

CARACTERIZACION DE UNA NUEVA PROTEINA COMO FACTOR RESPONSABLE DE LA RESISTENCIA DE *Phaseolus vulgaris* A *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae)

Carmen E. Posso¹
César Cardona
José F. Valor
Héctor Morales

RESUMEN

La Arcelina es una proteína nueva, únicamente presente en frijoles silvestres resistentes a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), se evaluó como posible factor antibiótico de resistencia a esta plaga. Cuando se introdujo el gen de la proteína en frijoles cultivados susceptibles, mediante un sistema de retrocruzamientos, se comprobó que la expresión de la proteína está controlada por un gen mendeliano simple y que su presencia es dominante a su ausencia, pues las líneas homocigotas dominantes resultaron altamente resistentes al insecto. En semillas artificiales, con dosis crecientes de la proteína purificada, se comprobó el efecto antibiótico de la arcelina y se encontró que la concentración letal media fue 6.5%.

Como la presencia de la arcelina es un marcador de resistencia, se ha implementado una técnica serológica para detectarla en poblaciones segregantes de frijol. Las semillas positivas (Arc+) se multiplican, para evaluarlas con el insecto, a partir de F₃ y generaciones subsiguientes, con el fin de obtener frijoles comerciales resistentes a *Z. subfasciatus*.

SUMMARY

Arcelin, a new protein, present only in wild beans resistant to *Zabrotes subfasciatus*, was evaluated as a possible antibiotic factor of resistance to this pest. When arcelin was introduced in cultivated susceptible beans by means

of backcrosses, it was demonstrated that arcelin expression is controlled by a single mendelian gene and its presence is dominant to its absence.

Thus, dominant homozygous lines were highly resistant to the insect, while homozygous recessive lines were highly susceptible. Heterozygous lines were intermediate. The antibiotic effect of arcelin was demonstrated in artificial bean seeds containing increasing levels of the purified protein; the medium lethal concentration (LC₅₀) was 6.5%. The presence of arcelin can be used as a marker for resistance to the insect. A serological technique has been implemented to detect the protein in segregating populations of beans. Positive seeds are multiplied and evaluated for reaction to the insect in F₃ and following generations. This method is being utilized to obtain commercial beans resistant to *Z. subfasciatus*.

INTRODUCCION

El gorgojo pintado del frijol, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae), es una plaga de almacenamiento, cuyo daño afecta tanto la cantidad como la calidad del frijol para consumo humano. En la búsqueda de materiales con resistencia genética a este insecto, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) evaluó miles de variedades cultivadas de diferente procedencia y no encontró niveles satisfactorios de resistencia (Schoonhoven y Cardona, 1982). Por esta razón, se amplió la búsqueda a frijoles silvestres entre los cuales se identificaron materiales con altos niveles de resistencia debida al mecanismo

de antibiosis (Schoonhoven et al., 1983).

Simultáneamente, con los trabajos sobre caracterización de la antibiosis en la Universidad de Wisconsin, en el CIAT, se realizaron estudios bioquímicos sobre las proteínas de los frijoles silvestres que confirmaron la presencia de una nueva proteína (Osborn et al. 1986), la cual se postuló como posible factor de resistencia a bruchidos, por encontrarse únicamente en frijoles silvestres resistentes.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto antibiótico de esta nueva proteína sobre la biología de *Z. subfasciatus* y desarrollar metodologías serológicas para su detección y utilizar su presencia como marcador en un proceso de mejoramiento dirigido a la obtención de variedades resistentes a esta plaga.

REVISION DE LITERATURA

En variedades silvestres de *P. vulgaris* se han detectado altos niveles de resistencia a *Z. subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Schoonhoven et al., 1983). Estas variedades silvestres son de origen mejicano y se caracterizan por presentar hábito de crecimiento voluble, semillas muy pequeñas y dehiscencia (Delgado-Salinas et al., 1988), pero pueden ser fácilmente cruzadas con variedades cultivadas.

Las investigaciones que se han efectuado sobre la resistencia a bruchidos en estas variedades silvestres revelaron que se debe al mecanismo de antibiosis (Schoonhoven et al., 1983), es decir, a un efecto deletéreo muy significativo

¹ Programa de Entomología de Frijol, CIAT. A.A. 6713, Cali.

sobre la biología del insecto y su supervivencia. En estudios posteriores, Cardona et al. (1989) encontraron que, como resultado de este efecto, la emergencia de adultos se reduce significativamente, el ciclo de vida de los insectos que logran sobrevivir se prolonga sustancialmente y la progenie resultante se caracteriza por tamaño y peso reducidos. La fecundidad de hembras emergidas de variedades resistentes, también, se reduce significativamente. Cuando se crían colonias del insecto en generaciones sucesivas y en materiales altamente resistentes, éstas no pueden desarrollarse. También, se encontró que el estado de desarrollo de *Z. subfasciatus* y *A. obtectus* más afectado por la antibiosis es el primer instar larval, en el cual se registró una mortalidad superior al 90%. El primer instar tardío y el segundo instar temprano son los más afectados, por lo cual Cardona et al. (1989) sugieren que las larvas que logran alcanzar el primer instar tardío mueren en el segundo instar temprano, posiblemente a consecuencia de la mala nutrición suministrada por la variedad resistente. La conclusión final de este trabajo fue que el o los factores responsables de la resistencia son de naturaleza química y están presentes en el cotiledón de la semilla.

