



64 Reunión Anual
Programa Cooperativo Centroamericano
para el Mejoramiento de Cultivos y Animales
PCCMCA
Honduras 2019



Instituto Hondureño del Café
Departamento de Investigación y Desarrollo

EFFECTO DE INHIBIDORES SINTÉTICOS DE PROTEASAS EN LAS RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA ESCAMA VERDE (*Coccus viridis*) Y EL CAFÉ (*Coffea arábica*)

Presentador: Cristian Lizardo
Ing. Agr. M.Sc. En Entomología

Cristian Yizard Lizardo Chávez¹; María Goreti de Almeida Oliveira²; Gláucia Cordeiro³; Manuel Solís Vargas⁴



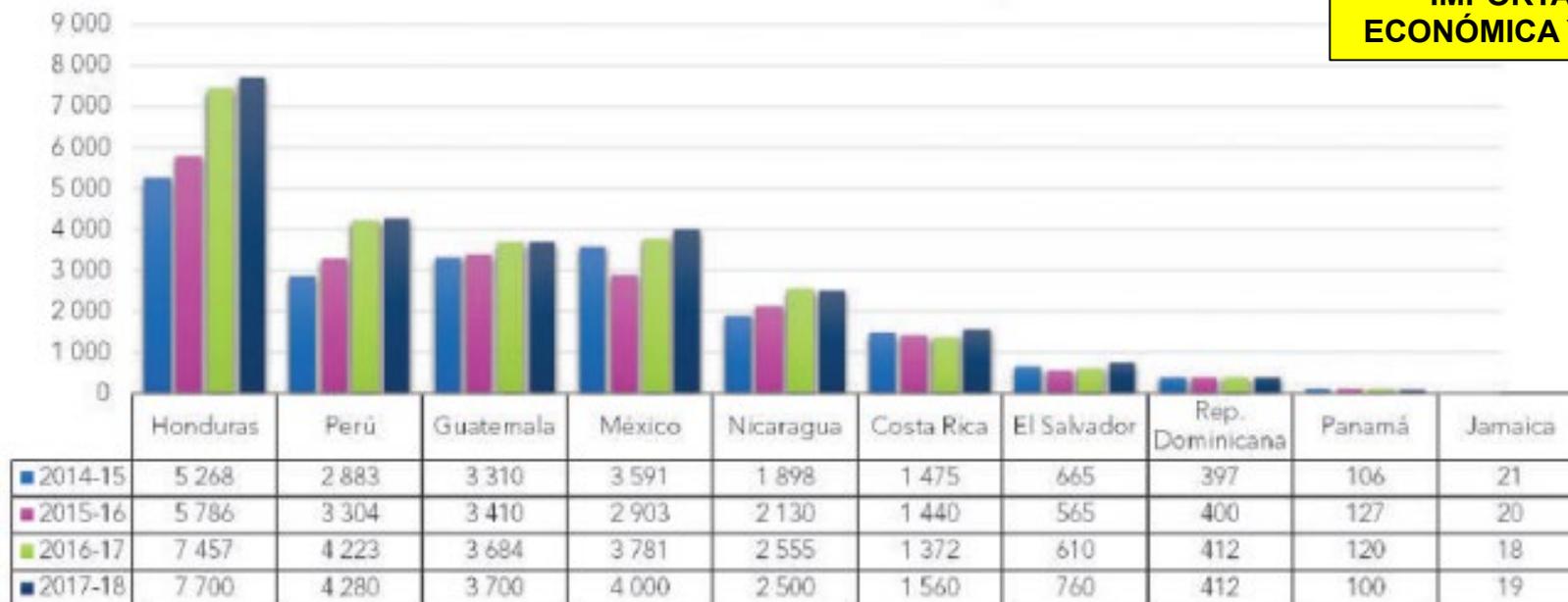
INTRODUCCIÓN

EL CAFÉ EN LA REGIÓN PROMECAFE

En relación con la producción regional PROMECAFE (10 países), Honduras ocupa el primer lugar, seguido de Perú, México y Guatemala, según cifras de la cosecha 2017-2018 publicadas por la OIC.

PROMECAFE: Producción de Café por País Miembro
Cosecha: 2014-15 a 2017-18*
Datos en Miles de Sacos de 60 kg

**IMPORTANCIA
ECONÓMICA Y SOCIAL**



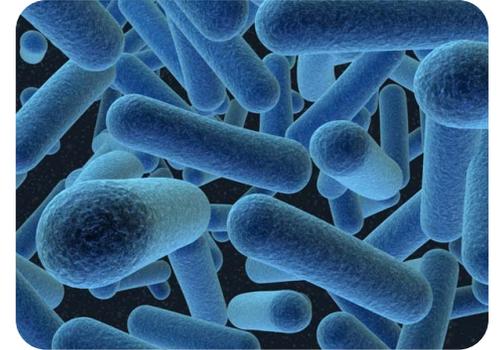
*/Cifras preliminares.

Fuente: Organización Internacional del Café (OIC).

