

LA MEMBRANA PERITRÓFICA EN *Prostephanus truncatus* (HORN) (COLEÓPTERA: BOSTRICHIDAE): ¿BLANCO PARA SU CONTROL?

M. Vázquez-Arista*, M.G. L. Basurto-Cadena** y
M. H. Walker***

RESUMEN

Prostephanus truncatus (Horn) es un insecto plaga del maíz almacenado en México, América Central, parte de América del Sur y se está expandiendo rápidamente en África desde que fue introducido a este continente. El control de este insecto en los almacenes se lleva a cabo con el uso masivo de insecticidas. Con el objeto de encontrar una alternativa para su control, se realizó un estudio de microscopía electrónica en el intestino medio del insecto adulto y su larva. Se detectó, en el intestino medio de *P. truncatus* adulto, la presencia de una membrana peritrófica. Esta membrana está formada por una red irregular compuesta de varias capas, la cual está ausente en el intestino medio del último estadio larvario de *P. truncatus*. Esto indica que su formación tiene lugar, principalmente, durante el período de pupa, por lo que *P. truncatus* podría ser controlado biológicamente usando plantas transgénicas con la información específica para interferir en la síntesis de esta membrana.

ABSTRACT

Prostephanus truncatus (Horn) is a pest of maize stored in Mexico, Central America, some parts of South America, and it is expanding rapidly in Africa since it was introduced to that continent. Control of this pest in storehouses is carried out with the massive use of pesticides. With the object of finding an alternative method of control, an electron microscope study was made of the mid intestine of adults and larvae. Detected in the mid intestine of adult *P. truncatus* was the presence of a peritrophic membrane. This membrane is formed by an irregular grid composed of various layers which are absent in the mid intestine of the last larval stage of *P. truncatus*. This indicates that formation of the peritrophic membrane take place mainly during the pupal stage, for which *P. truncatus* may be controlled biologically by using transgenic plants with the specific information to interfere in the synthesis of this membrane.

Palabras clave: *Prostephanus truncatus*; barrenador mayor de los granos; membrana peritrófica; control biológico; inhibición de quitina sintética; plantas transgénicas de maíz.

Key words: *Prostephanus truncatus*; greater grain borer; peritrophic membrane; biological control; chitin synthesis inhibition; maize transgenic plants.

* Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV-IPN, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Apartado Postal 629, Irapuato, Gto., México. Fax (462) 396-11 y 4-59-96, e-mail: mvazquez@ira.cinvestav.mx

** Departamento de Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, Apartado Postal (483) 311, Irapuato, Gto., México.

*** Zoology Department, School of Biological Sciences, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK.

Recibido: 6 de Julio de 2000

Aceptado: 9 de Mayo de 2001

INTRODUCCIÓN

El aparato digestivo de todos los insectos está formado por tres partes perfectamente bien diferenciadas, el intestino anterior, medio y posterior. En el intestino medio se producen las enzimas que van a llevar a cabo el proceso digestivo (Chapman, 1985). La existencia de una membrana que protege las células del intestino medio de varios artrópodos fue descrita por primera vez en el siglo XIX, la cual se forma en la región del proventrículo (Wigglesworth, 1930). Marcer y Day (1952) describen tres tipos de membranas en insectos que son: (1) malla fibrilar de forma regular (2) malla en forma hexagonal y (3) malla fibrilar de forma irregular, la cual parece estar formada por diversas capas. Balbiani le dio el nombre de membrana peritrófica (Richards y Richards, 1977). La mayoría de los insectos poseen membrana peritrófica tanto en el estado adulto como en el larvario. Generalmente, esta membrana se encuentra presente en insectos cuya dieta alimenticia está constituida de partículas sólidas y falta en aquellos insectos que se alimentan sólo de líquidos (Richards y Richards, 1977). Las funciones y componentes químicos de esta membrana peritrófica no están bien definidos, Terra en 1990 describe a la membrana peritrófica como una malla de quitina embebida en una matriz de proteína y carbohidratos, cuya principal función es la protección de las células del intestino medio para evitar daño mecánico por el paso del alimento sólido, como barrera contra microorganismos, además de ser permeable a las enzimas digestivas y productos de la digestión. Las quitinasas pueden alterar la estructura de la membrana peritrófica de un gran número de insectos y son usadas por algunos insectos parásitos para facilitar su penetración (Kramer and Muthukrishnan, 1997). Recientemente, con un mayor conocimiento de su estructura y funciones, ha sido posible plantear nuevas estrategias para el control de insectos plaga (Tellam *et al.*, 1999). Por otro lado, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae),

