en particular detalle, contiene tioninas, endoquitinasas, proteínas que inactivan ribosomas (RIP), β -glucanasas, LTP, lectinas, peroxidasa, proteínas tipo taumatina, además de al menos tres familias de inhibidores de enzimas (Shewry, 1993).

El segundo gran grupo de proteínas protectoras exhiben patrones de expresión más altamente regulados, siendo inducidos en respuesta a infección o daño. Éstas, incluyen las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), las cuales han sido ampliamente estudiadas y fueron inicialmente identificadas en hojas de tabaco, respondiendo hipersensitivamente a la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Van Loon y Van Kammen, 1970). Al menos diez proteínas PR están presentes en tabaco, y han sido clasificadas en cinco grupos en base a las relaciones estructurales y serológicas (Pierpoint y Shewry, 1987). Se han identificado en un gran número de especies y son inducidas por infección microbiana (virus, viroides, bacterias y hongos) o con ciertos inductores químicos, como el ácido salicílico y ácido acetil salicílico. Subsecuentes trabajos han mostrado que este efecto está relacionado con el papel del salicilato en la ruta de transducción de señales de la planta huésped. Las proteínas PR generalmente tienen masas moleculares relativas (Mr) entre 10000 y 40000, tienden a ser ácidas y ser extraídas selectivamente a bajo pH, ser resistentes a proteólisis y a estar localizadas en espacios intercelulares. Sin embargo, ahora se sabe que existen formas básicas de muchas proteínas PR y que éstas se localizan en vacuola, más que en apoplasto.

Los cinco grupos de las proteínas PR han mostrado estar involucrados con la defensa de plantas, como las quitinasas (grupo 3), β -1,3-glucanasas (grupo 2) y proteínas antifúngicas (grupos 1, 4, 5) (Niderman y col., 1995). Las proteínas PR también han sido identificadas en otras especies incluyendo otros miembros de la

familia de las solanáceas (tomate, tabaco), cereales (cebada, maíz) y girasol (Jung y col., 1993).

Otras proteínas relacionadas con la defensa inducidas por infección o daño incluyen los inhibidores de proteasas PI y PII de papa. Estos inhibidores de tripsina y quimotripsina, no sólo son inducidos por daño mecánico en hojas, sino también son expresados en tubérculo y flores (Ryan y An, 1988).

2. RESISTENCIA A PATÓGENOS MICROBIANOS.

A. Endohidrolasas.

Dos de los principales grupos de las proteínas PR inducidas por infección en tabaco por el virus del mosaico del tabaco (VMT), son las β -1,3-glucanasas (grupo 2 de las proteínas PR) y endoquitinasa (grupo 3 de las proteínas PR) (Linthorst y col., 1990). Ya que los b-glucanos y la quitina están presentes en la pared celular de muchos hongos patógenos (Bowles, 1990), no es sorprendente que ambos grupos de endohidrolasas hayan mostrado propiedades antifúngicas. Ambos tipos de endohidrolasas existen en dos formas: - isoformas extracelulares ácidas (proteínas PR clásicas) y las isoformas vacuolares básicas (Neuhaus y col., 1991). Las dos formas están estrechamente relacionadas estructuralmente, pero difieren en la presencia en las enzimas básicas de extensiones en el extremo C-terminal, las cuales son necesarias para dirigir estas proteínas a la vacuola.

Las endoquitinasas de plantas frecuentemente muestran actividad de lisozima, y algunas lisozimas de endoquitinasa (Collinge y col., 1993); ambas actividades requieren de la hidrólisis de enlaces β -1,4 entre homopolímeros de *N*-acetilglucosamina para quitinasa y entre el ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina para lisozima.

Las propiedades antifúngicas de las β -1,3-glucanasas y endoquitinasas han sido confirmadas por ensayos *in vitro* e *in vivo*, mostrándose

que la combinación de las dos enzimas provee mucha más actividad que cada una por separado (Melchers y col., 1994).

B. Proteínas que unen quitina: heveína y lectinas.

Muchas proteínas presentes en plantas son capaces de unirse a quitina, un polímero de enlaces β -1,4 de *N*-acetilglucosamina presente en exoesqueletos de insectos y nemátodos así como en pared celular de hongos, excluyendo Oomycetes. Esta unión resulta de la secuencia conservada de 30-43 aminoácidos, llamado dominio de "Unión a Quitina" (Raikhel y col., 1993). Tal dominio está presente en quitinasas clase I de *Amaranthus caudatus* (*Ac*-AMP1 y *Ac*-AMP2). También está presente en lectinas y una clase de proteínas tipificadas como heveína, la cual es una proteína presente en el látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*).

La heveína es una proteína de 43 aminoácidos, la cual consta esencialmente del dominio de unión a quitina. Es sintetizada como una preproteína de 204 residuos, la cual contiene una secuencia señal, la heveína y una proteína C-terminal de 144 residuos, la cual está también presente en el látex. La expresión de heveína en hojas, tallos y látex es inducida por daño, pero no en raíces (Broekaert y col., 1990). La proteína heveína inhibe el crecimiento *in vitro* de diversos hongos (Van Parijs y col., 1991).

Las lectinas se unen a quitina y otros glicoconjugados conteniendo *N*-acetilglucosamina o ácido *N*-acetilneuráminico y también causan la aglutinación de los glóbulos rojos de mamíferos. Un gran número de lectinas han sido caracterizadas de especies de cereales, leguminosas y solanáceas. Éstas, varían ampliamente en estructura y secuencia, pero todas contienen el dominio de unión a quitina. Algunas de ellas han mostrado tener propiedades antimicrobianas (Raikhel y col., 1993).

La lectina más ampliamente estudiada es la aglutinina del germen de trigo, una proteína de Mr 36000, la cual consta de dos cadenas idénti-

cas de 171 residuos de aminoácidos y mostró inhibir el crecimiento de *Trichoderma viride* (Mirelman y col., 1975). Similarmente, la lectina de papa (una proteína rica en hidroxiprolina ver Kieliszewski y col., 1994), inhibió el crecimiento de las hifas y la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* (Callow, 1977).

C. Tioninas

Las tioninas fueron primeramente purificadas de la harina del germen de trigo en la década de los 40's y fueron llamadas purotioninas (Balls y col., 1942a,b). Aunque inicialmente se pensó que eran lipoproteínas debido a su presencia en los extractos de éter de petróleo, posteriormente se identificaron en extractos de soluciones salinas. Se han purificado proteínas relacionadas de otros cereales (cebada, centeno, avena) mostrando que todas son ricas en cisteína (Mr 5000) y residuos básicos (García-Olmedo y col., 1989). Estas tioninas de semillas de cereales pueden ser consideradas como tipo I, mientras que un grupo separado de tioninas inducidas por patógenos presentes en hojas de cebada (Reimann-Philipp y col., 1989), están más relacionadas a las proteínas encontradas en las hojas de la planta parasítica *Pyrularia pubera* y son llamadas tipo II. Los demás tipos de tioninas, están presentes en semillas, hojas y tallos de muérdago (*Viscum*); y en hojas y tallos de *Dendrophthora* y *Phoradendron* (tipo III); y en semillas de *Crambe abyssinica* (tipo IV) (Florack y Stiekema, 1994).

Las tioninas tipo I de trigo (específicas de endospermo) (purotioninas) y cebada (hordotioninas) y las tioninas tipo II de cebada (específicas de hoja), han mostrado ser tóxicas a una serie microorganismos, incluyendo levaduras, así como, bacterias y hongos patógenos (Florack y Stiekema, 1994). Por ejemplo, Molina y colaboradores (1993a), mostraron que una serie de tioninas purificadas fueron tóxicas a algunas bacterias patógenas. Los mecanismos moleculares de la toxicidad de las tioninas no son aún conocidos, pero García-Olmedo y col.

(1992b) discuten tres posibilidades: alteración de la permeabilidad de la membrana resultando en pérdida de electrolitos, inhibición de síntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas) e interferencia con reacciones redox relacionadas con tiorredoxina.

D. Proteínas PR-1 (proteínas relacionadas con la patogénesis).

Las proteínas PR-1 son las más abundantes de las proteínas PR de tabaco que han sido reportadas. Se acumulan por arriba del 2% de la proteína total de las hojas (Alexander y col., 1993). Éstas, comprenden tres proteínas estrechamente relacionadas (PR-1a, -1b, -1c) de Mr 14000-16000. PR-1 es inducida por infección en tabaco por el virus del mosaico del tabaco (VMT), pero no inhibe la infección por el virus cuando se expresa constitutivamente en células de tabaco transgénico (Linthorst y col., 1989). Las proteínas PR-1 parecen aumentar la resistencia contra patógenos Oomycetes, Alexander y col. (1993) mostraron que la expresión constitutiva de PR-1a en plantas de tabaco transgénico reduce la infección por *Peronospora tabacina* y *Phytophthora parasitica*. Más recientemente Niderman y col. (1995) mostraron que las proteínas PR-1 purificadas de tomate y tabaco inhibieron el crecimiento de *Phytophthora infestans*. Los mecanismos para esta actividad son aún desconocidos.

E. Proteínas relacionadas a taumatina

Las proteínas relacionadas a taumatina (PR-5) de tabaco, son inducidas por infección con el VMT (Vigers y col., 1992). Dos isoformas tienen 97% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos, cada una consta de 226 residuos incluyendo el péptido señal de 25 residuos (Payne y col., 1988). Estas proteínas contienen seis cisteínas, las cuales por comparación con taumatina (aproximadamente un 65% de identidad), se predice que forman ocho puentes disulfuro (De Vos y col., 1985).

Proteínas PR relacionadas con taumatina han sido reportadas en otras dicotiledoneas, por

ejemplo en *Arabidopsis*, *Phaseolus*, papa (Uknes y col., 1992) y en cereales (cebada, trigo), donde su síntesis es inducida por hongos patógenos (Rebmann y col., 1991).

