

Amilasas de las glándulas salivales y tubo digestivo del gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus*, y su inhibición por extractos de *Phaseolus vulgaris*

Rebeca Carballar, Gabriela Jiménez, J. Antonio García y Fidel Hernández

RESUMEN

El gorgojo *Zabrotes subfasciatus* produce enormes pérdidas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) almacenado. Se caracterizaron las amilasas, enzimas implicadas en el ataque al frijol, de las glándulas salivales de *Z. subfasciatus*, mediante zimografía con sustrato de almidón. A pH 5.0-5.3 se obtuvieron tres bandas de 70kDa, 96kDa y 192kDa; y a pH 7.6 se obtuvo una adicional de 31kDa. Sólo la amilasa de 70kDa actúa en presencia del agente reductor DTT. Los extractos de frijoles resistentes inhibieron la actividad de amilasa de 93kDa de las glándulas salivales del gorgojo, sugiriendo que poseen un inhibidor tipo α A12 funcional a pH 7.6.

INTRODUCCIÓN

En México se almacenan anualmente más de un millón de toneladas de granos de frijol, de las cuales se pierde, aproximadamente, del 10 al 20% por ataque de plagas, entre las cuales se encuentra el gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus* (Sifuentes, 1985). Aunque se sabe que las amilasas del gorgojo intervienen en su ataque al frijol, el número, fuente y actividad de estas moléculas no se han caracterizado completamente.

Las α -amilasas son glicosidasas que hidrolizan al almidón (α -1,4-glucano 4 glucanohidrolasa); α -amilasas, provenientes de distintos organismos, han sido purificadas y caracterizadas según sus propiedades químicas y de cinética enzimática, observándose diferencias en el pH óptimo, peso molecular y tejido que las producen. Por ejemplo, en la bacteria *Thermus filiformis* se produce una amilasa extracelular que pesa 60kDa y tiene un rango de pH entre 4.0-8.0 (Egas, 1998). En *Bacillus subtilis* se ha reportado una amilasa de 96kDa formada por cuatro subunidades y con un pH óptimo de 5.2 (Roby, 1973).

En las plantas, las amilasas son sintetizadas en el endospermo de la semilla durante la germinación, de tal manera que después de 12 h de iniciada la germinación forman el 40% del total de las proteínas de la semilla y se usan para la degradación del endospermo y la ruptura de la testa (Tuan-Hua, 1979).

En el caso de los animales, las amilasas están presentes en la saliva y en el jugo pancreático y participan en la digestión gastrointestinal del almidón. Una enzima bien caracterizada es la amilasa pancreática de cerdo, que tiene un peso molecular de 50kDa, está formada por dos subunidades de 25kDa y es activa a pH 8.5 (Stiefel, 1973). En cambio, la amilasa pancreática humana es monomérica, pesa 54kDa y tiene un pH óptimo de 5.7-6.9. Por otra parte, en el jugo gástrico de la langosta americana (*Homarus americanus*) existe una amilasa de 41kDa con un pH óptimo de 5.2 (Wojtowicz, 1972).

En el insecto *Tenebrio molitor*, la actividad de la α -amilasa del tubo digestivo se concentra en una sola banda de 68kDa, activa a pH 4.0 (Applebaum, Jancovic y Birk, 1961). En el gorgojo *Callosobruchus chinensis* se ha estudiado la amilasa del tubo digestivo, que tiene un pH óptimo de 5.2-5.4 (Podoler y Applebaum, 1971). En *Z. subfasciatus* sólo se ha reportado una amilasa de 43kDa, proveniente del tubo digestivo y con un pH óptimo de 5.0-5.3 (Grossi y Chrispeels, 1997).

