

La digestión de carbohidratos en las larvas del gorgojo rojo de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae)

F.J. ALARCÓN, A. PEREGRINA, T.F. MARTÍNEZ, J.G. MAYORAL, P. BARRANCO

En este trabajo se estudia la evolución de la actividad amilolítica de *Rhynchophorus ferrugineus* durante su desarrollo larvario por técnicas bioquímicas y electroforéticas. Los resultados confirmaron la presencia de amilasas en larvas neonatas antes de su primera alimentación exógena. Durante todo su desarrollo, las larvas presentaron el mismo patrón de enzimas constituido por cuatro isoformas de bajo peso molecular (16 a 20 kDa). Paralelamente, se estudió la respuesta de las larvas a la ingestión de diferentes dietas. Se comprobó que las larvas alimentadas con dietas que sólo contenían carbohidratos purificados presentaron menores crecimientos y niveles de actividad amilasa digestiva. Este efecto fue revertido al añadir una fuente de proteína adicional a la dieta. La estrecha relación encontrada entre el peso de la larva y su actividad amilasa digestiva ($R^2 = 0,769$) indica que la secreción amilolítica está determinada por el tamaño de las larvas y no tanto por la dieta ingerida. Los estudios electroforéticos mostraron que todas las larvas, independientemente de la dieta consumida, presentaron el mismo patrón de isoenzimas. Los resultados obtenidos apuntan que las amilasas de *Rhynchophorus ferrugineus* podrían ser enzimas diana en el desarrollo de futuras estrategias de control basadas en inhibidores de amilasas.

F.J. ALARCÓN, A. PEREGRINA, T.F. MARTÍNEZ, J.G. MAYORAL, P. BARRANCO: Departamento de Biología Aplicada. CITE II-B. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano, 04120 Almería. e-mail: falarcon@ual.es

Palabras clave: amilasa, carbohidratos, Coleoptera, Curculionidae, digestión, desarrollo larvario, electroforesis, *Rhynchophorus ferrugineus*.

INTRODUCCIÓN

Ante la demanda creciente de productos agrícolas es necesario potenciar el desarrollo de nuevas estrategias de producción basadas en programas de control integrado que combinen diversas prácticas, entre las cuales se incluya el uso racional de plaguicidas, pero al mismo tiempo se exploren nuevas estrategias. De este modo, en una cuantía que por ahora no supera el 5%, se usan también los denominados bioinsecticidas, algunos de los cuales tienen un origen biológico (GATEHOUSE *et al.*, 1992). Uno de los fines de este tipo

de prácticas es la obtención de plantas resistentes que contengan en sus tejidos bioinsecticidas y, por tanto, les confieran altos niveles intrínsecos de resistencia a los insectos.

Las plantas, de manera natural, poseen y pueden desarrollar sus propias defensas químicas contra los insectos que atacan sus tejidos. Entre las numerosas clases de fitoquímicos naturales destacan las lectinas (CHRISPEELS y RAIKHEL, 1991), compuestos fenólicos (SUMMERS y FELTON, 1994) e inhibidores de enzimas digestivas (WOLFSON y MURDOCK, 1995). Uno de los enfoques actuales en la búsqueda de nuevos bioinsecticidas se

ha orientado hacia la utilización de las propias defensas químicas de las plantas. La mayoría de estas sustancias tienen en común que ejercen su acción en el sistema digestivo del insecto. Es por ello que para el desarrollo de estos métodos alternativos de control resulta necesario conocer tanto la bioquímica y fisiología digestiva de los insectos que son plaga de cultivos agrícolas como los mecanismos y modos de acción de estos insecticidas naturales.

Hasta la fecha, la eficacia de estas sustancias se determina mediante tres aproximaciones progresivamente más complejas. En una primera aproximación se realizan ensayos "in vitro" en los que se evalúa el efecto y modo de acción de estas sustancias. En este sentido, generalmente lo primero que se requiere antes de iniciar una estrategia de este tipo es conocer con detalle el tipo y las características de las enzimas que actúan en el sistema digestivo de la especie en cuestión. Obviamente, en estos estudios de laboratorio no se puede evaluar la respuesta fisiológica del insecto a los tratamientos. En la segunda aproximación, las sustancias a evaluar, que previamente se han confirmado como posibles bioinsecticidas, se incorporan en un alimento artificial de composición conocida, analizándose "in vivo" el efecto de ésta sobre la fisiología, crecimiento y desarrollo de los insectos. En una última etapa se realizan ensayos "in planta" en los que finalmente se evalúa el efecto real de esta sustancia sobre dicho insecto después de incorporarla a la planta mediante técnicas moleculares. Como puede deducirse el desarrollo de cada etapa se sustenta en los resultados obtenidos en la fase previa y se requieren poblaciones de insectos establecidas en laboratorio que puedan emplearse como modelo biológico experimental.

En el Laboratorio de Entomología Agrícola de la Universidad de Almería se cuenta con una población estable de gorgojo rojo de las palmeras (*Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier, 1790) desde 1996. Este coleóptero fue introducido en España a través de palmeras ornamentales importadas y está causando

daños graves en palmeras del género *Phoenix*, especialmente en *Phoenix canariensis* (BARRANCO *et al.*, 1996 a y b). Gracias al mantenimiento de esta población de laboratorio se han podido conocer importantes datos sobre su biología. Aunque se trata de una plaga de plantas ornamentales y, en nuestro país, no tiene importancia como plaga de cultivos agrícolas, es importante destacar el hecho de que puede constituir un MODELO BIOLÓGICO potencial para conocer los mecanismos y modos de acción de futuros bioinsecticidas a los tres niveles descritos anteriormente y que los resultados obtenidos para esta especie podrían ser extrapolados a otros insectos plaga. A todo lo anterior se une su facilidad de cría en laboratorio con alimento artificial y el gran tamaño de sus larvas que facilita cualquier tipo de estudio sobre su fisiología digestiva. Recientes estudios llevados por ALARCÓN *et al.* (2002) han dilucidado distintos aspectos de la fisiología digestiva del *Rhynchophorus ferrugineus* en relación con los mecanismos de acción de las enzimas responsables de la actividad proteolítica de este insecto, así como los efectos de distintas dietas sobre el funcionamiento de las mismas. Adicionalmente al estudio de la actividad proteolítica, se ha puesto de manifiesto que esta especie posee un equipamiento enzimático capaz de hidrolizar carbohidratos solubles (MARTÍNEZ *et al.*, 2000). De hecho, las plantas de las que estos animales se alimentan se caracterizan por su alto contenido en carbohidratos, a la vez que su relativamente baja concentración de proteínas (ALARCÓN *et al.*, 2002). A pesar de la preponderancia de los carbohidratos en la dieta de ésta y otras muchas especies de insectos plaga (PUEYO *et al.*, 1995), puede afirmarse, hablando en términos generales, que el conocimiento de las enzimas amilasas y otras carbohidrasas digestivas de los insectos plaga es más limitado que el de las enzimas proteolíticas. Las plagas de cultivos y de almacén adaptadas al consumo de carbohidratos (principalmente almidón) son numerosas, pero la investigación orientada a la utilización de posibles bioinsecticidas cuyo

blanco de acción sea la inhibición de la actividad amilasa está en sus inicios (BIGGS y MCGREGOR, 1996; SILVA *et al.*, 2001). En este sentido, se considera de gran interés la utilización del *Rhynchophorus ferrugineus* como MODELO de estudio de la fisiología de la digestión de los carbohidratos, aprovechando los aspectos favorables ya comentados de la cría de esta especie.

