

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Cuantificación de Enzimas Detoxificativas en Palomilla Dorso de Diamante
(*Plutella xylostella* L.) (Lepidoptera: Plutellidae) Asociadas a la Resistencia a
Indoxacarb.

Por:

JOSÉ ZARATE SOLORIO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México
Octubre del 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Cuantificación de Enzimas Detoxificativas en Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella* L.) (Lepidoptera:Plutellidae) Asociadas a la Resistencia a Indoxacarb.

POR:

JOSÉ ZARATE SOLORIO

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor Principal Interno


Dr. José Francisco Rodríguez Rodríguez
Asesor Principal Externo


Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Coasesor


Dra. Jazmín Janet Meléndez Guerrero
Coasesor


Dr. Jerónimo Landeros Flores
Coordinador Interino de la División de Agronomía



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Octubre, 2022

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



José Zarate Solorio

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por ser el principal guía en mi camino, cuidarme y llenarme de bendiciones para poder ser el hombre de bien que siempre he deseado ser, y sé que no me abandonará hasta el día que me llame a estar a su lado.

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Mi alma mater que como la gran institución que es, me brindó la oportunidad y siempre tuvo las puertas abiertas de sus aulas, para mi formación profesional.

PARASITOLOGÍA

Departamento el cual tuve bien elegir como mi especialidad ya que soy orgullosamente parasitólogo.

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez

Por la disponibilidad de su tiempo e interés brindado en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. José Francisco Rodríguez Rodríguez: Por su disponibilidad, su tiempo, aportaciones, correcciones y paciencia durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Yisa Ma. Ochoa Fuentes. Por su tiempo durante la realización de este trabajo y por formar parte del jurado.

DEDICATORIAS

Mis Padres

José Zarate Hernández, María de Luz Solorio Tafolla

Las dos personas que más me han llenado de amor desde que me trajeron al mundo: A ti padre y madre que han luchado por que sus hijos sobresalgan cuando ustedes no pudieron hacerlo, en su humildad y de la que nos han querido sacar con mucho esfuerzo y dedicación en su gran oficio de agricultores.

Mi Sobrino

José Alfredo García Zarate

Es un angelito que me llena de dicha y amor cuando con su sonrisa me dice te amo.

Mis Hermanas y Sobrino

Gabriela Alejandra Zarate Solorio, María Zarate Solorio y mi sobrino José Alfredo García Zarate: Gracias por siempre estar a mi lado y quererme tal y como soy y apoyarme en todo.

A Mis Abuelos

Gracias por darme tanto cariño y siempre estar apoyándome en todas las situaciones de mi vida los quiero mucho y extraño, si lo logre hasta el cielo.

A Mi Padrino

Pablo Ernesto Solorio Ramírez, Por ser un ejemplo de mi vida por sus regaños, consejos, por su apoyo y tantos momentos que pasamos.

A Mis Amigos

Gabriela Rojo García, Jaime Rojo García, Alejandro Rojo García, María del Carmen Guijón Torres: A todos ellos que han formado parte de mi vida a cada uno muchas gracias por todos los momentos alegres y tristes que hemos pasado.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General	2
Objetivos Específicos	2
Hipótesis	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Cultivo del Brócoli (<i>Brassica oleracea var. Italica</i>)	3
Origen	3
Taxonomía de <i>Brassica oleracea</i>	3
Importancia Económica	4
Producción de Brócoli en México	4
Producción de Brócoli en Guanajuato	4
Plagas y Enfermedades del Brócoli	5
Palomilla Dorso de Diamante (<i>Plutella xylostella</i> L.)	5
Clasificación Taxonómica de <i>Plutella xylostella</i>	6
Ciclo de Vida de <i>Plutella xylostella</i>	6
Hospederos	7
Daños	8
Control	8
Resistencia en <i>Plutella xylostella</i>	9
Resistencia	9
Tipos de Resistencia	10
Determinación de Resistencia	11
	VI

Bioensayos	11
Métodos bioquímicos	12
Enzimas Detoxificativas	12
Esterasas	12
Glutation-S-Transferasa	13
Oxidasas de Función Múltiple (MFO)	14
Acetilcolinesterasa	15
Indoxacarb	16
Modo de Acción	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Ubicación del Experimento	17
Colonia Madre	17
Insecticida	17
Bioensayos	18
Inducción de Resistencia	18
Pruebas Bioquímicas	19
Cuantificación de Proteína a Larvas de <i>Plutella xylostella</i>	19
Preparación de Homogenatos	19
Determinación de α y β-esterasas	19
Determinación de Glutation-S-transferasa	20
Determinación de acetilcolinesterasa	20
Determinación de oxidasas	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Bioensayos	22
Pruebas bioquímicas	23
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración letal media y proporción de resistencia de indoxacarb en diez generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección.	19
Cuadro 2. Comparación de medias χ^2 esterasas en diez generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección a Indoxacarb.	21
Cuadro 3. Comparación de medias de GST y oxidasas en diez generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección a Indoxacarb.	22
Cuadro 4. Comparación de medias de Aclt en 10 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección a Indoxacarb.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Absorbancias de proteínas en homogenatos de *Plutella xylostella* en diluyente buffer de fosfato (pH:7.2). 20

