

Análisis de la expresión de un gen codificante para un inhibidor de proteasa tipo tripsina de *Physalis philadelphica* (PpIT)

Analysis of expression of a trypsin-like protease inhibitor of *Physalis philadelphica* (PpIT)

Victor Uriel Quezada Camargo, Kena Casarrubias Castillo, Mireya Hernández Herrera, Ofelia Vargas Ponce, Carla Sánchez Hernández*

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jal, México

Resumen

Una de las respuestas que las plantas utilizan como defensa ante el ataque de insectos herbívoros, es la síntesis de proteínas que afectan el proceso digestivo de los mismos, afectando su desarrollo y/o reproducción. En un primer esfuerzo por caracterizar la respuesta a insectos masticadores en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica*), se realizaron bibliotecas sustractivas en plantas expuestas 24h a herbivoría por larvas de *Manduca sexta*. El análisis de las bibliotecas permitió identificar la secuencia de un inhibidor de proteasa, tipo tripsina. Los análisis de expresión que se presentan en este trabajo confirmaron un incremento en los niveles de transcrito en plantas expuestas a herbivoría por larvas de *M. sexta* o tratadas con ácido jasmónico. En ambos tratamientos la acumulación de transcrito fue sostenida hasta los 5 días sin embargo, fue significativamente mayor 24 h posteriores al tratamiento. Estos resultados sugieren que similar a lo que ocurre en otras especies solanáceas, la inducción de inhibidores de proteasas en tejido foliar está regulada a través de la ruta del ácido jasmónico. Análisis de expresión complementarios confirmaron la presencia de transcrito en diferentes tejidos, siendo la flor el tejido con los niveles más altos.

Palabras clave

ácido jasmónico, defensa, herbivoría, inhibidores de proteasa, tomate de cáscara

Autor de correspondencia: Carla Sánchez Hernández, e-mail: sanchez.cv@gmail.com

Abstract

One of the responses used by plants as a defense against the attack of herbivorous insects is synthesis of proteins that affect their digestive process, development and/or reproduction. In a first attempt to characterize the response to chewing insects in husk tomato (*Physalis philadelphica*), subtractive cDNA libraries from husk tomato seedlings subjected to 24h of herbivory by *Manduca sexta* larvae were realized. Analysis of the libraries enabled the identification of a trypsin-like protease inhibitor sequence. Expression analysis presented in this study confirmed an increase in the transcript levels in plants exposed to herbivory by *M. sexta* larvae or treated with jasmonic acid. In both treatments, the transcript accumulation continued up to 5 days, though it was significantly higher 24 h after treatment. These results suggest that, similar to that occurs in other Solanaceae species, the induction of protease inhibitors in leaf tissue is regulated via the jasmonic acid pathway. Complementary expression analysis of confirmed the presence of the transcript in different tissues, with the flower being the tissue with the highest levels.

Keywords

jasmonic acid, defense, herbivory, husk tomato, protease inhibitors.

Introduction

Herbivory is defined as the direct damage caused to the plant during the feeding process, due to the loss of either leaf tissue, buds or stems, or even the

Introducción

La herbivoría se define como aquel daño directo causado a la planta durante el proceso de alimentación, ya sea por pérdida de tejido foliar, brotes y tallos o bien a través de la pérdida de nutrientes. En general, cualquier forma de herbivoría conlleva cierto grado de daño al tejido vegetal, lo que provoca cambios en la expresión genética, reconfiguración del metabolismo y modificaciones de la tasa de crecimiento de la planta. Estos cambios, además dependen del tipo de tejido dañado, etapa fenológica y estado nutricional de la planta, así como del tipo de insecto, grado de daño y temporalidad de la interacción (Schuman y Baldwin, 2016). Las defensas en las plantas pueden clasificarse en constitutivas e inducibles, las primeras se encuentran presentes durante todo el ciclo de vida de la planta (e.g. tricomas y ceras), y las segundas solo se activa en presencia del herbívoro y pueden ejercer su efecto de forma local o sistémica. La defensa inducible requiere de un estímulo presente en la interacción planta-insecto, a través del cual se reconoce al agresor desencadenando una serie de respuestas inmediatas que incluye el incremento de calcio citosólico, cambios en potencial de membrana, la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, la apertura de canales iónicos y la fosforilación de proteínas (MAPKs) (Maffei, Mithöfer y Boland, 2007; Zebelo y Maffei, 2015). Como consecuencia de estos procesos, ocurre la síntesis y/o traslocación de ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y etileno (ET), los cuales regulan la transcripción de genes tardíos involucrados en la emisión de compuestos volátiles, la producción de toxinas, proteínas antinutritivas, etc. (Erb, Meldau y Howe, 2012; Pieterse *et al.*, 2012). Estos eventos comienzan en la zona inmediata al sitio de alimentación del herbívoro, pero eventualmente se activan en toda la planta y son considerados componentes de señalización necesarios para la inducción de las respuestas sistémicas (Heil y Ton, 2008; Wu y Baldwin, 2009).