Mientras que las proteínas PR clásicas están presentes en espacios intercelulares, la osmotina se encuentra localizada en la vacuola y está asociada con la adaptación a altas presiones osmóticas (La Rosa y col., 1986). Ésta ha sido caracterizada en detalle de células de tabaco adaptadas a sal, en donde su localización en vacuola parece ser resultado de una extensión C-terminal de 20 residuos (Bednarek y Raikhel, 1991). Subsecuentemente, se ha mostrado que fue también expresada en hojas de tabaco infectadas con VMT, formando el componente básico de las proteínas PR-5 (Stintzi y col., 1991). Se ha mostrado que la osmotina NP24 de tomate es idéntica a la proteína PR P23 (Rodrigo y col., 1991), en tanto que Zhu y colaboradores (1995b), mostraron que genes tipo osmotina en tabaco son inducidos por estrés osmótico e infección fúngica. Así, la osmotina resulta ser análoga a la clase II de β -1,3-glucanasas y endoquitinasas, las cuales son también vacuolares.

Se ha demostrado la actividad antifúngica que poseen la proteínas PR relacionadas con taumatina y osmotina, por ejemplo: Woloshuk y col. (1991) mostraron que la osmotina de tabaco (osmotina II) y de tomate (NP24/AP24) causaron la lisis de esporangios de *Phytophthora infestans* y también inhibieron el crecimiento de la hifa. De manera similar, Vigers y col. (1992), mostraron que la osmotina de tabaco inhibió el crecimiento de *Candida albicans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesi*, mientras que las proteínas PR-5 relacionadas con taumatina fueron inactivas contra estos hongos.

F. Defensinas, péptidos antimicrobianos (AMPs) y antifúngicos (AFPs).

Cammue y col. (1992) purificaron dos péptidos antimicrobianos altamente básicos de semillas de *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). Estos péptidos fueron llamados Mj-AMP1 y Mj-

AMP2, consistieron de 37 y 36 residuos de aminoácidos respectivamente, de los cuales cuatro difirieron entre los dos péptidos. Ambos tienen tres puentes disulfuro y parecen estar presentes como dímeros *in vivo*. Ambos son sintetizados como pre-proteínas, conteniendo una secuencia señal en el N-terminal (De Bolle y col., 1995), pero su localización subcelular en la semilla no ha sido reportado.

Péptidos antifúngicos de *Mirabilis jalapa* (Mj-AFPs) inhibieron el crecimiento de 15 especies de hongos patógenos de plantas, el péptido Mj-AFP1 mostró niveles más altos de actividad. Estos péptidos inhibieron el crecimiento de dos bacterias Gram-positivas (*Bacillus megaterium* y *Sarcina lutea*) pero no el de bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *Erwinia carotovora*). Una búsqueda de homología mostró una similitud significativa en la secuencia de aminoácidos al grupo de neurotoxinas insecticidas, las μ -agatoxinas producidas por la araña *Agenelopsis aperta*. Sin embargo, los péptidos antifúngicos no tuvieron efecto en la transmisión de pulsos en nervios de insectos, de hecho, no ha sido reportado que estos péptidos tengan actividad insecticida.

El segundo tipo de péptidos antimicrobianos proviene de semillas de *Amaranthus caudatus*. Los péptidos Ac-AMP1 y Ac-AMP2 constan de 29 y 30 residuos, respectivamente, con secuencias idénticas, excepto por el residuo adicional en el extremo C-terminal del último. Estos péptidos también son altamente básicos (pI por arriba de 10) y son ricos en cisteínas con tres puentes disulfuro. Sus secuencias son homólogas a los dominios de unión a quitina de las proteínas que unen quitina como las lectinas y heveína, además se ha demostrado que su unión a quitina es reversible. Ambos péptidos inhibieron el crecimiento de varios hongos patógenos con valores de CI_{50} (concentración de inhibición media) de 2-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, comparados con los valores mucho más altos (por arriba de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) para la lectina de *Urtica dioica* y para la quitinasa de chícharo. Estos péptidos inhibieron también bacterias Gram-positivas.

Sin embargo, las actividades antibióticas y antifúngicas fueron antagonizadas por cationes (K^+ , Ca^{2+}) (Broekaert y col., 1992).

Las defensinas de plantas se asemejan a Mj-AMPs y a Ac-AMPs en varios aspectos: son moléculas pequeñas (45-54 residuos), básicos y ricos en cisteína (cuatro puentes disulfuro).

Muchas defensinas han mostrado inhibir el crecimiento *in vitro* de hongos patógenos de plantas a concentraciones micromolares, con dos tipos de efectos. Rs-AFP1 y -2 de rábano y Hs-AFP1 de *Heuchera sanguinea* (Saxifragaceae) (Terras y col., 1995; Osborn y col., 1995) son "morfogénicas", éstas reducen el alargamiento hifal e incrementan su ramificación. En contraste, las defensinas "no morfogénicas" de *Dahlia* (Asteraceae) (Dm-AMP1) y *Clitoria* (Ct-AMP1) (Osborn y col., 1995), reducen la extensión hifal sin efecto significativo en el patrón de crecimiento. Estos dos tipos de defensinas, también difieren en sus actividades relativas contra diferentes hongos.

Las defensinas de cereales muestran una débil actividad contra hongos patógenos, pero inhiben α -amilasa de humanos y algunos insectos (langostas, cucarachas) (Osborn y col., 1995).

Terras y col. (1995), mostraron que las defensinas fueron exudadas de semillas de rábano en germinación, acumulándose cerca del 30% del total de la proteína liberada. Esto resultó en un halo de inhibición cuando las semillas fueron puestas en un medio de crecimiento fúngico, indicando que podrían actuar protegiendo a la semilla en germinación *in vivo*.

Hay evidencia que las defensinas son sintetizadas en hojas y otros tejidos, particularmente en respuesta a infección. Terras y col. (1995), mostraron que péptidos (Mr 5000) reaccionaron con anticuerpos a Rs-AFP1, y transcritos que hibridaron con la correspondiente clona de cDNA, estuvieron presentes a bajos niveles en hojas sanas de rábano, pero se incrementaron en infección con *Alternaria brassicola*. Moreno y

col. (1994), también identificaron una defensina, la cual fue llamada pseudotionina-ST1, en flores, tubérculos, tallos y hojas de papa. Este péptido fue activo contra varias bacterias y hongos patógenos (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pseudomonas solanacearum* y *Fusarium solani*).

Una nueva clase de pequeños péptidos antimicrobianos han sido purificados de semillas de *Aralia chinensis* (Araliaceae) (*Arc*-AMP1 y -2) e *Impatiens balsamina* (Balsaminaceae) (*Ib*-AMP1 a -4). Se determinó la secuencia de aminoácidos de *Ib*-AMP1 y -2, mostrando que cada una consta de 20 residuos incluyendo cuatro cisteínas, y no presentó una homología significativa con las otras proteínas. Estos cuatro péptidos son el producto de un solo gen, el cual codifica una proteína precursora de 333 residuos, conteniendo una copia para *Ib*-AMP2, -3 y -4 y tres copias para *Ib*-AMP1 (Attenborough y col., 1995).

Los seis péptidos (*Arc*-AMPs y *Ib*-AMPs) mostraron inhibir el crecimiento de hongos patógenos de plantas *in vitro* (Attenborough y col., 1995).

G. Proteínas no específicas que transfieren fosfolípidos.

La historia de las proteínas que transfieren fosfolípidos inicia cuando Campos y Richardson (1984) reportaron la secuencia de aminoácidos de una proteína de 95 residuos de semillas de ragi (*Eleusine coracana* Gaern.) que inhibió α -amilasas de animales. Una clona de ADNc que codifica una proteína relacionada fue caracterizada, proveniente de tejido de aleurona de cebada (Svensson y col., 1986) y fue llamada "probable inhibidor de amilasa/proteasa" (PIAP). PIAP es claramente específico para la capa de aleurona de semillas de cebada, siendo probablemente el mejor marcador molecular de este tejido (Kalla y col., 1994). Bernhard y Somerville (1989) sugirieron que esta proteína fuera de hecho proteínas no específicas que transfieren fosfolípidos (LTPs), basados en la

homología de la secuencia con LTPs de espinacas, maíz e higuera. Subsecuentes estudios mostraron que PIAP fue capaz de transferir fosfatidilcolina de liposomas a mitocondrias de papa *in vitro* (Breu y col., 1989), a pesar de que no se ha demostrado aún esta actividad *in vivo*. La exacta localización de PIAP y la carencia de especificidad en sus propiedades de transferencia, bien podría argüir contra tal papel *in vivo*. De manera similar, Thoma y col. (1993) demostraron que LTP no específico de *Arabidopsis* fue localizado en pared celular y principalmente restringido a células epidermales, sugiriendo que esto es inconsistente con el papel del transporte intracelular de lípidos. De hecho, la localización de LTPs en las capas exteriores de órganos de plantas (epidermis, aleurona) y en pared celular es más consistente con un papel de defensa en la planta.

