UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación preliminar de actividad insecticida de lectina ASA II a partir de ajo (*Allium sativum*), sobre *Tecia solanivora*.

Nury Lysseth Carreño Rondón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2013

Evaluación preliminar de actividad insecticida de lectina ASA II a partir de ajo (*Allium sativum*), sobre *Tecia solanivora.*

Nury Lysseth Carreño Rondón

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias – Bioquímica.

MSc., Dr Sci. EDGAR ANTONIO REYES MONTAÑO

Director

Grupo de Investigación en Proteínas

Universidad Nacional de Colombia

MSc., Ph.D. CARLOS ESPINEL

Codirector

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

CORPOICA

Grupo de Investigación en Proteínas
Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2013

Al esfuerzo y en memoria de mamá, que ha permanecido siempre alentándome a seguir con nuestros sueños.

Agradecimientos

A Dios y la madre naturaleza por permitirnos ser participes de este asombroso proceso que es la vida.

A mi familia porque ha dado la inspiración que me ha permitido seguir en pro de mis sueños.

A la universidad Nacional de Colombia por contribuir enormemente con mi formación profesional, personal y donde he conocido personas maravillosas.

Al Dr. Edgar Antonio Reyes Montaño quien me acompañó en todo el proceso, por su constancia, por su paciencia, por su comprensión, por su tiempo, por sus enseñanzas, por su ejemplo y porque me ha ayudado a creer que lo imposible se vuelve posible.

A la Dra. Nohora Angélica Vega Castro directora del grupo de Investigación en Proteínas (GRIP) de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración en todo momento durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Shaker Chuck Farah y a todo el grupo de investigación **Análise Funcional e Estrutural de Mecanismos de Patogenicidade de Xanthomonas; Biologia Estrutural,** especialmente Pricila Hauk Teodoro, por su colaboración, dedicación y aportes.

Al Dr Carlos Espinel y el grupo de trabajo del Laboratorio de control Biológico del centro de Biotecnología y Bioindustria CBB CORPOICA, por su enorme colaboración para la realización de los bioensayos.

A Fernando Rivera Trujillo por todos sus aportes y colaboración durante la etapa de realización de los bioensayos.

A mis compañeros del GRIP Andrea, Edwin, Mónica, y Camilo, por todos sus aportes, su colaboración y preocupación. A los demás compañeros del área de Bioquímica.

A mis amigos del alma Sandra, Valeria, Jenny, David, William, Sokito, Carito y Javier, por sus palabras, por su compañía y permanencia a lo largo de esta etapa de mi vida.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para que esta etapa de mi vida llegara a feliz término.

Contenido

Resumen 13

Introducción 15

1. Marco Referencial 17

1.1. Polilla Guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* 17

1.1.1. Distribución Geográfica de *T. solanivora* 17

1.1.2. Morfología y descripción de los estados de desarrollo *T. solanivora* 18

1.2. Plaguicidas 20

1.2.1. Clasificación de Plaguicidas 22

1.2.2. Efectos Ecológicos de Plaguicidas 23

1.2.3. Mecanismo de Acción de Plaguicidas 24

1.3. Inhibidores 25

1.3.1. De Acetilcolinesterasa 25

1.3.2. Inhibidores de Proteasas 26

1.3.3. Inhibidores de α-amilasas 27

1.4. Lectinas 28

1.4.1. Clasificación de Lectinas 29

1.4.2. Función de lectinas 30

1.4.3. Lectinas: Proteínas de Defensa en Plantas 31

1.4.4. Familia *Galanthus nivalis* (GNA) **32**

1.4.5. Lectina de Ajo *(Allium sativum*) **33**

2. Objetivos **35**

3. Metodología **37**

3.1. Extracción Y Purificación de Lectinas de Bulbos de Ajo **37**

3.1. Material Vegetal **37**

3.1.2. Extracción de lectinas de bulbo de ajo (*Allium sativum*) **38**

3.1.3. Cromatografía de intercambio iónico **38**

3.1.4. Ensayos de hemaglutinación **39**

3.1.5. Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B - Manosa **40**

3.1.6. Cuantificación de Proteína **42**

3.1.7. Electroforesis SDS PAGE **42**

3.1.8. Determinación de Punto Isoeléctrico **42**

3. 2. Obtención de Lectina Recombinante **44**

3.2.1. Extracción de RNA **44**

3.2.2. Diseño de Primers **46**

3.2.3. Condiciones PCR **47**

3.2.4. Construcción del plásmido recombinante **47**

3.2.5. Transformación de Bacterias *E. coli* competentes **48**

3.2.6. Secuenciamiento **48**

3.2.7. Clonación del gen *Asa II* en el vector de expresión PAE **48**

3.2.8. Confirmación de la Transformación **49**

3.2.9. Transformación de Bacterias *E. coli* BL21 (De3) RIL **50**

3.2.10. Expresión del gen *Asa II* **50**

3.2.11. Purificación de la proteína recombinante **51**

3.2.12. Western Blot **52**

3.3. Ensayo Biológico Preliminar sobre La Polilla Guatemalteca *Tecia solanívora* **53**

3.3.1. Procedencia de los insectos **53**

3.3.2. Selección de Tubérculos **54**

3.3.3. Proteínas usadas para los ensayos **54**

3.3.4. Dosis de proteína **55**

3.3.5. Aplicación de Lectinas en tubérculos **55**

3.3.6. Diseño Experimental **56**

3.3.7. Seguimiento y evaluación de los estados de desarrollo del insecto **57**

3.3.8. Tratamiento estadístico **59**

4. Resultados y Discusión **62**

4.1 Obtención Proteína nativa **62**

4.1.1. Extracción de lectinas de ajo **62**

4.1.2. Purificación de lectinas de bulbos de ajo **64**

4.1.3. Cromatografía de Afinidad Manosa-sepharosa 4B **67**

4.1.4. Punto Isoeléctrico **68**

4.2. Obtención proteína Recombinante **71**

4.2.1. Amplificación del gen *Asa* II **71**

4.2.2. Clonación **72**

4.2.3. Digestión del inserto **73**

4.2.4. Expresión de *Asa II* **76**

4.2.5. Purificación de ASA IIr **77**

4.3. Ensayo Biológico Preliminar sobre *Tecia solanivora* **80**

4.3.1. Evaluación Preliminar del efecto de lectinas ASA sobre larvas

T. solanivora **80**

4.3.2. Evaluación Preliminar del efecto de lectinas ASA sobre pupas de *T. solanivora* **81**

4.3.3. Efecto preliminar de lectinas ASA sobre parámetro de fecundidad y fertilidad de *Tecia solanivora.* **85**

4.3.4. Tratamiento estadístico **86**

4.3.5. Actividad Inseciticida Preliminar de lectinas ASA (*A. sativum*) sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gellechidae). **90**

5. Conclusiones **93**

6. Perspectivas **94**

7. Referencias **95**

Anexo 1. **109**

Anexo 2. **110**

Anexo 3. **111**

Anexo 4. **112**

Anexo 5. **113**

Resumen

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia* solanivora es considerada como uno de los principales insectos que ataca el cultivo de papa, causando daños a los tubérculos tanto en campo como en almacenamiento, existen reportes en Colombia que mencionan pérdidas cercanas al 25% en cultivo y hasta el 100% en almacenamiento. El uso de plaguicidas químicos es generalmente la única forma de control del insecto, sin embargo el uso de plaguicidas puede ocasionar efectos tóxicos sobre el cultivo y sobre el medio ambiente; además pueden generar resistencia. Las lectinas han sido referidas como proteínas de defensa natural y actualmente existen muchas publicaciones que relacionan el efecto de lectinas causando perjuicios al desarrollo normal de insectos. Este trabajo mostró el efecto insecticida de lectinas de ajo (*Allium sativum*), sobre la Polilla Guatemalteca de la papa. Para ello se purificaron las lectinas nativas ASA I y ASA II, presentes en el bulbo de ajo, se expresó la lectina ASA II en *E. coli*., y se realizó un ensayo biológico, los datos fueron analizados por el método Logit, determinándose algunas significancias relacionadas con mortalidad de larvas, pupas, y se evaluaron parámetros de fecundidad y fertilidad.

Palabras clave: Lectinas; Purificación de proteínas; *Allium sativum*; Bioinsecticida

Abstract

The Guatemalan potato moth, *Tecia solanivora,* is considered as one of the major insect that attacks the potato crop, causing damage to tubers in the field and in storage, in Colombia there are reports that mention losses close to 25% in culture and even 100% in storage. The use of chemical pesticides is usually the only form to control this insect, however the use of pesticides can cause toxic effects on the culture and the environment, also can generate resistance. Lectins have been considered as natural defense proteins and currently there are many reports that relate the lectins effect of causing damage to the normal development of insects. This work showed the lectin insecticidal effect of garlic (Allium sativum) lectins on the Guatemalan potato moth. For that, we purified native lectins ASA I and ASA II, present in the garlic bulb, and expressed ASA II lectin in E. coli., and performed a bioassay, the data were analyzed by the Logit method, determining some statistical significances related to mortality of larvae, pupae, and evaluated fecundity and fertility parameters.

Keywords: Lectin, protein purification, *Allium sativum*, bioinsecticidal.

Introducción

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en Colombia es considerado como un cultivo importante dentro de la producción agrícola, estimándose el área sembrada en 160.000 hectáreas con rendimiento de 18 toneladas por hectárea, producción anual de 2,9 millones de Toneladas y consumo per cápita aparente anual de 60 Kilos, lo que confirma la importancia de dicho alimento a nivel nacional (Guía ambiental, 2004).

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny), pertenece al complejo de polillas de la familia *Gelechiidae* (orden Lepidoptera), es originaria de Centroamérica y se le conoce como uno de los principales insectos que ataca el cultivo de la papa y que presenta mayor relevancia económica. Las larvas de *T. solanivora* causan daños directos a los tubérculos de papa tanto en campo como en almacenamiento. En la zona centro oriental (Boyacá y Cundinamarca) de Colombia hay reportes de pérdidas a causa de este insecto cercanas al 25% de la producción en campo, mientras que durante el almacenamiento de semilla puede llegar al 100% (Niño, 2004).

En la actualidad no hay insecticidas químicos específicos para su control, algunos estudios de efectividad de insecticidas sobre la polilla guatemalteca mostraron que existe susceptibilidad por parte del insecto a algunos insecticidas de uso comercial, sin embargo en la actualidad el uso de plaguicidas químicos no hace parte de un programa de manejo integrado de plagas (Dominguez et al., 2010) y puede ocasionar problemas de toxicidad tanto al medio ambiente como al cultivo (Arevalo y Castro, 2003).

Además del control químico se han ensayado otras alternativas como el uso de feromonas (para monitoreo de la plaga) y el control biológico, pero hasta ahora no se han obtenido resultados que garanticen un control eficaz de la polilla guatemalteca (OEPP/EPPO, 2005).

Las lectinas son proteínas que han sido referidas como proteínas de defensa natural que se encuentran en las plantas y animales (Gaidamashvili et al., 2009); actualmente se encuentran publicados muchos reportes de ensayos biológicos con dietas artificiales que confirman la reducción de la supervivencia, desarrollo y fecundidad de insectos de diversos órdenes, tales como Coleoptera, Homoptera y Lepidoptera (Murdock et al., 1990; Czapla y Lang, 1990; Powell et al., 1993; Rao et al., 1998, Shukle y Murdock, 1983).

De todas las lectinas de plantas estudiadas, la lectina *Galanthus nivalis* (GNA), fue una de las primeras que reportó efectos perjudiciales sobre el crecimiento y desarrollo de insectos, dichos estudios reportan toxicidad de GNA en dietas artificiales y en plantas transgénicas, sobre larvas del orden Lepidoptera (Sadeghi et al., 2008), incluyendo la polilla del tomate (*Lacanobia oleracea*) (Gathehouse et al., 1997) y el barrenador de arroz mexicano (*Eoreuma loftini*) (Sétamou et al., 2003). En consecuencia muchas lectinas de la misma familia han despertado gran interés por sus posibles propiedades entomotóxicas, un caso interesante es la lectina de ajo (*A. sativum*), que luego de su aislamiento y clonación (Van Damme et al., 1991; Van Damme et al., 1992; Smeet et al., 1997), mostró una estrecha relación funcional con la lectina de *Galantus nivalis* (GNA).

Mediante este trabajo se purificaron lectinas nativas por técnicas cromatograficas, a partir de bulbo de ajo *A. sativum* (ASA I Y ASA II); además se extrajo ARNm para expresar lectina ASA II recombinante en *E. coli.,* para finalmente evaluar el efecto insecticidad de

estas lectinas (nativa y recombinante) sobre *Tecia solanivora*; y a través la aplicación del método estadístico Logit se determinaron algunas significancias relacionadas con mortalidad de larvas, pupas, y se evaluaron parámetros de fecundidad y porcentaje de eclosión.

1. Marco Referencial

1.1 Polilla Guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*

La polilla de la papa *T. solanivora* (Povolny*)* pertenece al complejo de las polillas pertenecientes a la familia Gelechiidae (órden: Lepidóptera) que atacan la papa (*Solanum tuberosum L.*). Se le conoce con varios nombres comunes: polilla gigante, polilla centroamericana, gusano guatemalteco y principalmente como polilla guatemalteca, es originaria de Centroamérica, siendo considerada en varios países de ésta zona y en los países andinos (Venezuela, Colombia y Ecuador) como una de las principales plagas de este cultivo. Actualmente constituye una amenaza potencial para los cultivos de papa ubicados en los demás países del área andina (Niño, 2004).

1.1.1 Distribución Geográfica de *T. solanivora*

Desde 1956 se registraron daños producidos por esta polilla en Guatemala, posteriormente debido a la movilización de papa, se dispersó a los demás países centroamericanos. En 1970 fue introducida a Costa Rica ocasionando daños entre 5 y 41,5%.

En Colombia en 1985 se reportaron pérdidas entre el 10 y 40 % en el departamento de Cundinamarca, además en departamentos como Boyacá, Santander, Caldas y Valle del Cauca, se encontraron infestaciones. En Ecuador en 1996 se registraron daños hasta del 60% y en 1999 se detectó en España (OEPP/EPPO, 2005).

1.1.2 Morfología y descripción de los estados de desarrollo *T. solanivora*

Los huevos son de forma ovalada miden 0,5 mm de largo, recién puesto son de color blanco, luego cambian a amarillo y finalmente se puede apreciar la coloración oscura cuando están próximos a eclosionar. Los huevos son depositados cerca de la base de las plantas de papa o sobre los tubérculos almacenados.

La larva es de forma cilíndrica y recta, pasa por cuatro estadíos, recién nacida mide 1,4 mm de largo y llega a alcanzar entre 14 y 16 mm de longitud al completar su desarrollo en el cuarto estadío. La cabeza y la placa protorácica son de color marrón.

En los primeros estadíos el cuerpo es de color blanco hialino, luego en el último estadio adquiere un color verdoso amarillento y finalmente se torna de color rosado violáceo en el dorso, característico de la fase prepupa. Posee pequeñas manchas de color marrón en la base de las setas o pelos corporales distribuidos de manera uniforme sobre todos los segmentos torácicos y abdominales del cuerpo y tres pares de patas verdaderas más cinco pares de propatas o protuberancias abdominales (Niño, 2004).

Tabla 1. Duración (días) del ciclo de vida de *T. solanivora.*

	10 °C	12-14° C	15,5 °C	16 ° C	17 ° C	20 ° C	25 ° C
Estado							
Huevo	26	13-15	15	10	10	7	5
Larva	80,12	30	33,87	20	15	20,22	17,88
Pupa	91,18	23	25,92	20	20	10,96	9,86
Longevidad Adultos		20-25	15,6-20,8	20-25	20	18,20	10,00
Ciclo huevo-pupa	197,3	68	74,79	50	45	38,8	32,74
Ciclo total		86-93	90,6-94,9	70-75	65	56,38	42,74
No. Huevos/hembra	Muy Pocos		209	290	156		

Fuente: Torres 1989; Notz 1996; Herrera 1997; Álvarez y Trillos 1999.

T. solanivora, es un insecto con metamorfosis completa (holometábolo), la duración de cada uno de sus estadíos y la duración total del desarrollo de esta especie es afectada por las condiciones ambientales, siendo la temperatura y la humedad relativa los factores que más influyen. Al eclosionar el huevo, la larva sale y se orienta hacia el tubérculo, raspa la superficie y penetra justo debajo de la epidermis marcando su camino como los minadores de las hojas. Al penetrar no deja ninguna señal visible. Luego barrena más profundamente hasta formar galerías dentro del tubérculo. Esta especie no es caníbal y pueden encontrarse hasta 40 larvas en un solo tubérculo. Son capaces de alimentarse del tubérculo aún en avanzado estado de descomposición (Briceño, 2007; Palacios, 1997; Torres et al., 1997; Acevedo 1995).

Durante su proceso de alimentación y desarrollo, se alimentan solo de la pulpa y profundizan ocasionando un deterioro significativo de la calidad del tubérculo y aunque el consumo por larva es bajo, aproximadamente un (1) gramo (Hilje, 1994), cuando se incrementa la densidad de larvas por tubérculo, llegan a consumir gran parte de la pulpa y profundizan ocasionando un deterioro significativo (Niño, 2004).

La larva sale del tubérculo a través de un orificio limpio, sin rastros de partículas, forma un capullo de seda que puede recubrir con tierra u otras partículas, mantiene su forma pero pierde su movilidad y deja de comer, esta fase es conocida como prepupa, luego se va transformando hasta pasar al estado de pupa.

La polilla guatemalteca es considerada plaga primaria del cultivo de papa en la zonas de cultivo, por ende, en los últimos años el control se ha basado casi exclusivamente en la utilización de productos químicos y la poca efectividad de los mismos ha provocado uso irracional, lo cual además de incrementar los costos constituye un riesgo económico, social y ambiental (Dominguez et al., 2010).

1.2 Plaguicidas

Sustancia o mezcla de sustancias químicas de origen organosintético, de naturaleza tóxica y por consiguiente con un alto poder de alterar en forma drástica la fisiología de los organismos. Se utilizan en la actividad agrícola como medio de control para enfermedades, plagas y malezas. Normalmente, la acción del plaguicida no es específica para la especie objetivo y en consecuencia se producen efectos de diferentes magnitudes sobre otras especies y sobre los ámbitos expuestos a su acción (Auditoria política de gestión al uso y manejo de plaguicidas en Colombia, 2004).

En lugares donde se practica el monocultivo intensivo, los plaguicidas constituyen el método habitual de lucha contra las plagas. Por desgracia, los beneficios aportados por este tipo de sustancias han ido acompañados de una serie de perjuicios, algunos de ellos tan graves que ahora representan una amenaza para la supervivencia a largo plazo de importantes ecosistemas, como consecuencia de la peturbación de las relaciones depredador-presa y la pérdida de biodiversidad. Además, los plaguicidas pueden tener importantes consecuencias en la salud humana (Ongley Edwin, 1996).

La historia del desarrollo y utilización de los plaguicidas es fundamental para entender cómo y por qué han representado una amenaza para el medio ambiente en los sistemas acuáticos, y por qué esta amenaza está disminuyendo en los países desarrollados, mientras que continúa siendo un problema en muchos países en desarrollo. En la tabla 2, se presenta la cronología de evolución de los plaguicidas.

Tabla 2. Cronología de la evolución de plaguicidas.

Período	Ejemplo	Fuente	Características
1800-1920	Primeros plaguicidas orgánicos, nitrofenoles, clorofenoles, creosota, naftaleno, aceites de petróleo	Química orgánica, productos derivados de la elaboración de gas de carbón, etc.	Con frecuencia, carecían de especificidad y eran tóxicos para el usuario o para organismos que no eran los destinatarios
1945-1955	Productos orgánicos clorados, DDT, HCCH, ciclodien.	Síntesis orgánica	Persistentes, buena selectividad, buenas propiedades agrícolas, buenos resultados en materia de salud pública, resistencia, efectos ecológicos nocivos.
1945-1970	Inhibidores de la colinesterasa, compuestos organofosforados, carbamatos.	Síntesis orgánica, buena utilización de las relaciones estructura-actividad.	Menor persistencia, cierta toxicidad para el usuario, algunos problemas ambientales.
1970-85	Piretroides sintéticos,	Perfeccionamiento de las	Cierta falta de

	avermectinas, imitaciones de las hormonas juveniles, plaguicidas biológicos	relaciones estructura-actividad, nuevos sistemas de selección de objetivos	selectividad, resistencia, costos y persistencia variable.
1985-	Organismos obtenidos por la ingeniería genética	Transferencia de genes para plaguicidas biológicos a otros organismos y a plantas y animales beneficiosos. Alteración genética de las plantas para que resistan mejor a los efectos no deseados de los plaguicidas	Posibles problemas con mutaciones y fugas, perturbación de la ecología microbiológica, monopolio de los productos

Fuente: Stepheson y Solomon, 1993.

1.2.1 Clasificación de Plaguicidas (Morell, 1998)

Los plaguicidas se pueden clasificar:

a. **Según el tipo de organismo que se desea controlar:** Insecticidas, acaricidas, funguicidas, herbicidas, nematicidas, rodenticidas, etc.

b. **Según el grupo químico del Principio Activo:** compuestos organofosforados, compuestos carbamatos, compuestos organoclorados, piretroides, derivados del bipiridilo, triazinas, tiocarbamatos, derivados de ácido fenoxiacético, derivados de la cumarina, derivados de cloronitrofenol, compuestos organomercuriales, entre otros.

c. **Según su persistencia al medio ambiente:** persistentes, poco persistentes, no persistentes.

d. **Según su toxicidad aguda (O.M.S.):** Esta se relaciona principalmente a la toxicidad por vía oral en ratas y ratones. Usualmente la dosis se registra como el valor DL50 (Dosis Letal Media) que es la dosis requerida para matar al 50% de la población de animales de prueba y se expresa en términos de mg/Kg del peso del cuerpo del animal.

