

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**VARIACIÓN EN LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS DE LA
PALOMILLA DORSO DE DIAMANTE (*Plutella xylostella*) Y SU
CORRELACIÓN CON ENZIMAS DETOXIFICATIVAS**

Tesis

Que presenta JOSÉ FRANCISCO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

Saltillo, Coahuila.

Diciembre de 2017

VARIACIÓN EN LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS DE LA PALOMILLA
DORSO DE DIAMANTE (*Plutella xylostella*) Y SU CORRELACIÓN CON ENZIMAS
DETOXIFICATIVAS

Tesis

Elaborada por JOSÉ FRANCISCO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ como requisito parcial
para obtener el grado de maestro en ciencias en parasitología agrícola con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor principal



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor



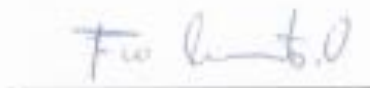
Dr. Jerónimo Landeros Flores
Asesor



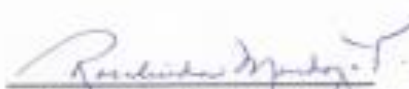
Dr. Luis Alberto Uribe Aguirre
Asesor



Dr. Luis Patricio Guevara Acevedo
Asesor



Dr. Francisco Cervantes Ortiz
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Posgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila.

Diciembre de 2017

Agradecimientos

A DIOS:

A ese personaje tan importante al cual de debo mi ser, gracias por permitirme haber terminado mis estudios profesionales. Gracias por haberme ayudado a superar todos los obstáculos que se presentaron a lo largo de mi formación y así poder ser una persona de bien.

A LA UAAAN:

Por abrirme sus puertas y brindarme las herramientas necesarias para mi formación como profesionista. Gracias a todo el personal de la universidad los cuales de una forma u otra aportaron para mi formación. Gracias a los catedraticos por haberme transmitido el aprendizaje necesario y sus consejos para hacer de mi un buen profesionista.

A MI DIRECTOR Y ASESORES:

Gracias a mi director de tesis el Dr. ErnestoCerna Chávez por permitirme realizar mi investigación de tesis, bajo sus asesorías, enseñanzas, su apoyo y sus consejos en lo académico. Asi como al resto de mis asesores: Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, Dr. Jeronimo Landeros Flores, Dr. Luis Alberto Uribe Aguirre, Dr. Luis Patricio Guevara Acevedo y el Dr. Francisco Cervantes Ortiz, gracias a todos ellos por ser parte de mi formación profesional.

A MIS AMIGOS:

Gracias a mis amigos con los que conviví a lo largo de estos 24 años que formaron parte importe de mi vida. Gracias a todos aquellos que me ayudaron y me apoyaron a lo largo de mi proyecto de investigación, ya que fueron parte importante para poderlo realizar.

Dedicatorias

A MIS PADRES:

A mi mamá Esperanza Rodríguez Rodríguez y a mi papá Francisco Rodríguez Terán, por brindarme todo su apoyo moral y económico, por su cariño y comprensión, sin ustedes no hubiera podido concluir esta etapa de mi vida como profesional; siempre estaré agradecido, gracias a ustedes soy la persona que soy y tengo lo que tengo.

A MIS HERMANAS Y SOBRINOS:

A mis hermanas Margarita Rodríguez y Marissa Rodríguez.

A mis sobrinos Fernando Rodríguez, Alonso Rodríguez, Sofía López, y Emiliano López.

“Gracias a ellos he podido salir adelante y su recuerdo siempre estará presente en mi mente”

Índice General

Agradecimientos	i
Dedicatorias	ii
Índice General	iii
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	ix
Resumen	x
Abstrat	xi
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general.	2
1.1.1 Objetivos específicos.	2
1.2 Hipótesis.	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Cultivo del brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L.).....	4
2.1.1 Origen	4
2.1.2 Importancia económica.....	4
2.1.3 Taxonomía de <i>Brassica oleracea</i>	5
2.1.4 Producción de brócoli en México	5
2.1.5 Producción de brócoli en Guanajuato.....	6
2.2 Palomilla dorso de diamante (<i>Plutella xylostella</i> L.)	6
2.2.1 Clasificación taxonómica.....	7
2.2.2 Ciclo de vida de <i>Plutella xylostella</i>	7

2.2.3 Hospederos	8
2.2.4 Daños	8
2.2.5 Control	9
2.2.6 Resistencia en <i>Plutella xylostella</i>	9
2.3 Resistencia.....	11
2.3.1 Tipos de resistencia.....	11
2.3.2 Determinación de resistencia.....	13
2.4 Enzimas detoxificativas.....	14
2.4.1 Esterasas	14
2.4.2 Glutation-S-Transferasa.....	15
2.4.3 Oxidasas de función múltiple (MFO).....	16
2.4.4 Acetilcolinesterasa.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Ubicación del experimento.....	18
3.2 Insecticidas a evaluar.....	18
3.3 Poblaciones de <i>Plutella xylostella</i>	18
3.4 Colecta de material biológico en campo	19
3.5 Bioensayos.....	19
3.6 Pruebas bioquímicas.....	20
3.6.1 Determinación de proteína a larvas de <i>Plutella xylostella</i>	20
3.6.2 Preparación de homogenatos	20
3.6.3 Determinación de α y β -esterasas	21
3.6.4 Determinación de Glutation-S-transferasa.....	21
3.6.5 Determinación de acetilcolinesterasa.....	21
3.6.7 Determinación de oxidasas	22

3.7 Análisis estadístico	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
Cuantificación de enzimas asociadas a la resistencia de insecticidas en Diferentes Poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> L. (Lepidoptera: Plutelliidae) del Estado de Guanajuato	53
Susceptibilidad a Insecticidas de la Palomilla Dorso de Diamante (<i>Plutella xylostella</i> L.) (Lepidoptera: Plutellidae) en el Estado de Guanajuato.....	70

Lista de Tablas

1	Insecticidas y su grupo toxicológico.....	18
2	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea susceptible (LS) de larvas de <i>Plutella xylostella</i>	25
3	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo San Luis de la Paz (L1) de larvas de <i>Plutella xylostella</i> y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.....	27
4	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo San José Iturbide (L2) de larvas de <i>Plutella xylostella</i> y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.....	28
5	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Valle de Santiago (L3) de larvas de <i>Plutella xylostella</i> y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.....	28
6	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Abasolo (L4) de larvas de <i>Plutella xylostella</i> y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.....	29
7	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Celaya (L5) de larvas de <i>Plutella xylostella</i> y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.....	30
8	Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Juventino Rosas (L6) de larvas de <i>Plutella xylostella</i> y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.....	30
9	Proporción de resistencia en diferentes poblaciones de <i>P. xylostella</i> en el estado de Guanajuato.....	35
10	Análisis de varianza del contenido β -esterasas en las 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> en el estado de Guanajuato.....	35

11	Análisis de varianza del contenido α -esterasas de en las 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> en el estado de Guanajuato.....	36
12	Comparación de medias del contenido de β y α -esterasas en 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> del estado de Guanajuato y una línea susceptible.....	36
13	Análisis de varianza del contenido Glutation-S-Transferasas de en las 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> en el estado de Guanajuato.....	37
14	Comparación de medias del contenido de Glutation-S-Transferasas en 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> del estado de Guanajuato y una línea susceptible.....	37
15	Análisis de varianza del contenido Acetilcolinesterasa de en las 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> en el estado de Guanajuato.....	38
16	Comparación de medias del contenido de Acetilcolinesterasa en 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> del estado de Guanajuato y una línea susceptible.....	38
17	Análisis de varianza del contenido Oxidasas de en las 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> en el estado de Guanajuato.....	39
18	Comparación de medias del contenido de Oxidasas en 6 poblaciones de <i>Plutella xylostella</i> del estado de Guanajuato y una línea susceptible.....	39

Lista de Figuras

- 1 Absorbancias de proteína en homogenatos de *Plutella xylostella* en diluyente buffer de fosfato (ph: 7.2)..... 33

Resumen

La palomilla dorso de diamante es una de las principales plagas que afectan a las crucíferas, debido a la importancia de estos cultivos y al daño generado se ha convertido en un grave problema para los productores. Su control se basa principalmente en el método químico, en el cual solo se emplean insecticidas compatibles con el medio ambiente y la salud humana. Sin embargo la alta presión de selección de insecticidas, ha generado a que desarrolle resistencia a las diferentes materias activas utilizadas para su control. Por lo anterior, se realizaron pruebas de susceptibilidad para la determinación de la resistencia de larvas de tercer instar de *P. xylostella* a insecticidas de diferente grupo toxicológico, así como pruebas bioquímicas para cuantificar α y β esterasas, Glutathion S-transferasas, Acetil colinesterasas y oxidasas, enzimas relacionadas con la resistencia a insecticidas, en 6 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato (Abasolo, Celaya, San Luis de la Paz, Valle de Santiago, Juventino Rosas y San José Iturbide) y una línea susceptible como referencia. Los resultados demuestran que las poblaciones de San Luis de la Paz y Valle de Santiago presentan problemas de resistencia para cipermetrina, mientras que el resto de las poblaciones presentan una tendencia al desarrollo de resistencia contra este insecticida. Para los otros insecticidas evaluados no se presentan problemas de resistencia en ninguna de las poblaciones en estudio, considerándose efectivos para el control de esta plaga en el estado de Guanajuato. En relación a la cuantificación las enzimas detoxificativas las de mayor presencia fueron las α y β esterasas en Celaya y Valle de Santiago, así como oxidasas en poblaciones de San Luis de la Paz, así mismo, podemos mencionar que las enzimas responsables de la falta de efectividad en productos aplicados para el control de esta plaga como piretroides, organofosforados y benzoilureas son las enzimas esterasas. Por su parte las enzimas acetilcolinesterasa y glutathion s-transferasa no presentaron relevancia como mecanismo detoxificativo.

Palabras clave: *Plutella xylostella*, resistencia, enzimas detoxificativas, insecticidas

Abstrat

The diamond back moth is one of the main pests that affect the crucifers, due to the importance of these crops and the damage generated has become a serious problem for producers. Its control is mainly based on the chemical method, in which only insecticides compatible with the environment and human health are used. However, the high selection pressure of insecticides has generated resistance to the different active materials used for their control. Therefore, resistance tests were carried out to determine the susceptibility of third-instar larvae of *P. xylostella* to insecticides of different toxicological group, as well as biochemical tests to quantify α and β esterases, Glutathione S-transfers, Acetyl cholinesterases and oxidases, enzymes related to insecticide resistance, in 6 populations of *Plutella xylostella* from the state of Guanajuato (Abasolo, Celaya, San Luis de la Paz, Santiago Valley, Juventino Rosas and San José Iturbide) and a susceptible line as a reference. The results show that the populations of San Luis de la Paz and Valle de Santiago present resistance problems for cypermethrin, while the rest of the populations have a tendency to develop resistance against this insecticide. For the rest of the insecticides evaluated there are no problems of resistance in any of the populations under study, considering themselves effective for the control of this pest in the state of Guanajuato. In relation to quantification, the detoxifying enzymes with the highest presence were the α and β esterases in Celaya and Valle de Santiago, as well as oxidases in populations of San Luis de la Paz, likewise, we can mention that the enzymes responsible for the lack of effectiveness in products applied for the control of this pest as pyrethroids, organophosphates and benzoylureas are esterase enzymes. For its part, the enzymes acetylcholinesterase and glutathione S-transferase did not show relevance as a detoxification mechanism.

Keywords: *Plutella xylostella*, resistance, detoxifying enzymes, insecticides

INTRODUCCIÓN

El brócoli es una de las hortalizas más importantes en México ya que un 80 % de su producción esta destina a exportación, su principal destino de las ventas internacionales es el mercado de Estados Unidos, ya que ahí se exporta 85 % de la producción. El resto de las exportaciones se dividen en países como Canadá, Japón, Alemania y Australia (SIAP, 2017a), por lo que este cultivo representan una importante fuente de divisas y significativos beneficios para los productores (Bujanos *et al.*, 2013). Los principales estados productores de brócoli en el país son: Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Puebla con un 90% de la producción total en el país, mientras que el estado de Guanajuato se produce un 63 % de la producción total (SIAP, 2017b). La principal plaga de importancia económica en las crucíferas es la Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostela*), que afecta la calidad del producto debido a la contaminación por huevos, larvas y pupas que ocasionan que sea rechazado para su exportación (INIFAP, 2013), también causa graves daños, desprestigiando el producto, al interferir en el crecimiento de las plantas e incluso causar la muerte y pérdida total del mismo (Da Silva, 2008). En todas las regiones productoras de crucíferas esta plaga se ha convertido en un tema de investigación, con el fin de obtener medidas de control técnicamente apropiadas, económicamente satisfactorias y respetuosas al medio ambiente (Thüler, 2006), ya que sociedad demanda la evaluación de las prácticas agrícolas potencialmente peligrosas, como el uso excesivo de insecticidas (Roberts, 2004). Exigiendo inspecciones estrictas del impacto de dichas prácticas, así como la búsqueda de alternativas para manejar adecuadamente las plagas dentro de un contexto económico, social y ecológico (Barrera *et al.*, 2006) *P. xylostella* es considerada como una de las plagas más difíciles de controlar y hasta ahora los insecticidas son el principal método para su manejo, siendo las diamidas, avermectinas, piretrinas, y Bt los grupos principales de insecticidas utilizados para erradicar esta plaga (Xia *et al.*, 2014). Así como las consecuencias para el medio ambiente, la eliminación de enemigos naturales, el surgimiento de plagas secundarias y el aumento del riesgo tanto de presencia de residuos en el producto comestible como para el personal de campo (Bujanos, 2013), el uso inadecuado y

continuo de las mismas materias activas ha generado poblaciones de *P. xylostella* resistentes a los insecticidas (Attique *et al.*, 2006, Khaliq *et al.*, 2007). En muchos países *P. xylostella* ha desarrollado resistencia a casi todos los insecticidas utilizados en contra de ella, (Furlong *et al.*, 2013). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2015 , la Palomilla Dorso de Diamante había desarrollado resistencia a aproximadamente 91 compuestos con diferentes modos de acción, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, benzoilureas, *Bacillus thuringiensis*, avermectinas, espinosinas, fenilpirazoles, indoxacarb, diacilhidrazinas y diamidas (APRD, 2015).

El aspecto más importante en el manejo de resistencia a los insecticidas es la comprensión de los mecanismos que conducen a la resistencia de las plagas a los insecticidas. Investigaciones previas indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucra mutaciones de aminoácidos de destino, la sobre-expresión o mutaciones de desintoxicación, enzimas detoxificativas, resistencia a la penetración y resistencia de comportamiento (Ahmad *et al.*, 2006; Bass *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayor parte de mecanismos de resistencia en común es la resistencia metabólica, con un aumento en las actividades de esterasas, glutatión-S-transferasas, acetilcolinesterasa y oxidasas (Li *et al.*, 2007; Bass *et al.*, 2011). El metabolismo de los insectos juega un papel importante en la resistencia a insecticidas y el conocimiento del mismo se puede utilizar para mejorar la toxicidad de los insecticidas por la mezcla de otros insecticidas que no poseen las mismas vías metabólicas (Mohan y Gujar, 2003).

1.1 Objetivo general.

Determinar la variación en la susceptibilidad de insecticidas de *P. xylostella* y el rol de las enzimas detoxificativas que confieren resistencia a insecticidas.

1.1.1 Objetivos específicos.

1.- Determinar la susceptibilidad de 6 poblaciones de *P. xylostella* a insecticidas de diferente grupo toxicológico en Guanajuato.

2.- Cuantificación y correlación de enzimas detoxificativas en la resistencia a insecticidas.

1.2 Hipótesis.

1.- La susceptibilidad a los plaguicidas de diferentes grupos toxicológicos será mayor al 30% entre las 6 poblaciones en estudio.

2.- La mayor cuantificación de enzimas en las poblaciones de *Plutella xylostella* será atribuida a las esterasas.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo del brócoli (*Brassica oleracea* L.)

Las Brassica son un grupo de especies importantes desde el punto de vista agrícola ya que forman parte de la nutrición humana, estos compuestos han ganado atención debido a su papel en la prevención del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares (Cartea y Velasco, 2008), como una fuente de compuestos promotores de la salud, como fibra, vitamina C, glucosinolato y flavonoides y selenio (Keck y Finley, 2004).

2.1.1 Origen

Los cultivos de coles tan diversos como la col rizada, la col, el colinabo, el brócoli, la coliflor y las coles de Bruselas son todas de la misma especie, *Brassica oleracea* L., que es nativa a Europa. La extrema plasticidad de la especie ha permitido la diferenciación, bajo la selección humana, de este gran número de formas debido a la especialización de diferentes órganos vegetales que han dado lugar a diversos cultivos y usos. Estas incluyen, por ejemplo, las hojas en el caso de la col y la col rizada de hoja, el tallo en el colinabo y la col rizada, las inflorescencias en el brócoli y la flor de cauli y los brotes axilares (laterales) en la col de Bruselas (Maggioni *et al.*, 2010). De acuerdo a un folleto de extensión de la Universidad Estatal de Iowa, todos los cultivos de coles son variedades cultivadas de la especie *Brassica oleracea* (Haynes *et al.*, 2009).

2.1.2 Importancia económica

La familia de plantas Brassicaceae (o Crucíferas) incluye algunos de los cultivos más importantes económicamente del mundo, especialmente miembros de los géneros *Brassica* L. (coles, mostazas, colza, nabos, etc.), *Raphanus* L. (rábano), *Armoracia* G. Gaertn. & Al. (Rábano picante), *Lepidium* Fabr. (Berro de jardín), *Nasturtium* W. T. Aiton (berro), *Eutrema* R. Br. (Wasabi) y molino de Eruca. (Cohete) (Al-Shehbaz *et al.*, 2006). Estas especies cultivadas ofrecen una gran variedad de hortalizas de hojas, raíces,

semillas oleaginosas y cultivos de condimentos. Las hortalizas Brassica son un alimento básico en muchas partes del mundo, ya que los cultivos producen el 14% del aceite vegetal comestible del mundo y son la tercera fuente más importante de aceite comestible después de la soja y la palma. Entre las hortalizas, las variedades cultivadas de la especie *Brassica oleracea* L. se denominan a menudo “cultivos de colza”, que incluyen el brócoli, las coles de Bruselas, el repollo, la coliflor, las coles y el colinabo (Haynes *et al.*, 2009, OCDE, 2012).

Los cultivos de col son cultivados en todo el mundo, con la excepción de algunas zonas tropicales. Entre éstos, el repollo se produce lo más extensamente posible, seguido por la coliflor y el brócoli. La col es más importante en los países del norte y del este de Europa, mientras que la coliflor es más importante en el sur de Europa, Estados Unidos y México (Maggioni *et al.*, 2010).

2.1.3 Taxonomía de *Brassica oleracea*

Order: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Tribu: Brassiceae

Subtribu: Brassicinae

Género: Brassica

Sección: Brassica

Especies: *Brassica oleracea* L.

2.1.4 Producción de brócoli en México

Para el año 2016 la producción de brócoli fue 507,482.34 Ton, siendo el estado de Guanajuato como el principal productor con un 63.11% de la producción total seguido

de los estados de Michoacán, Puebla y Jalisco con 9.55, 8.13 y 5.01% respectivamente (SIAP, 2017b).

2.1.5 Producción de brócoli en Guanajuato

Guanajuato es el principal estado productor de brócoli a nivel nacional con una superficie de siembra de 2,1383.50 ha y una producción de 320,268.37 Ton lo que equivale a un rendimiento promedio de 15.04 Ton/ha significado un ingreso en el valor de producción de 1, 791,255.00 de miles de pesos (SIAP, 2017b).

2.2 Palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.)

La palomilla dorso de diamante (DBM), *P. xylostella* (L.), es una plaga cosmopolita altamente destructiva de los cultivos de crucíferas (Heckel, 2006), ocasionando incrementos significativos en los costos de producción (INIFAP, 2013). Este especialista de crucíferas puede tener su origen en Europa (Sarfraz *et al.*, 2006), o el Este de Asia (Liu *et al.*, 2000), pero está presente en todo el mundo donde quiera que existan sus plantas huésped (Torres *et al.*, 2006). En el primer estadio, las larvas entran en el parénquima de la hoja y se alimentan entre la parte superior y las superficies inferiores de las hojas que crean minas. En el segundo estadio, las larvas abandonan las minas, y del segundo al tercer estadio, que se alimentan de las hojas, destruyendo el tejido de la hoja, excepto para la epidermis superior, dejando "ventanas" transparentes en las hojas. Las larvas de cuarto estadio se alimentan a ambos lados de las hojas (Cardoso *et al.*, 2010). Este insecto tiene un ciclo de vida corto, alrededor de 18 días, y su población puede aumentar hasta 60 veces de una generación a la siguiente. Los estudios indican que las polillas pueden permanecer en vuelo continuo durante varios días y pueden cubrir una distancia de hasta a 1000 km por día, pero la forma en que las polillas sobreviven a temperaturas tan bajas como de gran altitud (Shingo y Ventura, 2009).

