

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSGRADO

**Diferenciación de clones de papa resistentes y susceptibles a  
mosca minadora *Liriomyza huidobrensis*, Blanchard. :  
(Agromyzidae: Diptera), por electroforesis de proteínas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

José Enrique Olivera García

ASESOR

Alvaro J. Marcelo, PhD

Lima – Perú

2000

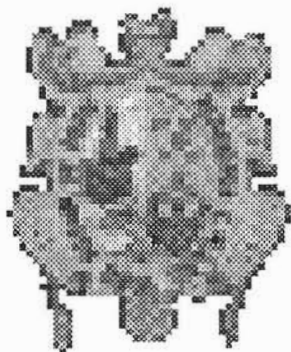
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)

**ESCUELA DE POST GRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

**UNIDAD DE POST GRADO**



**DIFERENCIACION DE CLONES DE PAPA RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES**

**A MOSCA MINADORA *Liriomyza huidobrensis*, BLANCHARD.**

**(Agromizydae:Diptera), POR ELECTROFORESIS DE PROTEINAS**

Tesis para optar el Grado de

**MAGISTER EN BIOQUIMICA**

**JOSE ENRIQUE OLIVERA GARCIA**

**LIMA-PERU**

**2000**

EL DESARROLLO DE LA PRÁCTICA DE INVESTIGACIONES EN LOS  
DEPARTAMENTOS DE QUÍMICA, FÍSICA Y ESTADÍSTICA,  
NEUMATOLOGÍA DEL CENTRO INTERNACIONAL PARA EL ESTUDIO Y EN EL  
LABORATORIO DE QUÍMICA DE ORGANOS, DE LA UNIDAD DE  
INVESTIGACION DE BIOPOLYMEROS Y MEMBRANAS DE LA UNAM.

RECIBIÓ FINANCIAMIENTO DE UN PROYECTO - No. 4103/4002  
PROGRAMA 4, 1988 FINANCIAMIENTO - ALTERNATIVO DE FONDO DEL CENTRO  
INTERNACIONAL PARA EL ESTUDIO Y EN ALGHIEN

**ASESOR:**

Dr. ALVARO J. MARCELO, PhD

- Dr. J. Rodríguez
- Dr. J. Rodríguez
- Dr. J. Rodríguez
- Dr. J. Rodríguez

EL DESARROLLO DE LA PRESENTE INVESTIGACION SE REALIZO EN LOS DEPARTAMENTOS DE RECURSOS GENETICOS Y ENTOMOLOGIA-NEMATOLOGIA DEL CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)Y EN EL LABORATORIO DE QUIMICA BIOORGANICA DEL CENTRO DE INVESTIGACION DE BIOQUIMICA Y NUTRICION (CIBN) DE LA UNMSM.

RECIBIO FINANCIAMIENTO DE LOS PROYECTOS No. 4101 y 4102, PROGRAMA 4, 1995, 1996 (MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS) DEL CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, SIENDO PATROCINADORES:

Dr. Alí Golmirzaie

Biol. María Palacios

Biol. Jorge Tenorio

Dr. Aziz Lagnaoui



## DEDICATORIA

### A MIS QUERIDOS PADRES

Por su sacrificio y continuo estímulo para la obtención de mi grado.

### AGRADECIMIENTO

### A MIS HERMANOS

Por su apoyo constante

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de los docentes de Neurología, Farmacología, Fisiología, Anatomía, del Centro Interamericano de la Papa (CIPA), Mis amigos de la Universidad de Chile, de la Pontificia y del Liceo de

Quiero también agradecer a los señores Dr. Bartolomé María Palacios y Biólogo Jorge Tenorio por el apoyo del material científico y el invaluable aporte de ambos en las conferencias de neurología. A la Dra. del Dr. María Mercedes y al Ing. Alberto González por abrirme las puertas en el laboratorio en el CIPA y en el CIP.

Desearé también reconocer la ayuda que recibí los recursos y asistencia de los laboratorios de Neurología y Fisiología del CIPA y a los integrantes del laboratorio de Química, Bioquímica del Centro de Investigaciones de Neurología y Nutrición (CINUN), por el colaboración en la realización del presente trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de los Departamentos de Nematología-Entomología y de Recursos Genéticos del Centro Internacional de la Papa (CIP). Muy agradecido a los Doctores Fausto Cisneros, Alí Golmirzaie y Aziz Lagnaoui.

Quiero también agradecer a los investigadores del CIP: Bióloga María Palacios y Biólogo Jorge Tenorio por el apoyo del material científico y el invaluable aporte de ambos en las correcciones del manuscrito. A mi tutor el Dr. Alvaro Marcelo y el Ing. Alberto González por abrirme las puertas en la investigación en el CIBN y en el CIP.

Deseo también reconocer la ayuda de todos los técnicos y asistentes de los laboratorios de Nematología y Electroforesis del CIP y a los integrantes del laboratorio de Química Bioorgánica del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN), por su colaboración en la realización del presente trabajo.

## INDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	IX
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 La mosca minadora .....	3
2.2 Biología de la mosca minadora .....	6
2.3 Clones de papa resistentes a la mosca minadora .....	10
2.4 Factores químicos de defensa de las plantas .....	11
2.5 Agrupación de genes de defensa de las plantas activados por la herida .....	14
2.6 Inhibidores de proteasas .....	15
2.7 Correlación de las proteínas con la resistencia de las plantas al estrés biótico .....	17
<b>III. METODOLOGIA DE TRABAJO</b> .....	19
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b> .....	20
4.1 Materiales químicos .....	20
4.2 Materiales Biológicos .....	21
4.2.1 Clones de papa .....	21
4.2.2 Larvas y adultos de la mosca minadora .....	21
4.3 Daño de las plantas de papa y colección de las hojas .....	21

4.3.1	Daño por mosca .....	22
4.3.2	Daño artificial .....	22
4.4	Extracción de proteínas .....	23
4.4.1	Proteínas de hojas de papa .....	23
4.4.2	Extractos de larvas de la mosca minadora .....	24
4.5	Ensayos enzimáticos .....	24
4.5.1	Actividad proteolítica .....	24
4.5.2	Inhibición de la actividad proteolítica .....	25
4.5.2.1	Con gelatina .....	25
4.5.2.2	Con TAME .....	25
4.6	Concentración de proteínas .....	25
4.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida y Zimografía .....	27
4.7.1	SDS-PAGE .....	27
4.7.1.1	Tinción y destinción de geles .....	27
4.7.2	Sistema SDS-PAGE/Gelatina o Zimografía .....	27
4.7.2.1	Actividad endoproteolítica .....	27
4.7.2.2	Inhibidores de proteasas .....	29
4.7.2.2.1	Tinción del gel de zimografía para isoinhibidores con actividad de esterasas.....	29
4.8	Análisis de Geles y Cálculos .....	29
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1	Niveles de actividad proteolítica de proteínas extraídas de hojas plantas dañadas por la mosca minadora .....	31

5.2	Inhibición de la actividad proteolítica de extractos de larvas y de tripsina por las hojas de papa de plantas dañadas .....	31
5.3	Patrón de bandas de proteínas totales de hojas de papa en geles de poliacrilamida .....	34
5.4	Actividad endoproteolítica mediante zimografía .....	37
5.5	Inhibidores de proteasas mediante zimografía .....	37
5.6	Nivel de expresión de la banda de 105 kDa entre plantas de diferentes edades .....	40
<b>VI.</b>	<b>DISCUSION</b> .....	42
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	46
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	47
<b>IX.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	48

## RESUMEN

Se evaluó las diferencias bioquímicas en el ámbito de las actividades proteolíticas y de la inhibición de la actividad proteolítica ensayas con proteínas de hojas de papa, entre los clones “resistentes” (282LM87B, 220LM87B, 136LM86B y 662LM86B) y “susceptible” (Revolución) a la mosca minadora *Liriomyza huidobrensis*, Blanchard (Díptera, Agromyzidae), una plaga perjudicial del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum spp*) especialmente en lugares donde el uso de insecticidas es intenso. Las plantas de papa resistentes, y Revolución, fueron sometidas previamente al daño por el ataque de adultos de la mosca minadora (daño por mosca) o por herida con estilete (daño artificial), y para ser evaluados mediante el grado de inducción de las proteínas en las hojas. Entre los clones resistentes, se encontró importantes márgenes de variación de las actividades proteolíticas en las hojas y la inhibición proteolítica de los extractos de larvas por efecto de las proteínas de hojas de los clones 282LM87B y 662LM86B con respecto a Revolución. Las unidades de actividad proteolítica por gramo de proteína de las de hojas ( $Ug^{-1}$ ) y las unidades de actividad proteolítica de larvas (U) fueron 20,5  $Ug^{-1}$  y 0,05 U con 282LM87B; 20,83  $Ug^{-1}$  y 0,12 U con 662LM86B y 17,5  $Ug^{-1}$  y 0,25 U con Revolución, respectivamente. Mediante ensayos de zimografía para determinar isoINHIBIDORES de proteasas se encontró dos bandas, de 63 y 105 kDa de peso molecular aproximado, expresados mayormente entre los clones resistentes. Este ensayo determinó



una diferenciación visual importante entre los clones resistentes con el susceptible. Se siguió el nivel de expresión de la banda de 105 kDa entre plantas de diferentes edades (20-80 días) dañadas artificialmente y en el cual se observó disminución en el nivel de su expresión en plantas de más de 60 días. Se discute la correlación de los niveles mayores de actividad proteolítica y de la inhibición de la actividad proteolítica hallados en los clones resistentes, especialmente en 282LM87B, con el atributo de la resistencia a la mosca minadora.

Palabras claves: *Solanum tuberosum*, mosca minadora, zimografía, plantas resistentes.

## I. INTRODUCCION

*Liriomyza huidobrensis*, Blanchard (Díptera, Agromyzidae) constituye una plaga clave del cultivo de la papa en la Costa Central del Perú y de otros países del continente americano. Se estableció como plaga a consecuencia del excesivo uso de insecticidas aplicados en el pasado con la intención de combatir a otras plagas de la papa (Herrera, 1963; Campos, 1978; Cisneros, 1995). La alta resistencia a insecticidas desarrollado por las poblaciones de la mosca minadora usualmente origina el aumento de los costos de producción de la papa como se ha determinado en los lugares donde actúa la plaga (Ewel y col., 1990; Rodríguez, 1997). Dentro de los factores que favorecen el incremento de las poblaciones de la mosca minadora se mencionan: 1) la elevación de la temperatura por los cambios climáticos (este es un factor muy importante en períodos de El Niño), 2) la siembra de variedades susceptibles, 3) factores culturales, y 4) el excesivo uso de insecticidas. Se han reportado daños perjudiciales para el cultivo de la papa ocasionados por la mosca minadora en Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Egipto, Indonesia, México, y algunos países europeos (Morales y col., 1994; Anónimo, 1998).

Dentro de los métodos sostenibles propuestos para controlar a las poblaciones de la mosca minadora destacan el uso de las trampas amarillas (Chávez y col., 1987; Gómez y col., 1994), la eliminación de las plantas hospederas, y el uso de variedades de papas resistentes (Tenorio y col., 1993). De ellos, el uso de cultivos resistentes o tolerantes al ataque severo de la mosca minadora es de principal importancia, empero, porque dichos materiales son el componente principal para su aplicación estratégica dentro de un programa de Manejo Integrado de la mosca minadora (Cisneros, 1992). Las



investigaciones desarrolladas en el Centro Internacional de la Papa (CIP) permitieron identificar clones resistentes a la mosca minadora: 282LM87B, 220LM87B, 136LM86B y 662LM86B. El mecanismo de resistencia atribuido a estos clones es del tipo antibiosis que causa hasta un 50% de mortalidad de las larvas de la mosca minadora (Tenorio y col., 1993). De estos clones, el 282LM87B fue comercialmente liberado recientemente como nueva variedad de papa para el sur del país con el nombre de María Tambeña-INIA. Ninguno de estos materiales avanzados han sido estudiados para indagar sobre las bases su resistencia ante el ataque severo de la mosca minadora.

La finalidad del presente estudio fue encontrar diferencias bioquímicas a nivel de las proteínas entre los clones de papa resistentes a la mosca minadora y la variedad Revolución. Los objetivos trazados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Determinar diferencias bioquímicas a nivel de las proteínas inducidas por el daño de las plantas entre los clones de papa resistentes y susceptible (cv. Revolución) a la mosca minadora.
2. Correlacionar la presencia de proteínas específicas asociadas a la resistencia de las plantas de la papa a la mosca minadora.

## II. REVISION DE LITERATURA

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum spp.*) es oriundo de los andes sudamericanos, y, en la actualidad uno de los alimentos más importantes del mundo junto al arroz, trigo y maíz (Anónimo, 1995). En el Perú, constituye un alimento básico y una actividad importante para la economía de los agricultores de la Costa y de la Sierra. Sin embargo su producción es cara por el uso obligado de insecticidas que se utilizan para controlar a las diferentes plagas de la papa, como el de la mosca minadora. Mundialmente se calcula que se gastan en insecticidas mas de US\$ 300 millones anuales (Anónimo, 1998). Por ello, se considera al cultivo de la papa como uno de más dependientes de insecticidas químicos, y como tal continúa generando graves problemas para la agricultura, el medio ambiente, y la salud humana. Por ello se requiere nuevos métodos de control para contrarrestar a las plagas de insectos y a la vez biosustentables como el desarrollo de las plantas naturalmente resistentes o tolerantes a insectos.

### 2.1 La Mosca Minadora

La mosca minadora *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, 1954 (Diptera, Agromyzidae), fue descrita por primera vez en 1926. Es una especie polífaga constituyendo plaga de diversos cultivos hortícolas y de flores. Está ampliamente distribuída por el Continente Americano y en algunos países europeos (Van der Liden, 1990); y últimamente se han reportado daños de la mosca minadora en cultivos de la



Figura 1. Las plantas de papa susceptibles al ataque de la mosca minadora, como la variedad Revolución, quedan fuertemente afectadas por el ataque de la plaga. La plaga de la mosca minadora destruye el área foliar por el cual la capacidad fotosintética de la planta se ve fuertemente reducida. En el círculo superior se muestra un adulto de la mosca minadora.