RESUMEN

El brócoli es una de las hortalizas más importantes en México ya que su producción está destinada a la exportación, los principales destinos de las ventas internacionales son Estados Unidos, Canadá, Japón, Alemania y Australia. La principal plaga de importancia económica que ataca a los cultivos de crucíferas es la Palomilla Dorso de Diamante, que daña la calidad del producto cosechado debido a la presencia de huevos, larvas y pupas las cuales ocasionan que sea rechazado para su exportación, este insecto plaga es considerado como una de las plagas más difíciles de controlar y hasta ahora los insecticidas son el principal método para su manejo, lo cual propicia el desarrollo de poblaciones resistentes, por lo que, es importante conocer los mecanismos de resistencia en los insectos. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar los niveles enzimáticos en una línea de laboratorio de *Plutella xylostella* en respuesta a la presión de selección del insecticida Indoxacarb durante 10 generaciones. Para la cuantificación de los niveles enzimáticos de α - β esterasas, oxidasas, glutatión S-transferasas y acetilcolinesterasas se realizaron pruebas bioquímicas en una línea resistente a Indoxacarb con selección de resistencia durante 10 generaciones aplicando dosis subletales (CL_{20}) y una línea susceptible. Los resultados obtenidos muestran que las glutatión S-transferasas y α -esterasas en la línea resistente superaron los niveles de la línea susceptible en 2 y 1.22 veces, mientras que, las medias del contenido de esterasas, oxidasas y acetilcolinesterasas de la línea resistente se reportan por debajo de la línea susceptible. Por lo que se puede concluir que glutatión S-transferasas y α -esterasas son las responsables de la resistencia a Indoxacarb en *P. xylostella*, por otro lado, oxidasas y acetilcolinesterasas juegan un papel poco relevante en la desintoxicación de Indoxacarb.

Palabras clave: Resistencia, Indoxacarb, Glutatión S-Transferasas, Esterasas.

ABSTRACT

Broccoli is one of the most important vegetables in Mexico since its production is destined for export, the main destinations of international sales are the United States, Canada, Japan, Germany and Australia. The main pest of economic importance that attacks cruciferous crops is the Diamond Back Moth, which damages the quality of the harvested product due to the presence of eggs, larvae and pupae that cause it to be rejected for export. This pest insect is considered as one of the most difficult pests to control and until now insecticides are the main method for its management, which favors the development of resistant populations, so it is important to know the mechanisms of resistance in insects. Therefore, the objective of the present investigation was to determine the enzyme levels in a laboratory line of *Plutella xylostela* in response to the selection pressure of the insecticide Indoxacarb during 10 generations. For the quantification of the enzyme levels of α - β esterases, oxidases, glutathione S-transferases and acetylcholinesterases, biochemical tests were carried out on an Indoxacarb-resistant line with resistance selection for 10 generations applying sublethal doses (LC20) and a susceptible line. The results obtained show that glutathione S-transferase and α -esterase in the resistant line exceeded the levels of the susceptible line by 2 and 1.22 times, while the mean content of β -esterase, oxidase and acetylcholinesterase in the resistant line are reported below the susceptible line. Therefore, it can be concluded that Glutathione S-transferases and α -esterases are responsible for resistance to Indoxacarb in *P. xylostela*, on the other hand, oxidases and acetylcholinesterases play a minor role in Indoxacarb detoxification.

Keywords: Resistance, Indoxacarb, Glutathione S-Transferases, Esterases

INTRODUCCIÓN

El brócoli es una de las hortalizas más importantes en México, ya que, un 80% de su producción está destinada a la exportación, los principales destinos de las ventas internacionales son Estados Unidos, ya que ahí se exporta el 85 % de la producción, el resto de las exportaciones se divide en Canadá, Japón, Alemania y Australia (SIAP, 2021), por lo que este cultivo representa una fuente importante de divisas para los productores de brócoli en el país. Los principales estados productores son: Guanajuato, Jalisco, Puebla y Sonora con un 90 % de la producción nacional, mientras que, el Estado de Guanajuato genera el 70 % (SIAP, 2021). La principal plaga de importancia económica que ataca a los cultivos de crucíferas es la Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella*), que daña la calidad del producto cosechado debido a la presencia de huevos, larvas y pupas que ocasionan que sea rechazado para su exportación (INIFAP, 2013), también causa graves daños, al ser considerado un defoliador voraz, al interferir en el crecimiento de las plantas e incluso causar la muerte y pérdida total de la misma (Da Silva, 2008). *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 *Plutella 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 (Mota y Wise, 2022). 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). Pero 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).

Objetivo General

- Determinar los niveles enzimáticos en una línea de laboratorio de *Plutella xylostella* en respuesta a la presión de selección del insecticida Indoxacarb durante 10 generaciones.

Objetivos Específicos

- Desarrollar una línea resistente de *Plutella xylostella* mediante la aplicación de dosis subletales CL₂₀ de Indoxacarb durante 10 generaciones.
- Determinar los niveles de esterasas, glutatión S- transferasas, acetilcolinesterasas y oxidasas en *Plutella xylostella* en relación al desarrollo de resistencia a Indoxacarb.