Las respuestas que se activan para contrarrestar los efectos negativos de la herbivoría involucran la síntesis de proteínas y metabolitos que afectan el desarrollo, reproducción y/o comportamiento de los insectos herbívoros. Los inhibidores de proteasas (IPs) forman parte del grupo de proteínas de defensa contra insectos herbívoros, cuya actividad se relaciona con la modificación del proceso digestivo del insecto y la asimilación correcta de nutrientes

loss of nutrients. In general, any form of herbivory involves a certain degree of damage to the plant tissue, which causes changes in gene expression, the reconfiguration of the metabolism and modifications of the plant growth rate. These changes, moreover, depend on the type of tissue that has been damaged, the phenological stage and nutritional state of the plant, the type of insect, the degree of damage, and the temporality of the interaction (Schuman and Baldwin, 2016). Plant defenses can be classified as either constitutive or inducible, with the former found throughout the plant's entire life cycle (e.g. in trichomes and waxes), while the latter are only activated in the presence of the herbivore and can exert their effect either locally or systemically. The inducible defense requires a stimulus to be present in the plant-insect interaction, through which the aggressor is recognized, triggering a series of immediate responses that includes the increase of cytosolic calcium, changes in membrane potential, production of reactive oxygen and nitrogen species, the opening of ionic channels and the protein phosphorylation (MAPKs) (Maffei, Mithöfer and Boland, 2007; Zebelo and Maffei, 2015). These processes result in the synthesis and/or translocation of jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA) and ethylene (ET), which regulate the transcription of late genes involved in the emission of volatile compounds and the production of toxins and anti-nutritional proteins, etc. (Erb, Meldau and Howe, 2012; Pieterse *et al.*, 2012). While these events begin in the area immediate to the herbivore's feeding site, they are, eventually, activated in the entire plant and are considered as signaling components for the induction of systemic responses (Heil and Ton, 2008; Wu and Baldwin, 2009).

The responses that are activated in order to counteract the negative effects of herbivory involve the synthesis of proteins and metabolites that affect the development, reproduction and/or behavior of herbivorous insects. Protease inhibitors (PIs) form part of the group of proteins that defend against herbivorous insects. Their activity is related to the modification of the insect's digestive process and the correct assimilation of nutrients indispensable for its development (Ryan, 2000; Zhu-Salzman, Luthe and Felton, 2008; Gatehouse, 2011). In Solanaceae, their accumulation in aerial tissues is regulated by the signaling pathway mediated by prosystemin and JA (Farmer, Johnson and Ryan, 1992; Schilmiller and Howe, 2005). The efficiency of PIs as a defense mechanism has been confirmed

indispensables para su desarrollo (Ryan, 2000; Zhu-Salzman, Luthe y Felton, 2008; Gatehouse, 2011). En Solanáceas su acumulación en tejidos aéreos es regulada a través de la ruta de señalización mediada por prosistemia y AJ (Farmer, Johnson y Ryan, 1992; Schilmiller y Howe, 2005). La eficiencia de los IPs como defensa, se ha confirmado utilizando plantas transgénicas sobreexpresantes, con ensayos *in vitro* o a través de dietas artificiales que mostraron resultados positivos para el control de insectos plaga (Broadway *et al.*, 1986; Lawrence y Koundal, 2002; Abdeen *et al.*, 2005; Maheswaran *et al.*, 2007; Smigocki *et al.*, 2013). Particularmente, se ha analizado el papel defensivo de los inhibidores de proteasas tipo tripsina de *Cajanus cajan*, *Vigna mung*, *Capsicum annuum* y *Tamarindus indica* sobre el desarrollo, crecimiento, y fecundidad de insectos lepidópteros (Tamhane *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2010) y coleópteros (Franco *et al.*, 2003).