Los objetivos del presente trabajo son por un lado la detección, cuantificación y caracterización bioquímica de la actividad de las enzimas amilolíticas digestivas durante el desarrollo larvario de *Rhynchophorus ferrugineus*, y finalmente de otro, la evaluación del efecto de distintas dietas sobre el crecimiento y la expresión de las enzimas responsables de la digestión del almidón. Este estudio representa una etapa inicial imprescindible en el proceso de estudio de la posibilidad de la inhibición de las amilasas como novedosa medida de control en la lucha contra insectos plaga.

MATERIAL Y MÉTODOS

Insectos. Las larvas proceden de una población de *Rhynchophorus ferrugineus* establecida en el laboratorio. La población de adultos se mantenía sobre caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). A partir de los adultos se obtenían los huevos embrionados que posteriormente eran eclosionados. Las larvas fueron criadas en dieta artificial control (Cuadro 1) según BARRANCO *et al.* (1997). El número de estadios post-embrionarios descritos en estas condiciones de cultivo son un total de nueve. Todo el proceso de cría se realizó en oscuridad dentro de una cámara de cultivo a una temperatura de $25 \pm 0,5$ °C y con una humedad relativa del 65 ± 5 %.

Estudio del desarrollo ontogénico de la actividad amilasa. Para realizar este estudio se seleccionaron un total de 500 larvas neonatas que fueron criadas en dieta artificial control durante todo su desarrollo larvario. El muestreo de éstas se realizó 24 h después de la muda, salvo para el primero de ellos en

el que se incluyeron dos muestras; una de larvas recién eclosionadas (L1r) y otra con larvas de 1 día de edad (L1). El número de larvas utilizadas fue el siguiente: L1r y L1: 100 individuos; larvas de estadio 2 (L2): 50 individuos y larvas de estadios 3 a 9 (L3 a L9): 10 individuos. En cada punto de muestreo se procedió al pesado individual de las larvas, salvo para L1r y L1 que se pesaron en grupos de 25 larvas. Una vez pesadas, las larvas fueron sacrificadas y conservadas a -20 °C hasta su análisis.

Estudio de la influencia de la dietas experimentales sobre el crecimiento y la expresión de la actividad amilasa. Un total de 200 larvas recién eclosionadas fueron mantenidas en dieta artificial control (Cuadro 1) hasta un día después de su muda a L6. En ese momento se transfirieron a tubos de cultivo que contenían 16 dietas experimentales diferentes elaboradas cada una de ellas con un tipo carbohidrato diferente (Cuadro 2). Se prepararon dos tipos de dietas; las dietas A sólo incluían las fuentes de carbohidratos (harinas vegetales, almidón, sacarosa y maltosa) y las dietas B que además de éstos carbohidratos, incluían caseína (CS) al 1% como fuente de proteína. Siete larvas por

Cuadro 1.- Composición de la dieta control para la cría de larvas de *R. ferrugineus* (para 1000 ml de dieta)

Ingrediente	Cantidad
Agar ¹	20 g
Levadura de cerveza ²	50 g
Germen de trigo ²	50 g
Harina de maíz ²	50 g
Nipagina ¹	1,8 g
Ácido ascórbico ¹	4,5 g
Ácido benzoico ¹	1,8 g
Cloranfenicol ¹	0,5 g
Vitaminas y aminoácidos ³	25 ml
Agua destilada	850 ml

¹ Panreac S.A.

² Santiveri®

³ Hidro Rex Vital Aminoácidos S.P. Veterinaria, S.A. Tarragona

Cuadro 2.- Composición de las dietas experimentales utilizadas en el estudio de crecimiento y expresión de amilasas digestivas (para 100 ml de dieta)

Ingredientes	Dietas A	Dietas B
Agar	2 g	2 g
Fibra de coco	3 g	3 g
Agua destilada	84,1 ml	83,1 ml
Nipagina	0,18 g	0,18 g
Ácido ascórbico	0,45 g	0,45 g
Ácido benzoico	0,18 g	0,18 g
Cloranfenicol	0,05 g	0,05 g
Vitaminas	5 ml	5 ml
Fuente de carbohidratos*	5 g	5 g
Caseína	-	1 g

* Las fuentes de hidratos de carbono utilizadas en cada tipo de dieta fueron la siguientes:

Harinas vegetales: maíz, trigo, avena, cebada y arroz. Las semillas fueron obtenidas en un mercado local, molidas y tamizadas a través de un paso de luz de 0,1 mm.

Disacáridos: sacarosa y maltosa. (Fuente: Panreac)

Polisacáridos: almidón. (Fuente: Panreac)

Las **dietas A** sólo incluyen los carbohidratos mencionados.

Las **dietas B** incluyen, además de las distintas fuentes de carbohidratos arriba indicadas, como fuente de proteína adicional un 1% de caseína (CS) (p/v).

dieta experimental se alimentaron durante 5 días en cada una de ellas. Este tiempo se determinó como el periodo de alimentación de las larvas de sexto estadio antes de iniciar el proceso de muda al siguiente estadio (BARRANCO *et al.*, 1996b). Después de cada periodo de alimentación, las larvas fueron pesadas, sacrificadas y conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

Preparación de los extractos crudos enzimáticos. Las larvas fueron disecadas y se les extrajo el sistema digestivo completo, procediendo rápidamente a congelarlo (Fig. 1). Todas las operaciones se realizaron en baño de hielo a 4°C . En las larvas L1r, L1, L2 y L3, debido a su pequeño tamaño, se optó por utilizar un pool de larvas completas para la preparación de los extractos enzimá-