Hipótesis

- *Plutella xylostella* desarrollará un factor de resistencia mayor a 50 x durante 10 generaciones con presión de selección de Indoxacarb.
- El principal mecanismo de resistencia a abamectina será a causa de las enzimas esterasas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo del Brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*)

El brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) pertenece a la familia de las Brassicaceae. En los últimos 10 años la superficie sembrada para este cultivo se incrementado en un 5.6%. Actualmente en México se siembran 34 mil hectáreas de brócoli (SIAP, 2021). El cultivo de brócoli requiere un clima templado y frío, así como un suelo con mayor grado de concentración de acidez, el pH requerido es de un intervalo de 6 a 7, donde el suelo preferible para la siembra es de textura arenosa con buenas condiciones de humedad. Estos suelos le proporcionan una mayor infiltración de agua y la planta puede absorber con mayor facilidad los minerales que requiere (SAGARPA, 2011).

Origen

Esta hortaliza es originaria del Mediterráneo y Asia menor. En Italia, Libia y Siria recolectaron los primeros ejemplares de esta planta proveniente de las coles y las coliflores (SAGARPA, 2011).

Taxonomía de *Brassica oleracea*

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Tribu: Brassicinae

Subtribu: Brassicinae

Género: Brassica

Sección: Brassica

Especie: *Brassica oleracea* L.

Importancia Económica

Las crucíferas son un importante grupo de especies hortícolas, tanto por el área sembrada como por el valor de su producción. Las crucíferas de mayor importancia económica son brócoli, coliflor, repollo, col china y col de brúcelas. El contenido nutricional de estas especies hortícolas es variable, dependiendo principalmente de las condiciones ambientales donde se desarrolla la planta, la edad, las propiedades del cultivar, y el método de conservación, procesamiento y preparación (Jaramillo & Díaz, 2006).

En 2021 se cultivó en 34 000 ha con un valor comercial de \$3 860 miles de pesos, donde el principal mercado de exportación esta en Estados Unidos, Canadá y Japón (SIAP, 2021), 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 2022 la producción de brócoli a nivel nacional fue de 584 000 ton, siendo el Estado de Guanajuato el principal productor con un 70.2% de la producción total seguido de los estados de Puebla, Jalisco y Sonora con una producción de 45 343, 23 293 y 20 623 ton, respectivamente (SIAP, 2021).

Producción de Brócoli en Guanajuato

Guanajuato es el principal estado productor de brócoli a nivel nacional con una superficie de siembra de 24 233.90 ha y una producción de 408 897.38 ton, lo que equivale a un rendimiento promedio de 16.93 ton/ha, por lo que significa un ingreso en el valor de producción de 2'708 145.22 de miles de pesos (SIAP, 2021).

Plagas y Enfermedades del Brócoli

Las principales enfermedades son: Mildiu (*Peronospora parasitica*), Botritis (*Botrytis cynerea*), Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*), Mancha negra (*Alternaria brassicae*) y Pie negro (*Phoma lingam*) (Webb *et al.*, 2017).

Las principales plagas que afectan al cultivo de brócoli son: Polomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella*), Mariposa de la col (*Pieris brassicae*, *Pieris rapae*), Mosca de la col (*Delia radicum*) y Áfido del Nabo (*Lipaphis erysimi*), Pulgón Verde del Melocotonero (*Myzus persicae*), Áfido del Repollo (*Brevicoryne brassicae*) y el Gusano Falso Medidor (*Trichoplusia ni*), la más importante de estas plagas es la Palomilla Dorso de Diamante (Webb *et al.*, 2017).

Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella* L.)

Es una especie cosmopolita y de amplia distribución mundial, actualmente se encuentra en Norteamérica, América del Sur, así como en África, Europa y Australia. Está presente en todas las regiones productoras de crucíferas, sin embargo, se considera más importante en zonas bajas como en los trópicos y subtrópicos, en áreas templadas no puede sobrevivir el invierno por debajo de los 4 °C (Sánchez-Arregui, 2010).

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 se alimentan de las hojas, destruyendo el tejido de éstas, excepto la epidermis superior, dejando "ventanas transparentes" en las hojas. Las larvas de cuarto estadio se alimentan consumiendo la totalidad de las hojas excepto las nervaduras (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 otra. Los estudios indican que los adultos pueden permanecer en vuelo continuo durante varios días, recorriendo una distancia de hasta a 100 km por día (Shingo & Ventura, 2009).

Clasificación Taxonómica de *Plutella xylostella*

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*

El ciclo biológico dura 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 óvalo aplanada, 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 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.

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 & Álvarez, 2008).

Hospederos

El rango natural de hospedantes de *P. xylostella*, se limita a la familia Brassicaceae cultivadas y silvestres que se caracterizan por tener glucosinolatos. Los adultos utilizan un conjunto integrado de señales químicas y morfológicas para la localización y reconocimiento de la planta huésped (Sarfraz *et al.*, 2006).

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 (*Brassica rapa* var. *Pekinensis*), col de

bruselas (*Brassica oleracea* var. Gemmifera), repollo chino (*B. rapa* cv. Pekinensis), mostaza (*B. juncea*), colza (*B. napus*) (Bújanos *et al.*, 2013).

Daños

Plutella xylostella es conocida por defoliar numerosas plantas del género *Brassica* en muchas áreas del mundo; en algunos casos, es considerado como el factor limitante más importante en la producción exitosa de éstos cultivos (Chu, 1985).

