



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**TOXICIDAD *IN VIVO* Y PROTEÓMICA  
COMPARATIVA PARA EL ESTUDIO DE LA  
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS  
CON ACTIVIDAD INSECTICIDA  
PRESENTES EN SEMILLAS DE  
*Phaseolus vulgaris* L.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Moisés Daniel Gamero Hernández como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología.

Tutores: Dr. Alexander Laurentin  
Dr.<sup>a</sup> Nardy Diez

CARACAS, VENEZUELA  
OCTUBRE 2009

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE  
GRADO DEL Br. MOISES DANIEL GAMERO HERNANDEZ

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. MOISES DANIEL GAMERO HERNANDEZ C.I: 16790209, titulado “TOXICIDAD *IN VIVO* Y PROTEÓMICA COMPARATIVA PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA PRESENTES EN SEMILLAS DE *Phaseolus vulgaris* L.”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dos días del mes de noviembre del año 2009, dejando constar que el Prof. Alexander Laurentin actuó como coordinador del jurado examinador.

---

Prof. Ana Gómez (Jurado)

---

Prof. Catalina Ramis

---

Prof. Alexander Laurentin  
(Tutor 1- Coordinador )

---

Prof. Nardy Diez  
(Tutor 2)



## Resumen

Las caraotas (*Phaseolus vulgaris*) son una de las leguminosas más cultivadas en el mundo, su composición las hace una excelente fuente de proteínas, carbohidratos, fibra dietética y micronutrientes por lo que son de gran interés desde el punto de vista nutricional. La alta calidad nutricional de *P. vulgaris* la hace en ocasiones blanco de ataques de distintos tipos de insectos desde antes de la cosecha hasta el almacenamiento de los granos. Un ejemplo de este tipo de plagas son los bruquidios, particularmente las especies *Acanthoscelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus*. Estos se alimentan del endospermo y causan graves daños a la semilla por lo que puede disminuir la calidad y cantidad de granos producidos hasta en un 48 %. Si bien los agricultores han empleado distintas estrategias para disminuir el efecto de los insectos, éstas generalmente tienen consecuencias negativas y no son por completo efectivas. Es preciso desarrollar una estrategia que permita combatir eficazmente los bruquidios y que no implique daño a otras especies o afecte de manera considerable la producción. Ciertas lectinas presentes en las leguminosas (como la fitohemaglutinina, los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y las arcelinas) afectan a los insectos y confieren una resistencia natural al ataque de las semillas, no implican estrategias complejas o costosas para contrarrestar el efecto de las plagas y representan una buena opción para evitar el ataque de insectos. Se realizó un bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) a fin de estimar la toxicidad de semillas sin testa de diferentes variedades de *P. vulgaris*, si bien este insecto no ataca en condiciones normales las semillas de *P. vulgaris*, se ha demostrado su susceptibilidad a las proteínas tóxicas presentes en las semillas. Mediante electroforesis en dos dimensiones se estudiaron las proteínas presentes en el endospermo de las semillas, obtenidas a partir de harinas de los granos. Esta técnica permitió comparar distintas muestras entre si mediante el análisis de las electroforesis por bioinformática. Mediante la correlación entre los resultados del bioensayo y el análisis de los geles, se buscó identificar las variedades de *P. vulgaris* resistentes al ataque de insectos que pueden ser de interés como parte de programas de introducción de nuevas variedades de caraotas al mercado venezolano más resistentes a las plagas de almacenamiento. Se obtuvieron tres grupos de resultados, semillas de toxicidad alta, moderada y baja, siendo las variedades Tacarigua, Victoria y MGM-08-02-026, las más tóxicas y Tenerife y DOR-500 las menos dañinas para los insectos. Las electroforesis en dos dimensiones mostraron grupos de proteínas comunes para todas las variedades de semillas que mostraron ser tóxicas, mientras que en las variedades no tóxicas no se observaron estas proteínas. Aparentemente existe una correlación entre la presencia de *spots* en ciertas regiones de los geles y la toxicidad de las semillas

# Índice

Resumen .....	iv
Índice .....	v
Índice de figuras.....	vi
Introducción.....	1
Antecedentes.....	8
Objetivos.....	15
Objetivo General .....	15
Objetivos Específicos .....	15
Materiales y Métodos.....	16
Bioensayo con el gorgojo de arroz.....	16
Análisis estadístico de los resultados .....	18
Proteómica comparativa .....	18
Extracción de las proteínas del endospermo .....	18
Determinación de la concentración de proteínas presentes en los extractos .....	19
Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas presentes en el endospermo de <i>P. vulgaris</i> .....	19
Resultados.....	24
Bioensayo del gorgojo de arroz .....	24
Supervivencia.....	24
Variación de peso .....	28
Tiempo de supervivencia media.....	31
Proteómica comparativa .....	32
Discusión .....	45
Conclusiones.....	56
Referencias .....	57

## Índice de figuras

Figura 1: Supervivencia del gorgojo de arroz en los controles del bioensayo. ....	25
Figura 2: Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con el endospermo de las semillas de diferentes variedades de <i>P. vulgaris</i> . ....	27
Figura 3: Variación de peso del gorgojo de arroz en los controles del bioensayo .....	28
Figura 4: Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con el endospermo de semillas de diferentes variedades de <i>P. vulgaris</i> .....	30
Figura 5: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad Tacarigua. ....	37
Figura 6: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad Victoria. ....	38
Figura 7: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad MGM-08-02-026. ....	39
Figura 8: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad MGM-10-02-108. ....	40
Figura 9: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad NAG-75. ....	41
Figura 10: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad Montalbán. ....	42
Figura 11: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad Tenerife. ....	43
Figura 12: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de <i>P. vulgaris</i> ; variedad DOR-500. ....	44

## Agradecimientos

A mis padres por su apoyo constante e incondicional a lo largo de toda mi vida, sin ustedes no habría llegado hasta este lugar, este es un logro de ustedes también. ¡¡¡LOS QUIERO MUCHO!!

A mi mejor amiga y hermana Débora, la mejor compañera de todas, gracias por estar ahí siempre dispuesta a oírme, a darme ánimos y a sentarte conmigo a hablar de cualquier cosa, todo el papel de este trabajo no basta para agradecerte tu compañía.

A mi familia, a todos aquellos que me ayudaron y en cierto modo me guiaron en este viaje

A mi tutor Alexander, gracias por todas las enseñanzas, por mostrarme que el trabajo duro tiene sus frutos, creo que el todo aprendizaje después de todo este trabajo no se limita solo al trabajo en el laboratorio. Gracias por su paciencia, y por aguantar mis pérdidas...

A mi tutora Nardy, gracias por la compañía en el laboratorio, y por todo el aprendizaje, por tu paciencia y por soportarme.

A Carolina mi tutora no oficial en este proyecto, este trabajo no habría estado completo sin ti, gracias por la enseñanza no solo de destrezas en el laboratorio sino de muchas cosas, que van mas allá de los muros de un laboratorio.

A mis amigos de la Universidad:

Juan Carlos, gran compañero a lo largo de toda la carrera, amigo (y ahora *colega*) en las buenas y en las malas, y se que siempre podré confiar en ti. A ti y a tu mamá muchísimas gracias, hicieron de todo este paseo por la Universidad una experiencia muy agradable, los aprecio mucho.

Lorena, Chuchu, Juan Manuel, Miguel, y Maleja: gracias amigos, por darle color a mis ratos en la universidad y fuera de ella, por su apoyo y compañía, por los agradables ratos de estudios, acompañados con innumerables ratos de diversión.

A mis amigos del IBE, Mighay, Denis y Olga: la mejor compañía en el laboratorio (sobre todo los fines de semana), gracias por estar ahí, acompañarme y darme ánimos siempre. Solo ustedes que trabajaron y trabajan con insectos saben lo que puede llegar a ser esto a veces

A mis amigos del IDEA; Verónica, Maleja, Mariale, Mónica, José, Ainhoa, Annamil, Leandro, Antonio y Pedro: ustedes me enseñaron que un laboratorio puede llegar a ser un excelente lugar de trabajo, realmente ameno y divertido, gracias por su apoyo y por su ayuda.

Y finalmente pero no menos importante, a la Universidad Central de Venezuela, por contribuir de una manera inigualable en mi formación como científico y como persona. Estaré eternamente agradecido a la Universidad, mi Universidad.

A todos ¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!

## Introducción

Las leguminosas son un rubro de gran importancia desde el punto de vista nutricional debido a que son una fuente de proteínas tanto para consumo humano como para consumo animal. Su bajo precio en comparación con las carnes y la leche las hace especialmente importantes; son consumidas en muchos países pobres en ocasiones como única fuente de proteína, aunque son poco consumidas por países desarrollados, motivo por el cual se han realizado relativamente pocos trabajos con miras a aumentar la producción de este rubro (Jaffe, 1987 y Mbogo, 2007). Son una excelente fuente de proteínas, carbohidratos, fibra dietética y micronutrientes en general (Singh, 1999). Tienen un alto contenido de lisina y bajo contenido de metionina y al ser consumidas junto con cereales (con bajo contenido de lisina, pero alto contenido de metionina) se complementan las deficiencias en aminoácidos esenciales de un grupo por el otro (Jaffé, 1987; Bressani y col., 1989).

*Phaseolus vulgaris* se cultiva extensamente en todo el mundo, siendo los países del este y sur de África, algunas partes de Asia y Latinoamérica, los principales productores y consumidores de esta leguminosa. Según estimaciones de las Naciones Unidas, para 2005 se cultivaron en el mundo 11 millones de toneladas de caraotas, para lo que se usaron 14 millones de hectáreas de tierra cultivable a nivel mundial (FAO, 2005). Para 2002, en Venezuela se destinaron 10.026 Ha de tierra cultivable para la producción de caraotas (Centro de Investigaciones Agroalimentarias, 2005).

Debido a la alta calidad nutricional de las semillas de *P. vulgaris* estas son en ocasiones blanco de ataques de distintos tipos de insectos. Existen diversas plagas que afectan la producción de leguminosas (Mbogo, 2007). Un claro ejemplo de este tipo de plagas son los bruquidios, particularmente las especies *Acanthoscelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus*. Estos



atacan los granos desde antes de la cosecha hasta después de que el grano ha sido almacenado. Las hembras adultas depositan los huevos en la superficie del grano (de 30 a 60 huevos en cada postura) y las larvas al salir del huevo penetran el grano, donde se alimentan del endospermo durante su desarrollo, hasta que emergen del grano como adultos y repiten el ciclo. Esto suele suceder repetidas veces durante el almacenamiento de los granos y provoca pérdidas en la producción total de las carotas. Ello se debe a que cada organismo al emerger del grano realiza en este una perforación de tamaño considerable y consume gran parte del endospermo, lo que implica una pérdida significativa de la masa del grano y a una disminución en el valor nutricional debido a la degradación de las proteínas y los carbohidratos del endospermo (Mbogo, 2007).

El daño, producto de la depredación que realizan los gorgojos, puede alcanzar una reducción de hasta un 48% en la calidad y cantidad de granos (Slumpa y Ampofo, 1991) y se han registrado pérdidas que van desde un 5% a un 20% en la masa de las semillas (Schoonhoven y col., 1983; Schoonhoven y Cardona, 1986). Este tipo de plagas produce pérdidas que alcanzan, en ocasiones el 40% del total de carotas en el mundo (Mbogo, 2007).

Para minimizar las pérdidas que generan los gorgojos, los agricultores han empleado distintas estrategias; si bien estas logran disminuir el ataque de los insectos, tienen consecuencias negativas de diversos tipos y en ocasiones no logran evitar por completo el efecto de las plagas sobre los granos (Mbogo, 2007).

Es muy frecuente el uso de pesticidas de diversos tipos, como bromuro de metilo y disulfuro de carbono, durante la siembra y mientras los granos están almacenados. Estos pesticidas suelen no sólo afectar a los bruquidios, también pueden ser nocivos para otras especies de animales o afectar el ambiente y ser costosos (Pereira y col., 2000). En ocasiones los granos almacenados se mezclan con polvo, astillas de madera y residuos de molienda de otros granos,

estos compuestos ocupan el espacio entre los granos y evitan la entrada de los insectos. Esta estrategia, aunque menos perjudicial, implica un proceso de limpieza previo al consumo y no es completamente efectiva (Mbogo, 2007). También suele disminuirse el tiempo entre la siembra y la cosecha, de manera tal que los granos están expuestos a los insectos el menor tiempo posible. Esto último se traduce en una menor producción; ya que no transcurre el tiempo necesario para que se alcance la madurez total de la planta, lo que implica un número menor de semillas de menor peso. Como última estrategia, los agricultores venden el producto de la cosecha a precios muy bajos a fin de evitar las pérdidas que podrían generar las plagas durante el almacenamiento prolongado o siembran pequeñas cantidades que puedan ser vendidas rápidamente y así evitar al máximo las pérdidas después de la cosecha (Mbogo, 2007). Por lo tanto es preciso desarrollar estrategias que permitan combatir eficazmente los bruquidios, que no implique daño a otras especies o afecte de manera considerable la producción; ya que los métodos empleados para contrarrestar el ataque de insectos a los granos no son completamente efectivos o tienen algún tipo de efecto negativo sobre la producción, (Mbogo, 2007; Pereira, 2000).

En muchas regiones donde se cultivan distintas variedades de granos a la vez, se ha observado que el ataque de los insectos es prácticamente específico. En silos donde se almacenan conjuntamente las especies de leguminosas *Vigna unguiculata* y *Phaseolus lunatus*, se ha registrado ataque de bruquidios a *V. unguiculata*, mientras que *P. lunatus* ha sido resistente al ataque (Moraes y col., 2000). Esto se debe a que las semillas de *P. lunatus* contienen diversas sustancias de defensa como taninos, glucósidos cianogénicos, aminoácidos no proteicos y proteínas de diversos tipos (inhibidores de proteasas, inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y lectinas) las cuales afectan los herbívoros que consumen las semillas (Pereira y col., 2000). Particularmente se ha comprobado la actividad insecticida de las proteínas de la familia de las lectinas, como las

mencionadas anteriormente (Fabre y col., 1998; Mourey y col., 1998). Se ha evidenciado a través de pruebas *in vivo* que algunas lectinas se comportan como proteínas tóxicas que inducen la muerte en ratones, sin embargo el mecanismo de acción de dichas proteínas no ha sido esclarecido (Fabre y col., 1998).

Ciertas proteínas de la familia de las lectinas presentes en las leguminosas (como la fitohemaglutinina, los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y las arcelinas) afectan de diversas formas a los insectos, confieren resistencia al ataque de las semillas y por otra parte no implican estrategias complejas o costosas para contrarrestar el efecto de las plagas, de esta manera representan una buena opción para evitar el ataque de insectos (Pereira y col., 2000). La toxicidad de muchas de estas sustancias desaparece después de la cocción debido a que durante este proceso las altas temperaturas necesarias para cocinar el grano afectan la estructura terciaria de algunas proteínas por lo que disminuye su toxicidad (Carmona y col., 1998). Por todo lo anterior pueden ser una buena opción contra las plagas de almacenamiento.

Es preciso entonces, estudiar conjuntamente las proteínas de las semillas y compararla con la resistencia a ataques de insectos, de manera tal que pueda correlacionarse la presencia de ciertas proteínas con la toxicidad, y de esta manera poder identificar las variedades de *P. vulgaris* más resistentes y, por lo tanto, de mayor interés desde el punto de vista agrícola (Mbogo, 2007).

La proteómica es una herramienta bioinformática útil en casos en los que se desea estudiar proteínas en conjunto. Data de finales de 1970, cuando muchos investigadores comenzaron a desarrollar bases de datos de las proteínas expresadas en diversos tejidos a partir de electroforesis en dos dimensiones. Esta técnica complementa el estudio del genoma de un organismo, ya que se enfoca principalmente en los productos de dichos genes y permite además determinar, en ocasiones, modificaciones que ocurren en las proteínas que no pueden ser

visualizadas por las técnicas de análisis genético (Pandey y Mann, 2000). Aunque son muchas las técnicas usadas en proteómica, una de las técnicas más utilizada es la electroforesis en dos dimensiones, las proteínas de una mezcla obtenida a partir de un tejido se separan en base a dos de sus características fisicoquímicas: punto isoeléctrico y masa molecular. Si bien esta no es una técnica cuantitativa que permite determinar las cantidades de cada proteína en la mezcla, la presencia o ausencia de uno o más puntos en un gel, donde cada punto o *spot* corresponde a una proteína, permite realizar estudios conocidos como proteómica comparativa en la que distintos patrones electroforéticos (que en cierto modo son una aproximación al proteoma) son analizados y comparados entre sí y de esta manera es posible determinar si las proteínas de interés se expresan o no en el tejido de estudio. Este tipo de trabajo se realiza empleando programas de computación que permiten analizar conjuntamente las imágenes de cada patrón electroforético y determinar si existen diferencias o similitudes entre los mismos (Hunter y col., 2002).

