

## Inhibidores de $\alpha$ -amilasas de la broca del café *Hypothenemus hampei* en diferentes especies vegetales

$\alpha$ -Amylase inhibitors of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in different plant species

BEATRIZ ELENA PADILLA H.<sup>1</sup>, JOSÉ RICARDO ACUÑA Z.<sup>2</sup>, CLAUDIA S. VELÁSQUEZ<sup>3</sup>,  
JOSÉ DAVID RUBIO G.<sup>4</sup>

**Resumen.** La antibiosis es uno de los mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de insectos, en el cual están involucradas proteínas de defensa como los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas. Estas se encuentran principalmente en especies vegetales como gramíneas y leguminosas. En *Phaseolus vulgaris* L. var. Radical se ha registrado un inhibidor de  $\alpha$ -amilasas de la broca del café *Hypothenemus hampei*, con más de 80% de inhibición, el cual también inhibe las  $\alpha$ -amilasas de mamíferos. Es necesaria la búsqueda de nuevos inhibidores de  $\alpha$ -amilasas en otras especies vegetales que tengan un efecto similar al de frijol y con especificidad a las  $\alpha$ -amilasas de insectos. Se obtuvieron extractos proteicos de las semillas de ocho especies vegetales de las familias Gramineae y Leguminosae. Con estos extractos y un inhibidor de  $\alpha$ -amilasas comercial de trigo (*Triticum aestivum* L.), se realizaron pruebas de actividad inhibitoria contra las  $\alpha$ -amilasas de la broca, evaluadas con espectrofotometría utilizando el método de Bernfeld y mediante zimogramas de inhibición enzimática. Las especies que mostraron más de 50% de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de broca, fueron: maíz (*Zea mays* L.), *Brachiaria decumbens* Stapf y el inhibidor comercial de trigo, corroborando su actividad mediante los zimogramas de inhibición. Con los extractos de brachiaria y de maíz no se encontró inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de mamíferos, mientras que con el inhibidor comercial de trigo sí se presentó más de 50% de inhibición. Adicionalmente se evaluó el efecto de los extractos de maíz y brachiaria sobre diferentes estados de la broca en dietas artificiales, encontrándose mortalidades de 40% y 95% de larvas respectivamente. Estas dos especies son promisorias para la identificación de los genes que codifican estas proteínas y para desarrollar una base genética de resistencia contra la broca del café.

**Palabras clave:** Antibiosis. Proteínas de defensa de las plantas.

**Abstract.** Antibiosis is one of the mechanisms of plant resistance to insect attack in which plant defense proteins, like  $\alpha$ -amylase inhibitors, are involved. These inhibitors are found mainly in the seeds of leguminous and graminaceous plant species. In *Phaseolus vulgaris* L. var. Radical, an  $\alpha$ -amylase inhibitor of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari has been reported, with up to 80% inhibition, which also inhibits  $\alpha$ -amylase of mammals. It is necessary to search for new  $\alpha$ -amylase inhibitors in other plant species that have an effect similar to beans and with specificity to insect  $\alpha$ -amylases. Protein extracts were obtained from the seeds of eight plant species from the families Gramineae and Leguminosae. With these extracts and a commercial  $\alpha$ -amylase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum* L.), tests were conducted on the inhibitory activity in the coffee berry borer evaluated with spectrophotometry using the Bernfeld method and zymograms of enzymatic inhibition. The species that showed more than 50% inhibition of  $\alpha$ -amylases in the coffee berry borer were maize (*Zea mays* L.), *Brachiaria decumbens* Stapf and the commercial inhibitor from wheat, their activity corroborated with the inhibition zymograms. While No inhibition of mammal  $\alpha$ -amylases were found for *Brachiaria* or maize, while the commercial inhibitor from wheat  $\alpha$ -amylases showed more than 50% inhibition. In addition, the effect of *Brachiaria* and maize extracts were evaluated on different stages of the coffee berry borer in artificial diets, resulting in larval mortalities of 40 and 95%, respectively. Therefore, these two species are promising for the identification of a promissory source of genes coding that code for such these inhibitory proteins and to develop a genetic base that could confer resistance to the coffee berry borer.

**Key words:** Antibiosis. Plant defense proteins.

### Introducción

La broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculio-

nidae: Scolytinae) es actualmente la plaga más importante para el cultivo del café (*Coffea arabica* L.) en Colombia. Dentro de las estrategias diseñadas para el manejo

integrado de la broca (MIB) se ha incluido el control cultural, biológico y químico. El análisis de la estructura de costos de producción en café muestra que este

1 Investigador Asociado. Bacterióloga Especialista en Biología Molecular y Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

2 Investigador Científico III. Mejoramiento Genético y Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

3 Auxiliar de Investigación.

4 Investigador Asociado. Ingeniero Agrónomo. Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

control puede representar 7,1% del total, es decir, aproximadamente \$ 300.000 (US\$145) por ha/año (Duque 2001). Incorporar una variedad resistente al insecto dentro del MIP haría este manejo más eficiente y reduciría sus costos, pero no se han encontrado aún fuentes de resistencia genética en el género *Coffea*. Por medio de transgénesis es posible obtener tal variedad, con una amplia base genética, la cual tenga incluidos genes que codifiquen proteínas con efecto de antibiosis contra la broca.