Broekaert y colaboradores (1995), caracterizaron LTPs de semillas de cebolla, rábano, trigo y maíz como parte de su amplio estudio de proteínas antimicrobianas (Cammue y col., 1995); se han aislado LTPs antimicrobianas de hojas de *Arabidopsis*, espinacas, cebada y trigo (Segura y col., 1993). Las LTPs de diferentes fuentes varían en sus especificidades para diferentes hongos patógenos y podrían también inhibir el crecimiento de bacterias patógenas tales como *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas solanacearum* (Cammue y col., 1995; García-Olmedo y col., 1995). Las actividades de las LTPs complementaron o incrementaron la actividad de las tioninas presentes en el mismo tejido, por lo tanto, estos dos grupos de proteínas defensivas podrían actuar de manera concertada. Por ejemplo, LTPs actúan conjuntamente con tioninas contra la bacteria *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, y sinérgicamente contra el hongo patógeno *Fusarium solani* (García-Olmedo y col., 1995). Evidencias adicionales para el papel *in vivo* en la resistencia contra patógenos, vienen de la observación de expresión de genes de LTP que pueden ser inducidos por infección, aunque también pueden ser inducidos por agentes abióticos como las bajas de temperatura (García-Olmedo y col., 1995).

H. Proteínas que inactivan ribosomas.

Las proteínas de plantas que inactivan ribosomas, o RIPs (ribosome-inactivating proteins), son *N*-glicosidasas que rompen el enlace *N*-glicosídico de adenina en una secuencia específica del ARN de ribosomas eucariotes, dejándolos incapacitados para sintetizar proteínas (Stirpe y col., 1992). Estas proteínas no inactivan a los ribosomas de la planta o especies estrechamente relacionadas, además se ha sugerido que juegan un papel en la resistencia a patógenos. Las RIPs están clasificadas en dos grupos, llamados tipo 1 y 2. Las RIPs tipo 1 son polipéptidos simples de Mr 26000-32000, usualmente están glicosiladas y tienen baja actividad citotóxica. En contraste, las RIPs del tipo 2 son sintetizadas con un dominio lectina de unión a galactosa, el cual es separado postraduccionalmente, pero permanece asociado por un solo puente disulfuro, estas proteínas están usualmente glicosiladas. El dominio lectina (B), interactúa con la membrana celular para permitir la entrada al dominio (A) de *N*-glucosidasa, resultando en una aguda citotoxicidad.

La alta toxicidad de las RIPs tipo 2, ejemplificada por ricina de higuera, la cual ha representado un caso interesante ya que fue empleada para ejecutar un asesinato político (Stirpe y col., 1992). Esta proteína, al ser considerada como un veneno tan potente, la hace poco probable para que se acepte como agente para conferir protección a plantas que sean productoras de alimentos. Sin embargo, se han tenido algunos éxitos con las RIPs del tipo 1, proporcionando protección contra virus y hongos.

La RIP antiviral mejor documentada, es la proteína antiviral de *Phytolacca americana* (PAP). Ésta, es una mezcla de tres proteínas (PAP, PAPII, PAP-5) las cuales están presentes en diferentes tejidos: hojas de invierno, hojas de verano y semillas (Barbieri y col., 1982). PAP está presente en la pared celular de las células del mesófilo (Ready y col., 1986) y previene la transmisión mecánica de virus cuando se aplica a la superficie de las hojas.

Lodge y col. (1993), expresaron PAP y una forma mutante con sustitución de dos aminoácidos en tabaco y tomate. En todos los casos, la proteína estuvo presente en fluidos intercelulares y las plantas mostraron resistencia a transmisión mecánica de virus: virus X de la papa, virus X del tomate y virus del mosaico del pepino. Los mecanismos de resistencia son desconocidos, aunque Lodge y col. (1993) sugieren que PAP puede introducirse en la célula con el virus y prevenir la traducción del RNA viral, o unirse al virus o a la pared celular para prevenir la entrada del virus a la célula.

I. Lisozima

Las Lisozimas de clara de huevo y bacteriófagos están entre las proteínas más ampliamente estudiadas, éstas inhiben el crecimiento bacteriano por hidrólisis de peptidoglicanos de la pared celular. Un buen número de enzimas bifuncionales con actividades de lisozima y endoquitinasa se han reportado en plantas (Kombrink y col., 1991). Se piensa que juegan un papel en la defensa contra bacterias patógenas.

Düring y col., (1993) seleccionaron lisozima del bacteriófago T4 debido a su alta actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y la expresaron en papa transgénica, bajo el control del promotor CaMV35S con un péptido señal de α -amilasa para asegurar que esta proteína llegara al sistema secretorio. Los niveles de expresión de la proteína fueron bajos, cerca del 0.001% del total de la proteína soluble, y al parecer glicosilada (a diferencia de la proteína sintetizada en bacteria). Ensayos de inmunodetección mostraron que la proteína fue localizada en pared celular y espacios intercelulares y mostró mayor resistencia a la infección por *Erwinia carotovora*.

J. Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas han sido ampliamente estudiados en relación a la resistencia contra invertebrados. Sin embargo, Pautot y col. (1991), mostraron además, que la infección

por *Pseudomonas syringae* pv *tomato* en hojas de tomate, induce la acumulación de ARNm de los inhibidores I y II de papa. En ese estudio se muestra que el ARNm del inhibidor II se acumula más rápidamente que el inhibidor I en plantas resistentes que en susceptibles. Además, Lorito y col. (1994), mostraron que una combinación de inhibidores de tripsina y quimotripsina de hojas de tabaco, suprimieron la germinación de esporas y el alargamiento del embrión de *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani*, pero no afectaron a *Alternaria brassicola*, el cual es un patógeno específico de repollo.

K. Proteínas que inhiben poligalacturonasa (PGIPs).

Durante la colonización de tejidos, los microorganismos patógenos de plantas, especialmente los patógenos necrotróficos, despliegan enzimas hidrolíticas extracelulares contra polímeros de pared celular. Tales enzimas, incluyen pectato liasas y poligalacturonasas (PGs), las cuales han sido implicadas como factores de patogenicidad de bacterias y hongos patogénicos de plantas.

Proteínas que inhiben poligalacturonasa (PGIPs Polygalacturonase-Inhibiting Proteins) han sido detectadas en una amplia variedad de plantas dicotiledóneas, incluyendo plántulas de soya (Favaron y col., 1994) y en frutos tales como tomate (Stotz y col., 1994), manzana (Yao y col., 1995) y pera (Sharrock y Labavitch, 1994). La PIPG de *Phaseolus*, ya ha sido purificada y caracterizada (Cervone y col., 1987), y el gen que la codifica (PGIP) ya ha sido clonado (Toubart y col., 1992).

La PGIP de frijol, es sintetizada como una proteína precursora la cual es procesada después de la traducción para producir un polipéptido de Mr 34000 (Toubart y col., 1992). La presencia de un péptido señal hidrofóbico, es consistente con la evidencia previa de que la PGIP es una proteína secretada y localizada en la matriz extracelular. La actividad inhibitoria de PGIPs parece estar restringida a endopoligalac-

turonasas de hongos. También hay diferencias en la actividad relativa de inhibición hacia poligalacturonasas purificadas de diferentes hongos (Favaron y col., 1994), y diferentes isoenzimas de un mismo hongo (Yao y col., 1995). El papel preciso de las PGIPs en interacciones planta-patógeno es difícil de evaluar. Una hipótesis atractiva es la que propone que estos inhibidores, localizados en la pared celular del huésped, alteran la cinética de degradación de polímeros pécticos por poligalacturonasas fúngicas tales como los de alta proporción de oligogalacturónidos, para que sean producidos en el rango de tamaño requerido para evocar las respuestas de defensa de la planta (Cervone y col., 1989). De acuerdo a este punto de vista, las poligalacturonasas pueden actuar como factores potenciales de avirulencia, por la liberación en presencia de PGIP de moléculas señal que activan la ruta de defensa de la planta. En la ausencia de PGIP, tales oligómeros son rápidamente despolimerizados a productos finales inactivos.

Resumiendo, las PGIPs son una familia de glicoproteínas secretadas inducibles en respuesta al daño, relativamente estables al calor, las cuales están presentes en la pared celular de un gran número de plantas dicotiledóneas. Éstas pertenecen a la clase de proteínas con Repetidos Ricos en Leucina (RRL), las cuales están involucradas en las interacciones proteína-proteína y parecen tener un importante papel en el reconocimiento de señales patogénicas.

3. INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los polipéptidos y proteínas que inhiben enzimas proteolíticas están presentes en casi todas las formas de vida. En plantas están generalmente concentradas en tejidos de almacenamiento, como semillas y tubérculos, particularmente en las gramíneas, leguminosas y solanáceas. Su abundancia en estas familias y tejidos no es única, ya que se han encontrado en raíces y hojas en géneros de otras familias.

Las familias de inhibidores que se han encontrado son específicas para cada una de la clases mecanísticas de enzimas proteolíticas que de acuerdo con el aminoácido que es esencial para su actividad, se clasifican en: serín proteasas, cisteín proteasas, ácido aspártico proteasas, metaloproteasas (Barret, 1986). Además, recientemente se ha agregado el grupo de treonin proteasas, presente en los complejos multienzimáticos conocidos como proteasomas (Seemüller y col., 1995)

El papel de los inhibidores en la regulación de las actividades proteolíticas es muy importante por la protección que proporcionan a tejidos y fluidos de la degradación no deseada. Altas concentraciones de inhibidores de proteasas se encuentran en tejidos y fluidos tales como suero sanguíneo (Travis y Salvesen, 1983), células pancreáticas (Neurath, 1984) y tejidos de almacenamiento de plantas (Richardson, 1980)

Los inhibidores de proteasas encontrados en plantas, generalmente contienen altos porcenta-

jes de cisteína formando puentes disulfuro, lo cual los hace resistentes a la desnaturalización por calor y pH's extremos. La tabla 1 muestra una lista de familias de inhibidores de proteasas encontradas en plantas, además se ha propuesto una nueva lista de familias de proteínas (no de inhibidores) entre los cuales se encuentran algunos inhibidores de proteasas (Tabla 2).

