

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Caracterización de la Resistencia a Fipronil en *Plutella xylostella* L.
(LEPIDOTERA: PLUTELLIDAE) en el Estado de Guanajuato

Por:

EDUARDO DE LA FUENTE GUTIÉRREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre del 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Caracterización de la Resistencia a Fipronil en *Plutella xylostella* L.
(LEPIDOTERA:PLUTELLIDAE) en el Estado de Guanajuato

Por:

EDUARDO DE LA FUENTE GUTIÉRREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor Principal



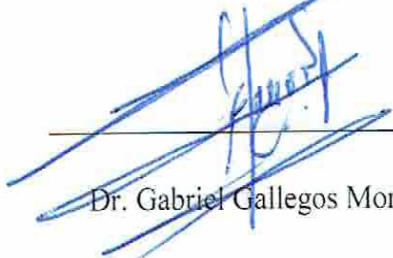
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Coasesor



M.C José Francisco Rodríguez Rodríguez

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre del 2018

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por la salud e iluminarme en el camino, por no dejarme solo nunca y cuidar de mis seres queridos.

A MI ALMA TERRA MATER, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

Por abrirme las puertas y cobijarme con sus enseñanzas, por haberme brindado la oportunidad de superarme en tanto personal como profesionalmente, por formar parte de mi vida, por haberme dado las herramientas necesarias para ser mejor persona.

AL DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO: Por darme las herramientas necesarias para mi formación y desarrollo profesional y por permitirme ser parte de esa carrera llena de conocimientos y prestigio.

A MIS ASESORES: Por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por la orientación, por brindarme su apoyo, tiempo y dedicación, por dar respuesta a mis preguntas y dudas que se generaron al momento de realizar este trabajo y por compartir sus conocimientos.

AL M.C José Francisco Rodríguez Rodríguez: Por su tiempo, paciencia, aportaciones y correcciones para la realización de este trabajo.

A LOS PROFESORES: Que fueron parte fundamental de mí formación profesional, que me inculcaron el conocimiento adquirido y por brindarme su apoyo.

A MIS AMIGOS: Gracias por brindarme su valiosa amistad, por todos los momentos buenos que pasamos, por el apoyo que me brindaron durante mi estancia.

¡Éxito y suerte!

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Isidra Gutiérrez Zamora y Rodolfo De La Fuente Aguilar

Por darme la vida y la mejor herencia que pudieron darme que es el estudio, por estar conmigo, por impulsarme a seguir adelante, por creer en mí a pesar de todo, por inculcarme buenos valores, por cuidar de mí en todo este tiempo, por no perder la fe en mí, por sus sabios consejos, por sacrificarse para sacar adelante a la familia, por hacer de mí una persona de bien, por eso y más ¡LOS AMO Y ADMIRO MUCHO!

A MIS HERMANOS:

Juan De La Fuente Gutiérrez, Julio De La Fuente Gutiérrez y Rodolfo De La Fuente Gutiérrez

A ustedes por cariño y apoyo moral, por sus consejos y las grandes experiencias que hemos vivido, ustedes que son un gran pilar en mi vida, por la fortaleza que como familia nos ha unido. Gracias hermanos por todo, siempre estaré agradecido.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Cultivo del brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L.).....	5
Origen.....	5
Taxonomía de <i>Brassica oleracea</i>	5
Importancia económica	6
Producción de brócoli en México	6
Producción de Brócoli en Guanajuato.....	6
Palomilla dorso de diamante (<i>Plutella xylostella</i> L.)	7
Clasificación taxonómica	7
Ciclo de vida de <i>Plutella xylostella</i>	8
Hospederos	9
Daños.....	9

Control.....	9
Resistencia en <i>Plutella xylostella</i>	10
Resistencia.....	10
Tipos de resistencia	11
Determinación de resistencia	12
Bioensayos.....	12
Pruebas bioquímicas	12
Pruebas moleculares	13
Enzimas detoxificativas.....	13
Esterasas	13
Glutation-S-Transferasa	14
Oxidasas de función múltiple (MFO)	15
Acetilcolinesterasa	16
Fipronil	16
Modo de Acción.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Ubicación del experimento.....	17
Colecta de material biológico en campo	18
Insecticida.....	19
Bioensayos.....	19
Inducción de resistencia	20
Pruebas bioquímicas	20
Determinación de proteína a larvas de <i>Plutella xylostella</i>	20
Preparación de homogenatos.....	21
Determinación de α y β -esterasas.....	21
Determinación de Glutation-S-transferasa	22
Determinación de acetilcolinesterasa.....	22

Determinación de oxidasas	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Bioensayos.....	25
Pruebas bioquímicas	26
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lugar del Sitio Experimental.	18
Figura 2. Concentraciones (5, 3, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm) y un testigo blanco (agua más adherente).....	19
Figura 3. Larvas de <i>Plutella xylostella</i> en hoja de brócoli tratada con insecticida.....	20
Figura 4. Determinacion de proteina a larvas de <i>Plutella xylostella</i>	21
Figura 5. Absorbancias de proteína en homogenatos de <i>Plutella xylostella</i> en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2)	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de fipronil aplicado a la generación inicial de larvas de <i>Plutella xylostella</i>	25
Tabla 2. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de fipronil aplicado a la línea susceptible de larvas de <i>Plutella xylostella</i>	26
Tabla 3. Comparación de medias del contenido de β y α -Esterasas en 4 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> y una línea susceptible	28
Tabla 4. Comparación de medias del contenido Acetilcolinesterasa en 4 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> y una línea susceptible	28
Tabla 5. Comparación de medias del contenido de Glutation-S-Transferasas y Oxidasas en 4 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> y una línea susceptible.....	29
Tabla 6. Proporción de resistencia del contenido de enzimas en 4 generaciones de <i>Plutella xylostella</i>	30

RESUMEN

La Palomilla Dorso de Diamante es la principal plaga en las brassicáceas, debido a la gran importancia económica que tienen estos cultivos y los daños generados. Su control se basa principalmente en el uso de productos químicos que sean compatibles con el medio ambiente y con la salud humana, elevando los costos de producción y control. Debido a la alta presión de selección de los insecticidas, ha generado resistencia a la mayoría de materias activas utilizadas para su control. Por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue caracterizar la resistencia a fipronil en larvas de tercer instar de *Plutella xylostella*. Se aplicó una presión de selección (CL_{20}) durante cuatro generaciones y realizaron bioensayos para determinar el desarrollo de resistencia a través de las generaciones, así como pruebas bioquímicas para cuantificar el contenido de α y β Esterasas, Glutathion S Transferasas, Acetil Colinesterasas y Oxidasas, enzimas relacionadas con la resistencia a insecticidas. Los resultados demuestran que, *P. xylostella* es capaz fácilmente de desarrollar resistencia a fipronil al obtener un factor de resistencia de 14.59 con base a una línea susceptible, pero puede haber una pérdida de resistencia si no existe una presión de selección constante de una generación a otra. Por otro lado, Glutathion S Transferasas es la enzima principal que actúa como mecanismo detoxificativo al insecticida fipronil en *P. xylostella* al reportar una proporción de resistencia de 83.33% y una clasificación de muy alterado.