INTRODUCCIÓN

Causas de pérdidas en la productividad

➤ Bióticos



➤ Abióticos



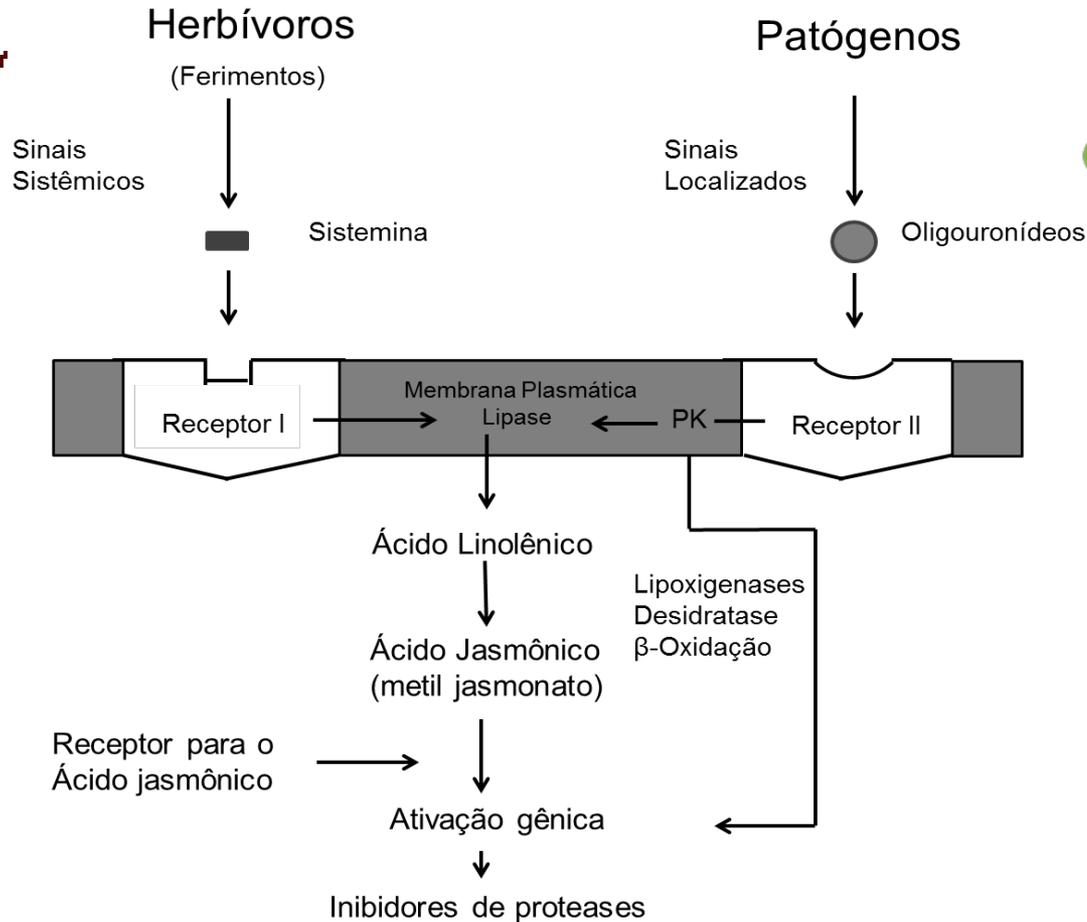
INTRODUCCIÓN

❖ *Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae)

- Introducen el estilete e inyectan toxinas en el tejido vascular de las plantas;
- Hipertrofia das células cambiales con colapso de las células del floema;
- Causando debilitamiento y caída queda de hojas y frutos
- Casos extremos, la muerte de la planta;



❖ DEFENSA DE PLANTA



Modelo propuesto para la señalización que regula la expresión de genes inhibidores de proteasas inducidos por heridas en hojas de tomate. PK = Proteína Quinasa (Adaptado de Farmer & Ryan, 1992).

INTRODUCCIÓN

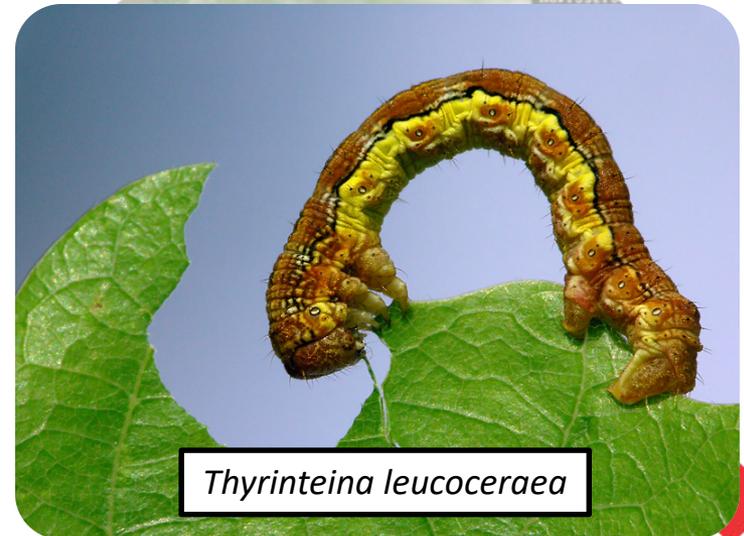
❖ Inhibidores de proteasas (IPs) sintéticos

- IPs artificiales introducidos en la dieta generalmente provocan perjuicios en el crecimiento, desarrollo y/o sobrevivencia.

Anticarsia gemmatalis

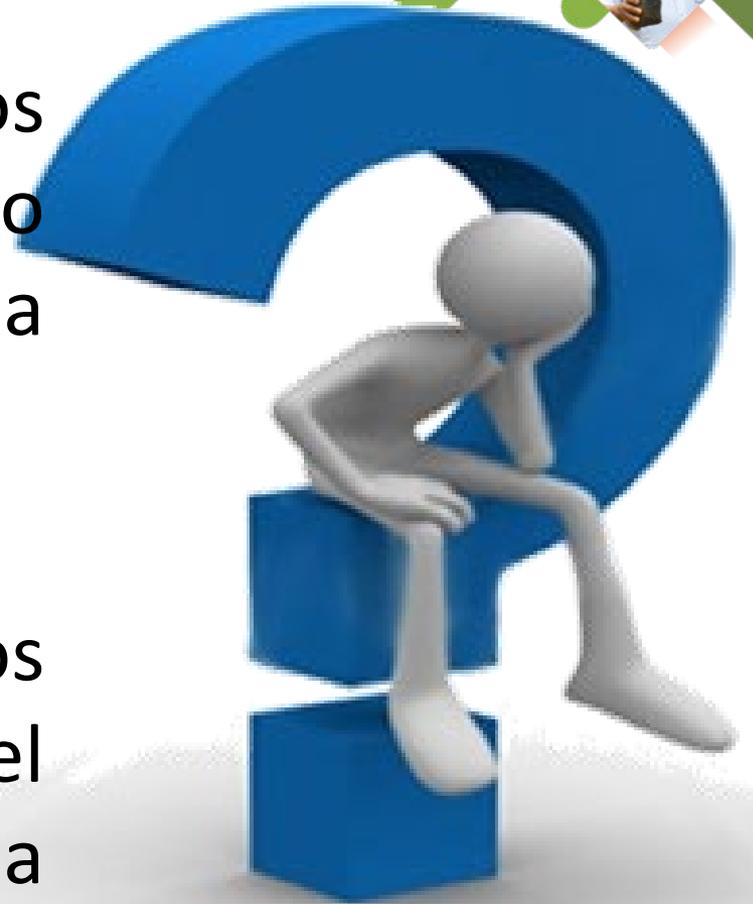


Thyrinteina leucoceraea



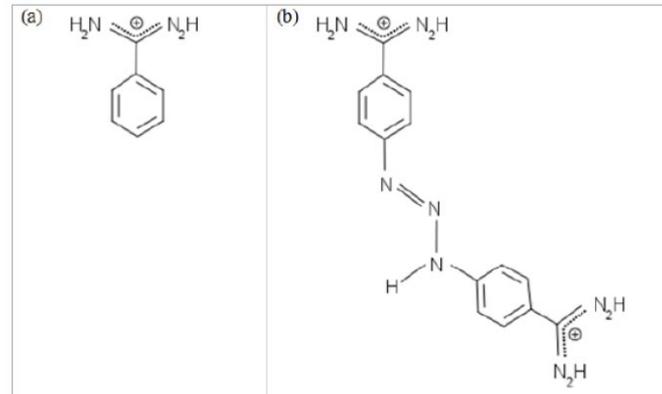
Entonces...

- Será que los IPs sintéticos pueden afectar un insecto chupador como la escama verde?
- O será que los IPs sintéticos puede interferir en el mecanismo de defensa de la planta de café?