A través del escrutinio de una biblioteca sustractiva de cDNA de tejido foliar de plantas expuesta a herbivoría por larvas de *M. sexta* se identificó la secuencia de un inhibidor de proteasa, tipo tripsina (PpIT) (GenBank JZ905787) (Quezada-Camargo, 2018). Los análisis de expresión génica que se presentan en este trabajo, tiene como objetivo confirmar el incremento en los niveles de transcrito en respuesta a herbivoría y determinar si el AJ participa en su regulación. Análisis complementarios se realizaron en diferentes tejidos para conocer los niveles basales de expresión en toda la planta.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron plantas de *Physalis philadelphica* cultivar Morada R crecidas en condiciones controladas de luz y fotoperiodo (16 h luz a 28°C y 8 h oscuridad a 16°C) y fertilizadas semanalmente con una solución 20:20:20 (N:P:K, Professional Solutions Scotts). Para los ensayos de herbivoría y tratamiento con AJ se utilizaron plantas con 5 a 6 hojas verdaderas. Para determinar los niveles basales se utilizaron plantas crecidas hasta el desarrollo de flor y fruto. Para los ensayos de herbivoría se utilizaron larvas de *Manduca sexta* (3er instar), donadas por el insectario del CINVESTAV unidad Irapuato.

Pruebas de inducción

Para los bioensayos con *M. sexta*, se colocaron dos larvas por planta permitiendo que se alimentaran

using overexpressing transgenic plants and with *in vitro* assays through artificial diets that showed 30% positive results for the control of insect pests (Broadway *et al.*, 1986; Lawrence and Koundal, 2002; Abdeen *et al.*, 2005; Maheswaran *et al.*, 2007; Smigocki *et al.*, 2013). Particularly, analysis has been conducted on the defensive role of the trypsin-type protease inhibitors from *Cajanus cajan*, *Vigna mung*, *Capsicum annuum* and *Tamarindus indica*, over the development, growth and fecundity of lepidopteran (Tamhane *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2010) and coleopteran insects (Franco *et al.*, 2003).

The sequence for a trypsin-type protease inhibitor (*PpIT*) was identified via the scrutiny of a subtractive cDNA library of foliar tissue of plants exposed to herbivory by *M. sexta* larvae (GenBank JZ905787) (Quezada-Camargo, 2018). The gene expression analysis presented in this study aims to confirm the increase in the transcript levels in response to herbivory and determine whether JA participates in its regulation. Complementary analysis was undertaken in different tissues in order to ascertain the base levels of expression in the entire plant.

Materials and methods

Biological material

Physalis philadelphica cultivar Morada R were grown in controlled light and photoperiod conditions (16 h of light at 28°C and 8 h of dark at 16°C) and fertilized weekly with a 20:20:20 solution (N:P:K, Professional Solutions Scotts). Plants with 5 to 6 true leaves were used for the herbivory assays or JA treatment. In order to determine the base levels, plants grown to the development of flower and fruit were used. *Manduca sexta* (3rd instar) larvae, donated by the CINVESTAV-Irapuato insectarium, were used for the herbivory assay.

Induction tests

For *M. sexta* tests, two larvae were placed per plant, and they were allowed to feed *ad-libitum* until an approximate loss of 30% of leaf tissue was observed (8-10 h nearly). Subsequently, the larvae were removed and the leaf tissue was collected 24 h or 5 days after damage had commenced. The JA treatment was conducted by spraying until saturation using 1mM solution. The plants remained in the growth chamber under controlled conditions for 24 h or 5 days. The leaf tissue collected was stored in liquid nitrogen at -70 °C until processing. The

ad-libitum hasta observar una pérdida aproximada del de tejido foliar (tiempo aproximado de 8-10 h). Posteriormente, las larvas fueron removidas y el tejido foliar colectado 24 h o 5 días después de haber iniciado el daño. El tratamiento con AJ se realizó por aspersión hasta el punto de saturación utilizando una solución 1mM. Las plantas permanecieron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas durante 24 h o 5 días. El tejido foliar fue colectado en nitrógeno líquido y almacenado a -70 °C hasta su procesamiento. Los controles incluyeron plantas intactas (sin tratamiento y sin herbivoría). Para cada tratamiento se incluyeron 9 plantas, con las cuales se generaron 3 réplicas biológicas (cada una con 3 plantas).

