

# BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A GENES DE RESISTENCIA A INSECTOS EN EL GENOMA DE *Coffea arabica* L., c.v. COLOMBIA

Elsa Leonor Álvarez-Mendez<sup>†</sup>; José Ricardo Acuña-Zornosa<sup>\*\*</sup>; Álvaro Gaitán-Bustamante<sup>\*\*</sup>; José Salvador Montaña-Lara<sup>\*\*\*</sup>; Myriam de Peña<sup>\*\*\*\*</sup>

---

## RESUMEN

ÁLVAREZ M., E.L.; ACUÑA Z., J.R.; GAITÁN B., A.; MONTANA L., J.S.; DE PEÑA M. Búsqueda de secuencias homólogas a genes de resistencia a insectos en el genoma de *Coffea Arabica* L., C.v. Colombia. *Cenicafé* 53(4):273-280. 2002.

La búsqueda de secuencias homólogas a genes de resistencia a insectos en el genoma de *Coffea arabica* var. Colombia se realizó directamente mediante análisis de Southern blot utilizando sondas heterólogas provenientes de otras especies de plantas y mediante PCR empleando iniciadores específicos y degenerados, diseñados con base en las secuencias consenso de los genes de inhibidores de proteinasas, alfa-amilasas y lectinas. Estos ensayos demostraron que no hay evidencia de que en el genoma de esta especie existan secuencias codificadoras emparentadas con los genes de inhibidores de proteinasas (tipo Kunitz, de repollo y tipo I y II de tomate). Tampoco se encontraron evidencias de que existan secuencias emparentadas con lectinas ó inhibidores de  $\alpha$ -amilasas presentes en las especies representativas de las leguminosas. Estos resultados sugieren que evolutivamente la broca del café no ha sido expuesta a estas proteínas en su dieta y por tanto, este tipo de genes puede ser una fuente importante de resistencia una vez introducidos en el genoma del café.

**Palabras claves:** *Coffea arabica*, Inhibidores de proteinasas, lectinas, inhibidores de  $\alpha$ -Amilasas

---

## ABSTRACT

In order to identify homologous sequences to insect resistance genes in *Coffea arabica* var. Colombia genome, heterologous probes corresponding to protein inhibitor and lectins were used in Southern blots, as well as PCR amplifications with primers from conserved regions from the *Glycine max* Kunitz trypsin inhibitor and *Phaseolus vulgaris* lectin PhaE. -Similarly, degenerated primers based on  $\alpha$ -amylase inhibitors and leguminous lectins were designed. Neither the hybridization experiments nor the sequence analysis of the coffee PCR products amplified indicated homology with the candidate genes. These results suggest that in the evolutionary course the coffee borer has not been exposed to these kind of proteins in its diet and therefore the genes evaluated could become in an important source of resistance once they are introduced into the coffee genome.

**Keywords:** *Coffea arabica*, proteinase inhibitors, lectins,  $\alpha$ -amylase inhibitors.

---

\* Estudiante de posgrado Becaria Colciencias

\*\* Investigador Científico I. Mejoramiento Genético y Biotecnología y Fitopatología, respectivamente. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

\*\*\* Investigador. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.

\*\*\*\* Ph.D. Directora Nacional del Programa de Biotecnología. Colciencias, Colombia

Las plantas responden al ataque de insectos activando una variedad de genes de defensa cuya función es proveerla de barreras físicas y químicas que impiden o repelen el ataque de éstos o su normal crecimiento y desarrollo. Los mecanismos de defensa en las plantas dependen, generalmente, de tres factores: escape temporal, defensa física y defensa química. La defensa química es uno de los mecanismos más importantes y se basa en la capacidad metabólica que tienen las plantas para producir compuestos químicos secundarios con actividad tóxica, anti-nutricional o adversa contra las especies que son predadores potenciales, pero los tipos de defensa encontrados varían dependiendo de las especies y no existen proteínas universales (5).

Entre los compuestos secundarios que producen las plantas como defensa contra insectos se encuentran los antibióticos, terpenoides, alcaloides, flavonoides, rotenoides, y saponinas, entre otros. Sin embargo, los compuestos secundarios son productos de rutas complejas donde están involucrados muchos genes (8). Las plantas, además, poseen algunos mecanismos de defensa basados en proteínas producto de un solo gen. Debido a que las proteínas no son volátiles, estas deben ser ingeridas por el insecto ya que para la mayoría, el blanco es su sistema digestivo. En este grupo encontramos algunas proteínas de reserva como la arcelinas, vicilinas, los inhibidores de proteinasas, las quitinasas, las lectinas y los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, entre otros (7, 8, 10).

