

RESUMEN / ABSTRACT

Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) es un insecto plaga del maíz almacenado en México, América Central y parte de América del Sur. En el continente africano ha causado grandes pérdidas desde que fue introducido. México y América Central parecen ser los países que dieron origen a esta plaga en África. Por diferencias encontradas, en el patrón electroforético de proteasas, en 3 colonias de *P. truncatus* procedentes de México, Tanzania y Togo, se sugiere que tienen diferente origen. Con el objeto de instaurar la estabilidad genética de *P. truncatus* en México, se colectaron insectos adultos en 4 estados de la República Mexicana a los que se les determinó su patrón de isoenzimas proteolíticas. Los resultados obtenidos demuestran que *P. truncatus* en México presentan el mismo patrón electroforético, a pesar de pertenecer a diferentes localidades con diversas condiciones ambientales. Esta similitud apoya la teoría de que México no puede ser el origen de *P. truncatus* en África. Además, confirma que la información obtenida a través de zimogramas, utilizando larvas completas, es útil para diferenciar insectos de la misma especie de diferentes zonas geográficas. La técnica es de fácil manejo y relativamente económica.

Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) is a pest of stored maize in Mexico, Central America, and some places of South America. In Africa has caused severe maize damage since its introduction. The outbreak in Africa seems to have its origin in Mexico or Central America. Differences found, in the electrophoretic pattern of proteases, on three *P. truncatus* colonies from Mexico, Tanzania, and Togo, suggest that they have different origin. In order to establish the genetic stability of *P. truncatus* in Mexico, adult insects from four States of the central part of this country were collected and determined their isoenzyme pattern of proteases. Results demonstrate that *P. truncatus* in Mexico, from different environmental conditions and locations, have the same proteolytic isoenzymes. This similarity supports the theory that Mexico could not be the origin of *P. truncatus* in Africa. Besides, it confirms that information of isoenzymes by electrophoretic zymograms, an easy and inexpensive tool, using the whole larva, is useful to differentiate insects of the same species from different geographic places.

Recibido: 3 de Octubre de 2001

Aceptado: 12 de Noviembre de 2002

* Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV-IPN. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Irapuato, Apartado Postal 629, C.P. 36500. Irapuato, Gto. México. Fax (462) 396-11 y 459-96. e-mail: mvazquez@ira.cinvestav.mx

** Departamento de Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, Apartado Postal 311, C.P. 36500, Irapuato, Gto. México.

Estabilidad Proteolítica de *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) en México.

E. Armienta-Aldana*, M. Vázquez-Arista*, M. Alvarado-Balleza* y M. G. L. Basurto-Cadena**

INTRODUCCIÓN

Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) o barrenador mayor de los granos, es una plaga de maíz en diferentes partes de América y se ha encontrado en diferentes hábitats (Back y Cotton, 1922; Dobie, 1988; Rees, 1990, Hodges, 1994; Tigar y col., 1994). Este insecto fue introducido por accidente, a finales de los 70s, al Continente Africano de algún lugar de América (México o América Central), causando grandes pérdidas en el maíz y la yuca seca almacenados (Golob y Hodges, 1982; Hodges y col., 1985; Krall, 1987; Nissen y col., 1991; Diané, 1993). Vázquez-Arista y col. (1999), trabajando con 3 colonias *P. truncatus*, procedentes de México, Tanzania y Togo, demostraron que tenían diferente patrón de isoenzimas proteolíticas y que no había diferencia entre larvas y adultos, por lo que se sugirió que México podría no ser el origen de las 2 colonias africanas. En plantas, los estudios con isoenzimas han servido para investigar la estabilidad genética y los cambios producidos ya sea por selección natural o humana (Stuber y col., 1980); también se han obtenido evidencias de la relación genética entre padres e hijos (Crawford y Smith, 1982), entre especies cultivadas y silvestres (Wilson, 1979), y entre híbridos y sus padres putativos (Broue y col., 1982). En insectos, Puterka y col. (1993) demostraron, usando electroforesis de isoenzimas y marcadores moleculares (RAPD-PCR), que había variación genética y relaciones filogenéticas en las colecciones de *Diuraphis noxia* (Mordvilko), el cual es un áfido del trigo en Rusia. Con el objeto de determinar la estabilidad proteolítica de *P. truncatus* en México y dar más soporte a la hipótesis de que México no fue el origen de este insecto plaga en África, se llevó a cabo un estudio electroforético de las proteasas presentes en larvas completas de *P. truncatus* de 4 estados de la República Mexicana. Asimismo, se pretende confirmar que la téc-

PALABRAS CLAVE: *Prostephanus truncatus*; Barrenador mayor de los granos; Isoenzimas proteolíticas; Electroforesis; Zimogramas.