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

INTRODUCCIÓN

El brócoli es originario del Mediterráneo y Asia menor. Italia, Libia y Siria recolectaron los primeros ejemplares de esta planta proveniente de las coles y las coliflores. Ésta hortaliza pertenece a la familia de las Brassicáceas y al género de *Brassicae* (SAGARPA, 2011). Este cultivo una de las mejores hortalizas de la naturaleza, pues avances científicos, han demostrado que su consumo cotidiano prevé cánceres, debido a la presencia de tres poderosos anticancerígenos: indol, sulforafano e isotiocianatos, (Rodríguez, 2011). También se considera un ingrediente muy importante en la nutrición humana por su alto contenido de vitaminas y minerales, ya que es una muy buena fuente de vitamina A, potasio, hierro y fibra, además de ser rico en hidratos de carbono, proteínas y grasa (CORPEI, 2009). En diferentes países, este alimento es altamente demandado y los mercados requieren un producto cada vez más fresco, lavado y correctamente empacado en recipientes plásticos. También se puede elaborar ensaladas mixtas con otros vegetales, se puede deshidratar y secar mediante un procesamiento industrial y suele mezclarse con pasta de arroz o preparar harinas (Hourtart y Yumba, 2013).

En México es una de las hortalizas más importantes, ya que un 80 % de su producción está destinada a su 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 representa una importante fuente de divisas y significativos beneficios para los productores (Bujanos *et al.*, 2013). En 2017 se cultivaron 34,493.28 ha con un valor comercial de 3,343,303.07 miles de pesos (SIAP, 2017a), Los principales estados productores de brócoli en el país son: Guanajuato, Puebla, Michoacán y Sonora con un 85.34% de la producción total en el país, mientras que Guanajuato produce un 63.42 % de la producción nacional (SIAP, 2017a). En la región de El Bajío, es una de las hortalizas de mayor importancia socioeconómica, por la superficie sembrada, por los ingresos que se obtienen y por las fuentes de trabajo que genera (Bujanos y Marín, 2001).

Uno de los principales factores por los que se ve afectada la producción de brócoli en el Estado de Guanajuato es por el insecto-plaga Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella* L.) (FAO, 2010) generando daños en su fase larvaria al deterioran el tejido foliar, al crecer tienen inclinación por los brotes internos e inflorescencia, lo cual produce daño al producto comercial (García, 2012), debido a la contaminación por huevos, larvas y pupas que ocasionan que sea rechazado para su exportación (INIFAP, 2013).

La exigencia del mercado de exportación de requerir alimentos sin presencia de plagas, daños del mismo y con una alta calidad comestible, han inducido el uso excesivo de plaguicidas para asegurar estos índices de calidad (Bújanos, 2000). La estimación global más reciente para el manejo de la *P. xylostella* es de US \$4-5 billones anualmente (Rusnak, 2017). La utilización masiva de insecticidas convencionales y especialmente plaguicidas de amplio espectro es costosa, y trae consecuencias colaterales secundarias como el desarrollo de la resistencia de las plagas, contaminación ambiental, residuos tóxicos en el producto cosechado, aparición de nuevas plagas, eliminación de la entomofauna benéfica e intoxicación del operador (Pérez y Lannacone, 2009). La alta presión de los diferentes problemas fitosanitarios y su manejo inadecuado, conducen a que estos ejerzan un impacto negativo no sólo en las cosechas, sino en el suelo, el agua y en la calidad del agroecosistema (Rosquete, 2011). Los principales insecticidas utilizados para el manejo de la PDD, se basa principalmente en diamidas, avermectinas, piretroides, y Bt (Xia *et al.*, 2014). Lo cual ha ayudado a desarrollar resistencia a la mayoría de los insecticidas sintéticos aplicados a campo, haciendo aún más difícil su control (Sánchez y Arregui, 2010), ocasionando incrementos significativos en los costos de producción (INIFAP, 2013).

El uso de pesticidas sintéticos combinado con la alta fecundidad de *P. xylostella* ha dado como resultado que la plaga desarrolle resistencia a casi todos los pesticidas (Sujay *et al.*, 2010). *P. xylostella* fue el primer insecto en desarrollar resistencia al DDT en campo (Ankersmit, 1953) y también ha sido el primer insecto capaz de desarrollar resistencia en campo a *Bacillus thuringiensis* (Tabashnik, 1990). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2015, la PDD 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 (Bass *et al.*, 2015). La resistencia se forma, en parte, por mecanismos metabólicos a través de los cuales individuos sobrevivientes (resistentes) adquieren niveles superiores de enzimas en comparación con los individuos susceptibles; esto les permite desdoblar las moléculas insecticidas convirtiéndolas en productos menos tóxicos o completamente atóxicos. (Bujanos *et al.*, 2013). Investigaciones previas indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucran mutaciones de aminoácidos de destino, la sobreexpresión o mutaciones de desintoxicación, enzimas detoxificativas, resistencia a la penetración y resistencia de comportamiento (Ahmad *et al.*, 2006; Bass *et al.*, 2015). En la resistencia metabólica, hay un aumento en las actividades de esterasas, glutatión-S-transferasas, acetilcolinesterasa y oxidasas (Li *et al.*, 2007; Bass *et al.*, 2011).

El fipronil es un insecticida y acaricida de amplio espectro con actividad residual (Taylor, 2001), perteneciente a los fenilpirazoles (IRAC, 2018). Actúa por contacto, ingestión y sistémico moderado (De La Cruz *et al.*, 2018), bloqueando el paso de iones cloro a través de los canales clorados, regulados por el GABA (ácido gama aminobutírico) que, causa la muerte por hiperexcitación (Salto *et al.*, 2001). Es usado en el control de múltiples insectos en un amplio rango de cultivos, foliarmente o incorporado al suelo (De La Cruz *et al.*, 2018), siendo efectivo tanto en estadio larvario como en adultos (Baynes, 2009).

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar la resistencia del insecticida fipronil sobre larvas de *Plutella xylostella* en condiciones controladas.

Objetivos específicos

1. Evaluar la resistencia a fipronil en cuatro generaciones de *P. xylostella* con presión selección en condiciones de laboratorio.

2. Cuantificar el contenido de enzimas detoxificativas en cuatro generaciones de *P. xylostella* con presión de selección a fipronil.

Hipótesis

1. Se presentará un incremento en la resistencia fipronil de 10 veces con base a la una línea susceptible
2. La mayor actividad enzimática en las poblaciones de *P. xylostella* será atribuida a las esterasas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo del brócoli (*Brassica oleracea* L.)