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) es considerada como la plaga que causa el mayor daño económico al cultivo del café, ya que por atacar sus frutos, produce pérdidas considerables al disminuir tanto el peso de la cosecha como la calidad del grano. Cenicafé ha venido buscando fuentes de resistencia genética en el germoplasma de *Coffea arabica*, variedades comerciales y en algunas especies diploides, pero hasta el momento no hay

genotipos que se perfilen como fuentes importantes de resistencia (1). Con estas observaciones, se consideró necesario determinar si existen secuencias de DNA homólogas a genes de resistencia contra insectos, que eventualmente puedan ser utilizadas para la evaluación y selección de materiales resistentes o en su defecto, para introducir estos genes mediante transformación genética.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Se recolectaron segundos pares de hojas frescas del genotipo CU1972 perteneciente a la colección de progenies del cruce del Híbrido de Timor 1343 y *C. arabica*. La recolección se realizó en la Estación Central Naranjal de Cenicafé en el Departamento de Caldas.

**Aislamiento de DNA total de alto peso molecular.** El DNA fue extraído a partir de hojas de acuerdo con el método propuesto por Bernatzky y Tanksley (4). Para tal fin, se licuaron 10g de hojas frescas con 150ml de Buffer de extracción (350mM sorbitol, 100mM Tris, 5 mM EDTA, 0,2% Beta-mercaptoetanol, pH 8,2). La mezcla se filtró a través de gasa y se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 650 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5ml de buffer de extracción. La suspensión se colocó en un tubo de 50ml que contenía 2ml de sarcosil al 5%. Posteriormente se adicionaron 5ml de buffer para lisis de núcleos (200 mM Tris, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB, pH 7,5). La mezcla se incubó a 65°C por 1 hora. Se adicionó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló invirtiendo el tubo hasta obtener una emulsión. Una vez obtenida la emulsión, se centrifugó a 480xg durante 15 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. El DNA fue precipitado adicionando 1 volumen de isopropanol frío. Se centrifugó a 650xg durante 15 minutos.

Posteriormente el DNA se lavó con 500 ml de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente fue resuspendido en 500 ml de buffer TE 10/1 (10 mM Tris-Cl pH 8,0 y 1 mM EDTA pH 8,0). La purificación del DNA de alto peso molecular se realizó mediante centrifugación en equilibrio con gradientes continuos de cloruro de cesio-bromuro de etidio (12).

**Análisis de Southern blot.** El análisis del DNA genómico de café se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Southern (13). 12mg de DNA de café fueron digeridos con 30 unidades de cada una de las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos de DNA se separaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% en buffer TBE 0,5X a 3V/cm por toda la noche. Para visualizar el DNA, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio. La transferencia capilar de los fragmentos de DNA a la membrana de Nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) se realizó de acuerdo a Sambrook *et al.* (12).

Se utilizaron como sondas heterólogas el gen del inhibidor de proteinasa de repollo (*Brassica oleracea*) suministrada por la Dra. Roxane Broadway de la Universidad de Cornell en Estados Unidos (No. de Acceso Genbank U18995), el gen de la lectina, *Snowdrop*, aislada de *Galanthus nivalis* y obsequiada por el Dr. Els Van Damme de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica (No. Acceso Genbank M55559) y los genes de inhibidores de proteinasas de tomate (*Lycopersicum. esculentum* L. var. Bonnie Best) tipo I (No. Acceso Genbank K03290) y tipo II (No. Acceso Genbank K03291) obsequiadas por el Dr. Clarence Ryan de la Universidad de Washington.