2.2.1 Clasificación taxonómica

Plutella xylostella (Linn. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Suborden: Frenatae

Superfamilia: Yponomeutoidea

Familia: Plutellidae

Género: *Plutella*

Especie: *xylostella* (Linneo, 1758)

2.2.2 Ciclo de vida de *Plutella xylostella*

El ciclo biológico dura unas dos semanas, en función de las condiciones climáticas puede presentar de 5 a 10 generaciones anuales en climas templados y hasta 20 en trópicos y sub-trópicos. Es un insecto de gran movilidad y capacidad migratoria lo que le permite colonizar otras regiones al llegar el invierno (Midori, 2014)

- **Huevo:** los huevos son de forma óvaloaplanada, de color amarillo claro recién colocados, cambiando de tonalidad hasta llegar a oscurecerse para el tiempo de eclosión. La dimensión promedio de los huevos es de 0.48 mm de longitud y 0.28 mm de ancho.

- **Larva:** La larva recién emergida es de color blanco pálido, con la cabeza marrón oscura muy resaltante. Al momento de emerger tiene una longitud promedio de 1.20 mm. Finalizando el último instar, el cuerpo tiene una coloración verde claro con la cabeza marrón y la longitud promedio del cuerpo es de 10.27 mm.
- **Pupa:** La pupa es obovada con una longitud promedio de 6.83 mm. Al principio de su formación tiene un color verde brillante, más tarde se torna blanco crema y antes de emerger el adulto es de color marrón oscuro. La pupa se halla encerrada en un fino capullo de seda de color blanco. En esta fase es muy difícil diferenciar el sexo por presentar una morfología externa muy similar en esta especie.
- **Adulto:** el adulto es una polilla cuya longitud promedio del cuerpo es de 10.56 mm, con una expansión alar cercana a los 14 mm. Las alas anteriores son angostas con manchas pálidas en la parte media, semejando cuando están en reposo un diamante en la parte dorsal del insecto, razón por la cual, en inglés, se le ha dado la denominación común de diamondback moth. EL adulto hembra se diferencia muy fácilmente del macho por su genitalia externa, pero además en la hembra se presenta la mancha dorsal antes mencionada con una coloración más clara y brillante (Fernández y Álvarez, 2008).

2.2.3 Hospederos

La palomilla dorso de diamante se alimenta básicamente de repollo o col (*Brassica oleracea* var. capitata), coliflor (*B. oleracea* var. botrytis), brócoli (*B. oleracea* var. italica), rábano (*Raphanus sativus*), nabo (*B. rapa* pekinensis), col de bruselas (*B. oleracea* var. gemmifera), repollo chino (*B. rapa* cv. pekinensis), mostaza (*B. juncea*), colza (*B. napus*) (Bújanos *et al.*, 2013).

2.2.4 Daños

Esta plaga causa daños graves a cultivos de brassica, desprestigiando el producto, lo que interfiere en el crecimiento de las plantas e incluso causar la muerte o pérdida total (Da Silva, 2008). Algunas de las dificultades destaca por su control se deben a la

coexistencia de zonas de cultivo durante todo año con ello las plantas de diferentes edades que proporciona la abundante oferta y alimentación continua (Oliveira, 2012). También las larvas se alimentan de la nueva hoja antes de la formación de la cabeza de la inflorescencia lo cual puede plantear graves deformaciones y la no formación de la misma (Mau y Kessing, 2007). A nivel mundial, las pérdidas directas y los costos de control son estimado en US \$ 1 mil millones (Gryzwacz, *et al.*, 2010).

2.2.5 Control

P. xylostella se considera que es una de las plagas más difíciles de controlar. Hasta la fecha, los insecticidas siguen siendo el criterio principal para la gestión de *P. xylostella*, y los grupos principales de insecticidas para el control son las diamidas, avermectinas, piretrinas, y Bt (Xia *et al.*, 2014). Aplicaciones de insecticidas continuos han sido, y sigue siendo en muchas regiones, la técnica más utilizada para la protección de cultivos. Se reportaron casos de resistencia de *P. xylostella* a los insecticidas en el 1950. Hoy en día esta especie muestra resistencia a la mayoría de las clases de insecticidas, incluyendo compuestos recientemente introducidos con nuevos modos de acción (Zhao *et al.*, 2006b).

2.2.6 Resistencia en *Plutella xylostella*

En la India, en 1968 se reportó la primera detección de resistencia en la polilla de la col, *P. xylostella*, para DDT y Parathion, demostrando una extraordinaria habilidad para crear resistencia a varios insecticidas sistémicos, lo que ha causado una pérdida de eficiencia de los métodos de control en los cultivos de crucíferas de ese país (Vargas *et al.*, 2013).

El tiempo de generación corto de la plaga, genética plasticidad, alta fecundidad (Trocza *et al.*, 2012), el uso indiscriminado de insecticidas, y la disponibilidad de los cultivos huéspedes durante todo el año han contribuido al desarrollo de la resistencia para casi todas las clases de insecticidas, incluyendo *Bacillus thuringiensis* (Shelton, 2006).

P. xylostella desarrollaron resistencia a nuevos insecticidas tales como clorantraniliprol, indoxacarb, spinosad y en dos o tres años (Furlong *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2015, la polilla de la col había desarrollado resistencia a aproximadamente 91 compuestos con diferentes modos de acción, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamato, piretroide, análogo de nereistoxina, benzoilurea, *Bacillus thuringiensis*, avermectina, espinosina, fenilpirazol, indoxacarb, diacilhidrazina y diamida (APRD, 2015).

El aspecto más importante en el manejo de resistencia a los insecticidas es una comprensión de los mecanismos que conducen a la resistencia de las plagas a los insecticidas. Anteriormente los informes indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucraba mutaciones de aminoácidos de destino, la sobreexpresión o mutaciones de desintoxicación enzimas, resistencia a la penetración y resistencia de comportamiento (Ahmad *et al.*, 2006; Bass *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayor parte de mecanismos común es la resistencia metabólica, con un aumento en las actividades de estererasas, glutatión S-transferasas, y monooxigenasas del citocromo P450 (Li *et al.*, 2007; Bass *et al.*, 2011).

En *P. xylostella*, niveles elevados de esterasa se correlacionaron con la resistencia a la organofosforados, carbamatos, piretroides, indoxacarb, avermectina, y benzoilurea (Sayyed *et al.*, 2006; Eziah *et al.* 2009; Furlong *et al.*, 2013), y la sobreexpresión de glutatión S-transferasa fue responsable de la resistencia a los organofosforados, piretroides, y diamida, así como indoxacarb (Furlong *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014a). Además, el aumento de las actividades monooxigenasas del citocromo P450 contribuye a la resistencia al carbamato, piretroides, análogo de nereistoxina, y diamida (Bautista *et al.*, 2009; Furlong *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014b).

Por lo tanto, el metabolismo de los insecticidas juega un papel particularmente importante en la resistencia y se puede utilizar para mejorar la toxicidad de los insecticidas por el uso de sinergistas que inhiben las vías metabólicas, o por la mezcla de otros insecticidas que no poseen las mismas vías metabólicas. Además, este

conocimiento puede ser utilizado para la elaboración de los métodos de diagnóstico bioquímicos de detección de la resistencia a los insecticidas (Mohan y Gujar, 2003).

2.3 Resistencia

La resistencia puede ser definida como " un cambio heredable en la sensibilidad de una población de plagas que se refleja en la falta repetida de un producto para lograr el nivel de control cuando se utiliza de acuerdo con la recomendación de la etiqueta para las especies de plagas. Es evidente que , debido a las poblaciones de insectos plaga son por lo general de tamaño grande y se reproducen rápidamente , siempre hay un riesgo de que la resistencia a los insecticidas puede evolucionar , sobre todo cuando los insecticidas se utilizan o usada en exceso (IRAC, 2016).

2.3.1 Tipos de resistencia

- **Resistencia al lugar de acción.** Corresponde al segundo mecanismo más común de resistencia y está referida al cambio en la estructura del sitio o al número de sitios donde el plaguicida causa toxicidad sobre el insecto. Generalmente, los insecticidas actúan en un sitio específico del insecto, habitualmente en el sistema nervioso del insecto (piretroides, organofosforados y carbamatos). El sitio de acción puede ser modificado por razas resistentes impidiendo la acción del insecticida. Como resultado, el insecto no será controlado mediante la aplicación de un plaguicida o sólo se afectarán los insectos más susceptibles (FAO, 2012).
- **Resistencia a la penetración:** Este mecanismo consiste en una baja o lenta absorción del plaguicida debido a la modificación en la cutícula o en el epitelio del tracto digestivo del insecto (Vargas *et al.*, 2008). La resistencia de penetración está usualmente presente con otras formas de resistencia y la penetración reducida intensifica los efectos de aquellos otros mecanismos (FAO, 2012).

- **Resistencia de comportamiento:** Cualquier modificación en la conducta de la plaga que le ayuda a evitar los efectos letales de los plaguicidas. El organismo-plaga es aún sensible al plaguicida y será eliminado de exponerse a una dosis letal del plaguicida. Por consiguiente, aquellos individuos que evaden la exposición logran sobrevivir y reproducirse, lo cual puede conllevar al desarrollo de una cepa o individuo resistente en su comportamiento (FAO, 2012).
- **Resistencia cruzada:** Consiste en la modificación del sitio de acción del insecto en donde la toxina se acopla, causando la pérdida de eficacia del insecticida. Cuando esto sucede los insecticidas químicamente relacionados o que comparten un mismo modo de acción están más propensos a la adquisición de este tipo de resistencia. Se ha observado por ejemplo que la resistencia a la parálisis en insectos se debe a la resistencia cruzada entre los insecticidas DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano] y piretroides que actúan en el mismo lugar del canal de sodio (Vargas *et al.*, 2008).
- **Resistencia múltiple:** La presencia simultánea de varios mecanismos diferentes de resistencia en el mismo organismo. Los distintos mecanismos de resistencia pueden combinarse para aportar resistencia a clases múltiples de plaguicidas. En el campo, la resistencia múltiple y la resistencia cruzada pueden aparecer, pero la primera se desarrolla a partir de casos de selección por separado, mientras que la segunda resulta de los mecanismos de resistencia compartida (FAO, 2012).
- **Resistencia metabólica:** Consiste en la degradación de muchos compuestos nocivos que se encuentran en el ambiente a través de un sistema integrado de enzimas (López, 2008). De esta manera, los insectos que son resistentes pueden detoxificar o destruir la toxina más rápido que los insectos susceptibles (IRAC, 2010). Además, para ser más eficientes, estos sistemas enzimáticos tienen también un espectro más amplio de actividad, o sea ellos pueden degradar muchos plaguicidas diferentes (FAO, 2012).

2.3.2 Determinación de resistencia

Como consecuencia, la resistencia profiere cambios genéticos alterando procesos bioquímicos a nivel individual, se hace notable en una población cuando la proporción de resistencia sea tal, que se refleje en una falla en el control (Devonshire, 1990), convencionalmente se puede detectar la resistencia mediante:

2.3.2.1 Bioensayos

Conocidos también como pruebas de susceptibilidad, son técnicas de laboratorio basado en la dosis-mortalidad (Lagunes y Villanueva, 1994), donde se pretende por medio de un proceso experimental conocer la efectividad biológica del pesticida, determinando la magnitud del estímulo mediante la respuesta del insecto (Hubert, 1980), generalmente involucran comparaciones de la DL_{50} , DL_{90} o de la concentración letal (Twine y Reynolds, 1980).

2.3.2.2 Métodos bioquímicos

Técnicas sensitivas y precisas que proporcionan información de los mecanismos involucrados, pudiendo ser adaptados para detectar y monitorear la resistencia de muchas especies (Brown y Brogdon, 1987); generalmente correlacionan niveles de una enzima o una reacción enzimática específica, pueden ser cualitativos o cuantitativos, generalista o altamente específicos (Lagunes y Villanueva, 1994).

- **Electroforesis:** separa moléculas en dependencia fundamental de su carga, desplazando proteínas bajo influencia de un campo eléctrico (Bisset, 2001), se emplean geles de acrilamida que se polimeriza y forma redes que permiten el paso de proteínas de diferentes pesos moleculares (Ibel *et al.*, 1990).
- **Pruebas moleculares:** incrementa la precisión y reduce la variabilidad asociada a los bioensayos (Devonshire, 1990), se obtienen patrones de banda de ADN que son utilizado como marcadores genéticos para una especie (Ffrench *et al.*, 1994).
- **Pruebas bioquímicas:** son ensayos múltiples que permiten analizar a una población de insectos cuantifican los niveles de una reacción enzimática (Brown

y Brodon, 1987). Desarrollados para cuantificar niveles de Esterasas (Brogdon y Dickinson, 1983), Acetilcolinesterasa (Devonshire y Moores, 1984), Glutation S-Transferasas (Brogdon y Barber, 1990) y oxidasas (Brogdon *et al.*, 1997).

2.4 Enzimas detoxificativas

2.4.1 Esterasas

Las esterasas (CE3.1) son hidrolasas (CE3) que se encuentran distribuidas en diferentes tejidos catalizando reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos (carboxiesterasas), amidas (amidadas) y ésteres de fosfato (fosfatasas). La interacción entre estas enzimas y el plaguicida no solamente da lugar a la acción que ejerce el tóxico en el organismo sino también, a una respuesta de defensa por parte del cuerpo que busca eliminar la sustancia. Dependiendo de la interacción tóxica – esterasa la hidrólisis de los fosfatos se puede abordar a partir de dos mecanismos (Kwong, 2002):

- Hidrólisis catalítica por las fosfotriesterasas (CE3.1.8), conocidas como esterasas-A, porque no son inhibidas por los organofosforados, interaccionan con el grupo funcional sulfhidrilo (-SH) del residuo de cisteína (CYS) del centro activo y forman un enlace P-S que es fácilmente hidrolizado por el agua (H₂O) (Costa, 2006).
- Hidrólisis no catalítica por las carboxilesterasas (CE3.1.1) o esterasas-B porque pueden ser inhibidas por los organofosforados, interaccionan con el radical hidroxilo (-OH) de la serina (SER) en el centro activo, dando lugar a la formación de grupos éster en presencia de radicales libres, que son los responsables del envejecimiento celular (Costa, 2006).

Estos dos grandes grupos enzimáticos (fosfotriesterasas y carboxilesterasas) presentan diferencias en sus reacciones de detoxificación no solamente por la acción que tienen los organofosforados sobre ellas sino también, por la eficiencia de cada una, ya que una sola molécula de fosfotriesterasa puede hidrolizar varias moléculas del organofosforado,

mientras que una sola de carboxilesterasa hidroliza una del tóxico (Sogorb y Vilanova, 2002).

2.4.2 Glutation-S-Transferasa

Las enzimas glutatión-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) son biomarcadores útiles para metales y contaminantes orgánicos que producen estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2001; Ezemonye y Tongo, 2010). GST son una amplia superfamilia de enzimas existentes en organismos procariotas y eucariotas, y están implicados en muchas actividades fisiológicas celulares, tales como detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos, transporte intracelular y biosíntesis de hormonas (Enayati *et al.*, 2005). Las enzimas protegen las células contra los tóxicos, neutralizándolas y haciendo que el producto sea más soluble en agua (Lamoureux y Rueness, 1987; Ezemonye y Tongo, 2010). Por lo tanto, esta enzima ha sido útil como indicador de exposición a plaguicidas (Taysse *et al.*, 1998; Ezemonye y Tongo, 2010). Entre la sustancia endógena, que protege contra el estrés oxidativo, la GST es la enzima de peso intracelular más abundante en la mayoría de los tipos de células, por lo que la alteración en la actividad de GST puede alterar el balance de activación-detoxificación que opera en diferentes tejidos para desintoxicar agentes tóxicos potenciales (Guengerich, 1963; Ezemonye y Tongo, 2010). Según sus localizaciones celulares, las GST se dividen generalmente en las tres categorías principales: citosol, microsomas, y mitocondrias. Hasta la fecha, sólo los dos primeros grupos se han descubierto en los insectos (Jakobsson *et al.*, 1996; Hayes *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2012). Han sido implicadas en la resistencia a varias clases de insecticidas, incluyendo organoclorados, organofosforados y piretroides (Huang *et al.*, 1998; Vontas *et al.*, 2001). En general, los GST actúan conjugando el grupo tiol de Glutatión (GSH; \ gamma - glutamil cisteinil - glicina) a compuestos que poseen un centro electrofílico. Al hacer esto, pueden eliminar los sustratos de una célula haciéndolos más solubles en agua y dirigiéndolos a los transportadores específicos de GSH multidroga (Low *et al.*, 2010). Uno de los insecticidas mejor caracterizados Degradantes de los GST es la actividad de la DDT-deshidroclorina (DDTasa). En este caso, se elimina un átomo de cloro del DDT para generar DDE [1,1-bis- (4-clorofenil) - 2,2-dicloroetano] (Wang *et al.*, 2008).

La acción de los GST sobre los pesticidas organofosforados puede conducir a la activación o desintoxicación (Miyamoto y Mikawa, 2005). GST con GSH liberan, grupos metilo o etilo (por ejemplo, paratión y paratión de metilo) y diaarínatos diaarínicos y diazoxon (Hutson *et al.*, 1972; Shishido *et al.*, 1972; Fujioka y Casida, 2007). Sin embargo, el conocimiento de la fosforilación de GSH es menos definitivo debido a que los metabolitos no se han caracterizado adecuadamente (Fujioka y Casida, 2007).

2.4.3 Oxidasas de función múltiple (MFO)

Son un grupo de enzimas que se encuentran en forma natural en el metabolismo del insecto debido a que, entre otras cosas, están involucradas en los procesos de detoxificación de aleloquímicos en las plantas (Scott y Wen, 2001).

Las MFO se encuentran en el retículo endoplasmático liso en la fracción microsomal de las células, son no específicas y catalizan la reacción siguiente (Bisset, 2002): un átomo de una molécula de oxígeno se incorpora al sustrato, mientras que el otro se reduce a agua; por ello requiere oxígeno (O_2) y nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para su funcionamiento (López, 2008).

Está comprobado que este sistema contiene además una flavoproteína, una ferrodoproteína y un citocromo especializado, el citocromo P450. Las P450 son una familia de homoproteínas de baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos (Bisset, 2002). Se ha observado en algunos insectos una relación directa entre el consumo de compuestos tóxicos de plantas y la inducción del metabolismo de las P450 dando como resultado una mayor detoxificación del xenobiótico (Snyder y Glendinning, 1996).

Este sistema enzimático también se asocia a la detoxificación de numerosos plaguicidas, siendo común verlas implicadas en resistencia cruzada a más de un tipo de insecticida (López, 2008). Otros autores como Bautista *et al.* (2009), señalan que ha existido un

aumento de la resistencia en insectos frente a insecticidas piretroides. La resistencia de *T. absoluta* frente a cartap demostró, que la mayor participación de enzimas implicadas en la detoxificación de este insecticida está dado por las MFO (Siqueira *et al.*, 2001).

2.4.4 Acetilcolinesterasa

Se debe a que existen múltiples formas mutantes de la acetilcolinesterasa en la que el insecticida no puede acoplarse y no ejerce su acción dado el cambio en su conformación. En general, este mecanismo produce un amplio espectro de resistencia a la mayoría de los organofosforados y en mayor medida a los carbamatos (Bisset, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

La determinación de la resistencia se realizó en el Laboratorio de Fitosanidad del Departamento de Ciencias Agropecuarias del Instituto Tecnológico de Roque en Celaya Guanajuato y la cuantificación de enzimas detoxificativas se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo Coahuila.

3.2 Insecticidas a evaluar

Se evaluaron ocho productos químicos de diferente grupo toxicológico, cada producto se evaluó a 8 dosis diferentes (Tabla 1).