Los mecanismos de defensa al ataque de insectos basados en proteínas son manejados por la ingeniería genética para la transformación de plantas con resistencia a insectos (Gatehouse *et al.* 1992). Las principales proteínas empleadas como fuente de resistencia a insectos son los inhibidores de enzimas digestivas, como los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y proteasas, además de las lectinas, que bloquean glicoproteínas en el intestino del insecto. Los tres grupos ocasionan disminución en la absorción de nutrientes, retardo en el desarrollo del insecto y su muerte (Gatehouse 1999).

Enzimas digestivas como las  $\alpha$ -amilasas constituyen una familia de endo-amilasas, que catalizan la hidrólisis de almidón, componente importante de diversas semillas que son alimento de varios insectos. El grano de café, fuente de alimento para larvas y adultos de la broca del café, *H. hampei*, contiene 10% de almidón en su composición bioquímica total (Siveltz 1977).

Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas se encuentran en semillas de leguminosas y gramíneas (Richardson 1991) y se han purificado de semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.), fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz (*Zea mays* L.) y *Amaranthus* sp., en busca de sus propiedades insecticidas contra coleópteros (Schimoler-O'Rourke *et al.* 2001; Franco *et al.* 2000; Valencia *et al.* 2000; Minney *et al.* 1990 citado por Gatehouse 1999; Ishimoto y Kitamura 1989, citado por Chrispeels 1997; Chagolla-López *et al.* 1994).

Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas son glicoproteínas de bajo peso molecular que se acumulan en vacuolas especializadas en la fase media de desarrollo de la semilla. Al ser proteínas de semillas, son excelentes candidatos para ser expresadas heterológicamente en tejidos homólogos como la semilla del café, donde ocurre el desarrollo biológico de la broca. Esto es particularmente importante porque inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, como el  $\alpha$ AI

de fríjol, para poder ser activo, es necesario que en la semilla ocurran cambios postraduccionales como la glicosilación y proteólisis, y crear así un sitio de unión a la enzima blanco. Chrispeels (1997) registra que cuando los genes de proteínas de semilla son expresados en plantas heterólogas, los productos de la transgénesis son correctamente procesados y transportados hasta las vacuolas especializadas para la formación de un inhibidor de amilasas activo.

Algunos inhibidores de  $\alpha$ -amilasas inhiben la actividad tanto en insectos como en mamíferos, otros inhiben solamente las  $\alpha$ -amilasas de insectos como los aislados de trigo, maíz y *Amaranthus* spp., entre otros (Franco *et al.* 2002; Gatehouse 1999). También hay especificidad en el género del insecto, ya que la formación del complejo inhibidor más amilasa tiene un pH óptimo de 5.5 y por esta razón inhibe amilasas en el medio ácido del intestino de insectos del orden Coleoptera pero no en el alcalino del orden Lepidoptera (Chrispeels 1997).

Los genes de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas de fríjol ( $\alpha$ AI) han sido identificados y clonados con el propósito de obtener plantas transgénicas. Se han obtenido plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) vía *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Town) que expresan  $\alpha$ AI, acumulándose de forma estable en sus semillas, a niveles de 0,8 -1% de expresión. Estudios en campo y bioensayos con semilla de arveja transgénica ocasionaron 100% de mortalidad de larvas de *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae) (Chrispeels 1997; Schroeder *et al.* 1995).

Igualmente, se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que expresan  $\alpha$ AI, afectando insectos del orden Coleoptera (*Tenebrio molitor* L. y *Callosobruchus maculatus* F.) (Altabella y Chrispeels 1990). También, plantas de tabaco transformadas con un inhibidor bifuncional de  $\alpha$  amilasas y proteasas de maíz, adquirieron protección contra los insectos del orden Coleoptera (*Tribolium castaneum* Herbst y *Rhyzopertha dominica* Fabricius) (Franco *et al.* 2000; Sarneer-Masoud *et al.* 1994 citado por Dilawari y Dhaliwal 1996).

Valencia *et al.* (2000) encontraron mediante ensayos espectrofotométricos y zimogramas de inhibición, que inhibidores de  $\alpha$ -amilasas de fríjol (*P. vulgaris* y *Phaseolus coccineus* L.) bloquean la actividad de las  $\alpha$ -amilasas de la broca del café. Estos genes actualmente están siendo clonados y se está evaluando su expresi-

ón en semillas de tabaco transgénico, por ser una especie de rápido desarrollo vegetativo (Acuña 2004, com. per.).