1.2.2 Efectos Ecológicos de Plaguicidas (Ongley Edwin, 1996)

Los efectos ecológicos de los plaguicidas en fuentes acuáticas están determinados por los siguientes criterios:

1.2.2.1. Toxicidad: Toxicidad para mamíferos y no mamíferos, expresada en forma de DL_{50} ("Dosis letal": concentración del plaguicida que provoca la muerte de la mitad de los organismos de prueba durante un período especificado de prueba). Cuanto más baja es la DL_{50}, mayor es la toxicidad.

La respuesta tóxica (efecto) puede ser **aguda** (muerte) o **crónica** (efecto que quizá no provoque la muerte durante el período de prueba pero cause en el organismo sometido a prueba efectos observables, como cánceres y tumores, deficiencias reproductivas, inhibición del crecimiento, efectos teratogénicos, etc.

1.2.2.2. Persistencia: Medida en términos de vida media (tiempo necesario para que la concentración ambiental disminuya un 50 por ciento). La persistencia está determinada por procesos bióticos y abióticos de degradación. Los procesos bióticos son la biodegradación y el metabolismo; los procesos abióticos son fundamentalmente la

hidrólisis, fotolisis y oxidación. Los plaguicidas modernos suelen tener vida-media breve, que reflejan el período durante el cual la plaga debe ser controlada.

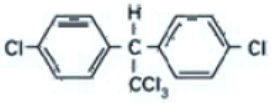
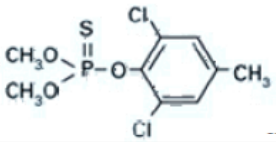
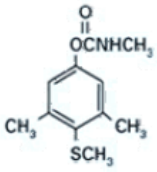
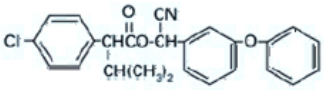
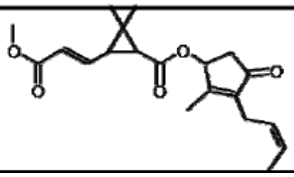
1.2.2.3. Productos degradados: El proceso de degradación puede llevar a la formación de "productos degradados", cuya toxicidad puede ser mayor, igual o menor que la del compuesto original.

1.2.2.4. Destino (ambiental): El destino ambiental (comportamiento) de un plaguicida depende de la afinidad natural del producto químico con respecto de uno de los cuatro compartimentos ambientales: materia sólida (materia mineral y carbono orgánico en partículas), líquido (solubilidad en aguas superficiales y aguas del suelo), forma gaseosa (volatilización) y biota. Este comportamiento recibe con frecuencia el nombre de "compartimentación" y comprende, respectivamente, la determinación de los siguientes aspectos: coeficiente de absorción del suelo (K_{OC}); solubilidad; Constante de Henry (H), y el coeficiente de partición n-octanol/agua (K_W). Estos parámetros son bien conocidos en el caso de los plaguicidas y se utilizan para prever su evolución ambiental.

1.2.3 Mecanismo de Acción de los Plaguicidas

Los plaguicidas normalmente, incluyen compuestos de las clases de los organofosforados, carbamatos, piretrinas, piretroides sintéticos y organoclorados, como se muestra en la Tabla 3. Los dos primeros son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, mientras que los tres últimos afectan los canales iónicos de las neuronas (Skinner, 2005) (canales de sodio), los cuales son regulados por voltaje y sirven para transmitir impulsos nerviosos a través de potenciales de acción que se esparcen por las dendritas y axones (Raymond-Delpech et al., 2005).

Tabla 3. Clases Químicas y Mecanismo de Acción de algunos Insecticidas sintéticos.

Clase química	Ejemplo	Estructura	Mecanismo de acción
Organoclorados	DDT		Afecta el cierre de los canales de sodio de las neuronas.
Organofosfatos	Ticlofos metil		Inhibidores de acetilcolinesterasa. Afectan irreversiblemente el sistema nervioso.
Carbamatos	Metiocarb		Inhibidores de acetilcolinesterasa. Afectan reversiblemente el sistema nervioso.
Piretroides	Fenvalerato		Bloqueo de los canales iónicos neuronales. Afectan el sistema nervioso.
Piretrinas	Cinerin II		Bloqueo de los canales iónicos neuronales. Afectan el sistema nervioso.

Fuente: Kojima et al, 2004; Gerberding, 2003; Vijverberg et al, 1982; Skinner 2005.

1.3 Inhibidores

1.3.1 De Acetilcolinesterasa

El bloqueo de acetilcolinesterasa AChE (EC 3.1.1.7; acetilcolina hidrolasa) por los compuestos organofosforados, como los insecticidas, causa rápidamente la muerte por fallas respiratorias. La acetilcolina (ACh), participa en la neurotransmisión en sinapsis neuromusculares, y su concentración en las henduduras sináticas está regulada por la enzima AChE. La AChE está presente en el tejido nervioso, músculo y células rojas, y cataliza la hidrólisis de aceticolina a colina y ácido acético, permitiendo la transmisión del impulso neuronal a través de la sinápsis (Chatonnet et al., 2003). Este mecanismo es utilizado para la neurotransmisión por diversos grupos de animales.

Desde mediados del siglo XX, se han reportado más de 500 especies de artrópodos considerados plaga que presentan resistencia a los inhibidores de AChE (Levitin y Cohen, 1998).

1.3.2. Inhibidores de Proteasas

Los inhibidores de proteasas han sido estudiados en plantas, porque desempeñan diversos papeles de importancia biológica en la célula; algunas de esas funciones los implican en el metabolismo intracelular durante el desarrollo de la semilla, germinación y senescencia en hojas (Ryan, 1990; Brzin y Kidric, 1995).

En leguminosas estas proteínas se acumulan en las semillas durante el desarrollo y alcanzan concentraciones relativamente altas en la madurez para ser movilizadas durante la germinación de la semilla. Estas proteínas son consideradas como materiales de reserva o almacenamiento. En términos de abundancia, uno de los más importantes grupos de proteínas encontrados en las semillas son los inhibidores de enzimas.

Todos los miembros de este grupo comparten una propiedad en común y es la de ser capaces de formar complejos estequiométricos con varias enzimas hidrolíticas causando una inhibición competitiva de la función catalítica. Este tipo de proteínas parece tener un papel importante en las plantas como agentes de defensa contra ataques de insectos y pestes microbiológicas (Koiwa et al., 1997; Lawrence y Ram, 2002). Los inhibidores de proteasas han sido objeto de estudio de biólogos moleculares e ingenieros genéticos con miras a incrementar sistemas de defensa natural y los valores nutricionales de las plantas. Dichos inhibidores de proteínas pueden hacer a las semillas desagradables al gusto y hasta letales para insectos depredadores.

Las proteasas (EC 3.4) catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos, reconociendo el extremo carboxilo de un residuo de aminoácido (Garcia y Navarrete, 1997). Estas enzimas llevan a cabo importantes papeles fisiológicos, como la digestión, activación de proenzimas o prohormonas (García - Carreño, 1992); por lo tanto, afectar la actividad de estas enzimas puede influenciar el control de insectos.

Una de las fuentes de inhibidores de proteasas, más estudiadas es la bacteria *Bacillus thuringensis.* Inhibidores de proteasas, obtenidos de esta bacteria ya son aplicados de manera directa en cultivos o bien los genes, que codifican a los inhibidores son transferidos a las plantas de interés (Oppert, 1999).

Debido a que insectos que presentan importancia económica como los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera, utilizan serín y cisteín proteasas en sus sistemas digestivos para degradar proteínas que ingieren en el alimento; se han realizado esfuerzos en la búsqueda de plantas transgénicas con inhibidores que actúen sobre estas proteasas y existen investigaciones recientes enfocadas en el diseño de inhibidores con mejores características (Outchkourov, et al., 2004), evitando así la resistencia que se genera en los insectos con algunas de estas proteínas.

1.3.3. Inhibidores de α-amilasas

Las α-amilasas (EC 3.2.1.1; α-1,4-glucano-4-gllucanohidrolasas) son enzimas hidrolíticas, encontradas en animales, plantas y microorganismos; pertenecen a la familia 13 de las glicanohidrolasas (Kokiekolo et al., 1999) y están encargadas de la degradación de polisacáridos unidos por enlaces α-1,4, como el almidón y el glucógeno.

Las α-amilasas pueden ser inhibidas por una serie de compuestos proteicos y no proteicos. A diferencia de los inhibidores naturales de proteasas, los inhibidores de α-amilasas presentes naturalmente en plantas han sido menos estudiados.

Algunas de las plantas que contienen inhibidores de α- amilasas son el fríjol, amaranto, papa, maíz, trigo y cebada. Estos inhibidores son responsables de la toxicidad de algunas plantas hacia insectos, y su conocimiento es relativamente reciente.

1.4. Lectinas

Hacia finales del siglo XIX, se comenzó a tener evidencia de la presencia de proteínas presentes en plantas con capacidad de aglutinar eritrocitos, a dichas proteínas se les dio

el nombre de hemaglutininas o fitoaglutininas. Se ha encontrado que las primeras descripciones de hemaglutininas fueron reportadas por Peter Hermann Stillmark en su tesis de doctorado en 1988, en la Universidad de Dorpat (Actualmente Tertu, Estonia); esta aglutinina se aisló de semillas del árbol de ricino (*Ricinus communis*) y se llamó ricina. Posteriormente Hellín demostró la presencia de una hemaglutinina tóxica en extractos de semillas de abrina (Precatorius abrus) (Sharon y Lis 2004).

Sumner y Howell en 1936, mostraron que la concanavalina A aislada de frijol (Canavalia ensiformis), aglutinaba células como eritrocitos y levaduras; así mismo mostraron la inhibición de la aglutinación con sacarosa, lo que demostró por primera vez la especificidad de las lectinas por azúcares y llevó a sugerir que la hemaglutinación podía ser una consecuencia de una reacción de la proteína vegetal con los hidratos de carbono presentes en la superficie de los glóbulos rojos.

Estudios posteriores mostraron que diferentes lectinas extraídas de leguminosas tenían actividad hemaglutinante y una especificidad por eritrocitos de diferentes tipos de sangre.

La capacidad de las aglutininas extraídas de plantas para distinguir entre eritrocitos de diferentes tipos de sangre llevó a Shapleigh a proponer el nombre de lectinas (leguere = seleccionar o elegir), este término se generalizó para todas las aglutininas específicas para azúcares de origen no inmune, independientemente de la fuente y la especificidad (Sharon y Lis 2004).

Se ha encontrado que las lectinas ejercen un gran número de propiedades biológicas dentro de las cuales podemos enumerar la aglutinación de células, la estimulación mitogénica de linfocitos, inducción de células supresoras, reconocimiento de receptores de membrana, detección de tumores e interacciones de tipo hospedero patógeno (Sharon y lis, 2004).

1.4.1. Clasificación de Lectinas

De acuerdo a los sitios de unión, las lectinas de plantas se pueden clasificar en cuatro grupos: merolectinas, hololectinas, chimerolectinas y superlectinas. Merolectinas son proteínas que contienen un solo sitio de unión a carbohidratos, por su carácter monovalente este grupo de lectinas no puede aglutinar células; las hololectinas son lectinas que se componen de dos sitios idénticos o con bastante homología en el reconocimiento de carbohidratos lo que les permite aglutinar células y/o formar precipitados de glicoconjugados; las superlectinas se componen de al menos dos sitios de unión que reconocen carbohidratos que se relacionan estructuralmente. El grupo de las chimerolectinas comprende lectinas de plantas que se componen de uno o más sitios de unión a carbohidratos, junto con un dominio que ejerce actividad biológica independiente del dominio de unión a carbohidratos (Van Damme et al., 1998).

Debido a la complejidad y heterogeneidad de casi todas las proteínas de unión a carbohidratos, las lectinas de plantas se clasifican también, teniendo en cuenta la incidencia, distribución taxonómica, evolución molecular y la función fisiológica.

Doce diferentes dominios de unión a carbohidratos han sido identificados: (1) Homólogos de *Agaricus bisporus*, (2) amaranthinis, (3) homólogos de la clase V Quitina, (4) familia *cianovirina*, (5) familia *Euonymus europaeus,* (6) familia *Galanthus nivalis*, (7) proteínas con dominios de heveina, (8) jacalinas, (9) proteínas con un dominio lectina leguminosa, (10) dominios de LysM, (11) familia *Nicotiana tabacum*, y (12) familia de Ricina – B (Van Damme et al., 2008a).

1.4.2. Función de lectinas

Aunque las lectinas han sido consideradas como proteínas presentes principalmente en semillas, se han encontrado también en tejidos vegetales como hojas, tallos, cortezas, bulbos, raíces y flores, entre otros; las lectinas en semillas representan por lo general del 0,1 al 5,0 %, mientras que las concentraciones en tejidos de almacenamiento pueden estar cerca del 50% del total de proteína, sin embargo también se pueden encontrar en muy pequeñas cantidades por lo que en promedio se puede decir que su contenido está entre el 0,1 y 5,0% (Van Damme et al., 2008b).

A partir de su descubrimiento, el estudio de estas proteínas se ha enfocado en el estudio de lectinas que se presentan en altas concentraciones en diferentes tejidos de plantas a fin de entender su función; existen muchas evidencias que indican que la mayoría pueden estar relacionadas con sistemas de defensa de las plantas; se han publicado estudios que reportan la síntesis de proteínas de unión a carbohidratos en plantas, cuando se encuentran expuestas a situaciones de estrés como sequía, alta concentración de sales o el tratamiento con algunas hormonas de las plantas (Zhang et al., 2000; Chen et al., 2002).

Las lectinas de las plantas básicamente difieren de las lectinas de animales, porque en estos últimos, dichas proteínas están envueltas en procesos de reconocimiento con el propio organismo, diferentes tipos de lectinas median las interacciones proteína-carbohidrato, siendo este tipo de interacciones muy importante para el normal funcionamiento y desarrollo de los organismos; estudios recientes también asocian diferentes familias de lectinas con la mediación de interacciones proteína- carbohidrato dentro de la planta (Van Damme et al., 2004; Van Damme et al., 2007).

1.4.3. Lectinas: Proteínas de Defensa en Plantas

Muchas lectinas de plantas muestran especificidad por glicoconjugados que se encuentran presentes en organismos fuera del reino plantae o se encuentran en muy baja cantidad en plantas, como galactosa, ácido siálico; además se ha reportado que muestran interacción entre las diferentes estructuras de carbohidratos presentes en organismos tales como virus, hongos, nematodos o insectos fitófagos, con lectinas de plantas (Hopkins y Harper, 2001; Ripoll et al., 2003, Wong et al., 2010).

A menudo, las lectinas están presentes en los órganos de almacenamiento y/o semillas que son particularmente vulnerables a los patógenos y/o insectos (Peumans y Van Damme, 1995); gran cantidad de lectinas de plantas son sintetizadas como precursores inactivos que se activan solamente después de su absorción en organelos especializados. Se puede preveer que después de la ingestión de semillas de plantas o tejidos, las lectinas son liberadas de las estructuras celulares y entran en contacto con las estructuras de carbohidratos presentes en el intestino de insectos (Vandeborre et al., 2011).

Aunque la actividad de las lectinas de unión a carbohidratos ha sido caracterizada, aún no se ha caracterizado el mecanismo por el cual estas proteínas pueden ejercer efectos insecticidas. Una hipótesis es que las lectinas ingeridas pueden unirse a carbohidratos que estén expuestos en las regiones de la cavidad oral y del intestino anterior o a la membrana peritófica (en las especies en las cuales está presente), sin embargo el sitio de más acción que puede dar lugar a la interferencia con el metabolismo, es la superficie de las células epiteliales donde las lectinas pueden unirse a glicoproteínas que se encuentren expuestas. La unión de lectinas puede afectar diferentes procesos que incluyen vías se señalización, procesos de transporte y respuesta inmune entre otras (Fitches et al., 2008).

1.4.4. Familia *Galanthus nivalis* (GNA)

En 1987 una lectina con especificidad por manosa fue aislada de bulbos de *Galanthus nivalis* (GNA) (Van Damme et al., 1987); GNA pasó a ser el prototipo de una extensa familia de lectinas de unión a manosa, presentes en familias de plantas monocotiledóneas, entre las que encontramos Alliaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Araceae, Bromeliaceae, Ruscaceae, Iridaceae (Yagi et al., 1996; Van Damme et al., 1998). Este grupo de lectinas es llamado como lectinas de la familia GNA, por ser la lectina de *Galanthus nivalis* la primera en aislarse y caracterizarse.

Todas las lectinas de plantas con dominios GNA, están compuestas por subunidades de aproximadamente 12 kDa, que muestran especificidad por manosa; sin embargo, algunas lectinas de este grupo muestran marcadas diferencias en especificidad sobre oligomanosidos y N-glucanos (Kaku et al., 1992; Van Damme et al., 2007).

GNA es una de las lectinas que más ha sido estudiada, principalmente fue la primera en mostrar actividad sobre hemípteros y además por su facilidad de aislamiento y purificación (Shi et al., 1994; Hilder et al., 1995).

1.4.5. Lectina de Ajo *(Allium sativum)*

El ajo (*Allium sativum*), es una hortaliza que pertenece a la familia de las Amarililadaceas, en esta especie se han encontrando cuatro diferentes lectinas, con similar especificidad por manosa, una presente en las hojas, dos en los bulbos y una en las raíces.

En los bulbos encontramos ASAI y ASA II (correspondientes a las lectinas de Allium sativum I y II), siendo ASA I un heterodímero compuesto por dos polipéptidos uno de 11,5 kDa y el otro de 12,5 kDa; en tanto que ASA II es un homodímero compuesto por dos polipéptidos de 12 kDa; ambas lectinas se encuentran como mezcla de isolectinas en la planta (Van Damme et al., 1991, Kaku et al., 1992), y cada subunidad de lectinas de ajo presentan tres sitios conservados de reconocimiento por manosa (Chandra et al., 1999; Ramachandraiah et al., 2000; Ramachandraiah et al., 2003).

Las lectinas de bulbo de ajo ASA I y ASA II han mostrado propiedades insecticidas en dietas artificiales suministradas a insectos plaga de arroz y frutas, y fueron evaluadas con proteínas recombinantes de ASA I y ASA II como dieta artificial, demostrando que ambas proteínas fueron tóxicas para *Acyrthosiphon pisum*, un áfido que ocasiona pérdidas en cultivos de arveja. Estos datos coincidieron con otros estudios reportados por otros autores como Rahbé (1995) y Powell (2001) que reportaron efectos deletéreos de lectinas con especificidad por manosa, purificadas y suministradas en dietas artificiales sobre áfidos (Fitches et al., 2008).

En consecuencia se pospuso evaluar preliminarmente la actividad insecticida de las lectinas de bulbo de ajo (*Allium sativum*) sobre *Tecia solanivora* (Polilla Guatemalteca de papa), teniendo en cuenta que en ensayos biológicos realizados sobre insectos (orden Lepidóptera, Homóptera y Hemiptera) (Upadhayay et al., 2012) han mostrado tener efectos deletéreos sobre desarrollo y reproducción de los mismos; presentando así una posible herramienta para el control del insecto, dado que actualmente no se tiene un insecticida específico y los insecticidas que son utilizados pueden conllevar efectos negativos tanto al consumidor como al producto.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar preliminarmente la actividad insecticida de lectinas purificadas(mezcla de ASAI-ASAII) y recombinante (ASA IIr) obtenidas a partir de bulbo de ajo (*Allium sativum)*, sobre la Polilla Guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora)*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Extraer y purificar las lectinas presentes en el bulbo de ajo (*Allium sativum)* con el fin de determinar preliminarmente la actividad insecticida sobre *Tecia solanivora*.

- ✓ Obtener la lectina ASAII recombinante en un sistema bacteriano con el fin de determinar preliminarmente la actividad insecticida sobre *Tecia solanivora.*

- ✓ Determinar preliminarmente la actividad insecticida con diferentes concentraciones de lectina purificada y recombinante sobre larvas de *Tecia solanivora*, bajo condiciones de laboratorio.

3. Metodología

La estrategia experimental que se utilizó para realizar este trabajo de investigación se dividió en tres etapas: 1) Extracción y purificación de lectinas (ASAI y ASAII mezcladas debido a sus similaridades en propiedades fisicoquímicas) de bulbo de Ajo *Allium sativum*; 2) expresión del gen *Asa II* de *A. sativum* en un sistema bacteriano y purificación de lectina ASA II recombinante (ASA IIr) y 3) Determinación preliminar del efecto bioinsecticida de las lectinas nativas de *A. sativum* y recombinante *(*ASAIIr) sobre la Polilla Guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* bajo condiciones de laboratorio.

3.1. Extracción Y Purificación de Lectinas de Bulbos de Ajo

3.1.1 Material Vegetal

Bulbos de Ajo (*Allium sativum*) obtenidos comercialmente, provenientes de la sabana de Bogotá (2500 msnm aproximadamente). Los bulbos fueron pelados, lavados, secados al aire a temperatura ambiente y liofilizados. Bulbos liofilizados fueron utilizados como material de partida para la extracción de las lectinas de ajo.