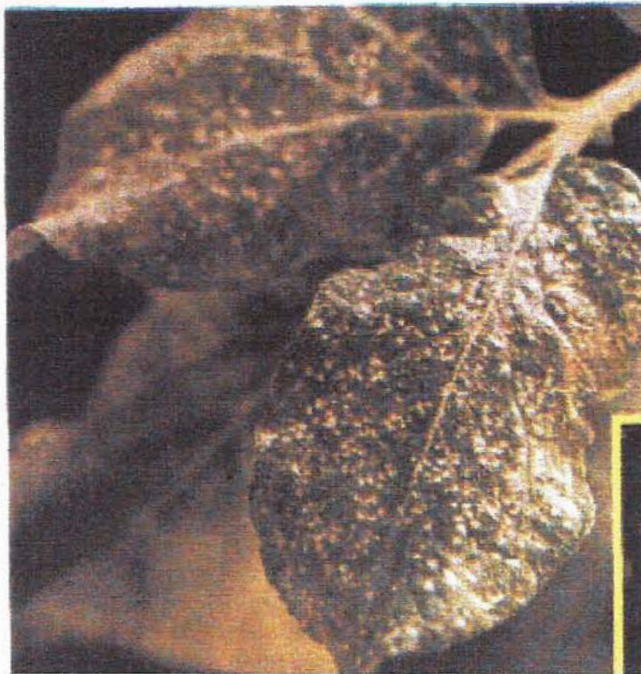


Figura 2. Puntos de alimentación en la superficie de las hojas producido por los adultos de la mosca minadora.





Figura 3. Un huevo de la mosca minadora depositado dentro de un orificio hecho por la hembra en el envés de la hoja.



Figura 4. Dos larvas de la mosca minadora de tercer estadio consumiendo el parénquima de la hoja de papa en la vecindad de un vaso conductor.

papa en otras partes del mundo como Indonesia, Israel y Egipto (Anónimo, 1998). Por su gran capacidad de resistencia a insecticidas químicos, esta plaga ha sido catalogada como muy difícil de eliminar en el mundo (Anónimo, 1998). En el Perú, se considera que *L. huidobrensis* ha desarrollado resistencia a la mayoría de los productos clorados y de fosfatos (Cisneros, 1992).

La plaga de la mosca minadora daña exclusivamente el follaje de dos modos: 1, haciendo minas de tipo serpenteantes, y 2, punteaduras sobre los foliolos (Figura 1). Frente a este daño la hoja tiende a una rápida deshidratación y envejecimiento. Si el daño es severo produce en la planta una fuerte reducción de la capacidad fotosintética reduciendo de esta manera su producción, desde que sobrepasa sus límites de compensación (Midmore, 1986). En plantas jóvenes el daño de la plaga afecta la tasa de crecimiento y el vigor provocando mortalidad temprana. Todo el daño producido por el ataque de la plaga de la mosca minadora sobre el cultivo de la papa se traduce en una pérdida en el rendimiento. En el Valle de Cañete, considerado uno de los principales centros de producción de papa en la Costa Central del Perú, se han reportado pérdidas del rendimiento entre el 40-50 % en años considerados malos (Ewell y col., 1990; Palacios y Raman, 1991). Todos los intentos de matar a la mosca minadora en esta zona son contra productivos, desde que el uso masivo de insecticidas afecta a los enemigos naturales de la plaga mas que a la plaga misma (Ewell y col., 1990).

## **2.2 Biología de la Mosca Minadora**

Las moscas adultas miden 2 mm de longitud y las hembras son más grandes que los machos. Por medio del ovipositor las hembras dañan las hojas produciendo “puntos



Figura 5. Pupas de la mosca minadora que han caído al suelo. Las pupas son de color marrón a púrpura y miden cerca de 3 mm de longitud.



Figura 6. Las larvas consumen el parénquima de las hojas de la papa produciendo minas que se observan a simple vista. Estas minas se convierten rápidamente en zonas cloróticas por ausencia de tejido fotosintetizador. Posteriormente estas zonas adquieren necrosis.





Figura 7. En conjunto las minas y los puntos de alimentación, ocasionados por las larvas y los adultos de la mosca minadora, ocasionan estragos en las hojas de las plantas y la destrucción del área foliar es mayor en plantas susceptibles como Revolución.

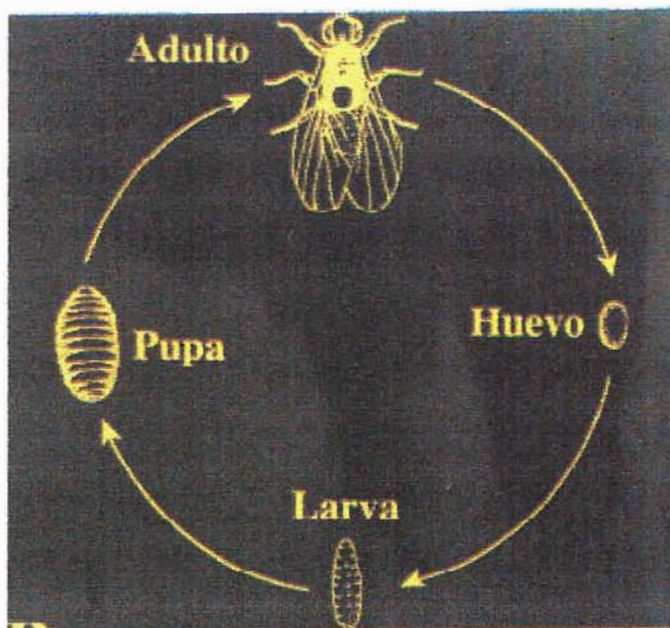


Figura 8. El ciclo de vida de la mosca minadora. 1, huevo (3-5 días); 2, larva (5-7 días); 3, pupa (8-12 días); y 4, adulto.

de alimentación” (Figura 2). A través de esta herida logran alimentarse tanto ella como el macho. Para depositar su huevo, las hembras producen una herida mucho mayor en el envés de las hojas (Parrella, 1987) (Figura 3). Este tipo de herida representa entre el 10 y el 15 por ciento del total de las punteaduras halladas en las hojas de papa, observándose con mayor frecuencia en las hojas inferiores y en los bordes de los cultivos (Morales y col., 1994). El huevo de *L. huidobrensis* es de aproximadamente 0,29 x 0,16 mm (Lizarraga, 1990) y generan larvas que pasan por tres estadios llegando a medir hasta 3 mm de longitud (Figura 4). En tercer el estadio las larvas dejan de alimentarse y proceden a salir a la superficie de la hoja para empupar. La pupa mide aproximadamente 2,1 x 0,9 mm (Lizarraga, 1990) (Figura 5). Estas pupas pueden quedar pegadas a las hojas o caer al suelo. En unos pocos días emergen los nuevos adultos.

El estado larval de la mosca minadora es el estado más dañino para la planta. Después de eclosionar del huevo, las larvas penetran en las hojas y empiezan a alimentarse del mesófilo produciendo galerías o minas (no hay daño de la epidermis), formando las características minas serpenteantes que se ven a simple vista sobre las hojas (Figura 6). Las minas aumentan de calibre conforme la larva crece y se desarrolla. La destrucción del área foliar se completa con el necrosamiento de los sitios dañados (Figura 1 y 7).

El ciclo de huevo a adulto (Figura 8) varía principalmente con la fuente de alimentación y con la temperatura (Parrella, 1987; Lizarraga, 1990). Va desde 14 días en verano (20°C) hasta 40 días en invierno (14°C). En la planta el daño empieza en las primeras hojas (cerca del suelo) y avanza hacia las últimas conforme la población aumenta. Una hembra puede depositar en promedio 149 huevos (Lizarraga, 1990).

Aparte del proceso mismo estresante de la herida en las hojas producido por la mosca minadora, y de su capacidad potencial de transmitir virus, la viabilidad de la planta



afectada puede verse mas comprometida por las heridas producidas; ya que esto es considerado una puerta abierta para el ingreso de bacterias y hongos, que destruirían en poco tiempo la vida de la planta (Salvo y col., 1995).

### 2.3 Clones de papa resistentes a la mosca minadora

Dentro de las labores de investigación para desarrollar métodos alternativos de control de la mosca minadora destacan la identificación de plantas resistentes (Palacios y col., 1991; Tenorio y col. (a), 1995), un proceso que el Centro Internacional de la Papa (CIP) desarrolla desde 1979. El uso de variedades de papa resistentes a insectos es un componente indispensable dentro de la estrategia del Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Cisneros, 1992). A partir de unas poblaciones de papa denominados LM86B y LM87B, provenientes de líneas parentales del programa de desarrollo de Semilla Sexual de la Papa (SSP), el CIP identificó algunos materiales (clones) avanzados con buenos niveles de resistencia y con buenas características agronómicas (Golmirzaie y col., 1992; Palacios y col., 1993), entre las cuales destacaron los clones 282LM87B, 220LM87B, 136LM86B y 662LM86B. Mediante pruebas en invernadero se determinó un mecanismo de resistencia de tipo antibiosis (Tenorio y col. (a), 1995) cuando se comparó con Revolución, una variedad comercial de papa susceptible al ataque de la mosca minadora.

Por su excelente rendimiento y resistencia a la mosca minadora, además de la resistencia mediana a la racha y a los virus PVX y PLRV (Tenorio y col. (b), 1995), el clon 282LM87B fue liberado recientemente como una nueva variedad comercial de papa denominada María Tambaña-INIA, y lanzado en forma conjunta por el Centro de Investigación Educativa y de Desarrollo (CIED), el Centro Internacional de la Papa

(CIP) y los agricultores del Valle Tambo, Arequipa, Perú (Martínez, 1996; Anónimo, 1998).

Ninguno de estos clones mencionados han sido estudiados para indagar sobre las bases de su "resistencia".

#### 2.4 Factores químicos de defensa de las plantas.

Dado su inmovilidad por la adherencia a su substrato (suelo), las plantas han diseñado complejas estrategias para defenderse de sus agresores mediante mecanismos hasta ahora poco comprendidos. En términos generales, puede decirse que las plantas emplean sustancias químicas para defenderse. En algunas plantas, estas sustancias, simples o muy elaboradas, pueden representar hasta el 10% de su materia seca (Chrispeels, 1994).

Entre los compuestos químicos diseñados para la defensa unos se encuentran en forma **constitutiva** en los tejidos, como por ejemplo los glucósidos de cianógeno, terpenoides, alcaloides, y sustancias fenólicas; y, otros sólo aparecen después de que un estímulo primario se halla producido, conocidos como productos de **inducción** (Chrispeels y col., 1994).

Se han observado que el nivel y la rapidez con que pueden presentarse los productos inducidos en las plantas, debido a factores bióticos, parecen marcar una diferencia característica en la resistencia de las mismas (Bowles, 1990). Es decir, cuando se comparan cultivares resistentes y susceptibles, se observa en las primeras la acumulación rápida de diferentes moléculas relacionadas con la defensa como las fitoalexinas y diferentes proteínas (Bowles, 1990; Vierling y col. 1992). Las fitoalexinas

son compuestos de bajo peso molecular, químicamente muy diversos, y que difieren de acuerdo a la clasificación sistemática de las plantas. Entre las proteínas de defensa inducibles se incluyen a los inhibidores de proteasas, proteínas PR ("Pathogenesis-Related"), tioninas y lectinas (glicoproteínas) (Bowles, 1990; Dixon y Harrison, 1994; Bohlmann, 1994; Lyon y col., 1995; Smirnoff, 1998).

La aparición de un producto inducido necesita de un estímulo previo, que puede ser un segundo organismo (factor biótico) o alguna otra forma de estrés (factor abiótico). Sin embargo, entre las modalidades de daño que sufren las plantas en su medio ambiente el estrés por la herida es el más común y es causado por animales e insectos herbívoros. La señal por la herida desencadena en la planta la activación orquestada de sus genes, no solo para la defensa de la planta sino también para la regeneración del tejido dañado (Sanchez-Serrano y col.; 1993). Se ha observado en plantas de tomate y de papa que el daño por la herida induce, dentro de horas, la acumulación de una serie de proteínas colectivamente denominadas Proteínas de Respuesta Sistémica a la Herida (PRSHs) (Bergey y col., 1996) varias de las cuales son considerados marcadores bioquímicos de la herida en las plantas. En el Cuadro 1 se muestran algunas de estas proteínas inducidas por herida en el tomate. El hecho de que estas proteínas sean inducidas sistémicamente, significa que se expresan en el lugar del daño y, poco después, en otro lugar de la planta lejos del daño. Se ha propuesto que en Solanaceas esta inducción sistémica es regulado por un oligopéptido de 18 aminoácidos denominado Sistemina (Ryan, 1998; Schaller, 1999) (Figura 9).

Dentro de las proteínas PRSHs, la inducción de los inhibidores de proteasas han sido estudiados más profundamente (Ryan, 1990). Así, se ha propuesto que, en la ruta de señalización para producir a los inhibidores de proteasas, la herida activa una fosfoliposis específica en la membrana plasmática, que libera al citosol los ácidos linoleico y



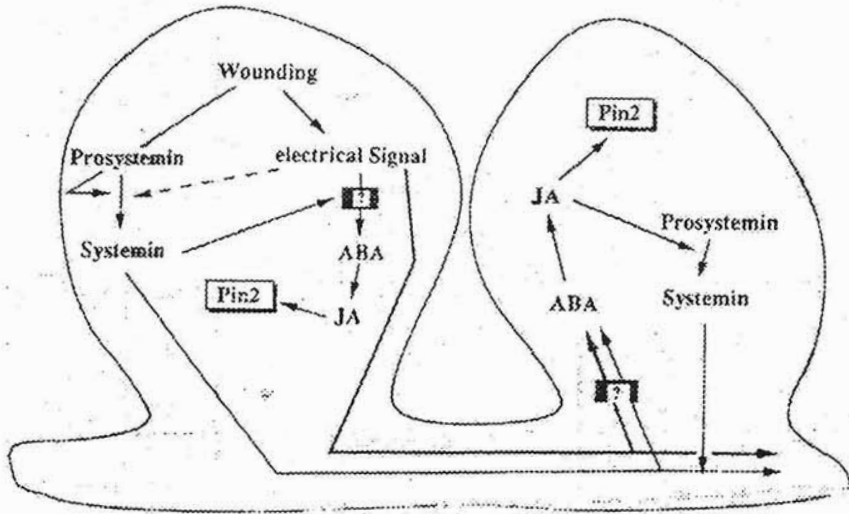


Figura 9. El daño mecánico en las células vegetales puede generar cambios en el potencial de la membrana plasmática, creando señales eléctricas que pueden propagarse por toda la planta induciendo Pin2 (un inhibidor de proteasa) mediante la biosíntesis de ácido jasmónico (JA). Las señales eléctricas y la herida misma pueden a su vez conducir a la síntesis de sistemina, (inicialmente como prosistemina) para transmitir la señal sistémica por toda la planta y generar los mismos compuestos en esos lugares. (Tomado de Peña-Cortez y col. 1995).