Teniendo en cuenta que estos inhibidores de fríjol también son activos para las  $\alpha$ -amilasas humanas, se hace necesaria la búsqueda de otros inhibidores de amilasas que sean específicos para las amilasas de insectos. Las especies de leguminosas y gramíneas son las principales fuentes de estas proteínas de defensa. Se han evaluado extractos semipuros de semillas de *Brachiaria decumbens* Stapf, *Canavalia ensiformis* L., *Vicia faba* L., *Erythrina rubrinervia* Kunth, *Adenanthera pavonica* L., *Acacia melanoxylum* L. y *Trifolium hybridum* L., adicionados a dietas artificiales, encontrándose efectos adversos en el ciclo de vida de la broca (González 1999). Por tanto, se seleccionaron estas especies y algunas por registros en la literatura, como *T. aestivum* y *Z. mays*, para la búsqueda de especies vegetales que contengan inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas de la broca y así ser seleccionadas para la posterior identificación de los genes que codifican estas proteínas y desarrollar una base genética de resistencia contra la broca.

## Materiales y Métodos

**Material Vegetal.** Se utilizaron semillas de *V. faba*, *B. decumbens*, *C. ensiformes*, *T. hybridum*, *A. melanoxylum*, *A. pavonica*, *E. rubrinervia* y *Z. mays*, además un inhibidor comercial purificado de *T. aestivum* (Sigma I-1520).

**Extracción de los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas.** Las semillas molidas se homogenizaron a 4°C con 5 volúmenes de NaCl 100 mM por 3 horas en agitación constante. Posteriormente el extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos y los sobrenadantes se dializaron contra agua durante tres noches (tres cambios de agua al día). Los extractos dializados se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C y finalmente se liofilizaron. Los extractos liofilizados se utilizaron posteriormente como fuente de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas.

**Extracción de las  $\alpha$ -amilasas de *H. hampei*.** Se pesaron 2 gramos de insectos y se homogenizaron a 4°C con 5 volúmenes de NaCl 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Posteriormente el extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se congeló a -20°C para ser usado posteriormente como fuente de enzima.

**Identificación de los extractos con inhibidores de  $\alpha$  amilasas.** Para determinar cuáles de los extractos semipuros de las semillas en estudio mostraron actividad inhibitoria, se cuantificó la producción de maltosa en la digestión del almidón con la metodología propuesta por Bernfeld (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Bernfeld 1955).

Previo a la identificación de los extractos semipuros con inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, se cuantificó la proteína total por ml de cada extracto, disuelto en buffer citrato pH 5.0, por el método de Bradford (Bradford 1976).

Para la identificación se realizaron tres repeticiones por especie vegetal. Se evaluaron cuatro cantidades de los extractos 10, 20, 40 y 80  $\mu$ l. Del inhibidor comercial de trigo se evaluó 1  $\mu$ l. A todos los tubos de prueba se les adicionaron 100  $\mu$ l del extracto semipuro de las  $\alpha$ -amilasas de la broca, se incubaron durante una hora a 37°C y se adicionaron 250  $\mu$ l del sustrato almidón a 0,125%.

Para determinar la producción de maltosa se hicieron dos lecturas, al tiempo cero y a la hora de iniciadas, tomando 100  $\mu$ l de la reacción más 100  $\mu$ l del reactivo de Bernfeld. Se detuvieron las reacciones calentándolas en agua hirviendo durante 10 minutos, se adicionó 1 ml de agua y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a  $\lambda$  de 490 nm. Además se tuvo un control de la actividad de la enzima proveniente del insecto, sin el extracto proteico. Adicionalmente se hicieron ensayos con amilasa comercial, Pankreoflat® (amilasa pancreática de porcino) como fuente de  $\alpha$ -amilasas de mamíferos.

La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición. Para cada especie se buscó la expresión lineal o cuadrática que describiera el comportamiento del porcentaje de inhibición en función de la concentración, y se determinó la concentración mínima que inhibió 50% de la amilasa de la broca. Para la obtención de los genes de inhibidores de amilasa, se seleccionaron las especies que mostraron 50% o más de inhibición de la actividad de la amilasa en estudio.

Con los extractos que mostraron actividad inhibitoria en el ensayo espectrofotométrico, se hicieron zimogramas de inhibición enzimática, con el fin de implementar la decisión de las especies seleccionadas para la búsqueda de los genes de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, como posibles fuentes de resistencia a la broca. Las proteínas del respectivo extracto se

separaron en gels de poliacrilamida nativos (Gradiente 10–15%. Phast-Gel, Amersham-Pharmacia). Cada gel se incubó en una solución de almidón a 1,5% por 30 minutos a 4°C, y luego con 10 ml del extracto semipuro de las  $\alpha$ -amilasas de la broca, disuelto en buffer citrato de sodio 50 mM pH 5.0, por 30 minutos a 30°C. El gel con almidón se reveló con KI/I<sub>2</sub> hasta obtener bandas azules oscuras, que indicaron la presencia del inhibidor. Como control se utilizó frijón (*P. vulgaris*, var. Radical) como fuente de inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas de la broca del café (Valencia *et al.* 2000).