El brócoli pertenece a la familia de las Brassicáceas y al género de *Brassicae oleracea* (L.). El cultivo de brócoli requiere de un clima templado y frío, las zonas que presentan estas características son las adecuadas para que pueda tener un óptimo desarrollo. Se adapta a suelos que tienen un mayor grado de concentración de acidez. El pH requerido es de 6 a 7, donde el suelo preferible para la siembra es de textura arenosa con buenas condiciones de humedad. Los suelos de textura arenosa propician una rápida filtración del agua y la planta puede absorber con mayor facilidad los nutrientes (SAGARPA, 2011).

Es uno de los alimentos más consumidos alrededor del mundo, que son llamados “súper alimentos”, la población mundial crece rápidamente y la gente demanda alimentos sanos y nutritivos. Se ha descubierto que el brócoli es altamente vitamínico y tiene propiedades que ayudan a combatir las células cancerígenas y retrasan el envejecimiento (SAGARPA, 2011).

Origen

Es originario de las costas del Mediterráneo y Asia Occidental, donde actualmente se encuentra Grecia, Turquía y Siria, de allí fue llevada a Inglaterra, Dinamarca, Holanda, Francia, España y Grecia. Su nombre proviene del termino italiano “broco” que quiere decir brote, en alusión a la parte comestible y preciada de la planta (Díaz y Jaramillo, 2006).

Taxonomía de *Brassica oleracea*

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Tribu: Brassiceae

Subtribu: Brassicinae

Género: Brassica

Sección: Brassica

Especies: *Brassica oleracea* L.

Importancia económica

En México se tiene identificado un agrupamiento productivo de producción e industrialización de brócoli, cuyo eje central se ubica en el estado de Guanajuato. Dicho agrupamiento surge principalmente con la motivación de comercializar producto congelado y en una menor proporción a la comercialización de producto fresco. El mercado nacional retiene un porcentaje muy bajo de producto fresco y congelado, el cual es distribuido principalmente a través de centrales de abasto como producto fresco y supermercados en ambas presentaciones (ITESM Campus Querétaro, 2003). En 2017 se cultivó en 34,493.28 ha con un valor comercial de \$3,343,303.07 miles de pesos (SIAP, 2017a), donde el principal mercado de exportación esta en Estados Unidos, Canadá y Japón (SIAP, 2017b), por lo que este cultivo representa una importante fuente de divisas y significativos beneficios para los productores (Bujanos *et al.*, 2013).

Producción de brócoli en México

Para el año 2017, la producción de brócoli a nivel nacional reportó 574,959.94 Ton, siendo el estado de Guanajuato como el principal productor con un 63.42% de la producción total seguido por los estados de Puebla, Michoacán y Sonora con 8.19, 7.22 y 6.51% respectivamente (SIAP, 2017a).

Producción de Brócoli en Guanajuato

Guanajuato es el principal estado productor de brócoli a nivel nacional con una superficie de siembra de 23,059.50 Has y una producción de 364,658.01 Ton lo que equivale a un rendimiento promedio de 15.81 Ton/ha significado un ingreso en el valor de producción de 2, 084,816.33 de miles de pesos (SIAP, 2017a).

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

P. xylostella es una plaga cosmopolita y de amplia distribución mundial, muy importante en los trópicos y sub- trópicos, y posee hábitos migratorios (Pastrana, 2004; Sarfraz *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).

Clasificación taxonómica

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

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Suborden: Frenatae

Superfamilia: Yponomeutoidea

Familia: Plutellidae

Género: *Plutella*

Especie: *xylostella* (Linneo, 1758)

Ciclo de vida de *Plutella xylostella*

La palomilla dorso de diamante es una plaga que presenta metamorfosis completa, es decir, pasa por los estados biológicos de huevecillo, larva, pupa y adulto. Oviposita un poco más de 200 huevecillos en el envés y los pecíolos de las hojas, en los tallos y floretes de brócoli (Bujanos y Marín, 2001). 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). El huevecillo tarda de 5 a 10 días, pasa por larva que comprende 4 instares de 10 a 4 semanas, posteriormente pasa a pupa de 7 a 15 días hasta que alcanza su forma adulta (IRAC, 2017).

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 (Fernández y Álvarez, 2008)

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 (Fernández y Álvarez, 2008).

Pupa

La pupa es obtecta 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 (Fernández y Álvarez, 2008).

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).

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).

Daños

Esta plaga causa daños graves a cultivos de brassicas, desprestigiando el producto, lo que interfiere en el crecimiento de las plantas e incluso causa la muerte o pérdida total (Da Silva, 2008). El daño lo realizan las larvas al alimentarse de las hojas y puntos de crecimiento, 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). En brócoli y coliflor el daño es indirecto pues la presencia de larvas y pupas en la inflorescencia limita la exportación, aunque no se alimente ésta. Durante la etapa vegetativa, las plantas pueden soportar hasta un 30% de defoliación sin tener mermas en el rendimiento, al momento de cosecha el nivel crítico es de un gusano por cabeza (Rueda y Shelton, 1996). Las larvas cercanas al producto de brócoli se ubican entre los floretes durante el tercer y cuarto instar para después transformarse en pupas, ocasionando así el daño más importante de contaminación de la cosecha de este cultivo (Bujanos y Marín, 2001).

Control

La estrategia para el manejo de la palomilla dorso de diamante, se basa en el uso casi exclusivo de insecticidas. La exigencia del mercado de explotación de requerir brassicas

sin presencia de plagas, daños del mismo y con una alta calidad comestible, han indicado el ejemplo de grandes cantidades de plaguicidas para asegurar estos índices de calidad (Bújanos, 2000). Los grupos principales de insecticidas para el control son las diamidas, avermectinas, piretroides, y Bt (Xia *et al.*, 2014). 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.*, 2006)

Resistencia en *Plutella xylostella*

En la India, en 1968 se reportó la primera detección de resistencia en la polilla de la col, *Plutella 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 brassicáceas de ese país (Vargas, M. R. *et al.*, 2008). También ha sido el primer insecto capaz de desarrollar resistencia en campo a *Bacillus thuringiensis* (Tabashnik, 1990). El uso de plaguicidas sintéticos combinado con la alta fecundidad de *P. xylostella* ha dado como resultado que la plaga desarrolle resistencia a numerosos insecticidas de origen químico (Sujay *et al.*, 2010), tales como el DDT, diazinón, permetrina, fenvalerato (Tabashnik *et al.*, 1987; Shelton *et al.*, 2000), deltametrina (Rosa *et al.*, 1997), clorantraniliprol, flubendiamida (Wang *et al.*, 2012), abamectina (Wang y Wu, 2014; Xia *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), spinosad, clorfluazuron, indoxacarb, beta-cipermetrina (Xia *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015), clorfenapir, (Jiang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015) y benzoato de emamectina (Wang, *et al.*, 2015). Con base a la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), en 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).