Tabla 1. Insecticidas y su grupo toxicológico

No.	Ingrediente activo	Grupo Toxicológico
1	Abamectina	Avermectinas
2	Spinosad	Spinosines
3	Imidacloprid	Neonicotinoides
4	Chlophenapir	Pyrrol
5	Beta Cipermetrina	Piretroide
6	Indoxacarb	Oxadiazinas
7	Fipronil	Fenilpirazoles
8	Lambda cyhalotrina	Piretroide

3.3 Poblaciones de *Plutella xylostella*

Se estudiaron seis poblaciones de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato como son: San Luis de la Paz (L1), San José Iturbide (L2), Valle de Santiago (L3), Abasolo (L4),

Celaya (L5) y Juventino Rosas (L6). Considerando que son las poblaciones con mayor superficie de siembra de brócoli en el estado.

3.4 Colecta de material biológico en campo

La colecta en campo se llevó a cabo de forma manual en lotes comerciales de las poblaciones antes mencionadas. Se colectaron larvas, pupas y adultos de *P. xylostella*, las cuales se colocaron en contenedores de plástico y se metieron en hieleras para su traslado a cajas entomológicas (60 cm × 40 cm × 40 cm) en invernadero para la eliminación de entomopatógenos y parasitoides que pudieran estar presentes. Los adultos se alimentaron con 50 mL de agua azucarada a 16%. Con la finalidad de asegurar el apareamiento y la oviposición, la alimentación de las larvas se realizó con plantas de brócoli de 40 días de edad. Los individuos de cada población se reprodujeron hasta F3 y así tener individuos suficientes para su posterior estudio. Como población susceptible se utilizaron individuos proporcionados, por el Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), reproducidos desde 1996 sin presión de selección a insecticidas.

3.5 Bioensayos

Para la evaluación de los insecticidas se empleó el método de inmersión (IRAC, 2017), utilizando larvas de *P. xylostella* de tercer ínstar. El cual consistió en recortar círculos de 6 cm de diámetro de una hoja de brócoli, se sumergieron en las soluciones en estudio por un tiempo de 10 segundos y se dejaron secar en papel absorbente durante una hora para eliminar excesos, posteriormente fueron colocadas en cajas petri provistas de algodón saturado con agua y se transfirieron 10 larvas de *P. xylostella* por cada círculo de hoja, mediante un pincel de pelo de camello 000 y se colocaron en una cámara climática a 27 °C, 50% de Humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad. Los conteos de mortalidad de las larvas se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h a partir del inicio del experimento. Como criterio de muerte los individuos se les realizó a un estímulo con un pincel en la parte dorsal, todo aquel que no respondía a dicho estímulo era

considerado como muerto. Se utilizó un diseño experimental completo al azar con 8 tratamientos y un testigo blanco el cual fue agua más adherente, con 4 repeticiones cada uno.

3.6 Pruebas bioquímicas

3.6.1 Determinación de proteína a larvas de *Plutella xylostella*

La determinación y cuantificación de proteína contenida en tejidos es la base para la realización de las pruebas bioquímicas por lo que se determinó la cantidad de larvas por muestra usando el método de Bradford (1984), con el kit-11 de Bio- Rad y ASB (albumina sérica bovina) como proteína de referencia, Se utilizaron larvas de tercer estadio colocando ocho muestras en tubos eppendorf con 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.50, 1.75 y 2 larvas de *P. xylostella* con 4 repeticiones, se agregaron 500 μL de solución Buffer (KPO_4) a 0.05 M y un pH de 7.2, se trituraron con ayuda de un macerador de tejidos y se aforaron a 1 mL para emplearlo como fuente de enzima.

En una microplaca de 96 pozos se agregó en cada cavidad 20 μL de homogenato posteriormente se adicionaron 80 μL de solución (Buffer KPO_4) más 200 μL de colorante diluido, esto se realizó por triplicado para cada repetición. Se tomaron lecturas de absorbancia en un lector de microplacas (BioTek El x 800) utilizando el filtro de 630 nm y se calcularon los valores de $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína comprendidos en el rango de 80 a 120 μL .

3.6.2 Preparación de homogenatos

Una vez determinada la cantidad de muestra en relación a la proteína, 1.75 larvas = 100 μL de proteína se homogenizó en 500 mL de solución Buffer (KPO_4) y posteriormente se aforo a 1 mL (Brogdon, 1984).

3.6.3 Determinación de α y β -esterasas

Preparación de reactivos: Se disolvieron 5.6 mg de α ó β -naphthyl acetate en 2 mL de acetona y se adicionaron 8 mL de solución Buffer (KPO_4). Como colorante se utilizó Fast-blue, pesando 10 mg del mismo y se diluyeron en 10 mL de H_2O destilada.

Lectura de absorbancias: En cada pozo de la microplaca, se colocaron 100 μ L del homogenato más 100 μ L de acetato de α ó β -naftil, se dejó incubar por 10 minutos, pasado el tiempo, se agregaron 100 μ L de Fast-blue, estos pasos se realizaron por triplicado para cada repetición de las siete poblaciones en estudio, se dejaron incubar durante 2 minutos y se corrió en el lector de placas usando un filtro de 540 nm (Brogdon y Dickinson, 1983).

3.6.4 Determinación de Glutathion-S-transferasa

Preparación de reactivos: Se disolvieron 0.0122 g de reduce glutati3n en 20 mL de Buffer (KPO_4). Para CDNB (1 - cloro- 2,4 dinitrobenzeno) se disolvieron 4 mg de CDNB en 2 mL de acetona + 18 mL de solución Buffer (KPO_4).

Lectura de absorbancias: Se colocaron 100 μ L del homogenato, se agregaron 100 μ L de Reduced glutation, y 100 μ L de CDNB, estos pasos se realizaron por triplicado para cada repetici3n de las siete poblaciones en estudio, se corrió inmediatamente (T_0) en el lector de placas usando un filtro de 340 nm, se volvi3 a correr transcurridos 5 minutos (T_5). Para el an3lisis estadística a las lecturas de absorbancia se les saco la diferencia entre ambos tiempos (T_5-T_0) y los n3meros negativos se consideraron como 0 (Brogdon y Barber, 1990).

3.6.5 Determinaci3n de acetilcolinesterasa

Preparaci3n de reactivos: Se disolvieron 70 mg de acetilcolina - yodisada en 10 mL de acetona y se aforo con 90 mL de soluci3n Buffer (KPO_4). Para el DTNB (Acido- Ditio-Bis-Nitrobenozoico) se prepararon 13 mg de DTNB y se le agregaron 10 mL de soluci3n Buffer (KPO_4).

Lectura de absorbancias: Se colocaron 100 μL del homogenato, se agregaron 100 μL de acetilcolina-yodisada y 100 μL de DNTB, estos pasos se realizan por triplicado para cada repetición de las siete poblaciones en estudio, se corrieron inmediatamente (T_0) en el lector de placas usando un filtro de 414 nm, se volvió a correr transcurridos 10 minutos (T_{10}). Para el análisis estadístico las lecturas de absorbancia se les saco la diferencia entre ambos tiempos ($T_{10}-T_0$) y los números negativos se consideraron como 0 (Brogdon, 1988).

3.6.7 Determinación de oxidasas

Preparación de reactivos: Buffer de Acetato de sodio (0.25 M): se disolvió 3.32g 3M de sodio acetato en 37.35 mL de H_2O destilada, después se aforó a 40 mL, ajustando el pH 5. Para el TMBZ (Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride), se disolvieron 20 mg de TMBZ en 10 mL de alcohol, y se le agrego 30 mL de solución Buffer acetato de sodio 0.25 M.

Lectura de absorbancias: Se colocaron 100 μL del homogenato, se agregaron 200 μL de TMBZ y se adiciono una gota (25 μL) de agua oxigenada (H_2O_2) estos pasos se realizaron por triplicado para cada repetición de las siete poblaciones en estudio, se dejó incubar por 5 minutos, pasado el tiempo se corrió en el lector de placas usando un filtro de 620 nm (Brogdon *et al.*, 1997).

3.7 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de los bioensayos se realizó una corrección de mortalidad con la fórmula propuesta Abbott (1925). Los resultados de la corrección de mortalidad se sometieron a un Análisis Probit (Finney, 1971) para obtener la curva de respuesta concentración-mortalidad, utilizando el programa SAS system for Windows ver 9.0 (SAS, 2002)

Con las absorbancias de cada enzima se realizó una distribución de frecuencias y se estableció el umbral de resistencia. La proporción de resistencia se estimó mediante el número de medias que excedía dicho umbral y se clasificaron según Montella *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones como: “inalterado” de 0-5%, “incipientemente alterado” 6-30%, “moderadamente alterado” de 31-50%, “alterado” de 51-75%, “muy alterado” por arriba de 76%. Por último, se realizó un ANVA, cuando este nos indicó que había diferencia significativa entre los tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($P=0,05$), para la separación de las medias, R versión 3.3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la respuesta de la línea susceptible (LS) de *P. xylostella* en relación a cinco insecticidas de diferente grupo toxicológico. La CL₅₀ fue de 43.24, 10.54, 289.45, 2.73, 0.09, 10.10, 3.38 y 0.72 ppm para los insecticidas cipermetrina, imidacloprid, lambda cyhalotrina, spinosad, fipronil, indoxacarb, chlophenapyr y abamectina respectivamente. La CL₅₀ para cipermetrina (43.24 ppm) en este estudio es superior a la reportada por Shao *et al.* (2013) en otra línea susceptible donde obtuvo un valor de 3.55 ppm. En lo que se refiere al resultado de imidacloprid (1054 ppm) es 219.5 veces mayor a lo reportado por Ninsin (2004) con otro insecticida neonicotinoide (acetamiprid) en la línea susceptible KOBII-NS strain. Para lambda cyhalotrina se reporto una CL₅₀ de 289.45 ppm, este resultado es inferior al reportado por Bujanos *et al.* (2003) en otra línea susceptible donde presento una CL₅₀ de 850 ppm, por su parte Balasubramani *et al.* (2008) una CL₅₀ de 10 ppm para línea susceptible Lab-UK. En relación al spinosad el valor de 2.73 ppm fue superior al comportamiento de otras líneas susceptibles, Barrera *et al.* (2006) reporto un resultado de 0.004 ppm, mientras que Shao *et al.* (2013) obtuvo una CL₅₀ de 0.12 ppm. Fipronil presento un resultado de 0.09 ppm el cual es 2.2 veces más alto en comparación a otra línea susceptible evaluada por Barrera *et al.* (2006). Para este mismo insecticida Mohan y Gujar (2003) reporto una CL₅₀ de 0.22 ppm en la línea susceptible IARI 17-65. En relación al insecticida indoxacarb se presentó una CL₅₀ de 10.10 ppm la cual supero comportamiento de otras líneas susceptibles, Barrera *et al.* (2006), Shao *et al.* (2013) y Santos *et al.* (2011) reportaron valores de 0.46, 0.52 y 0.2 ppm respectivamente. Chlophenapyr presento un resultado de 3.38 ppm superando 8.4 veces el valor reportado por Shao *et al.* (2013). En relación a abamectina la CL₅₀ 0.72 ppm fue superior en comparación de otras líneas susceptibles, Shao *et al.* (2013) y Santos *et al.* (2011) reportaron resultados de 0.02 ppm y 0.01 ppm respectivamente.

Tabla 2. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea susceptible (LS) de larvas de *Plutella xylostella*.

Insecticida	N	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	Pr>
Cipermetrina	30	43.24	26.771 - 78.582	143.410	<.0001
Imidacloprid	30	1054	962.329 - 1147	3677	<.0001
Lambda cyalotrina	30	289.45	246.824 - 334.398	605.853	<.0001
Spinosad	30	2.73	1.436 - 4.712	24.395	<.0001
Fipronil	30	0.09	0.040 - 0.198	0.643	<.0001
Indoxacarb	30	10.10	4.393 - 21.009	237.203	<.0001
Chlophenapyr	30	3.38	2.516 - 4.309	10.938	<.0001
Abamectina	30	0.72	0.228 - 1.885	10.446	<.0001

CL=Concentración letal; n= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

En las tablas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos sobre las líneas de campo de *P. xylostella* colectadas en el estado de Guanajuato. Para el insecticida cipermetrina la L1 y L3 presentaron las CL₅₀ más altas con valores de 528.22 y 491.79 ppm respectivamente, mientras que la población L4 reportó la CL₅₀ más baja (245.48 ppm). Estos resultados son superiores a los presentados por Zhang *et al.* (2016) en un estudio realizado sobre diferentes líneas de campo con CL₅₀ de 3.30 a 43.51 ppm. Por otro lado la población L2 y L4 obtuvieron los resultados más altos para imidacloprid con 1,227 y 1,156 ppm respectivamente, por otro lado la L5 presentó la CL₅₀ más baja (411.10 ppm). Al respecto Ninsin (2004) reportó una CL₅₀ de 3,720 ppm para otro insecticida del mismo grupo toxicológico (acetamiprid). Para lambda cyhalotrina la CL₅₀ más alta fue 457.62 ppm (L5) y la más baja 331.74 ppm (L3), estos resultados son similares a los reportados por Bujanos *et al.* (2003) que determinó CL₅₀ de 430 ppm en una línea de campo del estado de Guanajuato, lo que significa que no se ha presentado una disminución en la toxicidad de lambda cyhalotrina en el estado, por su parte Balasubramani *et al.* (2008) reportó una CL₅₀ de 1,070 ppm. Lo que se refiere a spinosad la CL₅₀ varió entre las poblaciones en estudio de 5.17 ppm (L5) a 1.50 ppm (L4), estos valores son similares a los reportados por Zhang *et al.* (2016) en diferentes líneas de campo de *P. xylostella* con un valor máximo de 2.57 ppm, por su parte Barrera *et al.* (2006) obtuvo resultados inferiores a los de esta investigación con una variación de 0.03 ppm a 0.05 ppm en poblaciones de campo del estado del Guanajuato, lo que

significa una disminución de la eficacia de este insecticida para la zona en estudio. Sin embargo Zhao *et al.* (2002) reporta resultados superiores para líneas de campo que va de 44.6 ppm a 837 ppm. En relación al fipronil las poblaciones L1, L2, L3 y L4 se comportaron de manera similar con una CL₅₀ que va de 0.11 ppm a 0.20 ppm, mientras que las poblaciones L5 y L6 presentaron los resultados mas altos con una CL₅₀ de 0.48 y 0.40 ppm respectivamente. Mohan y Gujar (2003) en un estudio realizado en diferentes líneas de campos reportaron una CL₅₀ que va de 1.83 ppm a 2.44 ppm, por su parte Barrera *et al.* (2006) reporto resultados inferiores (0.03 ppm) para diferentes líneas campo del estado de Guanajuato lo cual demuestra que a través del tiempo se ha incrementado la resistencia de *P. xylostella* a este insecticida en 16 veces. La L3 reporto la CL₅₀ mas alta (43.99 ppm) para el insecticida indoxacarb, mientras L6 presento el valor mas bajo con 11.39 ppm, estos resultados son menores a los obtenidos por Nehare *et al.* (2009) con una CL₅₀ que va de 50.83 ppm a 167.82 ppm, por su parte Santos *et al.* (2011) y Barrera *et al.* (2006) obtuvieron CL₅₀ inferiores a las reportadas en este estudio que van de 0.2 ppm a 7.6 ppm y 0.56 ppm a 0.77 ppm respectivamente. De acuerdo a los resultados reportados por Barrera *et al.* (2006) se puede observar un aumento en la resistecia de *P. xylostella* de 57.12 veces para indoxacarb en la zona del estado de Guanajuato. En relación a chlophenpyr las poblaciones de la L1 a la L5 se comportarán de manera similar con CL₅₀ de 4.10 ppm a 4.75 ppm, mientras que la L6 reporto la CL₅₀ mas alta (7.33 ppm). Estos resultados son similares a los reportados por Zhang *et al.* (2016) en un estudio sobre diferentes líneas de campo donde determino una CL₅₀ maxima de 5.38 ppm para este insecticida. Los resultados de la CL₅₀ para abamentina presentaron una variación de 0.69 ppm a 2.44 ppm, presentado una similitud con el comportamiento de otras líneas de campo evaluadas por Zhang *et al.* (2016) y Oliveira *et al.* (2011), donde reportaron CL₅₀ de 0.48 ppm a 1.90 ppm y 1.83 ppm a 2.61 ppm respectivamente. Por otro lado Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado en líneas de campo del estado de Guanajuato reporto CL₅₀ de 0.005 ppm a 0.008 ppm para el insecticida benzoato de enamectina, por lo que se puede considerar que existe una disminución en la toxicidad para insecticidas pertenecientes al grupo avermectinas en el estado de Guanajuato.

En las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados de la proporción de resistencia de las poblaciones en estudio en función a la línea susceptible (LS). Esta proporción de resistencia, nos permite discriminar poblaciones con problemas de resistencia, considerando resistentes aquellas que presentan un factor de 10 veces al comparar las líneas de campo y la línea susceptible. Para la población L1 se puede observar que se presentan problemas de resistencia con el insecticida cipermetrina con una proporción de resistencia de 12.2 veces en relación a la LS, mientras que el resto de los insecticidas evaluados presentan resultados por debajo de 3 veces en relación a la LS (Tabla 3), por lo que se considera que *P. xylostella* es vulnerable a ellos y se recomiendan para su control en esta zona del estado de Guanajuato.

Tabla 3. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo San Luis de la Paz (L1) de larvas de *Pluetlla xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Insecticida	N	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	P.R₅₀
Cipermetrina	30	528.226	433.099 - 664.736	1099	12.2
Imidacloprid	30	1019	895.230 - 1149	5881	0.97
Lambda cyhalotrina	30	414.07	335.117 - 524.208	907.786	1.4
Spinosad	30	3.221	1.257 - 7.199	26.344	1.2
Fipronil	30	0.282	0.155 - 0.521	3.083	2.9
Indoxacarb	30	18.51	8.816 - 35.462	267.672	1.8
Chlophenapyr	30	4.754	4.133 - 5.419	20.066	1.4
Abamectina	30	1.812	0.902 - 4.231	45.753	2.5

CL=Concentración letal; n= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

En el caso de L2 ningún insecticida presenta problemas de resistencia, siendo cipermetrina quien reportó el factor de resistencia más elevado con 7.3 veces en relación a la LS, mientras que el resto de los insecticidas en estudio presentan valores por debajo de 2 veces (Tabla 4). Considerando a esta *P. xylostella* como susceptible a los insecticidas en estudio en la zona de San José Iturbide (L2).

Tabla 4. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo San José Iturbide (L2) de larvas de *Pluetlla xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Insecticida	N	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	P.R₅₀
Cipermetrina	30	317.552	226.632 - 452.476	649.099	7.3
Imidacloprid	30	1227	882.131 - 1620	4849	1.2
Lambda cyhalotrina	30	401.841	329.669 - 494.178	790.410	1.4
Spinosad	30	3.085	1.328 - 6.217	24.811	1.1
Fipronil	30	0.111	0.040 - 0.272	0.910	1.1
Indoxacarb	30	17.231	12.812 - 22.952	371.463	1.7
Chlophenapyr	30	4.595	2.833 - 6.789	20.013	1.4
Abamectina	30	1.386	0.564 - 4.119	73.253	1.9

CL=Concentración letal; n= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

En la Tabla 5 se pueden observar los factores de resistencia para la L3, donde cipermetrina reporto el valor mas alto con 11.4 veces en relación a la LS, por lo que se considera que esta línea de campo presenta problemas de resistencia hacia este insecticida, en tanto que el resto de los insecticidas evaluados reportan valores inferiores a 4.5 veces en relación a la LS, indicando que *P. xylostella* presenta susceptibilidad a ellos y se recomiendan para su control en esta zona del estado de Guanajuato.

Tabla 5. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Valle de Santiago (L3) de larvas de *Pluetlla xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Insecticida	n	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	P.R₅₀
Cipermetrina	30	491.797	368.859 - 701.189	1056	11.4
Imidacloprid	30	1054	962.329 - 1147	2790	1.0
Lambda cyhalotrina	30	331.745	209.277 - 496.823	1075	1.1
Spinosad	30	2.506	1.965 - 3.148	34.591	0.9
Fipronil	30	0.209	0.155 - 0.282	6.552	2.1
Indoxacarb	30	43.991	22.649 - 86.548	468.150	4.4
Chlophenapyr	30	4.106	1.793 - 7.134	19.733	1.2
Abamectina	30	1.151	0.450 - 2.821	15.344	1.6

CL=Concentración letal; n= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

Los resultados obtenidos para L4 no reportan resistencia para los insecticidas en estudio, siendo cipermetrina quien presento el factor de resistencia más alto (5.7 veces) seguido

de abamectina con una proporción de resistencia de 3.4 veces, mientras que el resto de los insecticidas evaluados reportaron un factor de resistencia por de bajo de 1.6 veces en relación a la LS. Por lo que se considera que *P. xylostella* en la zona de Abasolo (L4) es susceptible a los insecticidas evaluados (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Abasolo (L4) de larvas de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Insecticida	n	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	P.R₅₀
Cipermetrina	30	245.489	219.024 - 273.324	822.396	5.7
Imidacloprid	30	1156	1043 - 1279	3749	1.1
Lambda cyhalotrina	30	382.204	298.857 - 507.508	965.839	1.3
Spinosad	30	1.508	0.533 - 3.027	13.910	0.6
Fipronil	30	0.154	0.091 - 0.253	1.406	1.6
Indoxacarb	30	14.595	7.074 - 28.519	428.855	1.4
Chlophenapyr	30	4.780	3.961 - 5.683	37.102	1.4
Abamectina	30	2.445	2.010 - 3.014	22.477	3.4

CL=Concentración letal; n= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

En el caso de L5 cipermetrina presento el factor de resistencia mas alto (9.0 veces) el cual no se considera aun como resistente, pero se recomienda disminuir el uso de este insecticida para la zona perteneciente a L5 para evitar el desarrollo de resistencia a cipermetrina. Por otro lado el resto de los insecticidas reportan una baja proporción de resistencia que va de 0.4 a 4.9 veces (Tabla 7), considerándose como efectivos para el control de *P. xylostella*.