Por otra parte un bioensayo permite estimar la toxicidad de distintos componentes de la dieta. En éste se coloca una población de un organismo determinado en presencia de dietas experimentales y se evalúa el efecto de las mismas sobre dichos organismos. Si bien las semillas de *P. vulgaris* son principalmente atacadas por *Acanthoscelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus*, insectos de la familia Bruchidae (Coleóptera), el uso de estos organismos en un bioensayo ha resultado complejo, ya que la manipulación constante los afecta en gran medida y el mantenimiento de los mismos en el laboratorio requiere de condiciones de esterilidad. (Chrispeels y Raikhel, 1991; Huesing y col., 1991; Kjemtrup y col., 1995).

Como alternativa el gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L., otro insecto del orden Coleóptera y de la familia Curculionidae, se perfila como un buen modelo animal para realizar un bioensayo que estime toxicidad. El gorgojo de arroz es un insecto de tamaño y ciclo de vida

relativamente pequeños: los adultos miden entre 3 y 4 mm y estos alcanzan la edad adulta aproximadamente 14 días después de la eclosión. Estas características permiten trabajar con poblaciones de insectos ( $n = 30$ ) en recipientes de tamaño pequeño, durante un tiempo corto (15 días) (Carmona, 1998). Además, no requieren de tantos cuidados para el trabajo como los bruquideos.

El bioensayo del gorgojo de arroz, además de estimar de forma sencilla la toxicidad de algunas dietas, tiene una serie de ventajas que superan ensayos similares en lo que se emplean otros animales (como ratones u otros insectos, por ejemplo) (Carmona y col., 1998).

Mediante el bioensayo del gorgojo de arroz es posible realizar diversos estudios midiendo distintos biomarcadores, como: supervivencia, composición corporal, actividad enzimática, entre otros. A partir de estos biomarcadores es posible determinar el efecto de dietas experimentales sobre los insectos y, en ocasiones, extrapolar los resultados a otro organismo de interés. Es posible estimar la toxicidad de una dieta a partir de la supervivencia de los insectos a un tratamiento específico (Lovera, 2008).

Los estudios de toxicidad que se han llevado a cabo, han siempre tenido como objetivo seleccionar variedades resistentes al ataque de insectos y a distintos tipos de enfermedades, enfocados principalmente a la presencia de taninos, oligosacáridos y saponinas; en general sustancias que actúan como factores antinutricionales pero que no son proteínas (Muzquiz y col., 1999). Es preciso realizar un estudio en el que se analicen conjuntamente la presencia de lectinas con actividad insecticida en los granos y la toxicidad de los mismos, y determine la correlación entre la actividad insecticida y la presencia de ciertas proteínas en las semillas. De manera que puedan escogerse las variedades de mayor interés comercial resistentes al ataque de insectos.

A partir del análisis de las electroforesis y de los resultados del bioensayo, se buscará determinar si existe alguna correlación entre la toxicidad *in vivo* y la composición proteica de las semillas. Como una herramienta potencial que podría utilizarse en la futura selección de variedades de *P. vulgaris* que podrían utilizarse en programas de mejoramiento genético para posteriormente ser introducidas en el mercado venezolano como una alternativa que evitará cuantiosas pérdidas producto del daño que causan los insectos.

## Antecedentes

Las leguminosas son el rubro de la agricultura que comprende los granos: carotas o frijoles (*Phaseolus vulgaris*), lentejas (*Lens culinaris*), la soya (*Glycine max*), el caupí (*Vigna unguiculata*) y los garbanzos (*Cicer arietinum*). Su bajo precio en comparación con las carnes y la leche las hace especialmente importantes, son consumidas en muchos países pobres en ocasiones como única fuente de proteína, aunque son poco consumidas por países desarrollados, motivo por el cual se han realizado relativamente pocos trabajos con miras a aumentar la producción de este rubro (Jaffe, 1987 y Mbogo, 2007).

*P. vulgaris* es una de las leguminosas más consumida en el mundo, en países desarrollados se observa una tasa de consumo de estas leguminosas, donde se registran valores de ingesta que van desde los 13 a los 40 kg/año per cápita (Singh, 1999) y en Latinoamérica, esta es la leguminosa más consumida (Bressani y col., 1989). Por lo tanto es preciso desarrollar tecnologías que permitan cultivarla de manera sencilla, y a un costo relativamente bajo, donde la producción sea alta y no sea afectada por ningún tipo de plagas (Hamelryck y col., 1996a, Mourey y col., 1998). En Venezuela para 2002, se cosecharon 8,32 Tm y se importaron 54,073 Tm de carotas (Centro de Investigaciones Agroalimentarias, 2002).

El estudio de las proteínas presentes en las semillas de leguminosas se ha realizado principalmente con miras a realizar árboles filogenéticos que permitan determinar el proceso de aparición de nuevas especies a partir de las especies del viejo mundo (Lioi y col., 2006). Los genes que codifican para proteínas de resistencia a ataque de insectos han servido como marcadores genéticos de mucha importancia ya que este grupo de proteínas presenta grandes secuencias conservadas por lo que son de gran utilidad para estudios de cladística (Mourey y col., 1998; McClean y col., 2004).

Las lectinas son proteínas de mucha importancia, no solo desde el punto de vista agrícola debido a su actividad insecticida. Sus dominios de interacción con distintos tipos de carbohidratos las hacen muy útiles como herramientas en la separación y el estudio de glucoproteínas, glucopéptidos y glucolípidos; permiten estudiar los cambios que ocurren en la superficie celular durante procesos fisiológicos normales y patológicos; son ampliamente utilizadas en estudios de histoquímica; en el estudio de procesos neurofisiológicos y en la estimulación de producción de linfocitos gracias a su actividad mitogénica, entre otras muchas aplicaciones (Hossain y col., 2004). Aunque este tipo de proteínas han sido ampliamente estudiadas, todavía hoy en día se conoce poco sobre sus funciones biológicas. Particularmente las lectinas de las leguminosas han sido las más estudiadas y se ha encontrado que esta familia de proteínas formada por un gran número de polipéptidos con funciones diversas, mantiene secuencias conservadas en la mayor parte de toda su estructura. Las secuencias de aminoácidos que determinan la actividad de las proteínas y por ende confieren identidad a la molécula representan nada más el 2% de la estructura total de la proteína (Nagasuma y col., 2001, Hamelryck y col., 1996b). Por otro lado, mediante experimentos *in vitro* realizados con segmentos del intestino de ratas, se ha registrado que al agregar al medio lectinas provenientes de semillas de leguminosas (purificadas mediante cromatografía de afinidad), estas inhiben el proceso de absorción de glucosa en un 40% y transporte de glucosa en un 75% (Levy-Benshimol y col., 1998).

Del grupo de proteínas producto de la familia de genes que codifican para lectinas (fitohemaglutinina, arcelinas e inhibidores  $\alpha$ -amilasa), la fitohemaglutinina (PHA) fue la primera cuyas propiedades insecticidas fueron descritas (Janzen y col., 1976 citado por Goosens y col., 2000). Para 1977, Puztai y Palmer observaron que al alimentar ratas con PHA purificada de



frijoles los animales morían rápidamente, lo que los llevó a pensar que esta proteína tenía cierta actividad tóxica. Este tipo de bioensayos de toxicidad se llevaron a cabo con distintos tipos de animales empleando principalmente PHA e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, obteniéndose siempre resultados similares (Bollini y col., 1999). La actividad insecticida de los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa fue descubierta casi por error en 1991, al realizar bioensayos con insectos empleando para ello dietas artificiales basadas en PHA purificada a partir de semillas de leguminosa, pero accidentalmente contaminadas con inhibidores de  $\alpha$ -amilasa. En estos bioensayos se observó una alta toxicidad, superior incluso a las dietas basadas en PHA pura de experimentos similares; por lo que se realizó un estudio más a fondo de la composición de las dietas artificiales y se descubrió la presencia de los inhibidores (Huesing y col., 1991).

Aproximadamente entre un 5% y 10% del total de proteínas presentes en las semillas de *P. vulgaris* corresponde a la PHA, una proteína formada por dos subunidades distintas, una de 32 kDa (PHA-E) y otra de 34 kDa (PHA-L) (Kjemtrup y col., 1995). Estas subunidades forman una estructura tridimensional con dominios de unión a carbohidratos, por lo que son consideradas lectinas (Schroeder, 1995) que se unen a glúcidos con una alta especificidad y se encuentran presentes en todos los seres vivos (Nelson y Cox, 2005). Se ha observado que cada subunidad presenta propiedades biológicas diferentes y especificidad por distintos tipos de azúcares: PHA-L genera aglutinación de linfocitos mientras que PHA-E sirve como mitógeno de linfocitos de mamíferos. El dominio de unión a carbohidratos que presentan las PHA es reconocido por las células del sistema inmune y es el causante del efecto de hemoaglutinación, el cual en parte da el nombre a estas proteínas (Kjemtrup y col., 1995).

Las PHA son proteínas vacuolares que se sintetizan a partir de un precursor polipeptídico con una estructura tipo PHA, el cual por modificaciones a su estructura mediante actividad

enzimática, es transformado en uno u otro tipo de PHA. Estos polipéptidos se almacenan principalmente en los cotiledones dentro de las estructuras de almacenamiento celular (Kjemtrup y col., 1995). La estructura de estas proteínas consiste en un tetrámero formado por la interacción de las subunidades L y E en diferentes combinaciones (las cuales presentan un 84% de homología): L<sub>4</sub>, L<sub>3</sub>E, L<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, LE<sub>3</sub> y E<sub>4</sub>. La subunidad L es a la vez un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas, presenta dos glucosilaciones cerca del N-terminal y alta afinidad por diferentes tipos de carbohidratos (la cual varía en base a las diferencias estructurales que se observan en distintas especies). Por otra parte la subunidad E además de presentar afinidad por carbohidratos, interactúa fuertemente con nucleótidos, especialmente con adenina (Hamelryck y col., 1996a; Mourey y col., 1998).

La familia de genes que codifican para las PHA también codifican para otras lectinas: como los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y las arcelinas. Estas podrían considerarse pequeñas variaciones de la molécula de PHA donde se ha perdido la estructura de unión a carbohidratos (Hamelryck y col., 1996a; Mourey, 1998).

Se han descrito tres tipos principales de inhibidores de  $\alpha$ -amilasa de carácter proteico: los de origen microbiano, los cuales contienen carbohidratos en su extremo C-terminal; péptidos microbianos sin glucosilaciones e inhibidores presentes en plantas superiores. Estos últimos inhiben la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -amilasa de algunos insectos al unirse a la enzima de manera reversible formando el complejo enzima-inhibidor, pero no afectan de ninguna otra forma las enzimas de la planta. Estas moléculas se originan a partir de un precursor proteico que es madurado mediante una hidrólisis específica, lo que las diferencia de las PHA y las arcelinas (Lee y col., 2002). La estructura de estos inhibidores y los genes que codifican para su síntesis han sido ampliamente estudiados, se han realizado diversos análisis de homología entre los

distintos los tipos de inhibidores presentes en algunos granos, todo esto, con miras al desarrollo de árboles filogenéticos (Ishimoto y Chrispeels, 1996).

Se han propuesto posibles modelos de estructuras tridimensionales de los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, basados en la estructura de la PHA, esto tomando en cuenta el alto grado de similitud entre los inhibidores y la fitohemaglutinina. La forma activa del inhibidor está compuesta por al menos dos subunidades, con residuos de alanina y serina en el extremo N-terminal. Estas subunidades se forman a partir de precursores proteicos, que son degradados por proteasas, lo que probablemente propicie la unión entre las moléculas de precursores madurados, lo que conforma la proteína inhibidora, sin embargo el mecanismo mediante el cual se forman los inhibidores no está completamente claro todavía (Lee y col., 2002).

Otro grupo de proteínas que presentan homología con los dos grupos de lectinas antes mencionadas, es el grupo de las arcelinas. Hasta la fecha se han descrito seis tipos de arcelinas en semillas de leguminosas (Hamelryck y col., 1996a). Estas fueron descubiertas en base a estudios de perfiles electroforéticos de extractos de semillas en los cuales se observó una fracción con una movilidad diferente a la mostrada por las PHA y la phaseolina, una proteína de almacenamiento presente en los granos y que representa aproximadamente el 50% del total de proteínas de las semillas (Osborn y col., 1988; Bollini y col., 1999). Todas las arcelinas presentan una masa molecular entre 35 y 40 kDa formadas a partir de subunidades proteicas de menor tamaño (Goosens y col., 1994, Fabre y col. 1998).

Mediante bioensayos con los insectos *A. obtectus* y *Z. subfasciatus*, se ha determinado que existen diferencias desde el punto de vista de actividad insecticida, siendo las arcelina-1 y arcelina-5 las que presentan mayor toxicidad; lo que sugiere que existen diferencias estructurales claves que afectan la actividad de las mismas. Desde el punto de vista químico (solubilidad,

punto isoeléctrico y masa molecular) los diferentes tipos de arcelinas son muy parecidos a las PHA, ello se debe a que entre estos dos tipos de proteínas existe al menos un 60% de homología (Hartweck y col., 1991). Aunque ambas proteínas son estructuralmente similares, las arcelinas no generan cambios significativos en células del sistema inmune de mamíferos, como lo harían las PHA, cuya interacción con células del sistema inmune ha sido ampliamente estudiada (Hamelryck y col., 1996b; Mourey, 1998).

Diversos trabajos se han realizado enfocados a determinar la estructura de los distintos tipos de arcelinas (Hamelryck y col., 1996a; Hamelryck y col., 1996b; Mourey y col., 1996; Fabre y col., 1998) y aunque se ha caracterizado la estructura de las distintas moléculas, aun no se ha logrado explicar por completo el mecanismo por el cual estas afectan algunos organismos; lo que explicaría probablemente la especificidad de estas lectinas, las cuales en ocasiones confieren resistencia contra una especie de insecto, pero son inofensivas para otros (Lee y col., 2002).

En conjunto los tres grupos de proteínas mencionados anteriormente confieren a los granos de *P. vulgaris* resistencia al ataque de diversos insectos y otros agentes patógenos (como hongos y bacterias). Las pequeñas variaciones en las estructuras de cada proteína en particular juegan una pieza clave en la interacción con los diferentes organismos que pueden atacar la semilla (Hartweck y col., 1991).

Si bien estas proteínas afectan principalmente a los insectos de la familia Bruchidae (como *A. obtectus* y *Z. subfasciatus*) y la mayoría de estudios de toxicidad se han realizado mediante bioensayos empleando estos organismos (Chrispeels y Raikhel, 1991; Huesing y col., 1991; Kjemtrup y col., 1995), se ha comprobado que estos factores antinutricionales también pueden ser nocivos para *Sitophilus oryzae*. Se han observado cambios en la composición

corporal de estos insectos alimentados con diversas leguminosas, junto con una elevada tasa de mortalidad durante el tratamiento experimental, lo que sugiere que *S. oryzae* es susceptible también a algunas lectinas presentes en las semillas de leguminosas. Por otra parte, estudios de la actividad de enzimas de *S. oryzae* realizados *in vitro*, han mostrado cierto porcentaje de inhibición al agregar extractos proteicos de semillas de leguminosas al medio, esto puede explicar la susceptibilidad de los organismos a las lectinas presentes en los granos (Szwarcbort, 1980; Gómez-Sotillo, 1997).

Mediante el bioensayo del gorgojo de arroz es posible realizar diversos estudios midiendo distintos biomarcadores, como: supervivencia, composición corporal, actividad enzimática entre otros. Mediante estos biomarcadores es posible determinar el efecto de un tratamiento experimental sobre los insectos. A partir de la supervivencia de los insectos a un tratamiento específico, es posible estimar la toxicidad de una dieta. Este tipo de estudios se ha realizado antes para determinar el efecto de la harina de caraotas sobre los insectos (Carmona y col., 1997), donde se observó una elevada mortalidad en comparación con los controles positivos, y para determinar el efecto del etanol sobre los insectos donde se obtuvieron resultados similares (Lovera, 2008).

