

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Enzimas Detoxificativas en la Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella*) en Respuesta a la Aplicación de Abamectina

Por:

LUIS ENRIQUE VARGAS VARGAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Enzimas Detoxificativas en la Palomilla Dorso de Diamante (*Plutella xylostella*) en Respuesta a la Aplicación de Abamectina

Por:

LUIS ENRIQUE VARGAS VARGAS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

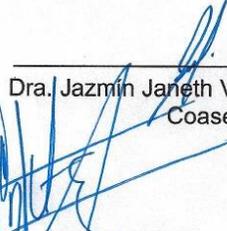
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

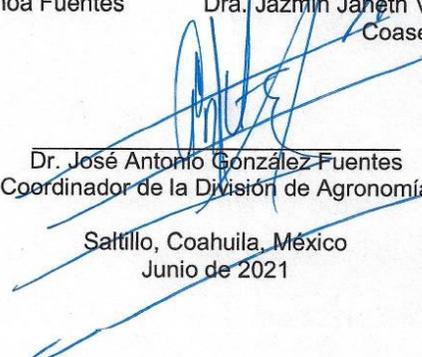
Aprobada por el Comité de Asesoría


Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor Principal Interno


Mc. José Francisco Rodríguez Rodríguez
Asesor Principal Externo


Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Coasesor


Dra. Jazmín Janeth Velázquez Guerrero
Coasesor


Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía

Satillo, Coahuila, México
Junio de 2021



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, graficas, 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

Luis Enrique Vargas

Nombre y Firma

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por cobijarme desde el momento en que llegue por primera vez a esta institución y formarme profesionalmente.

Al Departamento de Parasitología Agrícola por darme las herramientas necesarias para completar mi formación y desarrollarme de manera eficaz y profesionalmente durante toda mi carrera.

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

A MI MADRE

FRANCISCA VARGAS TERRONES. Gracias por haberme dado la vida, amor, cariño y ser parte fundamental en mi desarrollo profesional, estoy infinitamente agradecido por tu apoyo incondicional en todo momento, por haberme dado las mejores lecciones de vida, por tus esfuerzos, oraciones y desvelos, por ser el pilar de mi vida y por darme la mejor herencia de mi vida “una profesión” y por haber tenido confianza en mí, Gracias.

A MIS HERMANOS

MARIELA VARGAS Y RAMON VARGAS. Con cariño para ustedes, Gracias por llenar mi vida de su amor, comprensión, alegría, por sus consejos y por el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A VERONICA BERENICE VILLALVAZO CRUZ.

Gracias por estar a mi lado y formar parte de mi vida, y por tu apoyo incondicional y ser mi motivación para seguir adelante y ser mejor cada día, gracias por tu amor y cariño que me brindas en todo momento, vivimos momentos maravillosos, alegrías, tristezas, discusiones pero a pesar de todo cada día hemos salido adelante por todo esto gracias mi chaparrita de mi vida.

A MI HIJA ZOE BERENICE VARGAS VILLALVAZO.

Gracias por ser mi inspiración para poder lograr esta meta en mi vida, por alimentarme a seguir con tu cariño y amor sincero y por darme tantas alegrías en mi vida.

RESUMEN

La principal plaga de importancia económica en las crucíferas es la “Palomilla Dorso de Diamante” *Plutella xylostella*, la cual es una especie cosmopolita altamente destructiva, que afecta la calidad del producto debido a la contaminación por huevos y larvas, ocasionando su rechazo para exportación, los insecticidas son el principal método para su control, siendo las diamidas, avermectinas, piretrinas y *Bacillus thuringiensis* (Bt) los más utilizados para el control de esta plaga. El aspecto más importante en el manejo de la resistencia, es el conocer los mecanismos responsables de esta.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar la resistencia a abamectina en larvas de tercer instar de *P. xylostella*. Para esto se realizó presión de selección (CL_{20}) durante 10 generaciones y se determinó el desarrollo de resistencia entre las generaciones en estudio, mediante bioensayos de película residual, 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 obtenidos demuestran que *P. xylostella* es capaz de desarrollar resistencia fácilmente a Abamectina al obtener un factor de resistencia de 33.40 con base a una línea susceptible. Las principales enzimas detoxificativas a abamectina es la α y β Esterasas al reportar una proporción de resistencia de 49.99 y 45.55 % y una clasificación de medianamente alterado. Por otro lado, Glutathion S Transferasas presentó una resistencia nula para este insecticida.

Palabras clave: *Plutella xylostella*, Abamectina, enzimas Detoxificativas, resistencia, la α y β Esterasas.

ABSTRAT

The main pest of economic importance in crucifers is the “Diamondback Moth” *Plutella xylostella*, which is a highly destructive cosmopolitan species that affects the quality of the product due to contamination by eggs and larvae, causing rejections for exportation, insecticides are the main method for its control, being diamides, avermectins, pyrethrins and *Bacillus thuringiensis* (Bt) the most used for the control of this pest. The most important aspect in managing resistance is knowing the mechanisms responsible for it.