3.1.2 Extracción de lectinas de bulbo de ajo (*Allium sativum*)

Para la extracción de lectinas se tomaron en total 100 gramos de bulbos de ajo (*A. sativum*), liofilizados, los cuales fueron homogeneizados con buffer fosfato salino (PBS) (NaH_2PO_4 20 mM y Na_2HPO_4 20 mM y NaCl 150 mM) pH 7.2, en proporción 1:1.8, obteniendo un volumen final total de 180 mL, en un total de tres extracciones. Esta preparación se dejó en agitación constante por 4 h a 4°C, de acuerdo a lo descrito por Defilpo y Mestrallet, (1996).

La solución resultante se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C; el sobrenadante obtenido se sometió a precipitación fraccionada con sulfato de amonio (0-20%s, 20-40%s, 40-60%s) (Defilpo y Mestrallet, 1996), centrifugando en cada etapa de precipitación a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C y obteniendo un pellet (residuo) y un sobrenadante. El residuo se resuspendió en buffer de extracción, mientras que el sobrenadante se usaba para lograr el porcentaje de saturación siguiente.

Cada pellet se resuspendió en 20 mL de PBS y el pellet obtenido de la precipitación 40-60%s se resuspendió en 60 mL de PBS; cada una de estas fracciones se dializó dos veces contra el mismo buffer fosfato salino (Defilpo y Mestrallet, 1996), en proporción 1:20. Con cada una de las fracciones obtenidas se realizó test de aglutinación, cuantificación de proteína y perfil electroforético, de acuerdo a lo descrito en los numerales 3.1.4.; 3.1.6. y 3.1.7., respectivamente.

3.1.3. Cromatografía de intercambio iónico

Para purificar las lectinas presentes en los bulbos de ajo, se utilizó la fracción obtenida en el proceso de extracción que presentó mayor presencia de proteínas en la zona de 10

a 15 kDa y que presentó actividad de aglutinación. En caso de presentarse esta actividad en más de una fracción se purificó a partir de esas fracciones y se evaluó rendimiento.

3 mL de la fracción entre el 40-60%s se sembró sobre una columna de intercambio aniónico (DEAE-celulosa, sigma referencia D3764, de 5 cm de altura por 1 cm de diámetro) equilibrada previamente con PBS pH 7.2. Se realizaron 50 corridas cromatográficas, con un flujo de 0.2 mL/min. En cada cromatografía se sembraron 30 mg de la fracción la cual se equilibró previamente en PBS pH 7.2.

Inicialmente se realizó la elución de la fracción no retenida con el mismo buffer de equilibrio hasta obtener nuevamente línea base a 280nm; para eluir la fracción retenida se realizó una elución con un gradiente discontinuo de NaCl (200mM, 300mM y 500mM) con el fin de determinar la concentración salina necesaria para eluir la lectina retenida. Las fracciones colectadas fueron en promedio de 10 mL para la fracción no retenida y 5 mL para cada una de las fracciones retenidas, por cada cromatografía, las mismas fueron dializadas contra PBS y se determinó la actividad aglutinante en cada una de ellas, así como el perfil electroforético.

3.1.4. Ensayos de hemaglutinación

El ensayo de hemaglutinación se realizó de acuerdo al protocolo de aglutinación del laboratorio de la Dra. Els Van Damme, Universidad de Ghent, Bélgica, suministrado por comunicación personal.

Para los ensayos de hemaglutinación se colectaron muestras de sangre de conejo que fueron obtenidas en el bioterio de la Universidad Nacional de Colombia, teniendo en cuenta lo consignado en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y en la Ley 84 de 1989, haciendo énfasis en el cuidado nutricional de los animales utilizados para la realización del mismo así como las condiciones ambientales propias del sitio en el que se mantienen los animales.

La sangre de conejo fue colectada en citrato trisódico 10mM, en relación 2:1, se realizaron varios lavados con buffer PBS pH 7.2 (por lo menos 5), centrifugando a 3000 rpm, durante 5 minutos, entre lavado y lavado, y resuspendiendo los eritrocitos nuevamente en PBS. Finalmente se preparó una solución de eritrocitos al 10 % (v/v) en PBS, se adicionó tripsina marca sigma referencia T6567 (5 mg de tripsina por mL de solución de eritrocitos) y se dejó incubar por 1 hora a 37 ºC. Pasado este tiempo, la solución se lavó dos veces con PBS para eliminar la tripsina.

Para el ensayo de aglutinación se preparó una solución al 1%v/v de eritocitos de conejo tratados con tripsina y en una microplaca se adicionaron 30 uL de los eritrocitos tratados al 1% y 10ug de muestra (se evaluaron cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de manera independiente). Se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se observó la aglutinación en el fondo de los pozos.

3.1.5. Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B- Manosa

Las fracciones de mayor actividad obtenidas de la cromatografía de intercambio se eluyeron por una columna de Manosa-Sepharosa 4B activada con Divinil sulfona (Hermanson, et al. ,1992), se realizó esta cromatografía con el fin de confirmar el reconocimiento sobre manosa de las proteínas purificadas.

3.1.5.1. Preparación del soporte

La preparación del soporte se realizó de acuerdo a lo descrito por Hermanson y colaboradores (1992). Se lavaron 2 ml de Sepharosa 4B (marca sigma referencia 4B200) con 100 mL de agua desmineralizada en un embudo sinterizado, se equilibró el soporte con 20 mL de carbonato de sodio 0.5M pH 12, posteriormente se resuspendió el soporte en 2 mL de carbonato de sodio 0.5M pH 12 en un falcon de 50 mL, se adicionó gota a gota 0.2 mL de Divinil sulfona (en cabina de extracción) con agitación constante en shaker, se dejó activando por 2 horas a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó durante 3 minutos a 3000 r.p.m. con el fin de descartar el exceso de Divinil Sulfona.

3.1.5.2. Acoplamiento de Manosa - Sepharosa 4B

Se equilibró el soporte con 20 ml de carbonato de sodio 0.5M pH 12 en un embudo sinterizado, se resuspendió el soporte en 2 ml de solución de carbonato de sodio 0.5M pH12 conteniendo 0.3M de manosa y se dejó en agitación constante en shaker durante 24 horas a temperatura ambiente.

Se lavó el soporte con 100 mL de agua desionizada y 100 mL de carbonato de sodio 0.5M pH 12, se verificó que el pH estuviera en 7; el soporte fue resuspendido en 2 mL de carbonato de sodio 0.5M pH 12 conteniendo 0.5mL de β-mercaptoetanol (con el fin de bloquear los grupos que no reaccionaron), se dejó dos horas a temperatura ambiente con agitación (shaker), se lavó el soporte con 100 mL de agua, después con 100 mL de NaCl 1M, se empacó el soporte en una columna (dimensiones 2cm x 1 cm de largo) y se equilibró con 100 mL de PBS pH 7.2.

3.1.5.3. Cromatografía de Afinidad

1,2 mg de proteína de la fracción que presentó actividad eritroaglutinante, obtenida de la cromatografía de intercambio, eluída con 300mM de NaCl, se sembraron sobre el soporte Sepharosa 4B- Manosa, con el objetivo de evaluar el reconocimiento de las lectinas nativas (ASAI y ASAII) por manosa. Se colectó la fracción no retenida y posteriormente se eluyeron la fracción retenida, empleando PBS - manosa 200mM. La fracción retenida se dializó contra PBS, se cuantificó y se realizó el perfil electroforético.

3.1.6. Cuantificación de Proteína

En cada una de las etapas descritas se realizó cuantificación de proteína de acuerdo al método ácido bicinconínico (BCA) según lo descrito por Smith (1985), usando como patrón estándar albúmina de suero bovino (BSA 1,6 mg/mL).

3.1.7. Electroforesis SDS PAGE

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida, según lo descrito por Laemmli (1970) o Schägger, H. & Von Jagow, (1987). Se prepararon geles de 0.75 mm , y se utilizaron marcadores de peso molecular marca fermentas de peso molecular intermedio (116- 14 kDa) y marcadores de bajo peso molecular marca Thermo scientific (100 – 3,4 kDa). Los geles fueron fijados con ácido acético al 10% y teñidos con azul de coomassie R-250 o coomassie G- 250, se siguió la metodología del grupo de Investigación.

3.1.8. Determinación de Punto Isoeléctrico

3.1.8.1. Electroforesis Bidimensional

El procedimiento de electroforesis en dos dimensiones se realizó de acuerdo con el método descrito por O'farrel y colaboradores (1975). Para la primera dimensión se utilizaron tiras de gradiente de pH IPG de General Electric (Estados Unidos), con un rango distribuido linealmente entre 3 y 10, de siete centímetros de longitud. El protocolo para el uso de estas tiras comprende tres pasos:

Rehidratación: 16 horas en una solución que contenía tiourea 2M, CHAPS 4%v/v, urea 8M, y 1% anfolitos con rango lineal de pH 3 a 10. En esta solución se disolvió la muestra que contenía 100ug de proteína, que previamente fue liofilizada.

Equilibrio: dos incubaciones de quince minutos cada una con ditiotreitol al 1% en buffer de equilibrio que contenía urea 6M, Tris-HCl 0,05M pH 8,6, glicerol 30%p/v, SDS 2% p/v y azul de bromofenol; y la otra con una solución de iodoacetamida al 4% v/v en buffer de equilibrio.

Enfoque: finalmente, las tiras se colocaron en una cámara de isoelectroenfoque utilizando un equipo Protean IEF cell de BioRad y las especificaciones del fabricante.

Para la segunda dimensión, las tiras fueron acopladas a geles de poliacrilamida PAGE SDS al 12%, se realizó la electroforesis de acuerdo a lo descrito en el numeral 3.1.7.

3.1.8.2. Isoelectroenfoque

Se realizó según metodología descrita por O´Farrell y colaboradores (1997) modificada por Ardila, 2012 (datos sin publicar) la cual consiste en la utilización de un gel de poliacrilamida al 10% con monómeros de acrilamida al 30% y bisacrilamida al 1%, se empleó una solución de anfolitos GE Healthcare Ampholine TM pH 3.5 – 10 for IEF, como solución catódica NaOH 0.1M y aniónica H_3PO_4 0.1M; se emplearon patrones de pH General Electric de rango de pH 3 -10, también hemoglobina humana como patrón de enfoque. Los parámetros de corrida fueron 30 min a 500 voltios, 300 mA 12 W para el acondicionamiento de los anfolitos, 1.5 horas 500 voltios, 300 mA 12 W, con la muestra sembrada y por último 30 min a 700 voltios, 300 mA, 12 W, el gel fue fijado con soluciones de ácido tricloroacético – TCA al 10% durante 10 min y TCA al 1% durante toda la noche, y finalmente fue teñido con azul de coomassie G-250 5x.

3. 2. Obtención de Lectina Recombinante

La etapa correspondiente a la obtención de la proteína recombinante se realizó en el laboratorio “Análise Funcional e Estrutural de Mecanismos de Patogenicidade de Xanthomonas; Biologia Estrutural” dirigido por el doctor PhD. Shaker Chuck Farah, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

3.2.1. Extracción de RNA

Para realizar la expresión del gen Asa II se aisló ARN total a partir de los bulbos de ajo por medio del método de extracción fenólica con TRIZOL® (Chomezynsky y Sacchi, 1987). Los bulbos previamente liofilizados se molieron en un mortero agregando

nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. De este polvo se pesaron 0,10 g en un tubo de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de TRIZOL®, se mezcló y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C, obteniéndose un sobrenadante que fue separado y transferido a un eppendorf que contenía 0.2 mL de cloroformo frío.

Esta mezcla se agitó y mantuvo en hielo durante 3 minutos, tiempo después del cual se centrifugó a 10 000rpm por 10 minutos a 4°C. La fase acuosa fue separada y tratada con 0,5 mL de isopropanol frío para precipitar el ARN, que se separó por centrifugación (7500 rpm por 5 minutos a 4°C). El precipitado se lavó con etanol y finalmente se disolvió en 50 uL de agua DEPC (dietilpolicarbonato) estéril. La cantidad del ARN obtenido se evaluó por medio de la absorbancia a 260nm y 280nm de una dilución 1:50 del ARN en agua DEPC estéril. El ARN fue tratado con solución de DNAsa para eliminar interferencias por ADN (Castañeda et al., 2006).

El ADNc se sintetizó por retrotranscripción (RT-PCR) a partir del ARN total obtenido y utilizando primers diseñados previamente basados en la secuencia del ARNm para la proteína ASAII reportada en NCBI (M85171). Los primers fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia de la proteína madura y los residuos relacionados con los sitios de unión a manosa (figura 1) (Smeets et al., 1997).

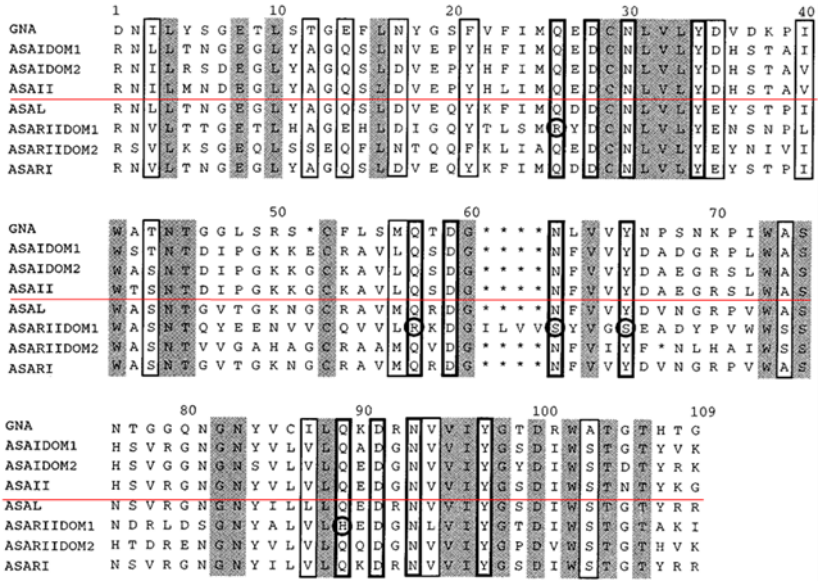


Figura 1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de lectinas de ajo. Se subraya en rojo la secuencia correspondiente a lectina ASAII de ajo. Los aminoácidos idénticos se muestran en gris y los homólogos en cuadros sin relleno con borde oscuro. Los aminoácidos de los sitios de unión a manosa se muestran en cajas sin relleno, con borde claro. (Smeets, et al., 1997).

3.2.2. Diseño de Primers

Partiendo de la secuencia del ARNm de ASA II, código NCBI M85171, se diseñaron los primers (figura 2) usados para la obtención de la proteína recombinante. El diseño se realizó mediante el análisis de la secuencia por varios software que se encuentran disponibles en la red como “restriction mapper” (disponible en: http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl), para encontrar sítios de restricción dentro de la secuencia de nucleótidos; “Rare Codon Calculator” (disponible en http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/) que permitió identificar codones raros o poco usuales que pueden ser un problema en la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* y el programa “Gene runner”, programa de libre acceso en www.generunner.net.

Primers *E. coli*:

XhoI NdeI

asaIICU_F: 5´- **CTCGAGCATATG**ATGCGCAACATTCTGATGAACGACGAAGG-3´

asaII_R: 5´**AAGCTT** **TCA** TCCTTTGTAGGTATTAGTAGACCAAATATC-3'

HindIII

Figura 2. Primers diseñados para la amplificación del gen ASA II.

En el primer de partida se cambiaron 2 codones ya que podían ser un problema en la expresión del gen en *E. coli* (Hénaut y Danchin, 1996). Los codones raros encontrados en la secuencia de nucleótidos fueron: AGG, ATA, que fueron cambiados por CGC y ATT respectivamente y se encuentran demarcados en amarillo en la figura 2.

3.2.3. Condiciones PCR

Para la amplificación de la secuencia se realizó una PCR con las siguientes condiciones experimentales: una denaturación inicial a 95° por 3 min, 35 ciclos que consistieron en una denaturación a 95°C por 30 s, anillamiento a 55°C por 30 s, una primera extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 2 min. El producto obtenido de la PCR fue cortado directamente del gel y se extrajo el ADN con el kit de purificación (GeneJET™ Gel Extraction).

3.2.4. Construcción del plásmido recombinante:

Después de confirmar el tamaño del inserto se sometió a reacción de adenilación con el fin de preparar el inserto para la subclonación con el vector de subclonación PGEM®-T Easy. Para la adenilación se utilizó DNA Taq polimerasa y la reacción se colocó a 72°c por 30 minutos y posteriormente de dejó en hielo hasta su utilización.

El inserto adenilado se purificó con el kit de GeneJET ™ Gel purification y se colocó en reacción de ligación con el vector PGEM®-T Easy, usando ADN ligasa T_4, la relación de vector – inserto fue de 1:3 con el fin de facilitar la ligación. La reacción se realizó según el método descrito por Sambrook y Russell (2001) y teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante (pGEM®-T Easy Kit, Promega) (Anexo 1).

3.2.5. Transformación de Bacterias *E. coli* competentes

Para realizar la transformación de bacterias con el plásmido recombinante obtenido se utilizaron bacterias *E. coli* 5DHα competentes, de acuerdo con lo descrito por Hannan (1983) y Hanahan y colaboradores (1991). Para esto, las células que se encontraban almacenadas en glicerol a -80°C, se colocaron en hielo y se adicionó el inserto recombinante ASA II manteniéndolas en hielo por 30 minutos, posteriormente se realizó choque térmico a 42°C por menos de 2 minutos y se colocó de nuevo en hielo por 5 minutos. Finalmente se le adicionó medio 2TY que contenía triptona al 1.6 %, extracto de levadura al 1% y NaCl al 0.5% y se dejó en incubación a 37°C por 1 hora. Las células transformadas se sembraron en placa con medio 2TY agar ampicilina, *X- gal*, IPTG.

3.2.6. Secuenciamiento

Se tomaron colonias positivas, se realizó un cultivo de 5 mL en medio 2TY a 37 °C toda la noche, posteriormente se extrajo y purificó el ADN plasmídico con el Kit “Gene Jet plasmid Miniprep” y se realizó secuenciamiento automático y se emplearon las herramientas informáticas Chromas v1.4 y BLAST, para el análisis de las secuencias obtenidas.

3.2.7. Clonación del gen *Asa II* en el vector de expresión PAE

Se realizó la digestión del constructo obtenido (PGEM®-T Easy +ASA II) y del vector de expresión PAE, con la enzimas de restricción XhoI, Hind III (ver figura 2, donde se observan los sitios de restricción), y buffer NEB2 que permite que se mantenga la actividad de las dos enzimas. El producto de las digestiones se corrió en gel de agarosa al 1% y se visualizó por irradiación UV en presencia de bromuro de etidio. Las bandas correspondiente al vector PAE y al inserto fueron cortadas directamente del gel, se purificaron y se colocaron a reacción de ligación a 16°C durante toda la noche. El nuevo plásmido recombinante se empleó para transformar bacterias *E. coli* 5DH α competentes de igual forma como se mencionó en el numeral de transformación de bacterias *E coli*, (ver numeral 3.2.5.).

3.2.8. Confirmación de la Transformación

Con el fin de confirmar la transformación de las bacterias *E. coli* se realizó siembra en placa con medio 2TY + ampicilina 0,05 mg/mL (El vector PAE marca resistencia a ampicilina) tanto de vector PAE + *Asa* II, como de vector PAE vacío y se incubaron a 37º C toda la noche. Posteriormente se tomaron las 24 colonias que crecieron y se realizó un

cultivo de 5 mL de medio 2TY ampicilina, para cada colonia y se dejaron en incubación toda la noche a 37ºC con agitación constante.

La confirmación de la transformación de las bacterias *E coli* con la construcción PAE + *Asa* II, se realizó tomando 200 uL de cada cultivo por separado (el resto de cada cultivo se almacenó a 4 ºC), se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto, se tomó el pellet y se extrajo el ADN plasmídico con dos volúmenes de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó cada extracto y se sembró el sobrenadante en gel de agarosa al 1% y se visualizó por irradiación UV en presencia de bromuro de etidio. De igual forma se procedió con 2 colonias de *E coli*., con la construcción PAE vacío.

Por diferencia en la movilidad electroforética observada, se comprobó la presencia del inserto *Asa* II en la construcción PAE + *Asa* II, al comparar las bandas correspondientes a este constructo con respecto al constructo PAE vacío.

Para confirmar la presencia del gen de *Asa* II se tomó uno de los cultivos almacenados a 4 ºC, se centrifugó, el pellet obtenido se trató con el kit de purificación de plásmido (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit), obteniéndose el plásmido purificado y se realizó digestión con enzimas XhoI, Hind III. El producto obtenido se sembró en gel de agarosa 1% y se reveló en un transiluminador UV.

3.2.9. Transformación de Bacterias *E. coli* BL21 (De3) RIL

Se realizó transformación de bacterias *E. coli.* BL21 (De3) RIL, de la misma forma como se mencionó previamente para *E. coli* 5DH α competentes, al sembrar en placa el medio utilizado fue 2YT + ampicilina 0,05 mg/mL + cloranfenicol 0,034mg/mL. El vector PAE

marca resistencia a ampicilina y las bacterias *E. coli* BL21 (De3) RIL marcan resistencia a cloranfenicol.

3.2.10. Expresión del gen *Asa II*

Para la expresión del gen *Asa II*, se tomó una de las colonias de la placa sembrada, se inició cultivo con medio 2YT + ampicilina 0,05 mg/mL + cloranfenicol 0,034 mg/mL, se dejó en incubación a 37°C toda la noche.

