

Фитоцистатините – потенциален източник на устойчивост към неприятели и гъбни болести по растенията

Петя К. Христова

АгроБиоИнститут
1164 София, бул. Драган Цанков 8
E-mail: petyachristova@abi.bg

Резюме

Семейството на растителните цистатини, наречени още фитоцистатини, включва над 200 представители, открити в редица едно- и двусемеделни видове. Голяма част от тях са изолирани, пречистени и характеризирани на молекулярно ниво. Техните функции в растенията са свързани с редица физиологични процеси като преобразуване на протеините по време на зреенето и покълването на семена, органогенезата, програмираната клетъчна смърт. Установено е също така, че цистатините вземат участие в отговора на растенията към абиотични и биотични стресови фактори. Редица изследвания доказват инсектицидните, акарицидните, нематоцидните и антигъбните свойства на фитоцистатините. Това обуславя техния потенциал като източник на устойчивост към неприятели и гъбни болести при стопански значими растителни видове.

Ключови думи: растителни цистатини, антигъбни свойства, инхибиторна активност, насекоми, нематоци, акари, листни въшки

Phytocystatins –potential source of resistance to pests and fungal pathogens in plants

Petya K. Christova

AgroBioInstitute, 1164 Sofia
E-mail: petyachristova@abi.bg

Abstract

Plant cystatins (phytocystatins) superfamily is consist of over 200 members that are identified in many mono- and dicot species. A lot of them are isolated, purified and characterized at the molecular level. They play an important role in a number of physiological processes in plants, such as the proteins turnover during maturation and germination of seeds, organogenesis, programmed cell death. Phytocystatins also participate in the response of plants to abiotic and biotic stress factors. Experimental data prove the inhibitory activities of phytocystatins against insects, nemadotes, aphids, spider mites and fungal pathogens. This determines their potential as a source of resistance to pests and fungal diseases in economically important plant species.

Keywords: plant cystatins, antifungal properties, inhibitory activities, insects, nemadotes, aphids, spider mites

Цистатините са цистеинови протеазни инхибитори, които са идентифицирани както в растителното, така и в животинското царство. Растителните цистатини, наречени още фитоцистатини, са класифицирани в 3 групи в зависимост от броя на цистатиновите домени, от които са изградени. Фитоцистатините от група 1 имат един цистатинов домен и са с молекулна маса 12-16 kDa. Цистатините от група 2 са изградени от един цистатинов домен в N-края си и един цистатин-подобен домен в C-края си. Тяхната молекулна маса е около 23 kDa. Мултицистатините, които се състоят от няколко цистеинови единици и имат молекулна маса от порядъка на 85 kDa, формират група 3.

Семейството на растителните цистатини включва над 200 представители, изолирани от редица едно- и двуседелни видове. Пречистени и характеризирани са цистатини от ориз (Abe et al., 1987; Kondo et al., 1990), царевица (Irie et al., 1996; Massonneau et al., 2005), пшеница (Kuroda et al., 2001; Christova et al., 2006), ечемик (Martinez et al., 2003), просо (Joshi et al., 1998), соя (Hines et al., 1991), картофи (Waldron et al., 1993), домати (Goulet et al., 2008), морков (Ojima et al., 1997), ягоди (Martinez et al., 2005), киви (Popovic et al., 2013), ябълка (Ryan et al., 1998), захарна тръстика (Soares-Costa et al., 2002), цусам (Cheng et al., 2014), карамфил (Sugawara et al., 2002b), кестен (Pernas et al., 2000) и много други. Първите растителни цистатини са изолирани от семена (Abe et al., 1987; Kondo et al., 1990; Ojima et al., 1997), но след това цистеинови протеазни инхибитори са открити и в други растителни органи като грудки (Waldron et al., 1993), листа (Diop et al., 2004), плодове (Kimura et al., 1995) цветове, цветни пъпки (Lim et al., 1996), венчелистчета (Sugawara et al., 2002a).