Resistencia

La resistencia puede ser definida como un cambio heredable en la sensibilidad de una población de plagas que se refleja en la falla 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 en exceso (IRAC, 2016).

Tipos de resistencia

Resistencia metabólica: Corresponde al mecanismo típico expresado por los insectos, rompiendo la estructura de los plaguicidas mediante el sistema enzimático pudiendo degradar un amplio espectro de plaguicidas. Es decir, las enzimas detoxificadoras son utilizadas para romper la invasión del plaguicida (toxina) en el cuerpo del insecto (Vargas *et al.*, 2008).

Resistencia en el 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 insectos 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 (Vargas *et al.*, 2008).

Resistencia a la penetración: Este mecanismo de resistencia se produce en un amplio rango de insecticidas. Consiste en una baja absorción del plaguicida debido a la modificación en la cutícula o en el tracto digestivo del insecto. Esta reducción en la penetración del insecticida se traduce en una menor absorción de la toxina en el cuerpo del insecto comparado con las poblaciones susceptibles (Vargas *et al.*, 2008).

Resistencia de comportamiento: Consiste en la pérdida de susceptibilidad por cambio en el comportamiento del insecto frente a los repetitivos programas de control. No es un mecanismo tan importante, sin embargo, contribuye en la disminución de la efectividad de la dosis letal del plaguicida. Esta habilidad puede producirse mediante un estímulo dependiente o independiente. El primero se evidencia cuando una plaga evita el contacto con la zona tratada con plaguicida y el estímulo independiente ocurre cuando la plaga abandona la zona tratada hacia un área sin residuos (Vargas *et al.*, 2008).

Resistencia cruzada: La 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 [1,1,1tricloro-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).

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:

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).

Pruebas bioquímicas

Son ensayos múltiples que permiten analizar a una población de insectos cuantifican los niveles de una reacción enzimática (Brogdon y Barber, 1987). Desarrollados para cuantificar niveles de Esterasas (Brogdon y Dickinson, 1983), Acetilcolinesterasa (Devonshire y Moores, 1984), Glutation STransferasas (Brogdon y Barber, 1990) y oxidasas (Brogdon *et al.*, 1997)

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).

Enzimas detoxificativas

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, 2007):

- 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 carboxiesterasas (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).

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 diaarinos 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).

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.* (2007), 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).

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).

Fipronil

El fipronil corresponde a una nueva familia descubierta por Rhône Poulenc, en Ongar (Reino Unido), cuyas propiedades insecticidas han sido estudiadas desde 1985. Se trata de un pirazol de ingestión y contacto extremadamente activo, que generalmente necesita tan sólo unos pocos gramos de materia activa por hectárea, para controlar diversas especies de insectos, incluyendo los picadores-chupadores y sobre todo los masticadores, siendo en principio los coleópteros los más sensibles, así como para el control de muchos insectos del suelo y foliares, también para el tratamiento de semillas y es formulado como cebo para cucarachas, hormigas y termitas. Es efectivo contra insectos resistentes o tolerantes a insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos (Salto *et al.*, 2001).

El fipronil posee certificaciones del International Agency for Research on Cancer, The National Toxicology Program (NTP), American Conference of Governmental Health Industrial (ACGHI), Occupational Safety and Health Administration (OSHA) que lo excluyen como producto químico probable o sospechoso de carcinogénico en humanos (Gentile *et al.*, 2004).

Modo de Acción

El fipronil ejerce su acción sobre el sistema nervioso central de los insectos, perturbando la transmisión de los impulsos nerviosos una vez que el producto ha sido absorbido por

ingestión o contacto (Garzo *et al.*, 2000), bloqueando el paso de iones cloro a través de los canales clorados, regulados por el GABA (ácido gama aminobutírico) que a dosis suficiente, causa la muerte por hiperexcitación (Salto *et al.*, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El presente trabajo experimental se llevó a cabo en las cámaras bioclimáticas y en el Laboratorio de Toxicología, ubicado en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo Coahuila, México.



Figura 1. Lugar del Sitio Experimental.

Colecta de material biológico en campo

La colecta en campo se llevó a cabo manualmente en lotes comerciales del Municipio de Celaya en el Estado de Guanajuato. 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 50 días de edad. Los individuos 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.

Insecticida

Se evaluó el desarrollo de la resistencia al insecticida Fipronil utilizando un diseño experimental completo al azar con 6 concentraciones (5, 3, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm) y un testigo blanco el cual fue agua más adherente, con 4 repeticiones cada uno.

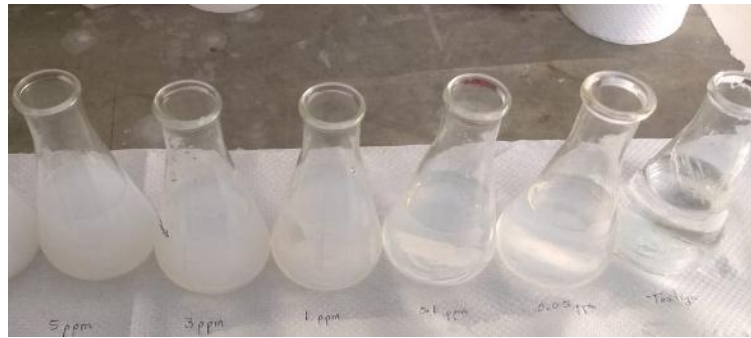


Figura 2. Concentraciones (5, 3, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm) y un testigo blanco (agua más adherente).

Bioensayos

Para llevar a cabo la evaluación del insecticida fipronil se empleó el método de inmersión (IRAC, 2017), utilizando larvas de *Plutella xylostella* de tercer instar. El cual consistió en recortar círculos de 6 cm de diámetro de una hoja de brócoli, se sumergieron en la solución 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 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.



Figura 3. Larvas de *Plutella xylostella* en hoja de brócoli tratada con insecticida.

Inducción de resistencia

Una vez realizado el bioensayo a la generación inicial y obtenida la curva de concentración-mortalidad, a las siguientes 4 generaciones se le aplicó la CL₂₀, realizando aspersiones mediante un atomizador, asegurándose de tener una cobertura uniforme sobre las plantas de brócoli con larvas de *P. xylostella*. Las aplicaciones se realizaron semanalmente, con un promedio de dos aplicaciones por generación. 48 h después de la segunda aplicación de cada generación se tomó una muestra de larvas de tercer instar, las cuales fueron colocadas en tubos de eppendorf y se congelaron para posteriormente realizarles pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas

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-II 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 (KPO₄) 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 .