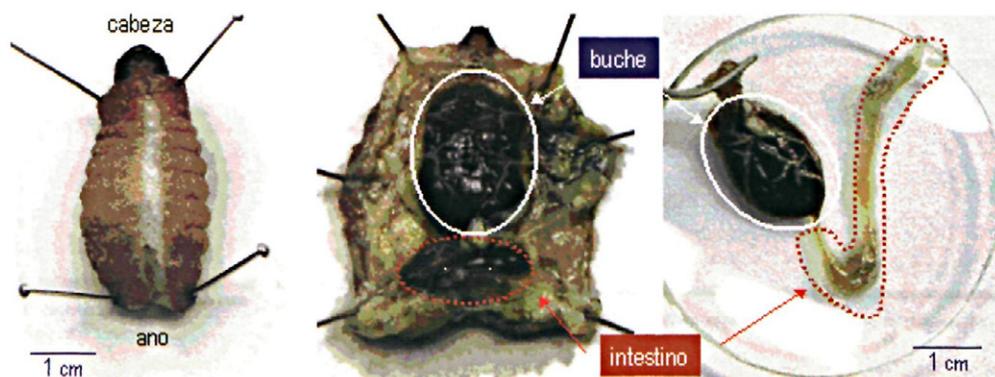


Figura 1. Disección y sistema digestivo de una larva de *R. ferrugineus* de estadio 7.

ticos. En este sentido, varios estudios con larvas de coleópteros de otras especies han descrito que el patrón de enzimas digestivas en extractos crudos de larvas enteras es prácticamente similar al que muestran el de sus digestivos (OVERNAY *et al.*, 1997; GIRARD *et al.*, 1998). Las larvas y los digestivos individuales fueron homogenizados en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 por sonicación (MICROSON XL200, Misonix Inc., Farmingdale, NY) en baño de hielo. Seguidamente los homogenizados se centrifugaron a 12000 r.p.m. por 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se recuperaban y se conservaban a -20 °C hasta su uso para los análisis enzimáticos. La proteína soluble de los extractos se cuantificó según el procedimiento descrito por BRADFORD (1976).

Determinación de la actividad amilasa de los extractos larvarios. La actividad amilasa de los extractos larvarios se determinó utilizando como sustrato almidón al 2% (p/v) en agua destilada. Para ello, 20 µl de extracto enzimático, se mezclaron con 0,125 ml de tampón fosfato-citrato 0,1 M, 50 mM NaCl, pH 6,5. A continuación se añadieron 0,125 ml de la solución de almidón. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante 20 minutos. Los azúcares reductores liberados se determinaron mediante espectrofotómetro a 600 nm según el procedimiento descrito en MARTÍNEZ *et al.* (2002). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La actividad enzimática se expresó en unidades (U)/mg proteína soluble y U/larva.

Zimogramas de los extractos larvarios de *R. ferrugineus*. Los zimogramas de actividad amilasa se realizaron según la metodología propuesta por MARTÍNEZ *et al.* (2000). Las electroforesis se realizaron en condiciones desnaturalizantes en geles copolimerizados de almidón-poliacrilamida. Los extractos larvarios fueron diluidos a partes iguales en tampón 0,125 M Tris, 20% (v/v) glicerol, 0,04% (v/v) azul de bromofenol, 2% (p/v) SDS. En cada gel de electroforesis se incluyó un carril con 5 µl de marcador de masas

moleculares (MWM) y en el resto de pocillos se colocaron de 15 a 20 µl de extracto larvario conteniendo 25 µg de proteína. Después de la separación electroforética, los geles fueron incubados en tampón fosfato-citrato 0,1 M, pH 6,5 a 37 °C por 2h. Finalmente, los geles se lavaron en agua destilada y se sumergieron en una solución de lugol al 2%. Tras esto, las bandas activas se revelaron como zonas de color claro sobre el fondo oscuro teñido por el lugol que corresponde a almidón no hidrolizado. Una vez teñidos, los geles fueron fotografiados para su posterior estudio.

Análisis estadístico. La comparación de pesos y actividades enzimáticas de las larvas se llevó a cabo mediante ANOVA y se les aplicó posteriormente el test de Tukey para comparar diferencias entre medias a un nivel de significación del 95%, utilizando para ello una aplicación informática específica (Statgraphics Plus 4.0. Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland, USA). Los análisis de correlación lineal para determinar el coeficiente R² (Pearson) se realizaron utilizando la hoja de cálculo Excel de paquete informático Microsoft Office (Microsoft Corp., USA).

RESULTADOS

Evolución de la actividad amilasa digestiva durante el desarrollo larvario.

La evolución de la actividad amilasa expresada U/mg prot en las larvas de *R. ferrugineus* se detalla en la Figura 2. En general, se comprueba que la actividad amilasa experimenta un incremento progresivo a medida que evoluciona el desarrollo de las larvas, siendo mucho más notable a partir de L4. Cuando se estimó la actividad amilasa total por individuo (U/larva), su evolución fue similar, observándose un incremento progresivo de la misma conforme lo hacía la edad de la larva. A pesar de ello, si se compara con la actividad referida a U/mg prot, el aumento más marcado se produjo más tardíamente, siendo éste a partir de L6. La Figura 3 representa la relación entre

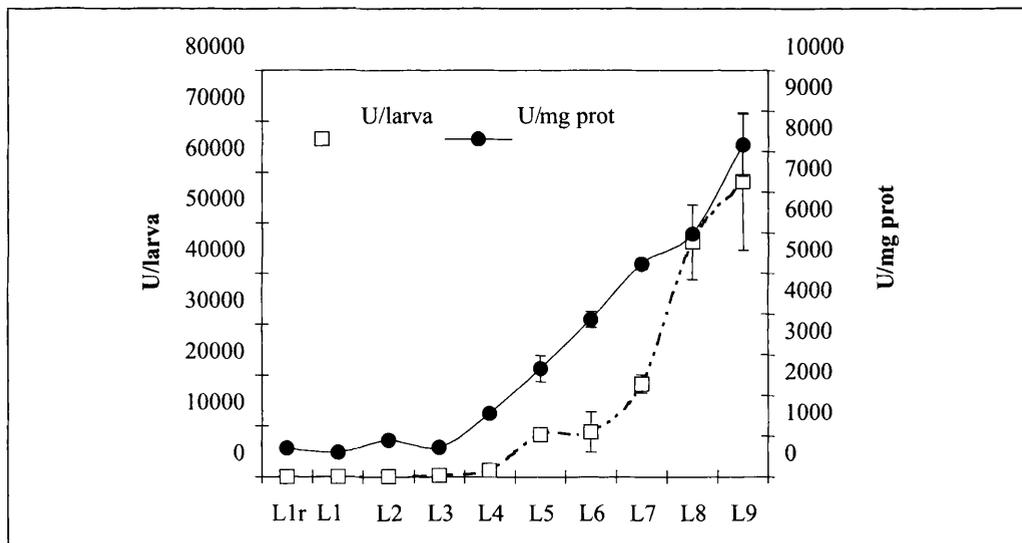


Figura 2. Evolución comparada de la actividad amilasa digestiva de los extractos de larvas de *R. ferrugineus*, expresada en U/mg prot y U/larva.

el peso de las larvas y su actividad amilolítica digestiva en U/mg prot y U/larva. En ambos casos se comprueba que existe una relación lineal entre ambos parámetros ($R^2 > 0.9$).