Проучването на възможностите за използване на цистатините като потенциален източник на устойчивост към неприятелни и гъбни болести има важно стопанско значение. В световен мащаб щетите, причинени от неприятелни по културните растения, варират от 10 до 16% (Bebber et al., 2013). Загубите, които насекомите нанасят, според различни автори възлизат на 7.9-15.1% (Pimentel, 1986; Oerke and Dehne, 2004; Oerke, 2006; Pimentel, 2009; Oerke et al., 2012). Щетите, нанесени от гъбни патогени, са от порядъка на 10.1% (Oerke et al., 2012). Това налага

непрекъснато търсене, разработване и прилагане на нови и алтернативни методи за растителна защита.

Роля на фитоцистатините

Фитоцистатините участват в широк кръг физиологични процеси. Те се включват в различни етапи от вегетативното развитие на растенията от покълването на семената, през органогенезата до стареенето на клетките (Abe et al., 1991; Arai et al., 2002; Rivard et al., 2007; Sugawara et al., 2002a). Доказана е тяхната роля в преобразуването на протеините по време на зреенето и покълването на семената (Abe et al., 1987; Kondo et al., 1990; Hong et al., 2007). Установено е също така, че цистатините вземат участие в отговора на растенията както към абиотични, така и към биотични стресови фактори (Pernas et al., 2000; Gaddour et al., 2001; Diop et al., 2004; Massonneau et al., 2005; Demirevska et al., 2009). Първите изследвания за ролята на цистатините в устойчивостта на растенията към биотичен стрес са свързани с контрола на неприятелни (Michaud et al., 1993; Michaud et al., 1995; Irie et al., 1996; Arai S. and Abe K., 2000; Alvarez-Alfageme et al., 2007; Goulet et al., 2008; Kiggundu et al., 2010). В последните години обаче вниманието на учените е насочено към техния потенциал при потискане развитието на гъбни патогени (Pernas et al., 1999; Soares-Costa et al., 2002; Sugawara et al., 2002b; Martinez et al., 2003; Yang and Yeh, 2005; Martinez et al., 2005; Christova et al., 2006; Pirovani et al., 2010; Valdes-Rodriguez et al., 2010; Popovic et al., 2013; Cheng et al., 2014).

Редица фитоцистатини, изолирани от стопански значими растителни видове, са добре характеризирани във функционално отношение. Първият и най-добре проучен растителен цистатин е изолиран от ориз, OCI (Abe et al., 1987; Michaud et al., 1993; Benckroun et al., 1995; Lecardonnell et al., 1999). С него се поставят основите на проучване на протеазната инхибиторна активност на цистатините и техните инсектицидни, акарицидни и нематоцидни свойства. Доказано е също така значението на OCI в отговора на растенията към засушаване, високи температури и светлинен стрес (Demirevska et al., 2009). От ечемик са изолирани 13 цистатина, които са добре харак-

теризирани като източници на устойчивост към гъбни патогени и неприятели (Martinez et al., 2003; Abraham et al., 2006; Alvarez-Alfageme et al., 2007; Carrillo et al., 2011a; Carrillo et al., 2011b; Gambardella et al., 2012). Пшеничените цистатини WC1, WC2, WC3, WC4 и WC5 са свързани с покълването на семената и семеобразуването (Kuroda et al., 2001). Изолираният от зимна пшеница цистатин TaMDC1 се индуцира в отговор на абиотични стресови фактори, а също така потиска развитието на причинителя на снежната плесен *Microdochium nivale* (Christova et al., 2006). Други 2 пшенични цистатина, WC3 и WCMD, се индуцират при нападение на хембиотрофната гъба *Tilletia indica* по време на изкласяването и се смята, че са естествен ефектор на устойчивостта на растенията към гъбни патогени (Dutt et al., 2011). В царевица са открити 8 цистатина, като два от тях (CC8 и CC9) се индуцират от ниски температури (Masonneau et al., 2005). От домат е изолиран мултицистатин, който е свързан с отговора на растенията към биотични стресови фактори (Goulet et al., 2008).