Las sondas fueron obtenidas mediante la técnica de PCR. Como molde se emplearon los plásmidos que contenían cada una de las secuencias (sondas) y como iniciadores se utilizaron el M13 forward: 5'-

CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3', el M13 reverse: 5'AGCGGATAAC-ATTTTCACACAGG-3', el T3: 5'TAACCTCACTAAAGGGA-3' y el T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'. Las sondas fueron marcadas con 50μCi de α<sup>32</sup>P dCTP (3000Ci/mmol) utilizando el kit *Redi*prime DNA labelling system de Amersham siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la prehibridación se utilizaron 0,2ml de solución por cada centímetro cuadrado de la membrana. La solución de prehibridación contenía 6X SSC, 5X Solución de Denhart's (50X: 1% (w/v) Albúmina de suero bovino, 1% (w/v) Ficoll y 1% (w/v) PVP), 0,5% SDS y 100 mg/ml de DNA denaturado de esperma de salmón. Se incubó a 65°C durante 1 hora en un horno de hibridación. La hibridación se hizo con 10-20ng/ml de sonda marcada radioactivamente, la cual se denaturó incubándola a 100°C por 10 minutos y luego llevándola a hielo por 1 minuto e inmediatamente se adicionó a la solución de prehibridación. Se incubó a 65°C toda la noche.

**Análisis mediante PCR.** Se diseñaron iniciadores utilizando las secuencias consenso de las lectinas y los inhibidores de α-amilasa de leguminosas teniendo en cuenta una base de datos de proteínas llamada "The Pfam Protein Families Database" (3). Otros iniciadores se diseñaron utilizando las secuencias de interés del GeneBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el programa Primer Select del Lasergene (DNASar, Madison, Wi).

La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9600 bajo las siguientes condiciones: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, dNTP's 0,2mM c/u, iniciadores 100ng/ml c/u, Taq DNA polimerasa (Promega) 0.05U/ml y DNA 150ng. El programa utilizado para la amplificación fue: 94°C por 5 minutos y luego 35 ciclos de amplificación (94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto)

seguida de una incubación final de 10 minutos a 72°C.

Los fragmentos de interés se purificaron del gel de agarosa mediante el kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector de clonación empleado fue el plásmido pGEM®-T Easy (Promega).

La secuenciación de los plásmidos se realizó en la Universidad de Iowa en Estados Unidos (Iowa State University, DNA Core Facility). Las secuencias fueron analizadas comparándolas con las reportadas en el GenBank a través del programa BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

**Ensayos de hemaglutinación para detección de lectinas.** Para corroborar la ausencia de lectinas tipo hemaglutinantes en café, se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación. Como control positivo se utilizó un extracto proteínico de semilla de fríjol y como control negativo, se utilizó el buffer empleado para la extracción de las proteínas. El extracto proteínico de café se preparó homogenizando un volumen de tejido con 4 volúmenes de buffer de extracción (0,1 M buffer fosfato pH 7,0, 0,1% Brij 35, 10% polivinil polipirrolidona PVPP, 10 mM cisteína y 20mM tiourea) a 4°C. Luego se filtró por tela miracloth y se centrifugó a 14.000g por 15 minutos. Finalmente el sobrenadante se pasó por una columna de PVPP al vacío.

El extracto de fríjol se preparó de la siguiente forma: 50mg de harina de fríjol se homogenizaron con 500ml de buffer de extracción (176mM Tris.HCl pH 8,5 y 1% NaCl). Este homogeneizado se llevó al sonicador por 1 hora y posteriormente se centrifugó a 10.000g por 15 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante. La concentración estimada de estos extractos fue de 16,8mg/ml y 15,7mg/ml, respectivamente.

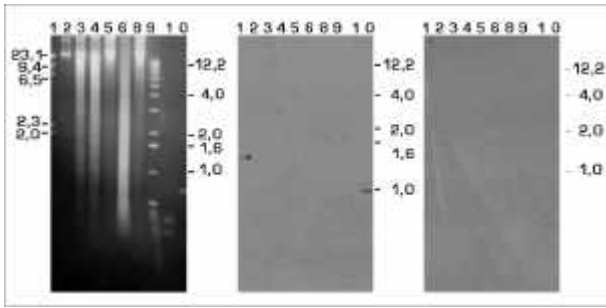
El procedimiento utilizado para observar la hemaglutinación en los extractos proteínicos, consistió en: 1 ml de glóbulos rojos (GR) de los tipos A, AB y O se lavaron tres veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para 1 litro). Los glóbulos rojos fueron tripsinizados con un volumen de una solución de tripsina al 0,1%. Posteriormente se mezclaron e incubaron a 37°C por 5, 10 y 15 minutos, e inmediatamente se lavaron tres veces con PBS. Finalmente se resuspendieron en PBS al 2,5%.