Se ha observado que semillas de *P. vulgaris* resistentes al ataque de diferentes gorgojos, presentan un inhibidor proteico de amilasas (α AI), el cual se activa mediante proteólisis (Pueyo, 1993). Existen dos isómeros para este inhibidor, producidos por genes alelos, los cuales difieren en la especificidad de acción para distintas amilasas (Grossi et al., 1997). El isómero α AI-1 inhibe las amilasas del gorgojo *C. chinensis* y la amilasa pancreática de cerdo, pero

no actúa sobre las amilasas de *Z. subfasciatus*. En contraste, el isómero α AI-2 inhibe la actividad de la amilasa del tubo digestivo de *Zabrotes*, pero no inhibe las amilasas afectadas por α AI-1 (Ishimoto, 1996). Para ambas moléculas la actividad óptima de inhibición se da a un pH de 5.0-5.3, disminuyendo conforme aumenta el pH (Grossi et al., 1997).

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se propuso determinar el origen y características de las amilasas de *Z. subfasciatus*, y buscar la presencia de inhibidores de amilasas en semillas de *P. vulgaris* parcialmente resistentes al gorgojo.

METODOLOGÍA

Insectos. Los gorgojos *Zabrotes subfasciatus* se obtuvieron de una colonia mantenida en el Instituto de Ecología de la UNAM. Para su alimentación, los insectos se colocaron en semillas de *P. vulgaris* a 30 °C, con periodos de luz-oscuridad de 16 h -8 h y 70% de humedad.

Extracto de glándulas salivales. Para el análisis de las amilasas, se disectaron glándulas salivales de larvas de *Z. subfasciatus* de los cuatro instares. Grupos de cinco glándulas salivales se colocaron en 50 μ l de solu-

ción salina fría amortiguada con fosfatos (PBS) (NaCl 0.1 M, KCl 2.0mM, Na_2HPO_4 8.0mM, KH_2PO_4 1.0mM), pH 7.6. Las muestras se sometieron a 4 ciclos de congelación con nitrógeno líquido y descongelación en un baño a 65 °C, y luego se centrifugaron durante 2 min a 12 mil xg. Al sobrenadante recuperado se le adicionaron 25 μl de amortiguador de muestra 2X (1.0mM tris base, 20.0mM glicerol, 1% SDS, 0.1% azul bromofenol). A la pastilla se le adicionaron 25 μl de amortiguador de muestra con Brij-58 0.2%, se centrifugó durante 3 min a 12 mil xg, la pastilla se desechó, y al sobrenadante se le agregaron 25 μl de SDS 20%.

Obtención de semillas resistentes de *P. vulgaris*. Semillas de *P. vulgaris* de una población de semillas comerciales cepa Veracruz (Pronase), se pusieron como sustrato en cultivos de *Z. subfasciatus*. Las semillas que no se infectaron se seleccionaron y se reprodujeron; y las de la F1 se sometieron a dos nuevos retos con *Zabrotes*. Las semillas obtenidas se usaron para los experimentos de inhibición.

Extracto de *Phaseolus vulgaris*. Semillas resistentes de *P. vulgaris* se trituraron individualmente en 2 ml de solución salina fría amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7.6. El extracto se centrifugó a 4 °C y 12 mil xg durante

5 min, el sobrenadante se utilizó como fuente de inhibidores. Para probar el proceso de inhibición se mezclaron 15 μl del extracto de amilasas y 5 μl del de las semillas, la mezcla se incubó durante 15 min a 37 °C y se le agregó 25 μl de amortiguador para electroforesis 2X (Ishimoto y Chrispeels, 1996).