Análisis de expresión de genes

Para el aislamiento de RNA total se partió de 200 mg de tejido y se utilizó el reactivo comercial TRIzol reagent (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La calidad y pureza del RNA fue evaluada por espectrometría a 260/280 nm. La síntesis de cDNA se llevó a cabo usando la enzima transcriptasa reversa (RT-MMLV Promega) a partir del 2 µg del RNA total. El qPCR se realizó utilizando el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems Life Technologies). La detección se hizo cuantificando la fluorescencia del IQTM SYBRTM Green master mix (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en placas para PCR de 96 pozos siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 15 µL. Los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-AGACATTGACAAAGAGACGAACT-3' y 5'-GTGACACTACTGAATGGTTCTCC-3', para *PpIT* y 5'-GGGATGATATGGAGAAGATA-3' y 5'-AGTACAGCCTGAATAGCAAC-3' para Actina. Para la amplificación se utilizaron condiciones estándar (desnaturalización 95° C por 1 min, seguidos por 40 ciclos de desnaturalización a 95° C por 15 s, alineamiento a 56 °C por 1 min). La línea base y el ciclo umbral de detección (Ct) fueron automáticamente determinados utilizando el StepOne Software Versión 2.2.2 (Applied Biosystems Life Technologies). El análisis de expresión se determinó a través del método comparativo, utilizando como referencia el gen de actina, calculando el valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de acuerdo a Livak y Schmittgen, (2001) en donde $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ promedio de } PpIT - C_t \text{ promedio de actina})_{\text{tratamiento}} - (C_t \text{ promedio de } PpIT - C_t \text{ promedio de actina})_{\text{control}}$. Para comparar los niveles de expresión entre las plantas control y los tratamientos se realizó una

controls comprised intact plants (untreated or herbivory free). Each treatment included 9 plants, for biological replicate tissue of 3 plants was pooled.

Gene expression analysis

For the isolation of total RNA, 200 mg of plant tissue was used and TRIzol reagent (Invitrogen), in accordance with the supplier's recommendations. The quality and purity of the RNA was evaluated via spectrometry at 260/280 nm. The synthesis of cDNA was carried out using the reverse transcriptase enzyme (RT-MMLV Promega) from 2 µg of total RNA. The qPCR was done using the StepOnePlus thermal cycler (Applied Biosystems Life Technologies). Detection was carried out by quantifying the fluorescence from the IQTM SYBRTM Green master mix (Applied Biosystems). The reactions were carried out on 96-well PCR plates, following the manufacturer's recommendations, at a final volume of 15 µL. The oligonucleotides used were 5'-AGACATTGACAAAGAGACGAACT-3' and 5'-GTGACACTACTGAATGGTTCTCC-3' for *PpIT*; and, 5'-GGGATGATATGGAGAAGATA-3' and 5'-AGTACAGCCTGAATAGCAAC-3' for Actin. The amplification used standard conditions (denaturation at 95 °C for 1 min, followed by 40 denaturation cycles at 95° C for 15 s, and annealing at 56 °C for 1 min). The baseline and the cycle threshold (Ct) for detection were automatically determined using StepOne Software, Version 2.2.2 (Applied Biosystems Life Technologies). The expression analysis was conducted using the comparative method, where transcript abundance data were normalized against the average transcript abundance of the actin gene, calculating the value of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ in accordance with Livak and Schmittgen (2001), where $\Delta\Delta C_t = (\text{average } C_t \text{ } PpIT \text{ gene} - \text{average } C_t \text{ actin gene})_{\text{treatment}} - (\text{average } C_t \text{ } PpIT \text{ gene} - \text{average } C_t \text{ actin gene})_{\text{control}}$. The mean expression levels between treated and control plants were compared by t tests using JMP version 13.