**Evaluación de antibiosis contra la broca en dietas artificiales.** Para observar el efecto de antibiosis se evaluaron los extractos de las especies vegetales que mostraron efecto de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca, adicionándolos a dietas merídicas (Portilla *et al.* 2000). Se evaluaron 400 mg de los extractos semipuros liofilizados de *B. decumbens* y *Z. mays* disueltos en 10 ml de agua destilada estéril, a los cuales previamente se les había determinado su concentración de proteína total. Posteriormente estos 10 ml se homogenizaron con 20 ml de dieta y se sirvieron en 10 pozos de una caja multipozos con 2 ml de la mezcla en cada pozo. La dieta se secó hasta obtener una humedad de 50% y se inoculó con 20 huevos de broca por pozo. Para los controles de cada uno de los extractos se adicionó el mismo volumen de la dieta mezclada con 10 ml de agua destilada estéril y se tuvieron las mismas repeticiones y la misma cantidad de huevos inoculados.

Se hicieron tres lecturas, una a los cuatro días, para determinar el porcentaje de eclosión, a los 12 y a los 24 días para determinar el porcentaje de mortalidad de estados de brocas ocasionados por efecto de los extractos evaluados.

## Resultados

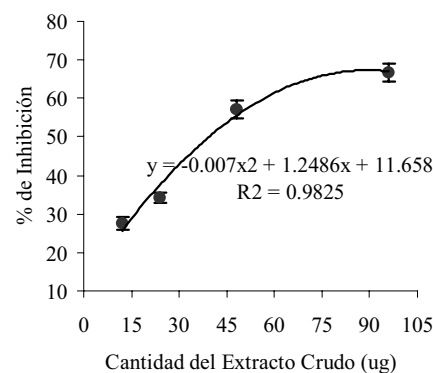
Los extractos de las especies vegetales que mostraron inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca del café con las condiciones evaluadas fueron *B. decumbens*, *Z. mays* y el inhibidor comercial de trigo (*T. aestivum*). Con las otras especies evaluadas en las mismas condiciones no se encontró inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca.

En la figura 1 se observa el porcentaje de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca con diferentes cantidades de extracto semipuro de *Z. mays*, 12, 24, 48 y 96  $\mu$ g

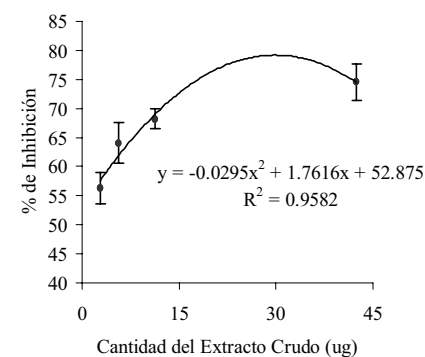
de proteína total. Se observa que entre 24 y 48  $\mu$ g se alcanza 50% de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca. El porcentaje de inhibición se ajusta mejor a un comportamiento cuadrático (Fig. 1) comparado con un comportamiento lineal ( $y = 0.4708x + 25.243$ .  $R^2 = 0.8872$ ).

En la figura 2 se observa el porcentaje de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca con diferentes cantidades de extracto semipuro de *B. decumbens*, 2.86, 5.66, 11.32 y 42.45  $\mu$ g de proteína total. Con la menor cantidad de extracto evaluado se alcanza más de 50% de inhibición. El porcentaje de inhibición se ajusta mejor a un comportamiento cuadrático (Fig. 2) que lineal ( $y = 0.3624x + 60.123$ .  $R^2 = 0,7494$ ).

Para el ensayo de inhibición con el inhibidor comercial purificado trigo se



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca con diferentes cantidades de extracto semipuro de *Zea mays* (12, 24, 48 y 96  $\mu$ g de proteína). Medido como la producción de maltosa utilizando el método de Bernfeld (1955). Cada punto es el promedio de tres medidas y las barras representan el error standard.



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca con diferentes cantidades de extracto semipuro de *Brachiaria decumbens* (2.83, 5.66, 11.32 y 42.45  $\mu$ g de proteína) medido como la producción de maltosa utilizando el método de Bernfeld (1955). Cada punto es el promedio de tres medidas y las barras representan el error standard.