La Figura 4 muestra un zimograma de la evolución de la actividad amilasa durante el desarrollo larvario de *R. ferrugineus* desde L1 a L7. Pudo verse que desde la

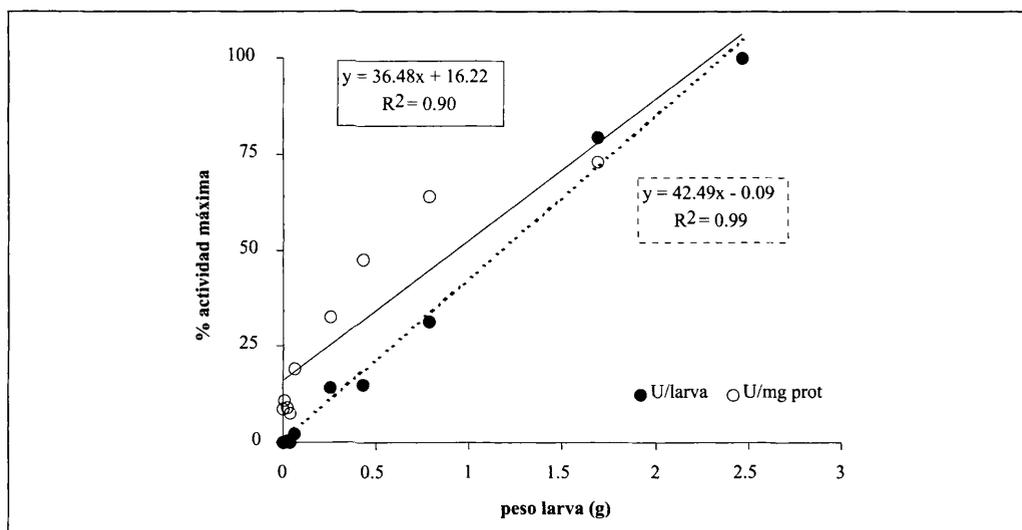


Figura 3. Evolución de la actividad amilasa en larvas de *R. ferrugineus* en función de su peso. Los valores de actividad se han expresado en % sobre el valor máximo determinado en cada caso.

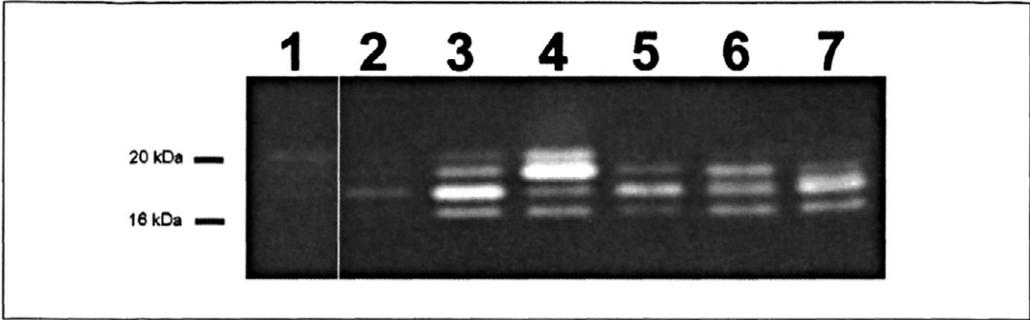


Figura 4. Zimograma obtenido a partir de extractos larvarios de *R. ferrugineus* de diferente edad. Carril 1= L1, carril 2 = L2, carril 3 = L3, carril 4 = L4, carril 5 = L5, carril 6 = L6 y carril 7 = L7.

eclosión (L1) ya se aprecian cuatro fracciones activas, aunque la intensidad de algunas de ellas, sobre todo las de menor masa molecular, es muy débil. No obstante, es a partir de L3 cuando se diferencian claramente estas cuatro isoenzimas. Desde un punto de vista cualitativo (nº de bandas) no se observan diferencias apreciables entre los estadios analizados, aunque desde una perspectiva cuantitativa (intensidad de las bandas), si se apreciaron variaciones en cuanto a las bandas más activas en cada

extracto. Las masas moleculares de las distintas isoformas estuvieron comprendidas entre 20 y 16 kDa.

Efecto del tipo de carbohidrato incorporado en la dieta sobre el crecimiento y la expresión de la actividad amilasa.

Los pesos finales y actividades enzimáticas de las larvas alimentadas con las distintas dietas experimentales se analizan separadamente, considerando como criterio de estudio la fuente de carbohidratos incorpora-

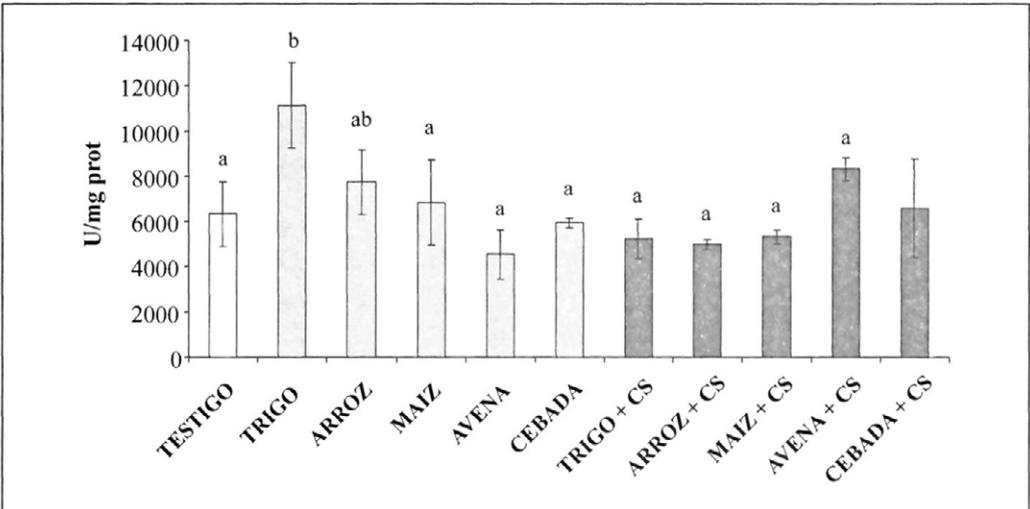


Figura 5. Actividad amilasa (U/mg prot) de las larvas alimentadas con dietas que incluyen diferentes harinas. La línea punteada muestra el peso medio de las larvas criadas con el alimento artificial control (Cuadro 1). Las letras distintas en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