El estudio de las lectinas presentes en las semillas de leguminosas se ha centrado principalmente en el análisis de la estructura de las mismas con miras a proponer posibles modelos que expliquen la acción de estas, también se ha demostrado la actividad insecticida de algunas proteínas. Es preciso establecer correlaciones entre la presencia de estas lectinas y los niveles de toxicidad que las mismas presentan.

## Objetivos

### **Objetivo General**

Buscar diferencias en la expresión de proteínas con actividad insecticida presentes en ocho variedades de semillas de caraotas, *Phaseolus vulgaris* L., (Victoria, Tacarigua, Montalbán, Tenerife, NAG-75, DOR-500, MGM-08-02-031 y MGM-10-02-108) mediante estudios de proteómica comparativa y estimación de la toxicidad *in vivo* utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar la supervivencia y la variación de peso de los gorgojos alimentados con el endospermo de los granos de las distintas variedades de *P. vulgaris*.
2. Estimar el tiempo de supervivencia media como un biomarcador de la toxicidad de la semilla para el gorgojo de arroz.
3. Comparar el proteoma del endospermo de las distintas variedades de caraotas con la finalidad de buscar diferencias en la expresión de proteínas con actividad insecticida: fitohemaglutinina, inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y arcelinas.
4. Correlacionar la presencia de las proteínas con actividad insecticida y la toxicidad *in vivo*.

## **Materiales y Métodos**

Se llevaron a cabo dos grupos de experimentos: en primer lugar se realizó un bioensayo donde se evaluó la toxicidad de diferentes semillas de *P. vulgaris* para ello se utilizó un modelo animal que permitió estimar la toxicidad de las dietas; en segundo lugar se realizó un análisis de las proteínas presentes en las semillas mediante electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de las semillas.

### ***Bioensayo con el gorgojo de arroz***

El bioensayo con el gorgojo de arroz permite evaluar el efecto de los componentes de la dieta sobre una población de insectos. En éste se coloca un grupo de insectos en presencia de una dieta experimental y se estudia la respuesta de los animales a la misma. Mediante el análisis de la supervivencia y variación de masa corporal de los insectos es posible determinar el efecto de las dietas en estudio.

Para el cultivo de los insectos se colocaron 50 individuos adultos, que corresponderían a los padres (P1) de la población de insectos a utilizar en el bioensayo, y 200 gramos de arvejas verdes peladas y picadas en recipientes de vidrio tapados con una malla, estos se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 días; transcurrido este tiempo se retiraron los insectos adultos de los granos, las semillas se colocaron nuevamente en un recipiente de vidrio tapado con una malla y de nuevo se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 días. Transcurrido este tiempo se retiraron los insectos que se observaron en los granos, los cuales corresponden a la primera generación filial (F1). De esta manera se obtuvieron poblaciones de insectos adultos con una edad y una masa corporal aproximadamente similar que se utilizaron para el bioensayo.

Se colocaron 30 individuos adultos por réplica para un total de tres a ocho réplicas (con un peso promedio de aproximadamente  $1,6 \pm 0,1$  mg) y 2 g de dieta en viales de vidrio de 15 mL durante 28 días. Los recipientes tapados se colocaron en oscuridad a temperatura ambiente y se realizaron mediciones diarias de las variaciones de la masa corporal (empleando una balanza analítica) y supervivencia de los gorgojos a los tratamientos experimentales, esta última se determinó a partir del registro de la cantidad de individuos vivos desde el inicio del experimento hasta la culminación del mismo durante todos los días.

Las dietas experimentales consistieron en el endospermo (granos sin testa) de ocho variedades de *P. vulgaris* provenientes del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias ubicado en la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela núcleo Maracay (Edo. Aragua), identificados Victoria, Tacarigua, Montalbán, Tenerife, NAG-75, DOR-500, MGM-08-02-026 y MGM-10-02-108 por el personal del banco. Para la obtención del endospermo, las semillas fueron peladas en forma manual. Para los controles positivo y negativo se utilizaron arvejas verdes (*Pisum sativum*) peladas y partidas compradas en un mercado local y la privación completa de la ingesta de alimento (ayuno), respectivamente.

A partir de los resultados del registro de la masa corporal de los insectos, se determinó la variación de peso (en porcentaje) para cada una de las dietas, para ello se utilizó la fórmula:

$$\text{Variación de peso (\%)} = \frac{(\text{peso día } n) \times 100}{\text{peso día } 1} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Tanto la supervivencia como la variación de peso fueron graficadas en función del tiempo.



Para la estimación de la toxicidad de las semillas se calculó el tiempo de supervivencia media (TSM). Este biomarcador es el tiempo en días en el que sobrevive la mitad de la población alimentada con una dieta en estudio (Carmona y col., 1998). Para el cálculo del TSM se emplearon las curvas de supervivencia obtenidas con cada dieta; utilizando los puntos que describían el descenso en el tamaño poblacional para obtener una recta mediante una regresión lineal, para lo que se utilizó el programa Excel de Microsoft versión 2003. Con la ecuación de la recta de regresión correspondiente se calculó el tiempo en días necesario para que la cantidad de individuos vivos fuese la mitad de los colocados inicialmente en el ensayo.

Los TSM obtenidos permitieron clasificar las semillas en tres grupos en base al valor de estos con respecto al valor del TSM del control negativo: semillas con TSM menores al TSM del control negativo, iguales al TSM del control negativo y superiores al TSM del control negativo y en base a esto fue posible determinar si las semillas presentaron cierto grado de toxicidad.

## **Análisis estadístico de los resultados**

Debido a que se realizaron diferente número de réplicas para cada tratamiento, fue más apropiado utilizar una prueba t de Student para comparar las TSM de los ocho tratamientos experimentales con la media del TSM del control negativo (ayuno).

## ***Proteómica comparativa***

### **Extracción de las proteínas del endospermo**

Se realizó la extracción de proteínas de los granos de *P. vulgaris* siguiendo la metodología de Bollini y col (1999). Los granos pelados fueron pulverizados empleando un molinillo de café, las harinas obtenidas se incubaron en buffer borato 20 mmol/L pH 9 a 37 ° C con agitación constante (1000 rpm) durante una hora, previa adición de una mezcla de

inhibidores de proteasas que inhibe las proteinasas serínicas, cisteínicas y calpaínicas proteasas, específicamente desarrollado para el uso en electroforesis en dos dimensiones. Finalmente las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 g y se recuperaron los sobrenadantes. Estos extractos proteicos pueden ser utilizados en el momento o almacenarse en alícuotas a -70° C para ser utilizados posteriormente.

### **Determinación de la concentración de proteínas presentes en los extractos**

La concentración de proteínas de los extractos se determinó mediante una modificación del ensayo de Bradford donde se incubaron durante 5 minutos 4 µL de solución proteica y 200 µL de reactivo de Bradford en placas de microtitulación. Posteriormente se determinó la absorbancia a 560 nm empleando para ello un lector de placas, y se calculó la concentración de proteínas de las muestras, empleando para ello una curva de calibración preparada con albúmina sérica bovina de concentraciones conocidas.

### **Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas presentes en el endospermo de *P. vulgaris***

La electroforesis en dos dimensiones consta de dos procedimientos de separación: en primer lugar, se separan las proteínas según su punto isoeléctrico. Este paso es llamado isoelectroenfoque (primera dimensión). Para ello se emplea un gel que contiene un gradiente de pH inmovilizado a lo largo del cual las biomoléculas migran al establecer una diferencia de potencial entre los extremos del gel, hasta alcanzar el un punto en el gel en el que el pH es tal que la carga neta de la proteína sea cero, lo cual es conocido como punto isoeléctrico de la proteína. Posteriormente se lleva a cabo una separación en base a la masa molecular de las proteínas (segunda dimensión).

## **Primera dimensión: isoelectroenfoque de las proteínas**

Para la primera dimensión se utilizaron tiras de gradiente de pH IpG de General Electric (Estados Unidos), con un rango de pH distribuido linealmente entre 3 y 10, de siete centímetros de longitud. El protocolo para el uso de estas tiras comprende tres pasos:

- *Rehidratación*: En este paso las tiras se colocaron durante 18 horas en una solución buffer DeStreak™ (GE Health Care Amersham Biosciences) que contenía urea, tiourea, detergente CHAPS, reactivo DeStreak™ y 1% de anfolitos con rango lineal de pH 3 a 10; en esta solución se disolvieron los extractos proteicos de los endospermos. En cada caso se colocó un volumen de extracto que correspondía aproximadamente a 15 µg de proteínas.
- *Equilibración*: Este paso consta de dos incubaciones de 15 minutos cada una. En la primera se incubaron las tiras en una solución de ditioneitol al 1% en buffer de equilibrio (que contenía urea, Tris-HCl, glicerol, SDS y azul de bromofenol), En la segunda las tiras se incubaron en una solución de iodoacetamida al 4% en buffer de equilibrio.
- *Enfoque*: Finalmente las tiras se colocaron en una cámara de electroforesis que estableció una diferencia de potencial entre los extremos de las tiras, para ello se utilizó el equipo Ettan IPGphor (GE Health Care Amersham Biosciences).

## **Segunda dimensión: separación en base a masa molecular**

Posteriormente se realizó la segunda electroforesis en la que las moléculas se separaron en base a su masa molecular mediante un campo eléctrico. Para ello se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% y de 1 mm de espesor; preparados en el laboratorio según el protocolo descrito por Sambrook y Russel (2001).

En la superficie de estos geles se colocaron las tiras de gradiente de pH de manera tal que entraron en contacto tira y gel. El espacio sobrante dentro del separador de vidrio se completó con agarosa al 0,1% la cual, al solidificar dentro del separador, sirvió como soporte que evitó que se separaran el gel de electroforesis de la tira de gradiente de pH.

Finalmente se realizó, la corrida electroforética para lo cual se empleó un sistema de separación vertical BioRAD (Hercules CA, Estados Unidos) y una fuente de poder que permitió establecer una diferencia de potencial entre los extremos del gel de 200 mV. Esta diferencia de potencial generó un campo electromagnético a lo largo del gel que promovió el movimiento de las moléculas de proteína cargadas.

Los geles se prepararon a partir de acrilamida, bisacrilamida, una solución amortiguadora de pH y el detergente dodecil sulfato de sodio. En una reacción catalizada por persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED). Las moléculas de acrilamida y bisacrilamida forman un entramado molecular en el que se intercalan las moléculas de acrilamida y bisacrilamida, de manera tal que se forma una especie de malla, la cual retrasa el movimiento de las proteínas de forma aproximadamente proporcional al cociente carga/masa. El detergente agregado se une a la mayoría de las proteínas de forma proporcional a la masa molecular de las mismas, aproximadamente una molécula de detergente cada dos residuos de aminoácidos. Esto trae como consecuencia la incorporación de una carga neta negativa en todas las proteínas y una pérdida parcial de la estructura tridimensional de las mismas, por lo tanto todas las biomoléculas adoptan una forma similar. En este caso los cocientes carga/masa (que determina la migración de los péptidos a lo largo del gel) de cada una de las proteínas tendrán valores similares para todas las moléculas, y será quien determine la migración de las proteínas en el gel (O'Farrel, 1975; Hames y Rickwood, 1994; Nelson y Cox, 2005).

## **Visualización de las proteínas: tinción con nitrato de plata**

Una vez realizada la segunda electroforesis los geles fueron teñidos con nitrato de plata para visualizar las proteínas. Para ello se utilizó el estuche PlusOne™ Silver Staining de Amersham (Hercules CA, Estados Unidos). El protocolo de uso de este kit comprende varias incubaciones de los geles en diferentes soluciones: en primer lugar, se realizó una incubación en solución de fijación (etanol 40%, ácido acético 10%) por 30 min, luego de la cual se incubaron los geles en solución de sensibilización (etanol 3%, glutaraldehído 125 mM, tiosulfato de sodio 220 mM, acetato de sodio 0,82 mM) durante 30 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con agua bidestilada y se procedió a incubar en solución de plata (nitrato de plata 250 mM, formaldehído 4,8 mM) por 20 min. Seguidamente se realizaron dos lavados con agua bidestilada por 1 min cada uno para retirar el exceso de plata. Por último, se sumergieron los geles en solución de revelado (carbonato de sodio 0,23 mM; formaldehído 7,5 mM) y se mantuvieron en continua agitación hasta observar la aparición de puntos en el gel, correspondientes cada uno a una proteína, momento en el cual se agregó la solución de paro (EDTA-Na 2H<sub>2</sub>O 0,039 mM) para detener el revelado.

## **Análisis de los patrones electroforéticos**

Una vez teñidos los geles, se llevó a cabo un análisis comparativo de los mismos, para ello se fotografiaron con un equipo Perkin Elmer (Waltham MA, Estados Unidos) modelo ProXCISION. Las imágenes digitales obtenidas fueron analizadas empleando el programa Phoretix 2D versión 2004. Este programa, mediante la comparación de imágenes digitales de los diversos geles, permitió analizar los geles de electroforesis bidimensionales de los granos y determinar la presencia de *spots* comunes y no comunes para cada variedad de *P. vulgaris*. El análisis comparativo de las imágenes de los geles se realizó tomando como patrones de

referencia las imágenes de las variedades Tacarigua y Tenerife, que resultaron las variedades comerciales con mayor y menor toxicidad respectivamente.

Se utilizaron valores teóricos de punto isoeléctrico y masa molecular como criterios que permitieron ubicar las zonas de las imágenes de los geles donde se ubicarían las proteínas con actividad insecticida. Para ello se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las tres proteínas de interés (arcelina, fitohemaglutinina e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa) mediante una búsqueda en la base de datos de proteínas *Swiss Prot* y con esta información se calcularon los valores de masa molecular y pI empleando para esto un software disponible en la página de la misma base de datos.

## Resultados

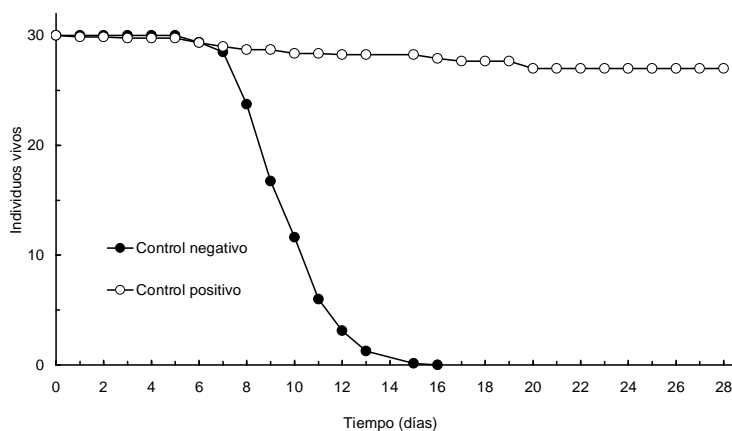
Se muestran a continuación los resultados obtenidos, en primer lugar los resultados del bioensayo de toxicidad y seguidamente los resultados correspondientes al trabajo con la proteómica comparativa de las semillas.

### ***Bioensayo del gorgojo de arroz***

El bioensayo del gorgojo de arroz fue utilizado como herramienta para estimar el grado de toxicidad del endospermo de las semillas de las ocho variedades de caraotas estudiadas, utilizando tres biomarcadores: la supervivencia, la variación de peso y el tiempo de supervivencia media.

### **Supervivencia**

La Figura 1 muestra la supervivencia de los insectos en los controles del bioensayo: el control negativo (insectos mantenidos en ayuno) y el control positivo (insectos alimentados con arvejas), puede verse que alrededor del día 6 comenzó a disminuir la cantidad de individuos vivos en el control negativo y que para el día 16 todos los insectos habían muerto en este tratamiento. Por otra parte no se observó una disminución importante en el tamaño poblacional de los insectos en arvejas a lo largo de todo el bioensayo.



**Figura 1: Supervivencia del gorgojo de arroz en los controles del bioensayo.**

En el control Positivo (n=7) los insectos fueron alimentados con arvejas verdes peladas y partidas; mientras que, en el control negativo (n=4) los insectos fueron privados de alimento.

En la figura 2 se muestran las curvas de supervivencia de *S. oryzae* en los distintos tratamientos. Todas las curvas de supervivencia describen una forma sigmoideal invertida, es decir tienen una forma similar a una “S” invertida: donde inicialmente la pendiente de las curva se mantiene relativamente estable y cercana a cero, y luego la curva describe una caída bastante marcada hasta alcanzar un nuevo punto cerca del límite inferior donde la pendiente pareciera nuevamente cambia a un valor nuevamente cercano a cero.