Tabla 7. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Celaya (L5) de larvas de *Pluetlla xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Insecticida	n	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	P.R₅₀
Cipermetrina	30	388.440	330.844 - 464.440	822.643	9.0
Imidacloprid	30	411.108	367.549 - 457.749	1413	0.4
Lambda cyhalotrina	30	457.620	425.628 - 494.524	13.707	1.6
Spinosad	30	5.175	3.340 - 8.557	22.792	1.9
Fipronil	30	0.482	0.383 - 0.615	5.693	4.9
Indoxacarb	30	36.423	26.593 - 50.774	1151	3.6
Chlophenapyr	30	5.678	1.762 - 9.465	22.792	1.7
Abamectina	30	0.698	0.320 - 1.383	13.707	1.0

CL=Concentración letal; n= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

En la Tabla 8 se pueden observar los factores de resistencia para la L6, donde cipermetrina reporto el valor mas alto con 9.7 veces en relación a la LS, el cual no se considera aun como resistente, pero se recomienda disminuir el numero de aplicaciones de este insecticida o la rotación con otros insecticidas de diferente grupo toxicológico para evitar el desarrollo de resistencia a cipermetrina en la zona en estudio. Para el resto de los insecticidas evaluados reportan valores inferiores 4.2 veces en relación a la LS por lo que se pueden considerar efectivos para el control de *P. xylostella*.

Tabla 8. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la población de campo Juventino Rosas (L6) de larvas de *Pluetlla xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Insecticida	n	CL₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL₉₀ (ppm)	P.R₅₀
Cipermetrina	30	420.081	345.993 - 524.389	783.729	9.7
Imidacloprid	30	1054	962.329 - 1147	2790	1
Lambda cyhalotrina	30	375.327	319.441 - 445.161	45.145	1.3
Spinosad	30	4.352	3.535 - 5.376	834.953	1.6
Fipronil	30	0.407	0.226 - 0.787	153.858	4.2
Indoxacarb	30	11.396	5.177 - 21.927	6.426	1.1
Chlophenapyr	30	7.339	5.338 - 10.176	32.710	2.2
Abamectina	30	0.779	0.464 - 1.262	17.795	1.1

CL=Concentración letal; N= Número de individuos; LFI=Límite fiducial inferior; LFS=Límite fiducial superior; P.R=Proporción de resistencia.

Jiang *et al.* (2015) reportan factores de resistencia mayores a 25.1 veces en diferentes líneas de campo para cipermetrina, por su parte Zhang *et al.* (2016) determinaron una

resistencia superior a 69.76 veces en relación a su línea susceptible para este mismo insecticida, mientras que Bujanos *et al.* (2003) no reportaron resistencia (8 veces) para una línea de campo de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato, estos resultados difieren a lo reportado en este estudio, donde se encontró resistencia a cipermetrina en las líneas L1 (12.2 veces) y L3 (11.4 veces), mientras que el resto de las líneas evaluadas presentan una tendencia a generar resistencia, demostrando que ha habido una pérdida de toxicidad de cipermetrina en el estado de Guanajuato. Ninsin, (2004) reporto una resistencia de 77.3 veces para un insecticida neonicotinoide (Actamiprid), lo cual difiere a lo encontrado en esta investigación donde también se evaluo un insecticida del mismo grupo toxicológico (imidacloprid) y se reporto una proporción de resistencia máxima de 1.2 (L2) veces. Balasubramani *et al.* (2008) reportaron un factor de resistencia (107 veces) en lambda cyhalotrina para líneas de campo de *P. xylostella*, por otro lado Bujanos *et al.* (2003) en un estudio sobre una línea de campo del estado de Guanajuato no reportaron resistencia (1 veces) de este insecticida en *P. xylostella*, lo cual coincide a los resultados de esta investigación donde no se muestran problemas de resistencia con un valor máximo de 1.6 (L5). En relación a spinosad Jiang *et al.* (2015) y Zhang *et al.* (2015) reportaron resistencia en diferentes líneas de campo de *P. xylostella* con valores máximos de resistencia de 34.4 y 21.4 veces respectivamente. Por su parte Barrera *et al.* (2006) obtuvieron factores de resistencia de 12.5 y 10 veces para líneas de campo del estado de Guanajuato, superando lo reportado en este estudio donde la resistencia mas alta para spinosad se presento en L5 (1.9 veces), significando una disminución en la resistencia de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato a spinosad, lo cual se les puede atribuir al buen manejo y rotación de este insecticida. Sayyed *et al.* (2005) y Barrera *et al.* (2006) no reportaron resistencia de *P. xylostella* al producto fipronil con proporciones de resistencia de 1 y 0.7 veces, coincidiendo con los resultados de esta investigación donde no se reporta resistencia a fipronil y se presenta un valor máximo de 4.9 veces (L5). Para el insecticida indoxacarb Nehare *et al.* (2010) reporto una resistencia de 31.3 veces en líneas de campo de *P. xylostella*, por su parte Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado sobre diferentes poblaciones de campo de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato no reporto problemas de resistencia (1.7 veces), lo cual coincide con lo encontrado en esta investigación donde no se reporta problemas de resistencia un

valor máxima de 4.9 veces (L5), pero se puede apreciar una pequeña disminución en la toxicidad de este insecticida. En relación al insecticida chlorfenpir Jiang *et al.* (2016) determinaron factores de resistencia en diferentes líneas de campo de *P. xylostella* que van de 2.9 a 260.1 veces, mientras que Zhang *et al.* (2015) reportaron una resistencia de 13.4 veces, estos resultados difieren a los presentados en este estudio donde se reporta un valor de resistencia máximo de 2.2 veces. Para el producto abamectina Zhang *et al.* (2016) y Jiang *et al.* (2015) reportaron resistencia en diferentes líneas de campo de *P. xylostella* con valores de 95.15 y 31.4 veces respectivamente, mientras que Santos *et al.* (2011) y Oliveira *et al.* (2011) no reportaron resistencia de *P. xylostella* para este insecticida con proporciones de resistencia de 1.4 y 3.3 veces respectivamente, por su parte Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado en diferentes líneas de campo de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato reportó una resistencia de 2.0 veces para el benzoato de abamectina, de acuerdo a lo reportado en esta investigación demuestra que no hay aumento en la resistencia de *P. xylostella* para insecticidas del grupo toxicológico avermectinas en las zonas en estudio.

Pruebas bioquímicas

Para la determinación de los niveles enzimáticos primeramente se calculó la cantidad de proteína contenida en larvas de *P. xylostella* y así obtener el número de insectos por muestra, de 0.25 a 1 larva su contenido de proteína fue por debajo del intervalo requerido (80 a 120µg), mientras que de 1.25 a 2 larvas están dentro del límite permitido; seleccionando 1.75 larvas como número de insectos para la fuente de enzima (Figura 1). Respecto a la fuente de enzima, Bradford (1976) menciona que valores fuera del rango no son confiables para la cuantificación de proteína en tejidos. En tanto que Dary *et al.* (1990) reporta que existe estrecha relación entre tamaño de muestra y cantidad de proteína, por lo que se pueden presentar diferencias en los resultados obtenidos.

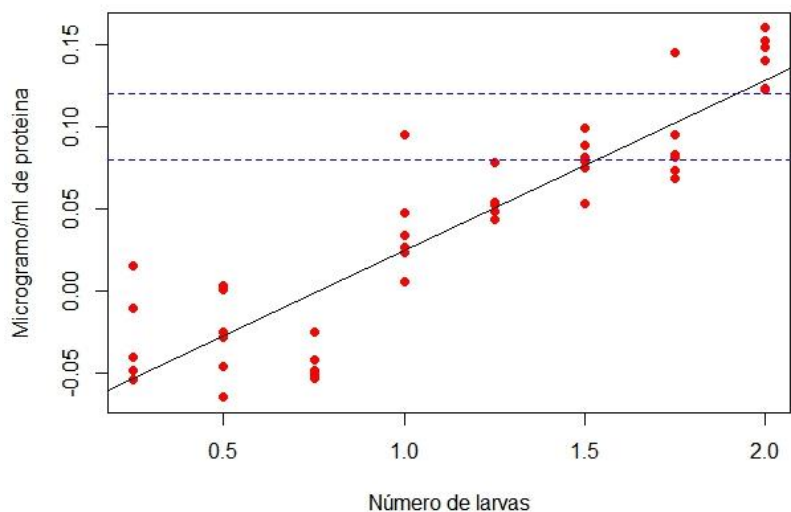


Figura 1. Absorbancias de proteína en homogenatos de *Plutella xylostella* en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2).

Posteriormente se estableció un umbral de resistencia en base a la línea susceptible y se determinó la proporción de la resistencia en cada población para las enzimas y se clasificaron según Montella *et al.* (2007). En el Tabla 9 se puede observar que en la misma población varía la proporción de resistencia según la enzima estudiada y todas las enzimas presentan variación en su cuantificación, ya que se presentan de manera heterogénea, siendo α -Est y ATch las enzimas que presentaron los porcentajes de resistencia más elevados con una media de 74.04 y 70.36 % respectivamente; estos resultados son superiores a los reportados por Flores *et al.* (2006) determinaron frecuencias de resistencia de 100% en mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus) a causa de α -Est. Por su parte Landeros *et al.* (2010) reportó una frecuencia de resistencia de 12.2 % a causa del ATch en *Tetranychus urticae* Koch. GST reportó el menor porcentaje de resistencia con un valor medio de 14.81%, lo cual difiere a lo observado por Chávez *et al.* (2013) en un estudio realizado sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc), donde reporta 1.5% de resistencia generada por esta enzima.

Para β -esterasas la población que corresponde a Juventino Rosas fue la que presentó mayor porcentaje de resistencia con un valor del 66.66 %, clasificándose como

“Alterado”, en tanto que, San Luis de la Paz, San José Iturbide y Valle de Santiago reportaron 0 % de resistencia para esta enzima con una clasificación de “Inalterado”. Celaya y Valle de Santiago expresaron un 100 % de resistencia para α -Est, con una clasificación de “Muy alterado”, mientras que para Juventino Rosas se observó la proporción de resistencia más baja con un 44.44% y una clasificación de “Moderadamente alterado” (Tabla 9). Por su parte Sayyed y Wright, (2006) demostraron que las Est están implicadas en la resistencia de *P. xylostella* al indoxacarb, lo cual era inesperado ya que el indoxacarb es un pro-insecticida que se sabe que se activa a través de la hidrólisis por esterasas (Wing *et al.*, 2000).

En lo que se refiera a GST, San José Iturbide reporto el porcentaje más elevado de resistencia con un 55.55 %, clasificándose como “Alterado”, por su parte, las poblaciones de Valle de Santiago Abasolo y San Luis de la Paz presentaron un porcentaje de resistencia nulo y una clasificación “Inalterada” (Tabla 9). Wu *et al.* (2004) menciona que GST juega un papel importante como mecanismo de resistencia en Lepidopteros ya que el alto contenido de esta enzima ayuda a la desintoxicación de organofosforados, piretroides, y diamidas, así como indoxacarb (Hu *et al.*, 2014a).

La población que corresponde a San Luis de la Paz expreso un 100 % de resistencia a causa de la enzima ATch y una clasificación de “Muy alterado”, en tanto que, para San José Iturbide se observó el porcentaje más bajo para esta enzima con un valor de 44.44 % y una clasificación de “Moderadamente alterado” (Tabla 9). Wang *et al.* (2004) menciona que el principal mecanismo de resistencia en muchos insectos es la alteración de la ATch que se observa como una insensibilidad de la misma enzima, debido a que existen múltiples formas mutantes de la ATch en la que el insecticida no puede acoplarse y no ejerce su acción dado el cambio en su conformación (Bisset, 2002).

Para oxidasas la población que corresponde a San Luis de la Paz reportó el porcentaje de resistencia más alto con un 100 % y una clasificación “Muy alterado”, por otro lado las poblaciones de Celaya y San José Iturbide presentaron una nula de resistencia a causa de esta enzima (Tabla 9). Pimentel *et al.* (2008) mencionan que las oxidasas juegan un

papel fundamental en la detoxificación de diversos plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados.

Tabla 9. Proporción de resistencia en diferentes poblaciones de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato.

Población	% de Resistencia				
	β -Est	α -Est	GST	ATCh	Oxid
Celaya	33.333 ^c	100.000 ^e	11.111 ^b	77.777 ^c	0.000 ^a
V. de Santiago	0.000 ^a	100.000 ^e	0.000 ^a	88.880 ^e	44.444 ^c
Abasolo	11.111 ^b	55.555 ^d	0.000 ^a	55.555 ^d	22.222 ^b
Sn. Luis de la Paz	0.000 ^a	66.666 ^d	0.000 ^a	100.000 ^e	100.000 ^e
Juventino Rosas	66.666 ^d	44.444 ^c	22.222 ^b	55.555 ^d	77.777 ^c
Sn. José Iturbide	0.000 ^a	77.777 ^b	55.555 ^d	44.444 ^c	0.000 ^a
X=	18.518	74.074	14.815	70.369	40.741

Clasificación según Montella *et al.* (2007): ^aInalterado, ^bIncipientemente alterado, ^cModeradamente alterado, ^dAlterado, ^eMuy alterado.

En el Tabla 10 se puede observar el análisis de varianza del contenido β -esterasas en las 6 poblaciones de *Plutella xylostella*, donde se reporta un coeficiente de variación de 16.75 %, lo que indica que la producción de β -Esterasas en la zona del estado de Guanajuato se presenta de una forma homogénea, dado a que se encontró muy poca variabilidad entre dichas poblaciones.

Tabla 10. Análisis de varianza del contenido β -esterasas en las 6 poblaciones de *Plutella xylostella* en el estado de Guanajuato.

FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
Trat	6	7.187	1.1979	9.708	2.58 e-07***
Error	56	6.91	0.1234		
Total	62	14.097	1.3213		
C.V.=	16.75 %				

Por su parte el coeficiente de variación de α -esterasas es mayor en comparación al de β -Esterasas con un valor de 28.63 % indicando una mayor variabilidad de los individuos para la producción de α -esterasas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza del contenido α -esterasas de en las 6 poblaciones de *Plutella xylostella* en el estado de Guanajuato.

FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
Trat	6	10.52	1.753	5.541	0.000146***
Error	56	17.72	0.3164		
Total	62	28.24	2.0694		
C.V.=	28.63 %				

β -Est presentó una mayor expresión para Juventino Rosas con una media de 2.805, en tanto que San Luis de la Paz reporto el valor más bajo para esta enzima con una absorbancia media de 1.722. Mientras que α -Est se observó su mayor contenido en Celaya con valor medio de 2.589; la Línea Susceptible expreso la absorbancia menor para α -Est con una media de 1.401 (Tabla 12). En *P. xylostella*, niveles elevados de Est se correlacionan con la resistencia a organofosforados, carbamatos, piretroides, indoxacarb, avermectina, y benzoilurea (Sayyed y Wright, 2006; Eziah *et al.*, 2009; Furlong *et al.*, 2013).

Tabla 12. Comparación de medias del contenido de β y α -esterasas en 6 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato y una línea susceptible.

Población	n	β -Est	α -Est
		Media \pm SD	Media \pm SD
Línea Susceptible	12	1.847 \pm 0.516 bc	1.401 \pm 0.124 c
Celaya	12	2.337 \pm 0.295 ab	2.589 \pm 0.142 a
V. de Santiago	12	1.995 \pm 0.282 bc	2.068 \pm 0.075 abc
Abasolo	12	1.974 \pm 0.408 bc	1.582 \pm 0.264 bc
Sn. Luis de la Paz	12	1.722 \pm 0.018 c	1.625 \pm 0.093 bc
Juventino Rosas	12	2.805 \pm 0.355 a	2.109 \pm 1.092 abc
Sn. José Iturbide	12	1.988 \pm 0.3680 c	2.374 \pm 0.949 ab

n= Numero de muestras; SD= Desviación estándar

En el Tabla 13, encontramos un coeficiente de variación muy elevado de 57.7 %, indicando que dentro de cada población el contenido de Glutatión S-Transferasas es muy heterogénea resultado de la variabilidad de los individuos para la producción de la enzima en mención.

Tabla 13. Análisis de varianza del contenido Glutation-S-Transferasas de en las 6 poblaciones de *Plutella xylostella* en el estado de Guanajuato.

FV	GL	SC	CM	F value	Pr>F
Trat	6	0.0032	0.00054	12.28	9.15e-09***
Error	56	0.0025	0.00004		
Total	62	0.0057	0.00058		
C.V.=	57.7	%			

San José Iturbide presentó el valor máximo de absorbancias para GST con una media de 0.024, por su parte Abasolo reporto la media más baja para esta enzima con un valor de 0.001 (Tabla 14). La sobreexpresión de glutatión S-transferasa es responsable de la resistencia a los organofosforados, piretroides, y diamidas, así como indoxacarb (Furlong *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014a). Siqueira *et al.* (2001), menciona que en general las enzimas GST tienen un rol secundario en la detoxificación de insecticidas. De acuerdo a Bisset, (2002) y Reyes *et al.* (2011), más de un mecanismo de resistencia puede estar implicado en la disminución de la eficacia de un producto determinado, y un mismo mecanismo puede generar resistencia a más de un producto.

Tabla 14. Comparación de medias del contenido de Glutation-S-Transferasas en 6 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato y una línea susceptible.

Población	n	GST Media ± SD
Línea Susceptible	12	0.006±0.006 bcd
Celaya	12	0.012±0.007 bc
V. de Santiago	12	0.004±0.003 cd
Abasolo	12	0.001±0.002 d
Sn. Luis de la Paz	12	0.016±0.004 ab
Juventino Rosas	12	0.014±0.012 bc
Sn. José Iturbide	12	0.024±0.005 a

n= Numero de muestras; SD= Desviación estándar

En el Tabla 15, se registra un coeficiente de variación elevado para el contenido de Acetilclínesterasa de 62.72 %, presentándose con mayor heterogeneidad en comparación a Glutatión S-Transferasas.

Tabla 15. Análisis de varianza del contenido Acetilcolinesterasa de en las 6 poblaciones de *Plutella xylostella* en el estado de Guanajuato.

FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
Trat	6	0.108	0.0181	27.4	5.41e-15***
Error	56	0.037	0.0006		
Total	62	0.145	0.0187		
C.V.=	62.72 %				

En lo que se refiere a ATCh se observó que la población de San Luis de la Paz se expresó un mayor contenido para esta enzima con una media de 0.130, por otro lado la Línea Susceptible reporto un contenido nulo para ATCh (Tabla 16). Bisset (2002) menciona que este mecanismo produce un amplio espectro de resistencia a la de los organofosforados y en mayor medida a los carbamatos.

Tabla 16. Comparación de medias del contenido de Acetilcolinesterasa en 6 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato y una línea susceptible.

Población	n	ATCh Media ± SD
Línea Susceptible	12	0.000±0.000 d
Celaya	12	0.042±0.036 bc
V. de Santiago	12	0.065±0.035 b
Abasolo	12	0.008±0.016 cd
Sn. Luis de la Paz	12	0.130±0.010 a
Juventino Rosas	12	0.022±0.030 cd
Sn. José Iturbide	12	0.018±0.026 cd

n= Numero de muestras; SD= Desviación estándar

En relación al análisis de varianza el contenido de oxidasas del Tabla 17, es similar al de β -Esterasas en las poblaciones muestreadas, con valores de 16.2 y 16.75 respectivamente, reportando un poco variabilidad de estas enzimas para la zona del estado de Guanajuato.