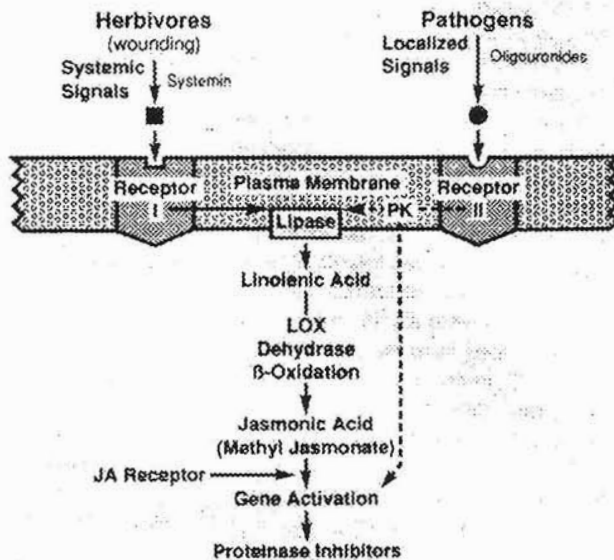


Figura 10. Modelo propuesto que señala la ruta que conduce a la expresión de genes inducibles de inhibidores de proteasas en hojas de tomate. (Tomado de Farmer y Ryan, 1992).

linolénico, poniendo en marcha la ruta del ácido jasmónico que ha de conducir a la activación y síntesis de dichos inhibidores (Farmer y Ryan, 1992) (Figura 10).

Como fue recalcado anteriormente, la acción severa de los adultos y de las larvas de la mosca minadora sobre las hojas de la papa es un estrés muy agresivo porque producen en las hojas de las plantas innumerables heridas internas y externas. Es esta característica que fue hecho hincapié en este estudio.

## 2.5 Agrupación de genes de defensa de las plantas activados por la herida

La señal por la herida produce en la planta la inducción de un grupo de genes de defensa aún no identificados totalmente. De los estudiados, lo podemos

**CUADRO 1.** Proteínas de hojas de plantas de tomate que son inducidos sistémicamente por el daño (herida) y por Sistemina (Tomado de Ryan y col., 1998).

PROTEINAS DE DEFENSA	COMPONENTES DE LA VIA DE SEÑALES
Inhibidor I	Sistemina
Inhibidor II	Calmodulina
Cistatina	Lipooxigenasa
Inhibidor de proteasa Aspartica	Alieno oxido sintasa
Polifenol oxidasa	
PROTEINASAS	OTRAS FUNCIONES DESCONOCIDAS
Leucina aminopeptidasa	Subunidad $\alpha$ catalítica de poli-galacturonasa
Carboxipeptidasa	Subunidad $\beta$ de
Proteinasa Aspartica	
poligalacturonasa	
Ubiquitina	Treonina deaminasa
Proteína semejante a	Nucleótido difosfato kinasa
Ubiquitina	Proteína ligada a Acil-CoA

dividir por grupos funcionales (Baron y Zambrisky, 1995):

1. Los genes que codifican a las enzimas del metabolismo de los fenilpropanoides como la fenil amonio-liasa, chalcon sintasa, y chalcon isomerasa. Estos son considerados marcadores clásicos de la respuesta a la herida y de la defensa en las plantas. Los productos que catalizan tienen efectos antimicrobiales directos y también ayudan a reforzar la pared celular para cerrar la herida al promover la síntesis de lignina (Shaw y col., 1990).
2. Los genes que sintetizan Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (GPRHs) y peroxidasas. Estos son esenciales para promover el refuerzo de la pared celular (Showalter, 1993; McQueen-Mason, 1995).
3. Los genes que sintetizan quitinasas, pectinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas. Estas enzimas hidrolíticas promueven la degradación de la pared celular, y con ello, incrementan el estímulo de más defensas porque se liberan oligogalacturónidos, que son potentes activadores de inhibidores de proteasas en plantas (Jacinto y col., 1993).
4. Los genes que producen enzimas con actividad lipooxigenasa. La actividad de éstas enzimas se relacionan con la producción de ácido jasmónico, una hormona que también activa la síntesis de proteínas de inhibidores de proteasas (Farmer y col., 1992; Bell y col., 1995; Gardner, 1995).

## 2.6 Inhibidores de Proteasas

El tubérculo de papa contiene una de las mayores cantidades de polipéptidos y proteínas de inhibidores de proteasas<sup>1</sup> (Pearce y col., 1982). Estos bioelementos



representan entre el 5-10 % de las proteínas totales (Ryan, 1980). En la variedad comercial de papa Russet Burbank representan alrededor del 7 % de las proteínas solubles del tubérculo (Graham y col., 1985).

Se ha demostrado que los inhibidores de proteasas son inducidos por el daño mecánico provocado por el ataque de insectos y de animales herbívoros (Davies, 1987; Peña-Cortez y col., 1988; Ryan, 1990; Sanchez-Serrano y col. 1993), y también por algunos compuestos orgánicos como los derivados solubles de quitina y quitosan, y de extractos solubles de hongos (Walker-Simmons y col., 1984; Dalkin, 1989; Ryan y col., 1991), oligogalacturónidos derivados de la pared celular de células vegetales (Bishop y col., 1981; Reymond y col., 1995), ácido jasmónico (Farmer y col., 1992), etileno (Chang y Shoken, 1999) y Sistemina (Ryan y Pearce, 1998). El hecho de incrementarse notablemente, después de una inducción, en las partes dañadas y luego en otras partes de la planta conllevó al conocimiento generalizado de una "inmunología sistémica" no conocida antes en las plantas (Peña-Cortez y col., 1988; Dalkin y col., 1989), y de la importancia de estos inhibidores como componentes de defensa contra insectos (Broadway y col., 1986).

En las hojas la cantidad de estos inhibidores es del 1-2 % del total de proteínas solubles (Ryan, 1980). Las más conocidas y estudiadas son las familias de inhibidores denominados Tipo I y Tipo II, presentes en tomate y en papa (Cuadro 1); ambos son inhibidores del grupo de las serina-proteinasas. Actualmente se ha caracterizado una nueva familia de inhibidores denominados proteínas de 22 kDa (Suh y col., 1991).

<sup>1)</sup>De acuerdo a la nomenclatura descrita por Barret (1986), el término *proteasa* incluye a endopeptidasas y exopeptidasas, mientras que el término *proteinasas* es usado para describir endopeptidasas. En este trabajo se menciona sólo el término proteasa para facilitar el concepto, teniendo en consideración que es recomendado usar el término proteinasa en hidrólisis donde participan enzimas como tripsina o de enzimas con actividad semejante a ella.

La interacción enzima-inhibidor de éstas moléculas ordinariamente exhibe valores de constante de disociación ( $K_d$ ) de  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  M y, por tanto, representan compuestos muy efectivos que inhiben a las proteínas que ellos ligan. A partir de diferentes estudios que han medido los niveles de inhibidores de proteasas en el tejido vegetal en plantas resistentes a insectos y de experimentos con dietas artificiales para insectos en el que se han incluido inhibidores naturales, se ha argumentado una correlación de la resistencia de las plantas y la muerte de los insectos con la presencia de los inhibidores de proteasas (Gatehouse y col., 1979; Broadway y col., 1986; Ryan, 1990).

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de éstas proteínas inhibidores de proteasas sobre los insectos se inicia en el intestino, con el disparo de un sistema de retroalimentación que provoca la hipersecreción de enzimas digestivas y la disminución consecuente del apetito, produciéndose en el tiempo una pérdida de aminoácidos esenciales que pueden llevar finalmente a una deficiencia proteica (Broadway, 1986).

Por su perspectiva en la protección de plantas, varios genes de inhibidores de proteasas de diferentes organismos han sido aislados e insertados genéticamente en algunos cultivos importantes (Johnson y col., 1989; Wolfson y col., 1995; Duan y col., 1996).

## **2.7 Correlación de las proteínas con la resistencia de las plantas al estrés biótico**

Después de la inducción o señal por algún tipo de estrés biótico o abiótico, la planta responde activando sus genes de defensa en lo que constituye su "sistema de alarma". Se intuye que en este sistema han de participar una red compleja de eventos moleculares sincronizados para dar origen a los productos liberados (Reymond y col.,



2000; Schenk y col., 2000). En estos eventos necesariamente participan proteínas, puesto que son las moléculas que acometen la mayoría de las funciones celulares. Por ejemplo, las enzimas que corresponden a las vías del ácido shikímico, fenilalanina y tirosina son usadas en común por muchas plantas para producir fitoalexinas que contrarrestan el ataque de insectos y de patógenos (Ananthkrishnan, 1996). De acuerdo al carácter genético, sin embargo, algunas de estas enzimas han sido correlacionadas con un determinado tipo de resistencia. Es decir, se han observado altos niveles de fenilalanina amonio-liasa como respuesta al ataque de virus (Duchesne, 1977), peroxidasa y superóxido dismutasa, y quitinasa (Broglie, 1991) frente a hongos y bacterias; proteínas PR (Linthorst, 1991) frente a hongos, bacterias, virus y viroides; polifenol oxidasa (Bouthyette, 1987; Bergey y col., 1996) e inhibidores de proteinasas (Ryan, 1990) frente al ataque de insectos.

Debido a esta correlación algunas de estas proteínas han recibido atención en el estudio de algunos cultivares con el fin de desarrollar marcadores bioquímicos de resistencia y su posterior uso en el mejoramiento genético. Dentro de Solanaceas, por ejemplo, se ha considerado que la fosfatasa ácida es un marcador bioquímico para la resistencia del tomate al nemátodo *Meloydogyne javanica* (Medina-Filho, 1980); en plantas de papa con tricomas, (se dice altos niveles de polifenol oxidasa presente en los tricomas) es favorable para seleccionar plantas resistentes al gorgojo del Colorado (Ave, y col., 1986; Raman y col, 1994).

### III. Metodología de Trabajo

Por lo expuesto en la revisión de literatura se dedujo:

1. Que las plantas tienen que recibir un estímulo adecuado para desencadenar sus componentes de defensa.
2. Con el estímulo se activa el sistema de alarma en las plantas, dentro de los cuales las proteínas son el fiel reflejo de la regulación celular de la defensa porque participan en todas las vías metabólicas.
3. Dentro de los estímulos conocidos para activar los genes de defensa, el estrés de la herida es uno de lo que más se han analizado. La herida se produce en forma común entre las plantas por causa de los insectos y de los animales herbívoros.
4. En plantas de tomate y de papa la herida conduce a una rápida acumulación de un número de proteínas relacionadas con la defensa, colectivamente denominadas PRSHs (proteínas de respuesta sistémica a la herida). De ellas, un elemento de resistencia directo contra insectos son las proteínas de inhibidores de proteasas. Sin embargo, en la acumulación de estas PRSHs es importante la participación de las enzimas proteolíticas como reguladores en los procesos intermediarios.

Por lo tanto, se determinó analizar los niveles de proteínas en las plantas inducidas por el daño causados por el ataque de la mosca minadora sobre las hojas de las plantas entre los clones resistentes y Revolución (clon susceptible).

## IV. Materiales y Métodos

### 4.1 Materiales químicos

1. Trizma Base (Tris-hidroximetil-aminometano), grado electroforesis; Glicina; N,N-Metilen-bisacrilamida (cristalino), N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED), grado electroforesis; Tritón X-100; Gelatina tipo A, grado electroforesis,  $\beta$ -mercaptoetanol, Azul de bromofenol, Tripsina, Quimotripsina, N( $\alpha$ )-*p*-tosil-1-arginina metil éster (TAME), fueron de Sigma Chemical Co. USA.
2. Acrilamida grado reactivo; Lauril sulfato de sodio (SDS); Fosfato de sodio monobásico; Metabisulfito de sodio y 87 % Glicerol fueron de Fisher Scientific Company, USA.
3. Fosfato de sodio dibásico anhidro fue de EME Science, Alemania y Serva Blau R (Coomassie Brilliant Blue R-250) fue de Serva, Feindiochemica Heidelberg.
4. Persulfato de amonio grado pureza y Reactivo de Bradford fueron de Bio-Rad.
5. Mezcla de proteínas estándares de bajo peso molecular fueron de Pharmacia.
6. Acetona, Metanol, ácido tricloroacético (TCA), Etanol, Cloroformo, Sulfato de amonio; HCl; NaCl; pastillas de NaOH y MgCl<sub>2</sub> fueron de Merck, Darmstadt, Alemania.

Otros reactivos usados fueron de grado de pureza para el análisis bioquímico.

## **4.2 Materiales Biológicos**

### **4.2.1 Clones de Papa**

Se usaron como materiales resistentes los clones 282LM87B, 220LM87B, 136LM86B y 662LM86B, y como material susceptible la variedad Revolución; todos fueron proveídos por el Departamento de Recursos Genéticos del Centro Internacional de la Papa.

### **4.2.2 Larvas y adultos de la mosca minadora**

Para obtener larvas de tercer estadio y adultos de mosca minadora se recolectaron del campo hojas de lechuga infestadas. Las larvas fueron extraídas el mismo día de la recolección colocándose cada hoja de lechuga frente a una fuente de luz y, luego, extrayendo las larvas al trasluz con ayuda de una lente de aumento (Luxo Magnifier, Port Chester N.Y.). Las larvas fueron extraídas con un estilete después de romper el tejido vegetal con el mismo y se guardaron en tubos de centrifuga (eppendorf) de 1,5 ml de capacidad a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para obtener adultos de la mosca minadora, las hojas de lechuga infestadas fueron colocadas entre papeles de toalla y guardadas en un recipiente de plástico en un lugar fresco. Después de 2 días se obtuvieron pupas que fueron colectadas con un pincel y colocadas en placas Petri en un total de 50 pupas, que se mantuvieron en un lugar fresco con algodón humedecido hasta la emergencia de los adultos que fue entre 4 y 5 días.

## **4.3 Daños de las Plantas de Papa y Colección de las Hojas**

Se sembraron 10 tubérculos de papa de cada clon en macetas de plástico de 8" x 200 mm<sup>3</sup> con arena, tierra y musgo en una proporción de 1:1:2, respectivamente. Las plantas fueron mantenidas en condiciones de invernadero entre los meses de Abril y Julio, con un rango de temperatura de 16-22 °C (mínimo) en un lapso de 20 y 80 días (Cuadro 2). Para producir el daño en algunas de estas plantas se utilizaron dos mecanismos que se indican a continuación.



### 4.3.1 Daño por la mosca

Las plantas de papa de 20 días fueron colocadas en jaulas de 1 x 0,7 x 1 m., e infestadas con adultos de mosca minadora por 24 horas, al cabo de este tiempo se recolectaron las hojas. Se utilizaron 50 adultos de mosca minadora emergidos recientemente en las placas Petri. Esto se denominó daño por mosca.