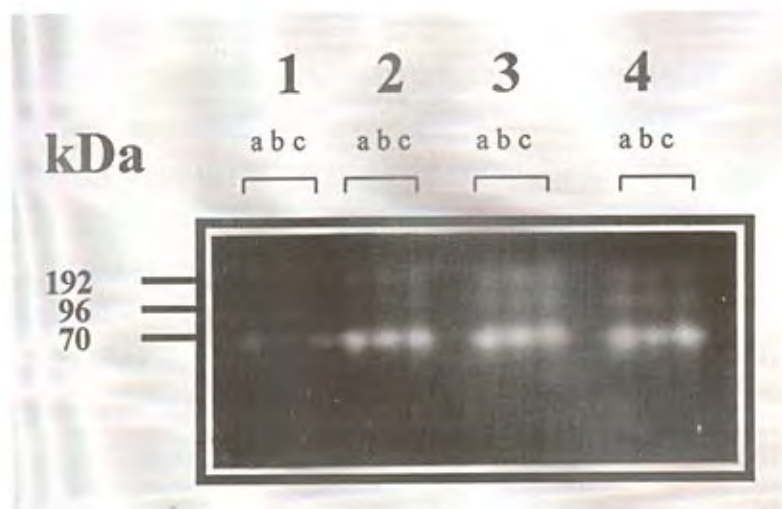
Zimogramas. La actividad de las amilasas en los diferentes extractos se analizó mediante zimogramas en geles de poliacrilamida (Lacks, 1980). Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, y en los carriles se colocaron 20 μl de los extractos de las glándulas salivales de los gorgojos o de semillas, así como de la mezcla glándula salival-semilla. Los geles se corrieron a 40 V a 4 °C. Después de la corrida se lavaron los geles dos veces en agitación con Triton X-100 al 2.5% durante 15 min. Los geles se lavaron con agua destilada y se incubaron en solución de almidón (almidón soluble Merck al 1% con Tris 0.1M) a dos valores de pH, 5.0 y 7.6 (Lacks, 1980), con o sin DTT 0.2%, durante 12 h a temperatura ambiente, y se tiñeron con solución de yodo (0.1 M KI, 0.03 M I_2) durante 15 min. Finalmente se contrastaron los geles con agua destilada.

RESULTADOS

El patrón de actividad de las amilasas en las glándulas salivales de las larvas de los cuatro estadios de *Z. subfasciatus*, varía con relación al pH, ya que cuando se indujo la actividad a pH 5.0-5.3, después de la corrida electroforética, se obtuvieron tres bandas de 70kDa, 96kDa y 192kDa (Fig. 1, carriles a).

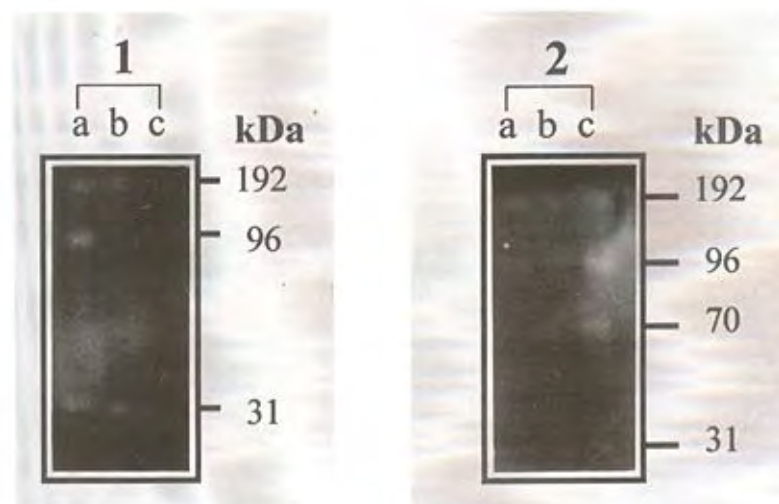
En comparación, para pH 7.6 se obtuvo un patrón de actividad menos intenso, donde se observaron, en extractos de muestras frescas, bandas con un peso molecular de 31kDa, 96kDa y 192kDa (Fig. 2-1, carril 1a).