Osborn et al. (1986) identificaron, por electroforesis, una proteína nueva que llamaron arcelina, en honor a la población de Arcelia en el Estado de Guerre-

ro en México, de donde son originarias algunas de las variedades silvestres, previamente reportadas por Schoonhoven et al. (1983) como resistentes a brúchidos.

Esta proteína, que no se encuentra en frijoles cultivados, se purificó y caracterizó bioquímicamente. También, se comparó con faseolina (principal proteína de la semilla de frijol común) y con fitohemaglutinina (principal lectina de la semilla de frijol) (Osborn et al., 1988). Arcelina y lectina tienen características comunes que son: glicoproteínas y están relacionadas antigénicamente. Arcelina, también, tiene alguna actividad hemoaglutinante, característica que está asociada a las lectinas, pero presenta, a su vez, propiedades que la diferencian de éstas, como son un punto isoeléctrico más básico, mayor número de residuos de aminoácidos básicos, residuos adicionales de cisteína y un residuo de metionina que no está presente en la fitohemaglutinina (Osborn et al., 1988).

Esta proteína presenta cuatro variantes electroforéticas con pesos moleculares de 35.000 a 42.000, los cuales consisten en grupos distintos de polipéptidos con movilidad similar en geles bidimensionales. Estas variantes fueron designadas por Osborn et al (1988) como arcelina 1, 2, 3 y 4 y su presencia fue confirmada en CIAT por medio de electroforesis (Figura 1).

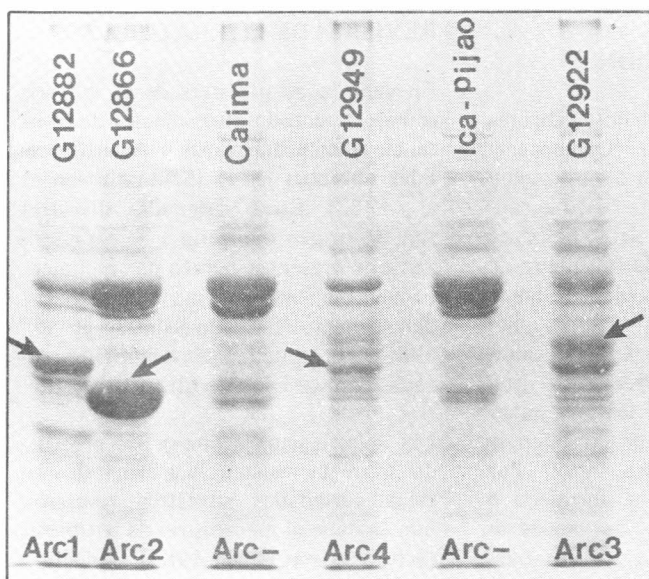


Figura 1. Patrón electrónico de cuatro variantes de la proteína arcelina presentes en algunas de las variedades silvestres resistentes a *Z. subfasciatus* (codificadas G). Calima e ICA-Pijao son variedades comerciales.

En estudios genéticos sobre la herencia de la proteína, se encontró que la expresión de arcelina está controlada por un gen mendeliano simple y que su presencia es dominante a su ausencia (Romero-Andreas et al., 1986). Aunque, por simple observación, se encontró una correlación entre la presencia de arcelina y la resistencia a *Z. subfasciatus*, podrían existir otros factores asociados con la resistencia a este insecto. Por esta razón, las investigaciones se encaminaron a caracterizar la proteína como el factor responsable de la resistencia al brúchido (CIAT, 1987).

MATERIALES Y METODOS

Para evaluar los niveles de resistencia en variedades silvestres y el efecto antibiótico de una proteína nueva sobre la biología de *Z. subfasciatus*, se utilizaron insectos mantenidos en colonias en el Laboratorio de Entomología del CIAT, bajo condiciones controladas de 28°C y 80% de humedad relativa, siguiendo las metodologías generales descritas por Schoonhoven y Cardona (1982).

EVALUACION DE VARIEDADES SILVESTRES CON Y SIN ARCELINA

Con el fin de acumular evidencia sobre el efecto de la arcelina en la biología de *Z. subfasciatus*, se escogieron seis variedades silvestres y dos cultivadas, las cuales fueron sometidas a electroforesis en geles de polyacrilamida SDS/PAGE, siguiendo la metodología de Laemmli (1970), modificada por Ma y Bliss (1978).