OBJETIVO GERAL

Evaluar los efectos de la presencia de los inhibidores de proteasas sintéticos, benzamidina e berenil, sobre las enzimas digestivas y biología de *C. viridis*. Además de eso, verificar cuales son las alteraciones na respuesta de defensa bioquímica en *C. arábica*.



Estruturas da benzamidina (A) e do berenil (B).



❖ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 
- Evaluar el efecto de los IPs sintéticos en la actividad **proteásica intestinal** de *C. viridis*.
 - Determinar las concentraciones de **inhibidores de proteasas totales** en hojas de *C. arabica*, con daño mecánico, con y sin infestación de *C. viridis*; en la presencia y ausencia de inhibidores de proteasas sintéticos.
 - Evaluar los efectos en los **aspectos biológicos** (crecimiento, desarrollo y sobrevivencia) de *C. viridis*, cuando son pulverizados con inhibidores sintéticos de tripsina en hojas de *C. arabica*.

MATERIAL E MÉTODOS

❖ Experimento

Fueron instalados dos experimentos.

1. Evaluación de la actividad proteolítica de la escama verde y la respuesta de defensa del café.
2. Parámetros biológicos de la escama verde bajo pulverización de IPs sintéticos benzamidina y berenil.



La infestación de las plantas (Rosado 2009).

- Dos hojas infectadas de la cámara de cría, colocadas en cada planta por 24 horas.
- Retiro de las hojas y de *C. viridis* extras(dejando solo 50 del primer instar).



Experimento 1: Respuestas bioquímicas

El delineamiento experimental casualizado.

- Tres repeticiones (plantas) y nueve tratamientos.

Los tratamientos fueron:

T1: P

T2: P+FM (Herida mecânica)

T3: P+I

T4: P+I+Bnz 0,25%

T5: P+I+Bnz 0,50%

T6: P+I+Bnz 0,75%

T7: P+I+Brnl 0,25%

T8: P+I+Brnl 0,50%

T9: P+I+Brnl 0,75%



La solución Triton X-100 al 0,005% (v/v), usada en todos los tratamientos.

Trabalhos: PAIXÃO 2010; MARINHO et al., 2006, MARINHO 2010.



➤ Pulverización: 7 días después de la infestación

➤ 24 horas después, colecta de:

- Hojas (dos infectadas).
- Insectos (30 ninfas de 2 do. e 3 ro. Instar) almacenadas en microtubos (1,5 mL).
- Muestras almacenadas en nitrógeno líquido y llevadas al laboratorio, y fueron mantenidos a -80°C .



T1: P

T2: P+FM

T3: P+I

T4: P+I+Bnz 0,25%

T5: P+I+Bnz 0,50%

T6: P+I+Bnz 0,75%

T7: P+I+Brnl 0,25%

T8: P+I+Brnl 0,50%

T9: P+I+Brnl 0,75%

- Evaluaciones:

- Escama verde: actividad (tripsina-like (amidásic quimotripsina-like esterási y proteasas totales.

Tratamiento 3: P+I (tratamiento

- Café: Actividad de inhibido

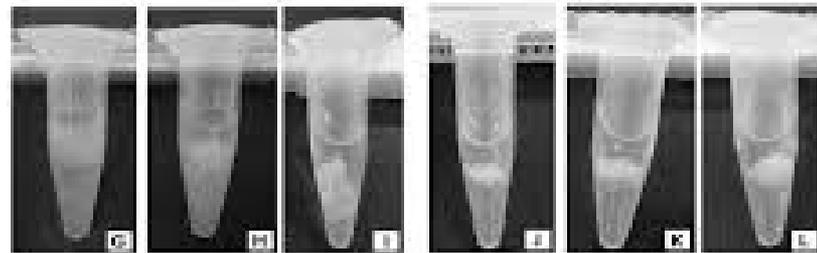
- T1: P (plantas limpias fueron el Los análisis fueron realizados en triplicadas en las tres repeticiones de cada tratamiento

- Análisis estadística: (R CORE TEAM, 2013).



Extractos enzimático de *C. viridis*

- Los insectos fueron macerados, con bastón de vidrio estéril.
- Se adiciono 1 mL de HCl 10^{-3} M a 4°C;
- Se centrifugo a 10.000 g por 10 min, a 4°C;
- El sobrenadante, extracto bruto, fue utilizado para la actividad enzimática y concentraciones de proteínas.





Determinación de la actividad amadésica de tripsina-*like* de la escama verde.

- Erlanger et al., 1961;
- Substrato: N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BApNa);
- Absorbancia a 410nm en función de tiempo (2,5 min);



➤ Determinación de la actividad esterásica de tripsina-*like* de la escama verde.

- Hummel et al., 1961;
- Substrato: N- α -p-tosil-L-arginina metil éster (L-TAME);
- Absorbancia a 247 nm en función del tiempo (2,5 min);



➤ Determinación de la actividad esterásica de quimotripsina-*like* de la escama verde.

– Erlanger et al., 1961;

– Substrato: N-5 Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate (ATEE);

– Absorbancia a 410 nm en función de tiempo (2,5 min);



➤ Determinación de la actividad cisteino-proteinása de la escama verde.

- Erlanger et al., 1961;
- Substrato: N-benzoil-L-arginil p-nitroanilina (L-BapNA);
- Absorbancia a 410 en función de tiempo (2,5 min);



➤ Determinación de la actividad proteasas totales de la escama verde.

- Tomarelli et al., 1949;
- Substrato: **azocaseína**;
- Absorbancia a 440nm;



❖ Extractos foliares de café variedad Catuaí rojo

– Ohta et al., 1986;



Producción de Inhibidores de Proteasas



- Determinación de los Inhibidores de proteasas
 - Kakade et al., 1974;
 - La presencia de inhibidores de proteasas en el extracto bruto fue determinada utilizandose **tripsina bovina sintética**;
 - Absorbancia a 410 en función de tiempo (2,5 min).



Experimento 2: Aspectos biológicos de *C. viridis*

- El delineamiento experimental casualizado.
- Tres repeticiones (plantas) y siete tratamientos.