El daño es causado por la alimentación larval; aunque las larvas son muy pequeñas, pueden ser bastante numerosas, resultando en la eliminación completa del tejido foliar excepto las venas de la hoja. Esto es particularmente perjudicial para las plántulas, y puede interrumpir la formación de cabezas en col, brócoli y coliflor. La presencia de larvas en los floretes puede resultar en el rechazo total de los productos, incluso si el nivel de daño en el tejido vegetal es insignificante (Capinera, 2008).

Control

Plutella xylostella se considera una de las plagas más difíciles de controlar. Hasta la fecha los plaguicidas siguen siendo el principal modo de control de *P. xylostella* en los cuales los principales grupos son diamidas, avermectinas, piretrinas y Bt (Xia *et al.*, 2014). 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 crucíferas 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).

Resistencia en *Plutella xylostella*

En 1953, *Plutella xylostella* se convirtió en la primera plaga de cultivos en el mundo en desarrollar resistencia al DDT, en la actualidad en muchos países adquiere resistencia a cada insecticida sintético usado para combatir esta plaga, en los campos de cultivo y adicionalmente esta polilla tiene la distinción de ser el primer insecto en desarrollar resistencia al insecticida bacteriano *Bacillus thuringiensis* (Talekar & Shelton, 1994; Sarfraz *et al.*, 2005).

P. xylostella ha desarrollado resistencia a nuevos insecticidas tales como clorfantriliprol, Indoxacarb, spinosad en pocos años (Furlong *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2022, la polilla de la col había desarrollado resistencia a aproximadamente 101 compuestos con diferentes modos de acción, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamato, piretroide, análogo de nereistoxina, benzoilurea, *Bacillus thuringiensis*, avermectina, espinosina, fenilpirazol, Indoxacarb, diacilhidrazina y diamida (Mota & Wise, 2022).

Investigaciones previas indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucran 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). Pero 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).

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).

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. 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 organismoplaga 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 (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).

Determinación de Resistencia

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

También llamadas pruebas de susceptibilidad, son técnicas de laboratorio basado en la dosis-mortalidad (Lagunes & 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 DL50, DL90 o de la concentración letal (Twine & Reynolds, 1980).

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 & Brogdon, 1987); generalmente correlacionan niveles de una enzima o una reacción enzimática específica, pueden ser cualitativos o cuantitativos, generalista o altamente específicos (Lagunes & Villanueva, 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 (amidases) 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 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 & 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 & 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 & Rueness, 1987; Ezemonye & Tongo, 2010). Por lo tanto, esta enzima ha sido útil como indicador de exposición a plaguicidas (Taysse *et al.*, 1998; Ezemonye & 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 & 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 Glutación (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 & 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 & 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 & 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 & 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 (Bisset, 2002).

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 dada 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).

Indoxacarb

El Indoxacarb es un insecticida a base de oxadiazina que tiene una buena actividad contra una serie de plagas de lepidópteros, así como algunas plagas de homópteros y coleópteros (Wing *et al.*, 2000).

Modo de Acción

Actúa bloqueando los canales de sodio de las células nerviosas lo que causa una descoordinación de movimientos, parálisis y muerte del insecto a las 24-60 horas de la aplicación; este proceso se denomina bioactivación.

Los síntomas aparecen rápidamente y se observan a los insectos que dejan de comer de 2-8 horas después de la aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Experimento

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.

Colonia Madre

Al comienzo del experimento se estableció una colonia madre de *P. xylostella* se realizaron colectas de larvas, pupas y adultos, las cuales se colocaron en contenedores de plástico y se depositaron en hieleras para su traslado a cajas entomológicas (60 x 40 x 40 cm) en condiciones controladas de 25 +- 2 ° C, 50 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad, esto se realizó con la finalidad de eliminar enemigos naturales (entomopatógenos o parasitoides) que pudieran estar presentes.

La línea de campo se produjo hasta F3 para así tener individuos suficientes para su estudio. Como línea 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 insecticida Indoxacarp utilizando un diseño experimental completamente al azar con 6 concentraciones distintas y cuatro repeticiones y un testigo el cual consistió de agua más adherente.

Bioensayos

Para realizar la evaluación del insecticida indoxacarp se utilizó el método de inmersión (IRAC, 2017), utilizando las larvas de *P. xylostella* del tercer instar. Se recortaron hojas de brócoli en forma de círculo de 6.0 cm de diámetro, posteriormente fueron sumergidas en las soluciones evaluadas por un tiempo de 10 segundos y se colocaron en papel absorbente para quitar los excesos de humedad durante una hora, de ahí se colocaron en cajas Petri con papel absorbente saturado de agua, después se transfirieron 10 larvas de *P. xylostella* en cada uno de los círculos de la hoja del brócoli, con un pincel de cabello de camello y se mantuvieron en una cámara climática a 27°C, 50% de humedad relativa (HR) y un fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad. El registro de mortalidad de las larvas se realizó a las 24 horas a partir del inicio del experimento. Como criterio de muerte se les realizó un estímulo a las larvas con un pincel en la parte dorsal, aquella que no respondía al estímulo era considerada muerta.