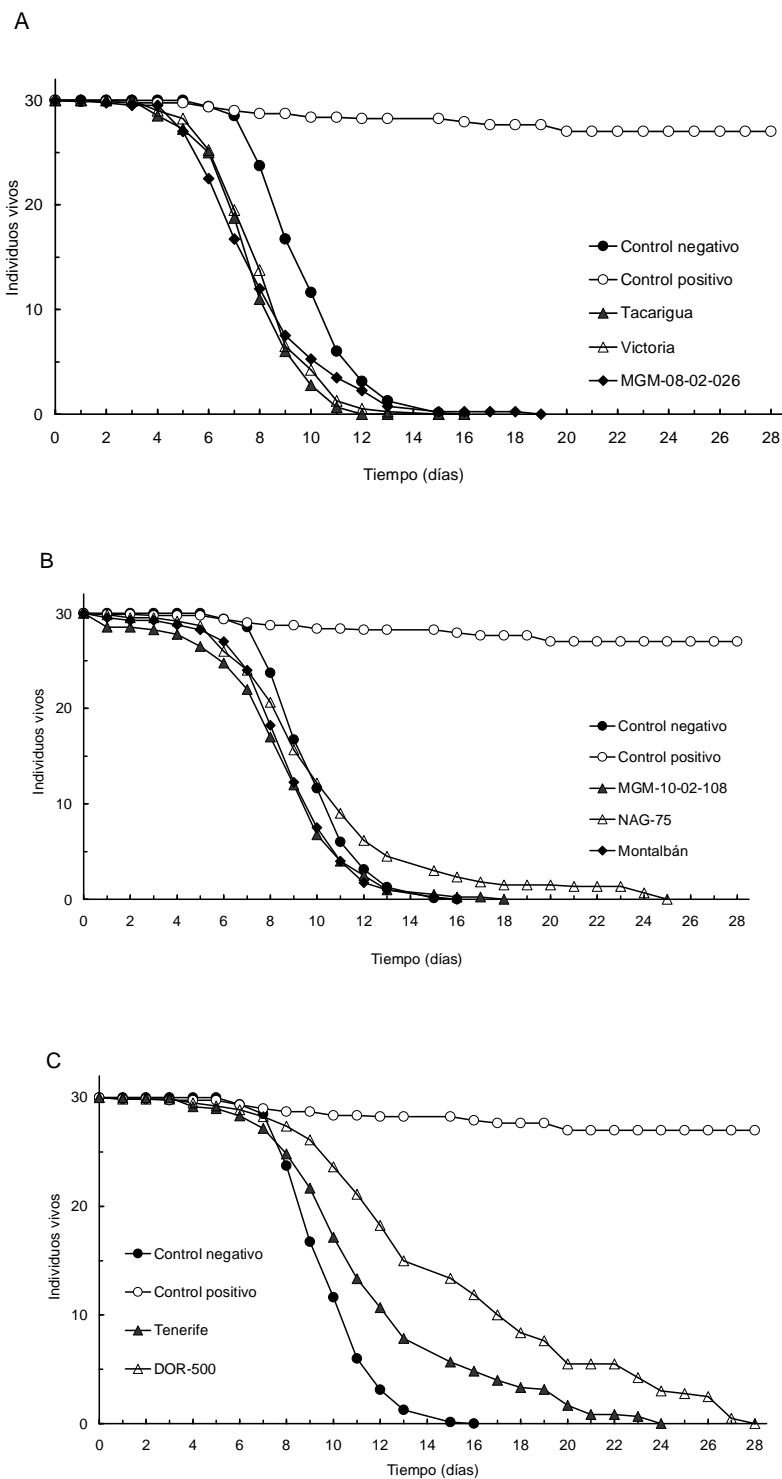
Las variedades Tacarigua, Victoria, MGM-08-02-026, MGM-10-02-108 y Montalbán produjeron una mortalidad mayor a la del control negativo, al observar las curvas de supervivencia de estas variedades (Figuras 2A y 2B) y compararlas con la curva del control negativo (Figura 1) puede verse que todas presentaron una forma sigmoidea invertida similar, pero en el caso de las curvas de las dietas las curvas se encuentran desplazadas hacia la izquierda con respecto a la curva del control; este grupo de curvas puede dividirse a la vez en dos subgrupos, uno que correspondería a las variedades Tacarigua, Victoria y MGM-08-02-026 las cuales presentaron curvas más desplazadas hacia la izquierda (Figura 2A) y un segundo



subgrupo en el que se incluirían las variedades Montalbán y MGM-10-02-108 y que presentan un menor desplazamiento hacia la izquierda (Figura 2B).

La curva de supervivencia de la variedad NAG-75 no mostró ningún desplazamiento con respecto a la curva de supervivencia del control negativo, pero mostró una pendiente menor en la región de la curva que describe el descenso en el tamaño poblacional, en comparación con la región misma de la curva correspondiente al control (Figura 2 B).

Se observó un tercer grupo de curvas correspondientes a las variedades Tenerife y DOR-500, estas presentan igualmente una forma sigmoïdal pero desplazadas hacia a la derecha con respecto a la curva de supervivencia del control negativo; por otro lado las zonas de las curvas que describen el descenso en el tamaño de la población presentaron una pendiente menor en comparación con su equivalente en la región de la curva de supervivencia del control negativo lo que implica que la disminución en el tamaño poblacional ocurre a una velocidad menor a la que se observó para el ayuno (Figura 2C).

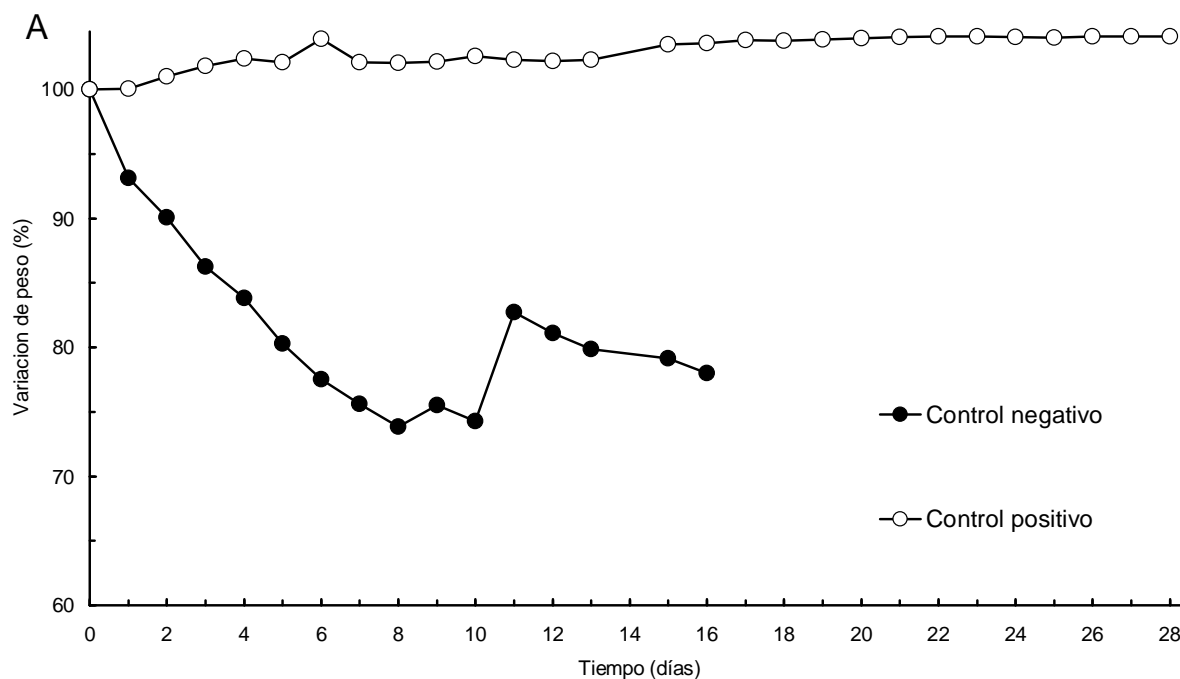


**Figura 2: Supervivencia del gorgojo de arroz alimentado con el endospermo de las semillas de diferentes variedades de *P. vulgaris*.**

Las curvas de supervivencia de los controles: positivo y negativo (Figura 1) se muestran con fines comparativos. El número de réplicas fue diferente en cada variedad: Tacarigua y Victoria (n=3), MGM-08-02-026, MGM-10-02-108 y Montalbán (n=4), Tenerife (n=6), NAG-75 y DOR-500 (n=8).

## Variación de peso

En todos los tratamientos se observó una disminución en el peso de los insectos, en ninguno de los casos esta disminución fue tan marcada como la descrita por el ayuno. La Figura 3 muestra las variaciones de peso (en porcentaje) de los insectos con los controles del bioensayo. Pudo verse claramente que para el control positivo hubo un ligero aumento en la masa corporal de los insectos, alrededor de 4 % por encima del valor inicial y se mantuvo constante durante todo el bioensayo. Por otra parte se observó una disminución en la masa corporal de los insectos en el control negativo (ayuno) de 21,9% por debajo del valor del valor inicial de peso.

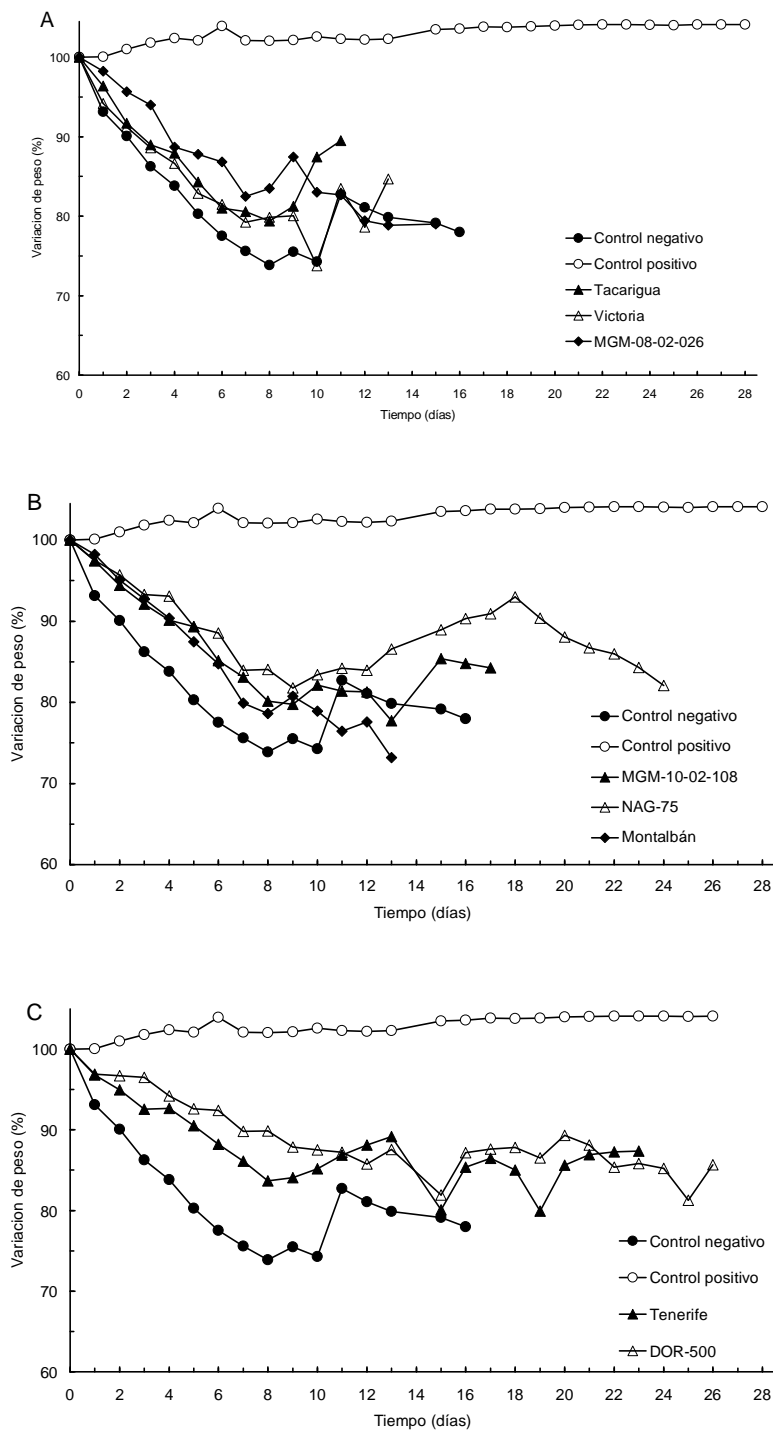


**Figura 3: Variación de peso del gorgojo de arroz en los controles del bioensayo**

En el control Positivo (n=7) los insectos fueron alimentados con arvejas verdes peladas y partidas; mientras que, en el control negativo (n=4) los insectos fueron privados de alimento.

La disminución de peso más fuerte se observó en los insectos alimentados con las semillas Tacarigua, Victoria y MGM-08-02-026, (Figura 4A). En segundo lugar en los gorgojos alimentados con las variedades NAG-75, MGM-10-02-108 y Montalbán se produjo una disminución en la masa corporal de los insectos (Figura 2 B), pero en este caso el descenso no fue tan marcado como en el grupo anterior. Finalmente, las dietas Tenerife y DOR-500 (Figura 2 C) muestran una disminución en la masa corporal de los insectos considerablemente menor en comparación con el resto de los tratamientos.

Varios investigadores (Carmona y col., 1998; Lovera, 2008) han descrito que el efecto de los componentes de la dieta experimental sobre los insectos se observan en el día ocho. Analizando los valores de variación de peso obtenido en los diferentes bioensayos para el día ocho, es posible agrupar nuevamente las semillas en dos grupos: Tacarigua, Victoria, MGM-08-02-026 y Montalbán con una masa corporal por debajo de 80% del valor inicial; y un segundo grupo que incluye las semillas MGM-10-02-108, NAG-75 Tenerife y DOR-500 las cuales presentaron valores por encima del 80%. El valor más bajo registrado para este día corresponde a la variedad Montalbán (78,6%) y el más alto se observó en la variedad DOR-500 (89,9%). El control negativo (ayuno) mostró una variación de peso de 73,9% por debajo del valor inicial para el día ocho.



**Figura 4: Variación de peso del gorgojo de arroz alimentado con el endospermo de semillas de diferentes variedades de *P. vulgaris***

Las curvas de variación de peso de los controles: positivo y negativo (Figura 3) se muestran con fines comparativos. El número de réplicas fue diferente en cada variedad: Tacarigua y Victoria (n=3), MGM-08-02-026, MGM-10-02-108 y Montalbán (n=4), Tenerife (n=6), NAG-75 y DOR-500 (n=8).

## Tiempo de supervivencia media

El tiempo de supervivencia media (TSM) corresponde al tiempo en días en que sobrevive la mitad de una población sometida a una dieta experimental (Carmona y col., 1998), este biomarcador es de gran ayuda en el análisis y comparación de curvas de supervivencia, ya que es más sencillo analizar los valores de TSM de las dietas ya que estos son números puntuales y no toda una curva lo que simplifica el trabajo.

Se obtuvo un tiempo de supervivencia media de  $9,44 \pm 0,81$  días para el control negativo, y extrapolando los puntos de la curva de supervivencia del control positivo (Figura 1) se estimó un tiempo de supervivencia media de 156 días para el control positivo. Para las dietas experimentales se obtuvieron tres grupos de valores de TSM: semillas que produjeron un TSM menor al del control negativo, valores iguales a los del control negativo y TSM mayores a los del control negativo. La existencia de estos tres grupos pudo validarse mediante una prueba estadística, la cual arrojó como resultado la existencia de dos grupos de semillas con valores de TSM estadísticamente significativos un grupo que no presentó diferencias significativas con respecto al control negativo.

Los tiempos de supervivencia media obtenidos en el bioensayo con el gorgojo de arroz se resumen en la Tabla 1, mostrada a continuación.

**Tabla 1: Tiempos de supervivencia media del gorgojo de arroz alimentado con el endospermo de las semillas de ocho variedades de *P. vulgaris*.**

Tratamiento	n	Tiempo de Supervivencia
		Media (Días)
Control negativo	4	9,44 ± 0,81
Tacarigua	3	7,30 ± 0,20*
Victoria	3	7,45 ± 0,37*
MGM-08-02-026	4	7,50 ± 0,40*
MGM-10-02-108	4	8,52 ± 0,89
Montalbán	4	8,58 ± 0,08
NAG-75	8	9,44 ± 1,67
Tenerife	6	10,88 ± 0,65*
DOR-500	8	13,98 ± 2,02*

\*Significativamente diferente del control negativo (prueba t de Student,  $p < 0,05$ ).