Los inhibidores de proteasas son elementos importantes de la respuesta de defensa de la planta a la depredación. La producción de estos inhibidores está altamente regulada por una ruta de transducción de señales que es iniciada por el ataque del patógeno y transducida como una respuesta de daño. Los insectos usan uno o una combinación de serín, cisteín o aspártico proteasas como principales enzimas proteolíticas digestivas (Wolfson y Murdock, 1990). Los inhibidores de estas enzimas son producidos por plantas y presumiblemente modulan el crecimiento y desarrollo de estas plagas atenuando la degradación de proteínas. Los inhibidores de serín proteasas de plantas son los más extensa-

mente caracterizados, y se ha postulado que funcionan en la defensa contra el ataque de herbívoros. Estos inhibidores se han subdividido en once familias basados en su secuencia primaria (Tabla 3) (Bode y Huber, 1993). Dos de estas familias están ampliamente diseminadas en leguminosas: Bowman-Birk y Kunitz. A pesar de las diferencias topológicas y de secuencia primaria, el mecanismo de acción y la estructura del sitio reactivo de los inhibidores de serín proteasas de plantas están bien conservados, con excepción del grupo de las serpinas. Los inhibidores de cisteín proteasas de plantas están tipificados por las fitocistatinas, las cuales inhiben proteasas de la superfamilia de la papaína. En algunos insectos como coleópteros y hemípteros así como en nemátodos fitopatógenos, las

Tabla 2. Familias de Proteínas que contienen inhibidores de proteasas.

Familia	Tamaño aproximado del dominio y número de dominios
1. Inhibidor de tripsina pancreática bovina	60 residuos
2. Inhibidor de serín proteasas (Kazal)	55 residuos; 7 dominios o más
3. Inhibidor de tripsina de Soya (Kunitz)	180 residuos
4. Inhibidor Bowman-Birk	35 residuos; 2 dominios
5. Inhibidor de la Papa I	70 residuos
6. Inhibidor de la Papa II	50 residuos; 1 o 2 dominios; 5 dominios o más en el producto de traducción original
7. Inhibidor de Calabaza	30 residuos
8. Inhibidor de tripsina de Cebada	120 residuos
9. Taumatina	200 residuos
10. Inhibidor de tripsina de <i>Ascaris</i>	60 residuos
11. Inhibidor de Langosta	35 residuos; 2 dominios en el producto de traducción original.
12. Ecotinas	140 residuos; 2 subunidades
13. Serpinas	400 residuos
14. Inhibidor de subtilisina de <i>Streptomyces</i>	110 residuos
15. Hirudina	65 residuos
16. Cistatinas	110 residuos; generalmente un sólo dominio, 3 en kininogenos y 8 en multicistatina de papa
17. Calpastatina	140 residuos; 4 dominios inhibitorios
18. Inhibidor de Carboxipeptidasas de Papa	40 residuos
19. Inhibidor de Carboxipeptidasas de <i>Ascaris</i>	40 residuos
20. Inhibidor de Colagenasas	200 residuos
21. Inhibidor de Pepsina de <i>Ascaris</i>	150 residuos
22. a-2-Macroglobulina	1500 residuos; 2 a 4 subunidades

Tomado de Reeck y col., 1997.

Cuando no se indica el número del dominio, la proteína es de un solo dominio.

Tabla 3. Lista de familias de los inhibidores de serín proteasas.

1. Inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI-Kunitz).
2. Kazal.
3. Inhibidor de tripsina de soya (STI-Kunitz).
4. Inhibidor de subtilisina de <i>Streptomyces</i> (SSI).
5. Inhibidor de papa I.
6. Inhibidor de papa II.
7. Quelonianinas.
8. Bowman-Birk.
9. Inhibidor de semilla de cucurbitáceas.
10. Serpinas.
11. Hirudina

Tomado de Bode y Huber (1993).

mayores actividades proteolíticas son aparentemente el resultado de proteasas tipo papaína.

A. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de los inhibidores de serín proteasas con la enzima que reconoce presentan un “mecanismo estándar”, es decir que la asociación enzima-inhibidor se lleva a cabo a través de la interacción del sitio reactivo del inhibidor con el sitio activo de la enzima, similar a la del complejo enzima-sustrato.

B. Inhibidores de proteasas y defensa de plantas.

La regulación de proteasas es un componente integral de procesos bioquímicos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta y para la respuesta de defensa de la misma. Aunque hay evidencias directas de la participación de los inhibidores de serín y cisteín proteasas en la respuesta de defensa de la planta (Urwin y col., 1995), sus funciones fisiológicas son inferidas de patrones de desarrollo y de la expresión de genes inducidos ambiental y químicamente (Bottella y col., 1996). La información acerca de la regulación de las actividades de inhibidores de aspártico y metaloproteasas es aún limitada.

B1. Tejidos de almacenamiento

Los inhibidores de proteasas se acumulan durante la maduración de la semilla o tubérculo,

sugiriéndose que estos elementos facilitan la acumulación de proteínas de reserva atenuando las actividades de las proteasas. De acuerdo a esto, las giberilinas inducen la germinación y expresión de genes de proteasas en semilla e inhiben la expresión de genes de inhibidores de proteasas (Jacobsen y Olszewski, 1996). Por otro lado, el ácido abscísico (ABA) inhibe la germinación de las semillas y concomitantemente induce la expresión de genes de inhibidores de serín proteasas. Por ello se ha argumentado, que la acumulación de inhibidores de serín proteasas durante la maduración de semillas y tubérculos es un indicador de su función en la defensa, ya que el mantenimiento de la integridad de estos órganos es esencial para la sobrevivencia de la especie (Koiwa y col., 1997). Dos inhibidores de serín proteasas (inhibidores I y II) se acumulan en frutos en desarrollo de *Lycopersicon peruvianum*, indicando una función durante la maduración (Pearce y col., 1988). Se presume que una función es la de protección de las semillas al ataque de herbívoros durante la embriogénesis y maduración. Debido a que las concentraciones de los inhibidores I y II decrecen en la maduración del fruto, se cree que estos inhibidores no funcionan como disuadores después de la maduración del fruto, ya que los herbívoros facilitan la dispersión de las semillas de *L. peruvianum*. Los inhibidores de cisteín proteasas están presentes en semillas y tubérculos, por lo que es posible que estas proteínas contribuyan a la acumulación de proteínas de reserva.

B2. Tejido vegetativo.

Con el ataque de herbívoros se inicia la respuesta de defensa de la planta que incluye la inducción de la expresión de genes de inhibidores de proteasas que pueden estar ligados directamente con la resistencia al ataque del insecto. La inducción de la expresión de genes de inhibidores de proteasas ocurre tanto en células del sitio de daño (local) como en lugares distantes a este sitio (sistémica). La respuesta de defensa puede incluir la expresión de múltiples inhibidores de proteasas que pueden inhibir un

amplio número de proteasas digestivas del herbívoro (Bergey y col., 1996).

C1. Inductores extracelulares locales.

Respecto al daño mecánico, los fragmentos de oligosacáridos pécticos que son liberados de la pared celular de la planta por endopoligalacturonasas, y oligómeros de quitosana derivados de la pared celular de hongos, se asume que actúan como inductores (elicitors) extracelulares de la ruta de señales que dirige a la expresión de genes de inhibidores de proteasas (Bergey y col., 1996). Los polisacáridos inductores no parecen ser móviles en la planta, por lo que es probable que estas moléculas únicamente induzcan en forma local la expresión de genes de inhibidores de proteasas. La magnitud de respuesta de defensa es mucho mayor en plantas atacadas por insectos que en plantas dañadas mecánicamente. La volicitina, un derivado de ácido graso conjugado con ácido glutámico detectado en secreciones orales de insectos, mostró inducir la emisión de terpenoides volátiles en plántulas de maíz que atraieron a avispas parasíticas de los insectos plaga (Alborn y col., 1997). La similitud estructural de la volicitina al ácido linolénico, ha sugerido que esta molécula pudiera integrarse en la ruta octadecanoidea.

C2. Señales sistémicas.

A la fecha, cuatro señales sistémicas han sido implicadas en la translocación de la respuesta al daño, incluyendo sistemina, ABA, señales hidráulicas (variación de potenciales) y señales eléctricas (activación de potenciales) (Bergey y col., 1996).

La sistemina es un péptido de 18 aa (AVQSKPPSKRDPPKMQTD) que fue primeramente aislado de hojas de tomate dañadas e induce fuertemente la expresión de genes de inhibidores de proteasas (Bergey y col., 1996). El gen de la prosistemina de tomate está compuesto de cinco pares homólogos de exones y un exón no homólogo. El exón no homólogo codifica la sistemina y está localizado al extre-

mo C-terminal de la proproteína. La sistemina es sintetizada como un precursor de 200 aa llamado prosistemina. La sobreproducción de prosistemina en plantas de tomate transgénico resultó en una acumulación constitutiva de los inhibidores I y II, además de otras proteínas de respuesta de daño (Bergey y col., 1996). Plantas transgénicas que expresaban prosistemina antisentido, mostraron una reducción sustancial en la inducción sistémica de la síntesis de inhibidores de proteasas, y redujeron su capacidad de resistir el ataque de insectos (Bergey y col., 1996).

C3. Receptores de señales.

Modelos actuales implican varias proteínas de membrana plasmática como potenciales receptores de señales moleculares en daño. Una proteína de membrana plasmática de 70 kDa aislada de soya, se une a inductores de β -glucano, además se une a evocadores fúngicos (Umemoto y col., 1997). La actividad de unión de esta proteína fue confirmada por ensayos *in vitro*, sin embargo, su función en la transducción de señales aún no ha sido confirmada. El tratamiento con oligouronido de papa o tomate incrementa la fosforilación *in vitro* de una fosfoproteína de membrana plasmática de 34 kDa (Reymond y col., 1995). Sin embargo, ni su estructura ni su función han sido aún determinadas.