Al día siguiente se preparó 1L de medio 2YT + ampicilina 10 mg + cloroanfenicol 34 mg, se adicionó el cultivo iniciado previamente y se colocó a 37°C en agitación constante, se realizaron mediciones de D.O a 600 nm, después de alcanzar 0.6 D.O, se adicionó 0.2 mg de Isopropil Tiogalactósido (IPTG) con el fin de inducir la expresión y se mantuvo a 37°C en agitación constante.

Al transcurrir 3 horas después de la inducción con IPTG, se centrifugó por 30 minutos a 4000 rpm, el sobrenadante se descartó y el pellet se almacenó a -20°C para resuspenderlo posteriormente en PBS 1X.

Estas células se sonicaron en un Ultrasonic Homogenizer Branson W450D durante tres ciclos de un minuto cada uno con pulsos de 0.9 segundos y 0.5 segundos de descanso a 40° de amplitud y se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos y se almacenó el sobrenadante y el pellet por separado. El pellet fue lavado con solución de lavado (úrea 1M), se centrifugó y el pellet obtenido fue resuspendido en solución 8M de úrea.

Se realizó electroforesis en poliacrilamida SDS - PAGE tris Glicina al 15%, de todas las fracciones obtenidas.

3.2.11. Purificación de la proteína recombinante:

Dado que la proteína se encontró en mayor presencia en la fracción insoluble 8M úrea, se tomó dicha fracción y se resuspendió en una solución de renaturación, la cual contenía Tris 50 mM pH 8.0; NaCl 500 mM e imidazol 5mM, en un volumen final de 2 litros.

Posteriormente esta solución se pasó por una columna de afinidad Hi-Trap Protein A (Amersham Pharmacia Biotech), teniendo en cuenta que el vector de expresión PAE permite la expresión de un polipéptido con un número mínimo de 9 aminoácidos (incluyendo una cola de 6 histidinas), fusionados en el N-terminal (cuando se usa XhoI como sitio de clonación). Para la elución de la proteína se utilizó la solución de refolding antes descrita conteniendo diferentes concentraciones de imidazol (20mM, 60mM y 1M). Todas las fracciones fueron colectadas y se corrió gel de electroforesis PAGE SDS.

La lectina recombinante obtenida se cuantificó por el método de ácido Bicinconínico y los ensayos de aglutinación de acuerdo a lo descrito anteriormente en metodología (3.1.6. y 3.1.4.), y con el fin de comprobar reconocimiento por manosa se realizó cromatografía de afinidad de acuerdo con lo descrito en el numeral 3.1.5.3.

3.2.12. Western Blot

La lectina recombinante fue separada en gel de poliacrilamida Tris Tricina SDS PAGE de acuerdo con lo mencionado en el numeral 3.1.7, y transferida a membrana de PVDF

(fluoruro de polivinilideno, BIO-RAD referencia 162-0177), bajo las siguientes condiciones 25v, 100 mA durante 45 minutos en una cámara de transferencia (BioRad) con buffer que contenía Glicina 0.2 M, Tris 25 mM y metanol 20% (v/v).

Finalizada la transferencia la membrana fue incubada durante toda la noche a temperatura ambiente, en solución bloqueo que contenía caseína al 1% p/v en solución de buffer fosfato salino PBS, se lavó con solución de PBS-Tween 20 0.01%p/v y se incubó con una dilución 1:5000 de anticuerpo antihis-tag (generado en conejo) por 2 horas a temperatura ambiente; el exceso de anticuerpo fue retirado mediante lavados con solución de PBS- Tween 20 0.01%p/v y se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo por 1 hora a temperatura ambiente, al igual que el paso anterior, se realizaron varios lavados para retirar el exceso de anticuerpo, finalmente la membrana se reveló en una solución de PBS que contenía Diaminobenzidina (DAB) 1.4mM y peróxido de hidrógeno 15 mM.

3.3. Ensayo Biológico preliminar de actividad insecticida sobre La Polilla Guatemalteca *Tecia solanívora*.

El ensayo biológico preliminar de actividad insecticida de lectinas de ajo, se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Control Biológico del centro de Biotecnología y Bioindustria CBB Corpoica, localizado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca, Colombia).

3.3.1. Procedencia de los insectos

Las larvas de primer instar, necesarias para los bioensayos, se obtuvieron de una cría del insecto mantenida en dieta natural (tubérculos de papa parda pastusa) en el laboratorio de Control Biológico, bajo condiciones de oscuridad a una temperatura ambiente de 19°C y 60% de humedad (Figura 4). Las larvas pertenecían a la tercera generación (F-III) del pie de cría disponible.

Figura 4. Área de cría de *Tecia solanivora.*

3.3.2. Selección de Tubérculos

Para la realización del bioensayo se seleccionaron tubérculos de papa variedad parda pastusa, con un tamaño homogéneo de 90g aproximadamente, sin signos visibles de daño efectuado por *T. solanivora*. Previamente al ensayo, se lavaron y secaron al ambiente (figura 5).

Figura 5. Tubérculos de papa utilizados para los bioensayos sobre polilla guatemalteca *Tecia solanivora*.

3.3.3. Proteínas usadas para los ensayos

Para el presente estudio se contó con dos soluciones de proteína a evaluar: la primera consistió en la proteína nativa, correspondiente a la mezcla de ASAI y ASA II obtenida en la purificación de las lectinas de ajo presentes en el bulbo de ajo (*A. sativum*) y la segunda lectina ASA II recombinante (ASAIIr) obtenida de la expresión en *E. coli.*

3.3.4. Dosis de proteína

Para realizar los ensayos biológicos sobre *T. solanivora*. Se prepararon dosis a partir de las lectinas purificadas, los cuales consistieron en los tratamientos con aplicación de una concentración de 0,3 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,04 mg/mL y 0,02 mg/ mL, para las lectinas purificadas a partir de bulbo de ajo, que para el presente trabajo se denominarán ASA nativa y lectina ASA II recombinante, que para el presente trabajo se denominará ASA IIr. El testigo absoluto consistió en tubérculos sin aplicación.

3.3.5. Aplicación de Lectinas en tubérculos:

La aplicación de las proteínas sobre los tubérculos se realizó mediante la aspersión de cada solución sobre el tubérculo, por un sistema de nebulización (figura 6), aplicando 2

mL sobre cada cara del tubérculo. Se utilizó este sistema debido a que según lo publicado por Carrera (2008), es un método útil y el método mostró reproducibilidad mayor al 95%.

Figura 6. Equipo de nebulización utilizado para realizar la aplicación sobre tubérculos de papa *Solanum tuberosum.*

3.3.6. Diseño Experimental

Se realizó un único ensayo biológico preliminar el cual tuvo un diseño completamente al azar, con once (11) tratamientos, de la siguiente manera: 5 tratamientos corresponden a concentraciones de 0,30 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL y 0,02 mg/mL de las lectinas obtenidas a partir de bulbo de ajo (lectina nativa); 5 tratamientos corresponden a concentraciones de 0,30 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL y 0,02 mg/mL de lectina recombinante y un control negativo. En cada tratamiento se

hicieron cinco (5) réplicas. Cada tratamiento corresponde a un tubérculo con lectina a la concentración evaluada.

3.3.7. Seguimiento y evaluación de los estados de desarrollo del insecto

Larvas: para realizar seguimiento de larvas de *Tecia solanivora*, se utilizaron tubérculos de papa parda pastusa. Después de la aplicación por nebulización, en cada tubérculo se ubicaron 10 larvas neonatas. Cada tubérculo fue ubicado en un recipiente de icopor con su respectiva tapa y un orifico cubierto con muselina negra, tal y como se observa en la figura 7. Se determinó mortalidad en el estado de larvas por parte de cada uno de los tratamientos, el seguimiento se realizó diariamente hasta 25 días después de inicio del ensayo, teniendo en cuenta lo descrito por Torres, 1989; Nortz 1996; Herrera 1997; Alvarez y Trillos, 1999 (ver tabla 1. Duración (días) ciclo de vida de *T. solanivora*), quienes reportan que la duración del período de larva de *T. solanivora* puede durar entre 15 o 20,22 días a temperatura de 17°C y 20°C, respectivamente).

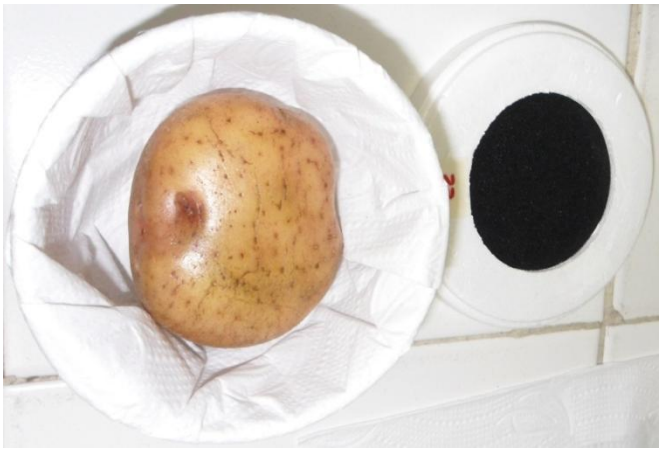


Figura 7. Tubérculo nebulizado con lectina, utilizado para realizar los bioensayos.

Pupas: Con el fin de determinar el efecto de las lectinas de ajo sobre la formación de pupas de *T. solanivora*, es decir larvas que llegaron a cuarto ínstar y desarrollaron capullo, éstas se pesaron teniendo en cuenta su dimorfismo sexual de acuerdo a lo reportado por Rincón y López – Ávila (2004) (figura 8). Se almacenaron en recipientes plásticos separados por sexo; se determinó el efecto de cada tratamiento sobre la superviviencia de pupas de *T. solanivora*. Se clasificaron como muertas pupas que no presentaron movimiento y con una coloración oscura. Se evidenció la mortalidad al constatar la ausencia de emergencia del adulto que provenía de la pupa analizada, se determinó la mortalidad de pupas de *T. solanivora*, pasados 20 días después del inicio de la etapa de pupa de los insectos que sobrevivieron a la etapa de larva, teniendo en cuenta lo descrito por Torres, 1989; Nortz 1996; Herrera 1997; Alvarez y Trillos, 1999 (ver tabla 1. Duración (días) ciclo de vida de *T. solanivora*), quienes reportan que la duración del período de pupa de *T. solanivora* puede durar entre 10 y 20 días, a temperatura de 17° y 20°C, respectivamente.

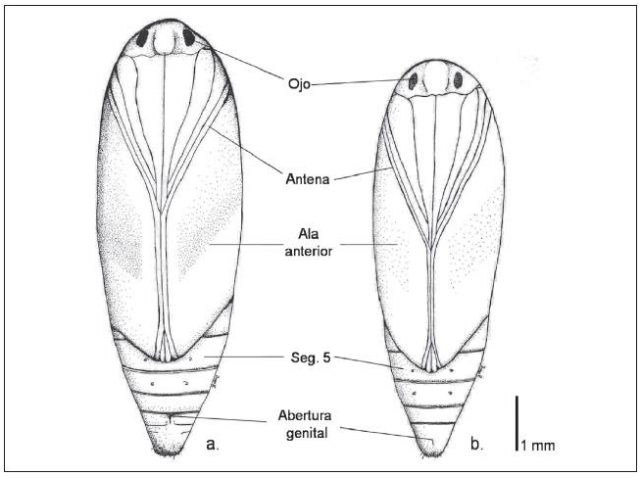


Figura 8. Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora*. Vista ventral a.Hembra. b. Macho. Tomado de Rincón y López-Ávila, 2004.

Huevos: con el fin de evaluar parámetros reproductivos de *T. solanivora*, se confinaron en recipientes de vidrio los adultos recién emergidos, cada recipiente fue acondicionado

con algodón impregnado con solución de miel al 15%. La boca de los recipientes se cubrió con muselina y se aseguró con bandas elásticas. Estos se colocaron boca abajo sobre papel absorbente para colectar las posturas del insecto (figura 9). Se determinó la fecundidad entendida como el número de huevos puestos por hembra y la fertilidad entendida como el número de larvas que emergieron de los huevos puestos por cada hembra después de 10 días de la postura de acuerdo a lo descrito por Torres (1989); Nortz (1996); Herrera (1997); Alvarez y Trillos (1999), quienes reportaron que el período de huevo puede durar de 10 a 7 días después de la postura, a temperatura de 17 a 20°C, respectivamente (ver tabla 1).

Figura 9. Recipientes de vidrio con adultos de *Tecia solanivora*, recién emergidos.

3.3.8. Tratamiento estadístico

Por tratarse de una repuesta dicotómica a dos niveles (“positivo o negativo”) se utilizó un modelo de regresión logística (Agresti, 1990).

Se planteó el modelo logit con dos factores, uno que indica la proteína con la cual se trabaja (lectina nativa, lectina ASA II recombinante) y otro que indica la etapa o fase del

experimento en que se encuentra (larva, pupa, huevo) y una variable auxiliar que indica el nivel o concentración (mg/mL) de proteína que es aplicado al individuo indicado.

En este caso se quiso explicar la variable de mortalidad asociada a dos opciones cualitativas denominadas éxito o fracaso, las cuales se denotan con valores de 1 y 0. Para analizar la probabilidad de que el insecto murió o no murió por el efecto de la lectina y existiendo únicamente dos opciones: murió, que para este caso fue éxito y se denotó con el valor de 1; y 0 que en este caso consistió en fracaso, no murió.

Se utilizó el programa R versión libre 2.12.2 (2011-02-25) para correr el modelo estadístico logit. Se empleó el siguiente modelo de regresión logística:

$$Y_k \sim Ber(\pi_k)$$

$$log\left(\frac{\pi_k}{1-\pi_k}\right) = \beta + \beta_1 X_{1k} + \beta_2 X_{2k} + \beta_3 X_{3k} + \beta_4 X_{4k} + \beta_5 (X_{1k} * X_{2k}) +$$

$$\beta_7 (X_{1k} * X_{3k}) + \beta_8 (X_{1k} * X_{4k}) + \beta_9 (X_{2k} * X_{4k}) + \beta_{10} (X_{3k} * X_{4k}) + \beta_{11} (X_{1k} * X_{2k} * X_{4k}) + \beta_{12} (X_{1k} * X_{3k} * X_{4k})$$

Donde Log (π_κ/ 1 - π_κ): probabilidad de resultados

β, β_1, β_2, β_{12} = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística.

Y_k = 1 si está muerto.

Y_k = 0 si no está muerto.

X_{1k} = nivel de concentración de lectina (mg/ml) aplicado.

X_{2k} = 1 si el individuo k se encuentra en estado de pupa.

X_{2k} = 0 si el individuo k no se encuentra en estado de pupa.

X_{3k} = 1 si el individuo k se encuentra en estado de huevo.

X_{3k} = 0 si el individuo k no se encuentra en estado de huevo.

X_{4k} = 1 si el individuo k se le aplicó lectina ASA II recombinante.

X_{4k} = 0 si el individuo k no se le aplicó lectina ASA II recombinante.

Se estimaron todos los términos de la ecuación (β, β_{12}) y se tuvieron en cuenta los de mayor significancia para los resultados.

4. Resultados y Discusión

4.1 Obtención Proteína nativa

4.1.1. Precipitación de las lectinas de ajo

De acuerdo con los resultados obtenidos (tabla 4), se escogió la fracción 40-60%s, debido a que contenía la mayor cantidad de proteína 10mg/mL y presentó una mayor actividad aglutinante; además estos resultados concordaron con lo reportado por Defilpo y Mestrallet, (1996), quienes encontraron que las lectinas de ajo se encontraban en las fracciones de globulinas que precipitaban entre 40% - 60%s y presentaban mayor título de eritroaglutinación (Figura 10); dichas fracciones almacenadas a -20°C conservaron su actividad total hasta seis meses. Finalmente se decidió almacenar las fracciones de 0-20%s y de 20-40%s; y trabajar directamente con la fracción correspondiente al 60%s.

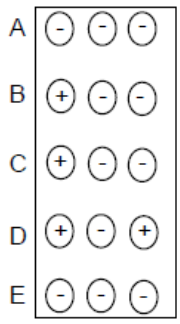


Figura 10. Observación de la actividad eritroaglutinante en placa, donde se observan en la fila **A,** controles negativos con PBS. **B** fracción de precipitación de 0-20%s con $(NH_4)_2$ SO_4. **C** fracción de precipitación de 20-40%s con $(NH_4)_2$ SO_4. **D** fracción de precipitación de 40-60%s con $(NH_4)_2$ SO_4. **E** sobrenadante fracción 60%s con $(NH_4)_2$ SO_4.

Debido a las diferencias encontradas con los ensayos de aglutinación de conejo, no fue posible determinar el título de cada una de las fracciones, en consecuencia no se pudo evaluar el rendimiento ni el grado de purificación de la lectinas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Van Damme, et al. (1991).

Tabla 4. Fracciones precipitadas con sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$. Se muestra la cantidad de proteína, la actividad y el volumen total de las fracciones obtenidas

MUESTRA	VOLUMEN (mL)	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (mg/mL)	CANTIDAD DE PROTEÍNA (mg)	ACTIVIDAD AGLUTINANTE
EXTRACTO CRUDO	180	~12,0	1200	+++
Pellet 0-20%	20	1,3	26	+
Pellet 20-40%	20	0,6	12	+
Pellet 40-60%	60	10,0	600	++

Se tomaron alícuotas de las diferentes fracciones, así como del extracto crudo y fueron sometidas a SDS-PAGE. Las proteínas observadas en el extracto crudo (carril 2, figura 11), son de un amplio rango de peso molecular encontrándose la mayoría debajo de 66 kDa. En este caso es importante observar las bandas abajo de 45 kDa, indicándose allí la posible presencia de las lectinas ASA I y ASA II, lectinas que se encuentran en los bulbos de ajo, según lo reportado por Van Damme y colaboradores (1991) y que están conformadas así: ASA I un heterodímero compuesto por subunidades de 12,5 kDa y 11,5 kDa y ASA II un homodímero compuesto de dos subunidades de 12 kDa (Van Damme et al., 1991) (Kaku et al., 1992). En el carril 3 (fracción de la precipitación 60%s $(NH_4)_2$ SO_4, se observa menor cantidad de proteínas de alto peso molecular, y mejor actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo (Figura 10).

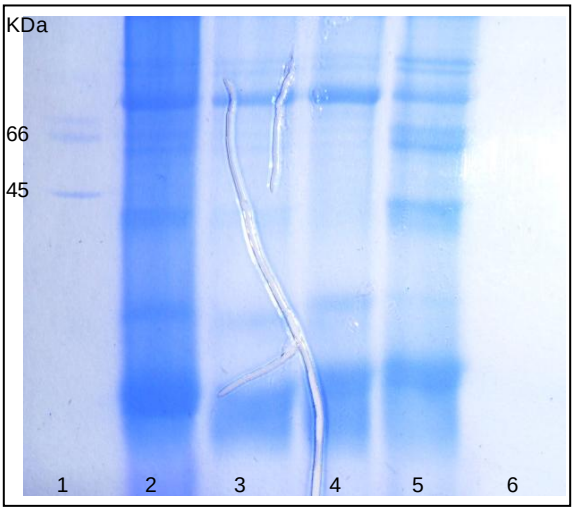


Figura 11. Electroforesis de las fracciones de extracción y precipitación fraccionada de lectinas a partir de bulbos de ajo *A. sativum*. Electroforesis realizada en condiciones reductoras SDS PAGE al 12%, en cada carril se sembró 10 ug de proteína. Orden de los carriles: 1. Marcadores de peso molecular Albúmina 66 kDa, Ovoalbúmina 45 kDa (preparados en el laboratorio de investigación en proteínas); 2. Extracto crudo 3. Fracción precipitación 0-20%s; 4. Pellet precipitación 40-60%s; 5. Pellet precipitación al 20-40%s, y y 6. Sobrenandante 60%s.

4.1.2. Purificación de lectinas de bulbos de ajo

Se realizaron ensayos de elución con PBS en concentraciones de 200 mM, 300mM, y 500mM de NaCl. En la figura 12, se observa el perfil cromatográfico obtenido cuando se eluyó la fracción obtenida de la precipitación al 40-60%s por la columna de intercambio aniónico DEAE, los resultados arrojaron que la fuerza iónica de 300mM de NaCl fue la que presentó la mejor actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo; Adicionalmente por electroforesis se observó una única banda en condiciones reductoras que corresponde con lo reportado por Van Damme et al., (1991). Por lo tanto para las demás

cromatografías de intercambio iónico se hizó una única elución con PBS-300mM de NaCl y posteriormente se lavó la columna con PBS-1M NaCl, esta fracción de lavado se descartó.