### ***Proteómica comparativa***

En las electroforesis en dos dimensiones de todas las variedades de *P. vulgaris*, pudo verse claramente el *spot* de la phaseolina, una proteína de almacenamiento de unos 50 kDa y punto isoeléctrico ácido; que corresponde a poco más del 50% del total de proteínas de las semillas (Osborn y col., 1988) y es un control interno para las electroforesis en dos dimensiones de este grano. En los análisis comparativos, se observaron similitudes entre todas las variedades; no sólo destaca la presencia de la phaseolina en todas las electroforesis, sino que también se observa un grupo de proteínas comunes, estas se ubican en regiones de los geles cercanas a la phaseolina con masas moleculares ligeramente superiores a la de 50 kDa y en general punto isoeléctrico ácido. Estos *spots* deben corresponder a proteínas cuyas funciones son esenciales para las semillas, por lo que son comunes a todas las semillas. Por otra parte se observan ciertas diferencias al centrar la atención en las regiones del gel que deberían contener las proteínas con actividad insecticida.

Los valores teóricos de punto isoelectrico y masa molecular que sirvieron para establecer los intervalos que delimitaron las zonas de los geles donde se ubicarían probablemente las proteínas con actividad insecticida se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2: Valores teóricos de punto isoelectrico y masa molecular de las proteínas con actividad insecticida presentes en el endospermo de semillas de leguminosas.**

Proteína	Masa molecular (kDa)	Punto isoelectrico	Color con que se muestra en las imágenes de los geles
Fitohemaglutinina	28-32	4,7-5,2	Verde
Inhibidores de $\alpha$ -amilasa	26-29	4,9-5,3	Azul
Arcelina	30-38	5,6-6,2	Rojo

Los valores de punto isoelectrico y masa molecular mostrados en esta tabla se calcularon empleando para ello las secuencias de aminoácidos de las proteínas obtenidas de la base de datos *Swiss Prot*, posteriormente se realizó un calculo teórico de los valores de pI y MM empleando para ello un programa disponible en la página de la base de datos *Swiss Prot*.

En la variedad Tacarigua se observaron un total de 79 *spots*, tres de los cuales se encuentran en el rango de masa molecular y pH característico de la fitohemaglutinina, tres en el rango de las arcelinas y cinco en el rango correspondiente a los inhibidores de alfa amilasa (Figura 5). Por ser esta la variedad comercial que presentó un tiempo de supervivencia media mas bajo ( $7,30 \pm 0,20$  días) se utilizó como patrón de referencia para realizar el análisis comparativo de los geles, y se determinó la presencia de *spots* comunes en las electroforesis de las otras variedades de caraotas con respecto a la variedad Tacarigua. La Figura 5 muestra la imagen de la electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua, se destacan los *spots* comunes entre esta variedad y la variedad Tenerife (Figura 5 A), la cual mostró uno de los tiempos de supervivencia media más altos. Se incluye en esta figura la imagen de la electroforesis en dos dimensiones de la variedad Tenerife con fines comparativos (Figura 5 B). Ya que la variedad Tenerife fue la variedad comercial que mostró un tiempo de



supervivencia media más alto ( $10,88 \pm 0,65$  días), se utilizó esta variedad como patrón de referencia para realizar un segundo análisis comparativo, de igual manera en este caso se determinó la presencia de *spots* comunes entre las distintas variedades con respecto a la variedad Tenerife.

La variedad Victoria mostró un total de 54 *spots*, de los cuales cuatro se encuentran en el rango correspondiente a la fitohemaglutinina y seis en la región del gel donde se esperaría encontrar la arcelina, no se observan proteínas en el intervalo correspondiente a inhibidores de  $\alpha$ -amilasa (Figura 6). Se observaron 27 *spots* comunes a la variedad Tacarigua (Figura 6 A), y 12 con la variedad Tenerife (Figura 6 C).

Se observaron 66 *spots* en los geles de electroforesis bidimensional de la variedad MGM-08-02-026 (Figura 7), de los cuales 21 son comunes con la variedad Tacarigua (Figura 7A) y 6 con la variedad Tenerife (Figura 7C). Se encontraron *spots* en las regiones del gel que corresponden a las proteínas con actividad insecticida: tres para la región correspondiente a arcelina, cinco para la correspondiente a inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y dos en la región donde se ubicaría la fitohemaglutinina (Figura 7).

Las semillas de la variedad MGM-10-02-108 mostraron un total de 84 *spots* en las electroforesis en dos dimensiones, se encontraron un total de cinco *spots* en la región del gel donde se ubicaría la arcelina, dos para la correspondiente a fitohemaglutinina y tres en la región de los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa (Figura 8). Del total de *spots* observados en los geles de electroforesis se observaron 18 comunes con la variedad Tacarigua (Figura 8A) y seis comunes con la variedad Tenerife (Figura 8C).

Para la variedad NAG-75 se registraron 24 *spots*, esta fue la variedad que mostró la menor cantidad de *spots* en comparación con el resto de las semillas. Sólo se observaron dos

*spots* en la región del gel donde se ubicaría la arcelina y cuatro en la región correspondiente a la fitohemaglutinina (Figura 9). Se encontraron 15 *spots* comunes con la variedad Tacarigua (Figura 9 A) y siete con la variedad Tenerife (Figura 9 C).

La variedad Montalbán mostró 72 *spots* en total, se observaron dos *spots* en la región del gel correspondientes a los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, tres para la fitohemaglutinina, y cuatro *spots* en la región correspondiente a la arcelina (Figura 10). Se registraron 15 *spots* comunes con la variedad Tacarigua (Figura 10 A) y 20 comunes con la variedad Tenerife (Figura 10 C).

En la variedad Tenerife se observaron un total de 49 *spots*, solo se encontraron proteínas en los rangos de masa molecular y pH correspondientes a la fitohemaglutinina e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, cuatro en cada caso (Figura 11). Se encontraron 10 *spots* comunes con la variedad Tacarigua (Figura 11 A).

Finalmente para la variedad DOR-500 se registraron un total de 70 *spots*, en todas las regiones del gel correspondientes a las proteínas de interés se observaron *spots*: tres para arcelina e inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, cuatro en la región que corresponde a fitohemaglutinina y uno en la región correspondiente a inhibidores de  $\alpha$ -amilasa (Figura 12). Se observaron 36 *spots* comunes con la variedad Tacarigua (Figura 12 A) y 20 comunes con la variedad Tenerife (Figura 12 C).

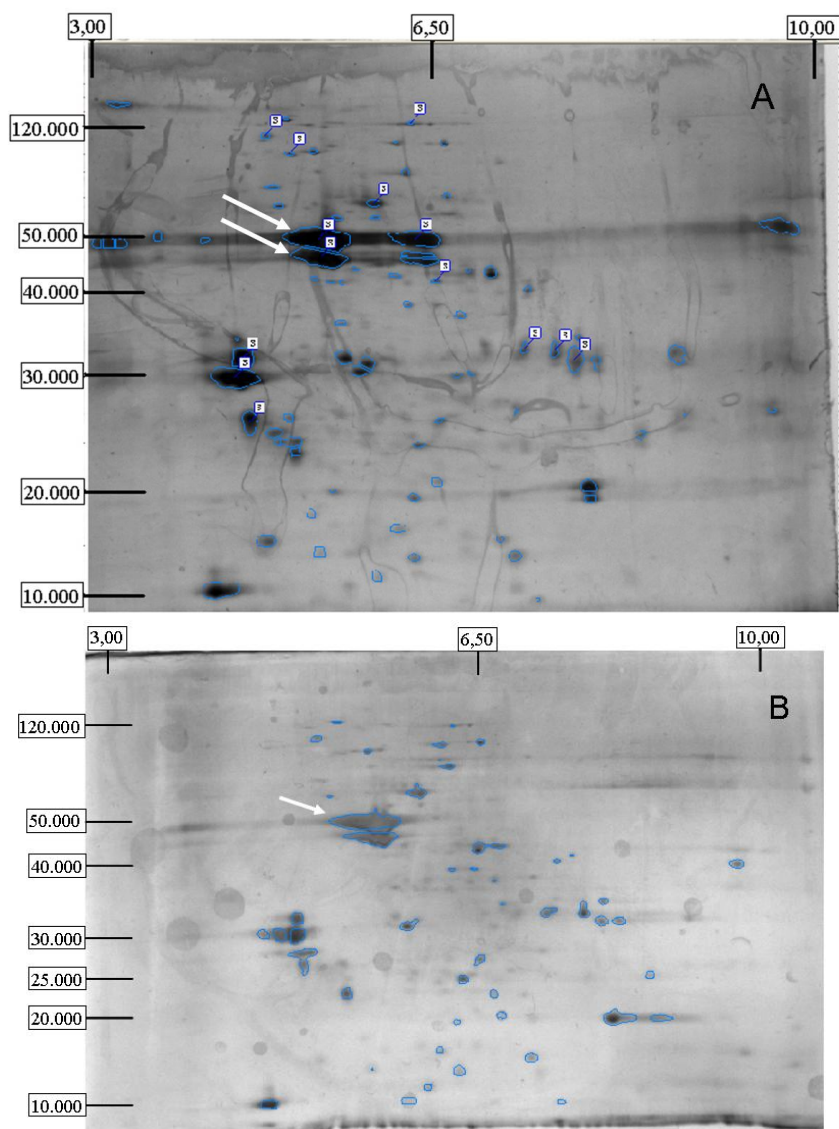
La cantidad de *spots* observados en las regiones de interés en los geles de electroforesis bidimensional se resumen en la Tabla 3 mostrada a continuación. La Tabla 4 resume el análisis comparativo de los geles, mostrando la cantidad de *spots* comunes entre todas las variedades con las dos variedades de referencia.

**Tabla 3: Resumen análisis comparativo de las imágenes de las electroforesis bidimensionales**

<b>Variedad</b>	<b>Arcelina (número de spots)</b>	<b>Fitohemaglutinina (número de spots)</b>	<b>Inhibidores de <math>\alpha</math>-amilasa (número de spots)</b>
Tacarigua	4	3	5
Victoria	6	4	0
MGM-08-02-026	3	2	5
MGM-10-02-108	5	2	3
NAG-75	2	4	1
Montalbán	4	3	2
Tenerife	4	6	6
DOR-500	3	4	3

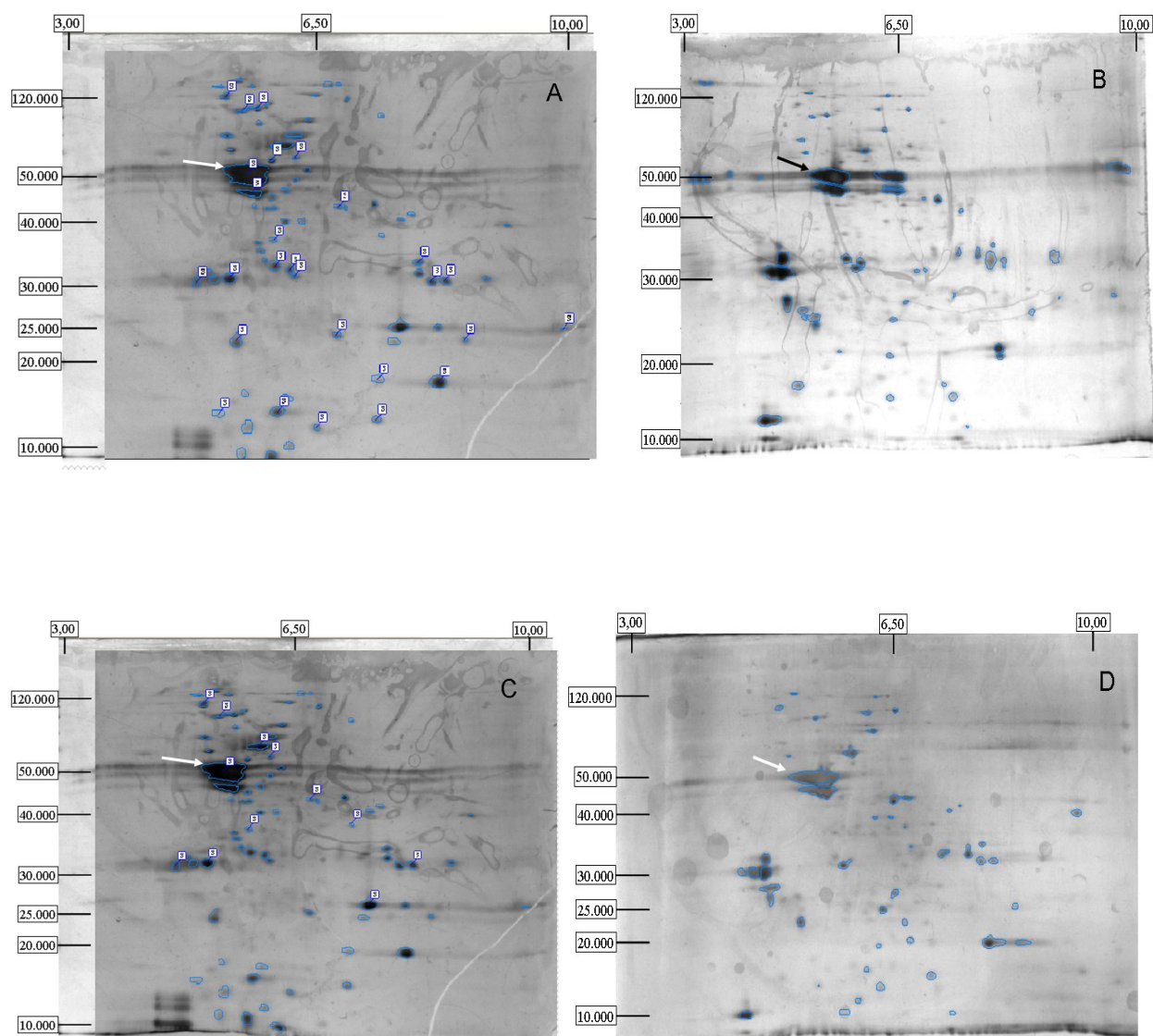
**Tabla 4: Resumen análisis comparativo de las electroforesis en dos dimensiones.**

<b>Variedad</b>	<b>Total de spots observados</b>	<b>Spots comunes con la variedad Tacarigua</b>	<b>Spots comunes con la variedad Tenerife</b>
Tacarigua	79	-	10
Victoria	54	27	12
MGM-08-02-026	66	21	6
MGM-10-02-108	84	18	6
NAG-75	24	15	7
Montalbán	72	15	20
Tenerife	49	10	-
DOR-500	70	36	20



**Figura 5: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad Tacarigua.**

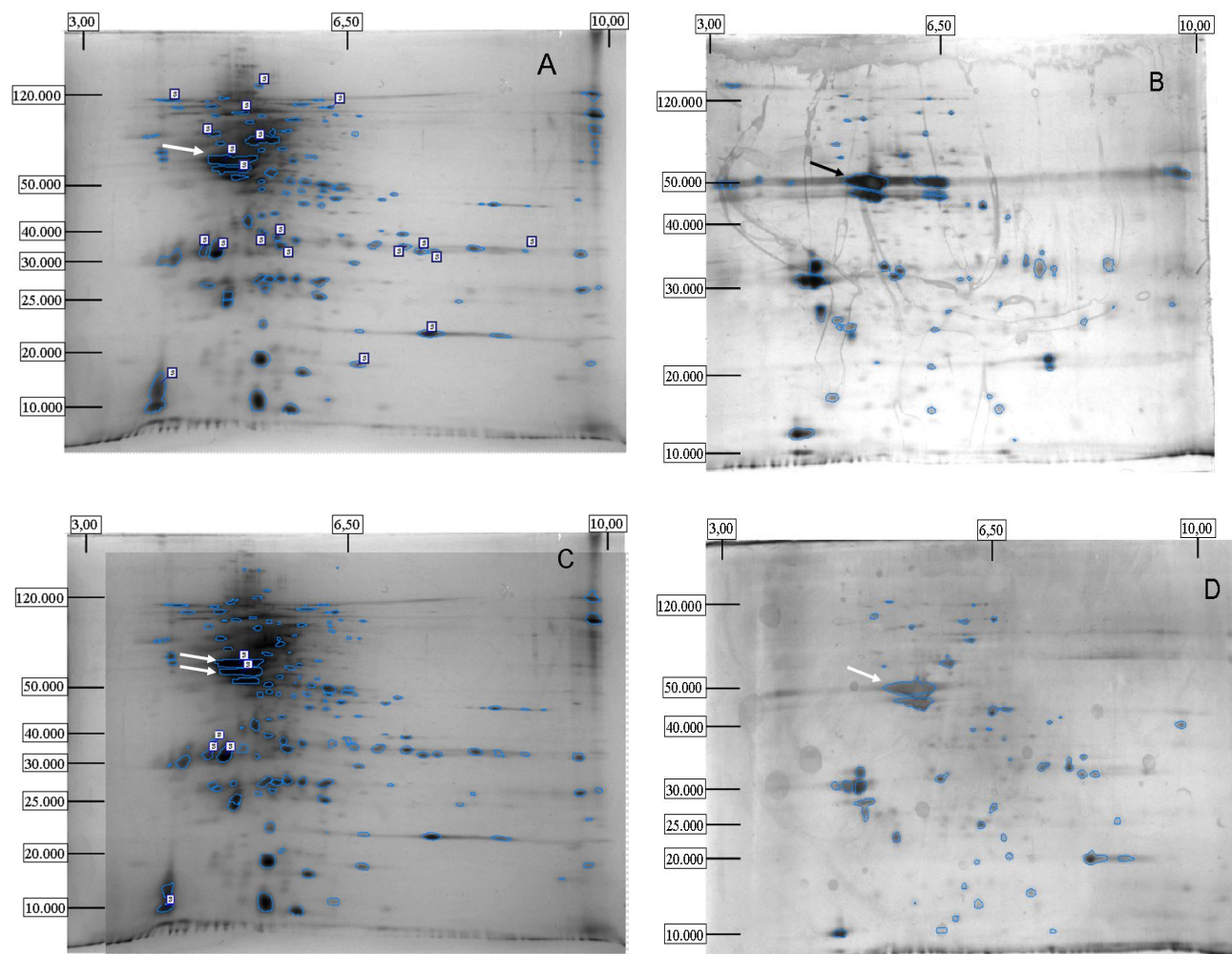
A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad Tacarigua y la variedad Tenerife; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife. En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En ambas imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.