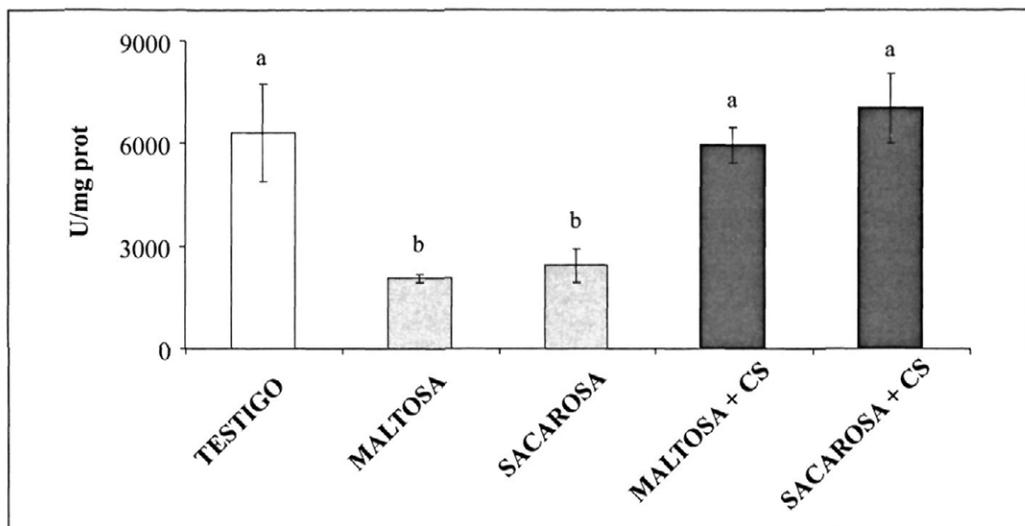


Figura 6. Actividad amilasa (U/mg prot) de las larvas de *R. ferrugineus* alimentadas con dietas que incluyen diferentes disacáridos. Las letras distintas en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

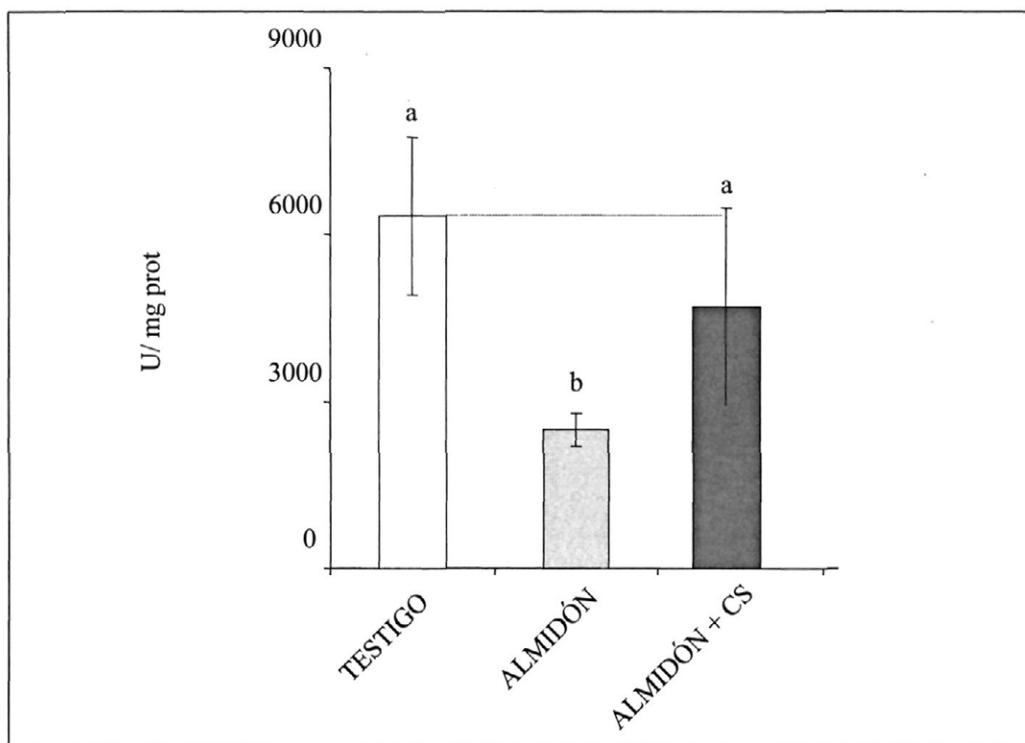


Figura 7. Actividad amilasa (U/mg prot) de las larvas de *R. ferrugineus* alimentadas con dietas que incluyen almidón. Las letras distintas en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

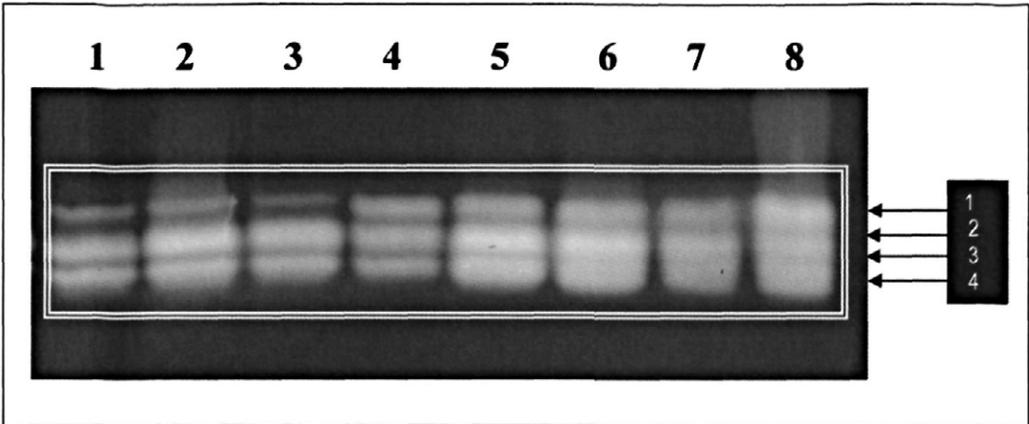


Figura 8. Zimograma obtenido a partir de extractos del digestivo de larvas de *R. ferrugineus* criadas sobre distintas dietas artificiales. Carril 1= sacarosa, carril 2 = almidón, carril 3 = sacarosa + caseína, carril 4 = maltosa, carril 5 = almidón + caseína, carril 6 = trigo, carril 7 = trigo + caseína y carril 8 = control.

da a las mismas (harinas vegetales, disacáridos y polisacárido).