### 4.3.2 Daño artificial

Se utilizaron plantas de diferentes edades (20, 40, 60 y 80 días) cuyas hojas fueron heridas artificialmente con un estilete. Se hirieron 3 o 4 hojas por planta cubriendo los niveles

**CUADRO 2.** Siembra de tubérculos de papa en invernadero de clones resistentes y susceptibles a la mosca minadora.

Fecha de Siembra	Fecha de colección (de hojas)	Días transcurridos (edad)
21/04/97	7/10/97	80
5/07/97	7/07/97	60
14/05/97	23/06/97	40
6/11/97	7/01/97	20

**CUADRO 3.** Cada una de las seis plantas de cada clon son heridas (h) en sus hojas en el tiempo 0, y colectadas (c) después de 24 horas ó 48 horas. "E" días corresponde a plantas de 20, 40, 60 ó 80 días de edad. Las plantas dañadas serán comparadas con plantas no dañadas

Tiempo de colección (horas)	Plantas de E días					
	1	2	3	4	5	6
0	hc	hc	hc	h	h	h
24	c	c	c			
48				c	c	c

superior, medio e inferior del follaje, utilizando por cada clon seis planta de tamaño y vigoridad uniforme (Cuadro 3). Se recolectaron las hojas después de 24 o 48 horas. Como control se evaluó hojas de plantas de papa sembradas en campo (CIP, Huancayo) de 20 días de edad, libres de daño de mosca minadora. Las hojas recolectadas fueron mantenidas por 24 horas en lugar fresco antes de su congelamiento.

En todos los casos, las hojas recolectadas fueron colocadas en bolsas de papel krepé de 6 x 10 cm y, luego, sumergidos en nitrógeno líquido en el tiempo establecido. Las hojas fijadas se guardaron a -20 °C en bolsas de plástico de 30 x 60 cm hasta los siguientes tratamientos.

#### **4.4 Extracción de Proteínas**

Se prepararon extractos de hojas de papa y larvas de mosca minadora realizando todo el procedimiento en baño de hielo.

##### **4.4.1. Proteínas de las hojas de papa**

Las hojas guardadas a -20°C fueron pesadas y molidas con nitrógeno líquido en un mortero, luego se añadió 7 ml de buffer fosfato (25 mM de Fosfato de sodio, pH 5.0, conteniendo 5% de glicerol, 10 mM de metabisulfito de sodio, y 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) por gramo de peso fresco.

1. El homogenizado fue filtrado a través de 4 capas de gasa y el material retenido fue exprimido para obtener el máximo de líquido.
2. Los extractos fueron centrifugados a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C (Varifuge RF, Heraeus).
3. El sobrenadante fue tratado con acetona fría (-20°C) para precipitar a las proteínas, en una proporción de 1:1 (v/v).
4. Después de una agitación la mezcla fue mantenida en reposo a -20°C por 20 minutos.
5. Las proteínas precipitadas fueron separadas por centrifugación (20.000 x g a 4°C por 20 minutos) y secadas bajo presión reducida (Speed Vac). Estas proteínas

precipitadas fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y utilizados en los ensayos enzimáticos y electroforéticos.

#### 4.4.2 Extractos de larvas de mosca minadora

Veinte larvas de mosca de tercer estadio obtenidos según 4.4.2 fueron colocadas en un eppendorf y homogenizadas con 250  $\mu\text{l}$  de buffer tris 50 mM, pH 7,0, usando un émbolo de plástico y un rotor Cole Parmer. El homogenizado fue centrifugado a 4.000 rpm por dos minutos y el sobrenadante fue utilizado inmediatamente en los ensayos enzimáticos.

### 4.5 Ensayos Enzimáticos

#### 4.5.1 Actividad Proteolítica.

Se realizó el ensayo de actividad proteolítica de proteínas de hojas de papa (proteínas totales extraídas con acetona —4.4.1) a partir de hojas de papa según el método de Fry y col. (1994). En tres eppendorf de 1,5 ml de se mezclaron 0,25 ml de gelatina al 1% (diluído en 0,05 M de Tris-Cl, pH 8,0) y 0,25 ml de muestras de hojas de papa (60mg de peso seco diluído en 25 mM de buffer fosfato, pH 5,0). La mezcla fue incubada a diferentes tiempos por 3, 4 o 5 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se detuvo la reacción adicionando 0,75 ml de TCA al 20% con rápida agitación. Después de un reposo de 15 minutos a temperatura ambiente, la mezcla fue centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos y con el sobrenadante se repitió el mismo proceso. El sobrenadante final fue leído a 280 nm. Una unidad de actividad proteolítica (U) se definió como el incremento de la absorbancia de 0,01 a 280 nm.

Como blanco del ensayo enzimático se incubó por separado la gelatina y los extractos a los tiempos indicados (3, 4 y 5 horas para cada uno). Luego se mezclaron y se fijaron inmediatamente con TCA al 20% y se leyeron a 280 nm.

Se empleó el mismo sistema para los ensayos de actividad proteolítica de tripsina y quimotripsina (concentración final de 4  $\mu\text{g/ml}$ ) diluyendo las enzimas en agua destilada.



## 4.5.2 Inhibición de la actividad proteolítica.

### 4.5.2.1 Con Gelatina

Fue realizado según Fry y col. (1994) mediante el ensayo descrito anteriormente utilizando como fuente de proteasas el sobrenadante soluble del homogenizado de larvas de tercer estadio descrito en el punto 4.4.2. Estas muestras de proteasas fueron preincubadas con proteínas extraídas de hojas de papa (4.4.1) durante 15 minutos a temperatura ambiente antes del ensayo en una proporción 1:1 (v/v).

Como control de inhibición se usó 150  $\mu$ l de tripsina (10  $\mu$ g/ml) por cada 250  $\mu$ l de la proteína obtenida de hojas (60 mg de peso seco).

### 4.5.2.2 Con TAME (*N* $\alpha$ -*p*-tosyl-L-arginine methyl ester)

Fue realizado mediante una técnica descrita en el Manual de Worthington (1988) y ensayado con los clones 282LM87B y Revolución. En este caso, las proteínas de hojas de papa diluidas en buffer fosfato (3 mg/ml, p/v) fueron preincubados con tripsina (15  $\mu$ g/ml, diluido en 0.001 N de HCl) a temperatura ambiente por 20 minutos.

En el ensayo, se mezclaron 0,05 ml de buffer fosfato (25 mM, pH 5,0), 2,6 ml de buffer tris (46mM, pH 8,1 que contiene 11,5 mM de CaCl<sub>2</sub>) y 0,3 ml de 0,01 M de TAME.

Se dejó en reposo por 3-4 minutos en una cubeta de cuarzo dentro del espectrofotómetro (Spectronic) y luego se añadió rápidamente la mezcla de las muestras preincubadas. La lectura se llevó a cabo a 247 nm y se midió la absorbancia cada 20 segundos por 5 minutos.

## 4.6 Concentración de Proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976) usando como estándar de proteína albúmina de bovino (BSA).



**CUADRO 4.** Soluciones para formar un gel de poliacrilamida-SDS según Laemmli y col (1970).

Gel de <b>Resolución</b> 10% en 0,375 M de Tris, pH 8,9		Gel de <b>Concentración</b> 3% en 0,125 M de Tris, pH 6,8	
SOLUCIONES	ml	SOLUCIONES	ml
Agua destilada	5,21	Agua destilada	8,40
3M Tris-Cl, pH 8,9	1,25	0.5 M Tris-Cl, pH 6,8	0,42
Acrilamida/Bisacrilamida (30%/0,8%, p/v)	3,33	Acrilamida/Bisacrilamida (30 %/0,8% , p/v)	1,00
10 % p/v SDS	0,10	10 % p/v SDS	0,10
10 % p/v persulfato de amonio	0,10	10 % p/v persulfato de amonio	0,07
TEMED	0,01	TEMED	0,01
Total de monomero	10,00	Total de monomero	10,00

Nota: Se agregó isobutanol acuoso en la superficie de la solución monomérica de Resolución para una buena polimerización del borde superior.

**CUADRO 5.** Soluciones para formar un Gradiente SDS-PAGE.

Gel de resolución, 5 % de acrilamida		Gel de resolución, 20 % de acrilamida	
SOLUCIONES	ml	SOLUCIONES	ml
Agua destilada	5,21	Agua destilada	8,40
3M Tris-Cl, pH 8,9	2,50	0.5 M Tris-Cl, pH 6,8	2,50
40 % p/v acrilamida	2,50	40 % p/v acrilamida	10,00
2 % p/v bisacrilamida	6,75	2 % p/v bisacrilamida	6,75
10 % p/v SDS	0,20	10 % p/v SDS	0,20
10 % p/v persulfato de amonio	0,08	10 % p/v persulfato de amonio	0,08
TEMED	0,008	TEMED	0,008
Total de monomero	20,00	Total de monomero	20,00

Nota: La solución monomérica de Concentración fue el mismo usado en el cuadro 4.

## 4.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

Todas las corridas electroforéticas fueron realizadas en una unidad de electroforesis vertical (MONIPROTEAN II, Bio-Rad) utilizando espaciadores de 0,75 mm de grosor.

### 4.7.1. SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo al método esencialmente descrito por Laemmli (1970) preparando un gel de separación al 10% y un gel de concentración al 3% para un sistema discontinuo (Cuadro 4), o un gel de 5%-20% para un sistema en gradiente (Cuadro 5). Las proteínas de hojas de papa fue suspendida en buffer fosfato (25 mM, pH 5,0) en una relación 1:10 (p/v), y luego mezclada con buffer muestra de electroforesis (0.125 M tris-Cl, pH 6,8, conteniendo 20% glicerol, 4% de SDS, 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,002% de azul de bromofenol) en una proporción de 3:1. Luego la mezcla fue hervida por 5 minutos antes de ser centrifugada y cargada a los geles con 40-45 ug de proteína. El buffer corrida fue 25 mM de Tris-Cl, 192 mM de Glicina y 0,1% de SDS, pH 8,3. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante, 50V al inicio por 30 minutos y luego a 100 V hasta el final de la corrida, y a 4°C.

#### 4.7.1.1 Tinción y destinción de geles

Después de la corrida electroforética los geles fueron lavados con TCA al 20% por 5 minutos y luego teñidos con azul de Coomassie R-250 al 0,01% disuelto en ácido acético:metanol:agua (24:24:2:10). Los geles fueron desteñidos con metanol:ácido acético:agua (2:10:2).

### 4.7.2 Sistema SDS-PAGE/Gelatina o Zimografía

#### 4.7.2.1 Actividad Endoproteolítica

Se realizó de acuerdo al método descrito por Heussen y Dowdle (1980), para lo

cual, se preparó geles de poliacrilamida con SDS al 8% copolimerizado con gelatina al 1% (Cuadro 6). Las proteínas de hojas fueron preparadas y mezcladas con buffer muestra de electroforesis de la misma forma que el sistema anterior, con la diferencia de que no fueron hervidas. Las condiciones de corrida fueron mantenidas como en el sistema anterior.

Al término de la corrida electroforética, los geles fueron tratados como sigue:

1. Se lavaron con 25 ml de Tritón X-100 al 25 % por dos veces de 15 y 20 minutos cada uno, con el fin de remover el SDS.
2. Se lavaron con 150 ml de agua por dos veces de 15 minutos cada uno para eliminar el Tritón X-100.
3. Se incubaron en un medio de actividad enzimática consistente en 0,1 M de glicina pH 8,3 por 12 horas a 37°C, o por 24 horas a temperatura ambiente.
4. Al término de la incubación, fueron teñidos y desteñidos con azul de comassie R-250 como se describió anteriormente (4.7.1.1).

**CUADRO 6.** Soluciones para formar el gel de resolución de poliacrilamida-SDS copolimerizado con gelatina (gel de zimografía).

Gel de Resolución 8% en 0,375 M de Tris, pH 8,9	
SOLUCIONES	ml
Agua destilada	4,950
3M Tris-Cl, pH 8,9	1,250
Acrilamida/Bisacrilamida (30 %/0,8% , p/v)	2,667
1 % p/v gelatina	1,000
10 % p/v SDS	0,100
10 % p/v persulfato de amonio	0,022
TEMED	0,011
Total de monomero	10,000

Nota: 1 Para una buena polimerización en la parte superior del gel de resolución se cubrió con isobutanol acuoso.

2 El gel concentrador fue el mismo del cuadro 4.



#### 4.7.2.2 Inhibidores de proteasas

Se realizó siguiendo un método descrito por Hanspal y col (1983) modificado para visualizar en general isoINHIBIDORES de proteasas, basado en el método de Heussen y Dowdle (1980) (Cuadro 6). El proceso se siguió según lo descrito en 4.7.2.1 hasta el paso 2, y luego los geles fueron incubados en un buffer de 0,1 M de glicina pH 8,3 conteniendo tripsina en una concentración final de 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

De esta forma la tripsina digiere a la gelatina y a las proteínas de las hojas sensibles a la degradación por tripsina contenidas en el gel, menos las proteínas de hojas que son resistentes, localizando de esta manera los denominados "isoINHIBIDORES".

Para la visualización de las bandas de isoINHIBIDORES se siguió según 4.7.1.1.

##### 4.7.2.2.1 Tinción del gel de zimografía para isoINHIBIDORES con actividad de esterasas

Para visualizar a las bandas de "INHIBIDORES de proteasas", un método alternativo de actividad esterásica fue realizado según lo descrito por Shaw y col. (1970). En este caso, después de que los geles fueron incubados en un medio de glicina con tripsina, fueron sumergidos en la siguiente mezcla:

- a. 46,5 ml de agua bidestilada.
- b. 1,5 ml de  $\alpha$ - $\beta$ -naftilacetato (preparado a partir de 25 ml de agua bidestilada, 25 ml de acetona, 0,5 g de  $\alpha$ -naftilacetato y 0,5 g de  $\beta$ -naftilacetato).
- c. 5 ml de 0,5 M de Tris-Cl, pH 7,1.
- d. 50 mg de Fast Blue RR.

#### 4.8 Análisis de Geles y Cálculos

Los geles fijados en membranas de celofán, fueron colocados bajo un densitómetro (Hofer) que estuvo conectado a una computadora PC IBM compatible, desde el cual se registraron las bandas, y se analizaron con el programa GS365W.EXE (Hofer Software). Las imágenes con bandas claras en fondo oscuro fueron invertidas

usando las capacidades del software, así como el cálculo de las áreas. Por otro lado, los datos obtenidos en los ensayos enzimáticos fueron a partir de tres repeticiones cada uno, y linearizados cada uno mediante rectas de regresión aplicando el programa Excel (Windows 95).