Una vez comprobada la presencia o ausencia de arcelina en las variedades en frascos plásticos provistos de tapa con areación, se infectaron plantas correspondientes a cinco repeticiones con siete parejas de *Z. subfasciatus* por repetición. Se realizaron conteos de huevos a los 15 días después de la infestación y, una vez iniciada la emergencia, conteos de adultos cada dos días. Se calculó el porcentaje de emergencia y el tiempo de emergencia de adultos. Los insectos se secaron en un horno a 45°C por 3-4 días, para obtener su peso seco.

Los datos de porcentaje de emergencia, el tiempo de emergencia de adul-

tos y el peso seco de los adultos se sometieron a análisis de varianza. En algunos casos, se hicieron transformaciones a $\log(X + 1)$ y arco seno. Cuando la prueba de F fue significativa, las medias se compararon por medio de la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se calculó, también, el siguiente índice de susceptibilidad (I_s), el cual se utilizó para la comparación entre tratamientos y para la clasificación de las variedades como resistentes, intermedias o susceptibles.

$$I_s = \frac{\text{Logaritmo natural (progenie hembras + 1)}}{\text{días de emergencia por adultos}} \times 100$$

EVALUACION DE LINEAS CON EL GEN DE ARCELINA

Con base en el conocimiento de que la herencia de arcelina está controlada por un gen mendeliano simple de carácter dominante, se inició un programa de retrocruzas para introducir el gen de la proteína en variedades cultivadas y evaluar las progenies resultantes, con el fin de determinar la expresión de la herencia en términos de presencia de la proteína y los efectos correspondientes en la biología del insecto.

Se hicieron cruza entre un padre susceptible cultivado (Sanilac) y un padre silvestre resistente (G. 12882). Las semillas F₁ fueron sometidas a análisis electroforético para confirmar la presencia de la proteína en el proceso de hibridación. Posteriormente, se obtuvieron dos generaciones de retrocruzamiento al padre Sanilac, seguidas por dos generaciones de autofecundación. La semilla F₂ de las segundas retrocruzadas se evaluó por resistencia al insecto así: dos líneas homocigotas dominantes Arc + /Arc +, cuatro líneas heterocigotas Arc + /arc - y tres líneas homocigotas recesivas arc - /arc -. Se infestaron una o dos repeticiones de 50 semillas, según la disponibilidad de éstas, con siete parejas de *Z. subfasciatus* por repetición. Como en el estudio anterior, se determinaron porcentajes de emergencia, tiempo de emergencia y peso seco de los adultos y se calcularon los correspondientes índices de susceptibilidad.

En otro estudio, se evaluaron seis líneas provenientes de segundas retrocruzas, entre dos variedades cultivadas (Pinto) y la variedad silvestre resistente G 12882. Tres de las líneas fueron purificadas por la presencia de arcelina y las otras tres por la ausencia de la proteína. Se infestaron cinco repeticiones de 50 semillas con 7 parejas de *Z. subfasciatus* por repetición. Como en los casos anteriores, se evaluaron y sometieron a análisis de varianza los siguientes parámetros: porcentaje de emergencia, tiempo de emergencia de adultos, peso de la progenie e índice de susceptibilidad.

EVALUACION DE ARCELINA PURA EN SEMILLA ARTIFICIAL

Para poder manipular los niveles de arcelina y evaluar su efecto en la biología del insecto, se adaptó a *Z. subfasciatus* la técnica de semilla artificial desarrollada para *Callosobruchus maculatus* (F) por Shade et al (1986).

Para preparar semillas artificiales, las naturales se remojan por 24 horas y la testa se remueve y el endospermo se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se muele para obtener harina de una finura tal que permita su paso por una criba de 0,25 mm. La harina se mezcla con agua destilada y se reconstituye en moldes de teflón. Las semillas moldeadas se congelan por 15 minutos en hielo seco y, posteriormente, en nitrógeno líquido y, luego, se someten a un período de liofilización por 24 horas, después de la cual, se hidratan a temperatura ambiente hasta alcanzar una humedad de 12 a 14%. Una vez hidratadas, se cubren con gelatina pura a una concentración del 10%, quedando listas para ser infestadas. Con este método de semilla artificial se uniformizan características, tales como color, tamaño y forma de las semillas y se pueden añadir, a voluntad, concentraciones de sustancias que se quieran evaluar.