Results and discussion

A subtractive cDNA library was obtained from plants damaged by *M. sexta* larvae and then examined to identify various ESTs (GenBank JZ905781-JZ905892) including few nucleotide sequences that correspond to PIs for Solanaceae species. The significant increase in *PpIT* transcripts that occurs in response to herbivory and JA treatment confirms the data obtained from the subtractive library. Although, in both cases, a sustained increase was observed for up to 5 days, the

prueba t Student realizados con el programa JMP versión 13.

Resultados y discusión

A través del escrutinio de una biblioteca sustractiva de cDNA obtenida a partir de plantas dañadas por larvas de *M. sexta* se identificaron varios ESTs (GenBank JZ905781-JZ905892) entre los cuales algunos presentan similitud con secuencias nucleotídicas de IPs de especies solanáceas. El aumento significativo de los transcritos *PpIT* en respuesta a herbivoría y al tratamiento con AJ confirma los datos obtenidos en la biblioteca sustractiva. En ambos casos se observó un incremento significativo respecto a los niveles de plantas control, sostenido hasta los 5 días, sin embargo el mayor incremento ocurrió 24 h posteriores a la inducción. La acumulación de mensajero fue mayor en el tratamiento con AJ respecto a los niveles detectados en la respuesta a

herbivoría, representando un incremento de 14 veces más respecto a los ensayos con *M. sexta* (Figura 1). The highest level of induction occurred 24 h subsequent to the initial induction. The accumulation of messenger was higher in the JA treatment compared to the levels detected in the response to herbivory, representing a 14-fold increase (Figure 1). The results obtained confirmed that, in *P. philadelphica*, the activation of PIs against chewing herbivores is regulated with JA. In this same species, Andrade-Medina (2012) reported increases in the enzyme activity for defense-related proteins (PIs, polyphenoloxidases and peroxidases) in the leaf representing a 14-fold increase (Figure 1). The results obtained confirmed that, in *P. philadelphica*, the activation of PIs against chewing herbivores is regulated with JA. In this same species, Andrade-Medina (2012) reported increases in the enzyme activity for defense-related proteins (PIs, polyphenoloxidases and peroxidases) in the leaf

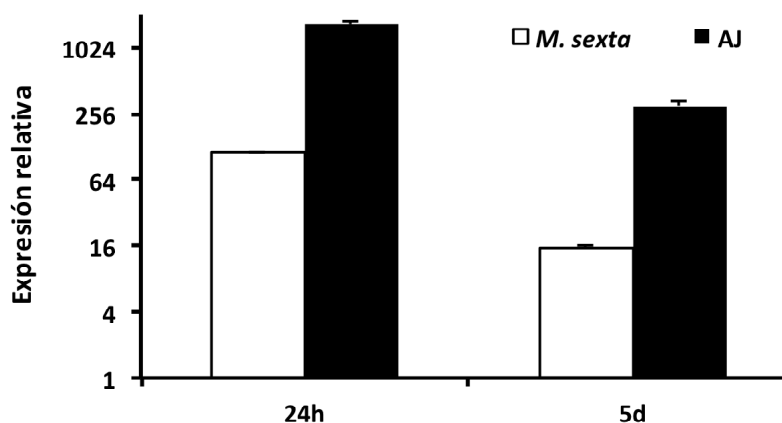


Figura 1. Niveles de expresión de *PpIT* en tejido foliar de plantas de *Physalis philadelphica* tratadas con ácido jasmónico (AJ) o expuestas a herbivoría por larvas de *Manduca sexta* durante 24 horas o 5 días. Las barras indican la abundancia relativa (media $\pm$ EE) de los transcritos respecto a los niveles de plantas control.

Figure 1. Expression of *PpIT* in *Physalis philadelphica* leaves after jasmonic acid (JA) treatment or *Manduca sexta* larvae herbivory, for 24 hours or 5 days. Bars indicate mRNA accumulation (mean $\pm$ SE) relative to expression values on control intact plants.