**Figura 6: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad Victoria.**

A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad Victoria y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua; C: Muestra los *spots* comunes entre la variedad Victoria y la variedad Tenerife; D: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife

En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En todas las imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.

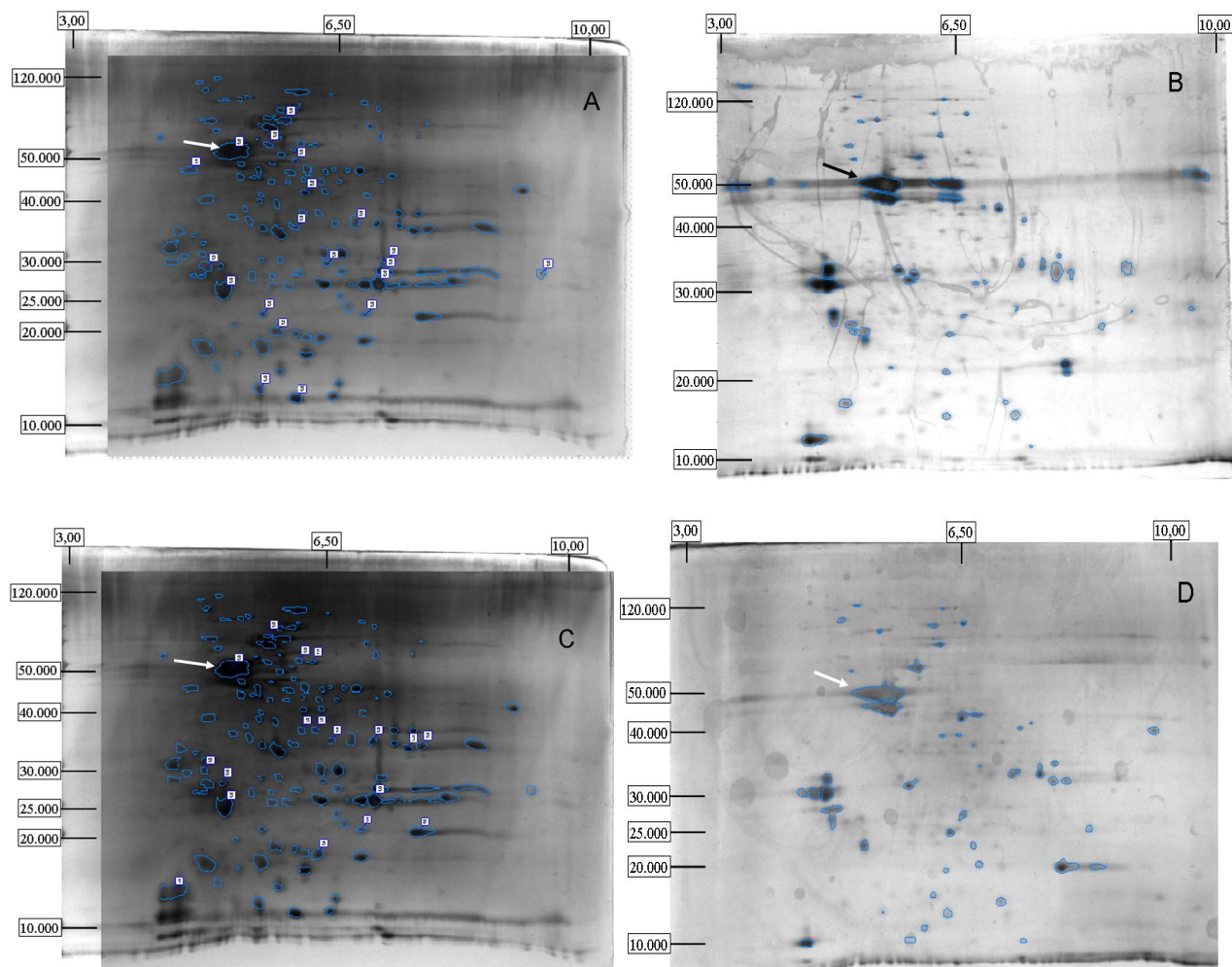


**Figura 7: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad MGM-08-02-026.**

A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad MGM-08-02-026 y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua; C: Muestra los *spots* comunes entre la variedad MGM-08-02-026 y la variedad Tenerife; D: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife

En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En todas las imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.

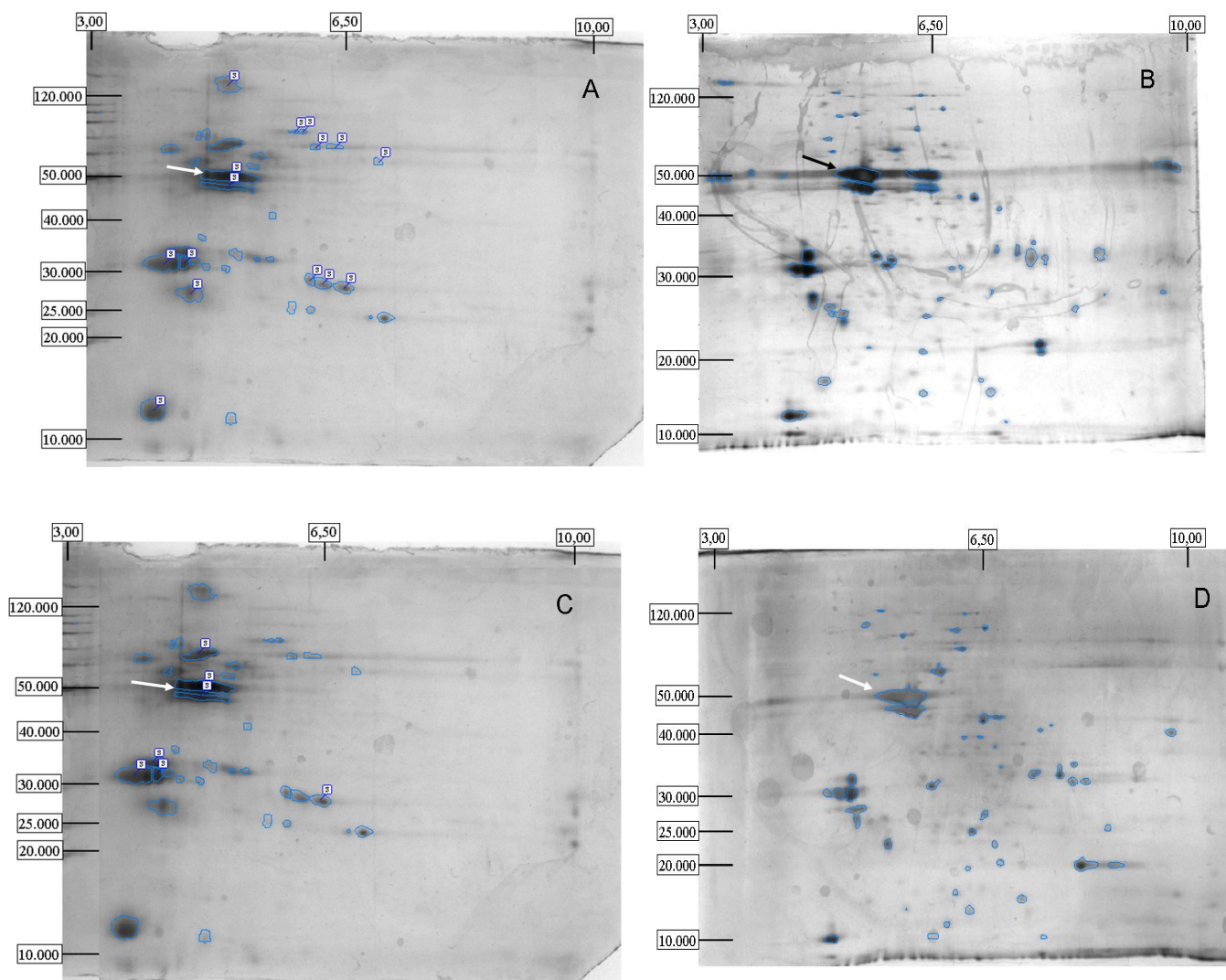




**Figura 8: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad MGM-10-02-108.**

A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad MGM-10-02-108 y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua; C: Muestra los *spots* comunes entre la variedad MGM-10-02-108 y la variedad Tenerife; D: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife

En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En todas las imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.

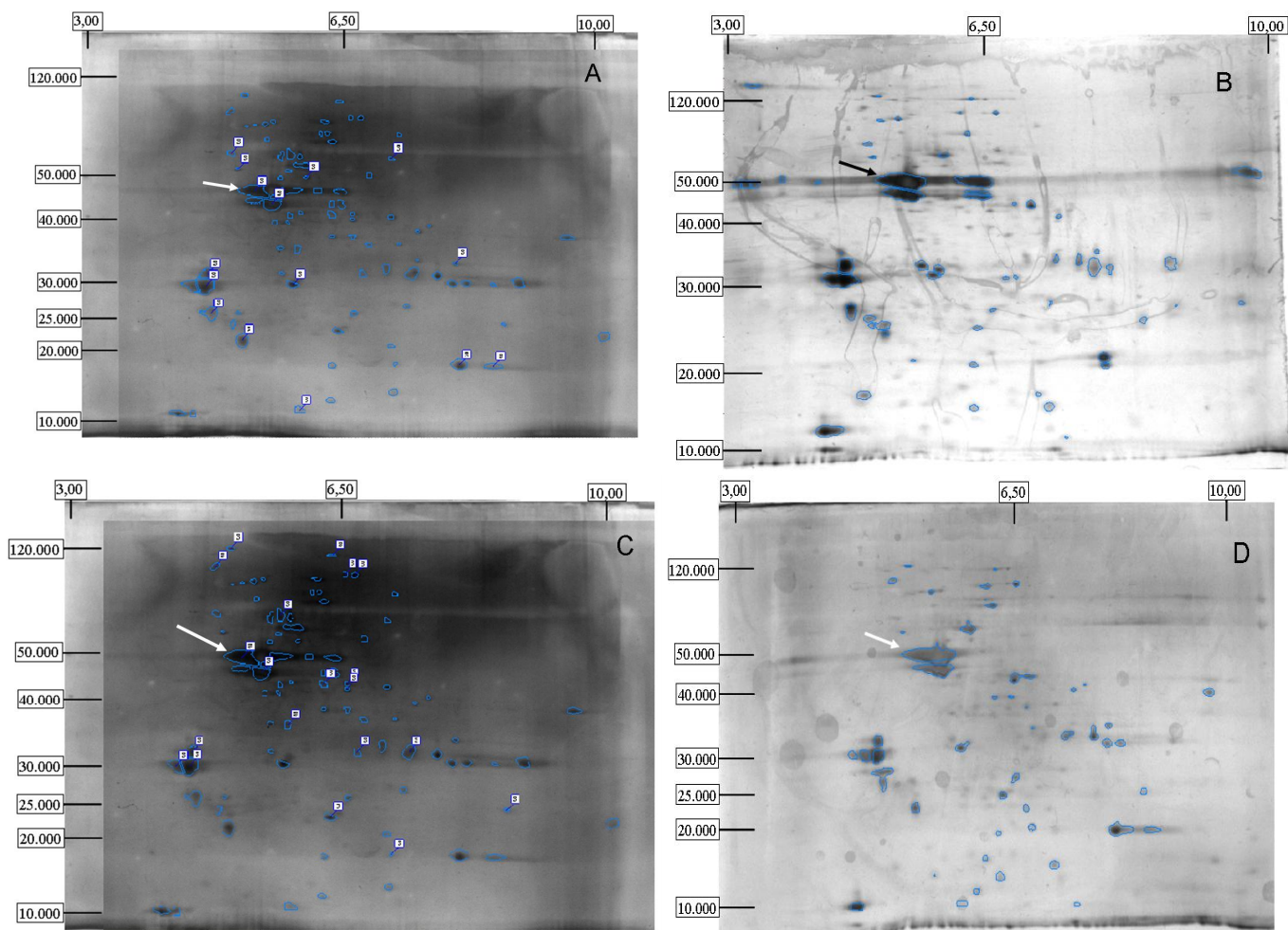


**Figura 9: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad NAG-75.**

A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad NAG-75 y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua; C: Muestra los *spots* comunes entre la variedad NAG-75 y la variedad Tenerife; D: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife

En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En todas las imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.