KEYWORDS: *Prostephanus truncatus*; Larger grain borer; Proteolytic isoenzymes; Electrophoresis; Zymograms.

nica usada es útil para diferenciar insectos de la misma especie con diferente zona geográfica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Se colectaron insectos adultos de *P. truncatus* en Guanajuato, Querétaro, Michoacán y San Luis Potosí; obteniéndose respectivamente 9, 4, 5 y 6 colonias. Estas colonias se obtuvieron usando trampas de embudo con viales de plástico embebidos con feromonas (Key y col., 1994), por inspección directa en almacenes con maíz en el medio rural y en molinos de los estados antes mencionados. Además se usaron las colonias de México, Tanzania y Togo empleadas por Vázquez-Arista y col. (1999). Para este estudio se utilizaron larvas del último estadio de cada una de las colonias. Los insectos adultos y larvas de *P. truncatus* se mantuvieron en el laboratorio como lo estableció Vázquez-Arista (1997).

Extracto crudo de larvas

Se pesaron 250 mg de larvas de *P. truncatus* y se molieron, a 4°C, con 1.25 ml de una solución 0.01 M de Tris-HCl a pH 7.2. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 14,000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

Determinación de proteína y actividad proteolítica

El contenido de proteína de los extractos se determinó por el método de Bradford (1976), usando como proteína estándar albúmina de suero de bovino (BSA), con el objeto de calcular la cantidad de cada extracto crudo, con igual proteína, que se aplicaría a los pozos de los geles de acrilamida. La actividad de proteasa, como actividad de tripsina, se determinó por el método de Schwertz y Takenaka (1955), usando éster etílico de N-benzoil-L-arginina (BAEE) como sustrato, con el objeto de verificar que cada extracto tuviera este tipo de actividad.

Zimogramas

Las bandas de las isoenzimas de proteasas se determinaron usando electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) (Laemmli, 1970), con caseína al 2% como sustrato de acuerdo a García-Carreño y col. (1993). La electroforesis se llevó a cabo, en condiciones no desnaturizantes de los extractos crudos a 4°C, en geles de poli(acrilamida) al 10 y 4% como gel separador y concentrador respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Vázquez-Arista y col. (1999) trabajando con el intestino completo de larvas y adultos de 3 colonias de *P. truncatus*, no encontraron diferencias en las isoenzimas de amilasas entre las colonias de México, Tanzania y Togo, ni entre los estadios; sin embargo, si detectaron diferencias en las isoenzimas de proteasas entre las colonias, pero no diferencias entre los estadios. Por tal motivo, este trabajo se realizó usando la larva completa, sin disectar, para detectar diferencias o similitudes en el patrón electroforético de las proteasas presentes en las 24 colonias de *P. truncatus* procedentes de Guanajuato, Querétaro, Michoacán y San Luis Potosí. Con esta modificación, se detectaron las diferencias existentes entre las colonias de México y África (Figura 1), mientras que no hubo diferencias entre las 24 colonias mexicanas (Figura 2). De

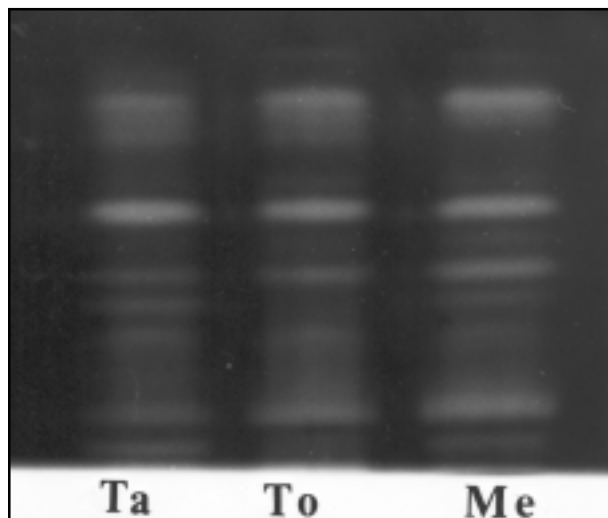


Figura 1. Patrón de proteasas en *P. truncatus* de México (Me), Togo (To) y Tanzania (Ta).

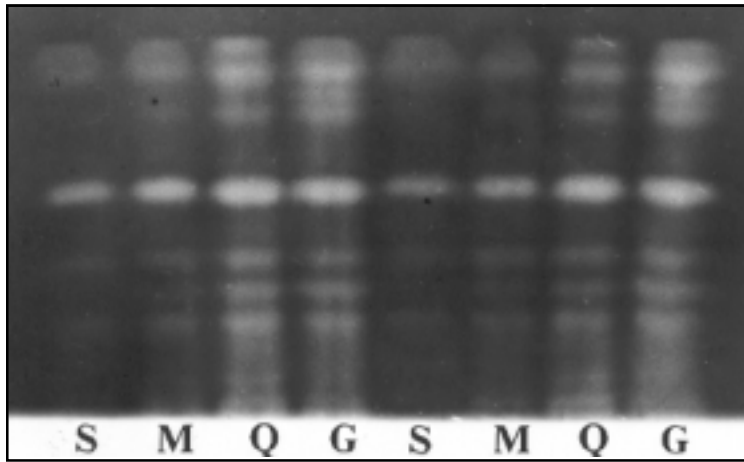


Figura 2. Patrón de proteasas en *P. truncatus*, una colonia y por duplicado, de Guanajuato (G), Querétaro (Q), Michoacán (M) y San Luis Potosí (S).