Инсектицидни, акарицидни и нематоцидни свойства на фитоцистатините

Способността на фитоцистатините да инхибират развитието на широк кръг от неприятели по растенията се изследва от редица автори (табл. 1). Инсектицидните им свойства засягат основно представители от разред Твърдокрили насекоми, в това число сем. Листояди, сем. Зърнояди и сем. Хоботници. Това е най-големият разред в царството на животните, включващ 40% от насекомите в света. Растителните цистатини са също така ефективни спрямо акари, листни въшки, дървеници и нематоди. Доказани са инсектицидните свойства на цистатин от ориз (OCI) към редица неприятели като колорадски бръмбар *Leptinotarsa decemlineata* (Michaud et al., 1993; Benchekgroun et al., 1995; Lecardonnel et al., 1999), китайски зърнояд *Callosobruchus chinensis*, соева дървеница *Riptortus clavatus* (Kuroda et al., 1996), бананов хоботник *Cosmopolites sordidus*; (Kiggundu et al., 2010), обикновен паяжинообразуващ акар *Tetranychus urticae* (Michaud et al., 1996), листни

въшки *Myzus persicae* и *Macrosiphum euphorbiae* (Rahbe et al., 2003; Azzouz et al., 2005) и нематоди *Globodera pallid*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne incognita* и *Pratylenchus penetrans* (Urwin et al., 1995; Urwin et al., 1997; Samac and Smigocki, 2003). От ориз е изолиран и друг цистатин, OCII, който проявява акарицидни, инсектицидни и нематоцидни свойства съответно спрямо обикновен паяжинообразуващ акар *Tetranychus urticae* (Michaud et al., 1996), люцернов листояд *Phytodecta fornicate* (Ninković et al., 2007) и нематоди *Pratylenchus penetrans* (Samac and Smigocki, 2003). Инсектицидни свойства спрямо колорадския бръмбар показват още цистатини, изолирани от ечемик - HvCPI-1 (Alvarez-Alfageme et al., 2007) и домат - SICYS8 (Goulet et al., 2008). Друг изолиран от ечемик цистатин (HvCPI-6), както и цистатин от ягода (FaCPI-1), демонстрират нематоцидни свойства по отношение на *Xiphinema americanum* и *Meloidogyne* spp. (Gambardella et al., 2012). Протеазната инхибиторна активност спрямо протеази на акари (*Tetranychus urticae* и *Brevipalpus chilensis*) е проучена при 13 изолирани от ечемик цистатина (Hv-CPI 1-13) и е доказана за всички, с изключение на два от тях, HvCPI-1 и HvCPI-7 (Carrillo et al., 2011b). Инсектицидна активност към папудов зърнояд (*Callosobruchus maculatus*) и ръждиво-червен брашнен бръмбар (*Tribolium castaneum*) проявява цистатин от соя (Hines et al., 1991). Цистатин от царевица (CC) демонстрира инхибиращи свойства към царевична гърица *Sitophilus zeamais* (Irie et al., 1996).

Използването на растителни протеазни инхибитори, каквито са цистатините, може да се прилага като алтернативна стратегия в растителната защита при контрола на неприятели. Доказано е, че цистеиновите протеазни инхибитори се свързват с активните центрове на цистеиновите протеази в храносмилателния тракт на насекомите, чрез което повлияват тяхното хранене. Потискането на храносмилането при насекомите обикновено води до недостиг на незаменими аминокиселини, което предизвиква забавяне на техния растеж (Kiggundu et al., 2010), изменения в развитието и размножаването им (Azzouz et al., 2005) и може да доведе до повишена смъртност в популацията (Leple et al., 1995; Kuroda et al., 1996; Lecardonnel et al., 1999; Ninković et al., 2007). Направените проучвания

Таблица 1. Фитоцистатини с инсектицидни, акарицидни и нематоцидни свойства, изолирани от стопански значими растителни видове