Tabla 17. Análisis de varianza del contenido Oxidasas de en las 6 poblaciones de *Plutella xylostella* en el estado de Guanajuato.

FV	GL	SC	CM	F	Pr>F
Trat	6	22.714	3.786	488.5	<2e-16***
Error	56	0.434	0.008		
Total	62	23.148	3.794		
C.V.=	16.2	%			

En el caso de Oxid se pueden observar que su mayor contenido se presentó para la población de San Luis de la Paz con un valor medio de 2.003, y expresándose su menor contenido para la población que corresponde a Celaya con una absorbancia media de 0.207 (Tabla 18). El aumento de las actividades Oxid contribuye a la resistencia a carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, y diamidas (Bautista *et al.*, 2009; Furlong *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014b). Estas enzimas las más comúnmente asociadas con la resistencia cruzada entre DDT / piretroides (Scott y Wen 2001; Fonseca *et al.*, 2009).

Tabla 18. Comparación de medias del contenido de Oxidasas en 6 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato y una línea susceptible.

Población	n	Oxid Media ± SD
Línea Susceptible	12	0.236±0.081 cd
Celaya	12	0.207±0.021 d
V. de Santiago	12	0.349±0.095 bc
Abasolo	12	0.275±0.076 cd
Sn. Luis de la Paz	12	2.003±0.145 a
Juventino Rosas	12	0.445±0.091 b
Sn. José Iturbide	12	0.285±0.051cd

n= Numero de muestras; SD= Desviación estándar

CONCLUSIONES

De acuerdo a la información generada en esta investigación, las poblaciones San Luis de la Paz y Valle de Santiago reportan resistencia para cipermetrina, mientras que el resto de las poblaciones en estudio presentan una tendencia a desarrollar resistencia a este producto, se recomienda la disminución de las aplicaciones y rotación de cipermetrina en el estado de Guanajuato. Para el resto de los insecticidas evaluados no se reporta resistencia en ninguna de las poblaciones en estudio, por lo que se consideran efectivos para el control de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato.

Las α -Est y ATch fueron los grupos de enzimas con mayor presencia, por lo que se les considera como el principal mecanismo de resistencia para *P. xylostella* en el estado de Guanajuato; GST expreso el menor contenido para las poblaciones en estudio, siendo un mecanismo detoxificativo poco relevante para la generación de resistencia en *P. xylostella*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Ahmad, M. I. Denholm, R. H. Bromilow. (2006). Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan, *Pest Manag. Sci.* 62, 805-810.
- Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A. & Kellogg, E.A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, vol. 259 (2-4), pp.89–120.
- APRD, Arthropod Pesticide Resistance Database www.pesticideresistance.com (2015).
Date of access: 23/08/2015
- Attique M.N.R, Khaliq A, Sayyed A.H. (2006). Could resistance to insecticides in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) be overcome by insecticide mixtures. *J Appl Entomol* 130: 122-127.
- Balasubramani, V., Sayyed, A. H., & Crickmore, N. (2008). Genetic characterization of resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from India. *Journal of economic entomology*, 101(6), 1911-1918.
- Barrera Urzúa, R., Bujanos Muñiz, R., Rodríguez Maciel, J. C., Mora Aguilera, G., & Martínez Téllez, M. Á. (2006). Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) del estado de Guanajuato, México. *Agrociencia*, 40(3).
- Bass, C. I. Denholm, M. S. Williamson, R. Nauen. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78-87.
- Bass, C. L. M. Field. (2011). Gene amplification and insecticide resistance, *Pest Manag. Sci.* 67, 886-890.
- Bautista, M. A. M. T. Miyataa, K. Miuraa, T. Tanaka. (2009). RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback

- moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 38-46.
- Bisset, A. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana Medicina Tropical* 54 (3).
- Bisset, J. A.; Rodríguez, M. M.; Molina, D.; Díaz, C.; y Soca, L. A. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *REV CUBANA MED TROP* 53(1): 37-43.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brogdon, W. G. (1984). Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of singlemosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79: 457-459.
- Brogdon, W. G. (1988). Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90: 145-150.
- Brogdon, W. G.; Barber, A. M. (1987). Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pesticide Biochemistry and Phisiology*, 29: 252-259.
- Brogdon, W. G.; Barber, A. M. (1990). Microplate assay of glutathione s-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96: 339-342.
- Brogdon, W. G.; Dickinson, M. C. (1983). A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in hig-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry*, 131: 499-503.
- Brogdon, W. G.; Mcallister, J. C; Vulule, J. (1997). Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13: 233-237.
- Bujanos Muñiz, R., Rodríguez Maciel, J. C., Byerly Murphy, K. F., Hoy, C. W., & Díaz Gómez, O. (2003). Dilución de insecticidas y reducción de toxicidad sobre

larvas de dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.)(Lepidoptera: Plutellidae). *Agricultura Técnica en México*, 29(2).

- Bújanos, Muñiz, R.; Marín Jarillo, A.; Díaz Espino, L. F.; Gámez, Vázquez, J.; Ávila, Perches, M. A.; Herrera, Vega, R; Dorantes González, J. R. A.; Gámez, Vázquez, F. P. (2013). Manejo Integrado De La Palomilla Dorso De Diamante *Plutella xylostella* (L.) En La Región Del Bajío, México. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México. Folleto Técnico Núm. 27.
- Cardoso, M. O.; Pamplona, A. M. S. R.; Michereff Filho, M. (2010). Recomendaciones técnicas para el control de lepidópteros plaga en el cultivo del repollo en Amazonas.
- Cartea, M. E., & Velasco, P. (2008). Glucosinolates in Brassica foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 213–229.
- Chávez, E. C., Bautista, O. H., Flores, J. L., & Fuentes, Y. M. O. (2013). Cuantificación de enzimas asociadas a la resistencia de insecticidas en *Bactericera cockerelli* (Sulc) de la zona papera de Coahuila y Nuevo León, México. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 5-12.
- Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*. 2006; 366(1-2):1-13.
- Da Silva, Carvalho, J. (2008). *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Efeito Da Sinigrina Aplicada Em Folhas De Couve E Brócolis. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Campus De Jaboticabal.
- Dary O, Georghiou GP, Parsons E, Pasteur N (1990). Microplate adaptation of Gomori’s assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *J. Econ. Entomol.* 83: 2187-2192.
- Devonshire, A. L. 1990. Biochemical and molecular genetic analysis of insects populations resistant to insecticides. Brighton crop protection conference. Pest and Diseases. Pp 889-896.

- Devonshire, A. L. and Moores G. D. 1984. Characterization insecticide-insensitive acetylcholinesterasa: microcomputer based analysis of enzyme inhibition in homogenates to individual house fly (*Musca domestica*) heads. *Pestic. Biochem. Physiol.* 21: 341-348.
- Enayati, A.A. Ranson, H. Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Mol. Biol.* 14 3–8.
- Ezemonye, L., & Tongo, I. (2010). Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81(2), 214-217.
- Eziah, V. Y. H. A. Rose, M. Wilkes, A. D. (2009). Clift, Biochemical mechanisms of insecticide resistance in the diamondbackmoth (DBM), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), in the Sydney region, Australia, *Aust. J. Entomol.* 48, 321-327.
- FAO, (2012). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas.
- Fernández, S. A. y Alvarez, C. (2008). Biología de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) polilla del repollo (*Brassica oleraceae* L.) en condiciones de laboratorio. FONAIAP. Estación Experimental Lara. Apdo. 592. Barquisimeto, Venezuela. *Agronomía Tropical.* 38(4-6): 17-28.
- Ffrench, C. R. H.; steinchen J. C. and Brun, L. O. 1994. A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) *Bull. Entomol. Res.* 84:11-16.
- Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge at the Univ. Press. 3rd Ed. 120 p.
- Flores, E. A.; Grajales, J. S.; Fernández, I. S.; Ponce, G. G.; Loaiza, M. H. B.; Lozano, S.; Brogdon, W. G.; Black Iv, W. C.; Beaty, B., (2006). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22: 672-677.
- Fonseca-González, I., Quiñones, M. L., McAllister, J., & Brogdon, W. G. (2009). Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between

- DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 18-26.
- Fujioka, K., & Casida, J. E. (2007). Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chemical research in toxicology*, 20(8), 1211-1217.
- Furlong, M. J. D. J. Wright, L. M. (2013). Dorsal, Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects, *Annu. Rev. Entomol.* 58, 517-541.
- Gryzwacz, D., A. Rossbach, D. Russell, R. Srinivasan, A.M. Shelton. (2010). *Crop Protection* 29 (1): 68-79.
- Guengerich, F.P., (1963). Bioactivation and detoxification of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metabolism and Disposition* 21, 1-6.
- Guo, L. P. Liang, X. G. Zhou, X. W. Gao. (2014). Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.), *Sci. Rep.* 4, 6924.
- Hayes, J.D. Flanagan, J.U. Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 51-88.
- Haynes, C., E. Everhart, R. Jauron, D. Nelson, and J. Lenahan. (2009). *Cole Crops*. Iowa State University Extension. <http://www.extension.iastate.edu/Publications/PM1896.pdf> (20 December 2009).
- Heckel D.G, (2006). Chemical and biological insecticides: resistance mechanisms and management in diamondback moth, in *The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests: Proc 5th Internat Workshop*, ed. by Shelton AM, Collins HL, Zhang Y and Wu Q. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing, China, pp. 30-43.
- Hu, Z. D X. Feng, S. Q. Lin, H. Y. Chen, Z. Y. Li, F. Yin, P. Liang, X. W. Gao. (2014a). Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus, *J. Integr. Agr.* 13, 2452-2459.
- Hu, Z. D. S. Q. Lin, H. Y. Chen, Z. Y. Li, F. Yin, X. Feng. (2014b) Identification of a novel cytochrome P450 gene, CYP321E1 from the diamondback moth, *Plutella*

- xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance, *Bull. Entomol. Res.* 104, 716-723.
- Huang, H. S., Hu, N. T., Yao, Y. E., Wu, C. Y., Chiang, S. W. & Sun, C. N. (1998). Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 651–658.
- Hubert, J. J. 1980. *Bioassay*. Kendall/Hunt Pub. Co. USA. 164 p.
- Hutson, D. H., Pickering, B. A., and Donninger, C. (1972) Phosphoric acid triester-glutathione alkyltransferase. A mechanism for detoxification of dimethyl phosphate triesters. *Biochem. J.* 127, 285–293.
- Ibel, K.; May, R. P.; Kirscheer, K.; Szadkowski, H.; Mascher, E. and Lundahl, P. 1990. Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate-protein complexes as determined by neutron scattering. *Eur. J. Biochem.* 190: 311-318.
- INIFAP, (2013). *Producción de brócoli en el bajío*. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México.
- IRAC, (2016). Consultado en: <http://www.irc-online.org/about/resistance/> 22-mayo-2016.
- IRAC. (2010). Consultado en: <http://www.irc-online.org> (26 mayo, 2010).
- Jakobsson, P.J. Mancini, J.A. Ford-Hutchinson, A.W. (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase, *J. Biol. Chem.* 271 22203–22210.
- Jiang, T., Wu, S., Yang, T., Zhu, C., & Gao, C. (2015). Monitoring field populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) for resistance to eight insecticides in China. *Florida entomologist*, 98(1), 65-73.
- Keck, A.S., Finley, J.W. (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integr. Cancer Ther.* 3, 5e12.

- Khaliq A, Attique M.N.R, Sayyed A.H (2007) Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Bull Entomol Res* 97: 191-200.
- Kwong T.C. (2007). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology *Ther Drug Monit.* 24(1):144-9.
- Lagunes, T. A. Y J. Villanueva, J.1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos, Edo. de México. 264 pp.
- Lamoureaux, G.L., Rueness, D.G., (1987). Synergism of diazinon toxicity and inhibition of diazinon metabolism in the house fly by Tridiphane: inhibition of glutathione S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 27, 318–329.
- Landeros, J., Ail, C. E., Cerna, E., Ochoa, Y., Guevara, L., & Aguirre, L. A. (2010). Susceptibilidad y mecanismos de resistencia de *Tetranychus urticae* (Acariformes: Tetranychidae) en rosales de invernaderos/Susceptibility and resistance mechanisms of *Tetranychus urticae* (Acariformes: Tetranychidae) in greenhouse roses. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(1), 5.
- Li, X. C. M. A. Schuler, M. R. (2007). Berenbaum, Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics, *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231-253.
- Lopez, N. (2008). Evaluación de mecanismos de resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentalis* (Pergande): implicación de carboxilesterasas y acetilcolinesterasas. Tesis Dr. C. B. Valencia. Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Biológicas. 190 p.
- Low, W. Y., Feil, S. C., Ng, H. L., Gorman, M. A., Morton, C. J., Pyke, J. & Gooley, P. R. (2010). Recognition and detoxification of the insecticide DDT by *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase D1. *Journal of molecular biology*, 399(3), 358-366.
- Maggioni, L., von Bothmer, R., Poulsen, G., & Branca, F. (2010). Origin and domestication of cole crops (*Brassica oleracea* L.): linguistic and literary considerations. *Economic botany*, 64(2), 109-123.
- Midori Biocontrol, (2014). *Plutella xylostella* Palomilla dorso de diamante/Diamoback moth. Ficha de control de plagas.

- Miyamoto, T., and Mikawa, T. (2005) Oxidative glutathione conjugation and its novel role in activation of the organophosphorus insecticide prothiofos. *J. Pestic. Sci.* 30, 31–38.
- Mohan, M., & Gujar, G. T. (2003). Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop protection*, 22(3), 495-504.
- Mohan, M.; Gujar, G. T. (2003). Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes.
- Montella, I. R.; Martins, A. J.; Fernández, V.; Pereira, L. B.; Braga, I. A.; Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanism of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001-2004. *The American Journal of Tropical Medical and Hygiene*, 77: 467-477.
- Nehare, S., Moharil, M. P., Ghodki, B. S., Lande, G. K., Bisane, K. D., Thakare, A. S., & Barkhade, U. P. (2010). Biochemical analysis and synergistic suppression of indoxacarb resistance in *Plutella xylostella* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(2), 91-95.
- Ninsin, K. D. (2004). Acetamiprid resistance and cross-resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pest management science*, 60(9), 839-841.
- Ninsin, K. D. (2004). Acetamiprid resistance and cross-resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pest management science*, 60(9), 839-841.
- OECD (2012). Consensus document on the biology of the Brassica crops (Brassica spp.). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 54. Paris: Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Oliveira, A. C. D., Siqueira, H. Á. A. D., Oliveira, J. V. D., Silva, J. E. D., & Michereff Filho, M. (2011). Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Scientia Agricola*, 68(2), 154-159.

- Oliveira, Cardoso, M.; Fascin, Berni, R. y Cohen, Antonio, I. (2012). Daños por *Plutella xylostella* en el cultivo de hojas jóvenes afectadas por la altura y por el nitrógeno. Embrapa Amazonica Occidental. Manaus, AM.
- Pimentel MAG, Antonino FLR, Duar te BM, Humber to S (2008). Resistance of storedproduct insects to phosphine. Pesq. Agropec. Bras. 43: 1671-1676.
- Reyes, M.; Collange, B.; Rault, M.; Casanelli, S. Y Sauphanor, B. (2011). Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 99 (1): 25–32.
- Roberts, M. J. 2004. Risk, government programs, and the environment. Technical bulletin 1908. Economic Research Service, USDA. Washington D. C., USA. 52 p.
- Santos, V. C., De Siqueira, H. A. A., Da Silva, J. E., & De Farias, M. J. D. C. (2011). Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. *Neotropical entomology*, 40(2), 264-270.
- Sarfraz M, Dosedall L.M, Keddie B.A. (2006) Diamondback moth-host plant interactions: im- plications for pest management. Crop Protection; 25 (7): 625–639.
- SAS Institute Inc. 2002. Guide for personal computers. SAS institute, Cary, N.C.
- Sayyed, A. H. D. J. Wright. (2006). Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), Pest Manag. Sci. 62. 1045-1051.
- Sayyed, A. H., Attique, M. N. R., Khaliq, A., & Wright, D. J. (2005). Inheritance of resistance and cross-resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Pest management science*, 61(7), 636-642.
- Scott JG, Wen Z 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. Pest Manag Sci 57: 958-967.

- Shao, Z.R., Feng, X., Li, S., Li, Z.Y., Huang, J.D., Chen, H., Hu, Z.D. (2013) Guideline for Insecticide Resistance Monitoring of *Plutella xylostella* (L.) on Cruciferous Vegetables, China Agriculture Press, Beijing.
- Shelton A.M and Badenes-Perez F.R. (2006) Concepts and applications of trap cropping in pest management. *Annu Rev Entomol* 51:285–308.
- Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, B. (2012). Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, 100(5), 327-335.
- Shingo, G. y Ventura, M. U. P. (2009). Producción del cultivo *Bassica oleracea* L. var. Acephala con fertilización mineral y organica. *Semina: Ciencias agrarias*, v. 30, n.3, p.589-594, 2009.
- Shishido, T., Usui, K., Sato, M., and Fukami, J. (1972) Enzymatic conjugation of diazinon with glutathione in rat and American cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2, 51–63.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), (2017a). En: <https://www.gob.mx/siap/articulos/casi-la-totalidad-de-las-verduras-mexicanas-congeladas-van-al-extranjero?idiom=es> Consultada: 01 de Marzo del 2017.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), (2017b). En: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do. Consultado: 01 de Marzo del 2017.
- Siqueria, H.; Guedes, R.; Fragoso, D. Y Magalhaes, L. (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Pest Management* 47 (4): 247-251.
- Sogorb MA, Vilanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett.* 128(1-3):215-28.
- Taysse, L., Chambras, C., Marionnet, D., Bosgiraud, C., Deschaux, P., (1998). Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology* 6, 300–305.

- Thuler, R.T. (2006). *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): estratégias para o manejo integrado. 83f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola), Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal.
- Torres, A. L.; Boiça Júnior, A. L.; Medeiros, C. A. M.; Barros, R. (2006). Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyriformium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia*, Campinas, v. 65, n. 3, p. 447-457.
- Trocza B, Zimmer CT, Elias J, Schorn C, Bass C, Davies TG, Field LM, Williamson MS, Slater R, Nauen R. (2012). Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42: 873-880.
- Twine, P. H. and Reynolds H. T. 1980. Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. *J. Econ. Entomol.* 73: 339-242.
- Vargas, R. (2013). Resistencia a insecticidas en plagas agrícolas. *Tierra Adentro*. 8(1): 50-52.
- Vargas, R.; Olivares, N. Y Ubillo, A. (2008). Manejo Integrado de Resistencia (MIR) y selectividad de plaguicidas. In: Ripa, R. y Larral, P. Manejo de Plagas en Paltos y Cítricos. INIA La Cruz. pp: 80-84.
- Vontas, J. G., Small, G. J. & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357, 65–72.
- Wang, J.J., Cheng, W.X., Ding, W., and Zhao, Z.M. (2004). ‘The Effect of the Insecticide Dichlorvos on Esterase Activity Extracted from the Psocids, *Liposcelis bostrychophila* and *L. entomophila*’, *Journal of Insect Science*, 4, 105.
- Wang, Y., Qiu, L., Ranson, H., Lumjuan, N., Hemingway, J., Setzer, W. N. (2008). Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. *J. Struct. Biol.* 164, 228–235.

- Wing KD, Sacher M, Kagaya Y, Tsurubuchi Y, Mulderig L, Connair M, Schnee M (2000). Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Crop Prot* 19: 537-545.
- Wu, G., Jiang, S., Miyata, T., (2004). Seasonal changes of methamidophos susceptibility and biochemical properties in *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Yponomeutidae) and its parasitoid, *Cotesia plutellae* (Hymenoptera : Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 97, 1689–1698.
- Xia, Y. M. Y. H. Lu, J. Shen, X. W. Gao, H. Qiu, J. H. Li. (2014) Resistance monitoring for eight insecticides in *Plutella xylostella* in central China, *Crop Prot.* 63 131-137.
- Yang, Y., Cheng, J., Singhal, S.S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S., (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry* 276 (22), 19220–19230.
- Zhang, S., Zhang, X., Shen, J., Mao, K., You, H., & Li, J. (2016). Susceptibility of field populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to a selection of insecticides in Central China. *Pesticide biochemistry and physiology*, 132, 38-46.
- Zhao, J. Z., H. L. Collins, Y. X. Li, R. F. Mau, G. D. Thompson, M. Hertlein, J. T. Andaloro, R. Boykin, and A. M. Shelton. (2006a). Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb and emamectin benzoate. *J. Econ. Entomol.* 99: 176–181.
- Zhao, J. Z., Li, Y. X., Collins, H. L., Gusukuma-Minuto, L., Mau, R. F. L., Thompson, G. D., & Shelton, A. M. (2002). Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology*, 95(2), 430-436.