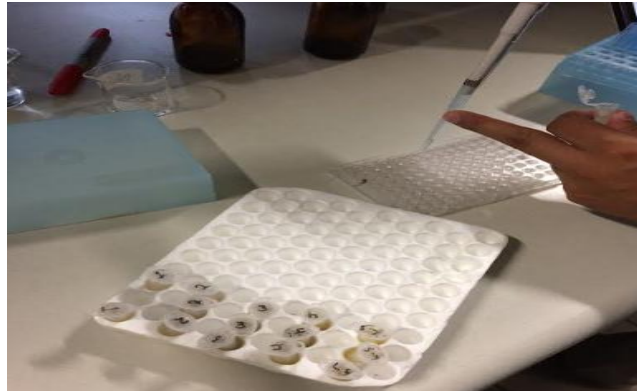


Figura 4. Determinación de proteína a larvas de *Plutella xylostella*.

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 μL de solución Buffer (KPO_4) y posteriormente se aforo a 1 mL (Brogdon, 1984).

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 cuatro generaciones 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).

Determinación de Glutation-S-transferasa

Preparación de reactivos: Se disolvieron 0.0122 g de reduce glutati3n en 20 mL de Buffer (KPO₄). Para CDNB (1 – cloro- 2,4 dinitrobenceno) se disolvieron 4 mg de CDNB en 2 mL de acetona + 18 mL de soluci3n Buffer (KPO₄).

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 seis poblaciones en estudio, se corri3 inmediatamente (T₀) en el lector de placas usando un filtro de 340 nm, se volvi3 a correr transcurridos 5 minutos (T₅). Para el an3lisis estadístico a las lecturas de absorbancia se les saco la diferencia entre ambos tiempos (T₅-T₀) y los n3meros negativos se consideraron como 0 (Brogdon y Barber, 1990).

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 (KPO₄). Para el DTNB (Acido- DitioBis-Nitrobenozoico) se prepararon 13 mg de DTNB y se le agregaron 10 mL de soluci3n Buffer (KPO₄).

Lectura de absorbancias: Se colocaron 100 μ L del homogenato, se agregaron 100 μ L de acetilcolina-yodisada y 100 μ L de DNTB, estos pasos se realizan por triplicado para cada repetici3n de las cuatro generaciones en estudio, se corrieron inmediatamente (T₀) en el lector de placas usando un filtro de 414 nm, se volvi3 a correr transcurridos 10 minutos (T₁₀). Para el an3lisis 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).

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 H₂O 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 μ L del homogenato, se agregaron 200 μ L de TMBZ y se adiciono una gota (25 μ L) de agua oxigenada (H₂O₂) estos pasos se realizaron por triplicado para cada repetición de las cuatro generaciones 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).

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 al insecticida fipronil de la generación inicial de *P. xylostella*, con una CL₅₀ de 0.482 ppm y una CL₂₀ de 0.095 ppm, la cual se aplicó a las siguientes 4 generaciones para inducir el desarrollo de resistencia a este insecticida. Estos resultados son superiores a los reportados por Barrera *et al.* (2006) en un estudio realizado en el Estado de Guanajuato donde reportó una CL₅₀ de 0.03 ppm, por lo cual se puede deducir que a través del tiempo *P. xylostella* ha presentado un incremento en el desarrollo de resistencia a este insecticida.

Tabla 1. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de fipronil aplicado a la generación inicial de larvas de *Plutella xylostella*.

Generación	CL ₅₀ (ppm)	LFI - LFS	CL ₂₀ (ppm)	Ecu. Predicción
Inicial	0.482	0.383 - 0.615	0.095	y= 0.3786+1.1954

CL=Concentración letal; LFI=Límite Fiducial Inferior; LFS=Límite Fiducial Superior

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la respuesta al fipronil en una generación inicial, cuatro generaciones posteriores y una línea susceptible. La CL₅₀ fue de 0.482, 0.434, 1.163, 1.430 y 0.963 ppm para la generación inicial y las generaciones 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Observándose un aumento en la proporción de resistencia de la generación inicial a la 3 donde se alcanzó un factor de resistencia de 14.59 veces con base a la línea susceptible, ya que se sabe que *P. xylostella* tiene una gran capacidad para desarrollar resistencia rápidamente a casi todas las clases de insecticidas. Mientras que para la generación 4 este se vio reducido a 9.83 veces lo cual se puede deber a que la presión de selección de la CL₂₀ (0.095 ppm) fue insuficiente para el desarrollo de resistencia para esta generación y por tal motivo se vio reducida. Sayyed y Wright, (2004) reportaron un valor bajo de heredabilidad (0.18) para fipronil, lo que indica una baja variación genética para la resistencia a este insecticida. Pu *et al.* (2010) reportaron un factor de resistencia de 357 veces en la cuarta generación en una población de *P. xylostella* sometida a presión de selección al insecticida abamectina, por lo que se puede

considerar que el desarrollo de resistencia a fipronil es más lento que al de abamectina. Por otro lado, Abbas *et al.* (2014) obtuvieron una proporción de resistencia para este mismo insecticida de 140.25 veces en 11 generaciones en estudio sobre *Musca domestica*.

Tabla 2. Concentración letal, límites fiduciales y ecuación de predicción de fipronil aplicado a la línea susceptible de larvas de *Plutella xylostella*.

Generación	CL₅₀ (ppm)	LFI - LFS	CL₉₀ (ppm)	Ecu. Predicción	P.R
Línea susceptible	0.098	0.040 - 0.198	0.643	Y= 1.5829 ±1.5715	-
Inicial	0.482	0.383 - 0.615	5.693	Y= 0.3786 ±1.1954	4.92
1	0.434	0.113 - 1.700	3.54	Y= 0.509 ± 1.407	4.43
2	1.163	0.428 - 2.629	9.20	Y= -0.096 ± 1.429	11.87
3	1.430	0.525 - 2.623	6.82	Y= -0.293 ± 1.889	14.59
4	0.963	0.137 - 6.092	32.51	Y= 0.013 ± 0.838	9.83

CL=Concentración letal; LFI=Límite Fiducial Inferior; LFS=Límite Fiducial Superior; P.R=Proporción de resistencia.

Pruebas bioquímicas

Para la determinación de los niveles enzimáticos se obtuvo el cálculo de la cantidad de proteína contenida en larvas de *P. xylostella* y así obtener el número de individuos 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.

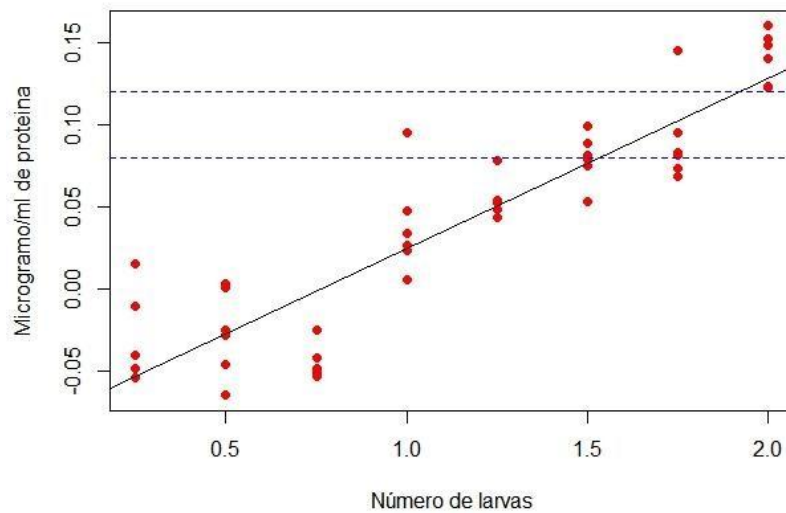


Figura 5. Absorbancias de proteína en homogenatos de *Plutella xylostella* en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2).