Table 1. Phytocystatins with inhibitory properties against pests, isolated of economically important plant species

Фитоцистатин	Произход	Инхибиран неприятел	Автор
HvCPI	ечемик	Колорадски бръмбар (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	Alvarez-Alfageme et al., 2007
		Нематоди (<i>Xiphinema americanum</i> ; <i>Meloidogyne</i> spp.)	Gambardella et al., 2012
		Обикновен паяжинообразуващ акар (<i>Tetranychus urticae</i>)	Carrillo et al., 2011b
		Чилийски червен акар (<i>Brevipalpus chilensis</i>)	
СС	царевица	Царевична гъгрица (<i>Sitophilus zeamais</i>)	Irie et al., 1996
OCI	ориз	Колорадски бръмбар (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	Michaud et al., 1993; Benckroun et al., 1995; Lecardonnell et al., 1999
		Китайски зърнояд (<i>Callosobruchus chinensis</i>)	Kuroda et al., 1996
		Соева дървеница (<i>Riptortus clavatus</i>)	Kiggundu et al., 2010
		Бананов хоботник (<i>Cosmopolites sordidus</i>)	
		Обикновен паяжинообразуващ акар (<i>Tetranychus urticae</i>)	Michaud et al., 1996
		Листни въшки (<i>Myzus persicae</i>)	Rahbe et al., 2003
		Зеленоивичеста листна въшка (<i>Macrosiphum euphorbiae</i>)	Azzouz et al., 2005
		Нематоди (<i>Globodera pallid</i> , <i>Heterodera schachtii</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Pratylenchus penetrans</i>)	Urwin et al., 1995; Urwin et al., 1997; Samac and Smigocki, 2003
OСII	ориз	Люцернов листояд (<i>Phytodecta fornicate</i>)	Ninković et al., 2007
		Обикновен паяжинообразуващ акар (<i>Tetranychus urticae</i>)	Michaud et al., 1996
		Нематоди (<i>Pratylenchus penetrans</i>)	Samac and Smigocki, 2003
SiCYS8	домат	Колорадски бръмбар (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) Хищна дървеница (<i>Perillus bioculatus</i>)	Goulet et al., 2008
Soybean CPI	соя	Папудов зърнояд (<i>Callosobruchus maculatus</i>) Ръждиво-червен брашнен бръмбар (<i>Tribolium castaneum</i>)	Hines et al., 1991
FaCPI-I	ягода	Нематоди (<i>Xiphinema americanum</i> ; <i>Meloidogyne</i> spp.)	Gambardella et al., 2012

показват, че фитоцистатините могат да бъдат използвани като инсектицидни агенти.

Редица автори изследват ролята на цистатините в контрола на колорадския бръмбар

(Michaud et al., 1993; Benckroun et al., 1995; Lecardonnell et al., 1999; Alvarez-Alfageme et al., 2007; Goulet et al., 2008). Това е най-разпространеният и вредоносен неприятел по картофите

насаждения в целия свят, като напада също така домати и патладжан. Основните протеолитични ензими в стомаха на колорадския бръмбар са цистеинови протеази (Michaud et al., 1993), което прави възможно тяхното инхибиране от растителни цистатини. Това обуславя включването на оризовите цистатини ОСІ и ОСІІ в стратегии за контрол на колорадския бръмбар.

Антигъбни свойства на фитоцистатините

Антигъбните свойства на растителните цистатини са доказани спрямо различни гъбни патогени (табл. 2). Установена е способността на цистатин изолиран от ечемик (Hv-CPI) да потиска развитието на *Colletotrichum graminicola*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea* и *Trichoderma viridae* (Martinez et al., 2003). Допълнителни проучвания на същия изследователски екип доказва антигъбните свойства