**Cuantificación de enzimas asociadas a la resistencia de insecticidas en
Diferentes Poblaciones de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutelliidae)
del Estado de Guanajuato**

**Quantification of enzymes associated to insecticide resistance in different
populations of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutelliidae) from the
State of Guanajuato**

Enzimas de resistencia en dorso de diamante

Cerna Chávez Ernesto¹; Rodríguez Rodríguez José Francisco²; Hernández
Juárez Agustín¹; Aguirre Uribe Luis Aguirre¹; Landeros Flores Jerónimo¹;
Cervantes Ortiz Francisco³; Guevara Acevedo Luis Patricio³ y Ochoa Fuetes
Yisa María¹•

¹Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. Calzada Antonio Narro 1923,
Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315. ²Estudiante de Maestría en Ciencias
en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro.
Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila. ³Instituto
Tecnológico de Roque, Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado
Postal 508, C.P. 38110, Celaya; Gto. •Autor de correspondencia:
yisa8a@yahoo.com, tel y fax 844-411-0326

Resumen

La palomilla dorso de diamante es una de las principales plagas que afectan a las crucíferas, debido a la importancia de estos cultivos y al daño generado se ha convertido en un grave problema para los productores. Su control se basa principalmente por el método químico, en el cual solo se emplean insecticidas compatibles con el medio ambiente y la salud humana. Sin embargo la alta presión de selección de insecticidas, ha generado a que desarrolle resistencia a las diferentes materias activas utilizadas para su control. Por lo anterior, se realizaron pruebas bioquímicas para cuantificar α y β esterasas, glutation S-transferasas, acetil colinesterasas y oxidasas, enzimas relacionadas con la resistencia a insecticidas, en 4 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato (Abasolo, Celaya, San Luis de la Paz y Valle de Santiago) y una línea susceptible como referencia. Los resultados nos indican que las enzimas con mayor presencia fueron las α y β esterasas en Celaya y Valle de Santiago, así como oxidasas en poblaciones de San Luis de la Paz, Así mismo, podemos mencionar que las enzimas responsables de la falta de efectividad en productos aplicados para el control de esta plaga como piretroides, organofosforados y benzoilureas son las enzimas esterasas. Por su parte las enzimas Acetilcolinesterasa y Glutacion S-transferasa no presentaron relevancia como mecanismo detoxificativo.

Palabras clave: Enzimas detoxificativas, dorso de diamante, tolerancia a insecticidas

Abstract

The diamondback moth is one of the main pests that affect the cruciferous, due to the importance of these crops and the damage generated has become a serious problem for producers. Its control is mainly based on the chemical method, in which only insecticides compatible with the environment and human health are used. Nevertheless, the high pressure of selection of insecticides, has generated develop resistance to the different active materials used for its control. Therefore, biochemical tests were performed to quantify α and β esterase, Glutathione S-transferase, Acetylcholinesterase and oxidases, enzymes related to resistance to insecticides, in four populations of *Plutella xylostella* from the state of Guanajuato (Abasolo, Celaya, San Luis de la Paz and Valle de Santiago) and a susceptible line as a reference. The results indicate that the enzymes with the highest presence were the α and β esterase's in Celaya and Valle de Santiago, as well as oxidases in populations of San Luis de la Paz. Moreover, we can mention that the enzymes responsible for the lack of effectiveness in products applied for the control of this pest as pyrethroids, organophosphates and benzoylureas are the esterase enzymes. For its part, the enzymes Acetylcholinesterase and Glutathione S- transferase did not present relevance as a detoxification mechanism.

Keywords: Detoxification enzymes, diamondback moth, insecticide tolerance.

Introducción

En el estado de Guanajuato anualmente se siembran 20,590.50 ha de brócoli con una producción de 292,345.21 Ton (SIAP, 2014), cuya producción se destina principalmente al mercado de exportación, por lo que el cultivo representan una importante fuente de divisas y significativos beneficios para los productores (Bujanos et al., 2013). La principal plaga de importancia económica en las crucíferas es la palomilla "Dorso de Diamante" *Plutella xylostella* (INIFAP, 2013), es una plaga cosmopolita altamente destructiva (Heckel, 2006), que afecta la calidad del producto debido a la contaminación por huevos y larvas que ocasionan que sea rechazado para su exportación (INIFAP, 2013). Este especialista de crucíferas puede tener su origen en Europa (Sarfraz et al., 2006), o el Este de Asia (Liu et al., 2003), pero está presente en todo el mundo donde existan sus plantas huésped (Torres et al., 2006). Causando daños graves, al interferir en el crecimiento de las plantas e incluso causar la muerte o pérdida total (Da Silva, 2008). Se ha convertido en un tema de investigación en todas las regiones productoras, con el fin de obtener medidas de control técnicamente apropiadas, económicamente satisfactorias y respetuosas al medio ambiente (Thüler, 2006). *P. xylostella* se considera que es una de las plagas más difíciles de controlar y hasta ahora, los insecticidas son el principal método para su control, siendo las diamidas, avermectinas, piretrinas, y Bt los grupos principales de insecticidas utilizados para erradicar esta plaga (Xia et al., 2014). Junto a las consecuencias para el medio ambiente como la eliminación de enemigos naturales y el surgimiento de plagas secundarias; el aumento del riesgo tanto de presencia de residuos en el producto comestible como para el personal de campo (Bujanos, 2013), el uso inadecuado y continuo de las mismas materias activas ha generado poblaciones de *P. xylostella* resistentes a los insecticidas (Attique et al., 2006, Khaliq et al., 2007). En muchos países *P. xylostella* ha desarrollado resistencia a casi todos los insecticidas utilizados en contra de ella, (Furlong et al., 2008). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2015 , la polilla de la col había desarrollado resistencia a aproximadamente 91 compuestos con diferentes

modos de acción, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, benzoilureas, *Bacillus thuringiensis*, avermectinas, espinosinas, fenilpirazoles, indoxacarb, diacilhidrazinas y diamidas (APRD, 2015). Sin embargo, el aspecto más importante en el manejo de resistencia a los insecticidas, es la comprensión de los mecanismos que conducen a la resistencia de las plagas a estos. Investigaciones previas indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucra mutaciones de aminoácidos de destino, la sobre-expresión o mutaciones de desintoxicación, enzimas detoxificativas, resistencia a la penetración y resistencia de comportamiento (Ahmad et al., 2006; Bass et al., 2015). Sin embargo, la mayor parte de mecanismos de resistencia en común, es la resistencia metabólica, con un aumento en las actividades de esterasas, glutatión S-transferasas, y oxidasas (Li et al., 2007; Bass et al., 2011). En *P. xylostella*, niveles elevados de esterasas se correlacionan con la resistencia a organofosforados, carbamatos, piretroides, indoxacarb, avermectina, y benzoilurea (Sayyed et al., 2006; Eziah et al., 2009; Furlong et al., 2013), y la sobreexpresión de glutatión S-transferasa es responsable de la resistencia a los organofosforados, piretroides, y diamidas, así como indoxacarb (Furlong et al., 2013; Hu et al., 2014a). Además, el aumento de las actividades oxidasas contribuye a la resistencia a carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, y diamidas (Bautista et al., 2009; Furlong et al., 2013; Hu et al., 2014b;). El metabolismo de los insectos juega un papel importante en la resistencia a insecticidas y el conocimiento del mismo se puede utilizar para mejorar la toxicidad de los insecticidas por la mezcla de otros insecticidas que no poseen las mismas vías metabólicas (Mohan y Gujar, 2003). Por lo antes mencionado el objetivo de la presente investigación fue generar información sobre los mecanismos enzimáticos de resistencia en diferentes poblaciones de *P. xylostella* del estado de Guanajuato y su cuantificación mediante pruebas bioquímicas.

Materiales y Métodos

Se evaluaron 5 poblaciones de *P. xylostella* del estado de Guanajuato como son: Valle de Santiago, San Luis de la Paz, Abasolo, Celaya y como población susceptible se utilizaron individuos proporcionados por el INIFAP campus Celaya reproducidos desde 1996 sin presión de selección a insecticidas. Considerando que son las poblaciones con mayor superficie de siembra de brócoli en el estado. La colecta en campo se realizó de forma manual en lotes comerciales de las poblaciones antes mencionadas. Se colectaron larvas pupas y adultos de *P. xylostella*, las cuales se colocaron en contenedores de plástico y se metieron en hieleras para su traslado a cajas entomológicas en laboratorio a 27 °C, 50% de humedad relativa y 16:8 h luz: oscuridad, esto para su reproducción hasta F1 y tener individuos suficientes de la misma edad para su posterior estudio.

Para cada población de *P. xylostella* se utilizaron cinco pruebas bioquímicas para la determinación de los niveles enzimáticos de α -esterasas (α -Est), β -esterasas (β -Est), oxidasas (Oxid), Glutación S-Transferasas (GST) y acetilcolinesterasas (ACTh). Todas las pruebas se corrieron por triplicado en placas de 96 pozos y fueron leídas mediante el lector de microplacas.

Pruebas bioquímicas

Determinación de proteína a larvas de *P. xylostella*: Se empleó la metodología descrita por Bradford (1976) modificada por Brogdon (1984), Brogdon y Barber (1987). Se colocaron ocho muestras en tubos eppendorf con 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.50, 1.75 y 2 larvas de *P. xylostella* con 4 repeticiones, se agregaron 500 μ L de solución buffer (KPO_4) a 0.05 M y 7.2 pH, se trituraron y se aforaron a 1 mL para emplearlo como fuente de enzima. Se utilizó una microplaca de 96 pozos, donde a cada cavidad se colocaron 20 μ L de homogenato y se agregaron 80 μ L de solución buffer más 200 μ L de colorante diluido, esto se realizó por triplicado para cada repetición. Se tomaron las lecturas de

absorbancia utilizando el filtro de 630 nm y se calcularon los valores de $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína comprendidos en el rango de 80 a 140 μg .

Niveles enzimáticos: Empleando el método de Brogdon y Dickinson (1983), se determinaron los niveles de β y α -esterasas, se agregaron 100 μL del homogenato y 100 μL de β o α -naftil acetato en cada pozo de la microplaca, se dejó incubar por 10 min y se adicionaron 100 μL de Dianisidina y se dejaron incubar durante 2 min, fueron leídas con un filtro de 540 nm. En cuanto a las oxidasas, se utilizó la metodología de Brogdon et al. (1997), se colocaron 100 μL del homogenato, se adicionaron 200 μL de ,5,5'- Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride (TBMZ), y 25 μL de H_2O_2 a 3%, se dejó incubar por 5 min y se tomó lectura usando un filtro de 620 nm. Para las GST, se utilizó el método de Brogdon y Barber (1990), se colocaron 100 μL del homogenato, adicionando 100 μL de glutatión reducido y 100 μL de 1-cloro-2,4'-dinitrobenceno (CDNB), y fue leído a tiempo cero (T0), se volvió a leer a los 5 min (T5) utilizando el filtro de 340 nm, se tomaron las diferencias de ambos tiempos para el análisis de resultados. Por último, siguiendo la metodología de Brogdon (1988), se determinaron los niveles de acetilcolinesterasa, colocando 100 μL del homogenato, se agregaron 100 μL de yoduro de acetilcolina al 3.0 mM y 100 μL de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), y se tomó la primera lectura (T0) y se volvió a correr después de 10 min (T10), utilizando el filtro de 414 nm, se tomaron las diferencias de ambos tiempos para el análisis de resultados.

Con las absorbancias de cada enzima se realizó una distribución de frecuencias y se estableció un umbral de resistencia. Por último, se realizó un ANOVA y una prueba de Tukey ($P= 0,05$), para la separación de las medias, utilizando el programa estadístico computacional R versión 3.3.1.

Resultados y discusión

Para la determinación de los niveles enzimáticos, en primera instancia se calculó la cantidad de proteína contenida en larvas de *P. xylostella*, y así obtener el número de insectos por muestra, donde de 0.25 a 1 larva su

contenido de proteína fue por debajo del intervalo requerido (80 a 120µg), mientras que de 1.25 a 2 larvas están dentro del límite permitido; seleccionando 1.75 larvas como número de insectos para la fuente de enzima (Figura 1). Respecto a la fuente de enzima, Bradford (1976) menciona que valores fuera del rango no son confiables para la cuantificación de proteína en tejidos. En tanto que Dary *et al.*, (1990) reporta que existe estrecha relación entre tamaño de muestra y cantidad de proteína, por lo que se pueden presentar diferencias en los resultados obtenidos.

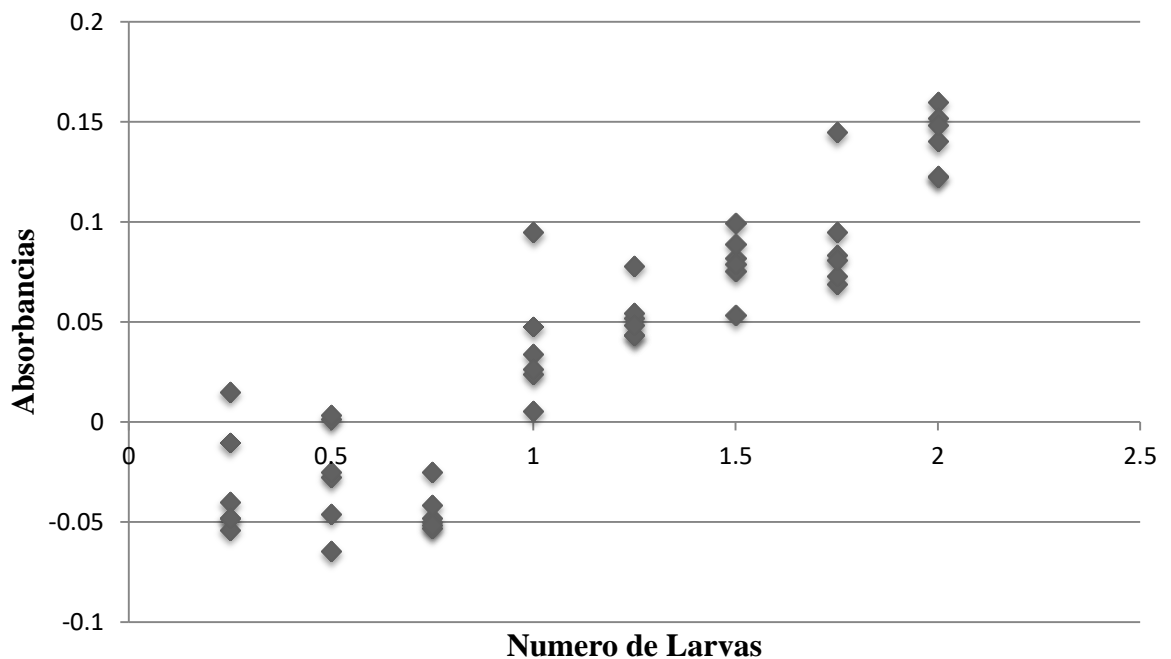


Figure1. Protein Absorbance in *Plutella xylostella* Homogenates in Phosphate Buffer Diluent (pH: 7.2)

Para determinar los niveles enzimáticos, mencionaremos que las poblaciones en estudio estuvieron bajo un manejo con insecticidas piretroides, lactonas macrocíclicas, espinosinas, diamidas, fosforados y carbámicos. En la tabla 1, se pueden observar las absorbancias por enzima para las diferentes

poblaciones de *P. xylostella*. Donde se observó diferencias significativas entre las poblaciones en estudio para cada enzima. Donde β y α -Est son las enzimas que se expresaron en mayor cantidad para todas las poblaciones, seguidas de Oxid mientras que GST y ACTh fueron las que presentaron un menor contenido. β -Est se expresó en mayor cantidad para la población de Celaya con una media de 2.337, en tanto que San Luis de la Paz y la Línea Susceptible presentaron los valores más bajos para esta enzima, con absorbancias de 1.722 y 1.847 respectivamente. Mientras que α -Est se reportó su mayor contenido en Celaya seguido de Valle de Santiago con valores medios de 2.589 y 2.068 respectivamente; la Línea Susceptible junto a Abasolo presentaron las absorbancias menores para α -Est con una media de 1.401 y 1.582 respectivamente. En el caso de Oxid se puede observar su mayor contenido fue expresado para la población de San Luis de la Paz con un valor medio de 2.003, y observándose su menor contenido para la población de Celaya con una absorbancia de 0.207. Por otro lado, San Luis de la Paz reportó el valor máximo de absorbancias para GST con una media de 0.016, mientras que Abasolo y Valle de Santiago fueron los que presentaron las medias más bajas para esta enzima con valores de 0.001 y 0.004 respectivamente. En lo que se refiere a ATCh la población que corresponde a San Luis de la Paz fue la que presentó una mayor expresión para esta enzima con una media de 0.130, en tanto que la Línea Susceptible reportó una expresión nula para ATCh.

Estudios anteriores reportan que el principal mecanismo de resistencia a piretroides, organoclorados (Ponce et al., 2009), organofosforados (Bisset et al., 2001), oxidazinas (Toshio et al., (2004), avermectina, y benzoilurea (Sayyed et al., 2006; Eziah et al., 2009; Furlong et al., 2013) es a causa del alto contenido de esterasas. Para las oxidasas que fue el segundo mecanismo detoxificativo, Pimentel et al., (2008) mencionan que las oxidasas juegan un papel fundamental en la detoxificación de diversos plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados. Los altos valores de oxidasas posiblemente se debe a las repetidas aplicaciones de abamectina en

algunas de las localidades; según Clark et al. (1994), las enzimas oxidativas son el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina. Finalmente las GST, en la zona productora del estado de Guanajuato, no es un factor determinante para la presencia de resistencia, estos resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Díaz *et al.* (2004) y Landeros *et al.* (2010), utilizando esta misma metodología, reportaron una baja presencia de GST en mosquitos y arañita roja respectivamente. Una de las posibles razones de encontrar bajos niveles de GST, es que estas enzimas están involucradas en la resistencia a insecticidas organofosforados (Ortelli *et al.*, 2003); sin embargo, la elevada producción de esterasas en una enzima más afín a este grupo toxicológico (Bisset *et al.*, 2001).

Table 1. Absorbance means of each enzyme for different populations of *Plutella xylostella* in the state of Guanajuato.

Población	n	β -Est		α -Est		GST		ATCh		Oxid	
		Media \pm SD		Media \pm SD		Media \pm SD		Media \pm SD		Media \pm SD	
Línea Susceptible	12	1.847 \pm 0.516	bc	1.401 \pm 0.124	d	0.006 \pm 0.006	bc	0.000 \pm 0.000	c	0.236 \pm 0.081	c
Celaya	12	2.337 \pm 0.295	a	2.589 \pm 0.142	a	0.012 \pm 0.007	ab	0.042 \pm 0.036	b	0.207 \pm 0.021	c
V. de Santiago	12	1.995 \pm 0.282	b	2.068 \pm 0.075	b	0.004 \pm 0.003	c	0.065 \pm 0.035	b	0.349 \pm 0.095	b
Abasolo	12	1.974 \pm 0.408	b	1.582 \pm 0.264	cd	0.001 \pm 0.002	c	0.008 \pm 0.016	c	0.275 \pm 0.076	bc
Sn. Luis de la Paz	12	1.722 \pm 0.018	b	1.625 \pm 0.093	c	0.016 \pm 0.004	a	0.130 \pm 0.010	a	2.003 \pm 0.145	a

Conclusiones

En la zona productora del estado de Guanajuato, las esterasas y oxidasas son las enzimas con mayor presencia, responsables de la resistencia en *P. xylostella*. Por su parte, glutatión s-transferasa y acetilcolinesterasa no presentan relevancia como mecanismo detoxicativo, por lo que se propone reducir las aplicaciones de productos organofosforados y carbamatos.

Bibliografía

- Ahmad, M. I. Denholm, R. H. Bromilow. 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan, *Pest Manag. Sci.* 62 805-810. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1225/>
- APRD, Arthropod Pesticide Resistance Database www.pesticideresistance.com. 2015. Date of access: 23/08/2015.
- Attique M. N. R., Khaliq A, Sayyed A.H. 2006 Could resistance to insecticides in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) be overcome by insecticide mixtures. *J Appl Entomol* 130: 122-127. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0418.2006.01035.x/>
- Bass, C. I. Denholm, M. S. Williamson, R. Nauen, 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 121 78-87. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357515000826>
- Bass, C. L. M., 2011 Field, Gene Amplification and Insecticide Resistance, *Pest Manag. Sci.* 67 886-890. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2189/>
- Bautistaa, M. A. M. T. Miyataa, K. Miuraa, T. Tanaka, 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39 38-46. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174808001732>
- Bisset, J. A.; Rodríguez, M. M.; Molina, D.; Díaz, C.; Soca, L. A., 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(1): 37-43.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602001000100007.