En la Tabla 3 se muestran las medias de absorbancia para α -Est y β -Est, donde se observa que en ambas enzimas hay diferencia significativa entre las generaciones en estudio de *P. xylostella* sometidas a una presión de selección ($CL_{20} = 0.095\text{ppm}$) con fipronil. α -Est presentó una mayor expresión para la Línea Susceptible (LS) con una media de 3.572, seguido de la generación 4 con una media de 3.563, mientras que la generación 1 presentó el valor más bajo para tal enzima con una absorbancia media de 3.467. Mientras que para β -Est se observó su mayor contenido en la generación 4 con valor medio de 3.581; la generación 1 expresó la absorbancia menor para β -Est con una media de 3.429 (Tabla 3). 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 3. Comparación de medias del contenido de β y α -esterasas en 4 generaciones de *Plutella xylostella* y una línea susceptible.

Generación	α-Esterasas	β-Esterasas
	Media \pm SD	Media \pm SD
Línea Susceptible	3.5728 \pm 0.0618 a	3.5286 \pm 0.0519 a
1	3.4672 \pm 0.0587 b	3.4290 \pm 0.0731 b
2	3.4975 \pm 0.0486 ab	3.5147 \pm 0.0482 ab
3	3.5407 \pm 0.0351 ab	3.5801 \pm 0.0365 a
4	3.5634 \pm 0.0802 a	3.5811 \pm 0.0957 a

SD= Desviación estándar

En lo referente a ATCh se observa que no hay diferencia significativa entre las generaciones evaluadas. La Generación 3 se expresó un mayor contenido para esta enzima con una media de 0.0026, por otro lado, la Línea Susceptible reportó un contenido nulo para ATCh (Tabla 4). 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 4. Comparación de medias del contenido Acetilcolinesterasa en 4 generaciones de *Plutella xylostella* y una línea susceptible.

Generación	ATCh
	Media \pm SD
Línea susceptible	0.0000 \pm 0.0000 a
1	0.0014 \pm 0.0043 a
2	0.0008 \pm 0.0026 a
3	0.0026 \pm 0.0080 a
4	0.0005 \pm 0.0016 a

SD= Desviación estándar

Por su parte para las enzimas GST y Oxidasas se presenta diferencia significativa entre las generaciones en estudio. La Generación 4 presentó el valor máximo de absorbancias para GST con una media de 0.0186, mientras que la Línea Susceptible reportó el valor

más bajo para esta enzima con 0.0005. 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). En el caso de Oxidasas se tiene que la Generación 4 presentó un mayor contenido con una media de 3.325 y observándose el menor contenido para la Generación 2 con una absorbancia media 0.467 (Tabla 5). 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).

Tabla 5. Comparación de medias del contenido de Glutation-S-Transferasas y Oxidasas en 4 generaciones de *Plutella xylostella* y una línea susceptible.

Generación	GST	Oxidasas
	Media ± SD	Media ± SD
Línea susceptible	0.0005 ± 0.0016 b	2.5098 ± 0.2902 c
1	0.0157 ± 0.0079 a	0.6395 ± 0.0376 d
2	0.0163 ± 0.0043 a	0.4676 ± 0.0559 d
3	0.0103 ± 0.0110 ab	2.8896 ± 0.2480 b
4	0.0186 ± 0.0143 a	3.3256 ± 0.1511 a

SD= Desviación estándar

En la Tabla 6 se muestran las proporciones de resistencia de cada enzima y su clasificación según Montella (2007), durante cuatro generaciones de *P. xylostella* sometida a presión de selección a fipronil, donde existen algunas diferencias en la respuesta bioquímica entre generaciones, debido a que la expresión enzimática puede variar dependiendo el tiempo posterior a la exposición al insecticida. Trabajos previos mencionan, que Esterasas tienen mayor expresión durante las seis primeras horas posteriores a la aplicación del insecticida, en tanto que Glutatión S-transferasas presenta su mayor actividad después de las 24 horas, así mismo se reporta que cuando la resistencia se desarrolla hasta cierto punto, se pueden observar respuestas insensibles de las enzimas, lo que puede deberse a la constitución de una actividad enzimática superior (Hu *et al.*, 2014).

Durante 4 generaciones Glutation-S-Transferasas es el principal mecanismo de detoxificación al fipronil con un valor del 83.33%, considerándose “muy alterado”, esto concuerda a lo mencionado por Hu *et al.*, (2014), quien menciona que esta enzima juega un papel importante para la detoxificación de insecticidas en esta plaga. Oxidasas fue el segundo mecanismo más importante para la detoxificación de xenobioticos con un porcentaje del 41.65 % (moderadamente alterado), por otro lado β -Est y ATCh no tienen acción importante, dado que la proporción de resistencia fue muy baja con 5.55 y 11.1% respectivamente y una clasificación inalterada e incipientemente alterada.

Tabla 6. Proporción de resistencia del contenido de enzimas en 4 generaciones de *Plutella xylostella*.

Generación	α-Esterasas	β-Esterasas	Ach	GST	Oxidasas
1	11.11	0	11.1	100	0
2	33.33	0	11.1	55.55	66.6
3	44.44	22.22	11.1	77.77	100
4	0	0	11.1	100	0
Promedio =	22.22	5.555	11.1	83.33	41.65

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

P. xylostella es un insecto que desarrolla rápidamente resistencia a fipronil, pero de igual manera puede existir una pérdida de resistencia si no se tiene una presión de selección constante entre una generación y otra.