también llamado barrenador mayor de los granos, es considerado un insecto plaga del maíz tanto en el campo como en el almacén (Tigar *et al.*, 1994). Este insecto es endémico de México (Delgado y Luna, 1951), cubriendo una gran variedad de hábitats (Tigar *et al.*, 1994), esta presente en América Central y algunos países de América del Sur, y se ha establecido en África como plaga de maíz y yuca seca (Hodges *et al.*, 1983). El control de *P. truncatus* se realiza con el uso de productos químicos. En el medio rural del estado de Guanajuato un alto porcentaje de los agricultores utiliza, en forma masiva y sin precaución, compuestos químicos residuales que además de inducir resistencia, ya no son recomendados para ser aplicados directamente a los productos agrícolas destinados para el consumo humano o animal (Vázquez-Arista *et al.*, 1995). Por tal motivo, se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido para detectar alguna debilidad en el sistema digestivo de *P. truncatus* y poder implementar un método de control alternativo al tradicional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Se usó una colonia de *P. truncatus* procedente de Tanzania. Los insectos adultos se mantuvieron en maíz amarillo americano, grado 3, a 25°C y 70% de humedad relativa. Las larvas se obtuvieron a partir de 20 insectos adultos, los cuales se desarrollaron en una mezcla de 20 g de maíz amarillo y 10 g de harina a la misma temperatura y humedad relativa (Howard, 1983).

Preparación del aparato digestivo

La disección de los insectos adultos se llevo a cabo a los 14 días después de haber emergido de los granos y del último estadio larvario a los 30 días después de haber eclosionado, en una gota de solución de Ringer, pH 7.2. Se eliminó, en forma manual, todo vestigio de grasa presente alrededor de los intestinos.

Microscopía electrónica de barrido

Los aparatos digestivos disectados se fijaron, por separado y durante 15 ó 16 horas, con 1 ml de una solución preparada con glutaraldehído al 2.5% y solución amortiguadora de Sörensen, 0.1 M, pH 7.0 (V/V). Los intestinos se lavaron tres veces con la solución amortiguadora y se realizó una segunda fijación con una solución al 1% de OsO_4 y la misma solución amortiguadora (V/V) por 1 hora. Los intestinos se lavaron tres veces con agua bidestilada y se deshidrataron con acetona al 30, 50, 70 y 90% por 30 minutos cada una y al final dos veces con acetona al 100% por 45 minutos. Los intestinos se colocaron en una secadora de punto crítico Baltzer y posteriormente fueron abiertos longitudinalmente para después ser cubiertos con una aleación de oro y paladio. Finalmente los intestinos se observaron en el microscopio electrónico de barrido Cambridge S100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La microscopía electrónica de barrido demostró que existe una membrana peritrófica en el intestino medio de *P. truncatus* adulto (Figura

1), la cual cubre las protuberancias protoplásmicas rectas y uniformes llamadas microvilli que sirven para aumentar las superficies celulares encargadas de la secreción y absorción (Prado y Valdéz, 1990). La Figura 2 muestra que la membrana peritrófica de *P. truncatus* está formada por una red irregular con varias capas, similares a las mencionadas por Marcer y Day (1952). Esta membrana está ausente en el intestino medio del último estadio larvario de este coleóptero (Figura 3), lo que hace pensar que esta membrana se forma principalmente durante el período pupal, tal como sucede con *Plodia interpunctella* (Hobner) (Ferkovich *et al.*, 1981), el cual es un lepidóptero de granos almacenados. Los resultados anteriores sugieren que la inhibición de la quitina sintetasa en *P. truncatus* puede prevenir la formación de la membrana peritrófica y por lo tanto podría ser un método de control para este coleóptero. En *Tribolium castaneum* (Herbst), coleóptero de granos almacenados, se ha logrado inhibir a esta enzima con el uso de peptidil nucleósidos, tales como polioxin D y uridin-5'-difosfato (Cohen y Casida, 1980) o por benzimidazoles (Cohen *et al.*, 1984). En *P. interpunctella* se inhibe la formación de quitina con el uso de benzoilfenil ureas, tal como el