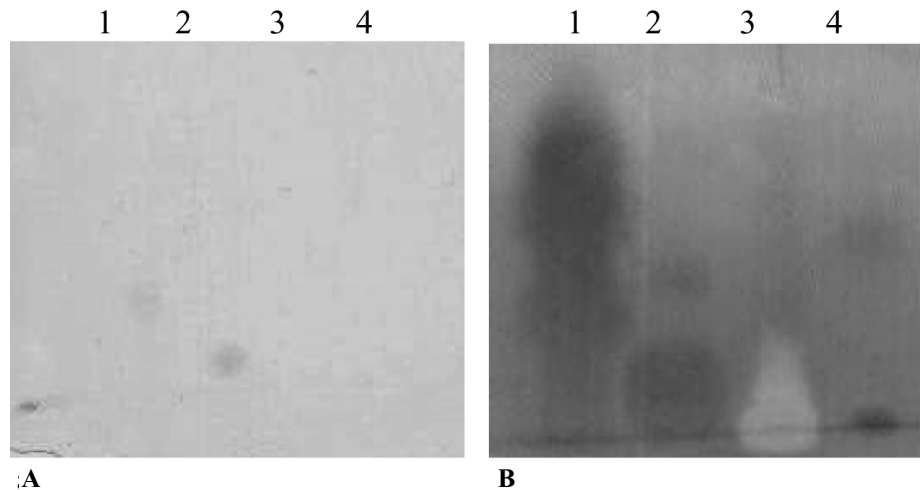
evaluó 1  $\mu$ l del producto (740 unidades  $\text{mg}^{-1}$ ) disuelto en 1 ml de buffer citrato pH 5.0 y se hicieron tres lecturas. Dando un porcentaje de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca de  $80,33 \pm 1,19\%$ .

En la evaluación del efecto inhibitorio de los extractos semipuros de *Z. mays*, *B. decumbens* y el inhibidor comercial de trigo contra las  $\alpha$ -amilasas de mamíferos (amilasas pancreáticas de porcino, Pankreoflat®), se encontró inhibición con trigo de un  $58,13 \pm 3,12\%$ . Con las otras dos especies evaluadas no se encontró efecto de inhibición. Por tanto las especies de *Z. mays* y *B. decumbens* son fuentes promisorias para la búsqueda de genes de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas especialmente contra  $\alpha$ -amilasas de insectos.

### Zimogramas de inhibición enzimática

En la figura 3 se presentan los zimogramas de inhibición enzimática de las amilasas de la broca y de las  $\alpha$ -amilasas pancreáticas de porcino (Pankreoflat®). En el gel incubado con la solución de las  $\alpha$ -amilasas pancreáticas de porcino (Fig. 3A), se observa dos bandas bien definidas, correspondientes al inhibidor purificado de frijól (carril 2) y al inhibidor comercial de trigo (carril 1). En este gel no se observan bandas de inhibición con los extractos de *Z. mays* y *B. decumbens* (carriles 3 y 4), corroborando los resultados espectrofotométricos, en los cuales tampoco se encontró inhibición con estas dos especies. En el gel incubado con las  $\alpha$ -amilasas de la broca (Fig. 3B), se presenta una coloración más oscura, posiblemente porque tienen menor actividad que las amilasas comerciales. Sin embargo, se aprecia un barrido muy fuerte correspondiente al inhibidor comercial de trigo (carril 1). Espectrofotométricamente éste inhibió 80% de las amilasas de la broca y 58% de las amilasas de mamífero, resultados encontrados también en los geles. En la figura 3B también se observan bandas de inhibición con el extracto puro de *P. vulgaris* (carril 2), el extracto semipuro de *Z. mays* (carril 4) y con el extracto semipuro de *B. decumbens* se observa un barrido muy tenue y no se observan bandas definidas de inhibición (carril 3).

El extracto semipuro de *Z. mays* sólo inhibió las  $\alpha$ -amilasas de la broca, tanto en los zimogramas como en los ensayos espectrofotométricos. Esta actividad específica de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de insectos, fue registrada por Franco *et al.* (2002) y por Schimoler *et al.* (2001) para insectos del orden Coleoptera, *T.*



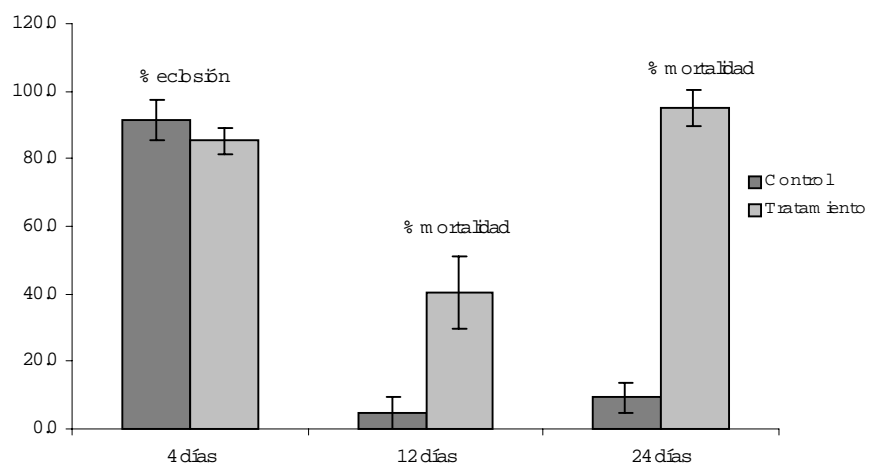
**Figuras 3.** Zimogramas de inhibición de  $\alpha$ -amilasas de broca. **A)** gel incubado con la amilasa pancreática comercial (Pankreoflat®). **B)** gel incubado con la amilasa de la broca. Carril 1. inhibidor comercial de trigo, carril 2. Extracto purificado de frijól, carril 3. Extracto semipuro de brachiaria, carril 4, extracto semipuro de maíz.