Una proteína de unión a sistemina (SBP50) de 50 kDa, aislada de membrana plasmática de hojas de tomate, se asemeja a prohormona convertasa tipo Kex2p (Schaller y Ryan, 1994). El extremo N-terminal de la sistemina se une a SBP50, pero los residuos críticos para la inducción del inhibidor I están localizados en el extremo C-terminal.

C4. La ruta octadecanoidea.

Tanto la aplicación de oligosacáridos y de sistemina, como el daño, han mostrado incrementar los niveles de jasmonato en plantas de tomate (Doares y col., 1995). La aplicación de

jasmonato o su éster metílico, induce fuertemente la expresión local y sistémica de genes de inhibidores de proteasas en una amplia variedad de especies de plantas, sugiriendo que el jasmonato, tiene un papel importante en la respuesta al daño (Wasternack y Parthier, 1997; Creelman y Mullet, 1997). El ácido jasmónico es un derivado de ácido graso que es producido del ácido linolénico vía la ruta octadecanoidea (Wasternack y Parthier, 1997; Creelman y Mullet, 1997). Una mutante de *Arabidopsis* que es deficiente en la producción de ácido linolénico, mostró ser susceptible al ataque de insectos a menos que el jasmonato fuera provisto exógenamente (McConn y col., 1997). El bloqueo de la ruta octadecanoidea por represión antisentido o por el uso de inhibidores químicos, suprimen la acumulación de jasmonato inducida por daño, además suprime también la expresión de genes de inhibidor de proteasas II de tomate. Los inhibidores de la ruta octadecanoidea reducen sustancialmente la inducción de inhibidores de proteasas II, por sistemina, ácido poligalacturónico y ácido linolénico, pero no afecta la inducción de inhibidores de proteasas por jasmonato (Bergey y col., 1996).

4. INHIBIDORES EN LA RESISTENCIA A INVERTEBRADOS PLAGA.

A. Inhibidores de α -amilasas y proteasas de la superfamilia de los cereales.

Los inhibidores de esta familia han sido descritos en cereales como ragí, arroz, centeno, maíz, sorgo y cebada (Richardson, 1991; García-Olmedo y col., 1992a), pero han sido caracterizados en más detalle en trigo. Generalmente tienen subunidades de Mr 12000-16000, encontrándose en formas monoméricas, diméricas y tetraméricas. Estas proteínas exhiben actividad inhibitoria contra tripsina, contra varios tipos de α -amilasa (de saliva, de insectos y hongos, pero no de plantas), y en algunos casos pueden ser bifuncionales.

Los inhibidores de esta familia presentes en trigo, cebada y centeno son selectivamente extraídos en mezclas de Cloroformo/Metanol, por lo cual son frecuentemente referidos como proteínas CM. Éstos incluyen los inhibidores monoméricos de tripsina y los inhibidores monoméricos, diméricos y tetraméricos de α -amilasa, los cuales varían en actividad (los inhibidores de cebada son generalmente menos activos que los de trigo) y especificidad.

El inhibidor de tripsina monomérico de cebada, también llamado CMe, muestra muy poca actividad contra α -amilasas, en contraste a los homólogos bifuncionales de maíz y ragí (Moralejo y col., 1993). Este inhibidor fue introducido en trigo (*Triticum aestivum*), las plantas transgénicas mostraron una resistencia significativa a *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera) comparado con las plantas control no transformadas, sin embargo, sólo las larvas de los primeros instar fueron inhibidas por las semillas transgénicas y la expresión de CMe en hojas transgénicas no tuvo un efecto protector significativo contra insectos que se alimentan de las hojas (Altpeter y col., 1999).

Carbonero y col. (1993) reportaron que plantas de tabaco transgénico mostrando expresión constitutiva del inhibidor monomérico de α -amilasa de trigo o del inhibidor de tripsina de cebada fueron letales a larvas de lepidópteros (*Agrotis ipsilon*, y *Spodoptera littoralis*).

B. Inhibidor de α -amilasa de frijol.

El inhibidor de α -amilasa de frijol común, *Phaseolus vulgaris* es una glicoproteína de Mr 45000 compuesta de subunidades de Mr 15000 - 18000. Éste inhibe α -amilasas de insectos y mamíferos, pero no de plantas y bacterias (Wilcox y Whitaker, 1984), y es el responsable de la resistencia de la semilla a *Callosobruchus maculatus* (coleóptero) (Huesing y col., 1991). El análisis de su secuencia mostró que es codificado por un gen tipo lectina descrito previamente (Moreno y Chrispeels, 1989). Extractos de semillas de tabaco transgénico ex-

presando este gen inhibieron a la α -amilasa de intestinos de *Tenebrio molitor* (coleóptero), confirmando el mecanismo de resistencia *in vivo*. La expresión de este gen en semillas de chícharo transgénico, también aumentó la resistencia contra los insectos *C. maculatus* y *C. chinensis* (Shade y col., 1994), demostrando que la proteína puede ser una herramienta poderosa para conferir resistencia a leguminosas contra coleópteros.

C. Inhibidor de serín proteasas (Bowman-Birk)

Los inhibidores tipo Bowman-Birk generalmente tienen masas moleculares relativas entre 8000-9000, con siete puentes disulfuro que estabilizan la molécula. La mayoría son de doble cabeza, con dos sitios reactivos, los cuales son específicos para diferentes proteasas (generalmente tripsina y quimotripsina). Aunque son característicos de leguminosas, los inhibidores Bowman-Birk se encuentran también presentes en otras plantas incluyendo algunos cereales (Richardson 1991). Algunos trabajos han mostrado que el inhibidor Bowman-Birk purificado de soya, inhibió el crecimiento de larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera) (Birk y Applebaum, 1960). Estudios más recientes han mostrado la inhibición del crecimiento y de la actividad proteolítica en intestinos de larvas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera), los cuales tienen como enzimas digestivas proteasas tipo tripsina y quimotripsina (Johnston y col., 1995).

El inhibidor Bowman-Birk fue el primero en usarse para conferir resistencia a insectos usando ingeniería genética (Hilder y col., 1987). Éste fue el inhibidor de tripsina de caupí (CpTI), el cual inhibió el crecimiento de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) cuando fue incorporado en dietas artificiales (Gatehouse y Boulter, 1983). Plantas de tabaco transgénico mostraron resistencia a larvas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera) (Hilder y col., 1987), mientras que la proteína purificada inhibió el crecimiento de larvas cuando se incorporó en

dietas artificiales y se midió la actividad proteolítica de extractos de intestinos *in vitro* (Johnston y col., 1995). Se observó resistencia a larvas de *Helicoverpa zea* (*Heliothis zea*) (Lepidoptera) en cultivos de campo en tabaco transgénico (Hoffmann y col., 1992), en tanto que James y col. (1992) reportaron que manzanos transgénicos que expresaban CpTI fueron menos susceptibles a varias plagas de coleópteros y lepidópteros.

D. Inhibidor de serín proteasas (Kunitz)

Los inhibidores de tripsina de la familia Kunitz están presentes en un amplio rango de especies de leguminosas, el mejor caracterizado es el de soya (SBTI). El inhibidor de soya tiene una masa molecular relativa de 21000, con un solo sitio reactivo para tripsina. Inhibidores menos relacionados, han sido identificados en papa (catepsina D) y cereales, éstos últimos siendo proteínas bifuncionales que también inhiben α -amilasas endógenas. Se ha propuesto que éstos juegan un papel en la regulación de la movilización del almidón durante el desarrollo y germinación del grano (Richardson, 1991). El inhibidor de tripsina de soya (SBTI) ha mostrado inhibir el crecimiento de larvas de lepidópteros como *Heliothis zea*, *Spodoptera exigua*, *Ostrinia nubilalis*, *Heliothis virescens*, *Manduca sexta* y de los coleópteros *Tribolium castaneum*, *Callosobruchus maculatus* cuando éste fue incorporado en dietas artificiales. De manera similar, la proteína purificada fue activa contra proteasas de intestinos en *H. virescens*, y en plantas de tabaco transgénico expresando SBTI mostraron niveles mayores de protección contra estas plagas que el conferido por CpTI (Johnston y col., 1995).

E. Inhibidores de serín proteasas (I y II de papa)

Tanto la papa como el tomate contienen inhibidores de serín proteasas de dos tipos llamados inhibidores I y II (ver tabla 1). Mientras que el inhibidor I es activo contra quimotripsina y débil contra tripsina, el inhibidor II es de

“doble cabeza” con sitios reactivos para ambas enzimas (Plunkett y col., 1982). Ambos inhibidores son sintetizados en hojas de papa y tomate en respuesta a depredación o daño (Broadway y col., 1986), además son expresados de manera constitutiva en tubérculos de papa (Pearce y col., 1982).

Los inhibidores I y II de tomate y el inhibidor II de papa fueron expresados en plantas de tabaco (Johnson y col., 1989). Las hojas con el inhibidor II, que es activo contra tripsina, inhibieron el crecimiento de larvas de *Manduca sexta* cuando éstas fueron proporcionadas como única fuente de alimento. En contraste, las plantas con el inhibidor I, el cual es activo principalmente contra quimotripsina, no tuvo efecto en el crecimiento de las larvas. El inhibidor I de tomate también ha sido expresado en tabaco, hierba mora y alfalfa (Narváez-Vásquez y col., 1992) y el inhibidor I de la papa en tabaco (McManus y col., 1994). En este último caso, se reporta la inhibición del crecimiento de larvas de *Chrysodeixis eriosoma* (Lepidoptera), pero no el de larvas de *Spodoptera litura* y *Thysanplusia orichlacea* (ambos también lepidópteros). Recientemente, el gen del inhibidor II de papa fue transferido a arroz bajo el control de un promotor inducible por daño (Duan y col., 1996). Análisis de cinco generaciones de plantas transgénicas mostraron un aumento en la resistencia al mayor patógeno del arroz, *Sesamina inferens* (Noctuidae).