на 12 изолирани от ечемик цистатини (Hv-CPI 1-13) спрямо фитопатогенните гъби *Magnaporthe grisea*, *Plectosphaerella cucumerina* и *Fusarium oxysporum* (Carrillo et al., 2011a), а на първите шест от тях (Hv-CPI 1-6) и спрямо *B. cinerea* (Abraham et al., 2006). Способността да потиска развитието на *F. oxysporum* и *B. cinerea* е установена и при опити с цистатин от ягода, FaCPI-1 (Martinez et al., 2005), а *B. cinerea* и *Alternaria radicina* се инхибират от фитоцистатин от киви KCPI-1 (Popovic et al., 2013). Цистатин изолиран от зимна пшеница (TaMDC1) инхибира развитието на причинителя на снежната плесен *M. nivale* (Christova et al., 2006). Фитоцистатин от захарна тръстика (CaneCPI) потиска развитието на *Trichoderma reesei* (Soares-Costa et al., 2002), която се инхибира и от цистатин от сусам (SiCYS) заедно с други два гъбни патогена, *Aspergillus sydowii* и *Helminthosporium sesamum* (Cheng et al. 2014). Широк набор от гъбни патогени инхибира цистатин от просо, в това число *F. oxysporum*, *A. solani*, *T. reesei*, *Helminthosporium*,

Таблица 2. Фитоцистатини с антигъбни свойства, изолирани от стопански значими растителни видове
Table 2. Phytocystatins with antifungal activities, isolated from economically important plant species

Фитоцистатин	Произход	Инхибиран гъбен патоген	Автор
Hv-CPI	ечемик	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum graminicola</i> <i>Plectosphaerella cucumerina</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Plectosphaerella cucumerina</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Martinez et al., 2003; Abraham et al., 2006; Carrillo et al., 2011a
TaMDC1	пшеница	<i>Microdochium nivale</i>	Christova et al., 2006
Pearl millet CPI	просо	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Claviceps paspali</i> <i>Claviceps purpurea</i> <i>Curvularia fallax</i> <i>Curvularia cymbopogonis</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Helminthosporium</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Joshi et al., 1998
FaCPI-1	ягоди	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Martinez et al., 2005
KCPI-1	киви	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Alternaria radicina</i>	Popovic et al., 2013
SiCYS	сусам	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Aspergillus sydowii</i> <i>Helminthosporium sesamum</i>	Cheng et al., 2014
CaneCPI	захарна тръстика	<i>Trichoderma reesei</i>	Soares-Costa et al., 2002

Claviceps paspali, *C. purpurea*, *Curvularia fallax*, *C. symbopogonis* и *C. lunata* (Joshi et al., 1998).

Фитоцистатините могат да потискат както развитието на мицела, така и покълването на спорите при различните видове гъби. Механизмът на инхибиторната им активност обаче все още не е изяснен. Установено е, че антигъбните свойства на цистатините не са свързани с тяхната протеазна инхибиторна активност (Martinez et al., 2003; Cheng et al., 2014). Необходими са допълнителни изследвания за изясняване механизма на антигъбните свойства на цистатините и съответно ролята им в защитата на растенията към гъбни болести.

Събраните данни за антигъбните свойства на фитоцистатините показват тяхната инхибираща активност към различни групи гъбни патогени. Повечето от тях потискат развитието на два от най-широко разпространените причинители на гъбни болести - *B. cinerea* и *F. oxysporum*. *B. cinerea* напада над 200 растителни вида и заема второ място в класацията на десетте най-значими причинители на болести по растенията, според Международната общност на растителните миколози (Dean et al., 2012). Пето място в същата класация заема *F. oxysporum*. Ето защо способността на фитоцистатините да инхибират развитието на *B. cinerea* и *F. oxysporum*, както и на други фитопатогени, може да бъде използвана в стратегии за борба с тях при много селскостопански култури.

ИЗВОДИ

Растителните цистатини имат способността да потискат развитието на едни от най-вредоносните неприятели по растенията, както и на най-разпространените причинители на гъбни болести. Това обуславя техния потенциал като източник на устойчивост към неприятели и фитопатогенни гъби при стопански значими видове.