## V. RESULTADOS

### 5.1 Niveles de Actividad proteolítica de proteínas extraídas de hojas de plantas dañadas por la mosca minadora.

Utilizándose plantas de papa de 20 días de edad, dañados por mosca minadora (4.3.1), se midieron los niveles de actividad proteolítica según Fry y col. (1994) (4.5.1). Como se observa en la Tabla 1, las unidades de actividad por gramo ( $Ug^{-1}$ ) de los clones resistentes varían de 16,5 a 20,5, mientras que en Revolución es de 17,5  $Ug^{-1}$ . También se comparó estos resultados con los obtenidos con tripsina (1,8 U) mediante unidades relativas (U/UT) en otro modo de medir el nivel de proteólisis de las hojas en este sistema de ensayo. De acuerdo a éstos resultados existen importantes márgenes de variación entre los clones 282LM87B (20,5  $Ug^{-1}$ ) y 662LM87B (20,83  $Ug^{-1}$ ) con respecto a Revolución (17,5  $Ug^{-1}$ ), sugiriendo mayores niveles de proteasas activadas o inducidas por el daño en estos clones, pero también una menor activación de proteasas en el clon 220LM87B. Se utilizó también quimotripsina como control de ensayo obteniéndose una menor actividad en este sistema que fue de 0,8.

### 5.2 Inhibición de la actividad proteolítica de extractos de larvas y de tripsina por las hojas de papa de plantas dañadas por la mosca minadora.

Las proteínas de hojas de papa de plantas dañadas por adultos de mosca minadora fueron evaluadas enzimáticamente en su capacidad de inhibir la actividad proteolítica total de extractos de larvas de mosca minadora (4.5.2.1). Como se observa en la Tabla 2, las unidades de actividad proteolítica (U) varían entre 0,05 y 0,25, siendo los valores mucho menores los probados con 282LM87B (0,05), y 662LM86B (0,12), con respecto a Revolución (0,25). La actividad proteolítica promedio de los extractos de larvas en el sistema de ensayo fue de 0,5 unidades (UL), de tal manera que, realizando una comparación relativa, las proteínas de 282LM87B inhiben en 90% (0,1 U/UL) y

**TABLA 1.** Actividad proteolítica de las proteínas de hoja de acuerdo al método de Fry y col. (1994) a partir de plantas dañadas por mosca minadora.

Clones	U°	Ug <sup>-1*</sup>	DS	U/UT <sup>†</sup> %
282LM87B	1,23	20,5	±4,23	68,33
662LM86B	1,25	20,83	±5,33	83,33
136LM86B	1,15	19,16	±4,56	63,88
220LM87B	0,99	16,50	±3,90	55,00
Revolución	1,05	17,50	±4,60	58,33

(\*)U. unidades de actividad proteolítica considerado por el cambio de absorbancia de 0,01 a 280 nm.

(†)En cada clon se usó en promedio 60 mg de proteínas de hojas extraídas con acetona.

(‡)UT, unidades totales de actividad de tripsina. El equivalente de 1,8 unidades es considerado el 100% de actividad.

DS. desviación estándar.

**TABLA 2.** Inhibición de la actividad proteolítica de extractos de larvas de mosca minadora por efecto de las proteínas extraídas de hojas dañadas por mosca minadora, según el método de Fry y col. (1994).

Clones*	Tripsina		Extracto de larva de la mosca minadora	
	U	U/UT <sup>†</sup>	U	U/UL <sup>‡</sup>
282LM87B	2,35	1,305	0,05	0,10
220LM87B	3,30	1,833	0,33	0,66
136LM86B	4,50	2,500	0,20	0,40
662LM86B	3,20	1,707	0,12	0,24
Revolución	4,40	2,444	0,25	0,50

(\*)De cada clon se usó 45 mg de proteínas extraídas con acetona.

(†)UT, unidades totales de actividad proteolítica de tripsina. El equivalente de 1,8 unidades es considerado el 100% de actividad.

(‡)UL, unidades totales de actividad proteolítica de sobrenadante de larva de mosca minadora. El equivalente de 0,5 unidades es considerado el 100 % de actividad.

**TABLA 3.** Porcentaje de inhibición relativa de la actividad proteolítica de tripsina en TAME utilizando proteínas de hojas del clon 282LM87B y Revolución.

	Tripsina <sup>†</sup>	Tripsina más hojas	
		282LM87B	Revolución
Umg <sup>-1</sup> tripsina*	363,88	25,00	83,33
Porcentaje relativo de inhibición de tripsina	0,00	93,13	77,09

(\*)Se usó la siguiente fórmula para los cálculos de unidades totales de actividad de tripsina,

$$Umg^{-1} = (5,55)(\Delta A_{247/min})(mg^{-1} \text{ tripsina}).$$

(†)Se usó 12 ug de tripsina en la solución total.

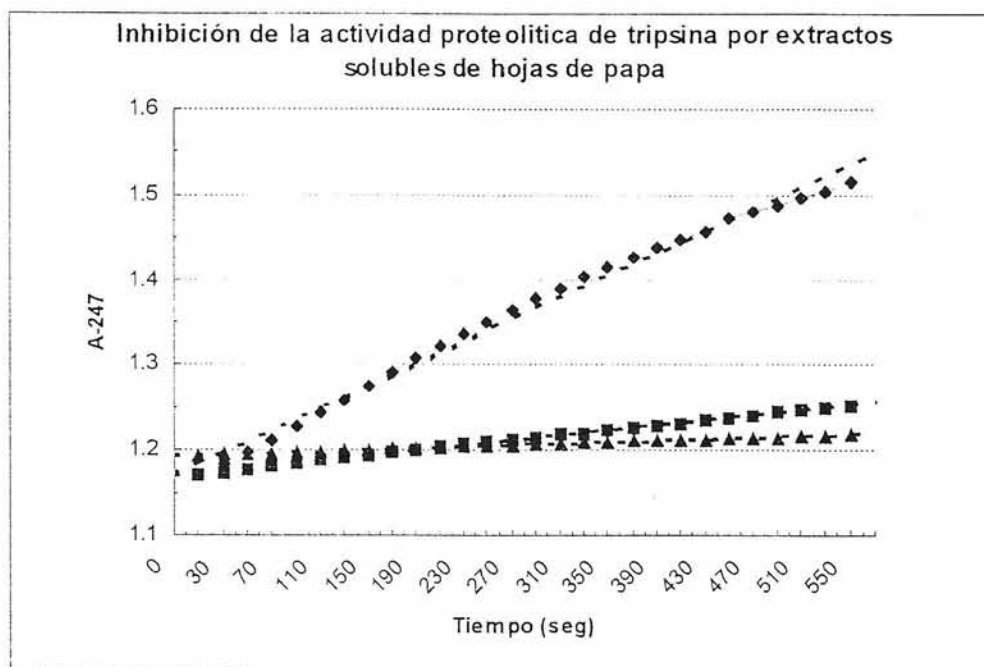


Figura 11. Las muestras de hojas de papa (3 mg/ml de extracto total) de los clones 282LM87B y Revolución, fueron preincubadas con tripsina (15  $\mu$ g/ml) de acuerdo a métodos, y ensayados para ver el grado de actividad proteolítica total con TAME. Las curvas representan promedios de tres muestras cada uno. ◆, Curva de actividad proteolítica de tripsina, ▲ curva de actividad proteolítica de tripsina más 282LM87B, ■ curva de actividad proteolítica de tripsina más Revolución.



662LM86B en 76% (0,24 U/UL) la actividad proteolítica de los extractos de larvas, con respecto a Revolución que inhibe el 50% (0,5 U/UL).

De la misma forma se realizaron ensayos con tripsina. Las unidades de actividad proteolítica de tripsina (UT) en este sistema fué de 1,8 unidades. En este caso, sin embargo, se observó un sinergismo proteolítico, es decir, los valores de las unidades de actividad son mayores a 1 (Tabla 2) después de combinarse la tripsina con las proteínas de hojas de papa. A pesar de ello se obtuvieron diferencias concordantes a los valores anteriores entre las unidades relativas (U/UT). Estos señalaron mayor inhibición en los clones 282LM87B y de 662LM86B con respecto a Revolución.

En otro ensayo utilizando TAME (N-*p*-tosyl-L-arginine methyl ester) (4.5.2.2) como sustrato de proteasas específico para tripsina, se midió el grado de inhibición de este enzima cuando se combinaron con muestras de hojas de papa de dos clones: 282LM87B y Revolución. Se encontró inicialmente en promedio una actividad de 363,88 unidades por miligramo ( $Umg^{-1}$ ) de tripsina, el cual disminuyó al combinarse con las proteínas de hojas a 77% (Revolución) y 93% (282LM87B) respectivamente (Tabla 3 y Figura 11).

### 5.3 Patrón de bandas de proteínas totales de hojas de papa en geles de poliacrilamida.

Se separaron proteínas de hojas de papa, en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (4.7.1) entre plantas dañadas y no dañadas por la mosca minadora. La figura 12 muestra el patrón de bandas de los clones en estudio obtenidos del campo (4.3) mientras que las figuras 13 y 14 son de plantas cultivadas en invernadero, y dañados o no por adultos de la mosca minadora (4.3.1). En todos los clones se observó un ligero incremento de la intensidad de las bandas de proteínas por causa del daño. En los clones resistentes este cambio es mayor, pero, cuando se compararon el patrón de intensidad de cada una de las bandas de migración iguales ( $R_f$ ) entre diferentes plantas de un mismo clon, no se pudo obtener un cuadro simple, desde el punto de vista de identificar bandas de proteínas relacionadas con la resistencia,



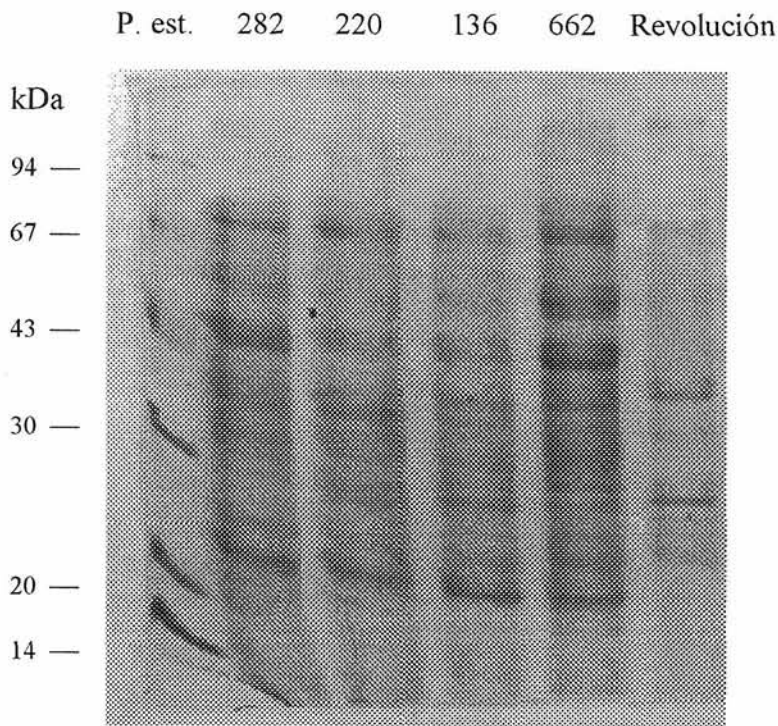


Figura 12. Separación de proteínas de hojas de papa en SDS-PAGE. Las muestras provienen de plantas cultivadas en el campo (CIP, Huancayo). P. est, proteínas estándares.

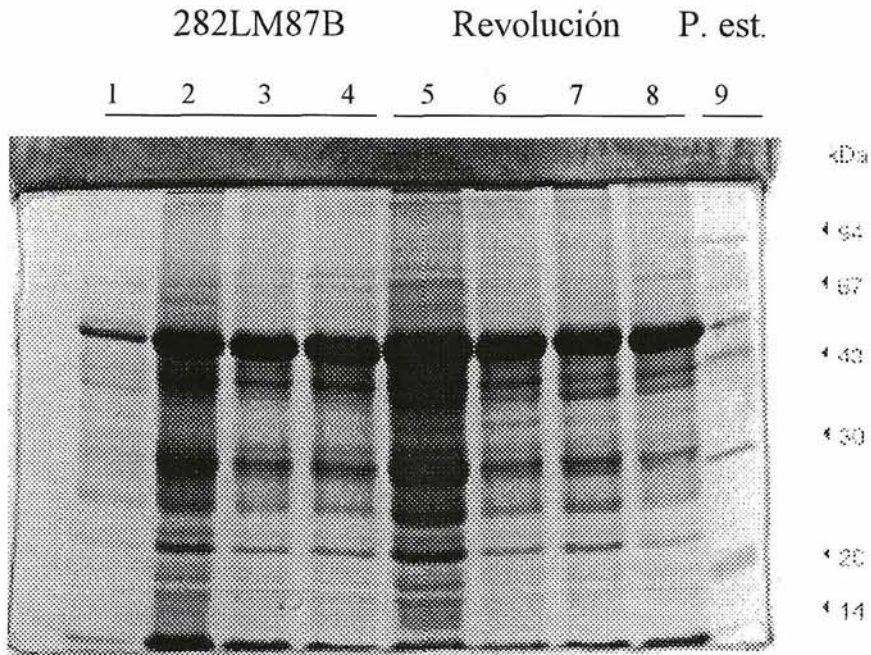


Figura 13. Separación de proteínas de hojas de papa en SDS-PAGE. Los clones 282M87B y Revolución fueron cultivados en invernadero y sometidos al daño por la mosca minadora (ver métodos). Los carriles 1, 2, 5 y 6 provienen de plantas evaluadas antes del daño, mientras que los carriles 3, 4, 7 y 8, de plantas después del daño.