Con esta técnica, se hicieron tres estudios. El primero consistió en comparar el desarrollo de *Z. subfasciatus* en semilla natural y artificial de tres genotipos susceptibles: Sanilac, L12-56 y Calima y uno resistente Sarc 1. Para ello, se infestaron semillas de fríjol de

cuatro repeticiones en cinco semillas por repetición y cada semilla infestada con cinco huevos del insecto por semilla. Los valores de porcentaje de emergencia, tiempo de emergencia de adultos y peso de las progenies se sometieron a análisis de varianza y, en algunos casos, con transformaciones a $\log(X + 1)$ ó arco seno. Los promedios se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los datos presentados corresponden a los valores no transformados.

En el segundo estudio, se midió el efecto de genotipos resistentes en la biología de *Z. subfasciatus*. Se utilizaron dos variedades silvestres resistentes: G 12866 y G 12949 y una susceptible: Calima. Las semillas artificiales se prepararon con harina de Calima, en cada caso, a la cual, se añadió harina de cada una de las variedades resistentes en proporciones de 20, 40, 60 y 80%. Los correspondientes testigos se prepararon con el 100% de harina de cada variedad.

Para cada concentración y genotipo se evaluaron cuatro repeticiones de cinco semillas infestadas con 5 huevos de *Z. subfasciatus* por semilla. El efecto del porcentaje de la variedad resistente en la dieta se midió por regresión con el tiempo de emergencia de los adultos.

En el tercer estudio, se midió el efecto de tres concentraciones de arcelina pura sobre la biología de *Z. subfasciatus*. La proteína con un grado de pureza del 99% fue obtenida en la Universidad de Wisconsin, de acuerdo con los procedimientos descritos por Osborn et al. (1988). Se prepararon semillas artificiales con harina de la variedad susceptible Sanilac a la cual se agregó arcelina pura en concentraciones de 2,5, 5 y 10%. Semillas preparadas con 100% de harina de Sanilac constituyeron el testigo sin la proteína. Se hicieron cuatro repeticiones de cinco semillas por repetición para cada concentración. El análisis de los datos sobre porcentaje de emergencia y tiempo de emergencia de los adultos se realizó como en el estudio anteriormente descrito. Por análisis de Probit se calculó la concentración letal media (CL₅₀).

EVALUACION DE LINEAS MEJORADAS SELECCIONADAS POR LA PRESENCIA DE ARCELINA

Mediante la prueba serológica de Ouchterlony, también, se detecta la proteína "arcelina" (Garvey et al, 1977). Esta técnica, que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo (Figura 2), presenta ventajas sobre la electroforesis, por ser una prueba de reacción rápida que permite la selección por la presencia de la proteína de una mayor cantidad de muestras diarias. El anticuerpo se obtiene a partir de la inoculación de la proteína pura en conejos. Las muestras de frijol, aproximadamente 15 mg de harina de cada semilla, se suspenden en 200 µl del buffer de extracción (NaCl 0,5 M;

ph 3.2) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para la prueba se utilizan 5 µl de cada muestra.

Con el fin de demostrar que la presencia del gen de arcelina imparte resistencia a *Z. subfasciatus* y que su detección por medio de serología se puede utilizar en un programa de mejoramiento, se usó el método de Ouchterlony para seleccionar semillas F3, provenientes de cuatro cruas simples (codificadas GG 125, 126, 127 y 129), las cuales se multiplicaron para la obtención de progenies F4. Estas progenies se evaluaron por su resistencia al insecto, siguiendo metodologías generales ya explicadas. La clasificación de la resistencia de los materiales se hizo con base en los índices de susceptibilidad.

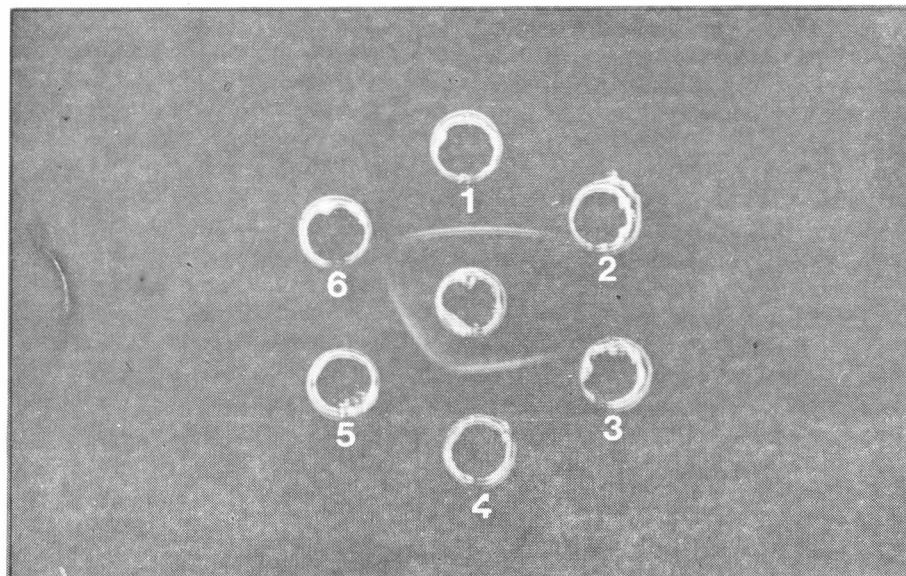


Figura 2. Prueba serológica de Ouchterlony que revela la presencia de arcelina. Reacción positiva en las muestras 1, 4 y 5.