Glutation S-transferasas es el principal mecanismo de detoxificación a fipronil en *P. xylostella*, sin embargo, se presentó una insensibilidad enzimática cuando hubo un aumento en la resistencia y por tal motivo la expresión de oxidasas incrementó por lo que se le puede considerar como una actividad enzimática mayor.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, N., Ali Khan, H. A., & Shad, S. A. (2014). Cross-resistance, genetics, and realized heritability of resistance to fipronil in the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): a potential vector for disease transmission. Sciences, University of the Punjab, Department of Entomology, Faculty of Agricultural Sciences, Pakistan.
- 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.
- Ankersmit, G. W. (1953). DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lep) in Java. *Bull. Entomol. Res.* 44, 421-425.
- APRD, A. P. (2015). Recuperado el 31 de 10 de 2018, de www.pesticideresistance.com
- Barrera, U. R., Bujanos, M. R., R., R. M., Aguilera, G. M., & Téllez, M. M. (2006). Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) del Estado de Guanajuato, México. *Agrociencia*.
- Bass, C. I., Denholm, M. S., & Williamson, R. N. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78-87.
- Bass, C. L. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 67, 886-890.
- Bautista, M., Tanaka, T., & Miyata, T. (2007). Identification of permethrin-inducible cytochrome P450s from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and the possibility of involvement in permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87 (1), 85-93.
- Bautistaa, M. A., Miyataa, M., Miuraa, K., & Tanaka, T. (2009). RNA interferencemediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39 38-46. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174808001732>

- Baynes, R. (2009). Ectoparasiticides. En J. Riviere, & M. Papich (Edits.), *Veterinary Pharmacology & Therapeutics* (9 ed., págs. 1181-1202). Iowa, Wiley-Blackwell.
- Bisset, A. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana Medicina Tropical* 54 (3).
- 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. (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 Physiology*, 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 high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry*, 131: 499-503.
- 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. En *Analytical Biochemistry*, 131: 549-503).
- Brogdon, W. G., McCallister, 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, M. R. (2000). Manejo integrado de plagas en crucíferas. *TEMAS Selectos en Fitosanidad y Producción de Hortalizas*, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- Bujanos, M. R., & Marín, J. A. (2001). *Insectos Plaga De Brócoli y Coliflor y Sus Enemigos Naturales En La Región De El Bajío, México*. Publicación Especial

Núm. 2, Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México.

Bujanos, M. R., Marín Jarillo, A., Díaz Espino, L. F., Gámez, V. J., Ávila, P. M., Herrera, V. R., . . . Gámez, V. F. (2013). Manejo Integrado De La Palomilla Dorso De Diamante *Plutella xylostella* (L.) En La Región Del Bajío, México. Folleto Técnico Núm. 27, Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Gto., México.

Cardoso, M. O., Pamplona, A. M., & Michereff Filho, M. (2010). Recomendaciones técnicas para el control de lepidópteros plaga en el cultivo del repollo en Amazonas.

CORPEI, e. p. (2009). "Brócoli". Recuperado el 18 de 10 de 2018, de <http://www.corpei.org/contenido.ks?contenidoId=1107>

Costa, L. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*. 366(12): 1-13.

Da Silva, C. 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, G., 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.

De La Cruz, E., Bravo, V., & Ramírez, F. (2018). Fipronil. Universidad Nacional Heredia, Costa Rica. Recuperado el 24 de Octubre de 2018, de <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/259-fipronil>

Devonshire, A. L. (1990). Biochemical and molecular genetic analysis of insects populations resistant to insecticides. En Brighton crop protection conference. Pest and Diseases (págs. 889-896).

- Devonshire, A. L. (1990). Biochemical and molecular genetic analysis of insects populations resistant to insecticides. Brighton crop protection conference. Pest and Diseases, (págs. 889-896).
- Devonshire, A. L., & 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.
- Díaz, D. C., & Jaramillo, N. J. (2006). Agronomía. En C. C. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, El Cultivo de las Crucíferas, Brócoli, Coliflor, Repollo, Col China.
- Enayati, 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., 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. Obtenido de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-6055.2009.00723.x/pdf>
- FAO. (2010). [Agris.fao.org](http://agris.fao.org). Recuperado el 22 de Octubre de 2018, de Incidencia de algunos factores naturales de mortalidad de *Plutella xylostella* (L.): <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012064579>
- 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., & Álvarez, 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., steinchen, J. C., & Brun, L. O. (1994). A molecular diagnostic for ndosulfan 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.
- 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., & Wright, L. M. (2013). Dosdall, Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annu. Rev. Entomol.* 58 517-541. Obtenido de <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurevento-120811-153605>
- Gant, D., Chalmers, A., Wolff, M., Hoffman, B., & Bushey, D. (1998). Fipronil: Action at the GABA receptor. En M. N. Kuhr RJ (Ed.), *Pesticides and the Future: Minimizing Chronic Exposure of Humans and the Environment*, (págs. 147-156). Amsterdam, IOS Press.
- García, M. M. (2012). Plagas y enfermedades en el cultivo de coliflor. Descripción y control. *Revista Agraria*, 56-62.
- Garzo, E., Collar, J., Muñoz, M., & Fereres, A (2000). Eficacia del fipronil (exp 60720a) en el control poblacional de *Frankliniella occidentalis* pergande (THYSANOPTERO: THRIPIDAE) en condiciones de laboratorio. Centro de Ciencias Medioambientales, Departamento técnico, Madrid, España.
- Gentile., A. G., Sartini., J. L., Campo., M. C., & Sánchez., J. F. (12 de Marzo de 2004). Eficacia del Fipronil en el control del ciclo peridomiciliario de *Triatoma infestans* en un área con resistencia a la Deltametrina.
- Guengerich, F. (1963). Bioactivation and detoxification of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metabolism and Disposition* 21.
- Hayes, J., Flanagan, J., & Jowsey, I. (2005). Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- Houtart, F. &. (2013). El brócoli amargo. *Ciencias Sociales*(35), 283-300.

- Hu, Z. D., 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. 13:24522459. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311914607486>
- Hu, Z. D., 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. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25208571>
- 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.
- Hutson, D. H., Pickering, B. A., & Donninger, C. (1972). Phosphoric acid triester-glutathione alkyltransferase. A mechanism for detoxification of dimethyl phosphate triesters. Biochem. J. 127, 285-293.
- Idris, A. B. (1995). Ecology and behavior of *Diadegma insulare* (Cresson), a biological control agent of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Dissertation, Michigan State University, East Lansing, MI. p24.
- 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). Recuperado el 05 de Octubre de 2018, de <http://www.irac-online.org/about/resistance/>
- IRAC. (2017). Recuperado el 05 de Octubre de 2018, de <http://www.irac-online.org/pests/plutella-xylostella/>
- IRAC. (2018). Mode of Action Classification Schem, 8.4. Recuperado el 31 de 10 de 2018, de www.irac-online.org

- ITESM Campus Querétaro. (2003). Plan Estratégico de Investigación y Transferencia de Tecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Guanajuato: TEC de Monterrey.
- Jakobsson, P., Mancini, J., & Ford-Hutchinson, A. (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5lipoxygenase-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.
- Kwong, T. C. (2007). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology *Ther Drug Monit.* 24(1):, 144-9.
- Lagunes, T. A., & J. Villanueva, J. (1994). Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillos, Edo. de México.
- Lamoureux, G., & Rueness, D. (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.
- Li, X. C., & Schuler, M. R. (2007). Berenbaum, Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics, *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231-253.
- López, 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.
- 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.
- Mau, L. R., & Kessing, M. J. (2007). *Plutella xylostella* (diamondback moth). Departamento de Entomología, Honolulu, Hawaii.