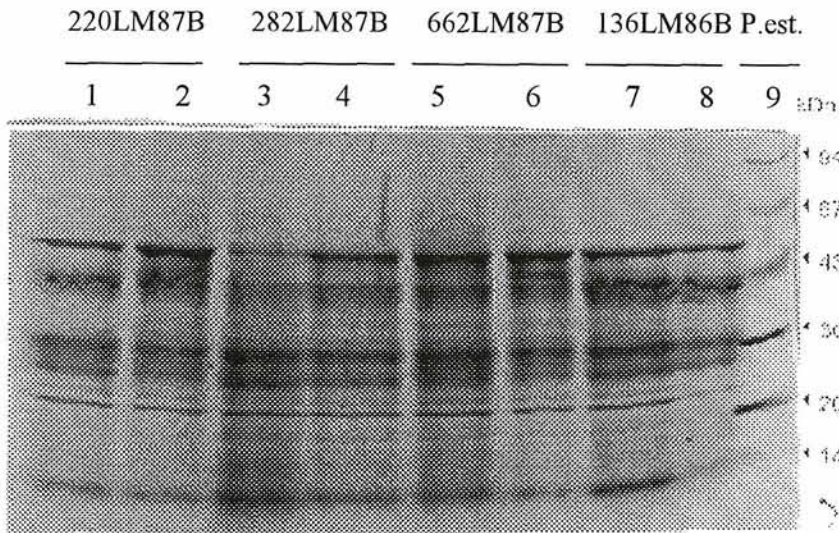
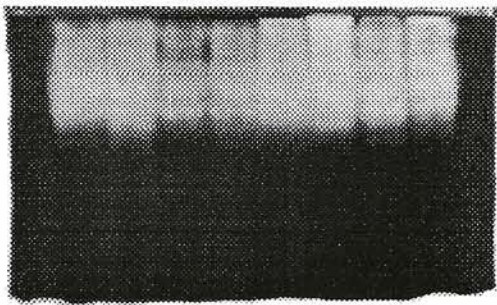
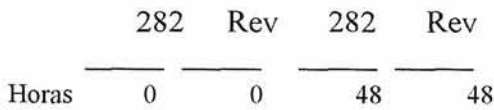
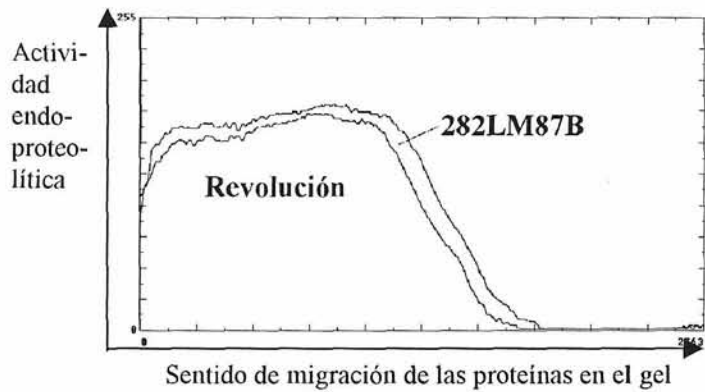


Figura 14. Separación de proteínas de hojas de papa en gradiente de poliacrilamida SDS-PAGE (5%-20%) de muestras similares al descrito en la figura 11. Los carriles 1, 3, 5, 7, y los carriles 2,4, 6 y 8, son de plantas no dañadas y dañadas por la mosca minadora, respectivamente. P. est, proteínas estándares.



A

### ANALISIS POR DENSITOMETRIA



B

Figura 15. Actividad endoproteolítica en geles de poliacrilamida (zimografía) de hojas de papa, entre plantas no dañadas (0 horas) y dañadas (48 horas) por mosca minadora entre los clones 282LM87B y Revolución. A, gel de zimografía mostrando las áreas de endoproteolisis (zonas claras). B. Barrido de las áreas de endoproteolisis con densitómetro a partir de geles de zimografía comparando solamente plantas dañadas. Se observó que existe en promedio mayor endoproteolisis en el clon 282LM87B.

como señala el segundo objetivo de este trabajo. Por ejemplo, en unas plantas se observaron que algunas bandas aumentaron de intensidad después del daño, mientras que en otras estas mismas bandas disminuyeron. (Figura 13 y 14).

#### **5.4 Actividad Endoproteolítica mediante zimografía**

En una nueva aproximación para encontrar diferencias bioquímicas entre los clones de papa resistente (282LM87B) y susceptible (Revolución) a mosca minadora por electroforesis, se realizaron zimografías según Heussen y col. (1980)(4.7.2.1), para desarrollar actividad endoproteolítica entre plantas dañadas por la mosca minadora. Mediante el análisis del barrido por densitómetro de las áreas de endoproteólisis en los geles se encontró, someramente, mayor actividad proteolítica en 282LM87B con respecto a Revolución (Figura 15 a y b). Se calculó un área de endoproteólisis de aproximadamente 8% en favor de 282LM87B.

#### **5.5 Inhibidores de proteasas mediante zimografía.**

Mediante otro ensayo de zimografía para detectar inhibidores de proteasas (Hanspal y col, 1983) se encontró una banda de aproximadamente 105 kDa con diferentes intensidades entre los clones resistentes y susceptibles a la mosca minadora, con el cual se pudo diferenciar notablemente a los clones en estudio. Esto es apreciado en la figura 16 entre plantas de papa de 20 días de edad dañados artificialmente (4.3.2) donde se probaron, además de la variedad Revolución, otros clones comerciales considerados susceptibles al ataque severo de la mosca minadora.

En estos geles es también apreciado otra banda menos definida de 63 kDa. Las bandas de inhibidores de proteasas de la figura 16 fueron revelados mediante tinción de esterasas (ver métodos). Sin embargo, en los experimentos iniciales las bandas de inhibidores de proteasas fueron teñidos con azul de coomassie. Los geles teñidos con azul de comassie no revelan bien a la banda de 63 kDa.

En los ensayos de zimografía realizados con proteínas de plantas dañadas artificialmente mostraron también la presencia de las bandas de 63 y 105 kDa mayormente intensas en los clones resistentes con respecto a Revolución. La figura 17 es



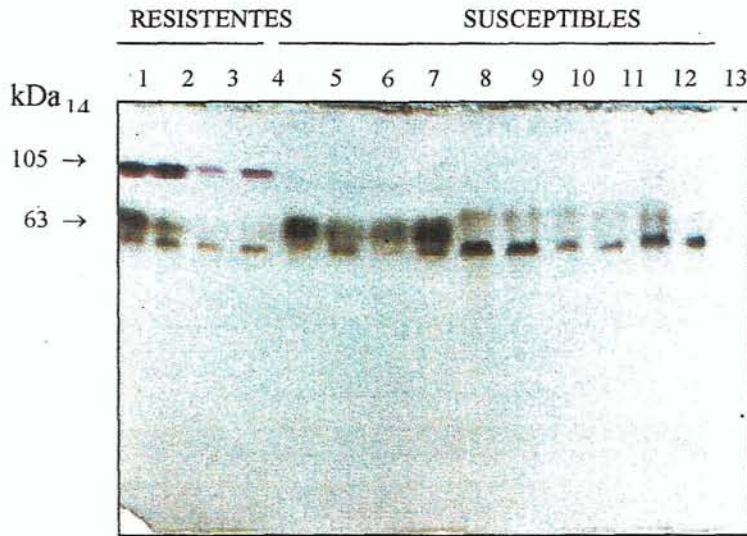


Figura 16. Bandas de "inhibidores de proteasas" de hojas de papa revelados con tinción de esterasas (ver métodos). Las bandas de proteínas, estimados en 63 y 105 kDa, muestran diferentes intensidades entre los clones resistentes y susceptibles. 1, 282LM87B; 2, 662LM86B; 3, 136LM86B; 4, 220LM87B; 5 y 8, Revolución; 6 y 7, Desiree; 9 y 10, Canchán; 11 y 12, Yungay; 13 y 14, Perricholi.

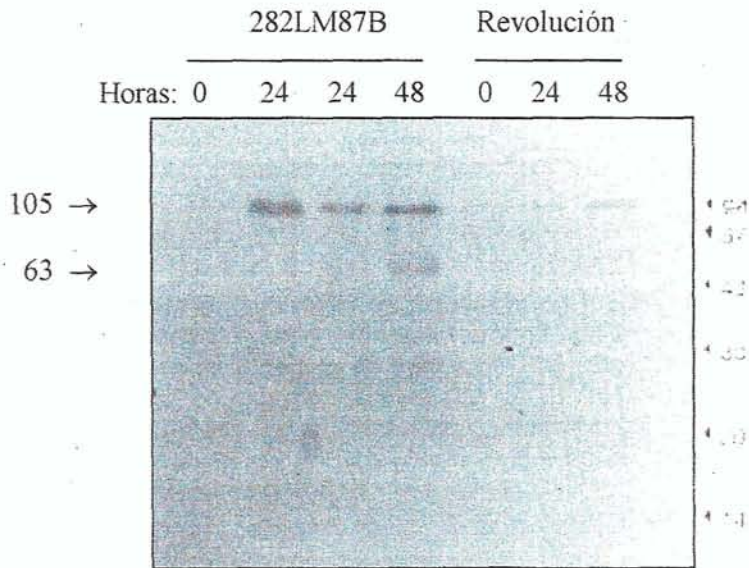


Figura 17. Separación de proteínas de hojas de papa en SDS-PAGE. Los clones 282M87B y Revolución fueron cultivados en invernadero y sometidos al daño por la mosca minadora (ver métodos). Los carriles 1, 2, 5 y 6 provienen de plantas evaluadas antes del daño, mientras que los carriles 3, 4, 7 y 8, de plantas después del daño.



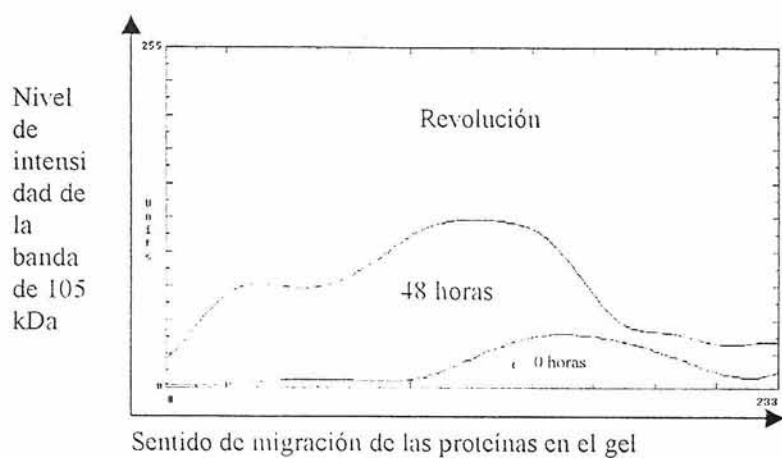
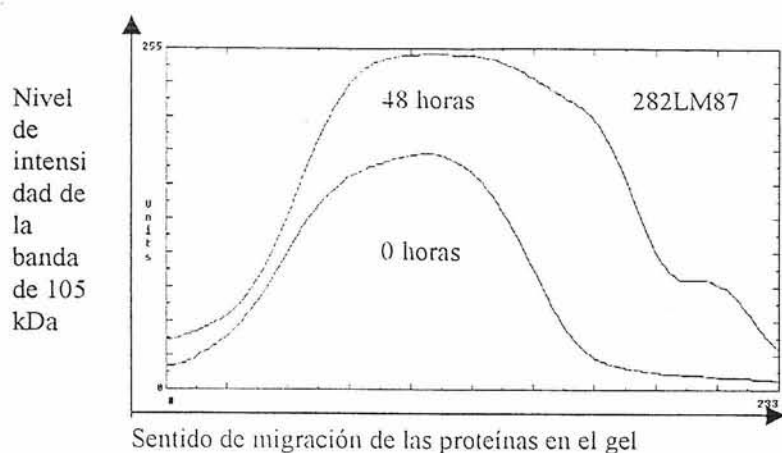


Figura 18. Las bandas de inhibidores de proteasas de los clones 282LM87B y Revolución determinados por zimografía son barridos con un densitómetro para comparar las áreas de intensidad de la banda de 105 kDa. Se observó que la intensidad de expresión de esta banda es mayor en el clon resistente antes del daño de las plantas (0 horas). En ambos clones la intensidad de la banda aumenta después del daño (48 horas), sin embargo, hay una diferencia comparable entre el clon resistente y el susceptible (ver 5,5).

el resultado de plantas dañadas artificialmente. En este gel se observa que el grado de inducción de la banda de 105 kDa ya es evidente a las 24 horas después del daño artificial, mientras que en Revolución recién se detecta a las 48 horas.

Esta diferencia en la intensidad de expresión de la banda de 105 kDa es apreciada en la figura 18 entre los clones 282LM87B y Revolución, y en el que dicha banda fue escaneada con un densitómetro (Hoefer) a partir de geles teñidos con actividad de esterasa, registrándose diferentes picos entre 0 horas y 48 horas después del daño artificial. Midiendo solamente las alturas máximas de los picos se encontró una relación de intensidad entre 282LM87B y Revolución, de 4,2:1 respectivamente, antes del daño y 2,14:1 después del daño. Midiendo ésta relación entre los mismos clones se calcula que 282LM87B aumentó 1,4 veces la intensidad de sus bandas, mientras que Revolución lo hizo 2,8 veces. A pesar de que hay una aparente mayor inducción de la banda de 105 kDa en Revolución, sin embargo no alcanza el nivel mostrado por 282LM87B que es en promedio dos veces mayor.

#### **5.6 Nivel de expresión de la banda de 105 kDa entre plantas de diferentes edades.**

Se midió también la intensidad de la banda de 105 kDa entre plantas de diferentes edades, dañadas artificialmente. La figura 19 muestra los resultados obtenidos con los cuatro clones resistentes y Revolución, en donde se observa una notable disminución en la intensidad de la banda conforme la planta es mayor de edad.

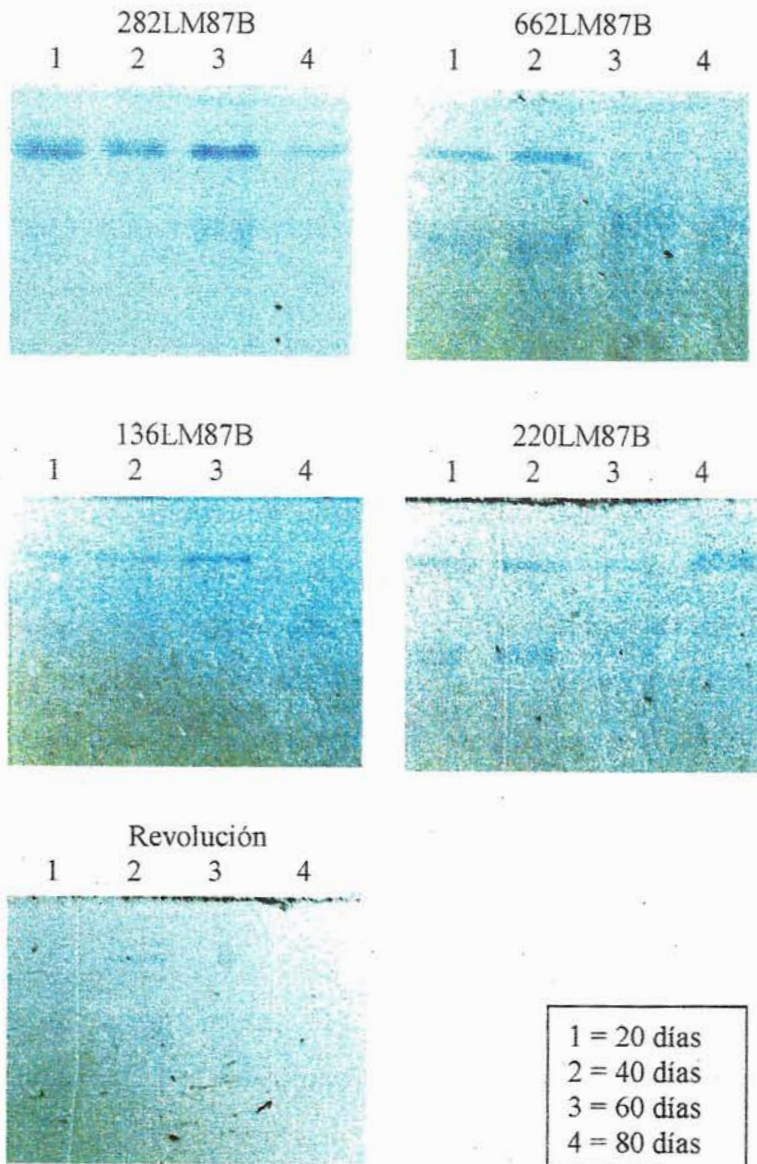


Figura 19. Influencia del daño de las hojas de las plantas (a las 48 horas) a través de la expresión de la banda de 105 kDa entre plantas de diferentes edades (cuadro derecho inferior). Se observó que ésta banda, revelada por zimografía, fue más evidente en el clon 282LM87B.