RESULTADOS Y DISCUSION

EVALUACION DE VARIEDADES SILVESTRES CON Y SIN ARCELINA

La evaluación de los niveles de resistencia entre variedades silvestres indicó que los materiales positivos para la presencia de arcelina mostraron altos niveles de resistencia a *Z. subfasciatus*, mientras que aquellos sin arcelina (silvestres y cultivados) resultaron muy susceptibles (Tabla 1).

EVALUACION DE LINEAS CON EL GEN DE ARCELINA

De acuerdo con los índices de susceptibilidad, las líneas homocigotas dominantes (Arc +/Arc +) fueron altamente resistentes en comparación con las homocigotas recesivas (arc-/arc-), que fueron totalmente susceptibles. Las líneas heterocigotas Arc +/arc- mostraron resistencia intermedia (Tabla 2). Este tipo de segregación es la esperada para un gen mendeliano simple, confirmando, así, por la reacción del insecto, los patrones de segregación para el gen arcelina, determinados por Romero-Andreas (1986). Los resultados sugieren, también, que las líneas para seleccionar en un proceso de mejoramiento deben ser homocigotas dominantes para arcelina, debido al alto nivel de resistencia impartido por la proteína.

Las líneas de frijol Pinto, homocigotas para la presencia de arcelina (Arc +), resultaron altamente resistentes al insecto, mientras que las negativas (arc-) fueron completamente susceptibles con diferencias estadísticas significati-

TABLA 1. Niveles de resistencia a *Z. subfasciatus* en variedades silvestres de *P. vulgaris* con y sin arcelina.

Variedad	Presencia de arcelina	Porcentaje de emergencia	Días a emergencia de adultos	Peso/adulto (g x 10 ⁻³)	Indice susceptibilidad	Clasificación
G 12947	ARC+	9.2 c*	69.6 a	0.8 cd	1.6	Resistente
G 12950	ARC+	4.8 c	70.2 a	0.0 bc	1.2	Resistente
G 12951	ARC+	9.2 c	70.3 a	0.7 d	1.7	Resistente
G 12924	ARC-	88.9 ab	44.9 c	1.0 b	7.3	Susceptible
G 12941	ARC-	85.3 b	45.6 c	1.0 b	7.6	Susceptible
G 12952	ARC+	15.2 c	57.9 b	0.9 b	2.5	Testigo Resistente
ICA-Pijao	ARC-	93.5 a	32.6 d	1.5 a	10.7	Susceptible
Calima	ARC-	93.1 a	31.9 d	1.4 a	11.2	Testigo Susceptible

* Promedios seguidos por la misma letra en la misma columna, no difieren significativamente el nivel del 5% (Duncan).

TABLA 2. Resistencia a *Z. subfasciatus* en semillas segregantes para el gen de arcelina.

Línea No.	Genotipo	Porcentaje de emergencia	Días a emergencia de adultos	Índice de susceptibilidad	Clasificación
1	Arc ¹ /Arc ¹	2.5	53.0	1.1	Resistente
2	Arc ¹ /Arc ¹	2.1	47.8	1.0	Resistente
3	Arc ¹ /arc	21.1	33.2	6.3	Intermedia
4	Arc ¹ /arc	38.7	37.2	7.0	Intermedia
5	Arc ¹ /arc	34.6	38.1	4.7	Intermedia
6	Arc ¹ /arc	30.2	35.4	6.8	Intermedia
7	arc/arc	89.5	34.2	10.5	Susceptible
8	arc/arc	76.3	34.7	9.3	Susceptible
9	arc/arc	93.8	34.4	10.0	Susceptible
G 12953	Arc/Arc	6.6	55.1	1.2	Testigo resistente
Calima	arc/arc	92.9	34.0	10.2	Testigo susceptible

vas en todas las variables evaluadas (Tabla 3). Se comprobó, entonces, un efecto deletéreo de la presencia de la proteína en la biología de *Z. subfasciatus*,

EVALUACION DE ARCELINA EN SEMILLA ARTIFICIAL

Evaluaciones previas en semilla artificial habían indicado que los resultados de resistencia y susceptibilidad eran consistentes y comparables con los resultados en semilla natural. Esto se confirmó cuando se comparó el desarrollo de *Z. subfasciatus* en tres genotipos susceptibles y uno resistente. La expresión de los parámetros evaluados, porcentaje de emergencia, tiempo de emergencia de adultos y peso de la prole, fue similar en las dos técnicas de cría (Tabla 4) y los niveles de

resistencia de la variedad SARC 1 fueron los menos consistentes, tanto en semilla natural como artificial.