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>

Brogdon W. G., 1984. Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 457-459. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6509934>.

Brogdon W. G., Barber A., 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pest. Biochem. Physiol.* 29: 252-259.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048357587901556>.

Brogdon, W. G., 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90: 145-150.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0742841388901107>.

Brogdon, W. G.; Barber, A. M., 1990. Microplate assay of glutathione s-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96: 339-342.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049190903857>.

Brogdon, W. G.; Dickinson, M. C., 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry*, 131: 499-503. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6614483>.

Brogdon, W. G.; Mcallister, J. C; Vulule, J., 1997. Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American*

Mosquito Control Association, 13: 233-237.
http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V13_N3_P23

Bújanos, Muñiz, R.; Marín Jarillo, A.; Díaz Espino, L. F.; Gámez, Vázquez, J.; Ávila, Perches, M. A.; Herrera, Vega, R.; Dorantes González, J. R. A.; Gámez, Vázquez, F. P., 2013. Manejo Integrado De La Palomilla Dorso De Diamante *Plutella xylostella* (L.) En La Región Del Bajío, México. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México. Folleto Técnico Núm. 27.
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3911>

Clark, J. M., Scott, J. G.; Campos, F.; Bloomquist, J. R., 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. Annual Review Entomology, 40: 1-30.
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.40.010195.00024>

Da Silva, Carvalho, J., 2008. *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Efeito Da Sinigrina Aplicada Em Folhas De Couve E Brócolis. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Campus De Jaboticabal.
<http://www.scielo.br/pdf/asagr/v32n1/v32n1a03.pdf>.

Dary O, Georghiou GP, Parsons E, Pasteur N., 1990. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. J. Econ. Entomol. 83: 2187-2192.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2280047>.

Díaz C.; Rodríguez, M. M.; Fresneda, M.; Bisset, J. A., 2004. Determinación de la actividad glutatión-s-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. Revista Cubana de Medicina Tropical, 56(2): 111-116. <http://scielo.sld.cu/scielo>.

php?script=sci_arttext&pid= S0375-07602004000200005.

- Eziah, V. Y. H. A. Rose, M. Wilkes, A. D., 2009. Biochemical mechanisms of insecticide resistance in the diamondbackmoth (DBM), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), in the Sydney region, Australian, Aust. J. Entomol. 48 321-327. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-6055.2009.00723.x/pdf>.
- Furlong, M. J. D. J. Wright, L. M., 2013. Dossall, Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. Annu. Rev. Entomol. 58 517-541. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-120811-153605>
- Heckel D. G., 2006. Chemical and biological insecticides: resistance mechanisms and management in diamondback moth, in The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests: Proc 5th Internat Workshop, ed. by Shelton AM, Collins HL, Zhang Y and Wu Q. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing, China, pp. 30–43. <http://web.entomology.cornell.edu/shelton/diamondback-moth/2006-workshop.html>.
- Hu, Z. D X. Feng, S. Q. Lin, H. Y. Chen, Z. Y. Li, F. Yin, P. Liang, X. W., 2014a). Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus, J. Integr. Agr. 13:2452-2459. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311914607486>.
- Hu, Z. D. S. Q. Lin, H. Y. Chen, Z. Y. Li, F. Yin, X., 2014b. Identification of a novel cytochrome P450 gene, CYP321E1 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance, Bull. Entomol. Res. 104, 716-723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25208571>.

INIFAP, 2013. Producción de brócoli en el bajo. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México.

file:///Users/macbook/Downloads/PRODUCCION%20DE%20BROCOLI.pdf.

Khaliq A, Attique M. R., Sayyed A. H., 2007. Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. Bull Entomol Res 97: 191-200. <https://doi.org/10.1017/S0007485307004877>.

Landeros, J.; Ail, C.; Cerna, E.; Ochoa, Y.; Guevara, L.; Aguirre, L., 2010. Susceptibilidad y mecanismos de resistencia de *Tetranychus urticae* en rosas de invernaderos. Revista Colombiana de Entomología, 36(1): 5-9. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v36n1/v36n1a02.pdf>

Li, X. C. M. A. Schuler, M. R. Berenbaum, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics, Annu. Rev. Entomol. 52 231-253. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>

Lui, T. X.; Hutchison, W. D.; Chen, W., Burkness. E. C., 2003. Comparative susceptibilities of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) from Minnesota and South Texas to Cyhalothrin and Indoxcarb. Journal of Economic Entomology 94 (4): 1230-1236. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/14503595/>

Mohan, M.; Gujar, G. T., 2002. Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. Crop Protection Vol 22, 3:495-50. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219402002016>.

- Ortelli, F.; Rossiter, L. C.; Vontas, J.; ranson, H.; Hemingway, J., 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 373 (Pt 3): 957-63. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.578.2879&rep=rep1&type=pdf>
- Pimentel M. A. G., Antonino F. L. R., Duarte B. M., Humberto S., 2008. Resistance of storedproduct insects to phosphine. *Pesq. Agropec. Bras.* 43: 1671-1676. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2008001200005.
- Ponce, G. G.; Badii, M.; Mercado, R.; Flores, A. E., 2009. Esterases in *Aedes albopictus* from Northeastern Mexico. *Soutwestern entomologist*, 34(4): 477-484. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.3958/059.034.0411>.
- Sarfraz M, Dossall LM, Keddie BA., 2006. Diamondback moth-host plant interactions: im- plications for pest management. *Crop Protection*; 25 (7): 625–639. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219405002565>.
- Sayyed, A. H. and Wright, D. J., 2006. Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag. Sci.* 62 1045-1051. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1270/>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2014. En: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Consultada: 7 de Abril del 2015.
- Thuler, R.T., 2006. *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutelidae): estratégias para o manejo integrado. 83f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola), Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/102318>.

- Torres, A. L.; Boiça Júnior, A. L.; Medeiros, C. A. M.; Barros, R., 2006. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia*, Campinas, v. 65, n. 3, p. 447-457. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/2362>
- Toshio, S., Zhang, L., Scott, J.G., 2004. Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8, 106–112. <http://scott.entomology.cornell.edu/125.pdf>.
- Xia, Y. M. Y. H. Lu, J. Shen, X. W. Gao, H. Qiu, J. H. Li, 2014. Resistance monitoring for eight insecticides in *Plutella xylostella* in central China. *Crop Prot.* 63 131-137. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414001008>.
- Mohan, M.; Gujar, G. T., 2002. Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop Protection Vol 22*, 3:495-50. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219402002016>.

Susceptibilidad a Insecticidas de la Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella* L.) (Lepidoptera: Plutellidae) en el Estado de Guanajuato.

Rodríguez Rodríguez José Francisco²; Cerna Chávez Ernesto¹; Hernández Juárez Agustín¹; Aguirre Uribe Luis Aguirre¹; Landeros Flores Jerónimo¹; Cervantes Ortiz Francisco³; Guevara Acevedo Luis Patricio³ y Ochoa Fuetes Yisa María¹•

¹Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315. ²Estudiante de Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila. ³Instituto Tecnológico de Roque, Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C.P. 38110, Celaya; Gto. •Autor de correspondencia: yisa8a@yahoo.com, tel y fax 844-411-0326

Resumen

Plutella xylostella es la plaga más importante en los cultivos de crucíferas, ocasionando incrementos significativos en los costos de producción, afectando la calidad del producto causando que sea rechazado para su exportación. El control de esta plaga se basa principalmente en insecticidas químicos, aumentando el riesgo de la presencia de residuos en el producto comestible así como el desarrollo de resistencia a los insecticidas empleados contra ella. Se realizaron pruebas de resistencia para la determinación de la susceptibilidad de larvas de tercer instar de *P. xylostella* a spinosad, abamectina, fipronil, cipermetrina, lambda cyhalotrina, imidacloprid, indoxacarb y chlorphenapyr sobre seis poblaciones del estado de Guanajuato y una línea susceptible. Los resultados demuestran que las poblaciones de San Luis de la Paz y Valle de Santiago presentan problemas de resistencia para cipermetrina, mientras que el resto de las poblaciones presentan una tendencia al desarrollo de resistencia contra este insecticida. Para el resto de los insecticidas evaluados no se presentan problemas de resistencia en ninguna de las poblaciones en estudio, considerándose efectivos para el control de esta plaga en el estado de Guanajuato.

Palabras clave: *Plutella xylostella*, insecticidas, resistencia

Abstract

Plutella xylostella is the most important pest in cruciferous crops, causing significant increases in production costs, affecting the quality of the product causing it to be rejected for export. The control of this pest is mainly based on chemical insecticides, increasing the risk of the presence of residues in the edible product and the development of resistance to the insecticides used against it. Resistance tests were carried out to determine the susceptibility of third instar larvae of *P. xylostella* to spinosad, abamectin, fipronil, cypermethrin, lambda cyhalothrin, imidacloprid, indoxacarb and chlorphenapyr on six populations of the Guanajuato state and a susceptible line. The results show that the populations of San Luis de la Paz and Valle de Santiago present resistance problems to cypermethrin, while the rest of the populations have a tendency to develop resistance to this insecticide. For the rest of the evaluated insecticides there are no problems of resistance in any of the populations under study, considering them effective for the control of this pest in the Guanajuato state.

Keyword: *Plutella xylostella*, insecticides, resistance

Introducción

El cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* L.) es de suma importancia socioeconómica en la región del Bajío en México (Montesinos, 2005), siendo el estado de Guanajuato es el principal productor de *B. oleracea*, aportando el 63 % de la producción nacional con un valor de producción de \$ 1, 791,255.00 (SIAP, 2017a), representando una importante fuente de divisas y significativos beneficios para los productores (Bujanos *et al.*, 2013) ya que el 80 % de su producción esta destina a exportación, siendo Estados unidos su principal mercado en ventas internacionales (SIAP, 2017b). *Plutella xylostella* (L.), es la plaga más importante en todo el mundo en los cultivos de crucíferas (Talekar y Shelton, 1993; Fathi *et al.*, 2011; Zalucki *et al.*, 2012), ocasionando incrementos significativos en los costos de producción (INIFAP, 2013), ya que es una especie altamente migratoria y

muy destructiva (Heckel, 2006), afectando la calidad del producto debido a la contaminación por huevos y larvas lo que ocasiona que sea rechazado para su exportación (INIFAP, 2013) y afecta el crecimiento y desarrollo de la planta generando mal formaciones e incluso puede llegar a causar la muerte o pérdida total de la misma (Da Silva, 2008). El control de la Palomilla Dorso de Diamante se basa principalmente en insecticidas químicos de amplio espectro (Tabone *et al.*, 2010, 2012). Desafortunadamente, la mayoría de los insecticidas existentes son dañinos para el medio ambiente y se han observado múltiples efectos secundarios en artrópodos benéficos (Desneux *et al.*, 2007; Biondi *et al.*, 2012, Lu *et al.*, 2012), por otro lado se aumenta el riesgo de la presencia de residuos en el producto comestible como para el personal de campo (Bujanos *et al.*, 2013). Además, debido al uso excesivo de insecticidas comerciales y aplicaciones inadecuadas, la Palomilla Dorso de Diamante ha desarrollado resistencia a los productos utilizados para su control. (Talekar y Shelton, 1993, Tabashnik, 1994, Sun *et al.*, 2012). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2015 *P. xylostella* había desarrollado resistencia a aproximadamente 91 compuestos con diferentes modos de acción, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, benzoilureas, *Bacillus thuringiensis*, avermectinas, spinosinas, fenilpirazoles, indoxacarb, diacilhidrazinas y diamidas (APRD, 2015). El control de esta plaga se ha convertido en un tema de investigación en todas las regiones productoras, con el fin de obtener medidas de control técnicamente apropiadas, económicamente satisfactorias y respetuosas al medio ambiente (Thüler, 2006), ya que sociedad demanda la evaluación de las prácticas agrícolas potencialmente peligrosas, como el uso excesivo de insecticidas (Roberts, 2004). Exigiendo inspecciones estrictas del impacto de dichas prácticas, así como la búsqueda de alternativas para manejar adecuadamente las plagas dentro de un contexto económico, social y ecológico (Barrera *et al.*, 2006). Por lo que es necesario el estudio de nuevas materias activas para el control de esta plaga y que sean potencialmente amigables con la salud humana y el medio ambiente. Por lo antes mencionado el objetivo de la presente investigación fue determinar la susceptibilidad a ocho insecticidas de diferente grupo toxicológico en seis poblaciones de *P. xylostella* del estado de Guanajuato.

Materiales y métodos

Ubicación del experimento: La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitosanidad del Departamento de Ciencias Agropecuarias del Instituto Nacional de México, Instituto Tecnológico de Roque en Celaya, Guanajuato, México.

Insecticidas: Se evaluaron ocho insecticidas químicos de diferente grupo toxicológico como son: abamectina, spinosad, imidacloprid, chlorphenapyr, cipermetrina, indoxacarb, fipronil y lambda cyhalotrina, cada producto se evaluó a 6 dosis que comprendían mortalidades de 0-100 %.

Poblaciones en *Plutella xylostella*: Se estudiaron seis poblaciones de *P. xylostella* del estado de Guanajuato como son: Valle de Santiago, Celaya, San José Iturbide, San Luis de la Paz, Abasolo y Juventino Rosas.

Colecta de material biológico en campo: La colecta en campo se llevó a cabo de forma manual en lotes comerciales de las poblaciones antes mencionadas. Se colectaron larvas, pupas y adultos de *P. xylostella*, las cuales se colocaron en contenedores de plástico y se metieron en hieleras para su traslado a cajas entomológicas (60 cm × 40 cm × 40 cm) en invernadero para la eliminación de entomopatógenos y parasitoides que pudieran estar presentes. Los adultos se alimentaron con miel de abeja, con la finalidad de asegurar su apareamiento y la oviposición, la alimentación de las larvas se realizó con plantas de brócoli de 40-50 días de edad. Los individuos de cada población se reprodujeron hasta F3 y así tener suficientes larvas para su posterior estudio. Como población susceptible se utilizaron individuos proporcionados por el Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), reproducidos desde 1996 sin presión de selección a insecticidas.

Bioensayos: Para la evaluación de los insecticidas se empleó el método de película residual (IRAC, 2017), utilizando larvas de *P. xylostella* de tercer instar. El cual consistió en tomar una hoja de brócoli de 40-50 días de edad y se sumergió en las soluciones en estudio por un tiempo de 10 segundos y se dejó secar en papel absorbente

durante una hora para eliminar excesos, posteriormente fueron colocadas en cajas petri provistas de papel absorbente saturado con agua y se transfirieron 10 larvas de *P. xylostella* por hoja mediante un pincel de pelo de camello 000 y se colocaron en una cámara climática a 27 °C, 50% de humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad. Los conteos de mortalidad de las larvas se realizaron a las 24 h a partir del inicio del experimento. Como criterio de muerte a los individuos se les realizo a un estímulo con un pincel en la parte dorsal, todo aquel que no respondía a dicho estímulo fue considerado como muerto. Se utilizó un diseño experimental completo al azar con 6 tratamientos y un testigo blanco el cual fue agua más adherente, con 3 repeticiones cada uno.

Análisis estadístico: Con los datos obtenidos de los bioensayos se realizó una corrección de mortalidad con la fórmula propuesta Abbott (1925). Los resultados de la corrección de mortalidad se sometieron a un Análisis Probit (Finney, 1971) para obtener la curva de respuesta concentración-mortalidad y así determinar la CL_{50} , utilizando el programa estadístico computacional SAS System. Una vez obtenida la CL_{50} para las líneas de campo y la línea susceptible, se determinó la proporción de resistencia dividiendo los valores de CL_{50} de las líneas de campo contra la CL_{50} de la línea susceptible (Georghiou, 1962).

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la respuesta de la línea susceptible (LS) de *P. xylostella* en relación a ocho insecticidas de diferente grupo toxicológico. La CL_{50} fue de 43.24, 10.54, 289.45, 2.73, 0.09, 10.10, 3.38 y 0.72 ppm para los insecticidas cipermetrina, imidacloprid, lambda cyahalotrina, spinosad, fipronil, indoxacarb, chlorphenapyr y abamectina respectivamente. La CL_{50} para cipermetrina (43.24 ppm) en este estudio es superior a la reportada por Shao *et al.* (2013) en otra línea susceptible (3.55 ppm). En lo que se refiere al resultado de imidacloprid (1054 ppm) es 219.5 veces mayor a lo reportado por Ninsin (2004) en insecticida neonicotinoide (acetamiprid) en la línea susceptible KOBII-NS strain. Para lambda

cyhalotrina la CL₅₀ fue 289.45 ppm, este resultado es inferior a lo reportado por Bujanos *et al.* (2003) en otra línea susceptible donde determinaron una CL₅₀ de 850 ppm, por su parte Balasubramani *et al.* (2008) reportaron una CL₅₀ de 10 ppm para la línea susceptible Lab-UK. En relación al spinosad el resultado 2.73 ppm supero el comportamiento de otras líneas susceptibles, Barrera *et al.* (2006) reporto un resultado de 0.004 ppm, mientras que Shao *et al.* (2013) obtuvo una CL₅₀ de 0.12 ppm. La CL₅₀ de Fipronil fue 0.09 ppm el cual es 2.2 veces más alto en comparación a otra línea susceptible evaluada por Barrera *et al.* (2006), para este mismo insecticida Mohan y Gujar (2003) reporto una CL₅₀ de 0.22 ppm en la línea susceptible IARI 17-65. En relación al insecticida indoxacarb se determinó una CL₅₀ de 10.10 ppm la cual supero comportamiento de otras líneas susceptibles, Barrera *et al.* (2006), Shao *et al.* (2013) y Santos *et al.* (2011) reportaron resultados de 0.46, 0.52 y 0.2 ppm respectivamente. Chlorphenapyr presentó una CL₅₀ de 3.38 ppm superando 8.4 veces el valor reportado por Shao *et al.* (2013). En relación a abamectina la CL₅₀ (0.72 ppm) fue superior a lo reportado por Shao *et al.* (2013) y Santos *et al.* (2011) con resultados de 0.02 ppm y 0.01 ppm respectivamente.

Tabla 1. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea susceptible (LS) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella*.

Línea Susceptible (LS)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	Pr>
Cipermetrina	30	43.243	26.771 – 78.582	143.410	y=-4.0266+2.4614	<.0001
Imidacloprid	30	1054	962.329 - 1147	3677	y=-9.1598+3.0303	<.0001
Lambda cyhalotrina	30	289.450	246.824 - 334.398	605.853	y=-9.8338+3.9950	<.0001
Spinosad	30	2.735	1.436 - 4.712	24.395	y=-0.5892+1.3485	<.0001
Fipronil	30	0.098	0.040 - 0.198	0.643	y= 1.5829+1.5715	<.0001
Indoxacarb	30	10.104	4.393 - 21.009	237.203	y=-0.9392+0.9350	<.0001
Chlorphenapyr	30	3.383	2.516 - 4.309	10.938	y=-2.3798+3.0188	<.0001
Abamectina	30	0.727	0.228 - 1.885	10.446	y= 0.1531+1.1074	<.0001

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, Pr= Probabilidad.

En las tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos sobre las líneas de campo de *P. xylostella* colectadas en el estado de Guanajuato. Para el insecticida cipermetrina la L1 y L3 presentaron las CL₅₀ más altas con 528.22 y 491.79 ppm respectivamente, mientras que la población L4 reporto la CL₅₀ más baja (245.48 ppm). Estos resultados son superiores a los presentados por Zhang *et al.* (2016) en un estudio realizado sobre líneas de campo *P. xylostella* con CL₅₀ de 3.30 a 43.51 ppm. L2 y L4 obtuvieron los resultados más elevados para imidacloprid con 1,227 y 1,156 ppm respectivamente, por otro lado la L5 presento la CL₅₀ más baja (411.10 ppm). Ninsin (2004) reporto una CL₅₀ de 3,720 ppm para el insecticida acetamiprid. En lambda cyhalotrina la CL₅₀ mayor fue 457.62 ppm (L5) y la menor de 331.74 ppm (L3), estos resultados son similares a los reportados por Bujanos *et al.* (2003) que determino CL₅₀ de 430 ppm en una línea de campo del estado de Guanajuato, lo que significa que no se ha presentado una disminución en la toxicidad de lambda cyhalotrina en el estado de Guanajuato, por su parte Balasubramani *et al.* (2008) reporto una CL₅₀ de 1,070 ppm. Lo que se refiere a spinosad la CL₅₀ vario entre las poblaciones en estudio de 5.17 ppm (L5) a 1.50 ppm (L4), estos resultados son similares a los reportados por Zhang *et al.* (2016) en líneas de campo de *P. xylostella* con un valor máximo de 2.57 ppm, por su parte Barrera *et al.* (2006) obtuvo resultados inferiores a los de esta investigación con una variación de 0.03 ppm a 0.05 ppm en poblaciones de campo del estado del Guanajuato, considerando una disminución de la eficacia de este insecticida para la zona en estudio. Sin embargo Zhao *et al.* (2002) reporta resultados superiores para líneas de campo que va de 44.6 ppm a 837 ppm.