Inducción de Resistencia

Una vez realizado el bioensayo a la generación inicial y obtenida la curva de concentración-mortalidad, a las siguientes 10 generaciones, se mantuvieron bajo presión de selección aplicando la CL_{20} de la generación anterior, con ayuda de un atomizador se realizaron dos aplicaciones en plantas de brócoli, las cuales posteriormente se infestaban de larvas de *P. xylostella* para el desarrollo de resistencia. A las 48 h después de la segunda aplicación de cada generación se tomó muestra de las larvas del tercer instar, las cuales se colocaron en tubos de Eppendorf y se congelaron para posteriormente a ser la cuantificación de sus niveles enzimáticos.

Pruebas Bioquímicas

Cuantificación de Proteína a Larvas de *Plutella xylostella*

Para determinar el contenido de proteína en las larvas de *Plutella xylostella* se utilizó el método de Bradford (1984), con el kit-II de Bio-Rad y ASB (albumina sérica bovina) como proteína de referencia, se usaron larvas de tercer estadio y se colocaron ocho muestras en tubos eppendorf con diferentes densidades (0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.50, 1.75 y 2 larvas) de *P. xylostella* con 4 recipientes, se agregaron 500 μL de solución Buffer (KPO_4) a 0.05 M y un pH de 7.2, y se trituraron con ayuda de un macerador de tejidos y se aforo a 1 mL para emplearlo como fuente de enzima.

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

Preparación de Homogenatos

Una vez que se determinó 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 1.0 mL (Brogdon, 1983).

Determinación de α y β -esterasas

Preparación de reactivos: Se disolvió 5.3 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, diluyendo 10 mg en agua destilada.

Lectura de absorbancias: En una microplaca de 96 pozos se agregaron 100 μL de homogenato y se adicionaron 100 μL de acetato de α ó β -naftil, se dejó incubar durante 10 minutos, y se agregaron 100 μL de Fast-blue, dejándose incubar durante 2 minutos y se corrió en el lector de placas usando un filtro de 540 nm (Brogdon & Dickinson, 1983).

Determinación de Glutation-S-transferasa

Preparación de reactivos: Se disolvieron 0.0122 g de reduce glutati3n de 20 mL de Buffer (KPO_4). Para CDNB (1 – cloro – 2,4 dinitrobencono) se disolvieron 4 mg de CDNB en 2 mL de acetona + 18 mL de soluci3n Buffer (KPO_4).

Lectura de absorbancia: Se agregaron 100 μL del homogenato, m3s 100 μL de reduced glutation y 100 μL de CDNB, y se corri3 inmediatamente (T_0) en el lector de placas utilizando un filtro de 340 nm, se volvi3 a correr transcurridos 5 minutos (T_5). Para el an3lisis estadístico de 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).

Determinaci3n de acetilcolinesterasa

Preparaci3n de reactivos: se disolvi3 70 mg de acetilcolina-yodisada en 10 mL de acetona y se aforo a 90 mL de soluci3n Buffer (KPO_4). Para el DTNB (Acido-DitioBisNitrobenozoico) se prepar3 13 mg de DTNB y se le agrego 10 mL de soluci3n Buffer (KPO_4).

Lectura de absorbancias: se agregaron 100 μL de homogenato, m3s 100 μL de acetilcolina-yodisada y 100 μL de DNTB, se tom3 la lectura inmediatamente (T_0) en el lector de placas utilizando un filtro de 414 nm y se volvi3 a correr a los 10 minutos (T_{10}). Para el an3lisis estadístico a las lecturas de absorbancia se les saco la

diferencia entre ambos tiempos (T10-T0) y a los números negativos se les considero como 0 (Brogdon, 1988).

Determinación de oxidasas

Preparación de reactivos: se usó Buffer de Acetato de sodio (0.25 M): se disolvieron 3.32 g 3.0 M de acetato de sodio 37.35 mL de H₂O destilada, después se aforó a 40 mL ajustando el pH a 5. Para el TMBZ (Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride), se disolvió 20 mg de TMBZ en 10 mL de alcohol, se agregó 30 mL de solución Buffer acetato de sodio 0.25 M.

Lectura de absorbancia: Se colocaron 100 µL del homogenato, más 200 µL de TMBZ y se le adiciono una gota (25 µL) de agua oxigenada (H₂O₂) se dejó incubar por un tiempo de 5 minutos, y se corrió en el lector de placas utilizando 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 de Abbott (1925). Los resultados de la corrección de la mortalidad se sometieron al Analisis Probit (Finney, 1971) para obtener la curva de respuesta de la concentración-mortalidad, utilizando el programa SAS system for Windows ver 9.0 (SAS, 2002).

Con los valores obtenidos de las pruebas bioquímicas se realizó un análisis de varianza (ANVA), cuando el análisis indico diferencia significativa entre los tratamientos se utilizó la prueba de Tunkey (P=0,05), para la separación de las medias, R versión 3.3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos

En la Cuadro1 se muestran los resultados obtenidos a la respuesta de Indoxacarb durante 10 generaciones. La CL₅₀ para la primera generación fue de 43.99 y de 11.28 para la línea susceptible. Observándose un aumento en la proporción de resistencia desde la generación uno a la diez de 186.06 veces con base a la línea susceptible. Estos resultados son superiores a los reportado Nehare *et al.* (2010) quienes desarrollaron una proporción de resistencia de 31.3 al aplicar presión de selección de Indoxacarb en mismo número de generaciones que en esta investigación.