Therefore, the objective of the present investigation was to characterize the resistance to abamectin in third instar larvae of *P. xylostella*. For this, selection pressure (CL20) was carried out for 10 generations and the development of resistance between the generations under study was determined, through residual film bioassays, as well as biochemical tests to quantify the content of α and β Esterases, Glutathione S Transferases, Acetyl Cholinesterases and Oxidases, enzymes related to resistance to insecticides. The results shows that *P. xylostella* is able to develop resistance to Abamectin by obtaining a resistance factor of 33.40 based on a susceptible line. The main detoxifying enzymes of abamectin are α and β esterases, reporting a resistance ratio of 49.99 and 45.55% and a classification of moderately altered. On the other hand, Glutathione S Transferases showed zero resistance to this insecticide.

Keywords: *Plutella xylostella*, Abamectin, Detoxifying enzymes, Resistance, α y β Esterases.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRAT	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	2
Hipótesis.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Cultivo del brócoli (<i>Brassica oleracea</i> L.).....	3
Origen.....	3
Taxonomía de <i>Brassica oleracea</i>	3
Producción de brócoli en México	4
Producción de brócoli en Guanajuato.....	4
Palomilla dorso diamante (<i>Plutella xylostella</i> L.)	5
Clasificación taxonómica	5
Ciclo de vida de <i>Plutella xylostella</i>	6
Hospederos.....	7
Daños	7
Control cultural.	8
Control biológico.....	8
Control químico.....	8
Resistencia.....	9
Tipos de resistencia	10
Determinación de resistencia	11
Enzimas detoxificativas.....	13
Esterasas	13
Glutación-S-Transferasa.....	13

Oxidasas de función múltiple (MFO)	15
Acetilcolinesterasa.....	15
Abamectina	16
Modo de acción	16
Resistencia en <i>Plutella xylostella</i>	16
MATERIALES Y METODOS	18
Ubicación del experimento.....	18
Colecta de material biológico.....	18
Insecticida	19
Bioensayos.....	19
Inducción de resistencia	19
Pruebas bioquímicas	20
Cuantificación de proteína a larvas de <i>Plutella xylostella</i>	20
Preparación de homogenatos.....	20
Determinación de α y β -esterasas	20
Preparación de reactivos	20
Lectura de absorbancias.....	20
Determinación de Glutation-S-transferasa	21
Preparación de reactivos	21
Lectura de absorbancias.....	21
Determinación de acetilcolinesterasa.....	21
Preparación de reactivos	21
Lectura de absorbancias.....	21
Determinación de oxidasas.....	21
Preparación de reactivos	21
Lectura de absorbancias.....	22
Análisis estadístico	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Bioensayos.....	23
Pruebas bioquímicas	24
CONCLUSIÓN	29
BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración letal media (CL ₅₀) de abamectina en diferentes generaciones de <i>plutella xylostella</i>	23
Tabla 2. Comparación de medias de α - Esterasas y β - Esterasas en 10 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección a Abamectina.....	25
Tabla 3. Comparación de medias de GST y oxidasas en 10 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección a Abamectina.	26
Tabla 4. Comparación de medias de Aclt en 10 generaciones de <i>Plutella xylostella</i> con presión de selección a abamectina.	27
Tabla 5. Proporción de resistencia del contenido de enzimas en 4 generaciones de <i>Plutella xylostella</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Departamento de parasitología agrícola.	18
Figura 2. Absorbancias de proteína en homogenatos de <i>Plutella xylostella</i> en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2).	24

INTRODUCCIÓN

El brócoli (*Brassica oleracea* L.) es originario de las costas del Mediterráneo Oriental y es considerada como una verdura con alto valor nutricional ya que se le atribuyen propiedades para la prevención de algunas enfermedades (Zilli, 2018).

Es un cultivo que se desarrolla principalmente durante las estaciones de otoño e invierno, para un crecimiento normal de la planta es necesario que las temperaturas durante la fase de crecimiento oscilen entre 20 y 24 °C; para iniciar la fase de inducción floral necesita entre 10 y 15 °C durante varias horas del día. Prefiere suelos con tendencia a la acidez y no a la alcalinidad, un nivel óptimo de pH (acidez) entre 6.5 y 7.0, con textura media para soportar la salinidad excesiva del suelo y del agua de riego (Santoyo y Martínez, 2011).

A nivel mundial, se producen 26 millones de toneladas, China es el principal productor, aporta 10 millones de toneladas; México es cuarto lugar con 717,424 toneladas. A nivel nacional se siembran 31,900 hectáreas de brócoli, lo que representa 3.3% de la producción de hortalizas (FAO, 2019). En el 2016, el volumen de producción fue de 507,482 ton, de las cuales Guanajuato ocupó el primer lugar con 320,268 ton; seguido de Michoacán 48,456 ton; Puebla 41,258 ton; Jalisco 25,436 ton; Sonora 15,854 ton (Zilli, 2018).

De la producción de brócoli en México, 70% se destina a la exportación, siendo Estados Unidos su principal destino, así como Canadá, Japón y algunos países de Europa, entre un 70 y 80% del brócoli que se exporta se envía congelado y el resto llega fresco hasta su último destino (Zilli, 2018).