Tabla 2. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea de campo San Luis de la Paz (L1) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

San Luis de la Paz (L1)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R ₅₀
Cipermetrina	30	528.226	433.099 - 664.736	1099	y=-10.9634+4.0264	12.2
Imidacloprid	30	1019	895.230 - 1149	5881	y=-6.4973 +2.1600	0.9
Lambda cyhalotrina	30	414.07	335.117 - 524.208	907.786	y=-9.8381+3.7592	1.4
Spinosad	30	3.221	1.257 - 7.199	26.344	y=-0.7133+1.4042	1.2
Fipronil	30	0.282	0.155 - 0.521	3.083	y= 0.6774+1.2355	2.9
Indoxacarb	30	18.51	8.816 - 35.462	267.672	y=-1.4000+1.1046	1.8
Chlorphenapyr	30	4.754	4.133 - 5.419	20.066	y=-1.3876+2.0493	1.4
Abamectina	30	1.812	0.902 - 4.231	45.753	y=-0.2360+0.9140	2.5

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, P.R= Proporción de resistencia.

Tabla 3. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea de campo San José Iturbide (L2) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

San José Iturbide (L2)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R ₅₀
Cipermetrina	30	317.552	226.632 - 452.476	649.099	y=-10.3261+4.1274	7.3
Imidacloprid	30	1227	882.131 - 1620	4849	y=-6.6325+2.1472	1.2
Lambda cyhalotrina	30	401.841	329.669 - 494.178	790.410	y=-11.3589+4.3620	1.4
Spinosad	30	3.085	1.328 - 6.217	24.811	y= -0.6925+1.4155	1.1
Fipronil	30	0.111	0.040 - 0.272	0.910	y= 1.3390+1.4062	1.1
Indoxacarb	30	17.231	12.812 - 22.952	371.463	y= -1.1881+0.9610	1.7
Chlorphenapyr	30	4.595	2.833 - 6.789	20.013	y= -1.3284+2.0056	1.4
Abamectina	30	1.386	0.564 - 4.119	73.253	y= -0.1055+0.7438	1.9

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, P.R= Proporción de resistencia.

Tabla 4. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea de campo Valle de Santiago (L3) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Valle de Santiago (L3)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R ₅₀
Cipermetrina	30	491.797	368.859 - 701.189	1056	y=-10.3983+3.8630	11.4
Imidacloprid	30	1054	962.329 - 1147	2790	y=-9.1598+3.0303	1
Lambda cyhalotrina	30	331.745	209.277 - 496.823	1075	y=-6.3253+2.5093	1.1
Spinosad	30	2.506	1.965 - 3.148	34.591	y=-0.4487+1.1243	0.9
Fipronil	30	0.209	0.155 - 0.282	6.552	y= 0.5819+0.8570	2.1
Indoxacarb	30	43.991	22.649 - 86.548	468.150	y=-2.0507+1.2478	4.4
Chlorphenapyr	30	4.106	1.793 - 7.134	19.733	y=-1.1530+1.8797	1.2
Abamectina	30	1.151	0.450 - 2.821	15.344	y=-0.0695+1.1393	1.6

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, P.R= Proporción de resistencia.

En relación al fipronil las poblaciones L1, L2, L3 y L4 se comportaron de manera similar con una CL₅₀ que va de 0.11 ppm a 0.20 ppm, mientras que las poblaciones L5 y L6 presentaron los resultados más altos con una CL₅₀ de 0.48 y 0.40 ppm respectivamente. Mohan y Gujar (2003) en un estudio realizado en líneas de campos reportaron CL₅₀ que va de 1.83 ppm a 2.44 ppm, por su parte Barrera *et al.* (2006) presento resultados inferiores (0.03 ppm) para líneas campo del estado de Guanajuato lo cual demuestra que a través del tiempo se ha incrementado la resistencia de *P. xylostella* a este insecticida 16 veces. La L3 reporto la CL₅₀ mas alta (43.99 ppm) para el producto indoxacarb, mientras L6 presentó el valor menor con 11.39 ppm, estos resultados son menores a los obtenidos por Nehare *et al.* (2009) con una CL₅₀ de 50.83 ppm a 167.82 ppm, por su parte Santos *et al.* (2011) y Barrera *et al.* (2006) obtuvieron CL₅₀ inferiores a las reportadas en este estudio que van de 0.2 ppm a 7.6 ppm y 0.56 ppm a 0.77 ppm respectivamente. De acuerdo a los resultados reportados por Barrera *et al.* (2006) se puede observar un disminución en la eficacia de indoxacarb en la zona del estado de Guanajuato. En relación a chlorphenpyr las poblaciones de la L1 a la L5 se comportaron de manera similar con CL₅₀ de 4.10 ppm a 4.75 ppm, mientras que la L6 reporto la CL₅₀

mas alta (7.33 ppm). Estos resultados son similares a los reportados por Zhang *et al.* (2016) en un estudio sobre líneas de campo donde determino una CL₅₀ máxima de 5.38 ppm para este insecticida. Los resultados de la CL₅₀ para abamentina reportaron una variación de 0.69 ppm a 2.44 ppm, presentado una similitud con el comportamiento de otras líneas de campo evaluadas por Zhang *et al.* (2016) y Oliveira *et al.* (2011), donde determinaron CL₅₀ de 0.48 ppm a 1.90 ppm y 1.83 ppm a 2.61 ppm respectivamente. Por otro lado Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado en líneas de campo del estado de Guanajuato reporto CL₅₀ de 0.005 ppm a 0.008 ppm para el insecticida benzoato de enamectina, por lo que se puede considerar que existe una disminución en la toxicidad para insecticidas pertenecientes al grupo avermectinas en el estado de Guanajuato.

Tabla 5. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea de campo Abasolo (L4) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Abasolo (L4)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R ₅₀
Cipermetrina	30	245.489	219.024 - 273.324	822.396	y=-10.1825+3.9325	5.7
Imidacloprid	30	1156	1043 - 1279	3749	y=-6.2469+2.3898	1.1
Lambda cyhalotrina	30	382.204	298.857 - 507.508	965.839	y=-8.3006+3.2102	1.3
Spinosad	30	1.508	0.533 - 3.027	13.910	y=-0.2372+1.3284	0.6
Fipronil	30	0.154	0.091 - 0.253	1.406	y= 1.0835+1.3376	1.6
Indoxacarb	30	14.595	7.074 - 28.519	428.855	y=-1.0162+0.8729	1.4
Chlorphenapyr	30	4.780	3.961 - 5.683	37.102	y=-0.9785+1.4401	1.4
Abamectina	30	2.445	2.010 - 3.014	22.477	y=-0.5165+1.3302	3.4

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, P.R= Proporción de resistencia.

Tabla 6. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea de campo Celaya (L5) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Celaya (L5)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R ₅₀
Cipermetrina	30	388.44	330.844 - 464.440	822.643	y=-10.1825+3.9325	9.0
Imidacloprid	30	411.108	367.549 - 457.749	1413	y=-6.2469+2.3898	0.4
Lambda cyhalotrina	30	457.620	425.628 - 494.524	13.707	y=-10.1208+3.8041	1.6
Spinosad	30	5.175	3.340 - 8.557	22.792	y= -0.8572+1.2006	1.9
Fipronil	30	0.482	0.383 - 0.615	5.693	y= 0.3786+1.1954	4.9
Indoxacarb	30	36.423	26.593 - 50.774	1151	y= -1.3343+0.8546	3.6
Chlorphenapyr	30	5.678	1.762 - 9.465	22.792	y= -1.6016+2.1234	1.7
Abamectina	30	0.698	0.320 - 1.383	13.707	y= 0.1546+0.9911	1.0

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, P.R= Proporción de resistencia.

Tabla 7. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de insecticidas aplicados a la línea de campo Juventino Rosas (L6) de larvas de tercer instar de *Plutella xylostella* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Juventino Rosas (L6)						
Insecticida	n	CL ₅₀ (ppm)	LFI -LFS	CL ₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R ₅₀
Cipermetrina	30	420.081	345.993 - 524.389	783.729	y=-12.4133+4.7319	9.7
Imidacloprid	30	1054	962.329 - 1147	2790	y=-9.1598+3.0303	1
Lambda cyhalotrina	30	375.327	319.441 - 445.161	45.145	y=-9.5010+3.6905	1.3
Spinosad	30	4.352	3.535 - 5.376	834.953	y=-0.8059+1.2616	1.6
Fipronil	30	0.407	0.226 - 0.787	153.858	y= 0.4174+1.0696	4.2
Indoxacarb	30	11.396	5.177 - 21.927	6.426	y=-1.1981+1.1338	1.1
Chlorphenapyr	30	7.339	5.338 - 10.176	32.710	y=-1.7094+1.9746	2.2
Abamectina	30	0.779	0.464 - 1.262	17.795	y= 0.1022+0.9432	1.1

n=Número de individuos, LFI= Limite Fiducial Inferior, LFS = Limite Fiducial superior, P.R= Proporción de resistencia.

En las Tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se presentan los resultados de la proporción de resistencia de las poblaciones en estudio en función a la línea susceptible. La proporción de

resistencia, nos permite discriminar poblaciones con problemas de resistencia, considerando resistentes aquellas que presentan un factor de 10 veces al comparar las líneas de campo y la línea susceptible. Jiang *et al.* (2015) reportan factores de resistencia mayores a 25.1 veces en líneas de campo para cipermetrina, por su parte Zhang *et al.* (2016) determinaron una resistencia superior a 69.76 veces en relación a su línea susceptible para este mismo insecticida, mientras que Bujanos *et al.* (2003) no reportaron resistencia (8 veces) para una línea de campo de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato, estos resultados difieren a lo reportado en este estudio, donde se encontró resistencia a cipermetrina en las líneas L1 (12.2 veces) y L3 (11.4 veces), mientras que el resto de las líneas evaluadas presentan una tendencia a generar resistencia, demostrando que ha habido una pérdida de toxicidad de cipermetrina en el estado de Guanajuato. Ninsin, (2004) reporto una resistencia de 77.3 veces para un insecticida neonicotinoide (acetamiprid), lo cual difiere a lo encontrado en esta investigación donde también se evaluó un insecticida del mismo grupo toxicológico (imidacloprid) y se reportó una proporción de resistencia máxima de 1.2 (L2) veces. Balasubramani *et al.* (2008) reportaron un factor de resistencia (107 veces) en lambda cyhalotrina para líneas de campo de *P. xylostella*, por otro lado Bujanos *et al.* (2003) en un estudio sobre una línea de campo del estado de Guanajuato no reportaron resistencia (1 veces) de este insecticida en *P. xylostella*, lo cual concuerda con los resultados de esta investigación donde no se muestran problemas de resistencia con un valor máximo de 1.6 veces (L5). En relación a spinosad Jiang *et al.* (2015) y Zhang *et al.* (2015) reportaron resistencia en diferentes líneas de campo de *P. xylostella* con valores máximos de resistencia de 34.4 y 21.4 veces respectivamente. Por su parte Barrera *et al.* (2006) obtuvieron factores de resistencia de 12.5 y 10 veces para líneas de campo del estado de Guanajuato, superando lo reportado en este estudio donde la resistencia más alta para spinosad se presentó en L5 (1.9 veces), significando una disminución en la resistencia de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato a spinosad, lo cual se les puede atribuir al buen manejo y rotación de este insecticida. Sayyed *et al.* (2005) y Barrera *et al.* (2006) no reportaron resistencia de *P. xylostella* al producto fipronil con proporciones de resistencia de 1 y 0.7 veces, coincidiendo con los resultados de esta investigación donde no se reporta resistencia a fipronil y se presenta un valor máximo de 4.9 veces (L5). Para el insecticida indoxacarb

Nehare *et al.* (2010) reportó una resistencia de 31.3 veces en líneas de campo de *P. xylostella*, por su parte Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado sobre diferentes poblaciones de campo de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato no reportó problemas de resistencia (1.7 veces), lo cual coincide con lo encontrado en esta investigación donde no se reportó problemas de resistencia un valor máxima de 4.9 veces (L5), pero se puede apreciar una pequeña disminución en la toxicidad de este insecticida. En relación al insecticida chlorphenapyr, Jiang *et al.* (2016) determinaron factores de resistencia en líneas de campo de *P. xylostella* que van de 2.9 a 260.1 veces, mientras que Zhang *et al.* (2015) reportaron una resistencia de 13.4 veces, estos resultados difieren a los presentados en este estudio donde se reporta un valor de resistencia máximo de 2.2 veces (L6). Para el producto abamectina Zhang *et al.* (2016) y Jian *et al.* (2015) reportaron resistencia en líneas de campo de *P. xylostella* con valores de 95.15 y 31.4 veces respectivamente, mientras que Santos *et al.* (2011) y Oliveira *et al.* (2011) no reportaron resistencia de *P. xylostella* para este insecticida con proporciones de resistencia de 1.4 y 3.3 veces respectivamente, por su parte Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado en líneas de campo de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato reportó una resistencia de 2.0 veces para benzoato de ivermectina, de acuerdo a lo reportado en esta investigación demuestra que no hay aumento en la resistencia de *P. xylostella* para insecticidas del grupo toxicológico avermectinas en la zona en estudio.

Conclusiones

De acuerdo a la información generada en esta investigación, las poblaciones San Luis de la Paz y Valle de Santiago reportan resistencia para cipermetrina, mientras que el resto de las poblaciones en estudio presentan una tendencia a desarrollar resistencia a este producto, por lo que se recomienda la disminución de las aplicaciones y rotación de cipermetrina en el estado de Guanajuato. Para el resto de los insecticidas evaluados no se reportó resistencia en ninguna de las poblaciones en estudio, por lo que se consideran efectivos para el control de *P. xylostella* en el estado de Guanajuato.

Literatura

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- APRD, Arthropod Pesticide Resistance Database www.pesticideresistance.com 2015.
Date of access: 23/08/2015.
- Balasubramani, V., Sayyed, A. H., & Crickmore, N. (2008). Genetic characterization of resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from India. *Journal of economic entomology*, 101(6), 1911-1918.
- Barrera Urzúa, R., Bujanos Muñiz, R., Rodríguez Maciel, J. C., Mora Aguilera, G., & Martínez Téllez, M. Á. (2006). Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) del estado de Guanajuato, México. *Agrociencia*, 40(3).
- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., Zappalà, L., 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere* 87, 803e812.
- Bujanos Muñiz, R., Rodríguez Maciel, J. C., Byerly Murphy, K. F., Hoy, C. W., & Díaz Gómez, O. (2003). Dilución de insecticidas y reducción de toxicidad sobre larvas de dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Agricultura Técnica en México*, 29(2).
- Bújanos, Muñiz, R.; Marín Jarillo, A.; Díaz Espino, L. F.; Gámez, Vázquez, J.; Ávila, Perches, M. A.; Herrera, Vega, R.; Dorantes González, J. R. A.; Gámez, Vázquez, F. P. 2013. Manejo Integrado De La Palomilla Dorso De Diamante *Plutella xylostella* (L.) En La Región Del Bajío, México. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México. Folleto Técnico Núm. 27.
- Da Silva, Carvalho, J. 2008. *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Efeito Da Sinigrina Aplicada Em Folhas De Couve E Brócolis.

Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Campus De Jaboticabal.

- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81e106.
- Fathi, S.A.A., Bozorg-Amirkalae, M., Sarfaraz, R.M., 2011. Preference and performance of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on canola cultivars. *J. Pest Sci.* 84, 41e47
- Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge at the Univ. Press. 3rd Ed. 120 p.
- Georghiou, G. P. 1962. Carbamate insecticides: Toxication synergized carbamates against twelve resistant strain of the house fly. *Journal of Economic Entomology* 55: 768-769.
- Heckel D.G. 2006. Chemical and biological insecticides: resistance mechanisms and management in diamondback moth, in *The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests: Proc 5th Internat Workshop*, ed. by Shelton AM, Collins HL, Zhang Y and Wu Q. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing, China, pp. 30–43.
- INIFAP, 2013. Producción de brócoli en el bajío. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México.
- IRAC (Resistance Action Committee insecticida), 2017. En: <http://www.irac-online.org/methods/plutella-xylostella-larvae/> Consultado: 29 de Junio del 2017.
- Jiang, T., Wu, S., Yang, T., Zhu, C., & Gao, C. (2015). Monitoring field populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) for resistance to eight insecticides in China. *Florida entomologist*, 98(1), 65-73.
- Lu, Y.H., Wu, K.M., Jiang, Y.Y., Guo, Y.Y., Desneux, N., 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature* 487, 362e365.

- Mohan, M., & Gujar, G. T. (2003). Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop protection*, 22(3), 495-504.
- Montesinos, S.G. 2005. Modelo de manejo de las unidades calor en el cultivo de brócoli y sus principales plagas. Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de producción de las crucíferas. COTECO. Guanajuato, México. 95 p.
- Nehare, S., Moharil, M. P., Ghodki, B. S., Lande, G. K., Bisane, K. D., Thakare, A. S., & Barkhade, U. P. (2010). Biochemical analysis and synergistic suppression of indoxacarb resistance in *Plutella xylostella* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(2), 91-95.
- Ninsin, K. D. (2004). Acetamiprid resistance and cross-resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pest management science*, 60(9), 839-841.
- Oliveira, A. C. D., Siqueira, H. Á. A. D., Oliveira, J. V. D., Silva, J. E. D., & Michereff Filho, M. (2011). Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. *Scientia Agricola*, 68(2), 154-159.
- Roberts, M. J. 2004. Risk, government programs, and the environment. Technical bulletin 1908. Economic Research Service, USDA. Washington D. C., USA. 52 p.
- Santos, V. C., De Siqueira, H. A. A., Da Silva, J. E., & De Farias, M. J. D. C. (2011). Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. *Neotropical entomology*, 40(2), 264-270.
- Sayyed, A. H., Attique, M. N. R., Khaliq, A., & Wright, D. J. (2005). Inheritance of resistance and cross-resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Pest management science*, 61(7), 636-642.
- Shao, Z. R., Feng, X., Li, S., Li, Z. Y., Huang, J. D., Chen, H., Hu, Z. D., Guideline for insecticide resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) on cruciferous vegetables, Beijing, China Agriculture Press, 2013.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2017a. En: http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/ Consultado: 29 de Junio del 2017.

- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2017b. En: <https://www.gob.mx/siap/articulos/casi-la-totalidad-de-las-verduras-mexicanas-congeladas-van-al-extranjero?idiom=es> Consultado: 01 de Marzo del 2017.
- Sun, J.Y., Liang, P., Gao, X.W., 2012. Cross-resistance patterns and fitness in fufenozide-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manag. Sci.* 68, 285e289.
- Tabashnik, B.E., 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 47e79.
- Tabone, E., Bardon, C., Desneux, N., 2012. Dispersal study as Trichogrammatidae selection criteria for biological control in cauliflower greenhouses. *Acta Horticulturae* 927, 227e235.
- Tabone, E., Bardon, C., Desneux, N., Wajnberg, E., 2010. Parasitism of different Trichogramma species and strains on *Plutella xylostella* L. on greenhouse cauliflower. *J. Pest Sci.* 83, 251e256.
- Talekar, N.S., Shelton, A.M., 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38, 275e301.
- Thüler, R.T. (2006). *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): estratégias para o manejo integrado. 83f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola), Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal.
- Zalucki, M.P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L., Furlong, M.J., 2012. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *J. Econ. Entomol.* 105, 1115e1129.
- Zhang, S., Zhang, X., Shen, J., Mao, K., You, H., & Li, J. (2016). Susceptibility of field populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to a selection of insecticides in Central China. *Pesticide biochemistry and physiology*, 132, 38-46.

Zhao, J. Z., Li, Y. X., Collins, H. L., Gusukuma-Minuto, L., Mau, R. F. L., Thompson, G. D., & Shelton, A. M. (2002). Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology*, 95(2), 430-436.