*castaneum* y *R. dominica*. *B. decumbens* también fue específica a las  $\alpha$ -amilasas de la broca. Por lo anterior, estas dos especies son candidatas para la búsqueda de los genes que codifican los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y hacer parte de la base genética para resistencia a la broca del café.

### Evaluación de antibiosis contra la broca en dietas artificiales

En la figura 4, se observa el efecto del extracto semipuro de *B. decumbens*, contra la broca del café. Previamente se había determinado que los 400 mg del extracto semipuro adicionado a la dieta contenían 2,83 mg de proteína total. El efecto adverso contra la broca se determinó mediante tres evaluaciones. A los cuatro días, se

registró el porcentaje de eclosión de larvas, el cual fue de  $84,3 \pm 4,9\%$ , comparado con el control (tratamiento sin la adición de extracto semipuro de la especie vegetal en estudio), de  $89,5 \pm 6,2\%$ . Con las larvas que eclosionaron se hicieron las siguientes dos lecturas, a los 12 y 24 días después de la inoculación de la dieta. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad de estados de broca por el efecto del tratamiento. Se obtuvo  $40,4 \pm 10,6\%$  de mortalidad a los 12 días con el tratamiento, comparado con  $4,5 \pm 4,9\%$  en el control. A los 24 días,  $95,1 \pm 5,6\%$  de mortalidad, comparado con  $9,3 \pm 4,2\%$  en el control. Considerando estos resultados y la evidencia bioquímica de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca del café con este



**Figura 4.** Efecto de antibiosis contra la broca del café de 400 mg de extracto semipuro de *Brachiaria decumbens* evaluado en la dieta artificial Cenibroca. Las barras representan el error standard de diez repeticiones.

extracto (resultados mostrados previamente), se reafirmó la decisión de seleccionar la especie *B. decumbens*, como fuente de búsqueda de genes con efectos deletéreos contra la broca, para ser incluidos en futuras variedades con resistencia a esta plaga mediante el mejoramiento genético no convencional.

En la figura 5 se observa el efecto de antibiosis contra la broca del café utilizando el extracto semipuro de *Z. mays*, con una concentración total de proteína de 12 mg en los 400 mg de extracto adicionado a la dieta. A los cuatro días el porcentaje de eclosión encontrado fue  $94,7 \pm 4,2\%$ , comparado con el observado en el control que fue  $94 \pm 3,1\%$ . Respecto al porcentaje de eclosión de larvas, se obtuvo  $8,3 \pm 3,4\%$  de mortalidad a los 12 días con el tratamiento, comparado con  $2,4 \pm 2,7\%$  en el control y  $40 \pm 6,6\%$  de mortalidad a los 24 días, comparado con  $5,5 \pm 3,6$  en el control.

En los ensayos con dietas se observó que con el extracto de *B. decumbens* se logra una evidente mortalidad de larvas, 95%, confirmando los ensayos bioquímicos de inhibición de  $\alpha$ -amilasas, en los cuales con la menor cantidad de extracto evaluado se alcanzó más de 50% de inhibición. Con el extracto de maíz se encontró una menor mortalidad en las evaluaciones en dietas hasta 40%, igualmente confirmando los ensayos bioquímicos, en los cuales se necesitó mayor cantidad

del extracto para alcanzar 50% de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca.

### Discusión

Las plantas han adquirido evolutivamente cierto grado de resistencia a insectos plaga mediante la producción de compuestos de defensa, que pueden ser de naturaleza peptídica o no peptídica. Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas son proteínas de defensa contra insectos ampliamente estudiadas para el control de diversas plagas en diferentes cultivos importantes en el mundo (Franco *et al.* 2002). De las ocho especies vegetales evaluadas en la presente investigación, se encontraron dos candidatos potenciales como fuente de genes que confieran resistencia a la broca, como son el inhibidor de *B. decumbens* y el de *Z. mays*.