aquí, se puede establecer que existe uniformidad genética de *P. truncatus* en los 4 estados de la República Mexicana y por lo tanto, el origen de este insecto plaga en África, difícilmente podría haber sido nuestro país. Los estudios de isoenzimas en insectos pueden proporcionar datos importantes sobre las relaciones genéticas entre poblaciones naturales de diferentes zonas geográficas. Además, es una herramienta útil y económica que podría ser utilizada por taxónomos.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este estudio forman parte del convenio 97-03-02-30, financiado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCYTEG), a quien los autores agradecen su apoyo.

REFERENCIAS

Back, E.A., and Cotton, R.T., (1922). Stored grain pests. *Farmer's Bulletin* No. 1260. U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C.

Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Broue, P., Douglass, J., Grace, J.P., and Marshall, D.R. (1982). Interspecific hybridisation of soybeans and perennial *Glycine* species indigenous to Australia via embryo culture. *Ruphytica* 31, 715-724.

Crawford, D.J., and Smith, E.B. (1982). Allozyme variation in *Coreopsis nuecensoid* and *C. nuecensis* (Compositae), a progenitor derivative species pair. *Evolution* 36, 379-386.

Diané, B., (1993). Vergleichende Untersuchungen über die Eignung verschiedener Nahrungssubstrate für den Großen Kornbohrer, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bustrichidae). *Wissenschaftlicher Fachverlang Gieben*, 88 pp.

Dobie, P., (1988). The distribution and biology of *Prostephanus truncatus*. In: G.G.M. Schulden, A. J. Toet (Eds.). *Workshop on the Containment and Control of the Larger Grain Borer*. Arusha, Tanzania, pp. 12-27.

Garcia-Carreño, F.L., Dimes, L.E., and Haard, N.F., (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214, 65-69.

Golob, P., and Hodges, R.J., (1982). Study of an outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn). *Report of the TPI G164*. Tanzania.

Hodges, R.J., (1994). Recent advances in the biology and control of *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bustrichidae). In: E. Highley, E.J. Wright, H.J. Banks, B.R. Champ (Eds.). *Proceedings of the Sixth International Working Conference on Stored-product Protection*, 2. Camberra, Australia, pp. 929-934.

Hodges, R.J., Meik, J., and Denton, H., (1985). Infestation of dried cassava (*Manihor esculenta* Crantz) by *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 21: 73-77.

Key, G.E., Tigar, B.J., Flores-Sanchez, E., and Vazquez-Arista, M., (1994). Response of *Prostephanus truncatus* and *Teretriosa nigrescens* to pheromone-baited flight traps. In: E. Highley, E.J. Wright, H.J. Banks, B.R. Champ (Eds.). *Proceedings of the Sixth International Working Conference on Stored-product Protection*, 1. Camberra, Australia, pp. 410-414.

Krall, S., (1987). Experience with a new stored-grain pest in Togo and Benin: the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). In

- Proceedings of the Fourth International Working Conference on Stored-product Protection, 1.* Tel Aviv, Israel. pp. 21-26.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Nissen, U., Laborius, G.A., and Shulz, F.A., (1991). Comparison of populations of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) of different geographical origins. *Journal of Applied Entomology* 112: 124-137.
- Puterka, G. J., Black, W. C., Steiner, W. M., and Burton, R. L., (1993). Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collection of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70: 604-618.
- Rees, D.P., (1990). *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae), a predator of the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae): Current status of knowledge. In: R.H. Markham, H.R. Herrem (Eds.). *Biological Control of the Larger Grain Borer. Proceedings of an IITA/FAO Coordination Meeting.* Cotonou, Republic of Benin. pp. 103-111.
- Schwartz, G.W., and Takenaka, Y., (1955). A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity. *Biochemistry and Biophysical Acta* 16: 571-575.
- Stuber, C.W., Moll, R.H., Goodman, M.M., Schaffer, H.E., and Weir, B.S., (1980). Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 95: 225-236.
- Tigar, B.J., Osborne, P.E., Key, G.E., Flores-S, M.E., and Vazquez-A, M., (1994). Distribution and abundance of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) and its predator *Teretriosoma nigrescens* (Coleoptera: Histeridae) in Mexico. *Bulletin of Entomological Research* 84: 555-565.
- Vázquez-Arista, M., (1997). Some studies on the digestive system of *Prostephanus truncatus* (Horn). PhD. Dissertation, University of Leicester, England.
- Vázquez-Arista, M., Smith, R. H., Martínez-Gallardo, N. A., and Blanco-Labra, A., (1999). Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 35: 167-174.
- Wilson, H.D., (1979). Genetic control and distribution of leucine aminopeptidase in the cultivated chenopods and related weed taxa. *Biochemistry Genetics* 14: 913-919.