Los resultados obtenidos confirmaron que en *P. philadelphica*, la activación de IPs contra herbívoros masticadores es regulada a través del AJ. En esta misma especie, Andrade-Medina (2012) reportó incrementos en la actividad enzimática de proteínas relacionadas con defensa (IPs, polifenoloxidasas y peroxidasas) en tejido foliar de plantas expuestas a herbivoría, AJ y daño mecánico. Particularmente,

tissue of plants exposed to herbivory, JA and mechanical damage. Particularly, the PI levels increased significantly, in response to JA and herbivory, attaining maximum levels 5 days subsequent to the stimulus. Similar to Andrade-Medina PIs activity assay, levels of *PpIT* were higher in response to JA than herbivory. The induction pattern in correspondence with the protein

los niveles de IPs se incrementaron significativamente en respuesta a AJ y a herbivoría, llegando a niveles máximos 5 días posteriores al estímulo. Similar a lo observado en los niveles de expresión para *PpIT*, la actividad de IPs también fue mayor en respuesta a AJ (Andrade-Medina, 2012). El patrón de inducción de *PpIT* en correspondencia con la actividad proteica sustentan el rol de los IPs en *P. philadelphica* como proteínas antinutritivas involucradas en la defensa contra herbívoros masticadores similar a lo reportado en jitomate, tabaco, chile y papa (Ryan, 2000; Zavala *et al.*, 2004; Turra y Lorito, 2011; Mishra *et al.*, 2012).

El análisis de la expresión constitutiva de *PpIT* en diferentes tejidos confirmó la presencia de mensajero en todos los tejidos analizados (raíz, tallo, hoja, flor y fruto), encontrándose los menores niveles de transcrito en tallo, por lo tanto los niveles de mensajero en los otros tejidos son mostrados en referencia a los observados en tallo (Figura 2).

activity sustains the role of PIs in *P. philadelphica* as antinutritional proteins involved in the defense against chewing herbivores, a role similar to that reported in tomato, tobacco, chili and potato (Ryan, 2000; Zavala *et al.*, 2004; Turra and Lorito, 2011; Mishra *et al.*, 2012).

Analysis of the constitutive expression of *PpIT* in different tissues confirmed the presence of the messenger in all the tissues analyzed (root, shoot, leaf, flower and fruit). Because the lowest levels of *PpIT* were found in the shoot, transcript abundance of the other tissues is expressed relative to shoot values (Figure 2). Flowers were the tissue with higher levels of messenger (Figure 2). The expression pattern of *PpIT* corresponds to the constitutive levels of PI reported in storage tissues and reproductive organs, where they seem to be directly involved as defense proteins against insects (Damle *et al.*,

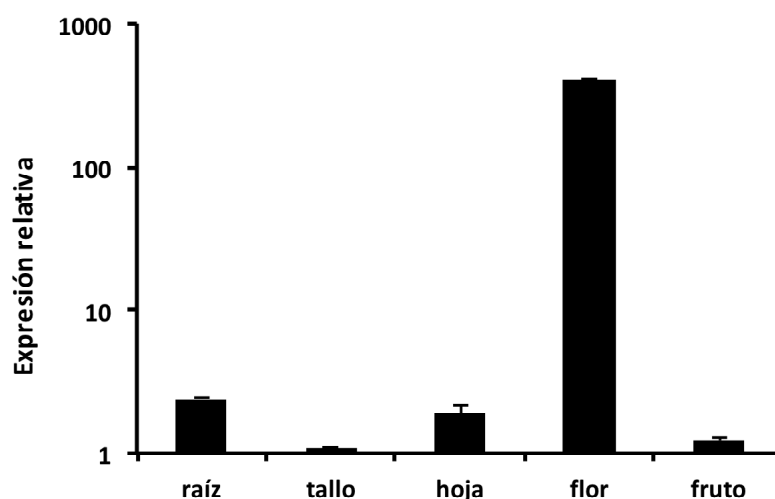


Figura 2. Niveles constitutivos de *PpIT* en diferentes tejidos de plantas de *Physalis philadelphica*. Las barras indican la abundancia relativa de los transcritos (media $\pm$ EE) respecto a los niveles presentes en tallo.

Figure 2. Constitutive expression levels of *PpIT* in different tissues of *Physalis philadelphica*. Bars indicate mRNA accumulation (mean $\pm$ SE) relative to expression values present in shoot tissue.