F. Inhibidores de cisteín proteasas (Cistatinas).

El nombre de cistatina fue primeramente dado a proteínas presentes en clara de huevo que inhibieron papaína y otras cisteín proteasas (Barrett, 1981). Un gran número de inhibidores relacionados han sido caracterizados principalmente de vertebrados, donde éstos se han clasificado en tres tipos (Barrett, 1987). Cistatinas tipo 1, o estefinas, no contienen puentes disulfuro y son predominantemente intracelulares, mientras que las cistatinas tipo 2 (incluyendo la cistatina de clara de huevo) son secretadas y

contienen dos puentes disulfuro. Ambos tipos de proteínas son de bajo peso molecular, aproximadamente 100 residuos (Mr 11000) para el tipo 1 y 115 residuos (Mr 13000) para el tipo 2. Las cistatinas tipo 3, o kininógenos, tienen estructuras más complejas, contienen tres dominios tipo 2. Éstas constan de aproximadamente 355 residuos y están glicosiladas.

Los inhibidores de cisteín proteasas tipo cistatina han sido identificadas en plantas, incluyendo piña (Reddy y col., 1975); y semillas de arroz (Abe y Arai, 1985), maíz (Abe y col., 1994); en leguminosas (Hines y col., 1992) incluyendo soya (Hines y col., 1991); y caupí (Fernandes y col., 1991, 1993). Estas cistatinas de plantas tienen características comunes con las cistatinas de origen animal del tipo 1 y 2, pero que bien podrían constituir un cuarto tipo (Kondo y col., 1990). Las cistatinas de arroz han sido estudiadas en más detalle, mostrando la presencia de dos formas llamadas orizacistatinas I y II (Arai y col., 1991).

La presencia de cisteín proteasas como enzimas digestivas en insectos plaga, de manera más notable en los miembros de la familia Coleoptera (Murdock y col., 1987) y Hemiptera, sugiere que las cistatinas pueden ser usadas para conferir resistencia. Por ejemplo, larvas de coleópteros *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Sitophilus oryzae*, *Diabrotica undecimpunctata howardii*, *Tenebrio molitor* y *Tribolium castaneum* tienen cisteín proteasas como enzimas digestivas, las cuales son inhibidas por inhibidores químicos como E64 o cistatinas de arroz, caupí o soya (Edmonds y col., 1996).

La expresión de orizacistatina I en plantas de tabaco transgénico, resultó en la acumulación de proteína activa, pero los niveles fueron bajos (0.5-0.6% del total de la proteína soluble) (Masoud y col., 1993). Similarmente se mostró que extractos de hojas de papa expresando orizacistatina I inhibieron papaína (cisteín proteasa) y también mostraron algo de inhibición a proteasas de *Leptinotarsa decemlineata*.

Un trabajo más reciente mostró que la cistatina de maíz se acumuló del 2 al 4% del total de la proteína soluble en semillas de arroz transgénico e inhibió proteasas intestinales de *Sitophilus zeamais* (Irie y col., 1996).

Las larvas de lepidópteros no parecen usar cisteín proteasas para la digestión por lo que estos inhibidores no resultaron efectivos.

Algunos trabajos recientes sugieren que los inhibidores de cisteín proteasas pueden ser usados para conferir resistencia contra otros invertebrados plaga. Adultos hembras de un nemátodo que ataca papa (*Globodera pallida*), contiene altos niveles de actividad de cisteín proteasa (Koritsas y Atkinson, 1994), lo que llevó a Urwin y col. (1997c) a explorar el uso de cistatinas para conferir resistencia. Ellos mostraron que formas mutadas y nativas de orizacistatina I expresadas en *E. coli*, inhibieron gcp-1, la cual es una cisteín proteasa del nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (también expresada en *E. coli*) y mostraron también inhibición del desarrollo de larvas de estas especies. Las cistatinas fueron introducidas por ingeniería genética en pelos radicales de tabaco, donde inhibieron el crecimiento y desarrollo de larvas de *G. pallida*

REFERENCIAS

- Abe K. and Arai S. (1985). Purification of a cysteine protease inhibitor from rice, *Oryza sativa* L. *japonica*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 3349-3350.
- Abe M., Abe K., Iwabuchi K., Domoto C. and Arai S. (1994). Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: Investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *Journal of Biochemistry* 116, 488-492.
- Alborn H. T., Turlings T. C. J., Jones T. H., Stenhagen G., Loughrin J. H. and Tumlinson J. H. (1997). An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276, 945-949.
- Alexander D., Goodman R. M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E. and Ryals J. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related proteins 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90, 7327-7331.
- Altabella T. and Chrispeels M. J. (1990). Tobacco plants transformed with bean α i gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. *Plant Physiology* 93, 805-810.
- Altpeter F., Diaz I., McAuslane H., Gaddour K., Carbone-ro P. and Vasil I. K. (1999). Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe. *Molecular Breeding* 5, 53-63.
- Arai S., Watanabe H., Kondo H., Emori Y. and Abe K. (1991). Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine protease inhibitor, depends on the central Gln-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. *Journal of Biochemistry* 109, 294-298.
- Ary M. B., Richardson M. and Shewry P. R. (1989). Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Jobs tears (*Coix lacryma-jobi*). *Biochimica et Biophysica Acta* 993, 260-266.
- Attenborough S. Broekaert W., Osborn R. W., Ray J. A., Rees S. B. and Tailor R. H. (1995). Antimicrobial proteins from *Aralia* and *Impatiens*. International Publication Number WO 95/24486.
- Balls A. K., Hale W. S. and Harris T. H. (1942a). A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chemistry* 19, 279-288.
- Balls A. K., Hale W. S. and Harris T. H. (1942b). Further observations on a crystalline wheat protein. *Cereal Chemistry* 19, 840-844.
- Barbieri L., Aron G. M., Irvin J. D. and Stirpe F. (1982). Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed). *Biochemical Journal* 203, 55-59.
- Barrett A. J. (1981). Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods in Enzymology* 80, 771-778.
- Barrett A. J. (1987). The cystatins: a new class of peptidase inhibitor. *Trends in Biochemical Science* 12, 193-196.
- Bednarek S. Y., Wilkins T. A., Dombrowski J. E. and Raikhel N. V. (1990). A carboxyl-terminal propeptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *The Plant Cell* 2, 1145-1155.
- Bergey D. R., Howe G. A., Ryan C. A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to

- defense signaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93, 12053-12058.
- Bernhard W. R. and Somerville C. R. (1989). Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 269, 695-697.
- Birk Y. and Applebaum Y. (1960). Effect of soybean trypsin inhibitors on the development and midgut proteolytic activity of *Tribolium castaneum* larvae. *Enzymologia* 22, 318-326.
- Blanco-Labra A., Chagolla-López A., Martínez-Gallardo N. and Valdés-Rodríguez S. (1995). Further characterization of the 12 kDa protease/alpha amylase inhibitor present in maize seeds. *Journal of Food Biochemistry* 19, 27-41.
- Bode W. and Huber R. (1993). Structural basis of the proteinase-protein inhibitor interactions. In *Innovations in proteinases and their inhibitors* (Aviles F.X. ed.) Walter de Gruyter. pp.81-122.
- Bohlmann H. (1994). The role of thionins in plant protection. *Critical Reviews in Plant Science* 13, 1-16.
- Botella M. A., Xu Y., Prabha T. N., Zhao Y., Narasimhan M. L., Wilson K. A., Nielsen S. S., Bressan R. A., Hasegawa P. M. (1996). Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiology* 112, 1201-1210.
- Bowles D. J. (1990). Defence-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59, 873-907.
- Breu V., Guerbet F., Kader J. C., Kannagara C. G., Svensson B. and von Wettstein-Knowles P. (1989). A 10 kDa barley basic protein transfers phosphatidylcholine from liposomes to mitochondria. *Carlsberg Research Communications* 54, 81-84.
- Broadway R. M., Duffey S. S., Pearce G. and Ryan C. A. (1986). Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 41, 33-38.
- Broekaert W. F., Lee H. I., Kush A., Chau N. H. and Raikhel N. V. (1990). Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 87, 7633-7637.
- Broekaert W. F., Marien W., Terras F. R. G., De Bolle M. F. C., Proost P., Van Damme J., Dillen L., Claeys M., Rees S. B., Vanderleyden J. and Cammue B. P. A. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine /glycine rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 31, 4308-4314.
- Broekaert W. F., Terras F. R. G., Cammue B. P. A. and Osborn R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defence system. *Plant Physiology* 108, 1353-1358.
- Burrows P. R. and Jones M. G. K. (1993). Cellular and molecular approaches to the control of plant parasitic nematodes. In *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture* (K. Evans, D. L. Trudgill and J. M. Webster, eds.), pp. 609-630. Cambridge University Press, Cambridge.
- Callow J. A. (1977). Recognition, resistance and the role of plant lectins in host-parasite interactions. *Advances in Botanical Research* 4, 1-49.
- Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C., Terras F. R. G., Proost P., Van Damme J., Rees S. B., Vanderleyden J. and Broekaert W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal of Biological Chemistry* 267, 2228-2233.
- Cammue B. P. A., Thevissen K., Gendriks M., Eggermont K., Goderis I. J., Proost P., Van Damme J., Osborn R. W., Guerbet F., Kader J. C. and Broekaert W. F. (1995). A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* 109, 445-455.
- Campos F. A. P. and Richardson M. (1984). The complete amino acid sequence of α -amylase inhibitor I-2 from seeds of ragi (Indian finger millet, *Eleusine coracana* Gaern.). *FEBS Letters* 167, 221-225.
- Carbonero P., Salcedo G., Sánchez-Monge R., García-Maroto F., Royo J., Gomez L., Mena M., Medina J. and Díaz I. (1993). A multigene family from cereals which encodes inhibitors of trypsin and heterologous α -amylases. In "Innovations in Proteases and their Inhibitors" (F. X. Avilés, ed.), pp. 333-348. Walter de Gruyter, Berlin and New York 1993.
- Cervone F. de Lorenzo G., Degra L., Salvi G. and Bergami M. (1987). Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 85, 631-637.
- Cervone F., Hahn M. G., de Lorenzo G., Darvill A. and Albersheim P. (1989). Host-pathogen interactions. XXXIII. A plant proteins converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defenses responses. *Plant Physiology* 90, 542-548.