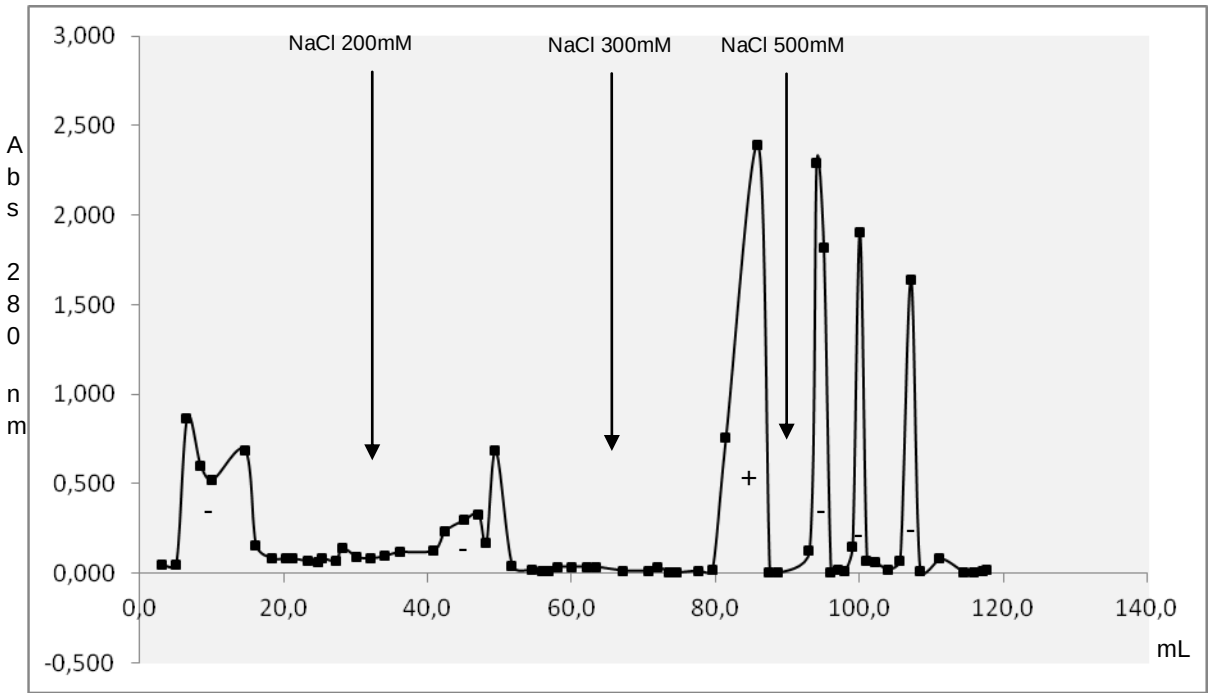


Figura 12. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico DEAE-celulosa sobre fracción obtenida de precipitación al 40-60%s con sulfato de amonio. Las flechas indican la concentración de sal usada para eluir cada una de las fracciones obtenidas. En cada uno de los picos se muestra el resultado obtenido en ensayo de aglutinación de cada una de esas fracciones. (+) Indica actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo.

En la figura 13, se muestra el perfil característico obtenido en la purificación del lectinas de ajo por Cromatografía de intercambio aniónico, se observan dos picos resueltos referidos como fracción no retenida y fracción retenida; se colectaron estas dos fracciones como se mencionó en la metodología.

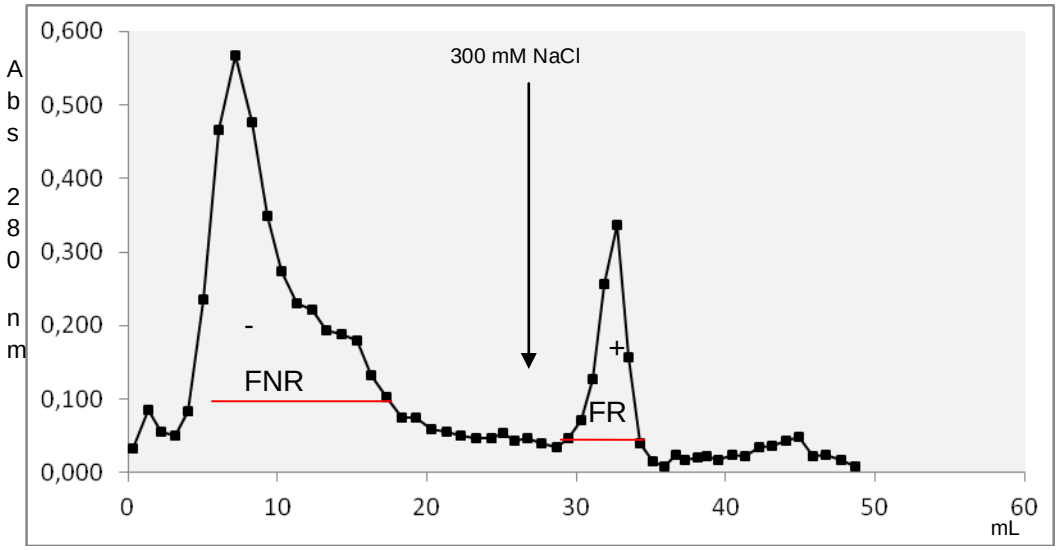


Figura 13. Perfil cromatográfico característico de intercambio aniónico DEAE-celulosa, sobre fracción obtenida por precipitación con 40-60%s de sulfato de amonio. La flecha indica la concentración de sal usada para eluir la fracción retenida. En cada uno de los picos se muestra el resultado obtenido en ensayo de aglutinación. (+) indica actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo.

En la figura 14 se observa el perfil electroforético de las fracción retenida y eluída con 300mM NaCl, se obtuvó una banda menor a 14 kDa (carriles 2 y 4 A; 1 B), lo cual era de esperarse teniendo en cuenta lo publicado por Van Damme et al., (1991) y Kaku et al., (1992), donde se reporta que en los bulbos de ajo se encuentran dos isoformas de lectinas (ASAI: un heterodímero que contiene un polipéptido de 11,5 kDa y un polipéptido de 12,5 kDa, mientras que ASAII: un homodímero que contiene dos polipeptidos de 12 kDa), podemos referirnos que la banda mostrada (figura 14 B) corresponde a la mezcla de los monómeros de las lectinas presente en los bulbos de ajo. Con el fin de determinar un valor más preciso en cuanto al peso molecular relativo se realizó una corrida electroforética utilizando marcadores de bajo peso molecular (figura 14B), donde se comprobó que el peso molecular relativo de la banda corresponde a 13KDa (Movilidad Relativa Anexo 2).

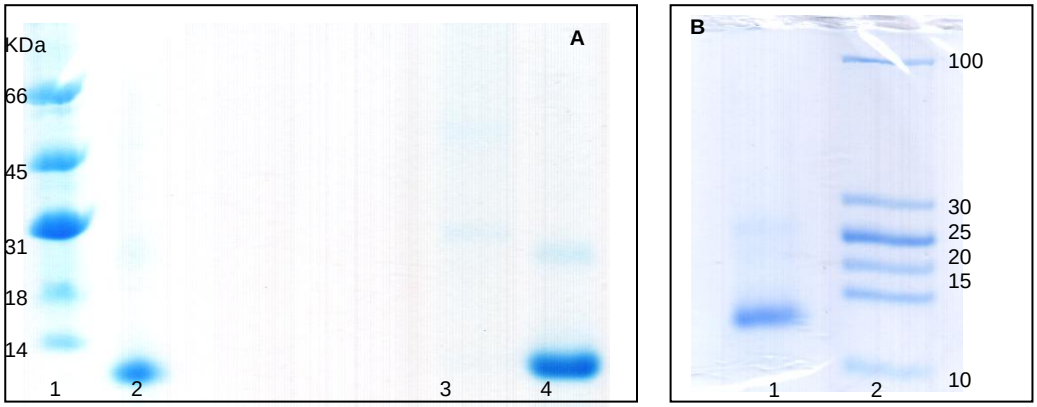


Figura 14. Electroforesis SDS PAGE tris tricina al 12%, lectinas purificadas por precipitación al 40-60%s con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico, a partir de extracto de bulbo de ajo (*A. sativum*). **A**. Carril 1 marcador de peso molecular Albúmina 66 kDa, Ovoalbúmina 45 kDa, Lactato deshidrogenasa 35 kDa, β-Lactatoglobulina 18 kDa y Lizosima 14 kDa (preparados en el laboratorio de investigación en proteínas). Carriles 2 y 4 fracción retenida cromatografía intercambio iónico, carril 3 fracción no retenida. **B**. carril 1 fracción retenida cromatografía de intercambio iónico; carril 2 marcador de peso molecular marca (Thermo scientific). En todos los ensayos se sembró 10ug de proteína.

Con el fin de corroborar la especificidad de estas proteínas por manosa se realizó cromatografía de afinidad.

4.1.3. Cromatografía de Afinidad Sepharosa 4B- Manosa

En la figura 15 se observa una fracción no retenida y una fracción retenida, esta estrategia de elución nos indica que la fracción retenida interactúa con la manosa expuesta en el soporte y esto es corroborado por la elución con PBS 200mM de manosa. En cuanto a la fracción no retenida nos indica la saturación del soporte, cabe anotar que no se hicieron ensayos adicionales de reconocimiento con otros carbohidratos, derivados de manosa por la dificultad de realizar ensayos de inhibición con eritrocitos de conejo.

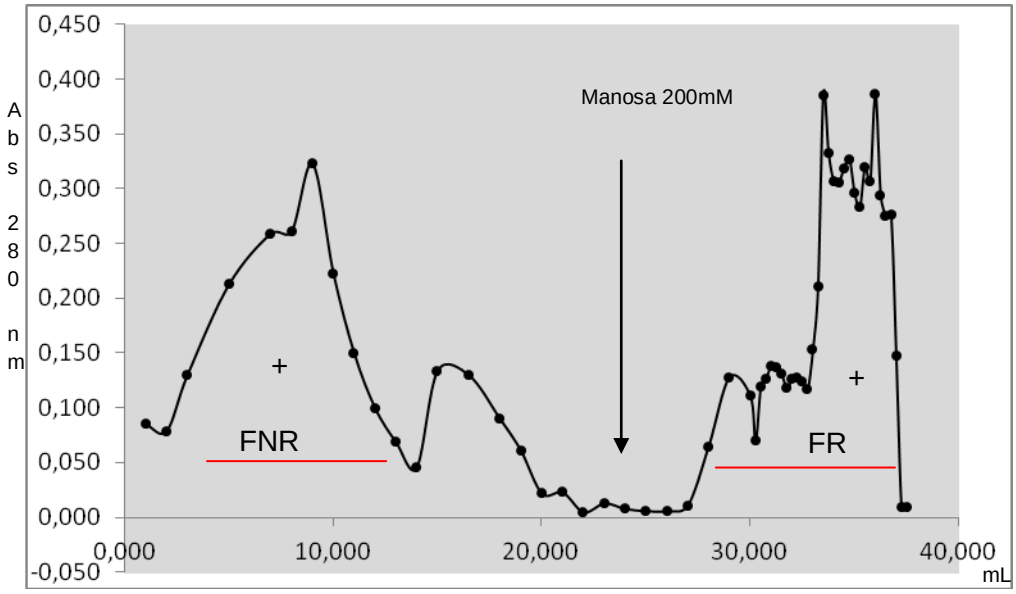


Figura 15. Perfil cromatográfico de afinidad sobre manosa-sepharosa 4B. Lectinas purificadas a partir de bulbos de ajo (A. sativum). La actividad aglutinante (+) se observa en las dos fracciones obtenidas.

4.1.4. Punto Isoeléctrico.

Con el fin de comprobar la presencia de las lectinas presentes en bulbo de ajo ASA I y ASA II (Van Damme et al., 1991 y Kaku et al., 1992) se realizó una electroforesis bidimensional de acuerdo con lo descrito en metodología (3.1.8); sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados; ya que se esperaba observar dos spots separados que evidenciaran la presencia de las dos isoformas (figura 16.). Este resultado no fue contundente debido a una baja resolución del ensayo. Se requeriría realizar la separación empleando IPG discontinuos o en una zona restringida de pH (3 a 5); por lo tanto se realizó un isoelectroenfoque para observar la presencia de las dos lectinas.

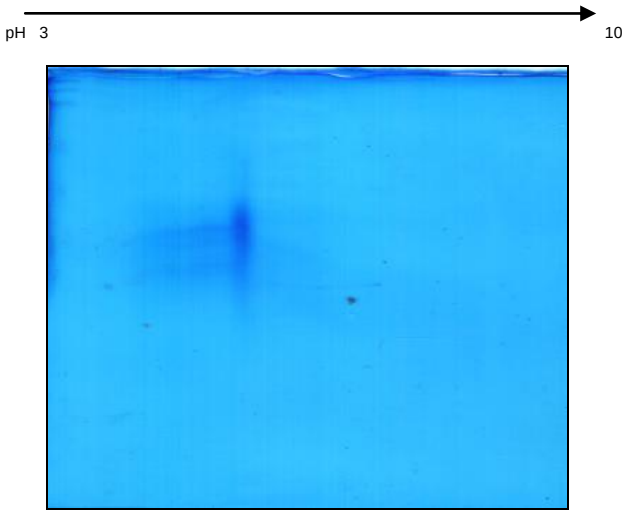


Figura 16. Electroforesis bidimensional de lectinas de bulbo de ajo (*A. sativum*).

En la figura 17, se observan dos bandas lo que nos confirma la presencia de las dos lectinas y concuerda con los datos reportados por Van Damme y colaboradores (1991). En este trabajo se estableció que existe diferencia respecto al punto isoeléctrico de las dos lectinas, ya que se encontraron dos bandas bien definidas una en 3.9 y la otra en 4.2 (Movilidad relativa Anexo 3).

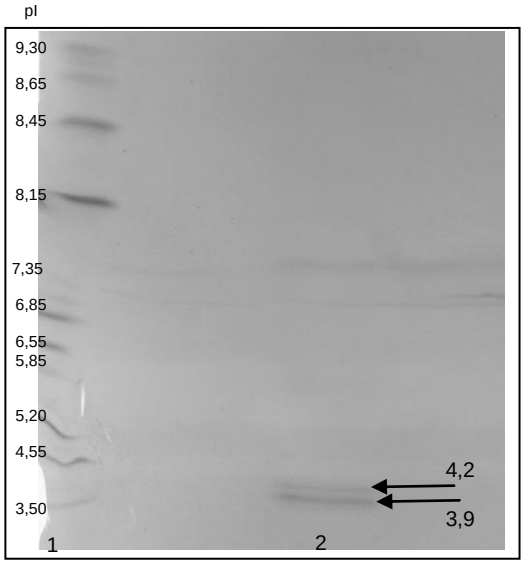


Figura 17. Isoelectroenfoque. Carril 2 lectinas purificadas a partir de bulbos de ajo de (*A. sativum*). Carril 1, marcador de punto isoeléctrico. Las flechas indican el punto isoeléctrico de las proteínas que se encuentran en la fracción purificada.

El porcentaje de proteína recuperada en cada uno de los pasos del proceso de purificación, respecto a la proteína total inicial, se observa en la tabla 5. Se obtuvieron 12 mg de lectinas de ajo a partir de 100g de bulbos liofilizados.

Tabla 5. Resumen del proceso de purificación de Lectinas purificadas de bulbo de ajo (*A. sativum*).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (mg/mL)	CANTIDAD DE PROTEÍNA (mg)	ACTIVIDAD AGLUTINANTE	PORCENTAJE DE PROTEÍNA RESPECTO A PROTEÍNA TOTAL
EXTRACTO CRUDO	12,0	1200	+++	100%
Pellet 0-20%	1,30	26	+	2,17%
Pellet 20-40%	0,60	12	+	1%
Pellet 40-60%	10,00	600	++	50%
DEAE-celulosa Fracción retenida	0,97	12	++	1%

4.2. Obtención proteína Recombinante

4.2.1. Amplificación del gen *Asa* II

Al utilizar los primers diseñados, se obtuvo por RT-PCR un fragmento que se visualizó en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se reveló en un transiluminador uv, (figura 18). Este fragmento se encontró localizado entre 400 y 300 bp, correspondiendo en tamaño con el fragmento esperado de 330 bp, por lo cual se confirmó la amplificación del gen con los primers diseñados.

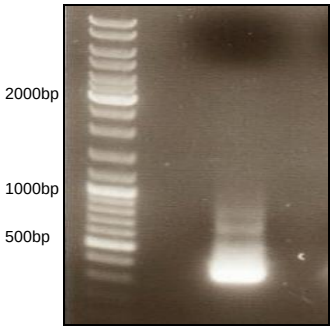


Figura 18. Amplificación del gen *Asa* II en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio visualizado en UV. Se utilizó marcador de pares de bases fermentas®.

El fragmento de ADN obtenido fue cortado y extraído para ser adenilado tal como se mencionó en la metodología numera 3.2.4.

4.2.2. Clonación

La transformación de bacterias *E. coli* 5DHα competentes, se determinó gracias a que el vector PGEM-T easy presenta la región de policlonaje, en medio del gen lacz, mediante esta característica se identificaron las colonias que han insertado el fragmento, obteniendo así colonias positivas para la clonación, color blanco, por el contrario colonias azules dan negativo, es decir han expresado la β-galactosidasa, enzima es capaz de hidrolizar un sustrato análogo de la lactosa, *XGal*, que se encontraba en el medio. Además el vector posee gen de resistencia a Ampicilina (Amp^R), otra característica que se utilizó, ya que el medio contenía ampicilina.

Se utilizaron colonias positivas para realizar el secuenciamiento automático, numeral 3.2.6. Al realizar el análisis de los cromatogramas obtenidos por medio de la herramienta chromas v1.4 se encontró un porcentaje de identidad del 89% entre la secuencia obtenida por secuenciación y la secuencia de partida publicada en la base de datos antes

mencionada (figura 19). De acuerdo con este resultado se concluyó que la clonación fue satisfactoria y se prosiguió el proceso de expresión de la lectina.

```
>lcl|32451
Length=330

 Score =   398 bits (215),  Expect = 1e-115
 Identities = 294/332 (89%), Gaps = 6/332 (2%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AACATTCTGATGAACGACGATTTGCCCGTACGCAGGCCAAAAAATGGATGTGGAATCGTA  60
            ||||| |||||||||||||||   | | |||||||||||||||     | |||||||||| |||
Sbjct  4    AACATACTGATGAACGACGA-AGGTCTGTACGCAGGCCAATCCCTAGATGTGGAACCGT-  61

Query  61   ATCCT-TTATAATGCAGAAAGACTGCAACCTTGTGCTGTACGACCACAGCACTGCCGTCT  119
            | | | |||||||||||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  62   ACCATCTTATAATGCAGGAAGACTGCAACCTCGTGCTGTACGACCACAGCACTGCCGTCT  121

Query  120  GGGCCTCAAACACTGACATCCCCGGaaaaaaaGGATGCCAGGCGGTGCTGCAGTCTGATG  179
            || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  122  GGACCTCAAACACTGACATCCCCGGAAAAAAAAGGATGCAAGGCGGTGCTGCAGTCTGATG  181

Query  180  GCAACTTTGTGGTCTACGATGCTGAGGGGCGTTCCCTCTGGATGAGTCACAGTGTTTTTT  239
            |||||||||||||||||||||||| || || |||||||||||||    ||||||||||||
Sbjct  182  GCAACTTTGTGGTCTACGATGCCGAAGGACGTTCCCTCTGGGCCAGTCACAGTGTAAGAG  241

Query  240  GTGAATGGAAACTATGTCCTGGTGCTTCATGAGGACGGGAACGTTGTCATTTACGGATCT  299
            | |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  242  G-GAATGGAAACTATGTCCTGGTGCTTCAAGAGGACGGTAACGTTGTCATTTACGGATCT  300

Query  300  GATATTTGGACCTACTAATACCATACACAGGA  331
            ||||||||| | |||||||||| |||| ||||
Sbjct  301  GATATTTGGTC-TACTAATACC-TACAAAGGA  330
```

Figura 19. Alineamiento de las secuencias de la proteína madura ASA II publicada y la proteína recombinante ASA II.

4.2.3. Digestión del inserto

La digestión del constructo obtenido (PGEM-T Easy + *Asa* II) se realizó con las enzimas de restricción *XhoI* y *Hind III*, y se confirmó el tamaño del fragmento (330 pb), además se realizó la digestión del vector PAE con el fin de linealizar el vector para realizar la reacción de ligación con el inserto digerido (figura 20).

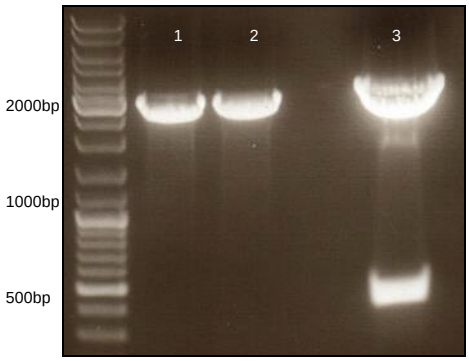


Figura 20. Digestión del vector PAE y la construcción PGEM®-T Easy *Asa* II. El orden correspondiente en el que aparecen las bandas es: 1. PAE vacio 2.PAE vacio y 3. PGEMT+ *Asa* II.

Las bandas correspondientes al vector PAE y al inserto *Asa* II digeridos fueron cortadas directamente del gel de agarosa, purificadas y usadas para la transformación de bacterias *E. coli* 5DHα competentes (ver metodología numeral 3.2.5.).

En la figura 21 se observa el gel de agarosa con muestras de ADN extraído de las colonias que mostraron crecimiento en la placa tanto en la construcción PAE + *Asa* II, como con el vector vacío. En los extremos del gel se sembraron muestras correspondientes al vector vacío y las demás muestras correspondieron a clones positivos de la construcción PAE + *Asa* II. Al observar la movilidad electroforética, se evidencia que los clones que contenían el inserto corrieron menor distancia en comparación con los clones que contenían el vector vacío PAE; el resultado de esta electroforesis sugirió que dichos clones (carriles 2 al 13) efectivamente contenían el inserto *Asa* II.