Los tratamientos fueron:

- ~~T1: P~~
- ~~T2: P+FM~~
- T3: P+I
- T4: P+I+Bnz 0,25%
- T5: P+I+Bnz 0,50%
- T6: P+I+Bnz 0,75%
- T7: P+I+Brnl 0,25%
- T8: P+I+Brnl 0,50%
- T9: P+I+Brnl 0,75%

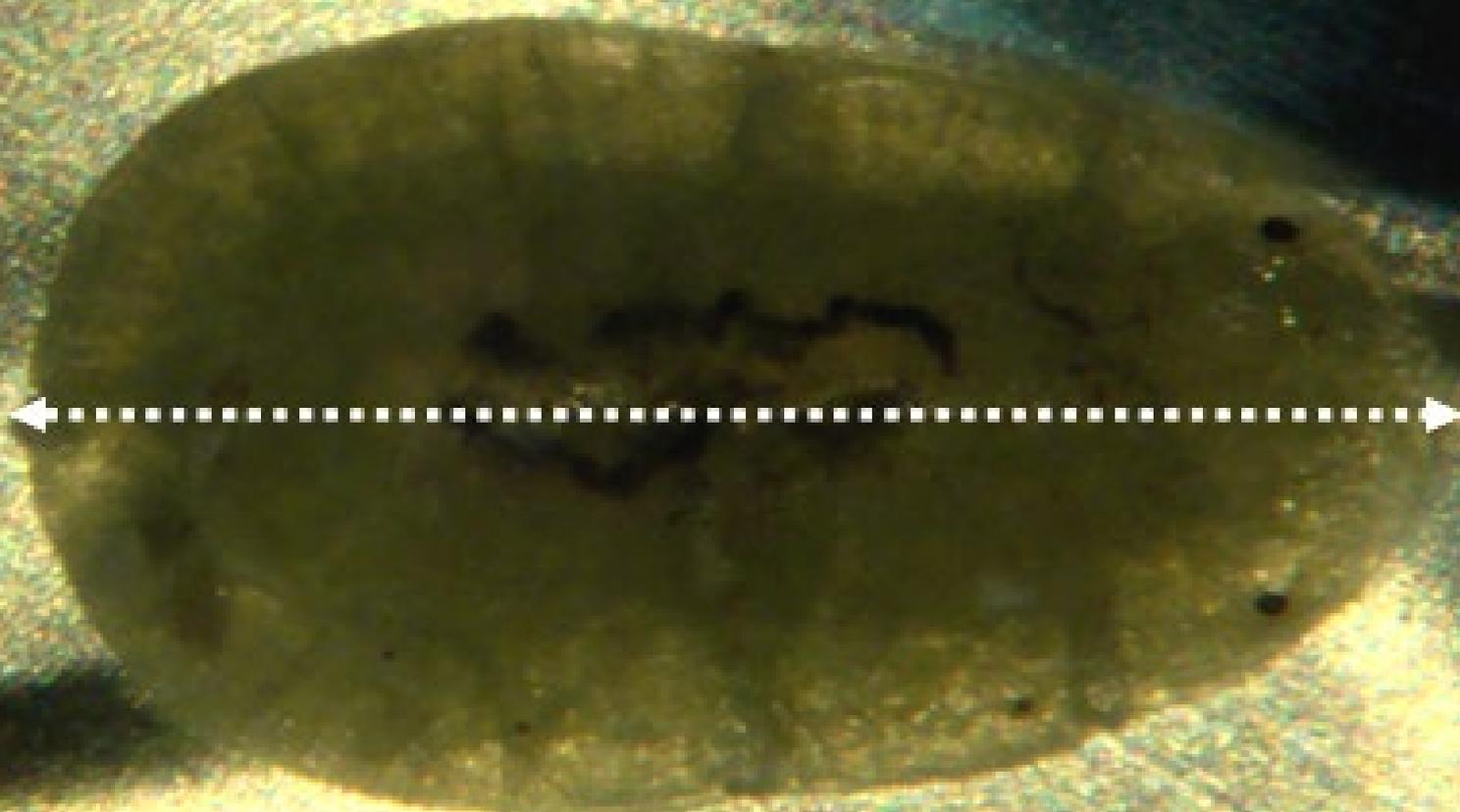


La solución Triton X-100 a 0,005% (v/v),
usada en todos los tratamientos



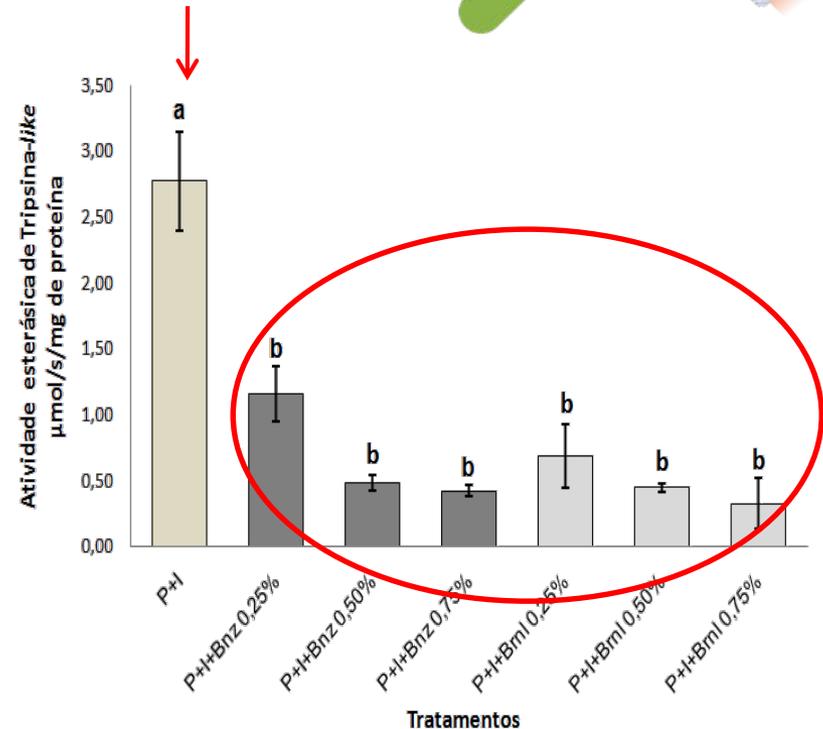
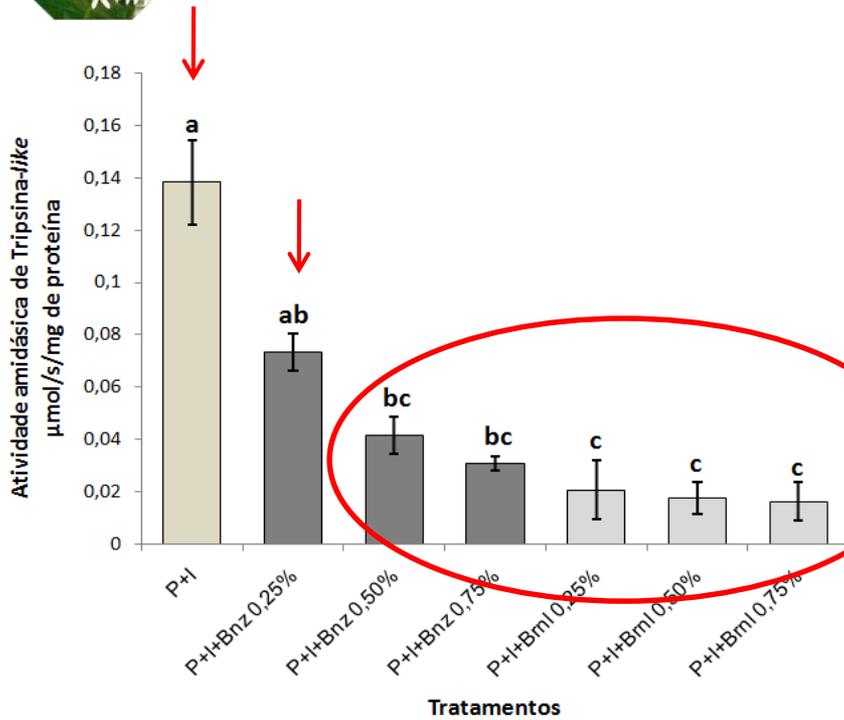
- Infestación con *C. viridis* (Rosado 2009).
- 50 ninfas en el primer estadio.
- Pulverización de IPs: Después de 24 hrs de infestación.