ЛИТЕРАТУРА

- Abe, K., Y. Emori, H. Kondo, K. Suzuki and S. Arai, 1987. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J. Biol. Chem.*, 262: 16793–16797
- Abe, K., H. Kondo, H. Watanabe, Y. Emori and S. Arai, 1991. Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds. *Biomed Biochim Acta*, 50: 637–641
- Abraham, Z., M. Martinez, P. Carbonero and I. Diaz, 2006. Structural and functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.*, 57: 4245–4255
- Arai, S. and K. Abe, 2000. Cystatin-based control of insects, with special reference to oryzacystatin. In: Michaud D., ed. *Recombinant protease inhibitors in plants*. Georgetown, TX, USA: Landes Bioscience/Eurekah.com, pp. 27–42
- Arai, S., I. Matsumoto, Y. Emori and K. Abe, 2002. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. *J. Agr. Food Chem.*, 50(22): 6612–6617
- Alvarez-Alfageme, F., M. Martinez, S. Pascual-Ruiz, P. Castanera, I. Diaz and F. Ortego, 2007. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Res.*, 16: 1–13
- Azzouz, H., A. Cherqui, E.D. Campan, Y. Rahbé, G. Duport, L. Jouanin, L. Kaiser and P. Giordanengo, 2005. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *J. Insect Physiol.*, 51(1): 75–86
- Bebber, D.P., M.A.T. Ramotowski and S.J. Gurr, 2013. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, 3: 985–988
- Benckroun, A., D. Michaud, B. Nguyen-Quoc, S. Overney, Y. Desjardins and S. Yelle, 1995. Synthesis of active oryzacystatin I in transgenic potato plants. *Plant Cell Reports*, 14(9): 585–588
- Carrillo, L., I. Herrero, I. Cambra, R. Sánchez-Monge, I. Diaz and M. Martínez, 2011a. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. *Plant Physiol. Biochem.*, 49(10): 1191–1200
- Carrillo, L., M. Martínez, K. Ramessar, I. Cambra, P. Castañera, F. Ortego and I. Díaz, 2011b. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Reports*, 30(1): 101–112
- Cheng, M.-L., J.T.C. Tzen, D.J.H. Shyu and W.-M. Chou, 2014. Functional characterization of the N-terminal and C-terminal domains of a sesame group II phytocystatin. *Bot. Stud.*, 55(18): 1–10
- Christova, P.K., N.K. Christov and R. Imai, 2006. A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*, 223: 1207–1218
- Demirevska, K., L. Simova-Stoilova, I. Fedina, K. Georgieva and K. Kunerd, 2009. Response of oryzacystatin I transformed tobacco plants to drought, heat