Dietas que incluyen harinas vegetales:

Las larvas criadas con dietas que incluían harinas vegetales mostraron pesos ligeramente mayores a las del alimento control, aunque estas diferencias no fueron significativas (datos no mostrados). En la Figura 5 se muestra la comparación de la actividad amilasa en U/mg prot de las larvas anteriores. Las larvas alimentadas con harinas sin caseína mostraron mayor actividad específica que las larvas del control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. No obstante, las larvas alimentadas con harina de trigo si muestran valores más altos que las del control ($p < 0,05$). La actividad de larvas alimentadas con las harinas y caseína muestran valores contradictorios. Así pues, en tres de ellas (trigo + caseína, arroz + caseína y maíz + caseína), los valores medios de actividad amilasa son algo menores que en el control, sin ser estadísticamente diferentes. En tanto que las alimentadas con avena + caseína y cebada + caseína mostraron valores medios de actividad amilasa mayores a las del control.

Dietas que incluyen disacáridos: Las larvas criadas en dietas que incluían sólo disacá-

ridos (maltosa y sacarosa) mostraron pesos inferiores a las larvas del control ($p < 0,05$) (datos no mostrados). Por otra parte, la inclusión en las dietas de disacáridos de caseína determinó un crecimiento de las larvas de *R. ferrugineus* similar al observado en el control. Los resultados de actividad amilasa obtenidos para las mismas larvas se muestra en la Figura 6. En este caso, las larvas alimentadas sólo con disacáridos mostraron menor actividad amilasa digestiva que las larvas del control, fenómeno que sólo pudo ser compensado cuando a las dietas se le añadió caseína.

Dietas que incluyen almidón: Las larvas alimentadas con dietas de almidón mostraron pesos medios algo menores que las del control (datos no mostrados). También en este caso la inclusión de caseína determinó un peso final de la larva similar al control. La comparación de la actividad amilasa de larvas alimentadas con dieta de almidón se muestra en la Figura 7. En comparación con el control, los extractos de larvas alimentadas únicamente con este polisacárido presentaron valores de actividad inferiores a las primeras ($p < 0,05$). En la misma gráfica se observa que la adición de caseína, incrementó de manera significativa la actividad amilasa de las larvas.

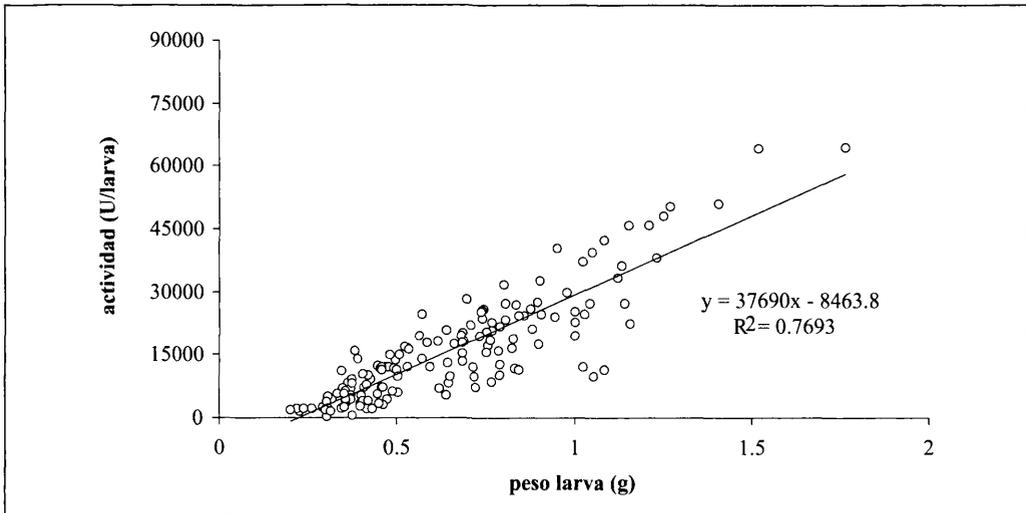


Figura 9. Relación lineal entre la actividad amilasa (U/larva) y el peso de la larva. La figura incluye en conjunto los datos individuales de las larvas de cada uno de los tratamientos (n = 147).

Zimogramas: Una vez comprobada la existencia de variaciones cuantitativas en la actividad amilasa de larvas que consumieron las diferentes dietas, se realizó un zimograma de los mismos extractos larvarios para determinar la existencia de variaciones cualitativas entre ellas (Fig. 8). Los resultados obtenidos indican que todas las larvas, independientemente de la dieta que hubieran ingerido, presentaban un patrón de amilasas digestivas similar, si bien se apreciaron ligeras variaciones cuantitativas en cuanto a la intensidad de algunas de las bandas activas (carriles 1 y 8: banda 1).

Finalmente, se consideró interesante analizar si el peso de la larva (y por extensión el de su digestivo, ya que este representa un 30% del peso corporal en todas las larvas) puede influir en los niveles de actividad amilolítica presente en ésta. Para ello, se representaron todos los datos de actividad (expresados en U/larva) frente a los pesos larvarios (Fig. 9). De este modo se comprobó una relación lineal entre ambos parámetros ($R^2 = 0.769$). Los resultados indican que, independientemente de su alimentación, las larvas tienen unos niveles de amilasas proporciona-

les a su peso corporal, y por correspondencia al tamaño de sus digestivos.

DISCUSIÓN

Los resultados bioquímicos obtenidos en el presente trabajo confirman la existencia de actividad α -amilasa en *R. ferrugineus* desde el momento de la eclosión de las larvas hasta el final de su desarrollo. Resulta interesante destacar que incluso antes de que las larvas neonatas ingirieran su primera comida, éstas ya poseen niveles de actividad similares a las larvas de 2º ó 3º estadio (L2-L3). Este hecho parece sugerir que en esta especie existe una expresión constitutiva de la actividad α -amilasa no inducida por la ingesta de alimento. Esta aparición programada de las enzimas digestivas ha sido descrita en numerosas especies de invertebrados y vertebrados, lo que manifiesta que es un mecanismo de expresión controlado a nivel genético (LEMOS *et al.*, 1999). La presencia de actividad α -amilasa también ha sido descrita en larvas de otras especies de coleópteros que ingieren altas proporciones de almidón en sus dietas, tales como *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chry-

somelida) (TITARENKO y CHRISPEELS, 2000), *Sophorhinus insperatus* (Coleoptera: Curculionidae) (ADEDIRE, 1994), *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) (SILVA *et al.*, 1999) y *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) (VALENCIA *et al.*, 2000), entre otras.