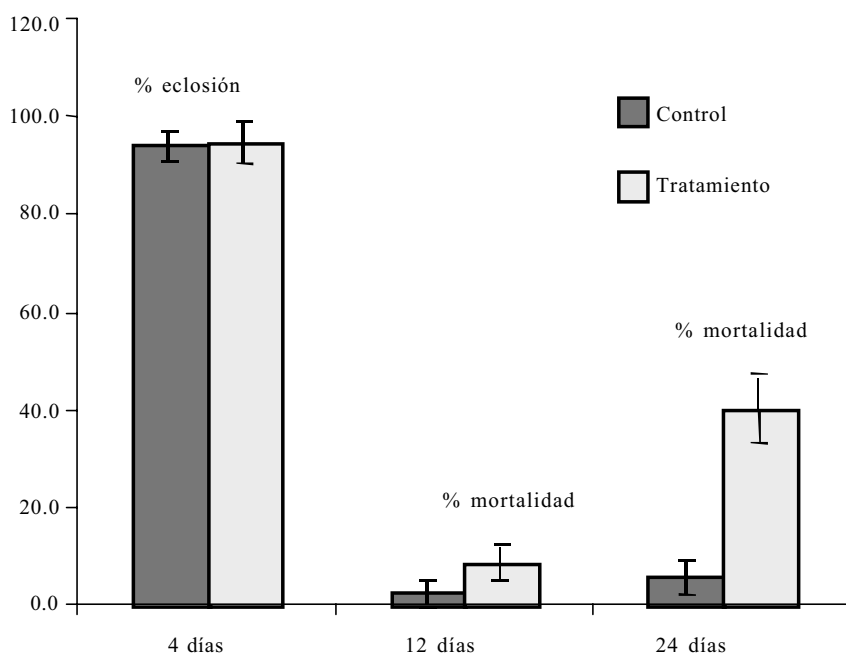
Para introducir genes de inhibidores enzimáticos en una variedad resistente a una plaga por medio de transgénesis, estos deben tener algunas propiedades como son: Inhibir sustancialmente las enzimas de los insectos utilizando bajas concentraciones del inhibidor, como fue el caso de los dos extractos de inhibidores seleccionados en la presente investigación. Comparando los dos extractos seleccionados, utilizando el extracto de *B. decumbens* se necesita menor concentración de proteína en el extracto para alcanzar el 50% de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca.

Otra propiedad importante es la especificidad de inhibición a las amilasas de los insectos, la cual se identificó con los dos extractos vegetales seleccionados de *B. decumbens* y el de *Z. mays*. Con estos dos extractos se encontró inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca de café y no hubo inhibición de las  $\alpha$ -amilasas pancreáticas de mamífero, confirmando así los registros en la literatura del inhibidor de *Z. mays* (Franco *et al.* 2002). El inhibidor de *B. decumbens* es un nuevo registro en la literatura como posible fuente de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas, además de mostrar especificidad para la broca del café fue el extracto que se necesitó en menor concentración para obtener más de 50% de inhibición.

En los zimogramas de inhibición de las  $\alpha$ -amilasas de la broca con el extracto de *B. decumbens*, a diferencia de maíz, no se observó una banda de inhibición bien definida, por tanto es importante hacer un análisis de proteómica para esta especie y corroborar que el efecto adverso contra la broca demostrada tanto en los ensayos biológicos y bioquímicos son de tipo peptídico, característica importante para que sean candidatos en el desarrollo de una futura variedad de café con resistencia a la broca por medio de transgénesis.

En los ensayos biológicos utilizando extractos de proteína semipura de maíz y brachiaria en dietas merídicas para la broca, se presentaron mortalidades entre el 40 y el 95%. Debe determinarse si la mortalidad del insecto es ocasionada por los inhibidores enzimáticos presentes en los extractos, los cuales se identificaron por medio de ensayos bioquímicos. Se recomienda entonces realizar pruebas con los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas puros. Debido a los altos costos del proceso de purificación de la proteína y de la obtención de la cantidad necesaria para realizar los ensayos biológicos, la metodología utilizada en esta investigación, evaluando extractos semipuros, es válida para la selección de especies como fuentes genéticas de resistencia vegetal a insectos.

Por tanto, en éste trabajo se dan las herramientas bioquímicas y biológicas para la selección de especies vegetales que contengan compuestos proteicos responsables de antibiosis contra la broca del café. Las especies vegetales que produzcan estos efectos son candidatas potenciales para la búsqueda de los genes que codifican estas proteínas, con el propósito de incluirlos dentro de un plan de mejoramiento para obtener una variedad de café resistente a la broca.



**Figura 5.** Efecto de antibiosis contra la broca del café de 400 mg de extracto semipuro de *Zea mays* evaluado en la dieta artificial Cenibroca. Las barras representan el error standard de diez repeticiones.