Cuando se prepararon semillas artificiales con niveles crecientes de harina de semilla de las variedades resistentes G 12866 y G 12949, se registró una prolongación significativa en el tiempo de emergencia de adultos a medida que aumentó la concentración. Se registró un efecto mayor del genotipo G12949 que, a concentraciones superiores al 60%, no permitió emergencia de adultos (Figura 3).

Al estudiar el efecto de las concentraciones de arcelina pura en las semillas artificiales de Sanilac, se encontró que en la concentración más baja probada, 2.5%, arcelina no presentó un efecto antibiótico significativo en la biología de *Z. subfasciatus*; en el nivel interme-

dio, 5%, hubo un incremento significativo en el ciclo de vida y no significativo en el porcentaje de emergencia. A la dosis más alta, 10%, que representa la concentración aproximada de arcelina en semillas naturales resistentes, hubo un efecto marcado sobre la duración del ciclo (días a emergencia) y el porcentaje de emergencia de adultos (Figuras 4 y 5).

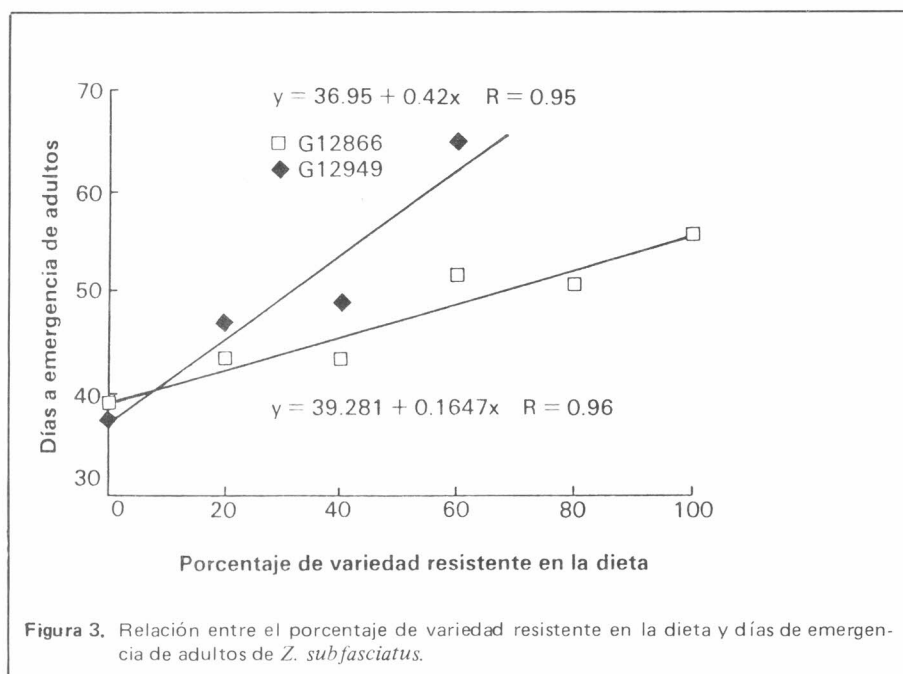
Se encontró que la concentración letal media (CL₅₀) fue 6.5% ± 1.5. En un segundo ensayo, la concentración letal media fue 6.8% ± 0.97.

EVALUACION DE LINEAS MEJORADAS SELECCIONADAS POR LA PRESENCIA DE ARCELINA

En la Tabla 5, se presentan los resultados de la evaluación entomológica de

TABLA 3. Niveles de resistencia a *Z. subfasciatus* en líneas de frijol Pinto seleccionadas por la presencia o ausencia de arcelina.

Línea	Presencia de arcelina	Porcentaje de emergencia	Días a emergencia de adultos	Peso 1 adulto (g x 10 ⁻³)	Índice de susceptibilidad	Clasificación
859446-67	+	7.8 c*	46.4 bc	0.8 c	3.0	Resistente
859446-59	-	95.4 a	32.8 d	1.3 b	11.1	Susceptible
859446-71	+	10.9 c	45.2 c	0.9 c	3.8	Resistente
859439-11	-	94.1 a	32.5 d	1.3 ab	11.6	Susceptible
859445-20	+	11.6 c	46.9 b	0.7 d	3.5	Resistente
R-148-15	-	95.4 a	32.2 d	1.3 ab	10.9	Susceptible
G 12952	+	3.0 d	50.0 a	0.7 d	0.7	Testigo Resistente
Calima	-	80.5 b	33.1 d	1.4 a	11.1	Testigo Susceptible



progenies F₄ seleccionadas por la presencia de arcelina según la prueba serológica de Ouchterlony. De acuerdo con el índice de susceptibilidad, estas progenies presentaron altos niveles de resistencia. Por estas razones, el proceso de selección, con base en presencia de la proteína arcelina, se siguió implementando con el fin de obtener a corto plazo frijoles comerciales con resistencia a esta plaga. En la actualidad, el proceso de mejoramiento consiste en seleccionar, por la presencia de arcelina, semillas F₁ de primeras retrocruzas y semillas F₁ y F₂ de segundas retrocruzas. En cada etapa de selección las semillas positivas ARC+ se seleccionan para la siembra y las semillas negativas ARC- se descartan. En semillas F₂ de segundas retrocruzas se siembran solamente las positivas (homocigotas dominantes) y se realizan selecciones por agronomía en el campo, para evaluar