Al analizar la evolución de la actividad α -amilasa durante el desarrollo de la larva, los resultados de actividad mostraron que el aumento cuantitativo más importante de la misma tiene lugar desde los estadios L4-L5 hasta L9. En este sentido, ALARCÓN *et al.* (2002) describieron un patrón similar en el desarrollo de la actividad proteasa digestiva en esta misma especie. Los mismos resultados indican que, independientemente de como se exprese la actividad α -amilasa, el patrón de su evolución es el mismo para la actividad específica expresada en U/mg proteína soluble o en U/larva, aunque como pudo comprobarse el incremento hasta el estadio L9 fue de 8 y 60.000 veces más que la actividad detectada en larvas neonatas, respectivamente.

La realización de zimogramas permitió la visualización del desarrollo de las distintas isoformas de α -amilasas en los extractos larvarios de *R. ferrugineus*. Aunque se apreciaron variaciones con respecto a la importancia relativa de cada una de las isoformas en el total de las fracciones amilolíticas, desde el primer estadio, L1, se observaron cuatro isoformas de peso molecular comprendido entre 20 y 16 kDa (Fig. 4). Resultados similares han sido descritos en otras especies de coleópteros que incluyen cantidades importantes de almidón en sus dietas. Así, en larvas de *Zabrotes subfasciatus* y *Callosobruchus maculatus*, ambas plagas de almacén, se han descrito desde tres hasta cinco isoformas de las α -amilasas con pesos moleculares comprendidos entre 94 y 35 kDa (SILVA *et al.*, 1999).

Recientemente se ha podido comprobar que en algunos insectos plaga se induce la expresión de nuevas enzimas digestivas como respuesta a la ingesta de dietas que contienen altas concentraciones de proteínas potencialmente tóxicas (JONGSMA *et al.*,

1995; BROADWAY, 1996; JONGSMA y BOLTER, 1997). La inducción de α -amilasas también ha sido descrita en larvas de insectos plaga de almacén en los que ésta se produce como respuesta a la ingesta de diferentes dietas (SILVA *et al.*, 1999).

Con el propósito de evaluar la capacidad que tienen las larvas de *R. ferrugineus* de variar el patrón de sus α -amilasas digestivas al ser alimentadas con distintas dietas, se realizó un ensayo en el que se transfirieron larvas alimentadas en dieta control a dietas experimentales que incluían un único ingrediente nutritivo, harina de distintas semillas, almidón o un disacárido, sólo o en combinación con una fuente de proteína (véase Cuadro 2).

La sustitución de la dieta control por dietas basadas en distintas harinas vegetales no influyó negativamente en el desarrollo de las larvas, ya que como pudo verse, el peso de las larvas fue igual o ligeramente superior al de las larvas alimentadas con la dieta control. Además, la adición de proteína a las harinas tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de las larvas. Las harinas de semillas, ricas en almidón, también poseen entre otros, un contenido importante de proteína que aportaría a las larvas una fuente de nitrógeno suficiente para completar su desarrollo con éxito. Este fenómeno parece ser más notable cuando las harinas se complementan con caseína. Por lo que respecta a la actividad amilolítica de los extractos obtenidos a partir de estas larvas, se pudo comprobar que, en general, los valores medios variaron dependiendo de la harina ingerida, aunque sin presentar diferencias significativas con respecto al control. Además, la adición de caseína a las harinas determinó un cambio en el patrón antes mencionado (Fig. 5).

Por otra parte, las larvas de *R. ferrugineus* alimentadas exclusivamente con disacáridos fueron incapaces de aumentar su peso corporal, fenómeno que sólo pudo ser revertido cuando a la dieta se le adicionó una proteína. Con respecto a la actividad α -amilasa de las larvas alimentadas exclusivamente con disacáridos, como era de esperar, mostraron niveles muy bajos en comparación con las

larvas alimentadas con la dieta control (Fig. 6). No obstante, resulta sorprendente que cuando a la dieta de disacáridos se le adicionó caseína, se produjo una inducción de la α -amilasas digestivas, mostrando los extractos larvarios actividades enzimáticas similares a las medidas en las larvas del control. Así, en ninguno de los trabajos revisados se menciona una inducción de carbohidrasas inducida por un sustrato nitrogenado. Otra explicación a este fenómeno, podría derivarse de la disponibilidad de caseína que tiene la larva que determinaría la existencia de elementos nitrogenados que son necesarios para la síntesis de proteínas enzimáticas, con lo que las larvas podrían mantener un nivel basal de actividad α -amilasa superior al de las larvas que consumen exclusivamente disacáridos.

Por su parte, los datos obtenidos para el almidón sólo indican que la presencia de este último en el alimento limita considerablemente el desarrollo corporal de la larva, sobre todo al compararlo con la dieta control. Este fenómeno es igualmente revertido cuando la dieta es suplementada con una proteína. La actividad α -amilasa digestiva de los extractos de larvas alimentadas con almidón ofreció resultados contradictorios (Fig. 7). La llamativa disminución aparente de amilasas digestivas en larvas que consumen sólo almidón, sustrato de las α -amilasas, puede explicarse por la carencia de proteína de la dieta que limitaría la síntesis de *novo* de α -amilasas en presencia incluso de su propio sustrato. Este argumento parece soportarse por el aumento considerable de la actividad α -amilasa de las larvas cuando consumen almidón y caseína.

La realización de zimogramas permitió la visualización del patrón de α -amilasas de los diferentes extractos larvarios. Los resultados obtenidos para *R. ferrugineus* indican que, independientemente de la dieta ingerida, las larvas de esta especie muestran siempre un mismo patrón de isoenzimas digestivas (Fig. 8). Así, en todos los casos se comprobó la presencia de las cuatro isoformas, aunque se detectaron variaciones de intensidad entre ellas. Estos datos son contrarios a los descri-

tos en larvas de otras especies de coleópteros en los que la fuente de almidón induce cambios en el patrón de isoformas de las α -amilasas digestivas (SILVA *et al.*, 1999, 2001; TITARENKO y CHRISPEELS, 2000).

Según los datos biométricos obtenidos, los buches de las larvas tienen una capacidad de llenado que viene condicionada por el tamaño de la larva y, en todos los casos, es independiente de la dieta que ingieren ya que se presentan normalmente llenos (datos no mostrados). Habida cuenta de este mecanismo de ingesta un tanto simple, se pensó que la secreción de α -amilasas digestivas en las larvas podría estar condicionada, al igual que la ingesta, por el tamaño de la larva. En efecto, cuando se representaron los valores de actividad amilasa total de todas las larvas muestreadas con respecto al peso de las larvas se encontró una correlación lineal entre ambos parámetros ($R^2 = 0,769$) (Fig. 9), quedando de manifiesto que el tamaño de la larva condiciona de manera importante (en un 76%) la cantidad de α -amilasas en su digestivo. Así, los extractos de las larvas más pequeñas, como las que fueron alimentadas con disacáridos, presentaban menor actividad α -amilasa que las de larvas mayores. En cualquier caso, la ingesta de carbohidratos sin una fuente nitrogenada parece limitar el crecimiento de la larva y por lo tanto, la secreción de α -amilasas digestivas.