- Collinge D. B., Kragh K. M., Mikkelsen J. D., Nielsen K. K., Rasmussen U. and Vad K. (1993). Plant chitinases. *The plant Journal* 3, 31-40.
- Creelman R. A. and Mullet J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 48, 355-381.
- De Bolle M. F. C., Eggermont K., Duncan R. E., Osborn R. W., Terras F. R. G. and Broekaert W. F. (1995). Cloning and characterization of two cDNA clones encoding seed-specific antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. *Plant Molecular Biology* 28, 713-721.
- De Vos A. M., Hatada M., van der Wel H., Krabbendam H., Peerdeeman A. F. and Kim S. H. (1985). Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 82, 1406.
- Dixon R. A. (1986). The phytoalexin response. Elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biological Reviews* 61, 239-291.
- Doares S. H., Syrovets T., Weiler E. W. and Ryan C. A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan active plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 92, 4095-4098.
- Duan X., Li X., Xue Q., Abo-El-Saad M., Xu D. and Wu R. (1996). Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14, 494.
- Düring D., Porsch P., Fladung M. and Lörz H. (1993). Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal* 3, 587-598.
- Edmonds H. S., Gatehouse L. N., Hilder V. A. and Gatehouse J. A. (1996). The inhibitory effects of the cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin, on digestive proteases and on larval survival and development of the southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howard*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 78, 83-94.
- Favaron F., D'Ovidio R., Porceddu E. and Alghisi P. (1994). Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. *Planta* 195, 80-87.
- Fernandes K. V. S., Campos F. A. P., Do Val R. R. and Xavier-Filho J. (1991). The expression of papain inhibitors during development of cowpea seeds. *Plant Science* 74, 179-184.
- Fernandes K. V. S., Sabelli P. A., Barratt D. H. P., Richardson M., Xavier-Filho J. and Shewry P. R. (1993). The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 23, 215-219.
- Florack D. E. A. and Stiekema, W. J. (1994). Thionins: Properties, possible biological roles and mechanism of action. *Plant Molecular Biology* 26, 25-37.
- García-Olmedo F., Rodríguez-Palenzuela P., Hernández-Lucas C., Ponz F., Marana C., Carmona M. J., López-Fando J., Fernández J. A. and Carbonero P. (1989). The thionins a protein family that includes purothionins, viscotoxins and crambis. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 6, 31-60.
- García-Olmedo F., Carmona M. J., López-Fando J. J., Fernández J. A., Castagnaro A., Molina A., Hernández-Lucas C. and Carbonero P. (1992b). Characterization and analysis of thionin genes. In *Plant Gene Research Series: Genes Involved in Plant Defense* (T. Boller and F. Meins, eds) pp. 283-302. Springer-Verlag, Wien.
- García-Olmedo F., Molina A., Segura A. and Moreno M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* 3, 72-74.
- García-Olmedo F., Salcedo G., Sánchez-Monge R., Hernández-Lucas C., Carmona M. J., López-Fando J. J., Fernández J. A., Gomez L., Royo J., García-Maroto F., Castagnaro P. (1992a). Trypsin/ α -amylase inhibitors and thionins: possible defense proteins from barley. In *Barley: Genetics, Biochemistry. Molecular Biology and Biotechnology* (P. R. Shewry, de.), pp. 335-350. CAB International, Wallingford, UK.
- Gatehouse A. M. R. and Boulter D. (1983). Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 34, 345-350.
- Gianinazzi S., Vallée J. C. and Martin C. (1969). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n. c. *Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris D* 268, 800-802.
- Hejgaard J., Jacobsen S. and Svendsen I. (1991). Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS letters* 291, 127-131.
- Hilder V. A., Gatehouse A. M. R., Sheerman S. E., Barker R. F. and Boulter D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330, 160-163.

- Hildmann T., Ebner M., Peña-Cortés H., Sanchez-Serrano J. J., Willmitzer L. and Prat S. (1992). General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell* 4, 1157-1170.
- Hines M. E., Osuala C. I. and Nielsen S. S. (1991). Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of Coleopteran digestive proteolytic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1515-1520.
- Hines M. E., Osuala C. I. and Nielsen S. S. (1992). Screening for cysteine proteinases inhibitor activity in legume seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59, 555-557.
- Hoffmann M. P., Zalom F. G., Wilson L. T., Smilanick J. M., Malyj L. D., Kiser J., Hilder V. A. and Barnes W. M. (1992). Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85, 2516-2522.
- Huesing J. E., Shade R. E., Chrispeels M. J. and Murdock L. L. (1991). α -Amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiology* 96, 993-996.
- Hughes M. A., Dunn M. A., Pearce R. S., White A. J. and Zhang L. (1992). An abscisic-acid-responsive, low temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. *Plant, Cell and Environment* 15, 861-865.
- Hull R. (1989). The movement of viruses in plants. *Annual Review of Phytopathology* 27, 213-240.
- Irie K., Hosoyama H., Takeuchi T., Iwabuchi K., Watanabe H., Abe M., Abe K. and Aria S. (1996). Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Molecular biology* 30, 149-157.
- Jacobsen S. E. and Olszewski N. E. (1996). Gibberellins regulate the abundance of RNAs with sequence similarity to proteinase inhibitors, dioxygenases and dehydrogenases. *Planta* 198, 78-86.
- James D. J., Passey A. J., Easterbrook M. A., Solomon M. G. and Barbara D. J. (1992). Transgenes for pest and disease resistance: progress in the introduction of transgenes for pest resistance in apples and strawberries. *Phytoparasitica* 20 (Suppl.) 83S-87S.
- Johnson R., Narvaez J., An G. and Ryan C. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effect on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86, 9871-9875.
- Johnston K. A., Lee M. J., Brough C., Hilder V. A., Gatehouse A. M. R. and Gatehouse J. A. (1995). Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 375-383.
- Jung J. L., Fritig B. and Hahne G. (1993). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* 101, 873-880.
- Kalla R., Shimamoto K., Potter R., Stein Nielsen P., Linnestad C. and Olsen O. A. (1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. *The Plant Journal* 6, 849-860.
- Kieliszewski M., Showalter A. M. and Leykam J. F. (1994). Potato lectin: a modular protein sharing sequence similarities with the extensin family, the hevein lectin family, and snake venom disintegrins (platelet aggregation inhibitors). *The Plant Journal* 5, 849-861.
- Koiwa H., Bressan R. A. and Hasegawa P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2, 379-384.
- Kombrink E., Beerhues L., García-García F., Hahlbrock K., Müller M., Schröder M., White B. and Schmelzer E. (1993). Expression patterns of defense-related genes in infected and uninfected plants. In *Mechanisms of Plant Defense Responses* (B. Fritig and M. Legrand, eds), pp. 236-249, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Kombrink E., Hahlbrock K., Hinze K. and Schröder N. (1991). Molecular responses of potato to infection by *Phytophthora infestans*. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (C. J. Smith, ed.) pp. 237-254. Oxford, Clarendon Press.
- Kondo H., Abe K., Nishimura I., Watanabe H., Emori Y. and Arai S. (1990). Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *Journal of Biological Chemistry* 265, 15832-15837.
- Koritsas V. M. and Atkinson H. J. (1994). Proteinases of females of the phytoparasite *Globodera pallida* (potato cyst nematode). *Parasitology* 109, 357-365.
- La Rosa P. C., Singh N. K., Hasegawa P. M. and Bressan R. A. (1986). Stable NaCl tolerance of tobacco cells is

- associated with enhanced accumulation of osmotin. *Plant Physiology* 91, 855.
- Lamb C. J. (1994). Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell* 76, 419-422.
- Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M., and Dixon R. A. (1989). Signals and transduction mechanism for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56, 215-224.
- Levine A., Tanhaken R., Dixon R. and Lamb C. (1994). H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Linthorst H. J. M., Melchers L. S., Mayer A., Van Rockel J. S. C., Cornelissen B. J. C. and Bol J. F. (1990). Analysis of gene families encoding acidic and basic b-1,3-glucanases of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 87, 8756-8760.
- Linthorst H. J. M., Meuwissen R. L. J., Kauffmann S. and Bol J. F. (1989). Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1, 285.
- Lodge J. K., Kaniewski W. K. and Tumer N. E. (1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90, 7089-7093.
- Lorito M., Broadway R. M., Hayes C. K., Woo S. L., Noviello C., Williams D. L. and Harman G. E. (1994). Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7, 525-527.
- Lucas W. J. and Gilbertson R. L. (1994). Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annual Review of Phytopathology* 32, 387-411.
- Malone M. and Alarcon J. J. (1995). Only xylem-borne factors can account for systemic wound signaling in the tomato plants. *Planta* 196, 740-746.
- Masoud S. A., Johnson L. B., White F. F. and Reeck G. R. (1993). Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin I) in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 21, 655-663.
- McConn M., Creelman R. A., Bell E., Mullet J. E., and Browse J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 94, 5473-5477.
- McManus M. T., White D. W. R. and McGregor P. G. (1994). Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can effect the growth of insect pest. *Transgenic Research* 3, 50-58.
- Melchers L. S., Apotheker-de Groot M., van der Knaap J. A., Ponstein A. S., Sela-Buurlage M. B., Bol J. F., Cornelissen B. J. C., van den Elzen P. J. M. and Linthorst H. J. M. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal* 5, 469-480.
- Mendgen K. and Deising H. (1993). Infection structures of fungal plants pathogens -a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist* 124, 193-213.
- Mirelman D., Galun E., Sharon N. and Lotan R. (1975). Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* 256, 414-416.
- Molina A., All-Goy P., Fraile A., Sánchez-Monge R. and García-Olmedo F. (1993a). Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Science* 92, 169-177.
- Moralejo M. A., García-Casado G., Sánchez-Monge R., Lopez-Otín C., Romagosa I., Molina-Cano J. L. and Salcedo G. (1993). Genetic variants of the trypsin inhibitor from barley endosperm show different inhibitory activities. *Plant Science* 89, 23-29.
- Moreno J. and Chrispeels M. J. (1989). A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86, 7885-7889.
- Moreno M., Segura A. and García-Olmedo F. (1994). Pseudothionin-Stl. A potato peptide active against potato pathogens. *European Journal of Biochemistry* 223, 135-139.
- Murdock L. L., Brookhart G., Dunn P. E., Foard D. E., Kelley S., Kitch L., Shade R. E., Shukle R. H. and Wolfson J. L. (1987). Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87B, 783-787.
- Narváez-Vásquez J., Orozco-Cardenas M. L. and Ryan C. A. (1992). Differential expression of a chimeric CaMV-tomato proteinase inhibitor I gene in leaves of transformed nightshade, tobacco and alfalfa plants. *Plant Molecular Biology* 20, 1149-1157.