En un plato de ELISA se colocaron los extractos proteínicos de cada planta con los GR así: sin tratamiento, tripsinado 5 minutos, tripsinado 10 minutos y tripsinado 15 minutos y diluciones seriadas 1 en 2 de cada uno de los extractos. Se adicionó un volumen de GR al 2,5% y se mezcló e incubó a 37°C por 30 minutos. Después se observó presencia de aglutinación (14).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

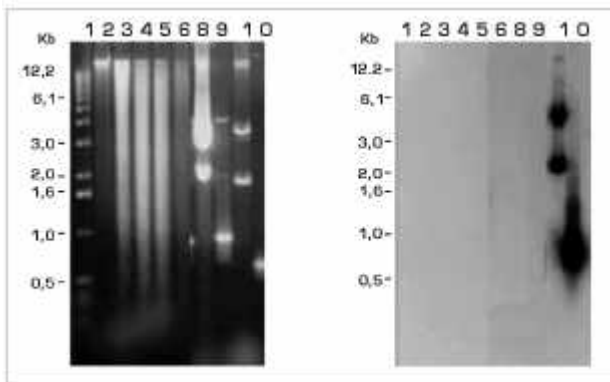
**Análisis del DNA de café mediante hibridación con sondas heterólogas de inhibidores de proteinasas y lectinas.** Los resultados obtenidos en el análisis de Southern blot, sugieren que no existen secuencias homólogas a las secuencias del inhibidor de proteinasa de repollo, a la lectina de *Galanthus nivalis* ni a los inhibidores de proteinasas de tomate I y II. Aunque se observaron señales positivas en los controles, no se presentó hibridación de ninguna de las sondas heterólogas con el DNA de café de alto peso molecular o digerido. (Figuras 1, 2 y 3)

La hibridación en estos casos se realizó bajo condiciones de baja astringencia con el fin de facilitar la unión de la sonda con las secuencias relacionadas, asumiendo que no existía una alta homología.



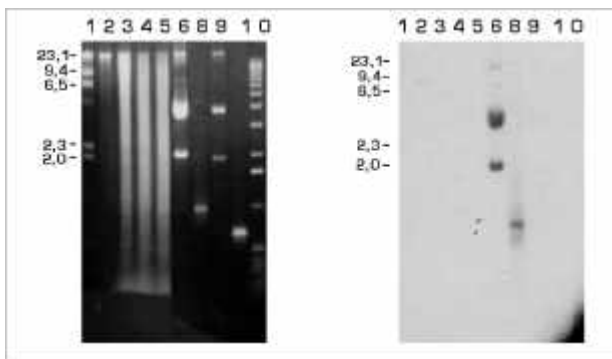
**Figura 1.** Análisis de Southern blot con la sonda heteróloga a los inhibidores de proteinasas de tomate tipo I y II. A. Carril 1. Lambda/*Hind*III 2. DNA de café de alto peso molecular 3. DNA café/*Bam*HI 4. DNA café/*Eco*RI 5. DNA café/*Hind*III 6. DNA de café/*Sau*3AI 7. DNA de café/*Xho*I 8. Marcador de peso molecular escalera de 1 kb 9. Fragmentos de 210 y 360 pb correspondientes al cDNA del inhibidor de tripsina de tomate tipo I 10. Fragmento de 750 pb correspondiente al cDNA del inhibidor de tripsina de tomate tipo II. B. Southern blot del DNA de café hibridado

con la sonda de 750 pb que corresponde al cDNA del inhibidor de tripsina de tomate tipo II. Temperatura de hibridación 42°C con 50% de formamida. C. Southern blot del DNA de café hibridado con la sonda de 200 y 360 pb que corresponden al cDNA del inhibidor de tripsina de tomate tipo I. Temperatura de hibridación: 42°C con 50% de formamida.