Concluyendo, la secreción de α -amilasas digestivas en las larvas *R. ferrugineus* parece estar condicionada en gran medida por el tamaño de la larva, por lo que se podría hablar de un mecanismo de síntesis de enzimas programado genéticamente y con poca capacidad de acomodación al tipo de alimento ingerido (24% de la variabilidad debida a otros factores distintos del peso). Debido a estas características, las amilasas de esta especie podrían ser enzimas clave para idear estrategias de lucha contra esta plaga basadas en el uso de inhibidores de amilasas. Para confirmarlo será necesario llevar a cabo nuevos estudios en los que se evalúe la respuesta de las amilasas digestivas de *R. ferrugineus* a diferentes inhibidores de amilasas.

ABSTRACT

ALARCÓN F. J., A. PEREGRINA, T.F. MARTÍNEZ, J.G. MAYORAL, P. BARRANCO. 2004. Carbohydrate digestion of larvae of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), (Coleoptera: Curculionidae) *Bol. San. Veg. Plagas*, **30**: 519-532.

The evolution of digestive amylase activity during the larval development of *Rhynchophorus ferrugineus* larvae was studied. Results showed the presence of amylases in larval extracts before first exogenous feeding. Along their ontogenetic development, amylolytic equipment of larvae was characterized by four α -amylases of low molecular mass (16 to 20 kDa). It was also studied the effect of several diets on growth and digestive physiology. Larvae fed with diets including only carbohydrates showed both low corporal growth and digestive amylase activities. Nevertheless, this fact was reverted when larvae were fed with diet supplemented with casein. Larval weight and amylase activities showed a linear correlation ($R^2 = 0,75$). Results showed that variations of amylolytic secretion in larvae reared with different diets was mainly influenced by larval size. Zymograms showed the same patterns of α -amylases in larvae reared with different diets. Results obtained appointed to confirm α -amylases of *Rhynchophorus ferrugineus* larvae as enzymes key in the development of new strategies against insect pest control based in the use of enzyme inhibitors.

Key words: amylase, carbohydrate, Coleoptera, Curculionidae, digestive process, larval development, electrophoresis, *Rhynchophorus ferrugineus*.

REFERENCIAS

- ADEDIRE, C. O. 1994. Distribution of carbohydrases and proteases in the intestine of the kola nut weevil, *Sophorhinus insperatus* Faust (Coleoptera: Curculionidae) and responses of proteases to inhibitors from kola nuts. *Appl. Entomol. Zool.* **29**: 331-338.
- ALARCÓN, F. J., MARTÍNEZ, T. F., BARRANCO, P., CABELLO, T., DÍAZ, M., MOYANO, F.J. 2002. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **32**: 265-274.
- BARRANCO, P., DE LA PEÑA, J., CABELLO, T. 1996(a). El picudo rojo de las palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), nueva plaga en Europa. (Coleoptera, Curculionidae). *PHYTOMA*- España, **76**: 36-40.
- BARRANCO, P., DE LA PEÑA, J., CABELLO, T. 1996(b). Un nuevo curculiónido tropical para la fauna europea, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790), (Col., Curculionidae). *Bol. Asoc. Esp. Ent.* **20**: 257-258.
- BARRANCO, P., DE LA PEÑA, J., CABELLO, T. 1997. Cría artificial de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Col.: Curculionidae). *Resúmenes IV Congreso Nacional de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio*. Vitoria. pp. CC-03.
- BIGGS, D. R., MCGREGOR, P. G. 1996. Gut pH and amylase and protease activity of larvae of the New Zealand grass grub (*Costelyra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. *Insect. Biochem.* **17**: 37-44.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method from quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BROADWAY, R. M. 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **32**: 39-53.
- CHRISPEELS, M.J., RAIKHEL, N.V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**:1-9.
- GATEHOUSE, A.M.R., HILDER, V.A., BOULTER, D. 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. *Bioethnology in Agriculture n° 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, CAB International. 155-181.
- GIRAD, C., LE MÉTAYER, M., BONADÉ-BOTINO, M., PHAM-DELEGUÉ, M., JOUANIN, L. 1998. High level of resistance to protease inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**: 229-237.
- JONGSMA, M. A., BAKER, P. L., PETERS, J., BOSCH, D. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 8041-8045.
- JONGSMA, M. A., BOLTER, C. 1997. The adaptation of insects to plant proteinase inhibitors. *J. Insect. Physiol.* **43**: 885-895.
- LEMONS, F. J. A., CAMPOS, F. A. P., SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* **56**: 219-227.
- MARTÍNEZ, T. F., ALARCÓN, F. J., DÍAZ-LÓPEZ, M., MOYANO, F. J. 2000. *Electrophoresis*, **21**: 2940-2943.
- MARTÍNEZ, T. F., ALARCÓN, F. J., MOYANO, F. J. 2002. Inhibition of amylases present in ruminal particle-associated micro-organism. *J. Sci. Food. Agric.* **82**: 398-404.
- OVERNAY, S., FAWÉ, A., YELLE, S., MICHAUD, D. 1997. Diet related plasticity of the digestive system in larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa*

- decemlineata* Say) *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **36**: 241-250
- PUEYO, J. J., MORGAN, T. D., AMEENUDDIN, N., LIANG, C., REECK, G. R., CHRISPEELS, M. J. 1995. Effects of bean and wheat α -amylase inhibitors on α -amylase activity and growth of stored products insects pests. *Entomol. Exp. Appl.* **75**: 237.
- SILVA, C.P., TERRA, W.R., XAVIER-FILHO, J. 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes Subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **3**: 41-50.
- SILVA, C.P., TERRA, W.R., XAVIER-FILHO, J. 2001. Digestión of legume starch granules by larvae of *Zabrotes Subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylase in response of different diets. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**: 355-366
- SUMMERS, C.B., FELTON, G.F. 1994. Prooxidant effects of phenolic acid on the generalist herbivore *Helicoverpa zea*: potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **24**:943-953.
- TITARENKO, E., CHRISPEELS, M.J. 2000 cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**: 979-990.
- VALENCIA, A.E. BUSTILLO, G.E. OSSA, M.J. CHRISPEELS. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **30**: 207-213.
- WOLSON, J.L., MURDOCK, L.L. 1995. Potential use of protease inhibitors for host plant resistance: A test case. *Environ. Entomol.* **24**: 52-57.

(Recepción: 19 enero 2004)

(Aceptación: 22 marzo 2004)