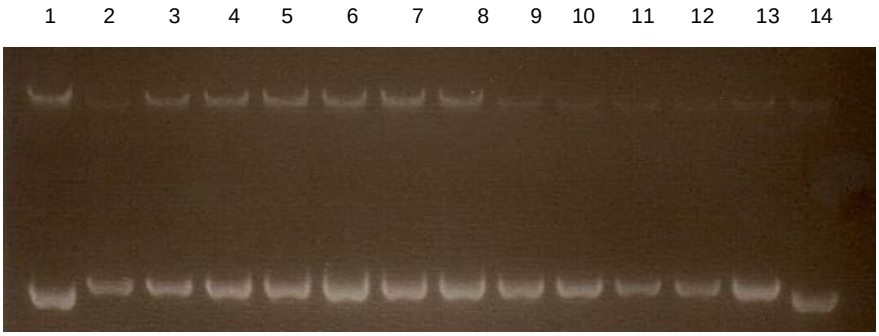


Figura 21. Selección de clones positivos construcción PAE + *Asa* II. En los extremos del gel de agarosa al 1%, se sembraron muestras de ADN extraído de clones con vector vacío, las demás muestras corresponden a clones positivos de la construcción PAE + *Asa* II.

En la figura 22. Se observa el gel de agarosa al 1% donde se realizó electroforesis de dos clones positivos (carriles 6 y 7, figura 21), que fueron digeridos con enzimas de restricción XhoI, Hind III. En esta figura se observan dos bandas correspondientes a 2000 pb y 350 pb, estos resultados confirmaron lo esperado teniendo en cuenta que el vector vacío tiene un tamaño de 2,8 Kb (Ramos et al., 2004) y el inserto de 330 bp.

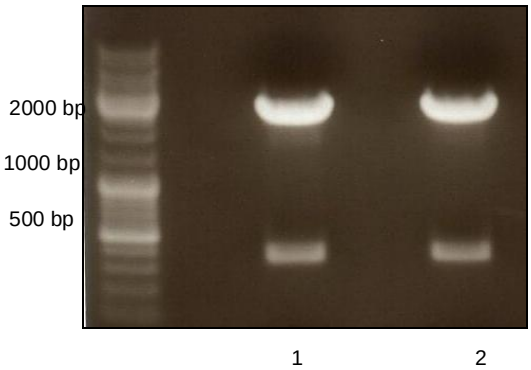


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 1% para identificación del inserto correspondiente a Asa II.

4.2.4. Expresión de *Asa II*

Confirmado el inserto en la construcción con el vector PAE, se realizó la transformación de Bacterias *E. coli* BL21 (De3) RIL, de acuerdo con lo descrito en metodología numeral 3.2.9.

En la figura 23, se muestra el perfil electroforético de las fracciones obtenidas después de la expresión de la proteína ASA II en *E.* coli., se puede observar en el carril 1 correspondiente a la fracción soluble no se observan bandas debajo de 18 KDa, mientras que al observar el carril 3 correspondiente a la fracción insoluble (solubilizada en solución 8M de urea), se presentó una banda significativa por debajo de 14KDa, a partir de este resultado se concluyó que la proteína no se encontraba en la fracción soluble, lo que sugirió que la expresión de esta proteína se dio en forma de cuerpos de inclusión. De acuerdo con este resultado se optó por utilizar una solución renaturante, de acuerdo con lo mencionado en metodología numeral 3.2.11., y se continúo con la purificación de la proteína.

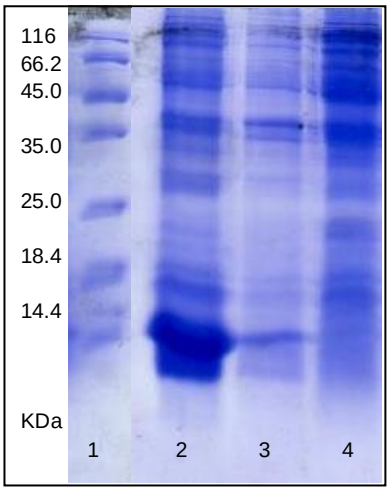


Figura 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE SDS 15%, fracciones obtenidas después de la expresión de ASA II. Carril 1. Marcadores de peso molecular (marca

fermentas) 2. Sobrenadante; carril 3. Lavado 1M urea; y carril 4. Pellet resuspendido en 8M urea.

4.2.5. Purificación de ASA IIr

La proteína ASA IIr, fue purificada en columna de afinidad con Ni, aprovechando la afinidad del níquel por la cola de histidina. En la figura 24, se muestra el perfil electroforético correspondiente a las diferentes fracciones colectadas eluídas con imidazol en diferentes concentraciones, es importante observar que en el carril 6 y 7 se observa una banda característica debajo de 14 KDa. Las fracciones correspondientes a los carriles 5, 6, 7y 8 fueron colectados en una sola fracción y se dializaron contra PBS tres veces, finalmente fue liofilizada y nuevamente resuspendida en PBS.

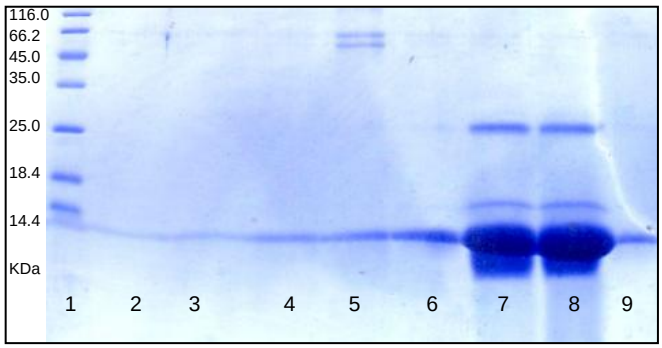


Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE SDS 15%, fracciones obtenidas después de la expresión de ASA II. Carril 1. Marcadores de peso molecular (marca fermentas). Carril 2. Fracción no retenida; Carril 3. Fracción eluída con 20mM imidazol; carril 4. Fracción eluída con 60mM imidazol. Carril 5. Fracción 3 eluída con 1M imidazol; carril 6. Fracción 5 eluída con 1M imidazol; carril 7. Fracción 7 eluída con imidazol 1M; carril 8. Fracción 9 eluída con imidazol 1M; carril 9. Fracción 11 eluída con imidazol.

En la figura 25 se observa el perfil electroforético de la lectina recombinante que fue purificada, la banda observada en el carril fue identificada por western blot teniendo en

cuanta que ésta contenía una región amino terminal de histidinas y que se puede reconocer por un anticuerpo anti-His. De esta manera se determinó el peso molecular relativo de 11KDa (Movilidad relativa Anexo 4). A partir de estos resultados se concluyó que la proteína ASA II, fue expresada en *E. coli.*

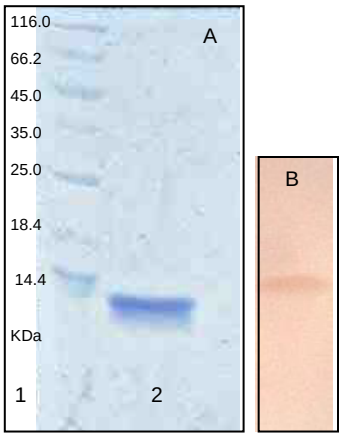


Figura 25. Lectina Recombinante. A. Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE SDS 15% de proteína ASA II recombinante. Carril 1 marcadores de peso molecular (Marca Fermentas). B. Western blot lectina recombinante ASA II.

Con el fin de evaluar la capacidad de la lectina de reconocer manosa, característica que indirectamente se puede relacionar con actividad, se realizó una cromatografía de afinidad sobre manosa-sepharose 4B, de acuerdo con lo descrito en la metodología numeral 3.1.5. En la figura 26 se muestra el perfil obtenido de la cromatografía de afinidad de la lectina ASA II, donde se observa claramente una fracción no retenida y una fracción retenida, dicha fracción sugiere que efectivamente la lectina ASA II recombinante reconoció manosa, característica indispensable para los ensayos biológicos.

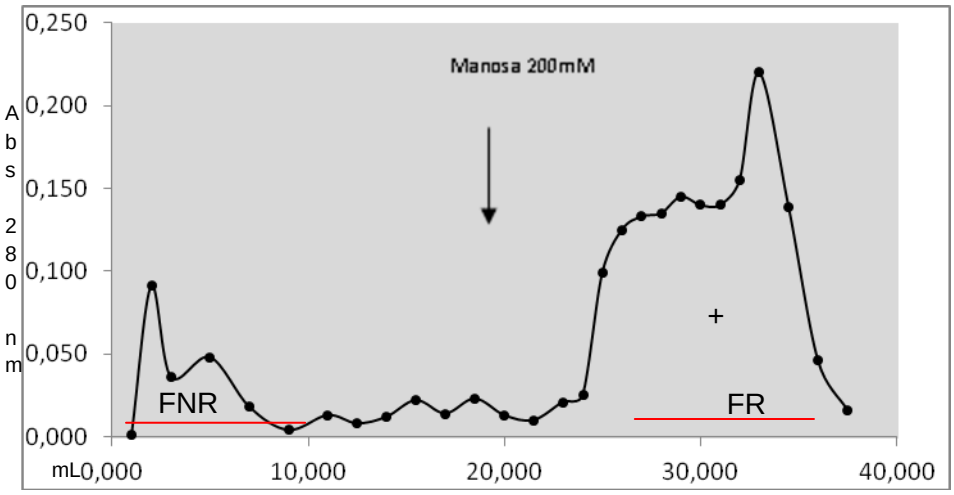


Figura 26. Cromatografía de afinidad sobre manosa-sepharose 4B. lectina ASA II recombinante. La actividad aglutinante de la FR fue determinada (+).

Es importante mencionar que aunque no se consiguió purificar ASA II a partir de bulbos de ajo, debido a que en los bulbos encontramos tanto ASA I como ASA II y la similitud tanto de peso molecular, como de punto isoeléctrico impidió su separación, los resultados obtenidos a partir de la purificación de la mezcla de lectinas (ASAI y ASAII) nativas mostraron dos características muy importantes como lo es la capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo y la de reconocer manosa, las cuales están relacionadas con actividad y teniendo en cuenta que se confirmó la presencia de sólo estas dos lectinas, se decidió su uso para la realización del biensayo sobre la Polilla de papa *Tecia solanivora.*

Por otro lado después de la purificación de lectina ASA II expresada en *E. coli*., al analizar los resultados se concluyó que podía utilizarse en la realización del bioensayo, teniendo en cuenta que presentó capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo y de reconocer manosa.

Finalmente estas dos soluciones de proteínas fueron usadas para la realización del ensayo biológico sobre sobre la Polilla de papa *Tecia solanivora.*

4.3. Ensayo Biológico preliminar sobre Polilla Guatemalteca *Tecia solanivora*

Con el fin de evaluar el efecto bioinsecticida preliminarmente de la mezcla de lectinas nativas de ajo (ASAI y ASAII) y la lectina ASA II recombinante, se realizó un bioensayo con *T. solanivora*.

4.3.1. Evaluación preliminar del efecto de lectinas ASA sobre larvas *T. solanivora.*

El mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *T. solanivora* se presentó en 0.08 mg/mL de concentración con 79.54% de mortalidad para el caso de las lectinas nativas; y 70.45 % de mortalidad en 0.15 mg/mL de concentración de lectina ASA II recombinante,en comparación con la mortalidad observada en el testigo absoluto (48%); sin embargo no se observó una relación proporcional en cuanto al incremento de la mortalidad de larvas con el aumento de la concentración. Esto impidió que se utilizara el método Probit con el fin de determinar concentraciones letales (Tabla 6).

Tabla 6. Mortalidad de larvas de *T. solanivora* ante cada una de las concentraciones de lectina nativa (ASAI-ASAII) y lectina recombinante usadas en el ensayo. En cada réplica se utilizó n=10 larvas.

Concentración Lectina nativa mg/mL	Mortalidad %	Concentración Lectina ASA II recombinante mg/mL	Mortalidad %
0.02	64.44	0.02	66.66
0.04	57.77	0.04	52.17
0.08	79.54	0.08	46.80
0.15	69.56	0.15	70.45
0.3	64.44	0.3	50.00

4.3.2. Evaluación preliminar del efecto de lectinas ASA sobre pupas de *T. solanivora*

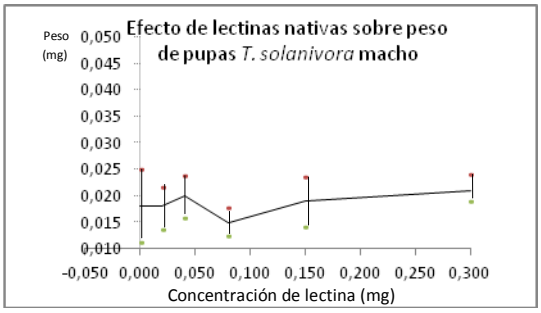
Con el fin de evaluar preliminarmente el efecto e impacto de las lectinas nativas y ASA II recombinante sobre el estado de pupa de *T. solanivora*, se pesaron pupas obtenidas en cada uno de los tratamientos, y se clasificaron de acuerdo al sexo. El factor de peso de pupa se utiliza como indicador de desarrollo de los insectos, y cualquier efecto causado por factores extremos se puede evidenciar en el peso de este estado. En la tabla 7 se presentan los datos de peso (prom. ± Desviación estándar).

Tabla 7. Peso de pupas de *T. solanivora* (promedio ± desviación estándar), de acuerdo con el tratamiento.

Tratamiento mg/mL	peso hembras ± SD (g)	peso machos ± SD (g)
0,000 **control**	0,028 ± 0,005	0,018 ± 0,007
0,300 N	0,032 ± 0,004	0,021 ± 0,026
0,150 N	0,034 ± 0,008	0,019 ± 0,005
0,080 N	0,031 ± 0,004	0,015 ± 0,003
0,040 N	0,033 ± 0,006	0,020 ± 0,004
0,020 N	NP	0,018 ± 0,004
0,300 R	0,031 ± 0,005	0,020 ± 0,005
0,150 R	0,032 ± 0,006	0,022 ± 0,003
0,080 R	0,033 ± 0,005	0,020 ± 0,004
0,040 R	0,025 ± 0,007	0,020 ± 0,004
0,020 R	0,033 ± 0,008	0,020 ± 0,002

N: Proteínas nativa purificada a partir de bulbos de ajo *A. sativum.*
R: Proteína ASA II recombinante.
N.P. : No se obtuvieron datos en esa concentración.

El efecto de las lectinas de ajo sobre el peso de pupas de *T. solanivora* machos y hembras se observa en la figura 27 y figura 28. El peso promedio de pupas macho en el control (testigo absoluto) fue de 0.018 ± 0.007 mg; en los tratamientos evaluados no se observa ninguna variación significativa en cuanto a peso de pupas macho, así como tampoco se observó variación en peso de pupas hembras del testigo absoluto a los tratamientos realizados tanto con lectina nativa como lectina ASA II recombinante.



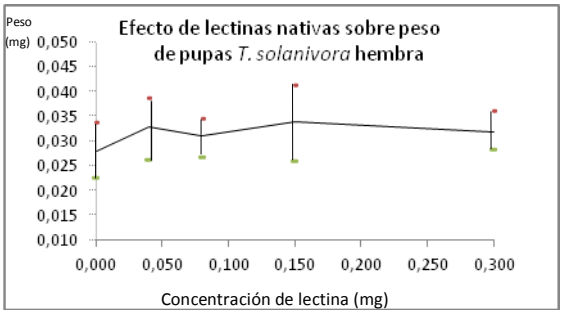


Figura 27. Efecto de lectinas nativas de ajo *A. sativum* sobre peso de pupas de *T. solanivora* hembras y machos. La barra sobre cada punto indica la desviación estándar establecida y mencionada en la tabla 7.

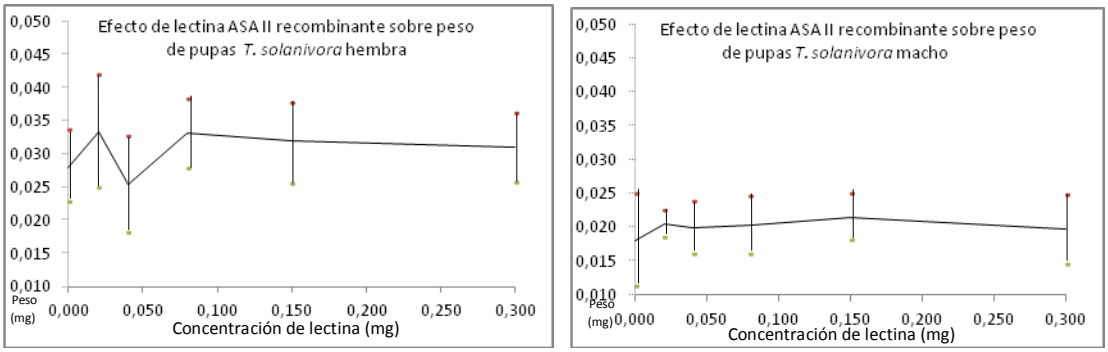


Figura 28. Efecto de lectina ASA IIr sobre peso de pupas de *T. solanivora* hembras y machos. La barra sobre cada punto indica la desviación estándar establecida y mencionada en la tabla 7.

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos de mortalidad de pupas por efecto de lectinas nativas purificadas a partir de bulbo de ajo. No se observó correlación lineal entre la concentración de lectina y la mortalidad de pupas (ver datos de mortalidad para lectina nativa); sin embargo, al observar el efecto de lectina ASA II recombinante sobre pupas, el comportamiento presentado es diferente, observándose una correlación lineal entre los datos de mortalidad y la concentración de lectina ($R^2 = 0.9247$), Figura 29.

Tabla 8. Mortalidad de pupas bioensayo con lectinas de Ajo (*A. sativum*). Los datos se expresan en porcentaje de mortalidad teniendo en cuenta que en cada concentración se parte de una cantidad diferente de pupas que sobreviven al estado de larva.

Concentración Lectina nativa (mg/mL)	n	Mortalidad %	Concentración Lectina ASA II recombinante (mg/mL)	n	Mortalidad %
0.00	23	40.00	0.00	23	40.00
0.02	9	57.14	0.02	15	04.00
0.04	24	10.54	0.04	22	10.00
0.08	11	25.00	0.08	21	10.00
0.15	14	42.86	0.15	13	27.27
0.3	16	6.25	0.3	23	37.50

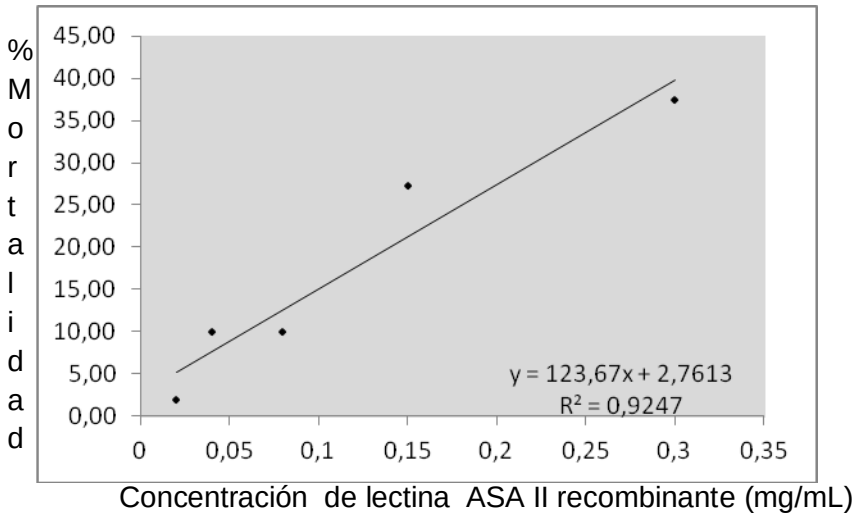


Figura 29. Efecto de lectinas recombinantes ASAII de ajo *A. sativum* sobre mortalidad de pupas de *T. solanivora.*

4.3.3. Efecto preliminar de lectinas ASA sobre parámetro de fecundidad y fertilidad de *Tecia solanivora.*

En la tabla 9, se muestran los datos correspondientes a fecundidad y fertilidad de hembras *T. solanivora*, por efecto de lectinas ASA de ajo. Vale la pena resaltar que en la mayoría de los tratamientos ensayados hubo disminución del porcentaje de eclosión de huevos, respecto al control. Aunque el dato correspondiente a la concentración 0.15mg/mL de lectina recombinante, no cumple esta condición, cabe aclarar que bajo este mismo tratamiento se presentó el menor número de oviposiciones del ensayo, ya que de las parejas colectadas para el ensayo, sólo se observó un huevo en una de las parejas. Estos resultados sugieren la presencia de algún efecto subletal sobre adultos del insecto, disminuyendo la fecundidad y la fertilidad. Esto es importante debido a que en el cultivo de papa se pueden presentar varias generaciones del insecto, y esta disminución en fertilidad y fecundidad, podrían disminuir la presión al cultivo de las nuevas generaciones, con una menor población de insectos que afecten el cultivo.

Tabla 9. Número de huevos y emergencia de *T. solanivora* en los diferentes tratamientos evaluados. Concentración 0,00 mg/mL se refiere al control establecido para el ensayo.

Tratamiento mg/mL	Número total de huevos por hembra	% Eclosión
0,00	112.00 ± 100.00	46.06 ± 10.36
0,30 N	97.00 ± 70.00	28.10 ± 9.60
0,15 N	9.50 ± 9.50	18.40 ± 18.40
0,08 N	184.00*	53.30
0,04 N	84.00 ± 34.00	30.10 ± 8.01
0,02 N	N.R.	N.R.
0,30 ASA II r	118.00 ± 106.00	30.70 ± 9.30
0,15 ASA II r	0.30 ± 0.50	100 ± 47.14
0,08 ASA II r	158.00 ± 25.60	38.30 ± 6.60
0,04 ASA IIr	83.00 ± 41.00	35.00 ± 6.70
0,02 ASA II r	125.00 ± 77.40	23.70 ± 6.10

(N: Proteínas nativa purificada a partir de bulbos de ajo *Allium sativum*
R: Proteína ASA II obtenida a partir de la expresión en un sistema bacteriano).
N.R.: Datos no reportados, no se pudo colectar parjeas. * No hubo réplicas.
En la mayoría de tratamientos se realizaron 3 réplicas (3 parejas).