Cuadro 1. Concentración letal media y proporción de resistencia de Indoxacarb en diez generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección.

Generación	CL ₅₀ (ppm)	LFS-LFI	CL ₂₀ (ppm)	Ecu. Predicción	PR ¹
LS ²	11.28	4.878 - 24.805	0.77	y= 0.017 - 0.008	-
G ₁	43.99	22.649 - 86.548	1.09	y= 0.007 - 0.003	3.90
G ₂	97.04	22.520 - 280.330	8.00	y= 0.158 - 0.069	8.60
G ₃	131.79	86.620 - 181.880	57.71	y= 0.658 - 0.287	11.68
G ₄	456.63	294.350 - 1,528	203.86	y= 2.973 - 1.170	40.48
G ₅	529.96	293.57 - 1,400	160.56	y= 1.190 - 0.444	48.11
G ₆	466.09	337.22 - 620.990	198.79	y= 0.796 - 0.290	41.32
G ₇	575.62	504.64 - 644.470	263.48	y= 0.517 - 0.179	51.03
G ₈	727.91	686.40 - 793.47	435.00	y= 0.613 -0.212	64.53
G ₉	1,479	1,083 - 3,075	610.19	y= 2.973 - 1.170	131.12
G ₁₀	2,099	1,648 - 2,902	1,265	y= 8.099 - 2.453	186.06

LFI: limite fiducial inferior; LFS: limite fiducial superior; P.R: proporción de resistencia.

Pruebas bioquímicas

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

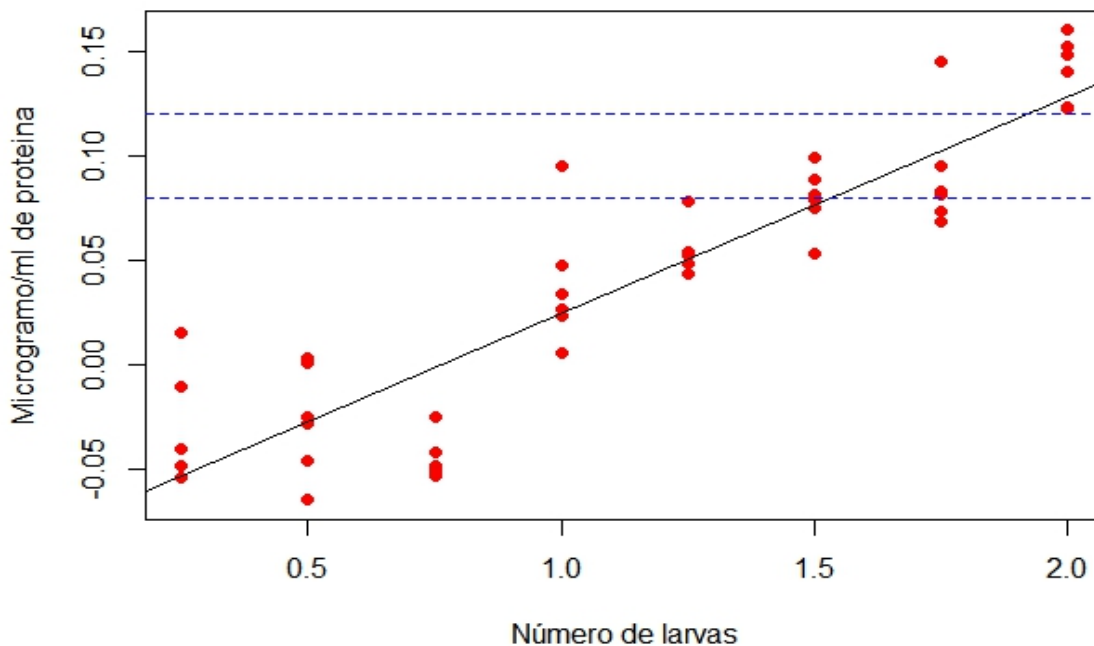


Figura 1. Absorbancias de proteínas en homogenatos de *Plutella xylostela* en diluyente buffer de fosfato (pH:7.2).

En la Cuadro 2 se muestran las medias de absorbencia para α -Est y β -Est, donde podemos observar que en ambas enzimas hay diferencia significativa entre las generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección a Indoxacarb. α -Est presento un aumento a través de las diez generaciones, con una media de 4.004 en la generación 10, seguido de la generación 8 con una absorbencia de 4.004, mientras que en la generación 1 se expresa el valor más bajo con una media de 3.518. Por otro lado, β -Est no influye en la resistencia al Indoxacarb, porque no hay expresión significativa con respecto de la línea susceptible en las diez generaciones en estudio. Nehare *et al.* (2010) reportan que las esterasas están ampliamente involucradas en la resistencia al Indoxacarb en la palomilla dorso de dimanate.

Cuadro 2. Comparación de medias α -esterasas en diez generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección a Indoxacarb.