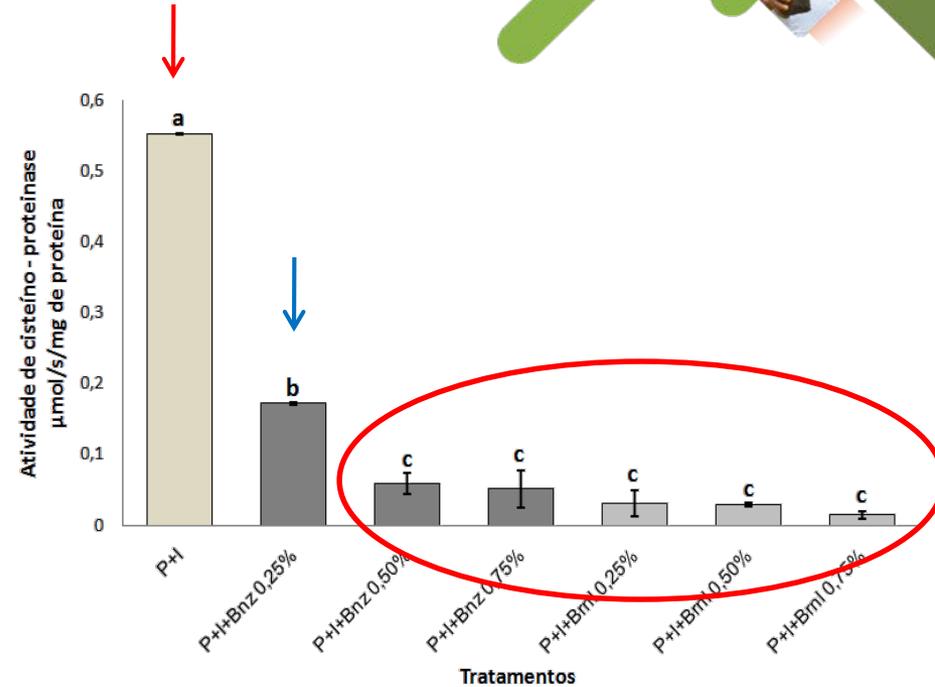
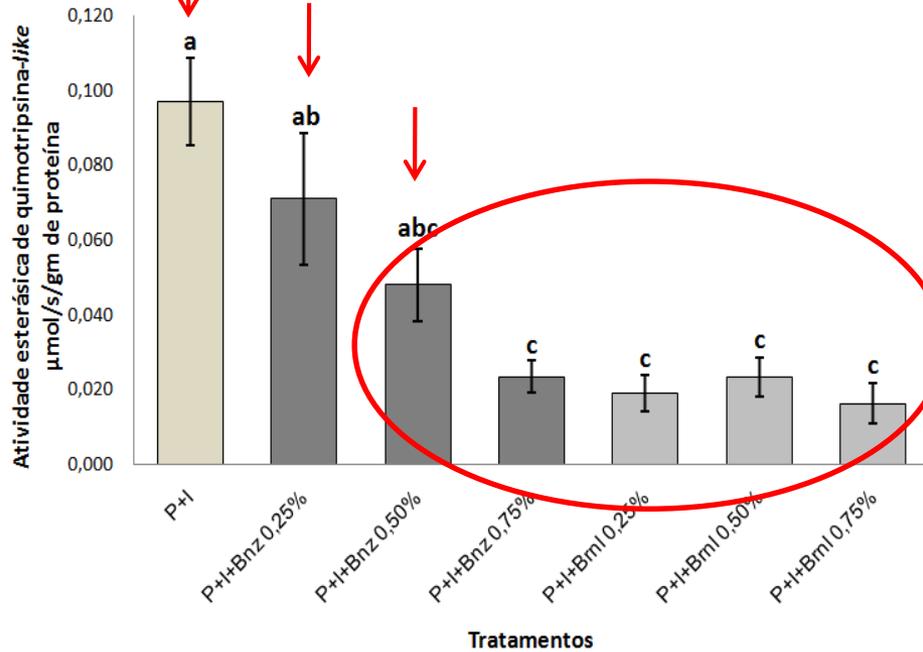
RESULTADOS

❖ *Coccus viridis*



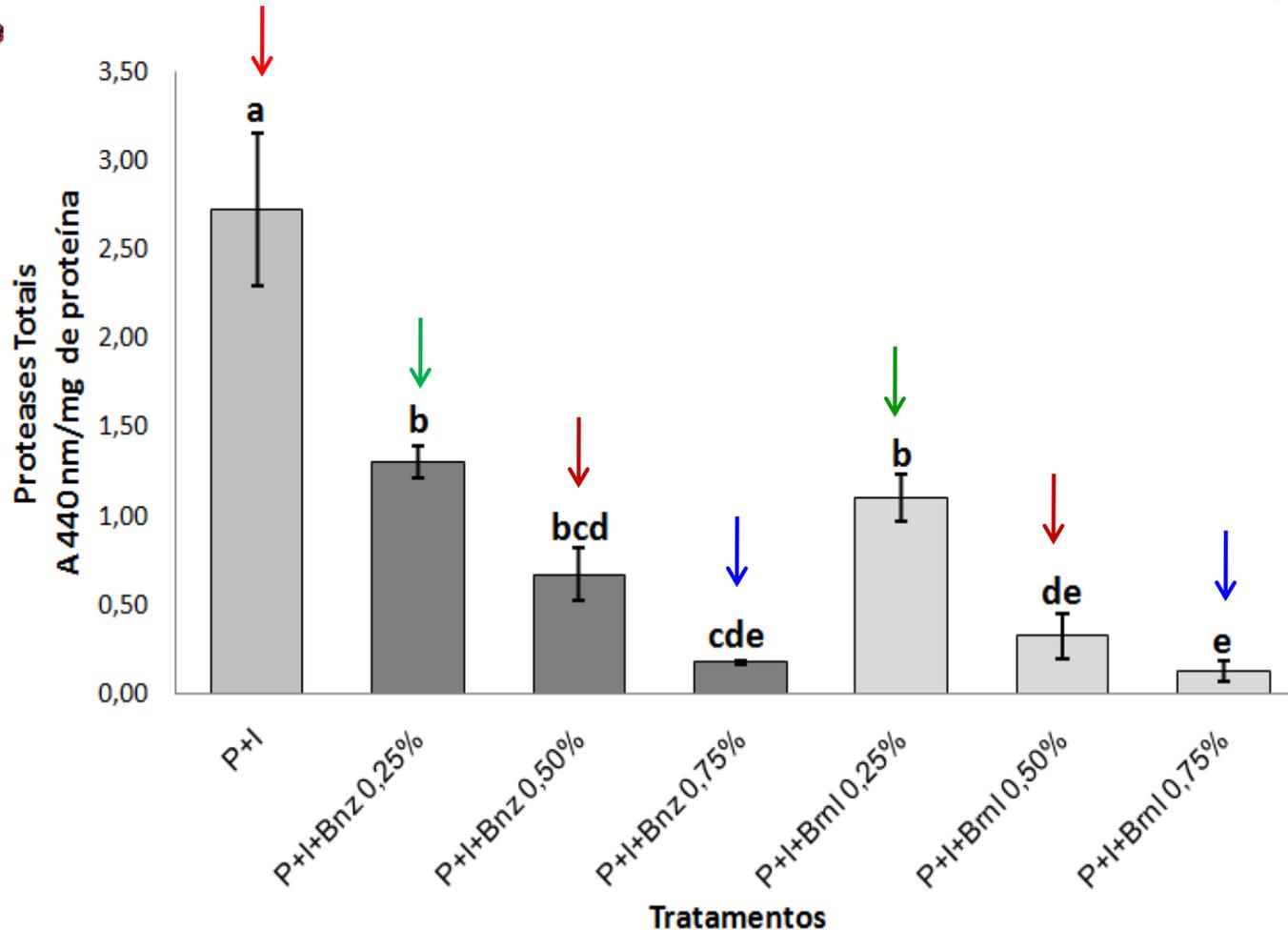
Atividade **amidásica** e **esterásica de tripsina-like** ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae) sob os diferentes tratamentos. Médias (\pm Desvpad; $n=3$) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. (P= planta; I= inseto; Bnz= Benzamidina; Brnl= Berenil).