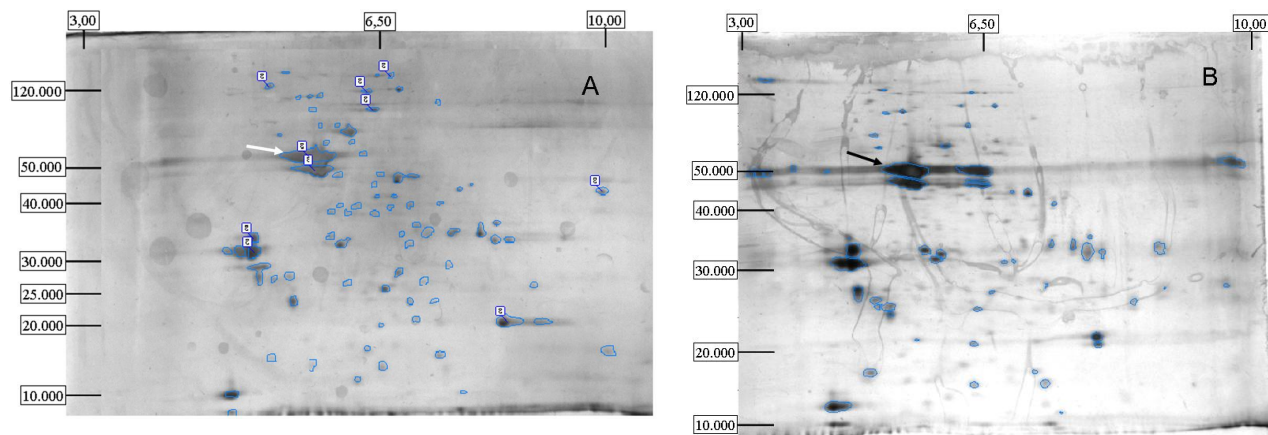




**Figura 10: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad Montalbán.**

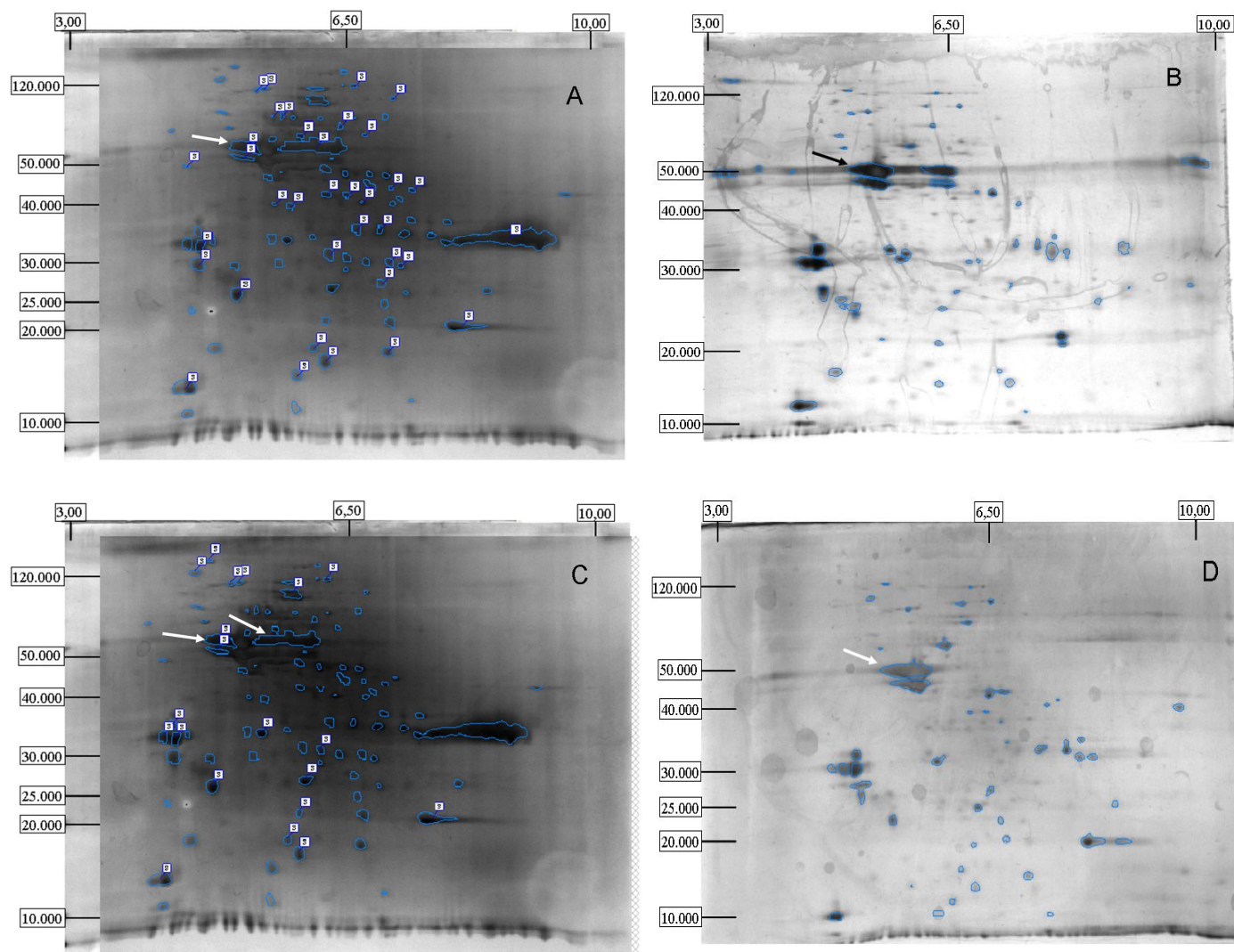
A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad Montalbán y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua; C: Muestra los *spots* comunes entre la variedad Montalbán y la variedad Tenerife; D: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife

En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En todas las imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.



**Figura 11: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad Tenerife.**

A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad Tenerife y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua. En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En ambas imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.



**Figura 12: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas extraídas del endospermo de semillas de *P. vulgaris*; variedad DOR-500.**

A: Muestra los *spots* comunes entre la variedad DOR-500 y la variedad Tacarigua; B: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tacarigua; C: Muestra los *spots* comunes entre la variedad DOR-500 y la variedad Tenerife; D: Electroforesis en dos dimensiones de las proteínas del endospermo de la variedad Tenerife

En la parte superior de cada panel se muestra la escala de pH y en el lado izquierdo la escala de masa molecular (en Da). En todas las imágenes la flecha muestra el *spot* que corresponde a la phaseolina.

## Discusión

A través de las curvas de supervivencia fue posible observar de forma sencilla la respuesta de los insectos a las dietas, determinar el efecto de esta sobre la supervivencia y finalmente comparar tratamientos entre si mediante la comparación de los gráficos. La respuesta de los gorgojos a los controles se fue similar a la reportada en la literatura: para el control positivo (insectos alimentados con arvejas) no se observó una disminución considerable en el tamaño poblacional a lo largo del bioensayo, mientras que para el control negativo (insectos mantenidos en ayuno) se registró una disminución en la cantidad de insectos vivos a partir del día seis; estudios previos han demostrado que para este día que incrementa la tasa de mortalidad de *S. oryzae* mantenido en ayuno (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Rojas, 1997; Lovera, 2008). La muerte de todos los insectos del control negativo se alcanzó el día 16, resultado similar al obtenido por Szwarcbort en 1980.

En la Figura 2 puede verse que todas las dietas experimentales provocaron la muerte de los insectos y que todas las curvas de supervivencia describen comportamientos similares, donde el efecto de las semillas comienza a registrarse como una disminución en el tamaño poblacional aproximadamente después del día seis. Esto se debe a que *S. oryzae* presenta un buche en el que puede almacenar alimento hasta por tres días por lo que una vez que los insectos son colocados en el alimento probablemente estos no lo consuman sino hasta vaciar su buche, lo que produce ese aparente retardo en el efecto de las dietas sobre los insectos (Carmona y Casotto, 2001).

En base a las características de las curvas de supervivencia con respecto a la curva de supervivencia del control negativo fue posible agrupar las distintas variedades de semillas de *P. vulgaris* en tres grupos: el primero, aquellas semillas que mostraron curvas de supervivencia desplazadas hacia la izquierda con respecto a la curva del control negativo (Tacarigua, Victoria,

MGM-08-02-026, MGM-10-02-108 y Montalbán); el segundo lo incluye solamente a la variedad NAG-75 cuya curva de supervivencia no mostró desplazamiento alguno con respecto a la del control negativo pero pudo verse que la pendiente de la curva de supervivencia para esta variedad fue diferente a la del control negativo; y un tercer grupo de semillas que mostraron curvas de supervivencia similares a la del control negativo pero desplazadas hacia la derecha con respecto a la curva de supervivencia del control (variedades Tenerife y DOR-500).

Las curvas de variación de peso son otra herramienta útil en los estudios de toxicidad, en presencia de una dieta tóxica se ha registrado junto a la mortalidad una disminución en la masa corporal de los insectos, por lo que este parámetro también puede ser utilizado para confirmar la toxicidad de una dieta (Carmona y col., 1998). Comparando las curvas de variación de peso de un tratamiento con las del control negativo (ayuno) es posible saber si la mortalidad se debe al tratamiento o no, ya que las variaciones de peso serán distintas en cada caso, siendo máximas en el control negativo debido a la privación completa de alimento mientras que en las dieta tóxicas se registrará disminución en el peso pero no tan marcada como en el control negativo.

Trabajos previos han demostrado que algunas lectinas de plantas tienen efectos tóxicos sobre insectos de distintas familias (se ha registrado toxicidad en insectos de los ordenes Coleoptera, Homoptera y Lepidoptera). Estas proteínas presentan dominios que les permiten interactuar con las células del tracto digestivo de los insectos: la fitohemaglutinina tiene regiones que le permiten unirse a las células del epitelio intestinal o células del “borde de cepillo”, mientras que la arcelina presenta dominios que le permiten unirse a la membrana peritrófica del tracto gastrointestinal de los insectos (Chrispeels y Raikhel, 1991 y Paes y col., 2000). Levy-Benshimol y col. (1998) demostraron que las lectinas de *P. vulgaris* inhiben la absorción y transporte de glucosa y el metabolismo de carbohidratos en el intestino de ratas. Estas proteínas

tienen dominios que les permiten interactuar con moléculas que participan en el proceso de digestión de los insectos; en este caso las lectinas actúan como inhibidores de enzimas digestivas por lo que el proceso de digestión de los alimentos se ve afectado por la acción de las proteínas con actividad insecticida (Chrispeels y Raikhel, 1991). Esto se traduce en una disminución en la masa corporal de los insectos (Huesing y col., 1991 y Kjemtrup y col., 1995). Los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados en la literatura, se ha registrado una disminución apreciable en la masa corporal de los insectos cuando estos son alimentados con dietas que contienen arcelina (Velten y col., 2007)

Nuevamente las distintas variedades de *P. vulgaris* pueden clasificarse en tres grupos en base al comportamiento de las curvas de variación de peso con respecto a la curva de variación de peso del control negativo. Un primer grupo cuyas curvas de variación presentan una pendiente similar a la del control negativo, y donde se observa una disminución pero no tan marcada como la de este último (variedades Tacarigua, Victoria y MGM-08-02-026), un segundo grupo en el que la disminución de peso es menor a la descrita por el ayuno pero ligeramente por encima del grupo mencionado anteriormente (variedades MGM-10-02-108, Montalbán y NAG-75), y finalmente un grupo en el que la disminución de peso es considerablemente menor a la observada en el resto de las semillas (variedades Tenerife y DOR-500). Puede verse que las variedades que produjeron menor supervivencia de los gorgojos (Figura 2A) presentaron también una mayor disminución de peso de los mismos (Figura 3A) y que conforme aumenta la supervivencia de los insectos en las diferentes dietas (Figuras 2B y 2C), la disminución de peso se hace cada vez menor (Figuras 3B y 3C).

Si bien se observa una aparente recuperación de masa corporal en los tratamientos MGM-08-02-026, Tacarigua, Victoria, NAG-75, MGM-10-02-108, DOR-500, esta puede

deberse a que los últimos días del experimento sobrevivían pocos insectos en cada uno de estos tratamientos, los cuales tenían un tamaño corporal mayor al tamaño promedio de los insectos colocados el primer día. Esto se evidencia al analizar conjuntamente las curvas de variación de peso junto con las curvas de supervivencia de estos tratamientos, los últimos días del bioensayo sobreviven pocos individuos de tamaño ligeramente mayor al tamaño promedio de los gorgojos colocados inicialmente. Una vez que la mayoría de los insectos ha muerto y solo quedan los organismos de mayor tamaño el peso promedio de los insectos será aparentemente mayor en relación con el resto de los individuos, por lo tanto se observa ese aparente aumento en la masa corporal de los gorgojos.

A partir de las curvas de supervivencia se obtuvo el biomarcador tiempo de supervivencia media (TSM), el cual permitió estimar la toxicidad de las dietas. Este biomarcador permite analizar y comparar de manera sencilla el efecto de distintas dietas sobre los insectos. La comparación y análisis estadístico de números discretos como los valores de TSM en este caso, es un proceso mucho más sencillo que la comparación y análisis estadístico de curvas, por lo que el TSM representa una buena opción en el estudio de los efectos de diferentes dietas debido a las facilidades que ofrece al trabajar con él.

Para el control negativo se obtuvo un tiempo de supervivencia media de 9,44 días, ligeramente por menor a los reportados por Gómez-Sotillo (1997) de 12 días y Rojas (1997) de 10 días. Las variaciones en los tiempos de supervivencia media de el control negativo en este tipo de bioensayos pueden deberse a diversos factores, que van desde factores ambientales, como época del año hasta mortalidad generada por la manipulación constante de los insectos. Por otro lado el tiempo de supervivencia media para el control positivo de 156 días se asemeja a valores presentados en trabajos previos, como el de Carmona y Gómez-Sotillo (1997) quienes

obtuvieron un TSM para insectos alimentados con arvejas de aproximadamente 4 meses (por encima de los 120 días).

Los tiempos de supervivencia media permitieron clasificar las semillas en tres grupos: semillas con TSM menores al control negativo, que fueron las semillas que presentaron semillas con TSM iguales al TSM del control negativo y semillas con TSM superiores al TSM del control negativo. Con estos datos fue posible determinar si una dieta experimental fue o no tóxica y se estableció el grado de toxicidad de las semillas de las distintas variedades de *P. vulgaris*.

El primer grupo, semillas que presentaron un TSM menor al del control negativo (variedades Tacarigua, Victoria y MGM-08-02-026), comprende semillas de alta toxicidad; según Carmona y col. (1998) una dieta experimental es tóxica si el TSM de la misma está por debajo del TSM del control negativo (ayuno). Estos resultados pueden soportarse al observar las curvas de supervivencia para estas variedades (Figura 1 A) y las curvas de variación de peso (Figura 2 A). En este caso la mortalidad de los insectos se debe a que estos consumieron parte del endospermo de las semillas y algún componente presente en estas les causó la muerte.

El segundo grupo de semillas, que pueden ser consideradas variedades de toxicidad moderada incluye a las variedades MGM-10-02-108, Montalbán y NAG-75; estas variedades presentaron valores de TSM cercanos pero ligeramente menores al valor de TSM del ayuno, el análisis estadístico de estos resultados arrojó que no existen diferencias significativas entre los TSM de estas semillas y el TSM del control (Tabla 1). Este grupo puede considerarse como un grupo de toxicidad moderada; para este grupo no es posible determinar si la mortalidad de los insectos se debe a algún componente de las semillas o a que los insectos no las consumieron. Ya que para estas variedades los resultados son parecidos a los resultados del control negativo y es difícil discernir si este comportamiento se debe a que los insectos realmente comieron el



endospermo de las semillas y estas en realidad son moderadamente tóxicas, o si el comportamiento se debe a que los insectos no consumieron las semillas y murieron debido al ayuno prolongado. Aparentemente todo apunta a que estas variedades de *P. vulgaris* son moderadamente tóxicas, ya que se observaron restos de semillas consumidas por los insectos en los viales en los que se realizó el bioensayo con estas variedades y por otro lado la disminución de peso de los insectos es menor que la observada en el control negativo (Figura 2B) lo que implica que probablemente los insectos si consumieron las semillas. Para determinar correctamente si los insectos comieron parte del endospermo de las semillas es preciso realizar experimentos donde se evidencie el consumo del alimento por parte de los insectos, como los realizados por Carmona y Casotto (2001) donde midieron el consumo de alimento, el cual se determinó a partir de la diferencia de peso de los insectos antes y después de ser colocados en presencia de una dieta por un tiempo determinado.

Finalmente el tercer grupo que comprende a las variedades Tenerife y DOR-500, puede ser considerado como no tóxico, ya que estas semillas mostraron valores de TSM superiores y estadísticamente diferentes a los del control negativo. De igual manera que en el caso anterior no es fácil determinar el origen de la mortalidad observada para este tercer grupo, en este caso la mortalidad puede deberse a probablemente a tres factores: las semillas presentan proteínas con actividad insecticida pero en concentraciones más bajas en comparación con las variedades de los otros grupos; las semillas presentan otro tipo de compuestos tóxicos pero no proteicos, como aminoácidos no proteicos o glucósidos cianogénicos (Pereira y col., 2000) o, las semillas tienen bajos niveles de aminoácidos esenciales para *S. oryzae* como metionina (Bressani y col., 1989) lo que puede producir también la muerte de los insectos pero a una velocidad mucho menor, lo que explica las diferencias en las pendientes de las curvas de supervivencia con respecto a las

pendientes de las curvas de las demás variedades y del control negativo. Se ha registrado que los niveles de proteína corporal de los gorgojos responden al tipo de proteína que se les suministra en la dieta, en función con la capacidad que tienen estas proteínas de cubrir los requerimientos de aminoácidos de los gorgojos, lo que sustenta la teoría de que la mortalidad observada en este grupo puede deberse a la calidad proteica de las semillas (Carmona y col., 2001).

Si bien *Sitophilus oryzae* no consume en condiciones naturales semillas de caraotas, se ha demostrado la susceptibilidad de este insecto a algunas proteínas presentes en granos de *P. vulgaris* (Szwarcbort, 1980), lo que sustenta los resultados obtenidos en este trabajo. Por lo que es posible estimar la toxicidad de las semillas tomando en cuenta los resultados de un bioensayo con el gorgojo de arroz.