TABLA 4. Comparación del desarrollo de *Z. subfasciatus* en semilla artificial y natural.

Técnica	Línea	Porcentaje de emergencia	Días de emergencia de adultos	Clasificación
Natural	Sanilac (susceptible)	95.9 ab*	31.3 b	Susceptible
	L12-56 (susceptible)	100.0 a	32.2 b	Susceptible
	SARC 1 (resistente)	7.4 d	50.3 a	Resistente
	Calima (susceptible)	93.0 abc	31.5 b	Susceptible
Artificial	Sanilac (susceptible)	86.1 bc	37.8 b	Susceptible
	L12-56 (susceptible)	74.7 c	38.4 b	Susceptible
	SARC 1 (resistente)	18.4 d	53.8 a	Resistente
	Calima (susceptible)	87.7 bc	37.9 b	Susceptible

* Promedios seguidos por la misma letra en la misma columna no difieren significativamente al nivel del 5% (Duncan).

TABLA 5. Evaluación de la resistencia a *Z. subfasciatus* de progenies F₄ provenientes de cruas simples, seleccionadas por la presencia de arcelina en F₃.

Código	Porcentaje de emergencia	Días de emergencia de adultos	Peso/adulto (g x 10 ⁻³)	Índice de susceptibilidad	Clasificación
GG 125-1-CM	15.7	41.5	1.0	4.2	Resistente
GG 125-4-CM	5.1	43.0	1.0	2.3	Resistente
GG 125-11-CM	29.3	40.9	1.0	5.3	Intermedia
GG 125-19-CM	11.5	41.9	1.0	3.8	Resistente
GG 126-1-CM	5.5	45.9	1.0	2.1	Resistente
GG 126-10-CM	16.3	42.3	0.9	4.5	Resistente
GG 127-3-CM	12.1	42.1	1.0	3.4	Resistente
GG 127-6-CM	8.5	42.7	1.1	3.3	Resistente
GG 127-8-CM	15.4	43.0	1.0	4.3	Resistente
GG 127-9-CM	7.8	43.0	1.0	2.8	Resistente
GG 129-3-CM	5.6	47.0	0.9	2.5	Resistente
G 129 52	5.7	61.8	0.7	1.3	Testigo Resistente
Calima	93.9	32.1	1.3	11.8	Testigo Susceptible

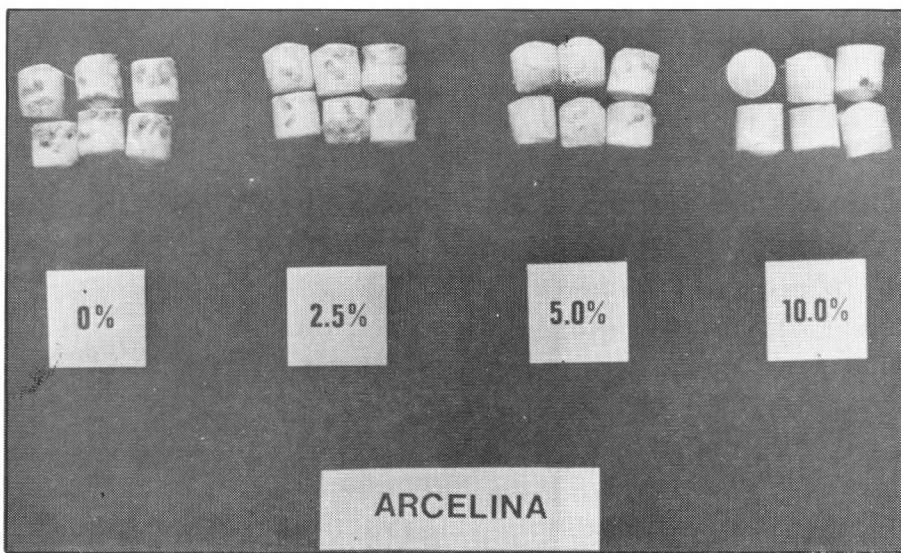


Figura 4. Semillas artificiales preparadas con harina de la variedad susceptible Sanilac a la cual se agregan dosis crecientes de arcelina pura. Al 10% el daño fue mínimo.