## VI. DISCUSION

Desde que la injuria o el daño provocado sobre las hojas de muchas plantas pueden alterar las concentraciones de sus componentes químicos por procesos de inducción (Sanchez-Serrano y col., 1993; Barker, y col, 1995; Hodge y col., 1999) en este trabajo se evaluó plantas de papa que fueron dañadas por adultos de mosca minadora y artificialmente, con la intención de medir los componentes inducidos (proteínas), y de esta manera hacer una comparación de las capacidades biológicas de las plantas, en un intento por determinar diferencias bioquímicas entre ellas, que puedan ser correlacionadas con el atributo de la "resistencia" de los clones en estudio. Los resultados demostraron que existen diferencias a nivel de la inducción de las proteínas, principalmente en dos de los clones resistentes con respecto a Revolución. En estos resultados: el nivel de inducción de la actividad proteolítica, el nivel de inhibición de la actividad proteolítica de extractos de larvas de la mosca minadora, y la presencia mayor de bandas de inhibidores de proteasas (63 y 106 kDa) en las hojas, mostraron que los clones 282LM87B y 662LM87B tienen las mayores diferencias con respecto a Revolución (Tablas 1 y 2, Figura 16).

Es considerado que la herida, como el producido por la masticación de insectos fitófagos o el daño mecánico de naturaleza abiótica, desencadena una respuesta en las plantas dañadas, que incluyen la activación de genes relacionados con la defensa y con la regeneración del tejido dañado. La velocidad de estas respuestas parecen estar correlacionadas con la resistencia (Bowles, 1990; Dixon y Harrison, 1994; Anantkrisma, 1994). De tal manera que dependiendo de la calidad del "sistema de alarma", el encargado de producir los componentes de defensa de las plantas (calidad genética), dependerá también la estabilidad de las mismas ante a un daño severo. En este sentido, el nivel en grado mayor de las actividades proteolíticas y de inhibidores de proteasas observados en las hojas de los clones 282LM87B y 662LM86B, después de ser sometidos al estrés del daño, parecen reflejar una mejor calidad de su sistema de alarma con respecto a Revolución.



La Tabla 1 y la figura 15 muestran en general una mayor inclinación en la producción de proteasas por los clones resistentes. Cabe señalar que el nivel de activación de proteasas en las plantas es importante porque pueden constituir activadores específicos de zimógenos presentes en las células para regular la formación de diferentes proteínas. Por ejemplo, en los sistemas planta-patógeno, la activación de zimógenos de quitinasas mediadas por las proteasas es muy importante para las plantas resistentes a hongos (Lange y col., 1996, Giri y col., 1998). Además, las proteasas se encuentran involucradas en los procesos de señalización. Por ejemplo, esta actividad es reconocida para el procesamiento de una prohormona de sistemina cuyo componente en forma madura (sistemina) puede activar genes de defensa sistémicamente en cada una de las células de toda la planta (Ryan y Pearce, 1998). Como se conoce, la sistemina es activado en las plantas (pertenecientes a las Solanaceas) después que éstas hallan sido dañadas, y activa genes de defensa, entre otros, a las proteínas inhibidores de proteasas y, por lo menos, a 19 proteasas (Bergey y col, 1996; Schaller, 1999). La activación de inhibidores de proteasas por herida esta bien documentada en un modelo propuesto por Farmer y Ryan (1992). Por lo tanto una pequeña variación en los niveles de acción de las proteasas puede revelar en términos moleculares el grado de eficiencia de la planta para responder ante una agresión. Recalcando, los clones 282LM87B y 662LM86B presentan las mejores características de inducción de proteasas con producción de inhibidores de proteasas (Tabla 1 y 2 y figura 11). Cabe señalar que el clon 282LM87B ha mostrado resistencia a la rancho y los virus de papa PVX y PLRV (Tenorio, y col, 1995) corroborando de alguna manera el resultado obtenido con la eficacia de este clon al daño severo de mosca minadora y de patógenos. Debido a que los inhibidores de proteasas son considerados factores importantes de resistencia a insectos en plantas (Broadway y col., 1986; Ryan, 1990; Dymock y col., 1992) el nivel mayor de Inhibidores de proteasas encontradas en las hojas dañadas del clon 282LM87B podría estar influenciando el comportamiento de las poblaciones de *L. huidobrensis* en el campo, siendo de esta manera, un clon menos vulnerable para la depredación. Trabajos realizados con restos de plantas previamente heridas y utilizados como alimentos de insectos se han observado alteraciones en el comportamiento de algunos de ellos (Reynolds y Smith, 1985; Bergelson y col. 1986; Hodge y col. 1999). Mas allá, los inhibidores de proteasas son considerados compuestos naturales de los vegetales que afectan la viabilidad de los insectos, una conclusión desarrollada a partir de estudios con dietas artificiales (Burgess

y col., 1991; Dymock y col. 1992), con plantas naturalmente resistentes (Birk, 1976; Gatehouse y col., 1979; Ryan, 1990; Baker y col., 1995), y con plantas que llevan un gen de resistencia (plantas transgénicas) (Wolfson y col., 1995).

Con la intención de encontrar diferencias específicas a nivel de inhibidores de proteasas entre los clones resistentes y susceptibles, se realizaron ensayos de zimografía, un método que permite evaluar proteínas mediante su función. Como muestra la figura 16, el método aplicado pudo fácilmente identificar a los clones resistentes de los susceptibles a través de la banda de 105 kDa al contrario del análisis de patrones de bandas de proteínas totales en SDS-PAGE. El fracaso de obtener diferencias a través del patrón de proteínas inducidas por la herida también lo experimentó Logeman y col. (1988) utilizando un sistema SDS-PAGE en tubérculos de papa. Aparentemente el sistema SDS-PAGE es más favorable para el análisis de genotipos que para fenotipos. Por el contrario, el análisis de los rasgos fenotípicos por zimografía parece ser muy favorable desde que otros autores lograron encontrar diferencias específicas aplicando éstas técnicas (Forcada y col., 1996; Giri y col., 1998).

La banda de proteína de 105 kDa, sin embargo, es desconocida por lo que se recomienda realizar progresos para su identificación. Desde que estas bandas diferencian electroforéticamente a los clones de papa resistentes y susceptibles a la mosca minadora es necesario, también, realizar otros estudios para evaluarlo como un marcador bioquímico. El desarrollo de marcadores bioquímicos de resistencia a insectos en plantas es de gran importancia para los programas de mejoramiento genético (Tinguey, 1994). Cabe señalar que el revelado de las bandas de 63 y 105 kDa por medio de la actividad esterásica es también utilizado en la detección de otros tipos de inhibidores de proteasas (Hejgaard, 1981).

Tomando en conjunto los datos encontrados se postula que los clones de papa resistentes a la mosca minadora, en especial los clones 282LM87B y 662LM86B sintetizan o activan eficazmente y en corto tiempo los niveles de sus proteasas frente al daño provocado por el ataque de mosca minadora en sus hojas. De esta manera, esta inducción influencia tempranamente la aparición de nuevos compuestos químicos de defensa como los inhibidores de proteasas en las hojas, entre las cuales se encuentran las bandas de inhibidores de proteasa de 63 y 105 kDa. Estos compuestos inducidos, en conjunto van a confrontar con mayor probabilidad el éxito de la planta al daño severo que ocasiona la plaga de la mosca minadora en el campo (Figura 6). Trabajos realizados



con plantas resistentes a herbívoros señalan que subsecuentes inducciones de las hojas de las plantas por el daño (como ocurre naturalmente en los campos) incrementa aún más la estabilidad de la planta, observándose disminución de insectos herbívoros en sus alrededores (Agrawal, 1998).

Finalmente, los diferentes valores que se han hallado entre todos los clones de papa resistentes a la mosca minadora, podrían estar reflejando mecanismos de resistencias distintos entre ellos, por lo cual deberían ser analizado más fehacientemente con otros ensayos.

### MECANISMO DE RESISTENCIA A MOSCA MINADORA EN LOS CLONES 282LM87B y 662LM86B

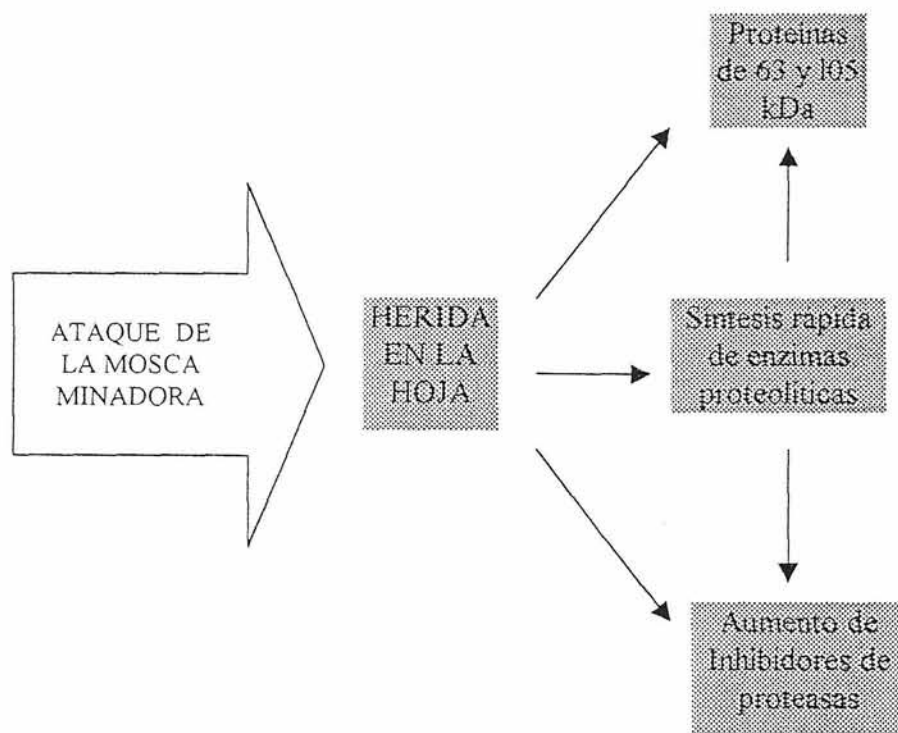


Figura 17. Representación del ataque de la mosca minadora sobre las hojas de los clones resistentes 282LM87B y 662 LM86B en condiciones naturales, y la respuesta de este último para contrarrestar el daño interpuesto. (El símbolo p es para denotar la proteína localizada por zimografía, de pesos moleculares estimados en 63 y 105 KDa, respectivamente.)

## VII. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias bioquímicas observadas a través de las actividades enzimáticas e inhibición de las actividades enzimáticas entre los clones resistentes y susceptibles a la mosca minadora
2. Los clones 282LM87B y 662LM86B son los que presentan mayores diferencias de las actividades bioquímicas estudiadas.
3. El daño de las plantas en forma artificial o por mosca produce en forma similar la inducción de isoinhibidores de proteasas observados en zimografía.
4. La banda del isoinhibidor de proteasa de 105 kDa, diferencia electroforéticamente a los clones resistentes de los susceptibles.
5. El nivel de inducción de la banda de 105 kDa es dependiente de la edad de la planta y de los clones en estudio.
6. Los resultados de inhibición proteolítica obtenidos (sobre todo en los clones 282LM87B y 662LM86B), sugieren que constituyen importantes factores de resistencia en los clones estudiados.



## VIII. RECOMENDACIONES

1. El nivel mayor de la actividad proteolítica e inhibición de la actividad proteolítica encontrado en los clones 282LM87B y 662LM86B que en los clones 136LM86B y 220LM87B, estarían señalando diferentes mecanismos de resistencia, por el cual se recomienda realizar otros ensayos entre estos clones como medir la actividad de polifenol oxidasa,  $\beta$ -glucanasa, fenil amonio-liasa, y otros (ver 2,5).
2. Debido a la importancia de tener a la mano marcadores moleculares de resistencia a insectos, es recomendable continuar nuevos estudios con la proteína de 105 kDa. Por ejemplo se pueden estudiar el comportamiento de estas bandas en progenies segregantes. Por otro lado, la banda de 105 kDa ofrece también otras posibilidades de estudios para responder a diferentes preguntas como: ¿cuál es el mecanismo genético de inducción de ésta proteína?, ¿en qué lugar se sintetiza?, ¿qué proteína es?, ¿cuál es su relación con la resistencia a la mosca minadora?, etc., de allí que uno de los primeros pasos es su purificación.

## IX. LITERATURA CITADA

1. Agrawall, A.A. 1998. Induced Responses to Herbivory and Increased Plant Performance. *Science*. 279: 1201-1202.
2. Ananthkrishnan, T. N. 1996. Chemical signals, pattern of defence gene expression and molecular recognition in insect-plant interactions. *En: Biotechnological Perspectives in Chemical Ecology of Insects*. Edited by T. N. Ananthkrishnan. Science Publishers, Inc. USA. pp, 4-14.
3. Anónimo. 1995. Potatoes in the 1990s. Situation and prospects of the world potato economy: A joint study. The basic food-stuffs services. Food and Agriculture Organization Commodities and Trade Division, and Post Harvest Management Marketing Program. International Potato Center, Rome. 1995.
4. Anónimo. 1998. Biotechnology-Assited Breeding to Reduce Pesticide Use in Potatoes. 1993-1997 (GLO-91-016). Final Report. International Potato Center and United Nations Development Program Division of Global and Interregional Projects., pp 29-32.
5. Ave, D. A., Eannetta, N. T. and Tingey, W. M. 1986. A Modified Enzimic Browning Assay for Potato Glandular Trichomes. *Amer. Potato J.* 63: 553-558.