El patrón de expresión de *PpIT* corresponde con los niveles constitutivos de IPs reportados en tejidos de almacenamiento y órganos reproductivos, donde al parecer se les ha relacionado directamente como proteínas de defensa contra insectos (Damle *et al.*, 2005; Tamhane *et al.*, 2009). Además, no se descarta que al igual que con el gen *Pin2* de jitomate, pudiera existir una regulación a través de

2005; Tamhane *et al.*, 2009). Moreover, it cannot be discounted that, as with the *Pin2* gene in tomato, there is a possible regulation through cis-elements, that differentially control their expression in both leaf and fruit (Lorberth *et al.*, 1992). Other studies report high constitutive levels of other defense-related proteins in tomato flowers (Samach *et al.*, 1995; Miersch *et al.*, 2004).

elementos en cis que controlen diferencialmente su expresión en hoja y en fruto (Lorberth *et al.*, 1992). Previamente se han reportado altos niveles constitutivos de otras proteínas relacionadas con defensa en flores de jitomate (Samach *et al.*, 1995; Miersch *et al.*, 2004)

Los niveles altos de mensajero y proteínas en flores podrían estar relacionados con funciones endógenas durante el desarrollo del tejido floral. Sin y Chye (2004) identificaron en flores de *Solanum americanum* la acumulación de los transcritos *SaPIN2a* y *SaPIN2b*, en tejido floral preparado a entrar en un programa de muerte celular programada, lo que sugiere posibles funciones endógenas en la inhibición de la actividad de tripsina y quimotripsina durante el desarrollo de las flores. Además, acorde a su patrón de expresión en floema de tallo y raíz, SaPIN2 es considerada una proteína reguladora de la proteólisis en los tubos cribosos (Xu *et al.*, 2001).

Conclusiones

Los niveles altos de transcritos del gen *PpIT* en tejido foliar de *Physalis philadelphica* y su capacidad de respuesta a tratamientos exógenos con AJ, coincide con su papel propuesto en la defensa ante insectos herbívoros; asimismo, la notable presencia de transcritos del gen *PpIT* de manera constitutiva en flor, sugiere además alguna función regulatoria en el desarrollo de este órgano.

Agradecimientos

A Javier Luevano-Borroel por la donación de larvas de *M. sexta* y al CONACyT por la beca otorgada a VQC.

Referencias

- Abdeen, A. et al. 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors, *Plant Molecular Biology*, 57(2), pp. 189–202.
- Andrade-Medina M. 2012. Determinación de la actividad de proteínas de defensa en tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam) y su inducción por herbivoría, daño mecánico y moléculas señales. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Guadalajara, CUCBA, Departamento de Producción Agrícola.
- Broadway, R. M. et al. 1986. Plant Proteinase inhibitors: A defense against herbivorous

The high levels of messenger and protein in flowers may be related to endogenous functions throughout the development of the floral tissue. Sin and Chye (2004) identified, in *Solanum americanum* flowers, the accumulation of *SaPIN2a* and *SaPIN2b* transcripts in floral tissue prepared to enter in a programmed cell death, which suggests possible endogenous functions in the inhibition of trypsin and chymotrypsin activity during flower development. Furthermore, in accordance with their expression pattern in stem and root phloem, SaPIN2 is considered a proteolysis regulatory protein in sieve-tube elements (Xu *et al.*, 2001).

Conclusions

The high transcript levels of *PpIT* gene in leaf tissue and their capacity to respond to treatments with exogenous JA, coincide with their proposed role in the defense against herbivorous insects. Likewise, the notable presence of *PpIT* transcripts in a constitutive manner in flower, also suggests some regulatory function in the development of this organ.

Acknowledgements

Thanks to Javier Luevano-Borroel for the donation of *M. sexta* larvae and to the CONACyT for the grant awarded to VQC.

- insects?, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 41(1), pp. 33–38.
- Damle, M. S. et al. 2005. Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree), *Phytochemistry*, 66(22), pp. 2659–67.
- Erb, M., Meldau, S. and Howe, G. A. 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions, *Trends in Plant Science*, 17(5), pp. 250–259.