4.3.4. Tratamiento estadístico

Primero se realizó el análisis en cuanto a la proporción de mortalidad frente a cada una de las categorías de concentración para observar la relación presente entre ellas (figura 26).

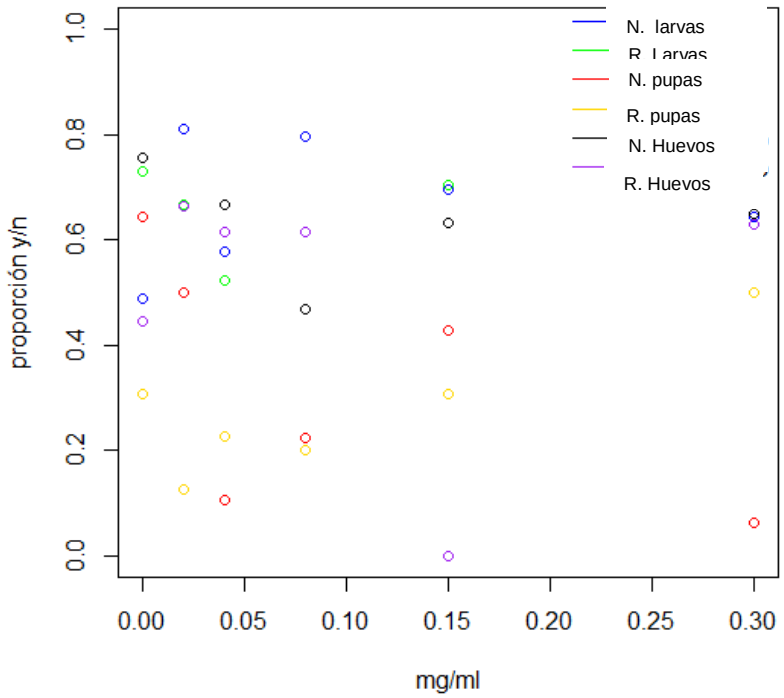


Figura 26. Proporción de mortalidad de larvas, pupas y huevos de *Tecia solanivora* frente a la dosis suministrada para todos los tratamientos evaluados. N: lectina nativa purificada a partir de bulbos de ajo (A*llium sativum)*; R: lectina recombinante ASA II.

Con esta información se construyó una matriz (Anexo 5) y realizó el análisis estadístico escogido correspondiente a un modelo aditivo que se desarrolla de la siguiente manera:

$$log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) = \beta_1 + \beta_2 X_{1k} + \beta_3 X_{2k}$$

Este modelo arrojó el siguiente resultado:

```
Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  0.63229    0.10166   6.219 4.99e-10 ***
x            0.15701    0.30673   0.512  0.60873
fase2       -1.31651    0.17419  -7.558 4.10e-14 ***
fase3       -0.03150    0.09794  -0.322  0.74773
prot2       -0.21085    0.07535  -2.798  0.00514 **
```

Donde x: pendiente relacionada con un cambio de concentración en mg/mL; Intercepto = β; fase 2: estado de pupa; fase 3: estado huevo; prot 2: lectina ASA IIr. Pr =probabilidad de rechazo de prueba bajo el nivel de significancia. Si se tiene 99% de confianza, por lo tanto hay un nivel de rechazo (significancia) de 1% (probabilidad 0.01).

Estos resultados indicaron que el nivel de concentración (mg/mL) parece no afectar la mortalidad del insecto.

Con el fin de encontrar algún tipo de significancia en cuanto a los resultados obtenidos de mortalidad del insecto bajo el efecto de lectinas de ajo, se realizó la interpretación de los parámetros del modelo, las cuales se realizan en función de las expresiones odds.

Dando como resultado lo siguiente:

```
Coefficients:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    0.64328    0.18005   3.573 0.000353 ***
x              0.50591    1.27706   0.396 0.691991
fase2         -0.66784    0.33472  -1.995 0.046021 *
fase3          0.04138    0.20479   0.202 0.839871
prot2         -0.07364    0.24747  -0.298 0.766042
x:fase2       -8.39670    3.13691  -2.677 0.007434 **
x:fase3       -1.37444    1.42059  -0.968 0.333288
x:prot2       -2.24305    1.73105  -1.296 0.195053
fase2:prot2   -1.40871    0.49720  -2.833 0.004607 **
fase3:prot2   -0.27705    0.27291  -1.015 0.310035
x:fase2:prot2 14.95012    3.84609   3.887 0.000101 ***
x:fase3:prot2  3.91601    1.88329   2.079 0.037586 *
```

Donde x: pendiente relacionada con un cambio de concentración en mg/mL; Intercepto = β; fase 2: estado de pupa; fase 3: estado huevo; prot 2: lectina ASA IIR. Pr =probabilidad de rechazo de prueba bajo el nivel de significancia de significancia. Si se tiene 99% de confianza, por lo tanto hay un nivel de rechazo (significancia) de 1% (probabilidad 0.01).

Al analizar los coeficientes β, se encontraron algunas significancias en cuanto a los datos de mortalidad y el efecto de las lectinas aplicadas, las cuales se relacionan a continuación:

La probabilidad de mortalidad de un individuo en estado de larva bajo el efecto de lectinas es de 1.89 veces la probabilidad de no estarlo, independientemente de la concentración y de la lectina suministrada; y por cada mg/mL que se aumente en las dosis, la razón de probabilidad de mortalidad aumenta 64.87%.

En cuanto a la mortalidad de pupas si bien se encontró que sin tener en cuenta la concentración de lectina suministrada y si era lectina nativa o recombinante; la mortalidad disminuía; sin embargo, cuando se analiza específicamente la significancia por cada mg/mL de concentración de lectina ASA IIr que se aumente, la mortalidad de pupas aumenta hasta un 99.96%.

También se encontró que en estado de huevo el porcentaje de mortalidad puede aumentar un 4.08% en relación con el estado de larva, además existe significancia en la mortalidad de huevos por cada mg/mL que se adicione de la lectina ASA II recombinante.

Se realizó además un análisis de diagnóstico para saber si había observaciones extremas en la respuesta y si la distribución escogida para la respuesta fue adecuada. En la figura 27 se observa el análisis de diagnóstico, y se observa que los residuales del modelo parecen seguir una distribución aproximadamente normal.

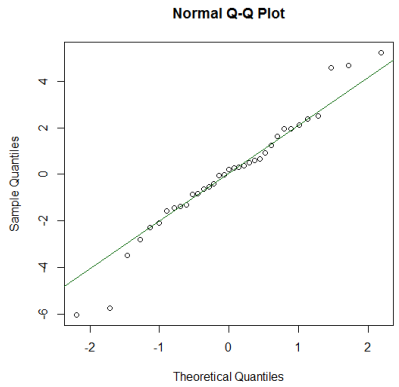


Figura 27. Análisis de diagnóstico del modelo logit para el ensayo biológico de lectinas de ajo *A. sativum* sobre Polilla Guatemalteca *T. solanivora*.

En la figura 28 se observa el efecto palanca, donde se aprecia que hay algunos puntos de palanca, sin embargo no son muchos, lo que indica que estos puntos son valores lejanos o extremos sobre las varibles explicativas.

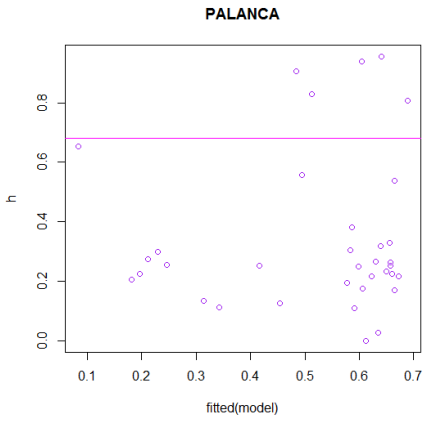


Figura 28. Efecto palanca del modelo logit para el ensayo biológico de lectinas de ajo *A. sativum* sobre Polilla Guatemalteca *T. solanivora*.

4.3.5. Actividad Insecticida preliminar de lectinas ASA (*A. sativum*) sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gellechidae).

Una de las primeras lectinas de las cuales se estableció efecto tóxico sobre insectos es la lectina de *Galanthus nivalis* GNA (Sauvion et al., 1996) y debido a la similaridad en cuanto a sus características bioquímicas (peso molecular, carbohidrato de reconocimiento, etc.), se han clasificado dentro de esta familia las lectinas presentes en ajo (*A. sativum*). Análisis comparativos con lectinas de la familia GNA, mostraron que lectinas encontradas en especies *Alliaceae*, son mucho más activas que GNA (Van Damme et al., 1993), dentro del cual se encuentra el ajo.

Aunque el mecanismo por el cual las lectinas pueden causar toxicidad sobre insectos no está totalmente entendido, es importante mencionar que la unión de toxinas a los receptores presentes en el intestino del insecto es un paso importante dentro del efecto tóxico de lectinas (Upadhyay et al., 2012).

En cuanto al estudio del mecanismo de acción de las lectinas de ajo se ha encontrado que pueden unirse a receptores sensoriales en algunas partes de la boca, contribuyendo al rompimiento de la membrana y afectando de esta manera la capacidad de detección de alimentos, también puede unirse al lumen del intestino e interactuar con proteínas glicosiladas del intestino medio del insecto, como la fosfatasa alcalina, N-aminopeptidasa, cadherinas, sucrasa, entre otras (Banerjee et al., 2004; Majumder, et al, 2004; Upadhyay et al., 2010), afectando la actividad de estas proteínas lo que puede conllevar a desórdenes fisiológicos que finalmente desencadenan en la muerte. Por otro lado lectinas de ajo pueden acumularse en algunas partes del cuerpo del insecto como hemolinfa y ovario e interactuar con proteínas intracelulares como simbionina y citocromo P450, lo que podría interferir con el desarrollo del insecto (Upadhyay et al., 2012).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que hay un efecto ocasionado por las lectinas presentes en bulbos de ajo (ASAI y ASAII) sobre el ciclo de vida de *Tecia solanivora*. Así mismo se determinó acción tóxica de la lectina recombinante (ASAIIr) sobre el mismo insecto. Aunque no se logró determinar las concentraciones letales, debido al comportamiento propio del ensayo, es importante mencionar que mediante el análisis Logit, se observaron significancias importantes desde el punto de vista estadístico y biológico como el efecto directo de las lectinas sobre la mortalidad de larvas, mostrando aumento de la mortalidad en un 64.84% por cada mg/mL que se aumente en la concentración de lectina suministrada, independientemente de si es lectina nativa o recombinante.

Es importante además tener en cuenta que en la mortalidad de pupas también se encontró significancia en cuanto al aumento de la concentración de lectina suministrada, es decir por cada mg/mL que se aumente a la concentración de lectina ASA II recombinante, aumenta 99,96% la razón de probabilidad de mortalidad en estado de pupa, relación que concuerda con lo expresado por Fitches y colaboradores (2008) quienes relacionan de manera general el efecto tóxico de lectinas de ajo sobre insectos,

mostrado como un efecto “crónico” que consiste en procesos que modifican el normal desarrollo del insecto.

La mortalidad relacionada al estado de huevo también mostró significancia a nivel estadístico, presentando aumento en razón de probabilidad de 4,08% en comparación con el estado de larva, concluyendo que este resultado también concuerda con lo propuesto como uno de los efectos que pueden ser ocasionados por lectinas de ajo sobre insectos y el efecto “crónico”(Fitches et al., 2008).

Es importante también mencionar que al analizar tasa de oviposición (tabla 6), se encontró que en la gran mayoría de los tratamientos se obtuvo disminución del porcentaje de oviposiciones en las parejas evaluadas resultado que concuerda con lo reportado por Sadehgi y colaboradores (2008), quienes reportaron que lectinas de plantas parecen interferir con la oviposición, y analizando el caso específico de las parejas tratadas con 0.15 mg/mL de lectinas nativas y recombinante, fueron las parejas que menor número de huevos por hembra mostraron respecto a todo el bioensayo realizado.

5. Conclusiones

En este trabajo se realizó la purificación de la mezcla de lectinas nativas presentes en bulbos de ajo *Allium sativum* (mezcla de ASA I y ASAII), obteniéndose una banda en PAGE SDS con peso molecular relativo de 13 KDa, presentando actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo y reconocimiento por manosa. Además se confirmó la presencia de las dos lectinas en la mezcla de lectinas nativas de ajo, con puntos isoeléctricos de 3.9 y 4.2.

Se determinó preliminarmente la actividad insecticida de lectinas presentes en bulbos de ajo sobre la Polilla Guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*), evaluando diferentes concentraciones de mezcla de lectinas nativas (ASA I y ASA II) y lectina recombinante (ASA IIr) en condiciones de laboratorio, encontrándose la mayor mortalidad de larvas a la concentración de 0,08mg/mL, y 0,15 mg/mL para la mezcla de lectinas nativas (ASA I y ASA II) y la lectina ASA II recombinante, respectivamente.

No se encontró efecto de las lectinas sobre el peso de pupas, sin embargo para el caso de la lectina recombinante ASA II se determinó preliminarmente efecto sobre la mortalidad de pupas, encontrándose que a 0,3 mg/mL, se presentó la mayor mortalidad.

En cuanto a la mortalidad del estado de huevo se observa disminución en el porcentaje de eclosión en la mayoría de los tratamientos evaluados.

Se expresó la lectina ASA II en *E. coli.*, mediante la extracción de RNAm y técnicas de Biología Molecular, método que resultó confiable y reproducible para la expresión de lectinas.

6. Perspectivas

Es importante establecer que este es el primer trabajo realizado con lectinas y su efecto insecticida sobre la Polilla Guatemalteca de la papa (*T. solanivora*), como perspectiva a continuar la investigación se puede plantear la inclusión de las lectinas de ajo (*Allium sativum*), dentro de un estudio en el cual se evalúe su efecto sobre otros insectos plaga (Homopteros, Dipteros, Coleopteros), lo que puede llevar a obtener resultados más efectivos en cuanto al control del insecto. Adicionalmente se puede evaluar el efecto de otras lectinas purificadas y caracterizadas en el grupo de Investigación en Proteínas (GRIP), sobre este mismo insecto.

7. Referencias

Acevedo, E. (1995). Biología y manejo de la polilla guatemalteca de la papa. FONAIAP Divulga N° 49 Año XII Julio-Septiembre.

Álvarez G, Trillos O. (1999). Estudio sobre la Biología y Cría de la Polilla de la Papa *Tecia Solanivora* Povolny EN: Conclusiones y Memorias del Taller: Plan Estratégico para el Manejo de *Tecia Solanivora* en Colombia. 22 al 24 de Julio 1.998. Universidad Nacional de Colombia, FEDEPAPA, IICA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. p. 29.

Agrest I., A. (1990). Categorical Data Analysis.Ed. John Wiley and Sons. U.K.

Arévalo, A., Castro, R. (2003). Evaluación post-registro de los insecticidas con licencia de uso para controlar la polilla guatemalteca de la papa Tecia solanivora (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. In: Memorias II Tallern Nacional, Tecia solanivora. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia, pp. 86 – 89.

Auditoria Política de Gestión al Uso y Manejo de Plaguicidas en Colombia. Auditoría General de la República. Bogotá. 2004.

Briceño, A. (2007). Importancia Agrícola de los principales insectos plagas en los Andes venezolanos. Consejo de estudios de Postgrado (CEP), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Brzin J, Kidric M. (1995). Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and in response to various stress conditions. Biotech. Genet. Engineer. Rev. 13: 421-467

Chomezynsky P., Sacchi N. (1987) Single – step methd of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal biochem. 162 (1): 156-9.

Carrera, M., Zeddam, J., Pollet, A., Léry, X., López-Feber, M. (2008). Evaluation of the per os insecticidal activity of baculoviruses by nebulization method. Insect pathogens and Insect Nematodes IOBC/wprs Bulletin 31:40 -43

Castañeda, N., Chaparro J., Castellanos J. (2006). Tecnología de la clonación y expresión Génica en un sistema Bacterianos y su aplicación en virología. Revista de la Facultad de Medicina. Universidad del del Bosque. 11:43-53.

Chandra, N.R., Ramachandraiah, G., Bachhawat, K., Dam, T.K., Surolia, A., and Vijayan, M. (1999) Crystal structure of a dimeric mannose-specific agglutinin from garlic: quaternary association and carbohydrate specificity. J. Mol. Biol. 285: 1157-1168.

Chatonnet F., Boudinot E., Chatonnet A., Taysse L., Daulon S., Champagnat J. & Foutz A.S. (2003) Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. *European Journal of Neuroscience* 18: 1419-1427.

Chen Y., Peumans W.J., Hause B., Bras J., Kumar M., Proost P., Barre A., Roug´e P., Van Damme E.J.M. (2002). Jasmonic acid methyl ester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chitooligosaccharide-binding lectin in tobacco leaves. FASEB J. 16:905–907.

Czapla, T.H., Lang, B.A. (1990). Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Crysomelidae). J. Econ. Entomol. 83, 2480–2485.

Defilpo S., Mestrallet M. (1996). Purificación parcial de lectina de *Allium sativum* L., variedad alpa suquía. Información Tecnológica vol 7, (4) 183-188.

Domínguez, I., Carrero C., Ramírez, W., Segovia, P. y Pino, H. (2009). Evaluación del Efecto de Insecticidas sobre Larvas de *Tecia solanivora*. Agricultura Andina. 17: 61-73.

OEPP /EPPO. Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la protection des Plantes. (2005). Data sheets on quarantine pests: *Tecia solanivora.* OEPP/EPPO Bulletin 35: 399 - 401.

Franco O.L , Rigden D. J., Melo FR & Grossi-de-Sá M.F. (2002) Plant a-amylase ihibitors and their interaction with insect a-amylases. Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry* 269: 397-412.

Fitches, E., Wiles, D., Douglas, A., Hinchliffe, G., Audsley, Neil., Gatehouse, J. (2008). The insecticidal activity of recombinant garlic lectins toward aphids. Insect Biochem and Mol Biology. 38: 905-915.

Gaidamashvili, M., Ohizumi, Y., Ogawa, T., Muramoto K. (2009). Binding of the insecticidal DB1 lectin in *Helicoverpa armigera* (Hübner) Midgut Epithelia. Plant Physiology. Bulletin of the Georgian National academy of Sciences. 3 (2): 147-149.

García-Carreño F.L. (1992) Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* 3: 145-150.

Garcia-Carreño F.L. and Navarrete del Toro MA (1997) Classification of proteases without tears. *Biochemical Education* 25: 161-167.

Gatehouse, A., Davison, G., Newell, C., Merryweather A., Hamilton W., Burgess E., Gilbert R., Gatehouse J. (1997). Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. Mol Breed 3: 49–63

Gerberding JL (2003) Toxicological profile for pyrethins and pyrethroids. In Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ed. U. S. D. O. H. A. H. SERVICES). Atlanta, Georgia, EU.

Guía Ambiental para el Cultivo de la Papa. Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Territorial. PEDEPAPA. Colombia (2004).

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.J. Mol. Biol. 166:557-580.

Hanahan D., Jessee J., and Bloom F.R. (1991). Plasmid transformation of *E. coli* and other bacteria. Methods Enzymol. 204:63-113.

Hénaut and Danchin. (1996). Analysis and Predictions from *Escherichia coli* sequences *Escherichia coli and Salmonella*, Vol. 2, Ch. 114:2047-2066, Neidhardt FC ed., ASM press, Washington, D.C.

Hermanson G., Mallia A., Smith P. (1992). Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, INC., San Diego. Pgs: 88-90.

Herrera, F. (1997). La Polilla guatemalteca de la papa. Biología, Comportamiento y prácticas de Manejo Integrado. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Regional Uno. Cundinamarca – Boyacá. Bogotá. 14p.

Hopkins, T.L., Harper, M.S. (2001). Lepidopteran peritrophic membranes and the effect of dietary germ agglutinin on their formation and structure. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47: 100–109.

Hilder V.A., Powell K.S., Gatehouse A.M.R., Gatehouse J.A., Gatehouse L.N., Shi Y., Hamilton W.D.O., Merryweather A., Newell C., Timans J.C., Peumans W.J., Van Damme E.J.M., Boulter D. (1995). Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. Transgenic Res 4:18–25.

Hilje L. (1994). Caracterización del daño de las polillas de la papa, *Tecia solanivora* y *Pthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), en Cartajo, Costa Rica. Revista Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 31:43-46.

Kakú, H., Goldstein, LJ., Van Damme E.J., Peumans W.J. (1992). New mannose-specific lectins from garlic (Allium savitum) and ramsoms *(Allium ursinum).* Carbohydr. Rese. 229: 347-353.

Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. Environ. Health Perspect. 112, 524–531.

Koiwa H., Bressan R.A, Hasegawa P.M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Sci. 2: 379-384.

Koukiekolo R., Le Berre-Anton V., Desseaux V., Moreau Y., Rouge P., Marchis-Mouren G. & Santimone M. (1999) Mechanism of porcine pancreatic a-amylase. Inhibition of amylose and maltopentaosa hydrolisis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparision with that by acarbosa. *Eur. J. Biochem.* 265.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227; 680-685.

Lawrence P., Ram K. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic J. Biotechnol. 5: 93-109.

Levitin E. and Cohen E. (1998) The involvement of acetylcholinesterase in resistance of the California red scale *Aonidiella aurantii* to organophosphorus pesticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88: 115-121.