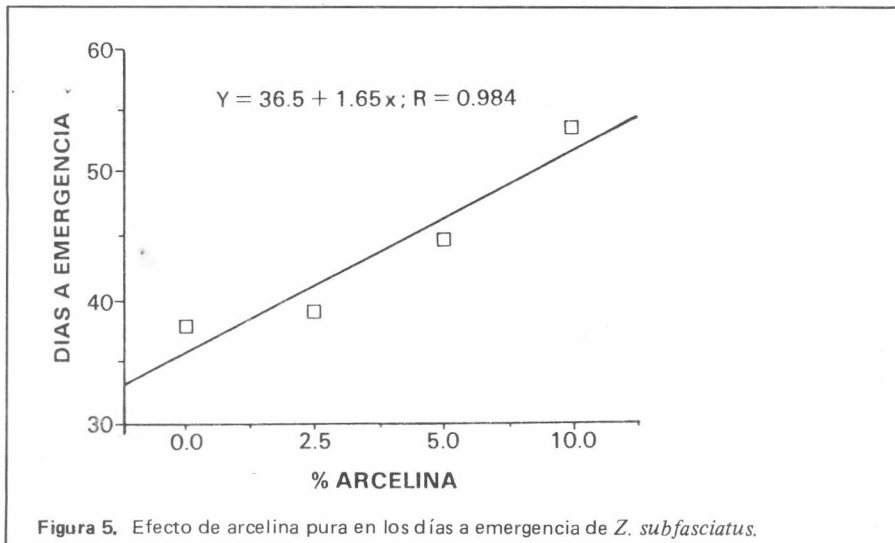


Figura 5. Efecto de arcelina pura en los días a emergencia de *Z. subfasciatus*.

la resistencia de estos materiales al insecto a partir de progenies F3 y generaciones subsiguientes.

CONCLUSIONES

- La Arcelina, una proteína nueva presente únicamente en los frijoles silvestres resistentes, es el factor responsable de antibiosis a *Z. subfasciatus*.
- Los resultados de resistencia y susceptibilidad a *Z. subfasciatus* en semilla artificial fueron consistentes con los resultados en semilla natural. Por medio de la prueba de semilla artificial se pudo comprobar que,

a una concentración del 10%, la arcelina imparte altos niveles de resistencia a *Z. subfasciatus*. La concentración letal media fue 6.5%.

- La arcelina se detecta por electroforesis y por medio de la prueba serológica de Ouchterlony. Como ésta última es más sencilla, se está usando en forma rutinaria para seleccionar semillas por la presencia de arcelina, utilizando la proteína como marcador de resistencia a *Z. subfasciatus*.
- El gen de arcelina puede transferirse y es mendeliano simple y se está in-

corporando en frijoles cultivados mediante un proceso de retrocruzamiento para obtener frijoles resistentes a esta plaga de almacenamiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Cardona, C.; Posso, C.E.; Kornegay, J.; Valor, J.; y Serrano, M. 1989. Antibiosis effects of wild dry bean accessions on the Mexican bean weevil and the bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). *J. Econ Entomol.* 82 (en imprenta; aceptado para publicación Septiembre 30, 1988).
2. CIAT. 1987. Annual Report 1986. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, p. 96-117.
3. Delgado-Salinas, A.; Bonet, A.; Gepts, P. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in middle America. In: Gepts, P. (ed.). Genetic resources of *Phaseolus* beans. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Holland, p. 163-184.
4. Garvey, J.S.; Cremer, N.E.; Sussdorf, D.H. 1977. Gel diffusion. Methods in immunology. Third edition. Addison Wesley Publishing Co.; New York. p. 313-327.
5. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* V. 22 p. 680-685.
6. Ma, L.; Bliss, F. 1978. Seed proteins of common bean. *Crop Science.* V. 18, p. 431-437.
7. Osborn, T.C.; Burow, M.; Bliss, F.A. 1988. Purification and characterization of arcelin seed protein from common bean. *Plant Physiol.* V. 86, p. 399-405.
8. Romero-Andreas, J.; Yandell, B.S.; Bliss, F.A. 1986. Bean arcelin. 1. Inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* and its effect on seed composition. *Theor. Appl. Genet.* V. 72, p. 123-128.
9. Schoonhoven, A. Van.; Cardona, C. 1982. Low levels of resistance to the Mexican bean weevil in dry beans. *J. Econ. Entomol.* V. 75 p. 567-569.
10. Schoonhoven, A. Van.; Cardona, C. 1983. Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in non cultivated common bean accessions. *J. Econ. Entomol.* V. 76 p. 1255-1259.
11. Shade, R.E.; Murdock, L.L.; Foard, D.E.; Pomeroy, M.A. 1986. Artificial seed system for bioassay of cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) growth and development. *Environ. Entomol.* V. 15 p. 1286-1291.