- ant light stress. *J. Agronomy and Crop Science*, 196: 90-99
- Dean, R., J.A. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis and G.D. Foster**, 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, 13(4): 414-30
- Diop, N.N., M. Kidrič, A. Repellin, M. Gareil, A. d'Arcy-Lameta, A.T.P. Thi and Y. Zuily-Fodil**, 2004. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Letters*, 577(3): 545-550
- Dutt S., D. Pandey and A. Kumar**, 2011. Jasmonate signal induced expression of cystatin genes for providing resistance against Karnal bunt in wheat. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6): 821-830
- Gaddour, K., J. Vicente-Carbajosa, P. Lara, I. Isabel-Lamonedá, I. Diaz and P. Carbonero**, 2001. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Mol. Biol.*, 45: 599-608
- Gambardella, M., R. Ríos, E. Aballay, I. Cambra and I. Diaz**, 2012. Effect of strawberry and barley defence proteins on nematode pests. *Acta Hort.*, 926: 113-117
- Goulet, M.-C., C. Dallaire, L.-Ph. Vaillancourt, M. Khalf, A.M. Badri, A. Preradov, M.-O. Duceppe, Ch. Goulet, C. Cloutier and D. Michaud**, 2008. Tailoring the Specificity of a Plant Cystatin toward Herbivorous Insect Digestive Cysteine Proteases by Single Mutations at Positively Selected Amino Acid Sites. *Plant Physiol.*, 146: 1010-1019
- Hines, M.E., C.I. Osuala and S.S. Nielsen**, 1991. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. *J. Agric. Food Chem.* 39(8): 1515-1520
- Hong, J.K., J.E. Hwang, C.J. Lim, K. Yang, Z.L. Jin, C.Y. Kim, J.C. Koo, W.S. Chung, K.O. Lee, S.Y. Lee, M.J. Cho and C.O. Lim**, 2007. Over-expression of Chinese cabbage phytocystatin 1 retards seed germination in Arabidopsis. *Plant Sci.*, 172(3): 556-563
- Irie, K., H. Hosoyama, T. Takeuchi, K. Iwabuchi, H. Watanabe, M. Abe, K. Abe and S. Arai**, 1996. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Mol. Biol.*, 30(1): 149-57
- Joshi, B.N., M.N. Sainani, K.B. Bastawade, V.S. Gupta and P.K. Ranjekar**, 1998. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246: 382-387
- Kiggundu, A., J. Muchwezi, C. Van der Vyver, A. Viljoen, J. Vorster, U. Schlüter, K. Kunert and D. Michaud**, 2010. Deleterious effects of plant cystatins against the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 73(2): 87-105
- Kimura, M., T. Ikeda, D. Fukumoto, N. Yamasaki and M. Yonekura**, 1995. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59: 2328-2329
- Kondo, H., K. Abe, I. Nishimura, H. Watanabe, Y. Emori and S. Arai**, 1990. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzacystatin-II. *J. Biol. Chem.*, 265: 15832-15837
- Kuroda, M., M. Ishimoto, K. Suzuki, H. Kondo, K. Abe, K. Kitamura and S. Arai**, 1996. Oryzacystatins Exhibit Growth-inhibitory and Lethal Effects on Different Species of Bean Insect Pests, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(2): 209-212
- Kuroda, M., T. Kiyosaki, I. Matsumoto, T. Misaka, S. Arai and K. Abe**, 2001. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 22-8
- Lecardonnell, A., L. Chauvin, L. Jouanin, A. Beaujean, G. Prevost and B.S. Sangwan-Norreel**, 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Science*, 140: 71-79
- Leple, J., M. Bonade-Bottino, S. Augustin, G. Pilate, V. Letan, A. Delplanque, D. Cornu and L. Jouanin**, 1995. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding*, 1: 319-328
- Lim, C.O., S.I. Lee, W.S. Chung, S.H. Park, I. Hwang and M.J. Cho**, 1996. Characterization of a cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor from chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. *Plant Mol. Biol.*, 30: 373-379
- Masonneau, A., P. Condamine, J.P. Wisniewski, M. Zivy and P.M. Rogowsky**, 2005. Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. *Biochim. Biophys. Acta*, 1729: 186-199
- Martinez, M., Z. Abraham, M. Gambardella, M. Echaide, P. Carbonero and I. Diaz**, 2005. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *J. Exp. Bot.* 56: 1821-1829.
- Martinez, M., E. López-Solanilla, P. Rodríguez-Palenzuela, P. Carbonero and I. Díaz**, 2003. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin *Hv-CPI* (gene *Icy*) is not associated with its cysteineproteinase inhibitory properties. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 876-883
- Michaud, D., B. Nguyen-Quoc and S. Yelle**, 1993. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *FEBS Lett*, 331: 173-176
- Michaud, D., L. Cantin, D.A. Raworth and T.C. Vrain**, 1996. Assessing the stability of cystatin/cysteine proteinase complexes using mildly-denaturing gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 17(1): 74-9
- Michaud, D., L. Cantin and T.C. Vrain**, 1995. Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322: 469-474