### Conclusiones

En los ensayos bioquímicos se encontró un efecto superior al 50% de inhibición de la actividad de las  $\alpha$ -amilasas de la broca, con los extractos semipuros de las semillas de *Z. mays* y *B. decumbens* y el inhibidor comercial de *T. aestivum*. Adicionalmente se encontró especificidad con *B. decumbens* y *Z. mays* para las amilasas de los insectos, por lo que se proponen estas dos especies como fuentes promisorias para la identificación de los genes que codifican estas proteínas.

En los ensayos biológicos, utilizando dietas merídicas, se observó el efecto de antibiosis con porcentajes de mortalidad de larvas de broca de 40 y 95% con los extractos semipuros de las semillas de *Z. mays* y *B. decumbens* respectivamente. Confirmando que estas especies presentan compuestos que tienen un efecto deletéreo contra la broca. Pero es necesario determinar si el efecto de mortalidad es ocasionado a la presencia de inhibidores enzimáticos en estos extractos, mediante evaluaciones en dieta de inhibidores puros.

### Agradecimientos

Al Centro Nacional de Investigaciones del café, Cenicafé, al Programa de Jóvenes Investigadores de Colciencias y al personal de la Disciplina de Mejoramiento Genético y Biotecnología de Cenicafé (Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia).

### Literatura citada

- ALTABELLA, T.; CHRISPEELS, M. J. 1990. Tobacco plants transformed with the bean  $\alpha$  AI gene express an inhibitor of insect  $\alpha$ -amylase in their seeds. *Plant Physiology* 93 (2): 805-810.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$  p. 149-158. In: Colowick, S. P.; Kaplan, N. O. (eds.). *Methods in enzymology*. Vol. 1 Academic Press New York.
- BRADFORD, M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- CHAGOLLA-LÓPEZ, A.; BLANCO-LABRA, A.; PATHY, A.; SÁNCHEZ, R.; PONGOR, S. 1994. A novel alpha-amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (38): 23675-23680.
- CHRISPEELS, M. J. 1997. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the  $\alpha$ -amilasa inhibitor gene. p. 139-156. In: Carozzi N., Koziel M. (eds.). *Advances in insect control: the role of trasgenic plants*. London: Taylor and Francis.
- DILAWARI, V. K.; DHALIWAL, G. S. 1996. Biotechnology and host plant resistance to insect Opportunities and achallenges. p. 36-53. In: Ananthakrishnan, T.N. (ed.). *Biotechnological Perspectives in Chemical Ecology of insects*. Oxford IBH Publishing Co. Pvt. Ltd: Nueva Delhi, India.
- DUQUE O., H. 2001. Análisis económico de doce prácticas para mejorar el desempeño de las fincas cafeteras. Cenicafé. Chinchiná (Caldas). 57 p.
- FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH, JR.; SILVA, C. P.; GROSSI DE SÁ, M. F. 2000. Activity of wheat  $\alpha$  amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$  amylase and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry* 267 (8): 1466-1473.
- FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI de SÁ, M. F. 2002. Plant  $\alpha$  amylase inhibitors and their interactions with insect  $\alpha$  amylases structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry* 269: 397-412.
- GATEHOUSE, A. M. R. 1999. Biotechnological applications of plant genes in the production of insect resistant crops. p. 263-280. In: Clement, S. L.; Quisenberry, S. S. (eds.). *Global Plant Genetic Resources for Insect Resistant Crops*, London, CRC Press.
- GATEHOUSE, A. M. R.; BOULTER, D.; HILDER, V. A. 1992. Potential of plant derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. p. 155-181. In: Gatehouse, A. M. R.; Hilder, V. A.; Boulter, D. (eds.). *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection* CAB International, Wallingford, UK.
- GONZÁLEZ G., M. T. 1999. Efectos de la concentración y combinación de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y proteasas sobre la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Informe anual de actividades 1998-1999. Cenicafé. Chinchiná (Caldas).
- PORTILLA, M.; MUMFORD, J.; BAKER, P. 2000. Reproductive potential response to continuous rearing of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) developed using Cenibroca-artificial diet. *Revista Colombiana de Entomología* 26 (3-4): 99-105.
- RICHARDSON, M. J. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. p. 259-305. In: Dey, P. M.; Harborne, J. B. (eds.). *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 5, Academic Press, New York, 259 p.
- SCHIMOLER-O'ROURKE, R.; RICCHAR- DSON, M.; SELITRENNIKOFF, C. P. 2001. Zeamatin inhibits trypsin and  $\alpha$  amylase activities. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5): 2365-2366.
- SCHROEDER, H. E.; GOLLASCH, S.; MOORE, A.; TABE L. M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPEELS, M. J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. J. V. 1995. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology* 107: 1233-1239.
- SIVELTZ, M. 1977. *Coffee and Tea Technology in: Elements of Food Technology*. Norman W Desroesier Avi Publishing Co. Westport connetrant 19: 601-613.
- VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. E.; OSSA, G. A.; CHRISPEELS, M. J. 2000.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 207-213.