G¹	α-Esterasas (Media \pm SD²)	β-Esterasas (Media \pm SD²)
LS ³	3.800 0.096 c	3.818 \pm 0.080 a
G1	3.518 \pm 0.066 c	3.298 \pm 0.050 d
G2	3.747 \pm 0.228 bc	3.386 \pm 0.098 cd
G3	3.785 \pm 0.045 bc	3.442 \pm 0.051 cd
G4	3.662 \pm 0.300 bc	3.412 \pm 0.075 cd
G5	3.648 \pm 0.074 bc	3.535 \pm 0.082 bc
G6	3.526 \pm 0.028 c	3.297 \pm 0.022 d
G7	3.752 \pm 0.062 bc	3.465 \pm 0.123 cd
G8	4.004 \pm 0.004 b	3.683 \pm 0.178 ab
G9	3.690 \pm 0.047 bc	3.484 \pm 0.033 bcd
G10	4.644 \pm 0.737 a	3.791 \pm 0.333 a

Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey, $\alpha < 0.05$); ¹Generación; ²Desviación estándar; ³Línea susceptible.

La enzima GST presenta diferencia significativa entre las generaciones en estudio (Cuadro 3). La generación 10 fue la que reporto el valor máximo con una media de 0.052, seguido de la generación 8 con una media de 0.032, mientras que en la

generación 9 se presenta el valor más bajo con una media de 0.016. Estudios anteriores demuestran que la sobreexpresión de glutathion S-transferasa es responsable de la resistencia de organofosforados piretroides y diamidas (Furlong *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014). En el caso de las oxidasas se presenta diferencia significativa en las generaciones de estudio, sin embargo, ninguna generación sobrepasó el valor medio de la línea susceptible 3.470, como se observa en la Cuadro 3. Estos resultados concuerdan con lo mencionado con Nehare *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2017) quienes mencionan que *P. xylostella* puede desarrollar resistencia al Indoxacarb a causa de la sobreexpresión de glutathion S-transferasas.

Cuadro 3. Comparación de medias de GST y oxidasas en diez generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección a Indoxacarb.

G¹	GST (Media ± SD²)	Oxidasas (Media ± SD²)
LS ³	0.026 ± 0.041 ab	3.470 ± 0.306 a
G1	0.019 ± 0.011 b	3.162 ± 0.043 c
G2	0.021 ± 0.016 b	3.293 ± 0.072 abc
G3	0.024 ± 0.008 ab	3.265 ± 0.030 bc
G4	0.018 ± 0.007 b	3.196 ± 0.053 c
G5	0.024 ± 0.006 ab	3.325 ± 0.095 abc
G6	0.018 ± 0.006 b	3.210 ± 0.095 c
G7	0.020 ± 0.007 b	3.270 ± 0.073 bc
G8	0.032 ± 0.004 ab	3.390 ± 0.119 ab
G9	0.016 ± 0.007 b	3.217 ± 0.306 bc
G10	0.052 ± 0.040 a	3.155 ± 0.066 c

Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey, $\alpha < 0.05$); ¹Generación; ²Desviación estándar; ³Línea susceptible.

Para la enzima Aclt se puede observar que hay diferencia significativa en las generaciones en estudio, sin embargo, ninguna de las generaciones con presión de selección superó en contenido enzimático a la línea susceptible que presenta una

absorbencia media de 0.040 seguida de la generación 10 con un valor de absorbencia de 0.027 (Cuadro 4). Investigaciones previas han demostrado que la enzima Aclt es considerada un mecanismo de resistencia principalmente para organofosforados y en mayor medida a carbamatos (Bisset, 2002).

Cuadro 4. Comparación de medias de Aclt en 10 generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección a Indoxacarb.

G¹	Aclt (Media ± SD²)
LS ³	0.040 ± 0.033 a
G1	0.0001 ± 0.0003 c
G2	0.0003 ± 0.0001 c
G3	0.000 ± 0.000 c
G4	0.0004 ± 0.001 c
G5	0.001 ± 0.002 c
G6	0.000 ± 0.000 c
G7	0.001 ± 0.003 c
G8	0.002 ± 0.003 c
G9	0.012 ± 0.011 bc
G10	0.027 ± 0.013 ab

Medias seguidas de la misma letra dentro de cada columna no presentan diferencia significativa (Tukey, $\alpha < 0.05$); ¹Generación; ²Desviación estándar; ³Línea susceptible.

CONCLUSIONES

P. xylostella en diez generaciones con presión de selección al insecticida Indoxacarb aumento su resistencia en más de 180 veces, lo que demuestra su gran capacidad para desarrollar resistencia a insecticidas.

Los principales grupos de enzimas involucrados en el desarrollo de resistencia a Indoxacarb en *P. xylostella* son α -esterasas y glutatión S-transferasas, por su parte β -esterasas, oxidasas y acetilcolinesterasas juegan un papel poco relevante en la desintoxicación de Indoxacarb en la palomilla dorso de diamante.

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 Management Science*, 62: 805-810. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1225/>
- 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. *Journal Applied Entomology*, 130: 122-127.
- Bass, C. I., Denholm, M. S., Williamson, R., Nauen. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121: 78-87. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357515000826>
- Bass, C. L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance, *Pest Management Science*, 67: 886-890. <https://doi.org/10.1002/ps.2189>.
- 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., y 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., y Barber, A. M. (1987). Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquito's homogenates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29: 252-259.
- 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., y 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., 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., 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>
- Capinera, J. L. (2008). *Encyclopedia of Entomology*. Second edition. USA, Springer, 43-46.
- 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.