La proteómica comparativa consiste en la evaluación simultánea de los perfiles electroforéticos de las proteínas de distintas muestras, lo que se traduce en el análisis comparativo de las proteínas presentes en cada una de las muestras. De esta manera es posible establecer similitudes y diferencias entre distintos materiales a partir del análisis de los *spots* comunes y no comunes en los geles de electroforesis de las distintas muestras (Bernal y col., 2006).

En todas los geles bidimensionales se observaron algunas similitudes: la más destacada es una proteína de alrededor de 50 kDa y punto isoeléctrico que corresponde a la phaseolina, una proteína de almacenamiento que corresponde a más del 50 % del total de proteínas de las semillas (Osborn y col., 1988). En todas las electroforesis que mostraron alguna de las proteínas de interés se observaron varios *spots* cercanos entre sí en los intervalos de pH y masa molecular característicos de las proteínas con actividad insecticida. Esto se debe a que cada una de estas proteínas está formada por varias subunidades proteicas muy parecidas entre si, las cuales

interactúan para formar la proteína, al colocar las proteínas en condiciones disociantes, como detergentes iónicos (dodecil sulfato sódico), y agentes desnaturalizantes (iodoacetamida y ditiotreitol) las subunidades se separarán; pero debido al alto grado de similitud entre estas subunidades, las tasas de migración de las mismas serán muy parecidas por lo que se observan en regiones muy cercanas del gel (Goosens y col., 1994; Hamelryck y col., 1996b; Kjemtrup y col., 1995).

Si bien se trabajó con distintas variedades de *P. vulgaris*, al comparar las imágenes de los geles de electroforesis, se observaron una serie de proteínas comunes para todas las semillas. Particularmente los *spots* correspondientes a proteínas con masas moleculares cercanas y/o superiores a 60 kDa y pH isoelectrico ácido se observaron en todos los geles; estos *spots* deben corresponder a proteínas cuya presencia en la semilla es esencial para el desarrollo de las mismas, por lo que son comunes para todas las variedades, tanto semillas tóxicas como semillas no tóxicas.

Las variedades de toxicidad alta, Victoria y MGM-08-02-026, presentaron una mayor cantidad de *spots* en común con la variedad Tacarigua, la variedad más tóxica de todas (Figuras 6A y 7A y Tabla 4), muchos de los *spots* ubicados en la región de los geles correspondiente a una masa molecular entre 20 y 40 kDa se observan por igual en todas las variedades tóxicas, mientras que estos *spots* no se observan en la variedad Tenerife (Figuras 6C, 7C, y Tabla 4).

Para el grupo de semillas considerado de toxicidad moderada (MGM-10-02-108, NAG-75 y Montalbán), el número de *spots* en común con la variedad Tacarigua es menor en comparación a lo observado para el grupo de semillas de toxicidad alta, mientras que se mantiene bajo el número de *spots* en común con la variedad Tenerife (Figuras 8, 9 y 10; Tabla 4).

Finalmente en las variedades que mostraron una baja toxicidad (Tenerife y DOR-500) no se observó un gran número de *spots* en las regiones del gel donde se ubicarían las proteínas con actividad insecticida. La variedad Tenerife mostró pocos *spots* en común con la variedad Tacarigua en comparación con lo observado entre las semillas tóxicas y esta misma variedad, pero por otro lado la variedad DOR-500 mostró una gran cantidad de *spots* en común con la variedad Tacarigua (Figuras 11 y 12, Tabla 4). Si bien para esta variedad se registró el TSM más alto, lo que implica que es una variedad no tóxica (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997) también se observaron una gran cantidad de *spots* comunes con la variedad más tóxica de todas. Probablemente este resultado se debe a que si bien están presentes las proteínas con actividad insecticida en las semillas, estas se encuentran en baja concentración en los granos, por lo que se observan estos *spots* en los geles bidimensionales; pero las proteínas no se encuentran en una concentración tal en la semilla que tengan efecto alguno sobre los insectos. Esto podría aclararse realizando un estudio de los perfiles de expresión que presentan los granos de esta variedad y compararlos con los perfiles de expresión correspondientes a la variedad Tacarigua, tal estudio permitiría determinar si las cantidades de proteínas comunes entre estas variedades están en mayor o menor concentración en una u otra. Se esperaría encontrar que en la variedad de alta toxicidad (Tacarigua) se encuentren en mayor concentración las posibles proteínas con actividad insecticida. Por otra parte podría realizarse una identificación más fina de las proteínas presentes en la variedad DOR-500, específicamente aquellas que se encuentran dentro de los rangos de pH y masa molecular característicos de las proteínas con actividad insecticida.

Aparentemente es posible establecer una correlación entre la presencia de *spots* comunes dentro de ciertas regiones de los geles de electroforesis y la toxicidad de las semillas. Ya que mientras que las semillas que mostraron los tiempos de supervivencia media más bajos, y que

por lo tanto fueron las más tóxicas no presentaron tantos *spots* en común con la variedad Tenerife (la cual fue una de las variedades menos tóxica) si mostraron un grupo considerable de proteínas en común con la variedad Tacarigua (Tabla 1).

Si bien aparentemente existe una correlación entre la presencia o ausencia de algunas proteínas en las semillas y la toxicidad de las mismas, determinada a partir de los valores de tiempo de supervivencia media de cada variedad de *P. vulgaris*. Es preciso realizar una identificación más fina de las proteínas que se observaron en los geles, centrando la atención de esta identificación en las proteínas que se observaron en las variedades tóxicas y no se observaron en las variedades no tóxicas, es decir, principalmente aquellos *spots* comunes con la variedad Tacarigua que se ubicaron en el rango de masa molecular entre 25 y 40 kDa, los cuales probablemente corresponden a las proteínas con actividad insecticida. Por lo tanto estos *spots*, que aparentemente tienen cierta relación con la toxicidad de las semillas podrían incluirse dentro de un proyecto de identificación de proteínas mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. Podrían utilizarse geles de electroforesis en dos dimensiones de las proteínas de las variedades tóxicas para ser cortados en las regiones que corresponden a los *spots* de interés, estos fragmentos de gel contienen cada una de las proteínas purificadas, y pueden utilizarse para hacer una identificación de las proteínas empleando para ello MALDI-TOF.

De esta manera podría establecerse una correlación mas fina, entre la presencia de ciertas proteínas en el endospermo de las semillas y la toxicidad de las mismas, lo que serviría como punto de partida para programas de mejoramiento genético que buscan producir semillas de *P. vulgaris* resistentes al ataque de insectos. Por otro lado sería recomendable verificar el efecto de estas semillas sobre insectos del orden Bruchidae, particularmente organismos de las especies

*Acanthoscelides obtectus* y *Zabrotes subfasciatus* de esta forma se mediría la toxicidad de las semillas sobre las verdaderas plagas que las atacan.

## Conclusiones

1. El bioensayo con el gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae* permitió estimar la toxicidad de las semillas de *Phaseolus vulgaris*.
2. Las variedades utilizadas presentaron cierto grado de toxicidad, el modelo animal utilizado fue susceptible a algunos componentes de las semillas.
3. *S. oryzae* puede ser una buena opción para ser utilizado como modelo para estimar la toxicidad de dietas basadas en semillas de *P. vulgaris*.
4. Las variedades Tacarigua, Victoria, MGM-08-02-026 mostraron los tiempos de supervivencia media más bajos, por lo tanto son las semillas más tóxicas.
5. Se observaron similitudes entre los geles de electroforesis de las variedades altamente tóxicas que no se observaron en las variedades o tóxicas.
6. Aparentemente existe una correlación entre la presencia de ciertos *spots* en los geles de electroforesis en determinadas regiones y la toxicidad de las semillas.
7. En aras de establecer marcadores bioquímicos de toxicidad frente a los gorgojos es importante realizar una identificación mas finas de las proteínas presentes en las semillas tóxicas.

## Referencias

- Bernal, C., Galindo, I., Pérez, D., Diez, N. 2006. Aplicación de la proteómica comparativa para la identificación de proteínas en *Phaseolus vulgaris* asociadas a resistencia a plagas. *Agronomía tropical*. **56**(4) 555-559.
- Bollini, R., Carnovale, E., Campio, B. 1999. Removal of antinutritional factors from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* . **3**: 217-219.
- Bressani, R. 1989. Factors influencing nutritive value in food grain legumes: *mucuna* compared to other grain legumes. *Food and Feed from Mucuna: current uses and the way forward*. 164-188.
- Carmona, A., Casotto, M. 2001. Índice de eficiencia alimentaria (FER) en gorgojos de arroz (*Sitophilus orizae*): herramienta para evaluar la utilización metabólica del alimento. *Memorias del Insituto de Biología Experimental*. **3**: 49-52:
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A. 1997. Uso de insectos en estudios nutricionales: cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anales venezolanos de nutrición*. **10**: 20-26.
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A., Casotto, M. 1998. Toxicología nutricional: un enfoque “artropocentrico”. *Memorias del Insituto de Biología Experimental*. **1**: 37-40.
- Carmona, A., López, Y., Gómez-Sotillo, A., Casotto, M. 2001. Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *Memorias del Insituto de Biología Experimental*. **3**: 53:56.
- Centro de Investigaciones Agroalimentarias. 2005. Superficie Cosechada del Subsector Agrícola Vegetal en Venezuela entre 1984-2003. <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/13142/2/superficie.pdf>. (consulta: 10 de noviembre de 2008).
- Centro de Investigaciones Agroalimentarias. 2002. Libro electrónico de las hojas de balance de Alimentos 2001-2002. <http://www.saber.ula.ve/ciaal/librosdebalance2001-2002/2002/index.html>. (consulta: 10 de noviembre de 2008).
- Chrispeels, M., Raikhel, N. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**: 1-9.
- Fabre, C., Causse, H., Mourey, L., Koninkx, J., Rivière, M., Hendriks, H., Puzo, G., Samana, JP., Rougé, P. 1998. Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv.RAZ-2) seeds. *Biochemical Journal*. **329**: 551-560.



FAO (2004/2005) FAO- Statistics online Crop production statistics. <http://faostat.fao.org>. (consulta: 2 de noviembre de 2008).

Gepts, P., Papa, R. 2002. Evolution During Domestication. Pags: 1-7. En Encyclopedia of Life Sciences. McMillian Publishers. Londres.

Gómez-Sotillo, A. 1997. Uso potencial del insecto *Sitophilus oryzae* L. en la evaluación del valor biológico de semillas de leguminosas. Un método rápido y económico. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de Prof. Titular. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.

Goosens, A., Geremia, R., Bauw, G., van Montagu, M., Angenon, G. 1994. Isolation and characterization of arcelin-5 proteins and cDNAs. *European Journal of Biochemistry*. **94**: 721-731.

Goosens, A., Quintero, C., Dillen, W., De Rycke, D., Flower, J., De Clercq, J., Van Montagu, M., Cardona, C., Angenon, G. 2000 Analysis of bruchid resistance in the wild common bean accession G02771: no evidence for insecticidal activity of arcelin 5. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 1229-1236.

Hamelryck, T., Dao-Thi, M., Poortmans, F., Chrispeels, M., Wyns, L., Loris, R. 1996a. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *The Journal of Biological Chemistry*. **34**: 20479-20485.

Hamelryck, T., Poortmans, F., Goosens, A., Angenon, G., Van Montagu, M., Wyns, L., Loris, R. 1996b. Crystal structure of arcelin-5, a lectin like defense protein from *Phaseolus vulgaris*. *The Journal of Biological Chemistry*. **51**: 32796-32802.

Hames, D., Rickwood, D. 1994. Gel electrophoresis of proteins. Oxford Press, Oxford.

Hartweck, L., Vogelzan, R., Osborn, T. 1991. Characterization and comparison of arcelin seed proteins variants from common bean. *Plant Physiology*. **97**: 204-211.

Hossain, M., Rafiqul, S., Absar, N. 2004. Purification and characterization of lectins from mulberry seeds (*Morus alba* L.). *Pakistan Journal of Biological Science*. **10**: 1808-1813.

Huesing, J., Shade, R., Chrispeels, M., Murdock L. 1991.  $\alpha$ -Amilase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiology*. **96**: 993-996.

Hunter, T., Andon, N., Koller, A., Yates, J., Haynes, P. 2002. The functional proteomics toolbox: methods and applications. *Journal of Chromatography B*. **782**: 165-181

Ishimoto, M., Chrispeels, M. 1996. Protective mechanism of the mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology*. **111**: 393 - 401

Jaffé, W. 1987. Nuestros alimentos, ayer, hoy y mañana. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana. Caracas.

Kjemtrup, S., Borkhesenious, O., Raikhel, N., Chrispeels, M. 1995. Targeting and release of phytohemagglutinin from the roots of bean seedlings. *Plant Physiology*. **109**: 603-610.

Lee, S., Gepts, P., Whitaker, J. 2002. Protein structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ -amilase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 6618-6627.

Levy-Benshimol, A., Carmona, A., Melito, C., Santiago, J., Contretras, L., Tovar, J. 1998. Efecto antinutricional de lectinas de *Phaseolus vulgaris* sobre la cascada digestiva de los carbohidratos. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **1**: 41 - 44.

Lioi, L., Galasso, I., Santantonio, M., Lanave, C., Bollini, R., Sparvolli, F. 2006. Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **53**: 1615-1623.

Lovera, M. 2008. Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (L.). Tesis de Pregrado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Mbogo, P. 2007. Breeding for bruchid resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): interspecific introgression of lectin-like seed proteins from tepary bean (*P. acutifolius* A. Gray), genetic control and bruchid resistance characterization. Tesis de Doctorado (Ph.D en Horticultura). Universidad Estatal de Oregon. Oregon, Estados Unidos.

McClellan, P., Kami, J., Gepts, P. 2005. Genomic and genetic diversity in common bean. *Legume Crop Genomics*. Cuarto capítulo. AOCS Press. Champaign, Estados Unidos.

Moraes, R., Sales, M., Pinto, M., Silva, L., Oliveira, A., Machado, O., Fernánde, K., Xavier-Filho, J. 2000. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **33**:191-198.

Mourey, L., Péderac, JD., Birck, C., Fabres, C., Rougé, P., Samana, JP. 1998. Crystal structure of the arcelin-1 dimer from *Phaseolus vulgaris* at 1,9-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**: 12914-12922.

Muzquiz, M., Burbano, C., Ayet, G., Pedrosa, M., Cuadrado, C. 1999. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. **3**: 210-216.

Nagasuma, R., Prabu, M., Suguna, K., Vijayan, M. 2001. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. *Protein Engineering*. **14**: 857-866.

Nelson, D., Cox, M. 2005. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Págs: 262-264. Cuarta Edición. Ed. Omega. Nueva York.

Paes, N., Gerhardt, I., Coutinho, M., Yokoyama, M., Santana, E., Harris, N., Chrispeels, M., Grossi-de-Saõ, M.F. 2000. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *Journal of Insect Physiology*. **46**: 393–402.

Pereira, M., Rodrigues, I., Grossi-de-Saõ, M., Xavier-Filho, J. 2000. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology*. **124**: 515–522.

O'Farrel, P. 1975 High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **250**: 4007-4021

Osborn, T., Burow, M., Bliss, F. 1988. Purification and characterization of arcelin seed protein from common bean. *Plant Physiology*. **86**: 399-405.

Pandey, A., Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. **15**: 837-845.

Rojas, C. 2007. Evaluación nutricional de películas comestibles con ingredientes pre y probióticos usando como modelo biológico el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Schoonhoven A., Cardona, C. 1986. Main insect pests of stored beans and their control. Study guide CIAT.

Schoonhoven A., Cardona C., Valor, J. 1983. Resistance to the bean weevil and mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in non cultivated bean accessions. *Journal of Economic Entomology*. **76**: 1255-1259.

Schroeder, H., Gollash, S., Moore, A., Craig, S., Hardie, D., Chrispeels, M., Spencer, D., Higgins, T. 1995. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*. **107**: 1233-1239.

Singh, M. 1999. Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvements. *Crop Sciences*. **39**: 80-89.

Slumpa S., Ampofo J. 1991 Evaluation of different methods for the control of bean bruchid (*Acanthoscelides obtectus*). *Annual Report of Bean Improvement Crop*. **34**: 66-67.

Szwarcbort, J. 1980. Efectos de algunos factores antinutricionales presentes en granos de leguminosas sobre el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.). Tesis de Grado (Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Velten, G., Rott, A., Cardona, C., Dorn, S. 2007. The inhibitory effect of the natural seed storage protein arcelin on the development of *Acanthoscelides obtectus*. *Journal of Stored Products Research*. **43** : 550-557.