Fig. 1. Amilasas presentes en las glándulas salivales de los cuatro estadios larvales de *Z. subfasciatus*



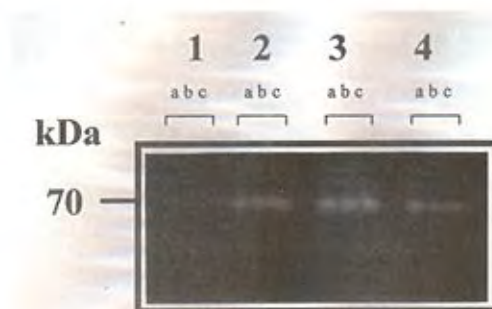
Extractos de glándulas salivales de los cuatro estadios larvales de *Z. subfasciatus* se analizaron en PAGE/SDS con sustrato de almidón a pH 5. Grupos 1-4: glándulas salivales de larvas del 1° al 4° estadio. Carriles a: extractos de glándulas salivales; carriles b y c: extracto de glándulas salivales incubado con extracto de *P. vulgaris* resistente.

Fig. 2. Efecto de inhibición de amilasas de *Z. subfasciatus* por extractos de semillas resistentes de *P. vulgaris*



Extractos de amilasas de glándulas salivales del cuarto estadio larval de *Z. subfasciatus* con extractos de semillas resistentes; se incubaron y analizaron por zimografía con sustrato de almidón a pH 7.6. Carril a: extracto de glándulas salivales; carriles b y c: mezcla de glándulas salivales con extracto de semillas resistentes. Panel 1: extracto de glándulas salivales y semillas resistentes frescos; panel 2: extractos de glándulas salivales y semillas resistentes con proceso de congelación-descongelación.

Fig. 3. Actividad de amilasa en las glándulas salivales de los cuatro estadios larvales de *Z. subfasciatus* en presencia del agente reductor DTT



Se analizaron extractos de glándulas de larvas de los cuatro estadios larvales de *Z. subfasciatus*, por zimografía con sustrato de almidón a pH 5. La activación de la amilasa se hizo en presencia del agente reductor (DTT) en el medio de activación. Grupos 1-4: extractos de glándulas salivales de los cuatro estadios larvales de *Z. subfasciatus*. Carriles a, b y c: extracto de glándulas salivales por triplicado.

En la búsqueda del mecanismo de resistencia de cepas seleccionadas de frijol, se interaccionaron extractos de *P. vulgaris* supervivientes a dos retos con gorgojos con extractos de glándulas salivales del gorgojo a pH 7.6, y se observó la inhibición de la banda de 96kDa (Fig. 2-1, carriles b y c).

En contraste, al combinar los extractos de glándulas salivales con los extractos de semillas resistentes a pH 5, no se observó actividad inhibitoria (Fig. 1, carriles b y c).

Sin embargo, el efecto inhibitorio fue sensible a la congelación-descongelación (Fig. 2-2, carriles a, b, c). Al hacer el análisis comparativo de las amilasas de las glándulas salivales de larvas de

los cuatro instars de *Z. Subfasciatus*, se encontraron, a pH 5.0, las bandas de 70kDa, 96kDa y 192kDa; la actividad de las dos últimas es sensible a la presencia del agente reductor DTT en el medio de activación de la amilasa (Fig. 3, carriles a, b, c).

DISCUSIÓN

No está claro cuántas y cuáles son las amilasas que usa *Zabrotes* para su ataque. En el tubo digestivo de este gorgojo se ha reportado hasta ahora una amilasa de 46kDa.

En este trabajo describimos la presencia de amilasas provenientes de las glándulas salivales; encontramos tres amilasas activas, tanto a pH 7.6, como a pH 5.0 (70kDa, 96kDa y 192kDa), y un segundo tipo (31kDa) activo sólo a pH 7.6.

Sin embargo, hasta el momento no podemos discernir si la más pequeña corresponde a productos de procesamiento de alguna de las de alto peso molecular, o si es una especie con actividad a pH 7.6, o si se activa, tal vez, por procesos proteolíticos.