- Chu, Y. I. (1985). The migration of diamondback moth. Eds. NS Talekar, TD Grigs. Taiwan, AVRDC Publication 86(248): 77-81.
- Costa, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. (2006). 366(1- 2):1-13.
- Da Silva C., J. (2008). *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Efeito da Sinigrina Aplicada em Folhas de Couve e Brócolis. 84 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. *Journal of Economic Entomology*, 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, 889-896.
- Devonshire, A. L., & Moores, G. D. (1984). Characterization insecticide-insensitive acetylcholinesterase: microcomputer based analysis of enzyme inhibition in homogenates to individual house fly (*Musca domestica*) heads. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 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. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 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.
- 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., & 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., & Brun, L. O. (1994). A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) *Bull. Entomological Research*. 84: 11-16.
- 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). Dosdall, Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology*, 58: 517-541. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurevento-120811-153605>
- Guengerich, F. P. (1963). Bioactivation and detoxification of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metabolism and Disposition*, 21: 1-6.

- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases, *Annu. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 51-88.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 651-658.
- Hubert, J. J. (1980). *Bioassay*. Kendall/Hunt Pub. Co. USA, 164.
- Hutson, D. H., Pickering, B. A., & Donninger, C. (1972). Phosphoric acid triesterglutathione alkyltransferase. A mechanism for detoxification of dimethyl phosphate triesters. *Biochemistry & molecular biology journal*, 127: 285-293.
- Ibel, K., May, R. P., Kirscheer, K., Szadkowski, H., Mascher, E., & Lundahl, P. (1990). Proteindecored micelle structure of sodium-dodecyl-sulfato proyein complexes as determinadesd by neutron scattering. *European Journal of Biochemistry/ FEBS*, 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. [file:///Users/macbook/Downloads/PRODUCCION%20DE%20BROCOLI.p df](file:///Users/macbook/Downloads/PRODUCCION%20DE%20BROCOLI.p%20df).
- IRAC, (2021). Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas. Recuperado el 25 de Octubre de 2021, de <http://www.iraonline.org/about/resistance/>
- 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. *Journal of biological and chemical sciences*, 271: 22203-22210.

Khaliq, A., Attique, M. N. R., & Sayyed, A. H. (2007). Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Bulletin of Entomological Research*, 97: 191-200.

Kwong T. C. (2007). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology*. 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.

Lamoureux, 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.

Li, X. C., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review Entomology*, 52: 231-253.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.15110>.

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. 190.

- 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.
- Mota S. D., & Wise, J. C. (2022). APRD. The Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. On-Line at: [Http://Www.Pesticideresistance.Org](http://www.pesticideresistance.org).
- Midori Biocontrol, (2014). *Plutella xylostella* Palomilla dorso de diamante/Diamoback moth. Ficha de control de plagas.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.12.002>
- SAGARPA. (2011). Monografía del cultivo de brócoli. Monografía informativa. Subsecretaría de fomentos a los agronegocios. SAGARPA. MÉXICO. 11.
- 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.; Dossall, L. M.; Keddie, B. A. (2006). Diamondback moth-host plant interactions: implications for pest management. *Crop Protection*, 25 (7): 625–639. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219405002565>.

- 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.
- Scott, J. G., & Wen, Z. (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science*, 57: 958-967.
- Shingo, G., & Ventura, M. U. P. (2009). Producción del cultivo *Bassica oleracea* L. var. Acephala con fertilización mineral y orgánica. *Semina: Ciencias agrarias*, 30(3): 589-594.
- Shishido, T., Usui, K., Sato, M., & Fukami, J. (1972). Enzymatic conjugation of diazinon with glutathione in rat and American cockroach. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2: 51-63.
- SIAP. (2021). Panorama Agroalimentario 2020. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021. Consultado el 3 febrero de 2022.
- Sogorb, M. A., & Vilanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128(1-3): 215-28.
- Taysse, L.; Chambras, C., Marionuet, 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.

- Twine, P. H., & Reynolds H. T. (1980). Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. *Journal of Economic Entomology*, 73: 339-242.
- Vargas, R., Olivares, N., & 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, 80-84.
- Vontas, J. G., Small, G. J., & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Journal of Biochemistry and Physiology*, 357: 65-72.
- 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. *Journal of Structural Biology*, 164: 228-235.
- Webb, S. E., Niño, A., & Smith, H. A. (2017). Manejo de Insectos en Crucíferas (Cultivos de Coles) (Brocoli, Repollo, Coliflor, Col, Col Rizada, Mostaza, Rabano, Nabos): ENY481/IG168, 12/2016. *EDIS*, 2017(1): 30-30.
- Wing, K. D. et al. (2000). Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects. *Journal of Crop Protection*. 19: 537-545.
- Xia, Y., Lu, Y., Shen, J., Gao, X., Qiu, H., & Li, J. (2014). Resistance monitoring for eight insecticides in *Plutella xylostella* in central China. *Crop Protection*, 63: 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.03.011>
- 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., Li, D., Wan, H., You, H., & Li, J. (2017). Cross-resistance and biochemical mechanisms of resistance to indoxacarb in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140: 85-89. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.011>