❖ *Coccus viridis*



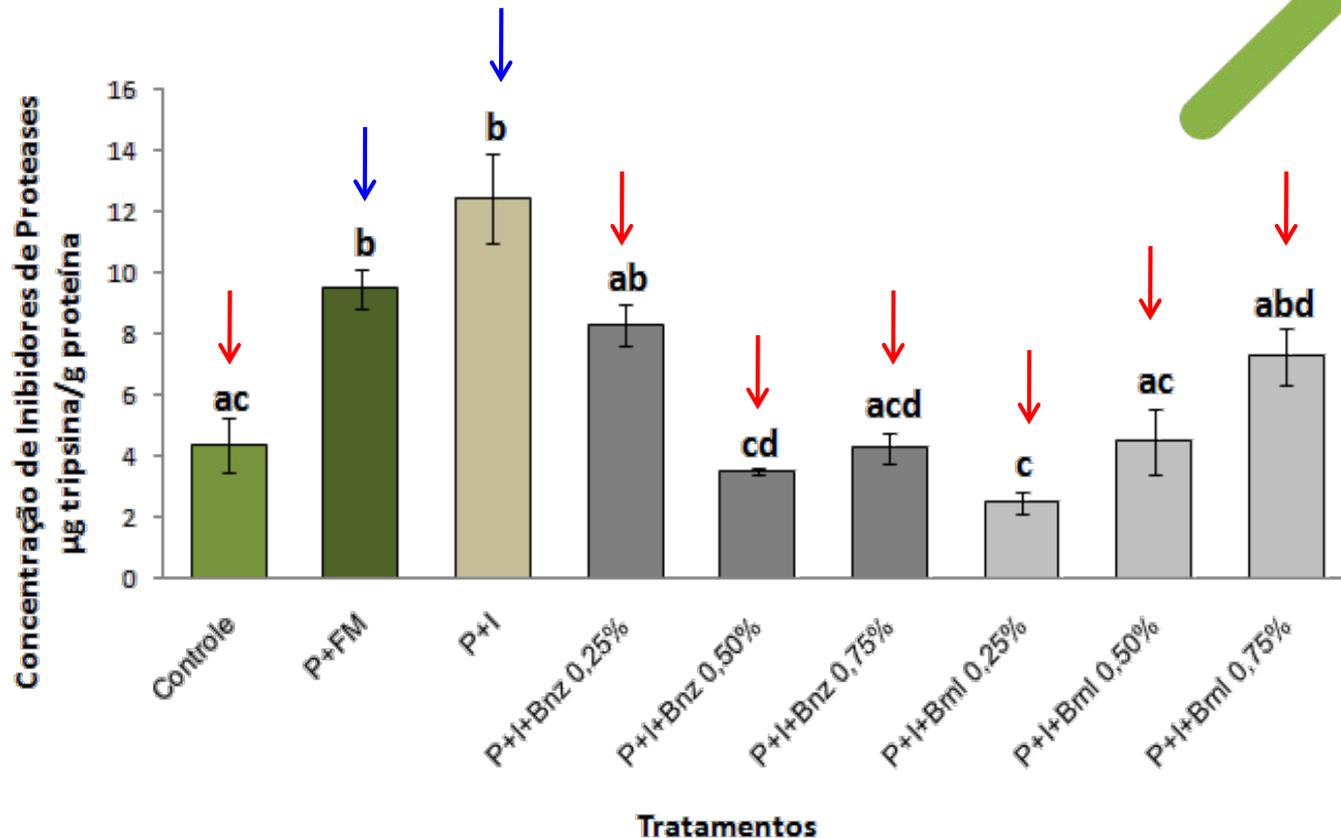
Atividade esterásica de quimotripsina-like e cisteíno-proteases ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae) sob os diferentes tratamentos. Médias (\pm Desvpad; n= 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. (P= planta; I= inseto; Bnz= Benzamidina; Bml= Berenil).

❖ *Coccus viridis*



Atividade de proteases totais (Absorvância 440 nm/mg de proteína) para *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae) sob os diferentes tratamentos. Médias (\pm Desvpad; n= 3) dos tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. (P= planta; I= inseto; Bnz= Benzamidina; Brnl= Berenil).