Macedo, L., Amorm, T., Ferreira, A., Oliveira, A., Ribeiro, J., Macedo F., Santos, E., Sales, M. (2008). Larvicidal Effects of a Chitin-Binding vicilin from Erythrina velutina sedes on the mediterranean Fruit Fly Ceratitis Capitata. J. Agric. Food Chem. 56: 802-808.

Ministerio de salud. República de Colombia. Resolución N° 008430 de 1993.

Morell I. (1998). PLAGUICIDAS: Aspectos ambientales, analíticos y Toxicológicos. Castelló de la Plana. Publicacions de la Universitat Jaume I. ed IV.

Murdock, L.L., Huesing, J.E., Nielsen, S.S., Pratt, R.C., Shade, R.E. (1990). Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. Phytochemistry 29, 85–89.

Niño, L. (2004). Revisión sobre la Polilla de la Papa *Tecia Solanivora* en Centro y Suramérica. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa.

Notz A. (1996). Influencia de la temperatura sobre la biología de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) criadas en tubérculos de papa *Solanum tuberosum* L. Boletín Entomología Venezolana. 11 (1): 49-54.

O'Farrel, P.Z.; Goodman, H.M. y O'farrel, P.H. (1975). High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell. 12, 113-142.

Ongley Edwin. (1996). Control of wáter pollution from agriculture – FAO irrigation and drainage paper 55.

Oppert B (1999) Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 42: 1-12.

Outchkourov N.S., Jan de Kogel W., Wiegers G.L., Abrahamson M. & Jongsma M.A. (2004). Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials. *Plant Biotechnology Journal* 2: 449-458.

Palacios, M. (1997). Principales plagas de la papa: La polilla de la papa y la mosca minadora. Centro Internacional de La Papa (CIP). Fasc. 3: 7 – 97.

Pérez G. (1984) Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina edulis*. Phytochemistry 23, 1229-1232.

Peumans W.J., Van Damme E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol 109:347–352.

Powell, K.S. (2001). Antimetabolic effects of plant lectins towards nymphal stages of the planthoppers *Tarophagous proserpina* and *Nilaparvata lugens*. Entomol. Exp. Appl. 99 (1): 71–78.

Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Gatehouse, J.A., C.R. Carlini, M.F. Grossi-de-Sa. (1993). Antimetabolic effects of plant-lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of 2 important rice pests, *Nilaparvata lugen*s and *Nephotettix cinciteps*. Entomol. Exp. Appl. 66, 119–126.

Rahbé, Y., Sauvion, N., Febvay, G., Peumans,W.J., Gatehouse, A. (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid. *Acyrthosiphon pisum*. Entomol. Exp. Appl. 76: 143–155.

Ramachandraiah, G., Chandra, N.R. (2000), Sequence and structural determinants of mannose recognition. Proteins Struc. Func. Genet., 39, 358-364.

Ramachandraiah, G., Chandra, N.R., Surolia A., Vijayan, M., (2003). Computational

analysis of multivalency in lectins: structures of garlic lectin-oligosaccharide complexes and their aggregates. Glycobiology. 13 n° 11, 765-775.

Ramos, C. R. R., Abreu, P. A. E., Nascimento, A. L. T. O. Ho, P. L. (2004). A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with minimal N-terminal His-tagged fusión peptide. Braz. J. Med. Biol. Res. 37, 1103–1109.

Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S., Spence, J., Gatehouse, A.M., Gatehouse, J.A. (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. Plant J. 15, 469–477.

Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle B.M., Rauh J.J. & Sattelle D.B. (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 5: 119-133.

Ryan C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insect and pathogens. Annu Rev Phytopathol 28: 425-449.

Rincón R. D., López-Ávila A. (2004) Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora* (Povolný) (Lepidoptera: Gelechiidae). Revista Corpoica Vol. 5 N° 1. Octubre.

Ripoll, C., Favery, B., Lecompte, P., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Abad, P., Jouanin, L. (2003). Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. Plant Sci. 164: 517– 523.

Sadeghi, A., Smagghe G., Broeders, S., Hernalsteens, J.P., De Greve, H., Peumans, W., Van Damme E. (2008). Ectopically expressed leaf and bulb lectins from garlic (*Allium*

sativum) protect transgenic tobacco plants against cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*). Transgenic Res. 17: 9-18.

Sambrook, J., Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauvion N, Rahbé Y, Peumans WJ, Van Damme EJM, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (1996) Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach potato aphid *Myzus persicae*. Entomol Exp Appl 79:285–293

Sétamou, M., Bernal, J., Mirkov, T., Legaspi, J. (2003). Effects of snowdrop lectin on Mexican rice borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) life history parameters. J. Econ. Entomol. 96: 950-956.

Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166 (2):368-79.

Sharon N. and Lis H. (2004). History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 11: 53-62.

Shi Y., Wang M.B., Powell K.S., Van Damme E., Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Boulter D., Gatehouse J.A. (1994). Use of the rice sucrose synthase-1 promotor to direct phloem-specific expression of β-glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants. J. Exp. Bot. 45:623–631.

Shukle, R.H., Murdock, L.L. (1983). Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of Manduca sexta (Lepidoptera:Sphingidae). Environ. Entomol. 12: 787–791.

Skinner J. (2005) Pest Control Technical Note. In Commonly used pesticide chemical classes (ed. D. o. H. Services), pp. 1-4. Melbourne: Victoria.

Smeets, K., Van Damme, E.J., Verhaert, P., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven P., Peumans, W.J. (1997). Isolation, characterization and molecular cloning of the mannose-binding lectins from leaves and roots of garlic (*Allium sativum L*.). Plant Mol. Biol. 33: 223-234.

Smith P., Rohn r., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M. (1985). “Measurement of protein using Bicinchoninic Acid”. Anal Biochem. 150: 76-85.

Stephenson, G.A. y Solomon, K.R. (1993). *Pesticides and the Environment.* Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

Torres, F., Notz, A., y Valencia, L. (1997). Ciclo de vida y otros aspectos de la biología de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny *(Lepidóptera: Gelechiidae)* en el estado Táchira, Venezuela. Boletín Entomología Venezolana N.S. 12 (1): 81-94.

Torres F. 1989. Algunos aspectos de la biología y comportamiento de la polilla de la papa *Scrobipalpopsis solanivora* Povolny 1.973, (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Táchira, Venezuela. Tesis MSc en Entomología, Fac. Agron Universidad Central de Venezuela, 86p.

Upadhayay S., K., Saurabh S., Rai P., Singh R., Chandrashekar K., Verma P. C., Singh P. K., Tuli R. (2010)SUMO fusion facilitates expression and purification of garlic leaf lectin but modifies some of its properties. J. Biotechnology 146:1-8

Upadhayay S., K., Singh P. K. (2012) Receptors of Garlic (*Allium sativum*) Lectins and their Role in Insecticidal Action. Protein J. 31:439-446.

Van Damme E.J.M., Allen A.K., Peumans W.J. (1987). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. FEBS Lett 215:140–144.

Van Damme, E.J., Goldstein, L.J., Peumans, W.J. (1991). A Comparative study of the mannose- binding lectins from Amaryllidaceae and Alliaceae. Phytochemistry 30: 509-514.

Van Damme E., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven F., Goldstein I., Peumans W. (1992). The closely related homomeric and heterodimeric mannose-binding lectins from garlic are encoded by one-domain and two-domain lectins genes, respectively. Eur. J. Biochem 206: 413-420.

Van Damme EJM, Smeets K, Engelborghs I, Aelbers H, Balzarini J, Pusztai A, Van Leuven F, Goldstein IJ, PeumansWJ (1993) Cloning and characterization of the lectin cDNA clones from onion, shallot and leek. Plant Mol Biol 23:365–376.

Van Damme E.J., Peumans, W., Barre, A., Rougé, P. (1998). Plant Lectins: A composite of several distincti families of structurally and Evolutionary Related Proteins with diverse Biological Roles. Plant Sciences 17 (6): 575-692.

Van Damme, E.J.M., Zhang, W., Peumans, W.J., (2004). Induction of cytoplasmic mannose-binding jacalin-related lectins is a common phenomenon in cereals treated with jasmonate methyl ester. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 69: 23– 31.

Van Damme E.J.M., Roug´e P., Peumans W.J. (2007). Carbohydrate protein interactions: plant lectins. In: Kamerling JP, Boons GJ, Lee YC, Suzuki A, Taniguchi N, Voragen AGJ (eds) Comprehensive glycoscience – from chemistry to systems biology. Elsevier, Oxford, UK. 3: 563–599.

Van Damme, E.J.M., Lannoo, N., Peumans, W.J. (2008a). Plant lectins. Adv. Bot. Res. 48, 107–209.

Van Damme, E.J.M. (2008b). Plant Lectins as Part of the plant Defense System Against Insects. Induced Plant Resistance to Herbivory. Springer Science Business Media.

Vandenborre, G., Smagghe, G., Van Damme E. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochemistry 72: 1538-1550.

Vijverberg HPM, Van Der Zalm JM & Van Der Bercken J (1982) Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. Nature 295: 601-603.

Wong, J.H., Ng, T.B., Cheung, R.C., Ye, X.J., Wang, H.X., Lam, S.K., Lin, P., Chan, Y.S., Fang, E.F., Ngai, P.H., Xia, L.X., Ye, X.Y., Jiang, Y., Liu, F. (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8, 1221–1235.

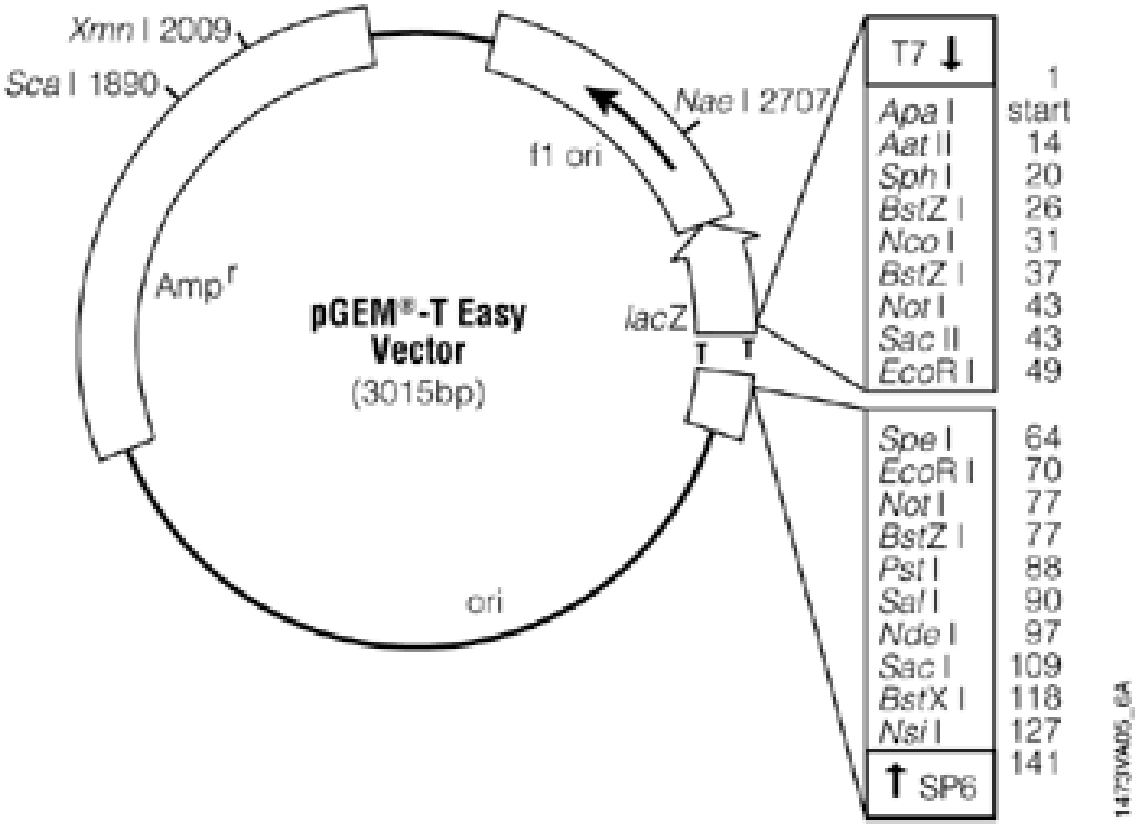
Yagi F., Hidaka M., Minami Y., Tadera K. (1996). A lectin from leaves of *Neoregelia flandria* recognizes D-glucose, D-mannose and N-acetylglucosamine, differing from the mannose-specific lectins from other monocotyledonous species. Plant Cell Physiol 37:1007–1012.

Zhang W., Peumans W.J., Barre A., Houles-Astoul C., Rovira P., Roug´e P., Proost P., Truffa Bachi P., Jalali A.A.H., Van Damme E.J.M. (2000) Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. Planta 210: 970–978.

Anexo 1

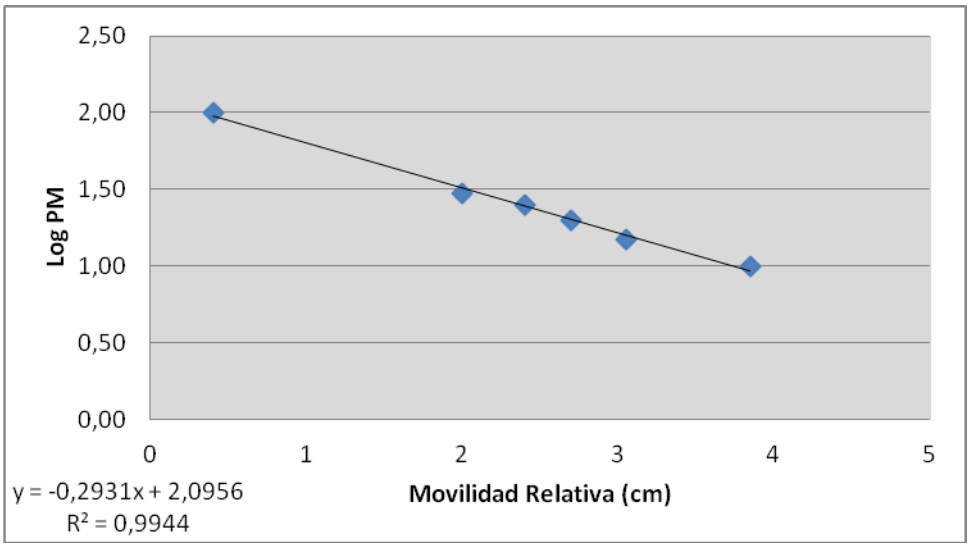
Características del vector PGEM-T Easy

El vector PGEM®-T Easy presenta la región de policlonaje, donde se incorpora el inserto, en medio del gen lac z, así permite identificar las colonias que lo han insertado, de aquellas que no. Además posee un gen de resistencia a Ampicilina (Amp^R).



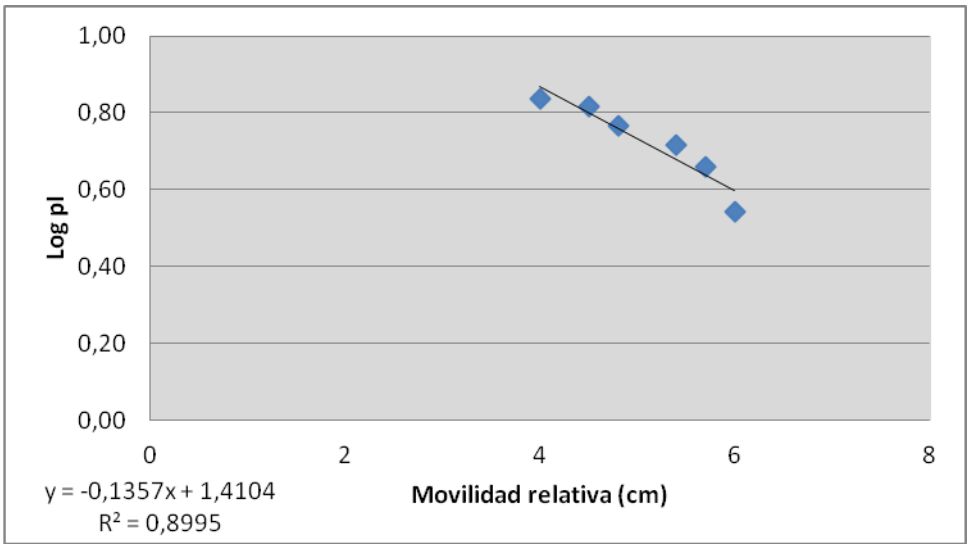
Anexo 2

Curva de Calibración utilizada para determinar el peso molecular de la banda correspondiente a las lectinas nativas de bulbo de Ajo (*Allium sativum*). Valor de x = 3.3



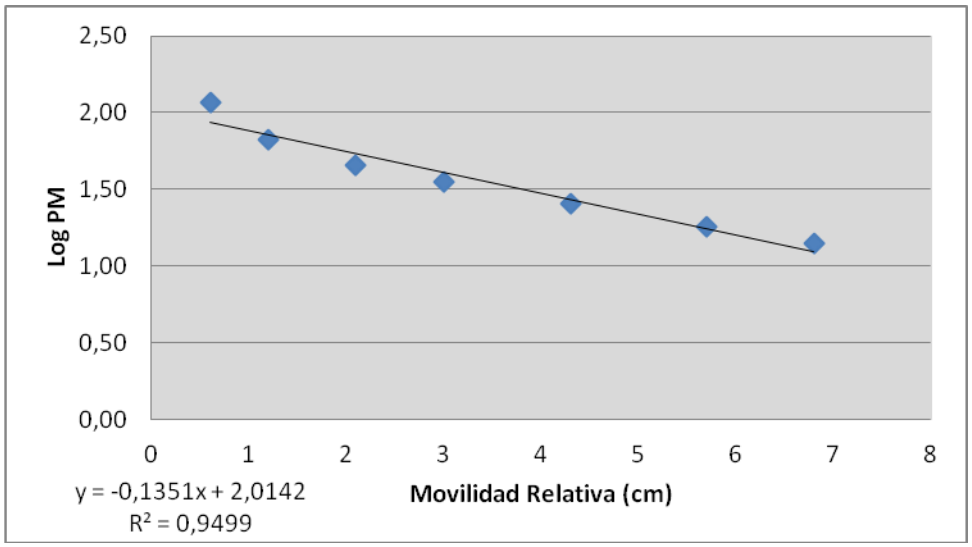
Anexo 3

Curva de Calibración utilizada para determinar punto isoeléctrico de lectinas nativas de bulbo de Ajo (*Allium sativum*). Valores de X: 5.8 y 6.



Anexo 4

Curva de Calibración utilizada para determinar el peso molecular de lectina ASA II, expresada en *E. coli*. Valor de x = 7.2.



Anexo 5

Matriz Análisis Estadístico, Método Logit.

	(Intercept)	x	fase2	fase3	prot2	x:fase2	x:fase3	x:prot2	fase2:prot2	fase3:prot2	x:fase2:prot
1	1	0.00	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
2	1	0.30	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
3	1	0.15	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
4	1	0.08	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
5	1	0.04	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
6	1	0.02	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
7	1	0.00	0	0	1	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
8	1	0.30	0	0	1	0.00	0.00	0.30	0	0	0.0
9	1	0.15	0	0	1	0.00	0.00	0.15	0	0	0.0
10	1	0.08	0	0	1	0.00	0.00	0.08	0	0	0.0
11	1	0.04	0	0	1	0.00	0.00	0.04	0	0	0.0
12	1	0.02	0	0	1	0.00	0.00	0.02	0	0	0.0
13	1	0.00	1	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
14	1	0.30	1	0	0	0.30	0.00	0.00	0	0	0.0
15	1	0.15	1	0	0	0.15	0.00	0.00	0	0	0.0
16	1	0.08	1	0	0	0.08	0.00	0.00	0	0	0.0
17	1	0.04	1	0	0	0.04	0.00	0.00	0	0	0.0
18	1	0.02	1	0	0	0.02	0.00	0.00	0	0	0.0
19	1	0.00	1	0	1	0.00	0.00	0.00	1	0	0.0
20	1	0.30	1	0	1	0.30	0.00	0.30	1	0	0.3
21	1	0.15	1	0	1	0.15	0.00	0.15	1	0	0.1
22	1	0.08	1	0	1	0.08	0.00	0.08	1	0	0.0
23	1	0.04	1	0	1	0.04	0.00	0.04	1	0	0.0
24	1	0.02	1	0	1	0.02	0.00	0.02	1	0	0.0
25	1	0.00	0	1	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0.0
26	1	0.30	0	1	0	0.00	0.30	0.00	0	0	0.0
27	1	0.15	0	1	0	0.00	0.15	0.00	0	0	0.0
28	1	0.08	0	1	0	0.00	0.08	0.00	0	0	0.0
29	1	0.04	0	1	0	0.00	0.04	0.00	0	0	0.0
30	1	0.00	0	1	1	0.00	0.00	0.00	0	1	0.0
31	1	0.30	0	1	1	0.00	0.30	0.30	0	1	0.0
32	1	0.15	0	1	1	0.00	0.15	0.15	0	1	0.0
33	1	0.08	0	1	1	0.00	0.08	0.08	0	1	0.0
34	1	0.04	0	1	1	0.00	0.04	0.04	0	1	0.0
35	1	0.02	0	1	1	0.00	0.02	0.02	0	1	0.0

fase3:prot2	x:fase2:prot2	x:fase3:prot2
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.30	0.00
0	0.15	0.00
0	0.08	0.00
0	0.04	0.00
0	0.02	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
0	0.00	0.00
1	0.00	0.00
1	0.00	0.30
1	0.00	0.15
1	0.00	0.08
1	0.00	0.04
1	0.00	0.02