**Figura 2.** Análisis de Southern blot con la sonda heteróloga al inhibidor de proteinasa de repollo. A. Carril 1. Marcador de peso molecular 1/*Hind*III 2. DNA café alto peso molecular 3. DNA café/*Bam*HI 4. DNA café/*Eco*RI 5. DNA café/*Hind*III 6. Plásmido que contiene el cDNA del inhibidor de tripsina de repollo 7. Fragmento de 780pb correspondiente al cDNA del inhibidor de tripsina de repollo 8. Plásmido que contiene el cDNA de la lectina de *Galanthus nivalis* 9. Fragmento de 540pb correspondiente al cDNA de la lectina de *Galanthus nivalis* 10. Marcador de peso molecular escalera 1 Kb B. Southern blot del DNA de café hibridado

con la sonda de 780 pb que corresponde al cDNA del inhibidor de tripsina de repollo. Temperatura de hibridación: 42°C con 50% de formamida.



**Figura 3.** Análisis de Southern blot con la sonda heteróloga a la lectina snowdrop A. Carril 1. Marcador de peso molecular escalera 1 kb 2. DNA de café de alto peso molecular 3. DNA café/*Bam*H I 4. DNA café/*Eco* RI 5. DNA café/*Hind* III 6. DNA de café/*Hind* III 7. Plásmido que contiene el cDNA del inhibidor de tripsina de repollo 8. Fragmento de 780pb correspondiente al cDNA del inhibidor de tripsina de repollo 9. Plásmido que contiene el cDNA de la lectina de *Galanthus nivalis* 10. Fragmento de 540pb correspondiente al cDNA de la lectina de *Galanthus nivalis*. B. Southern blot del DNA de café hibridado con

la sonda de 540 pb que corresponde al cDNA de la lectina de *Galanthus nivalis*. Temperatura de hibridación: 42°C con 50% de formamida.

Los lavados poshibridación se realizaron a una baja astringencia para garantizar que los pocos enlaces existentes entre las sondas y el DNA de café se mantuvieran estables. Además, la cantidad de DNA de café utilizada (12µg) garantiza que genes de copia única pueden ser detectados mediante un análisis de Southern con una sonda marcada radioactivamente (6).

**Evaluación del DNA de café mediante PCR con iniciadores específicos del inhibidor de proteinasas tipo kunitz de soya (*Glycine max*) y la lectina-E de fríjol (*Phaseolus vulgaris*).** En la Figura 4 se observan los productos amplificados empleando los iniciadores del inhibidor tipo Kunitz y de la lectina pha E sobre el DNA de soya (carriles 2, 3, 4 y 5) y de fríjol (carril 10), respectivamente.

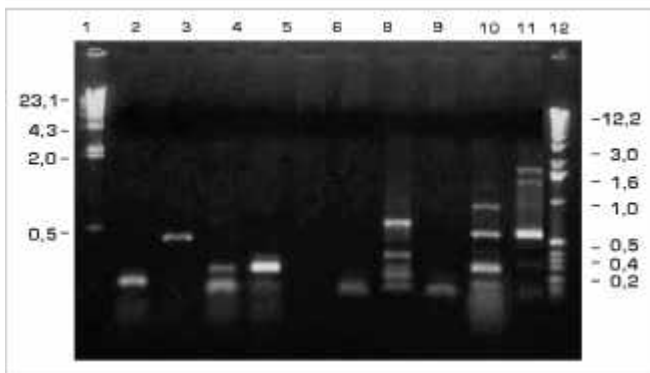
Cuando estos iniciadores se utilizaron para evaluar el DNA de café, se observaron 4 productos de amplificación con la combinación de iniciadores G1F-G3R (Figura 4, carril 8); cuando se utilizaron las combinaciones G3F-G3R o G3F-G1R (Figura 4, carril 7 y 9) sólo se observó una banda tenue; con la combinación G1F-G1R no se observaron productos de amplificación (Figura 4, carril 6).

La amplificación con los iniciadores de la lectina de fríjol produjo varios fragmentos, uno de ellos del mismo tamaño que el amplificado

con el DNA de fríjol y en buena cantidad (Figura 4, carril 11).