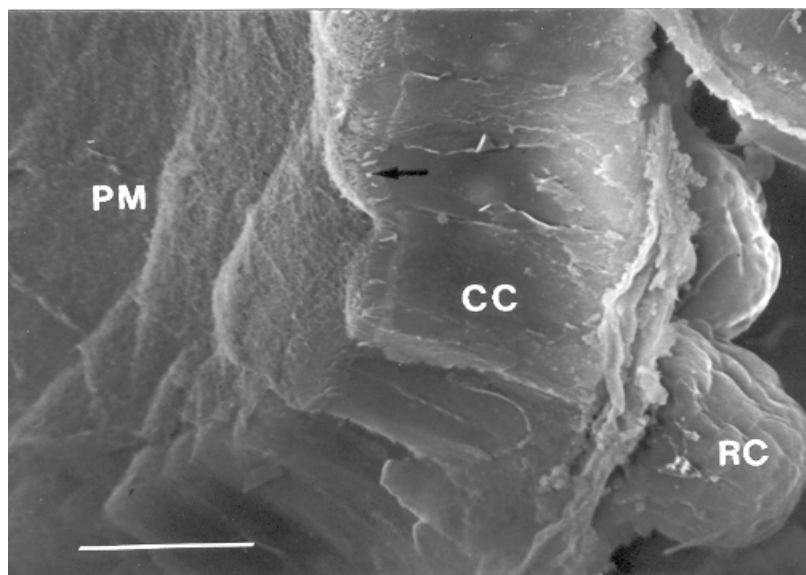


Figura 1. Microfotografía de barrido del intestino medio de *P. truncatus* adulto. Membrana peritrófica (PM), células columnares (CC), criptas regenerativas (RC), microvilli (flecha). Barra = 20 μm .

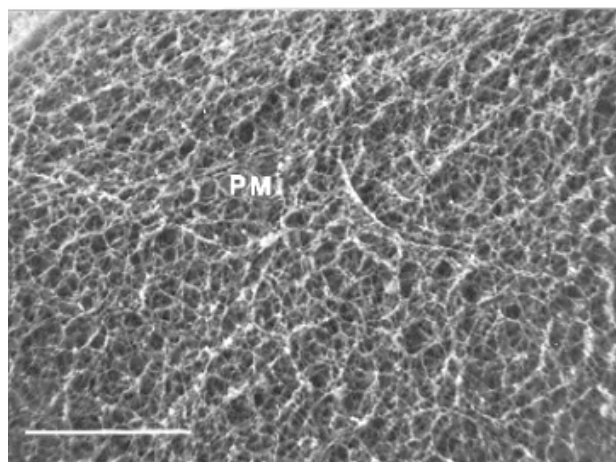


Figura 2. Microfotografía de barrido de la membrana peritrófica (PM) en el intestino medio de *P. truncatus* adulto. Barra = 5 μ m.

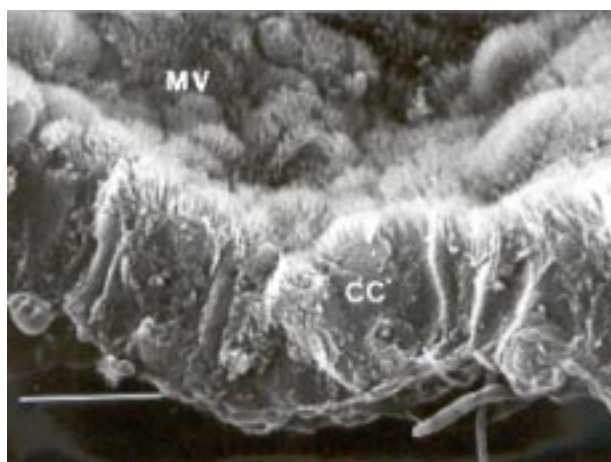


Figura 3. Microfotografía de barrido del intestino medio del último estadio larvario de *P. truncatus*. No se observa membrana peritrófica. Microvilli (MV), células columnares (CC). Barra = 20 μ m.

diflubenzurón (Ferkovich *et al.*, 1981). Sin embargo, el control de la síntesis de quitina en *P. truncatus* no podría ser llevada a cabo con el uso de los compuestos químicos antes mencionados, a pesar de que los tres son insectos plaga de granos almacenados, pero con diferentes hábitos alimenticios. Las larvas, pupas y adultos de *T. castaneum* y *P. interpunctella*, considerados insectos secundarios para el maíz, se alimentan de este grano cuando está quebrado y de la harina producida por el ataque de los insectos primarios. Los insectos adultos de *P. truncatus*, considerado insecto primario para el maíz, perforan el grano, hacen túneles y ovipositan en el interior del mismo, de tal manera que sus larvas y pupas se desarrollan todo el tiempo dentro del maíz, quedando de esta manera protegidos de la acción de cualquier producto químico aplicado en el exterior de este producto básico. Por otro lado, también se ha inhibido la acción de la enzima quitina sintetasa por medio de proteínas de plantas como la hevamina (Van Scheltinga *et al.*, 1994) y proteínas de origen microbiano como *Mucor rouxii* (López-Romero *et al.*, 1978) o *Candida albicans* (Braun and Calderone, 1979). Por lo tanto, una posibilidad para efectuar un control biológico en *P. truncatus* podría ser el uso de plantas de maíz transformadas por ingeniería