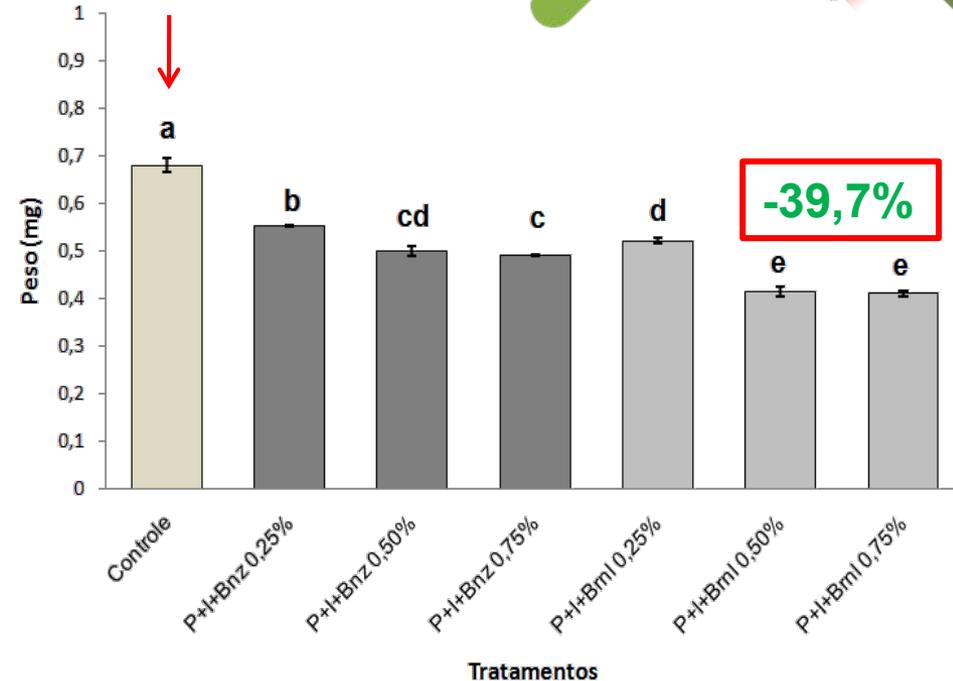
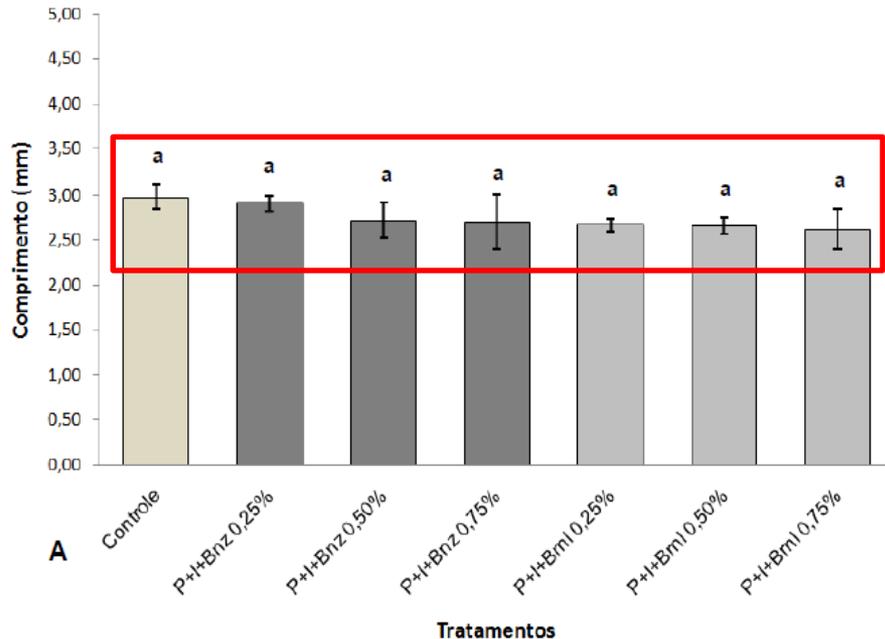
❖ Café (Var. Catuai Rojo)



Concentração de IP (g de tripsina inibida/g de proteína) de plantas de *Coffea arabica*, oito dias de infestação (um dia após da pulverização de IPs) de acordo com os tratamentos. Médias dos tratamentos (\pm Desvpad; n= 3) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P= planta; FM= fermento mecânico; I= inseto; Bnz= Benzamidina; Bml= Borenil).