- Midori, B. (2014). *Plutella xylostella* Palomilla dorso de diamante/Diamoback moth. Ficha de control de plagas.
- Miyamoto, T., & Mikawa, T. (2005). Oxidative glutathione conjugation and its novel role in activation of the organophosphorus insecticide prothiofos. *J. Pestic. Sci.* 30, 31-38.
- 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.
- Pastrana, J. (2004). *Los Lepidópteros Argentinos*. Sociedad Entomológica Argentina Ediciones. San Miguel de Tucumán, Argentina. 334pp.
- Pérez, D. Y., & Iannacone, J. (2009). Efecto insecticida de Sacha yoco (*Paullinia clavigera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941. Principal vector de malaria en Ucayali, Perú. *Ecol. Apl.* 3: 64-72.
- Pu, X., Yang, Y., Wu, S., & Wu, Y. (2009). Characterisation of abamectin resistance in a field-evolved multiresistant population of *Plutella xylostella*. *Society of Chemical Industry*.
- Rodríguez, K. (2011). *Propiedades anticancerígenos del brócoli*. N.73. TecnoAgro.
- Rosa, M., Araya, J., Guerrero, M., & Lamborot, L. (1997). Niveles de resistencia de *Plutella xylostella* (L.) a tres insecticidas en varias localidades de la zona central de Chile. *Bol. San. Veg. Plagas*, 23, 571-581.
- Rosquete, P. C. (2011). *Evaluación de impacto de la supresión de endosulfán en el agroecosistema Güira de Melena, Artemisa, Cuba*. 95h. Tesis (en opción al título de Master en Agroecología y Agricultura Sostenible), Universidad Agraria de la Habana, La Habana, Cuba.
- Rueda, A. A., & Shelton, A. M. (1996). *Palomilla Dorso de Diamante (DDM). Plutella xylostella* (ESPAÑOL)-MIP/CIIFAD, Cornell University.
- Rusnak, P. (25 de Julio de 2017). *Growing Produce*. Recuperado el 22 de Octubre de 2018, de *Vegetable Field Scouting Guide: Diamondback Moth:*

<https://www.growingproduce.com/vegetables/field-scouting-guide-diamondback-moth/>

- Rusnak, P. (2017). Vegetable Field Scouting Guide: Diamondback Moth. Florida Wrecker.
- SAGARPA. (2011). Monografía del cultivo de brócoli. Monografía informativa. Subsecretaría de fomento a los agronegocios. SAGARPA. MÉXICO. 11 Páginas.
- Salto C, F. J. (2001). Efecto de Fipronil en tucuras y sus predadores. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires.
- Salto, C., Frana, J., Imwinkelried, J., & Beltrame, R. (2001). Efecto de Fipronil en tucuras y sus predadores. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires.
- Sánchez, & Arregui, C. (2010). Incidencia de algunos factores naturales de mortalidad de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), en el área centro este de Santa Fe, Argentina.
- Sarfraz, M., L. M. Dossall., & B. A. Keddie. (2006). Diamondback moth-host plant interactions: implications for pest management. *Crop Protection*. 25 (7): 625- 639.
- SAS, I. I. (2002). Guide for personal computers. SAS institute, Cary, N.C.
- Sayyed, A. H., & 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. Obtenido de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1270/>
- Scott, J., & Wen, Z. (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Sci* 57, 958-967.
- Shelton, A., Sances, F., Hawley, J., Tang, J., Boune, M., Jungers., & Collins, H. y. (2000). Assessment of insecticide resistance after the outbreak of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997. *J. Econ. Entomol*, 93(3), 931-936.
- 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.

- Shishido, T., Usui, K., Sato, M., & Fukami, J. (1972). Enzymatic conjugation of diazinon with glutathione in rat and American cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2, 51–63.
- SIAP (2017a). Recuperado el 02 de Octubre de 2018, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SIAP (2017b). Recuperado el 02 de Octubre de 2018, de <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>
- Siqueira, H., Guedes, R., Fragoso, D., & Magalhaes, L. (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int J Pest Manag* 47, 247-251.
- Snyder, M., & Glendinning, J. (1996). Causal connection between detoxification enzyme activity and consumption of a toxic plant compound. *J Comp Physiol A* 17, 255-261.
- Sogorb, M., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett.* 128(1-3): 215-28.
- Sujay, Y., Sattagi, H., & Patil, r. (2010). Invasive alien insects and their impact on agroecosystem. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences.* 23(1).
- Tabashnik, B. E. (1990). Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *J. Econ.Entomol.* 83, 1170-1176.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Lou, K., & Adang, M. J. (1994). Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Agricultural Science* 91: 4120-4124.
- Tabashnik, B., Cushing, N., & Johnson, M. (1987). Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: Intra-island variation and cross-resistance. *J. Econ. Entomol.* 80: 1091-1099.
- Taylor, M. (2001). Recent Developments in Ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, 161, 253-268.
- 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 (*C. vprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology* 6.
- Twine, P. H., & 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: 242-339.
- Vargas, R., Olivares, N., & Ubillo, A. (2008). Manejo Integrado de Resistencia (MIR) y selectividad de plaguicidas. En R. y. Ripa (Ed.), *Manejo de Plagas en Paltos y Cítricos* (págs. 80-84). INIA La Cruz.
- 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, R., & Wu, Y. (2014). Dominant fitness costs of abamectin resistance in *Plutella xylostella*. *Pest Manag Sci*, 70(12), 1872-1876.
- Wang, X., Khakame, S., Ye, C., Yang, Y., & Wu, Y. (2012). Characterization of field-evolved resistance to chlorantraniliprole in the diamond backmoth, *Plutella xylostella*, from China. *Pest Management Science*, 69(5), 661-665.
- 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 DDTdetoxifying activity. *J. Struct. Biol.* 164, 228–235.
- Wang, Y., Wei, R., Zhu, H., & Zhou, X. (2015). Determination of resistance to seven insecticides in *Plutella xylostella* L. in fields of Northern Hunan. *Agricultural Science & Technology*, 15(3), 553-555.
- Xia, Y. M., Lu, J., Shen, X. W., Gao, H., & Qiu, L. J. (2014). Resistance monitoring for eight insecticides in *Plutella xylostella* in central China, *Crop Prot.* 63 131-137.
- Yang, Y., Cheng, J., Singhal, 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.
- Zhao, J. Z., Collins, H. L., Cao, J., Earle, E. D., & Shelton, A. M. (2001). Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant

to *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIc. Journal of Economic Entomology 94 (6): 1547-1552.

Zhao, J. Z., Collins, H. L., Li, Y. X., F.Mau, R., Thompson, G. D., Hertlein, M., . . . Shelton, A. M. (2006). Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb and emamectin benzoate. J. Econ. Entomol. 99: pag.176 - 181.