Los fragmentos amplificados en el DNA de café utilizando los iniciadores G3F-G1R del inhibidor de proteinasa tipo Kunitz y los iniciadores F90-R631 de la lectina, se clonaron en el vector pGEM®. Sin embargo, el análisis de la secuencia de dichos fragmentos no presentó homología con secuencias genómicas de estos genes en otras plantas. Es posible que en el proceso de especiación, con la interacción insecto-planta determinando la efectividad de estos genes de defensa, se generen familias muy diversas, algunas de las cuales no deben estar presentes en el genoma del café. Estos resultados sugieren que es necesaria la búsqueda de genes de inhibidores de proteinasas de otras familias taxonómicas más estrechamente relacionadas con *Coffea* para aumentar la probabilidad de hallarlos en su genoma. Hanuta *et al.* (9) adoptaron la estrategia molecular mediante PCR para aislar tres genes inhibidores de proteinasa tipo Kunitz de *Populus tremuloides*, basados en las secuencias disponibles de *P. trichocarpax* *P. deltoides* (híbrido) y *Salix viminalis*.

**Evaluación del DNA de café por PCR con Iniciadores degenerados de Inhibidores de α-amilasas y Lectinas de Leguminosas.** Utilizando el juego de iniciadores degenerados no se



**Figura 4.**

Productos de amplificación utilizando los iniciadores específicos de kunitz y pha E. Carril 1. Marcador de peso molecular 1/*Hind*III 2. Soya G1F-G1R 3. Soya G3F-G3R 4. Soya G1F-G3 5. Soya G3F-G1R 6. Café G1F-G1R 7. Café G3F-G3R 8. Café G1F-G3 9. Café G3F-G1R 10. Frijol F90-R631 11. Café F90-R631 12. Marcador de peso molecular escalera de 1 kb.

encontraron secuencias homólogas para lectinas de leguminosas o inhibidores de alfa-amilasas en el DNA de café. Sin embargo, no se descarta la presencia de genes de lectina ni inhibidores de  $\alpha$ -amilasas diferentes a las estudiadas, ya que cada día nuevas secuencias de estas familias de proteínas ingresan al GenBank para aumentar el número de introducciones. La búsqueda en bases de datos ha revelado similitud entre secuencias de lectinas de especies taxonómicamente diferentes como en el caso de las familias Convolvulaceae y Moraceae. Este descubrimiento es de gran valor desde el punto de vista de ocurrencia y evolución molecular (15). Para el caso de inhibidores de alfa amilasas, la gran variedad en estructura hasta ahora caracterizada, sugiere que la lista está lejos de ser completada. Otra estrategia que puede ser de gran ayuda en la búsqueda de genes de inhibidores de proteinasas es confirmar su presencia en la especie de interés mediante pruebas bioquímicas (7).

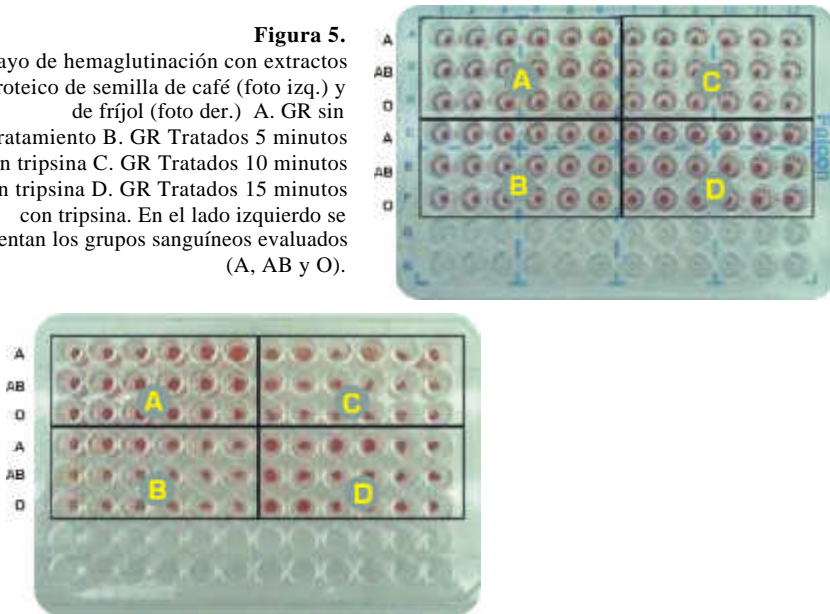
**Ensayo de hemaglutinación con extracto proteico de semilla de café para detección de lectinas.** Utilizando el extracto de semilla de fríjol se

observa hemaglutinación en los tres tipos sanguíneos, mientras que con el extracto proteico de semillas de café no se produce hemaglutinación en ninguno de los casos (Figura 5).