- Ninković, S., J. Miljuš-Djukić, S. Radović, V. Maksimović, J. Lazarević, B. Vinterhalter, M. Nešković and A. Smigočki**, 2007. *Phytodecta fornicate* Bruggemann resistance mediated by oryzacystatin II proteinase inhibitor transgenes. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 91: 289–294
- Ojima, A., H. Shiota, K. Higashi, H. Kamada, Y. Shimma, M. Wada and S. Satoh**, 1997. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. *Plant Mol. Biol.*, 34: 99–109
- Oerke, E.C.**, 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.*, 144: 31–43
- Oerke, E.C. and H.W. Dehne**, 2004. Safeguarding production - losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.*, 23: 275–285
- Oerke, E.-C., H.-W. Dehne, F. Schönbeck and A. Weber**, 2012. Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier
- Pernas, M., E. Lopez-Solanilla, R. Sanchez-Monge, G. Salcedo and P. Rodriguez-Palenzuela**, 1999. Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12: 624–627
- Pernas, M., R. Sánchez-Monge and G. Salcedo**, 2000. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Letters*, 467(2–3): 206–210
- Pimentel, D.**, 1986. Agroecology and economics. In: Kogan, M. (ed.), *Ecological Theory and Integrated Pest Management Practice*. Wiley, New York, 299–319
- Pimentel, D.**, 2009. Pesticide and pest control. In: Peshin P., Dhawan A.K. (eds.) *Integrated pest management: innovation-development process*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 83–87
- Pirovani, C.P., A.daS. Santiago, L.S. dos Santos, F. Micheli, R. Margis, A.daS. Gesteira, F.C. Alvim, G.A.G. Pereira and J.C. deM. Cascardo**, 2010. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. *Planta*, 232(6): 1485–97
- Popovic, M., U. Andjelicovic, L. Burazer, B. Lindner, A. Petersen and M. Gavrovic-Jankulovic**, 2013. Biochemical and immunological characterization of a recombinantly produced antifungal cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Phytochemistry*, 94: 53–59
- Rahbe, Y., C. Deraison, M. Bonade-Bottino, C. Girard, C. Nardon and L. Jouanin**, 2003. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin on different expression (OC-I) in different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Science*, 164: 441–450
- Ryan, S.N., W.A. Laing and M.T. McManus**, 1998. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry*, 49(4): 957–63
- Rivard, D., C. Girard, R. Anguenot, L.P. Vezina, S. Trepanier and D. Michaud**, 2007. MsCYS1, a developmentally-regulated cystatin from alfalfa. *Plant Physiol. Biochem.*, 45: 508–514
- Samac, D.A. and A.C. Smigočki**, 2003. Expression of Oryzacystatin I and II in Alfalfa Increases Resistance to the Root-Lesion Nematode. *Nematology*, 93(7): 799–804
- Soares-Costa, A., L.M. Beltramini, O.H. Thiemann and F. Henrique-Silva**, 2002. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296: 1194–1199
- Sugawara, H., K. Shibuya, T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh**, 2002a. Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *J. Exp. Bot.*, 53(368): 407–413
- Sugawara, H., T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh**, 2002b. Antifungal Activity of a Recombinant Carnation Cystatin, rDC-CPI. *Plant Biotech.*, 19(3): 207–209
- Urwin, P.E., H.J. Atkinson, D.A. Waller and M.J. McPherson**, 1995. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *Plant J.*, 8: 121–131
- Urwin, P.E., C.J. Lilley, M.J. McPherson and H.J. Atkinson**, 1997. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.*, 12: 455–461
- Valdes-Rodriguez, S., A. Cedro-Tanda, V. Aguilar-Hernandez, E. Cortes-Onofre, A. Blanco-Labra and A. Guerrero-Rangel**, 2010. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6): 469–475
- Yang, A.H. and K.W. Yeh**, 2005. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no.1). *Planta*, 221: 493–501
- Waldron, C., L.M. Wegrich, P.A. Merlo and T.A. Walsh**, 1993. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Mol. Biol.*, 23: 801–12