genética para proveerlas de una actividad específica. También, estas plantas transgénicas pudieran mostrar más o menos resistencia a las otras plagas primarias de maíz, *Sitophilus* spp. o *Sitotroga cerealella*, las cuales presentan un ciclo de vida similar a *P. truncatus*. No obstante, este insecto sería más vulnerable que las otras plagas primarias debido a que los adultos de *P. truncatus* tienen la capacidad de perforar y consumir grandes cantidades de maíz (Cowley *et al.*, 1980) y por lo tanto las células de su intestino medio sufrirían más daño en el caso de que dicha membrana estuviera mal formada o ausente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Británico por su apoyo financiero y al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Leicester, en especial a la Sra. E. Roberts y al Sr. S. Hyman por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

- Braun, P. C. y Calderone, R. A. (1979). Regulation and solubilization of *Candida albicans* chitin synthetase. *Journal of Bacteriology* 140, 666-670.

- Chapman, R. (1985). Structure of the digestive system. In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive and Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, (p. 165-211). Pergamon Press, Oxford.
- Cohen, E. y Casida, J. E. (1980). Inhibition of *Tribolium* gut chitin synthetase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 13, 129-136.
- Cohen, E., Kuwano, E. y Eto, M. (1984). The use of *Tribolium* chitin synthetase assay in studying the effects of benzimidazoles with a terpene moiety and related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 1617-1620.
- Cowley, R. J., Howard, D. C. y Smith, R. H. (1980). The effect of grain stability on damage caused by *Prostephanus truncatus* (Horn) and three other beetle pests of stored maize. *Journal of Stored Products Research* 16, 75-78.
- Delgado, M. N. y Luna, R. H. (1951). Control del gorgojo de la semilla de maíz *Prostephanus truncatus* (Horn). *Folleto Misceláneo* 4, (p. 426). Secretaría de Agricultura y Ganadería, México.
- Ferkovich, S. M., Oberlander, H. y Leach, C. E. (1981). Chitin synthesis in larval and pupal epidermis of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner), and the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.). *Journal of Insect Physiology* 27: 509-514.
- Hodges, R. J., Dunstan, W. R., Magazini, I. y Golob, P. (1983). An outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) in East Africa. *Protection Ecology* 5, 183-194.
- Howard, D. C. (1983). *The population biology of the greater grain borer Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae)*. Ph.D. Thesis, University of Reading.
- Kramer, K. J. y Muthukrishnan, S. (1997). Insect Chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 887-900.
- López-Romero, E., Ruíz-Herrera, J. y Bartnicki-García, S. (1978). Purification and properties of an inhibitory protein of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Biochemica et Biophysica Acta* 525, 338-345.
- Marcer, E. H. y Day, M. F. (1952). The final structure of the peritrophic membranes of certain insects. *Biological Bulletin* 103, 384-394.
- Prado, B. E. y Valdéz, C. J. (1990). El Aparato Digestivo. En Colegio de Posgraduados (Eds.), *Morfología de Insectos*, (p. 226-253). Texcoco, Edo. México. México.
- Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35, 181-200.
- Tellam, R. L., Wijffels, G. y Willadsen, P. (1999). Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 87-101
- Tigar, B. J., Osborne, P. E., Key, G. E., Flores-Sanchez, M. E. y Vazquez-Arista, M. (1994). Distribution and abundance of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) and its predator *Teretriosa nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae) in Mexico. *Bulletin of Entomological Research* 84, 555-565.
- Van Scheltinga T., A. C., Kalk, K. H., Beintema, J. J. y Dijkstra, B. (1994). Crystal structures of hevamine, a plant defense protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* 2, 1181-1189.
- Vázquez-Arista, M., Ramírez-Flores, A. y Blanco-Labra, A. (1995). Maize and bean storage and their use by rural farmers in a central state of Mexico. *Journal of Stored Products Research* 31(4): 325-333.
- Wigglesworth, V. B. (1930). The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 73, 593-616.