- Neuhaus J. M., Sticher L., Meins F. and Boller T. (1991). A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 88, 10362-10366.
- Neurath H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357.
- Niderman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B. and Mosinger E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal - isolation and characterization of 3 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108, 17-27.
- Niderman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B. and Mosinger E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal - isolation and characterization of 3 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108, 17-27.
- Osborn R. W., De Samblanx G. W., Thevissen K., Goderis I., Torrekens S., Van Leuven F., Attenborough S., Rees S. B. and Broekaert W. F. (1995). Isolation and characterization of a plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae*. *FEBS letters* 368, 257-256.
- Pautot V., Holzer F. M. and Walling L. L. (1991). Differential expression of tomato proteinase inhibitor I and II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4(3), 284-292.
- Payne G., Middlestaedt W., Williams S., Desai N., Parks T. D., Dincher S., Carnes M. and Ryals J. (1988). Isolation and nucleotide sequence of a novel cDNA clone encoding the major form of pathogenesis-related protein R. *Plant Molecular Biology* 11, 232.
- Pearce G., Sy L., Russel C., Ryan C. A. and Hass G. M. (1982). Isolation and characterization from potato tubers of two polypeptide inhibitors of serine proteinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 213, 456-462.
- Pearce y col., (1988). Proteinase inhibitors I and II in fruit of wild tomato species: transient components of a mechanism for defense and seed dispersal. *Planta* 175, 527-531.
- Pierpoint W. S. and Shewry P. R. (1987). Amino acid homologies suggest functions for pathogenesis-related proteins. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 4, 337-342.
- Plunkett G., Senear D. F., Zuroske G. and Ryan C. A. (1982). Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 213, 463-472.
- Raikhel N. V., Lee H. I. and Broekaert W. F. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 591-615.
- Ready M., Brown D. T. and Robertus J. D. (1986). Extracellular localization of pokeweed antiviral protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 83, 5053-5056.
- Rebmann G., Mauch F. and Dudler R. (1991). Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. *Plant Molecular Biology* 17, 283.
- Reddy M. N., Keim P. S., Heinrikson R. L. and Kezdy F. J. (1975). Primary structural analysis of sulphhydryl protease inhibitors from pineapple stem. *Journal of Biological Chemistry* 250, 1741-1750.
- Reeck G. R., Kramer K. J., Baker J. E., Kanost M. R., Fabrick J. A. and Behnke C. A. (1997). Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In *Advances in Insect Control, The Role of Transgenic Plants* (Nadine Carozzi and Michael Koziel eds.) pp.157-183. Taylor & Francis Publishers.
- Reimann-Philipp U., Schrader G., Martinoia E., Barkhold V. and Apel K. (1989). Intracellular thionins of barley. *Journal of Biological Chemistry* 264, 8978-8984.
- Reymond P., Grünberger S., Paul K., Müller M. and Farmer E. E. (1995). Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 92, 4145-4149.
- Richardson M. (1980). Protein inhibitors of enzymes. *Journal of Food Chemistry* 6, 235-253.
- Richardson M. (1991). Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry* 5, 259-305.
- Rodrigo I., Vera P., Frank R. and Conejero V. (1991). Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) proteins P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Molecular Biology* 16, 931.

- Ryan C. and An G. (1988). Molecular biology of wound-inducible proteinase inhibitor in plants. *Plant Cell and Environment* 11, 345-349.
- Schaller A. and Ryan C. A. (1994). Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having Kex2p-like properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 91, 11802-11806.
- Scholthof K. B. G., Scholthof H. B. and Jackson A. O. (1993). Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiology* 102, 7-12.
- Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R. and Baumeister W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A Threonine Protease. *Science* 268, 579-582.
- Segura A., Moreno M. and García-Olmedo F. (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Letters* 332, 243-246.
- Shade R. E., Schroeder H. E., Pueyo J. J., Tabe L. M., Murdock L. L. Higgins T. J. V. and Chrispeels M. J. (1994). Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology* 12, 793.
- Sharrock K. R. and Labavitch J. M. (1994). Polygalacturonase inhibitors of Bartlett pear fruits: differential effects on *Botrytis cinerea* polygalacturonase isozymes, and influence on products of fungal hydrolysis of pears cell walls and on ethylene induction in cell culture. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45, 305-319.
- Shewry P. R. (1993). Barley seeds proteins. In *Barley: chemistry and technology* (J. MacGregor and R. Bhatt, eds.) pp.131-197. AACC, St. Paul, MN.
- Shewry P. R. and Lucas J. A. (1997). Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Advances in Botanical Research* 26, 135-192.
- Shivaraj B. and Pattabiraman T. N. (1981). Natural Plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual alpha-amylase/trypsin inhibitors from ragi (*Ekeusine coracana*, Geart). *Biochemical Journal* 193, 29-36.
- Smith C. M. (1989). *Plant resistance to insects: A fundamental approach*. John Wiley and sons, Chichester, New York.
- Stintzi A., Heitz T., Kauffmann S., Legrand M. and Fritig B. (1991). Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-infected tobacco as osmotin. *Physiological and Molecular plant Pathology* 38, 137-146.
- Stirpe F., Barbieri L., Battelli M. G., Soria M. and Lappi D. A. (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* 10, 405-412.
- Stotz H. U., Contos J. J. A., Powell A. L. T., Bennett A. B. and Labavitch L. M. (1994). Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Molecular Biology* 25, 607-617.
- Svensson B., Asano K., Jonasson L., Poulsen F. M., Mundy J. and Svendsen I. (1986). A 10 kD barley seed protein homologous with an α -amylase inhibitor from Indian finger millet. *Carlsberg Research Communications* 51, 493-500.
- Terras F. R. G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N.V., Osborn R. W., Kester A., Ress S. B., Vanderleyden J., Cammue B. P. A. and Broekaert W. F. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defence. *The plant Cell* 7, 573-588.
- Thoma S., Kaneko Y. and Somerville C. (1993). A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *Plant Journal* 3, 427-436.
- Toubart P., Desiderio A., Salvi G., Cervone F., Daroda L. and de Lorenzo G. (1992). Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *The Plant Journal* 2, 367-373.
- Travis J. and Salvesen G. S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review Biochemistry* 52, 655-709.
- Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E. and Ryals J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645.
- Umemoto N., Kakitani M., Iwamatsu A., Yoshikawa M., Yamaoka N. and Ishida I. (1997). The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90, 1029-1034.
- Urwin P. E., Atkinson H. J., Waller D. A. and McPherson M. J. (1995). Engineered oryzacystatin I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *The Plant Journal* 8, 121-131.

- Urwin P. E., Lilley C. J., McPherson M. J. and Atkinson H. J. (1997c). Resistance to both cyst- and -root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant Journal* 12, 544-461.
- Van Loon L. C. and Van Kammen A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199-211.
- Van Parijs J., Broekaert W. F., Goldstein I. J. and Peumans W. J. (1991). Hevein: an anti-fungal protein from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* 183, 258-264.
- Vigers A. J., Wiedemann S., Roberts W. K., Legrand M., Selitrennikoff C. P. and Fritig B. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science* 83, 155-161.
- Wasternack C. and Parthier B. (1997). Jasmonate - signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2, 302-307.
- Wilcox E. R. and Whitaker J. R. (1984). Structural features of red kidney bean α -amylase inhibitor important in binding with α -amylase. *Journal of Food Biochemistry* 8, 189-213.
- Wolfson J. L. and Murdock L. L. (1990). Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology* 16, 1089-1102.
- Woloshuk C. P., Meulenhoff J. S., Sela-Buurlage M., Van den Elzen P. J. M. and Cornelissen B. J. C. (1991). Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3, 619.
- Xavier-Filho J., and Campos F. A. P. (1989). Proteinase inhibitors. In *Toxicans of plant origin* (P. R. Cheeke, ed.), Vol. III: Proteins and Amino Acid, pp.1-27. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Yao C., Conway W.S. and Sams C. E. (1995). Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Biochemistry and cell Biology* 85, 1373-1377.
- Zhu B., Chen T. H. H. and Li P. H. (1995b). Expression of three osmotin-like proteins genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Molecular Biology* 28, 17-26.