Por otra parte, las bandas de 192kDa y 96kDa fueron sensibles a la presencia de agentes reductores, como el DTT, en contraste con la banda de

70kDa, la cual mantiene su actividad. Esta resistencia es poco usual en las α -amilasas, ya que la actividad de las amilasas de *Tenebrio molitor* y *Tribolium castaneum* se inhibe cuando éstas se encuentran en presencia de grupos tiol (Applebaum, 1964). Cabe mencionar que, hasta el momento, no se han reportado en brúquidos amilasas mayores a los 68kDa.

Al tratar de discernir el mecanismo de resistencia de cepas de frijol resistentes a dos retos con gorgojos, se interactuaron extractos de glándulas salivales con extractos de frijol; se observó la inhibición de una banda de 96kDa a pH 7.6, lo que sugiere la presencia de un inhibidor con la especificidad de α AI2, pero que actúa a pH 7.6 (por lo que podría tratarse de un nuevo tipo de inhibidor).

Cabe mencionar que este inhibidor fue sensible a los procesos de congelación-descongelación, activándose únicamente cuando se utilizan extractos frescos, lo que apoya el carácter proteico del inhibidor (datos no mostrados).

Durante el proceso de digestión del frijol por el gorgojo, las amilasas provenientes de las glándulas salivales podrían ser secretadas e intervenir en la ruptura de la testa y en la digestión del endospermo de la semilla. Una vez rota esta barrera externa del frijol, el insecto puede aprovechar para introducir sus huevecillos y continuar su desarrollo.

Asimismo, el material nutritivo del frijol debe introducirse al tubo digestivo, donde la amilasa de 46kDa quizá termine la digestión del almidón para que éste pueda ser utilizado como fuente de energía. Estos conocimientos podrían ser de gran utilidad para diseñar métodos para la preservación de granos. ☺

BIBLIOGRAFÍA

- Applebaum, S. W. (1964). The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval Amylase. *J. Insect Physiol.*, 10, 897-906.
- Applebaum, S. W., Jankovic, M. y Birk, Y. (1961). Studies on the midgut amylase activity of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.*, 7, 100-108.
- Buonocore, V., Poerio, E., Silano, V. y Tomas, M. (1976). Physical and catalytic properties of α -Amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. *Biochem J.*, 153, 621-625.
- Egas, M. C., Da Costa, M. S., Cowan, D. A. y Pires, M. E. (1998). Extracellular alpha-amylase from *Thermus filiformis* OrK A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2, 23-32.
- Grossi de Sa, M. F., Mirkov, T. E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K. S. y Chrispeels, M. J. (1997). Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*, 203, 295-303.
- Grossi de Sa, M. F. y Chrispeels, M. J. (1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 271-281.
- Ishimoto, M. y Chrispeels, M. J. (1996). Protective mechanism of the mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiol.*, 111, 393-401.
- Lacks, S. A. y Springhorn, S. S. (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Biol. Chem.*, 255, 7467-7473.
- Podoler, H. y Applebaum, W. (1971). The α -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. Properties. *Biochem. J.*, 121, 321-325.
- Pueyo, J. J., Hunt, D. C. y Chrispeels, M. J. (1993). Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. *Plant Physiol.*, 101, 1341-1348.
- Robyt, J. F. y Ackerman, R. J. (1973). Structure and function of amylases. II. Multiple forms of *Bacillus subtilis* α -amylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 445-451.
- Sifuentes, J. (1985). *Plagas del frijol en México*. México: SARH.
- Stiefel, D. J. y Keller, P. J. (1973). Preparation and some properties of human pancreatic amylase including a comparison with human parotid amylase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 302, 345-361.
- Tuan-Hua, D. H. (1979). *Molecular biology of plants*. Hormonal control of enzyme formation in barley aleurone layers. EUA: Academic Press.
- Wojtowicz, M. B. y Brocherhoff, H. (1972). Isolation and some properties of the digestive amylase of the american lobster (*Homarus americanus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 42B, 295-302.