- Farmer, E. E., Johnson, R. R. and Ryan, C. A. 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic Acid, *Plant Physiology*, 98(3), pp. 995–1002.
- Franco, O. L. et al. 2003. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*, *Phytochemistry*, 63(3), pp. 343–349.
- Gatehouse, J. A. 2011. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects, *Current Protein & Peptide Science*, 12(5), pp. 409–16.
- Heil, M. and Ton, J. 2008. Long-distance signalling in plant defence, *Trends in Plant Science*, 13(6), pp. 264–72.
- Lawrence, P. K. and Koundal, K. R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(1). doi: 10.2225/vol5-issue1-fulltext-3.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408.
- Lorberth, R. et al. 1992. Promoter elements involved in environmental and developmental control of potato proteinase inhibitor II expression, *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 2(4), pp. 477–86.
- Maffei, M. E., Mithöfer, A. and Boland, W. 2007. Before gene expression: early events in plant–insect interaction, *Trends in Plant Science*, 12(7), pp. 310–316.
- Maheswaran, G. et al. 2007. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants, *Plant Cell Reports*, 26(6), pp. 773–82.
- Miersch, O. et al. 2004. Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves, *Phytochemistry*, 65(7), pp. 847–856.
- Mishra, M. et al. 2012. Stress inducible proteinase inhibitor diversity in *Capsicum annuum*, *BMC plant biology*, 12, p. 217. doi: 10.1186/1471-2229-12-217.
- Pearce, G., Johnson, S. and Ryan, C. A. 1993. Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase isoinhibitors of the potato inhibitor II family, *Plant Physiology*, 102(2), pp. 639–44.
- Pieterse, C. M. J. et al. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), pp. 489–521.
- Prasad, E. R. et al. 2010. Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from *Cajanus cajan* Seeds: Purification, Characterization, and Insecticidal Properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), pp. 2838–2847.
- Ryan, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1–2), pp. 112–21.
- Samach, A. et al. 1995. Expression of an amino acid biosynthesis gene in tomato flowers: developmental upregulation and MeJa response are parenchyma-specific and mutually compatible, *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 8(3), pp. 391–406.
- Schilmiller, A. L. and Howe, G. A. 2005. Systemic signaling in the wound response, *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), pp. 369–377.
- Schuman, M. C. and Baldwin, I. T. 2016. The Layers of Plant Responses to Insect Herbivores, *Annual Review of Entomology*, 61(1), pp. 373–394.
- Silva, F. C. B. L. et al. 2006. Digestive enzymes during development of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(7), pp. 561–569.
- Sin, S.F. and Chye, M.L. 2004. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral

- development in *Solanum americanum*, Planta, 219(6), pp. 1010–1022.
- Smigocki, A. C. et al. 2013 Pest Protection Conferred by a *Beta vulgaris* Serine Proteinase Inhibitor Gene, PLoS ONE, 8(2), p. e57303. doi: 10.1371/journal.pone.0057303.
- Quezada-Camargo V. 2018 Caracterización molecular de los genes de respuesta a herbivoría inhibidor de proteasa tipo tripsina (IT) y treonina (TD) en *Physalis philadelphica*. (Tesis de Maestría). Universidad de Guadalajara, CUCBA, Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas.
- Tamhane, V. et al. 2005 In vivo and in vitro effect of proteinase inhibitors on gut proteinases, Biochimica et Biophysica Acta, 1722(2), pp. 156–167.
- Tamhane, V. A. et al. 2009 Spatial and temporal expression patterns of diverse Pin-II proteinase inhibitor genes in *Capsicum annuum* Linn, Gene, 442(1–2), pp. 88–98.
- Turra, D. and Lorito, M. 2011 Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. Current Protein & Peptide science, 12(5), pp. 374–85.
- Wu, J. and Baldwin, I. T. 2009 Herbivory-induced signalling in plants: perception and action, Plant, Cell & Environment, 32(9), pp. 1161–1174.
- Xu, Z. F. et al. 2001 A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem, Plant Molecular Biology, 47(6), pp. 727–38.
- Zavala, J. A. et al. 2004 Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses, Plant Physiology, 134(3), pp. 1181–90.
- Zebelo, S. A. and Maffei, M. E. 2015 Role of early signalling events in plant-insect interactions, Journal of Experimental Botany, 66(2), pp. 435–448.
- Zhu-Salzman, K., Luthe, D. S. and Felton, G. W. 2008 Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores, Plant Physiology, 146(3), pp. 852–858.