6. Barker, A.M., Wratten, S. D. and Edwards, P. J. 1995. Wound-induced changes in tomato leaves and their effects on the feeding patterns of larval lepidoptera. *Oecologia*. 101: 251-257.
7. Barret, A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. *In: Plant Proteolytic Enzymes*. De. M.J. Dalling, 1: 1-16. Boca Raton, Fl: CRC Press.
8. Baron, C. and Zambryski, P. C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme?. *Annu. Rev. Genetics* 29: 107-129.
9. Bell, E.; Creelman, R.A. and Mullet, J.E. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8675-8679.
10. Bergey, D.R; Howe, G.A. and Ryan, C.A., 1996. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12053-12058.
11. Birk, Y, 1976. Proteinase inhibitors from plant sources. *Methods in Enzymol.* 45, 695-697.
12. Bishop, P.D.; Makus, D.J.; Pearce, G. and Ryan C. A. 1981. Proteinase inhibitor-inducing activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3536-3540.

13. Bohlmann, H. 1994. The role of thionins in plant protection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 1-16.
14. Bouthyette, P. Y., Eanneta, N., Hannigan, K. J. and Gregory, P. 1987. *Solanum berthaultii* trichomes contain unique polyphenoloxidases and peroxidase. *Phytochemistry* 26: 2949-2954.
15. Bowles, D.J. 1990. Defense-Related Proteins in Higher Plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.
16. Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
17. Broadway, R. M., Duffey, S. S., Pearce, G. and Ryan C. A. 1986. Plant Proteinase Inhibitors: A defence against herbivorous insects?. *Entomol Exp. Appl.* 41: 33-38.
18. Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J. and Broglie, R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
19. Burgess, E.P.J.; Stevens, P.S.; Keen, G.K.; Laing, W.A. and Christeller, J.T. 1991. Effects of protease inhibitors and dietary protein level on the black field cricket *Teleogryllus commodus*. *Entomol. Exp. Appl.* 61: 123-130.



20. Campos, R. 1978. Control químico de la "mosca minadora" (*Liriomyza huidobrensis*) en el Valle de Cañete. Rev. Per. Entomologia 21:105-108.
21. Cisneros, F. H. 1992. El Manejo Integrado de Plagas. Guía de Investigación CIP 7. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
22. Cisneros, F. H. 1995. Control de Plagas Agrícolas. AGLIS Electronics. Lima, Perú.
23. Chavez, G. L. and Raman, K. V. 1987. Evaluation of Trapping and Trap Types to Reduce Damage to Potatoes by the Leafminer, *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae). Insect. Sci. Applic. 6:265-270.
24. Chang, C. and Shockey, J.A. 1999. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. Current Opinion in Plant Biology 2:352-358.
25. Chrispeels, M. J. and Sadava, D. E. 1994. Plants, genes and agriculture. Jones and Bartlett Publishers Inc. USA.
26. Dalkin, K. and Bowles, D. J. 1989. Local and systemic changes in gene expression induced in tomato plants by wounding and by elicitor treatment. Planta 179:367-375.
27. Davies, E. 1987. Action potentials as multifunctional signals in plants: A unifying hypothesis to explain disparate wound responses. Plant Cell Envirom. 10: 623-631.

28. Dymock, J.J.; Laing, W.A.; Shaw, B.D.; Gatehouse, A.M.R. and Christeller, J.T. 1992. Behavioural and physiological responses of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*) feeding on protease inhibitors. N.Z.J. Zool. 19:123-131.
29. Dixon, R. A. and Harrison, M. J. 1994. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 479-501.
30. Duan, X. ; Li, X.; Xi, X.Q.; Abo-El-Saad, M.; Xu, D. and Wu, R. 1996. Transgenic rice plants harboring and introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. Nature Biotech. 14, 494-498.
31. Duchesne, M.; Fritig, B. and Hirth, L. 1977. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco mosaic virus-infected hypersensitive tobacco. Density-labelling evidence of *de novo* synthesis. Biochim. et Biophys. Acta 484, 465-481.
32. Ewell, P. T., Fano, H., Raman, K. V., Alcazar, J., Palacios, M. and Carhuamaca, J. 1990. Farmer Management of Potato Insect Pest in Peru. Food Systems Research Series No. 6. International Potato Center (CIP). Lima, Peru.
33. Farmer, E.E. and Ryan, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid active the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. The Plant Cell 4:129-134.
34. Forcada, C., Alcácer, E. , Dolores, M. and Martinez, R. 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strain, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Archives of Insect Biochemistry and

35. Fry, S.M.; Huang, J.S. and Milholland, R.D. 1994. Isolation and preliminary characterization of extracellular protease produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. *Phytopathology* 84, 357-363.
36. Gardner, H.W. 1995. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. *HortScience* 30: 197-205.
37. Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., Dobie, P., Kilminster, A. M. and Boulter, D. 1979. Biochemical Basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.* 30:948-958.
38. Giri, A.P.; Harsulkar, A.M.; Patnkar, A.G.; Gupta, V.S.; Sainani, M.N.; Deshpande, V.V. and Ranjekar, P.K. 1998. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *Plant Pathology* 47: 693-699.
39. Golmirzaie, A. M. and Tenorio, J. 1992. Breeding Potato for Resistance to Insect Pests. Proc. 8th. Symp. Insect-Plant Relationships, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. S. B. J. Menken, J. H. Visser & P. Harrewijn (eds), pp. 301-303.
40. Gómez, Y. y Rodríguez, C.L. 1994. Captura de adultos de *L. huidobrensis* (Blanchard), mediante trampas amarillas y su relación con el daño producido en plantas de papa (*Solanum tuberosum*). *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No.



41. Graham, J. J., Pearce G., Merryweather, J., Titani, K. Ericson, L. and Ryan C. A. 1985. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves I. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor I and its post-translational processing. J. Biol. Chem. 260:6555-6560.
42. Hanspal, J. S., Bushell, G. R. and Ghosh, P. 1983. Detection of Protease Inhibitors Using Substrate-Containing Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Anal. Biochem. 132, 288-293.
43. Harsulkar, A.M., Giri, A.P.; Patankar, A.G.; Gupta, V.S.; Sainani, M.N.; Ranjekar, P.K. and Deshpande, V.V. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinase and larval growth. Plant Physiol. 121: 497-506.
44. Hejgaard, J. 1981. Isoelectric focusing of subtilisin inhibitors: Detection and partial characterization of cereal inhibitors of chymotrypsin and microbial proteases. Analytical Biochem. 116: 444-4449.
45. Herrera, A.J. 1963. Problemas insectiles del cultivo de la papa en el Valle de Cañete. Rev. Per. Ent. 6(1): 1-9. Lima, Perú.
46. Heussen, C. and Dowdle, E. B. 1980. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and

47. Hodge, S.; Wratten, S.; Smiyh, J.; Thomas, M. and Frampton, C. 199. The role of leaf wounding and epigeal predator on caterpillar damage to tomato plants. Ann. appl. Biol. 134: 137-141.
48. Jacinto, T.; Farmer, E.E. and Ryan, C.A. 1993. Purification of potato leaf plasma membrane protein pp34, a protein phosphorylated in response to oligogalacturonide signals for defense and development. Plant Physiol. 103, 1393-1397.
49. Johnson, R.; Narvaez, J.; An, G. and Ryan, C. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9871-9875.
50. Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature (London). 227: 680-685.
51. Linthorst, H.J. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 10, 123-150.
52. Lizarraga, A. D. 1990. Biología de la Mosca Minadora *Liriomyza huidobrensis*, Blanchard (Diptera, Agromyzidae). Revista Latinoamericana de la Papa 3: 30-40.
53. Logeman, J.; Mayer, J.E., Scell, J. and Willmitzer, L. 1988. Differential expression of genes in potato tubers after wounding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1136-1140.

54. Lyon, G.D.; Reglinski, T. and Newton, A.C. 1995. Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathol.* 44, 407-427.
55. Martinez, E. 1996. Presentamos a María Tambaña. *Boletín Interno (CIP)* 23 (12): 1-3.
56. McQueen-Mason, S.J. 1995. Expansins and cell wall expansion. *Journal of Experimental Botany* 46: 1639-1650.
57. Medina-Filho, H.P. 1980. Rep. Tomato. *Filogenetics Coop.* 30: 26. Mencionado en: Mendoza, A. y Simpson, J. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. *Avance y Perspectivas* 16, 53-57.
58. Midmore, J. D. 1986. Respuesta de la planta de papa (*Solanum* spp.) al daño de insectos: algunos efectos de compensación. En: *Memorias del curso sobre control integrado de plagas de papa*. Luis Valencia (ed.). Centro Internacional de la Papa (CIP). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá, Colombia.
59. Morales, R. A., Atencio, F. A., Lara, J. A. y Muñoz, J. A. 1994. La mosquita minadora (*Liriomyza* spp.) en Panamá. Monografía No. 1. Programa Cooperativo de Papa. Instituto de investigación Agraria de Panamá. Panamá.
60. Palacios, M y Raman, K. 1991. Control integrado de la mosca minadora *Liriomyza*



*huidobrensis* Blanchard. En P. Manetti y F. Ezeta (eds). Unidad Integrada Balcarce. Argentina, pp 48-55.

61. Palacios, M.; Raman, K.V.; Cañedo, V.; Golmirzaie, A. y J. Tenorio. 1993. Clones resistentes a mosca minadora. En: Memorias de la XVI Reunión de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP). 22-26 de marzo . Santo Domingo, República Dominicana.
62. Parrella, M. P. 1987. Biology of *Liriomyza*. Annu. Rev. Entomol, 32: 201-224.
63. Pearce, G., Sy, L., Russell, 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(2): 456-462.
64. Peña-Cortez, H. Sanchez-Serrano, J. J., Rocha-Sosa, M. Willmitzer, L. 1988. Systemic induction of proteinase inhibitor II gene expresion in potato plants by wounding. Planta 174: 84-89.
65. Peña-Cortez, H.; Fisahn, J. and Willmitzer, L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4106-4113.
66. Raman, K. V., Golmirzaie, A. M. Palacios, M. and Tenorio, J. 1994. Inheritance of Resistance to Insects and Mites. In: Potato Genetics. J. E. Bradshaw and G. R. Mackay (eds.). C.A.B. International. pp. 447-466.

67. Reymond, Ph.; Grünberg, G.; Kahnethee, P.; Müller, M. and Farmer, E.E. 1995. Oligalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4145-4149.
68. Reymond, Ph., Weber, H., Diamond, M. and Farmer, E. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. The Plant Cell 12:707-719.
69. Rodríguez, C.L. 1997. La investigación en *Liriomyza huidobrensis* en el cultivo de papa en Cartago, Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 46: 1-8.
70. Ryan, C. A. 1980. Wound-regulated synthesis and vacuolar compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. Curr. Top. Cell. Regul. 17:1-23.
71. Ryan, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 425-449.
72. Ryan, C. A. and Farmer, E. E. 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. Annu. Rev. Plant. Physiol Mol. Biol. 42: 651-674.
73. Ryan, C.A. and Pearce, G. 1998. Systemin: A polipeptide signal for plant defensive genes. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14: 1-17.
74. Sachs, M.M. and Ho, T.H.D. 1986. Alteration of gene expression during

environmental stress in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 37: 363-376.

75. Salvo, A. y Valladares, G. 1995. Complejo parasítico (Hymenoptera, Parasitica) de *Liriomyza huidobrensis* (Diptera, Agromyzidae) en haba. *Agriscientia* 12, 39-47.
76. Sanchez-Serrano, J.J.; Anati, S.; Dammann, C.; Ebneith, M.; Herbers, K.; Hildman, T.; Lorborth, R.; Prat, S. and Willnitzer, L. 1993. Proteinase Inhibitors in the potato response to wounding. *In: Biotechnology in plant disease control*. Edited by Chet I. New York.(USA). Wiley-Liss. Pp 157-173.
77. Schaller, E. 1999. Oligopeptide signaling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* 40: 763-769.
78. Shaw, C.R. and Prasad, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochemical Genetics*. 4: 297-320.
79. Shaw, N.M.; Bolwell, G.P. and Smith, C. 1990. Wound-induced phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs. *Biochem. J.* 267:163-170.
80. Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, J., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, Sh.C. and Manners, J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microassay analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11655-11660.
81. Showalter, A.M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant*



82. Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Current opinion in Biotechnology* 9:214-219.
83. Suh, S. G. Stiekema, W. J. and Hanapel, D. L. 1991. Proteinase-inhibitor activity and wound-inducible gene expression of the 22-kda potato-tuber proteins. *Planta* 184: 423-430.
84. Tenorio, J.; Palacios, M.; Golmirzaie, A.; Cisneros, F. y O. Ortiz. 1993. Evaluación preliminar de clones resistentes a *Liriomyza huidobrensis* en el Valle de Tambo, Arequipa. En: Resúmenes de la XXXV Convención Nacional de Entomología. 7-11 de noviembre. Arequipa, Perú.
85. Tenorio, J.; Palacios, M.; Golmirzaie, A.; Gómez, R. y A. Pulcha. 1995. 282LM87B (LM1) Futura Variedad Resistente a Mosca Minadora para la Costa Peruana. *En: Memorias de la XVII Reunión de la Asociación latinoamericana de la Papa (ALAP)*. 9-15 de julio. Merida, Venezuela.
86. Tenorio, J.; Palacios, M.; Cañedo, V.; Golmirzaie, A. y H. Velarde. 1995. "María Tambeña-INIA" una variedad resistente a mosca minadora *Liriomyza huidobrensis*. *En: Resúmenes de la XXXVIII Convención Nacional de Entomología*. 17-21 de noviembre. Chincha-Perú.
87. Tinguey, W. M. and Yencho, G. C. 1994. Insect resistance in potato: A decade of

progress. *In*: Advances in Potato Pest: Biology and Management. G. W. Zehnder, M. I. Powelson, R. K. Jasson, K. V. Raman (eds.). APS. St Paul Minnesota.

88. Van der Linden, A. 1990. Prospects for the biological control of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), a new leafminer for Europe. SROP/WPRS Bulletin XIII/5:100-103.
89. Vierling, E. and Kimpel, I.A. 1992. Plant responses to environmental stress. Current Opinion in Biotechnology 3: 164-170.
90. Walker-Simmons, M. and Ryan, C. A. 1984. Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves: Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. Plant Physiol. 76:787-790.
91. Wolfson, J. L. and Murdock, L. L. 1995. Potential use of protease inhibitor for host plant resistance: A test case. Environ. Entomol. 24, 52-57.
92. Worthington, C.C. (eds.).1988. Manual Worthington. Worthington Biochemical Corporation. New jersey (USA). pp 320-325.