❖ Aspectos Biológicos

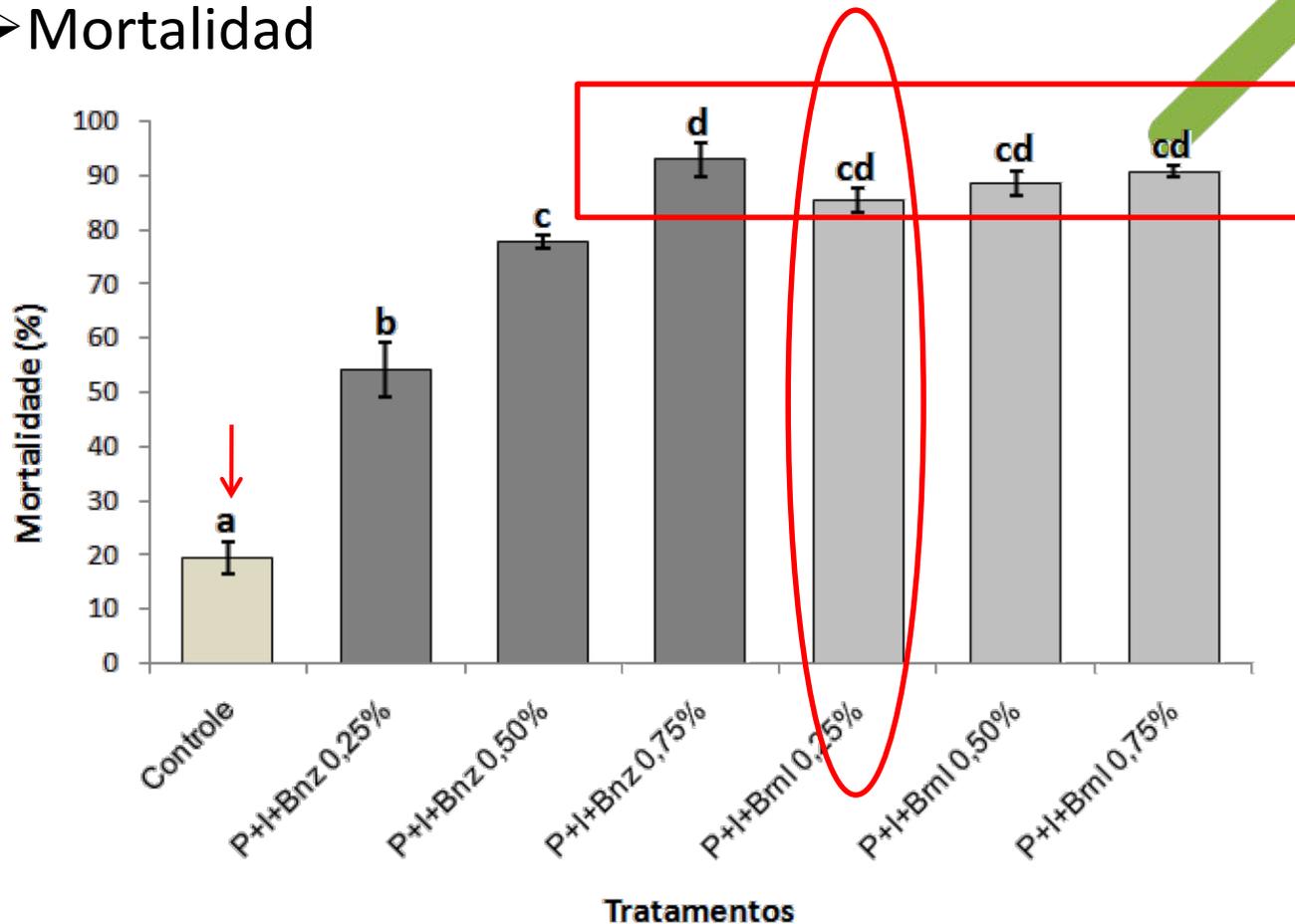
➤ Tamanho y peso



Tamanho y peso de adultas de *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae) em plantas limpas e quando foram pulverizadas com diferentes concentrações dos IPs benzamidina e berenil no primeiro instar sobre a folhas de *Coffea arabica*. Nos dois parâmetros, as médias dos tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P= planta; I= inseto; Bnz= Benzamidina; Brnl= Berenil).

❖ Aspectos Biológicos

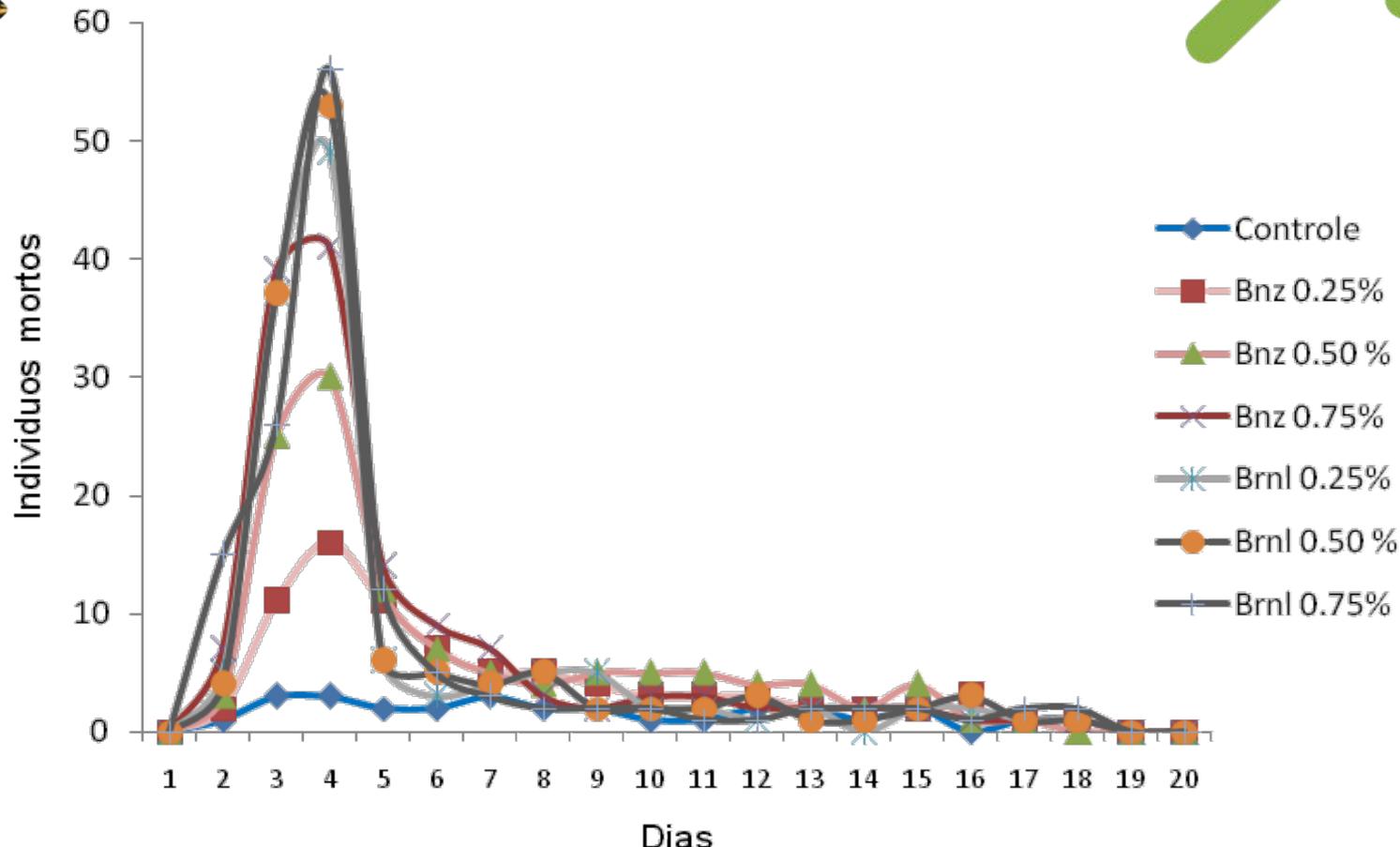
➤ Mortalidade



Avaliação da mortalidade de *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae), em plantas limpas e pulverizadas com diferentes concentrações dos IPs de protease benzamidina e berenil sobre a folha de *C. arabica*. Médias dos tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. (P= planta; I= inseto; Bnz= Benzamidina; Bml= Berenil).

❖ Aspectos Biológicos

➤ Curva de mortalidad



Curva de mortalidade de *Coccus viridis* (Green, 1889) (Coccidae) desde o primeiro instar ate chegar a adultas, tratamentos controle e tratamentos com pulverizações com diferentes concentrações dos IPs benzamidina e berenil no primeiro instar sobre as folhas de *Coffea*

CONCLUSIONES

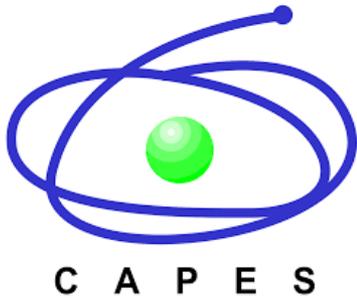
- Los IPs benzamidina y berenil **perjudican la actividad** proteolítica de las escamas verdes mostrando reducción de la actividad en las serino-proteasas y cisteino-proteasas.
- El **aumento** de los niveles de inhibidores de proteasas foliares sugiere que las plantas de *C. arabica* activaron su mecanismo de defensa por la vía de las lipoxigenasas cuando son heridas por *C. viridis*.

CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que los inhibidores de proteasas benzamidina y berenil tienen un efecto positivo en el desempeño de la planta, al inducir a la reducción de la producción de IPs por las plantas, reduciendo así los costos de defensa.
- Benzamidina y berenil perjudican la actividad biológica *C. viridis*, presentando **alta mortalidad después** de la pulverización, provocando reducción de **ganancia de** peso en los insectos que llegaron a adultos.



AGRADECIMENTOS



Pós-Graduação em Entomologia
Universidade Federal de Viçosa