La actividad de las lectinas se puede observar mediante los ensayos de aglutinación con GR ya que estas tienen la capacidad de aglutinarlos *in vitro* (2, 14, y 11). Este resultado demuestra, que en la semilla del café no se detectaron lectinas con capacidad hemaglutinante de glóbulos rojos humanos, confirmando los resultados obtenidos en el análisis de hibridación con sondas heterólogas homólogas a estas proteínas.

Con los ensayos realizados en este trabajo, no hay evidencia de que en el genoma del café existan secuencias codificadoras emparentadas con los genes de inhibidores de proteinasas (tipo Kunitz, de repollo y tipo I y II de tomate). Tampoco se encontraron evidencias que existan secuencias emparentadas con lectinas ó inhibidores de  $\alpha$ -amilasas presentes en las

**Figura 5.** Ensayo de hemaglutinación con extractos proteico de semilla de café (foto izq.) y de fríjol (foto der.) A. GR sin tratamiento B. GR Tratados 5 minutos con tripsina C. GR Tratados 10 minutos con tripsina D. GR Tratados 15 minutos con tripsina. En el lado izquierdo se presentan los grupos sanguíneos evaluados (A, AB y O).



especies representativas de las leguminosas. Estos resultados pueden ser muy promisorios para la generación de variedades mejoradas con resistencia a la broca del café, ya que indica que evolutivamente el insecto no ha estado expuesto a la acción de estas proteínas en su dieta, y por tanto, cualquiera de los genes aquí evaluados tiene posibilidad de brindar protección a las plantas de café que los expresen.

### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología "Francisco José de Caldas"-COLCIENCIAS Código 2251-12-620-96 Contrato 165-97. Los autores agradecen a la Pontificia Universidad Javeriana.

### LITERATURA CITADA

1. ALVAREZ S., J.H.; CORTINA G., H.A.; VILLEGAS M., J.F. Métodos para evaluar antibiosis a *Hypothenemus hampei* en café bajo condiciones controladas. *Cenicafé* 53 (1):60-69. 2002.
2. ARAGONES, R.C.; MERCA, F.E. Two lectins from the seeds of lablab bean (*Lablab purpureus* Linn cv. Highworth). *Philippine Journal of Science* 127(1):345-351. 1998.
3. BATEMAN, A.; BIRNEY, E.; DURBIN, E.; EDDY, S.R.; HOWE, K.L.; SONNHAMMER, E. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 28 (1): 263-266. 2000.
4. BERNATSKY, R.; TANKSLEY, S. Toward saturated linkage map in tomato based on isoenzymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112: 887-898. 1986.
5. CONSTABEL, C.P. A survey of herbivore-inducible defensive protein and phytochemicals. *In*: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. Induced plant defense against herbivores and pathogens. St. Paul, APS Press, 1999. p. 137-166.
6. DARLING, D.C.; BRICKELL, P.M. *Nucleic acid blotting: The Basics*. New York, IRL Press, 1994. 111 p.
7. FRANCO, O.; RIGDEN, D. J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry* 269:397-412. 2002.
8. GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pesticide Science* 52: 165-175. 1998.
9. HANUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, P.A. Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Molecular Biology* 46:347-359. 2001.
10. HELDTH. *Plant biochemistry and molecular biology*. New York, Oxford University Press, 1997. 522 p.
11. MONCADA, M del P. Búsqueda de fuentes de resistencia genética a la broca *Hypothenemus hampei*, en el germoplasma de café. Chinchiná, Cenicafé, 1992. (Proyecto MEG 08).
12. NAKAMURA S.; IKEGAMI A.; MATSUMURA Y.; NAKANISHI T.; NOMURA K. Molecular cloning and expression of the mannose/glucose specific lectin from *Castanea crenata* cotyledons. *Journal of Biochemistry* 131:241-246. 2002.
13. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning; a laboratory manual*. 2. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 Vols.
14. VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; MAZARD, A.M.; VERHAERT, P.; HORMAN, A.; DEBRAY, H.; ROUGE, P.; PEUMANS, W.J. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *European Journal of Biochemistry* 259: 135-142. 1999.
15. VENGELEN, T. V. *Technical manual American Association of Blood Banks*. 12. ed. Karger A.G. Publishers L.A. California. p. 636-638. 1996