La principal plaga de importancia económica en las crucíferas es la palomilla “Dorso de Diamante” *Plutella xylostella* (INIFAP, 2013), la cual es una plaga cosmopolita altamente destructiva (Heckel, 2006), que afecta la calidad del producto debido a la contaminación por huevos y larvas, ocasionando su rechazo para exportación (INIFAP, 2013).

P. xylostella se considera que es una de las plagas más difíciles de controlar, hasta ahora los productos de síntesis química son el principal método para su control,

siendo las diamidas, avermectinas, piretrinas y *Bacillus thuringiensis* (Bt) los principales grupos de insecticidas utilizados para erradicar esta plaga (Xia *et al.*, 2014).

Debido a la alta presión de selección de los insecticidas, ha generado resistencia a la mayoría de materias activas utilizadas para su control, el aspecto más importante en el manejo de resistencia a los insecticidas, es la comprensión de los mecanismos que conducen a la resistencia de las plagas a estos. Investigaciones previas, indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucra mutaciones de aminoácidos de destino, la sobreexpresión o mutaciones de desintoxicación, enzimas detoxificantes, resistencia a la penetración y resistencia de comportamiento (Ahmad *et al.*, 2006; Bass *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayor parte de mecanismos de resistencia en común, es la resistencia metabólica, con un aumento en las actividades de esterasas, glutatión S-transferasas, y oxidasas (Li *et al.*, 2007; Bass *et al.*, 2011).

Objetivo general

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

Objetivos específicos

- Desarrollar una línea resistente de *Plutella xylostella* mediante la aplicación de dosis subletales CL_{20} de abamectina durante 10 generaciones
- Determinar los niveles de esterasas, glutatión S transferasas, acetilcolinesterasas y oxidasas en *Plutella xylostella* en relación al desarrollo de resistencia a abamectina.

Hipótesis

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

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo del brócoli (*Brassica oleracea* L.)

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*) pertenece a las antiguas crucíferas, ahora familia *Brassicaceae* por derivar del típico género, reciben así el nombre genérico de Brásicas, un selecto grupo de vegetales de mucha importancia como la coliflor, repollo y brócoli. Se consume la inflorescencia que tiene que ser compacta y de grano fino, como características comerciales deseables; aunque en otros países se encuentran variedades que producen varios ramilletes por planta de tamaño pequeño y menos compacto. Es un vegetal que se consume mucho a nivel mundial (USAID, 2008).

Se le atribuyen propiedades en la prevención de algunas enfermedades, tiene alto contenido en fibra, aporta vitamina C y B2, calcio, potasio, fósforo, contiene antioxidantes y se considera con propiedades nutracéuticas y anticancerígenas (Zilli, 2018).

Origen

Su origen parece que está ubicado en el Mediterráneo oriental y concretamente en el Próximo Oriente (Asia Menor, Líbano, Siria, etc.). La zona noreste del Mediterráneo (desde Grecia hasta Siria) sería el centro de origen más probable de esta hortaliza (Corpocauca, 2007).

Taxonomía de *Brassica oleracea*

Order: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Tribu: Brassiceae

Subtribu: Brassicinae

Género: *Brassica*

Especies: *Brassica oleracea* L

Producción de brócoli en México

México ocupa el quinto lugar y Guanajuato está en el primer lugar en producción nacional, y 70% de la producción se destina al mercado de exportación. Principalmente brócoli congelado; 75% de las exportaciones se van en esta presentación y 25% en fresco (Zilli, 2018).

Estados Unidos es el mercado más importante para el brócoli y coliflor producidos en México, debido a que demanda la mayor parte del volumen producido (García, 2018).

El brócoli es el principal producto agrícola que Guanajuato exporta, con expectativas de crecimiento, representando una buena oportunidad para productores, comercializadores y la agroindustria, a través de programas estatales cuyo objetivo es contribuir a la sustentabilidad agrícola y mejorar el nivel de vida de los habitantes (Zilli, 2018).

Producción de brócoli en Guanajuato

El total de producción a nivel nacional es de 40.000 hectáreas de brócoli, de las que Guanajuato se encarga de cosechar y distribuir 38.000 hectáreas; de cada hectárea, salen de 12 a 15 toneladas. El costo de la caja que contiene 9 kilos oscila entre los 3 y 8 dólares, lo que deja un ingreso de 60.000 a 70.000 pesos por extensión de terreno (Hernández y Rodríguez 2018).

De acuerdo con información publicada por El Financiero, de esta producción

agrícola guanajuatense, solo se queda el 10% de este producto alimentario para el consumo en la República, mientras que el restante se exporta a diferentes países, situándose Estados Unidos como principal comprador, seguido de Canadá, Japón y algunos países europeos (Hernández y Rodríguez 2018).

Palomilla dorso diamante (*Plutella xylostella* L.)

Plutella xylostella (L.) es el insecto plaga más destructivo de las brasicáceas en todo el mundo (Sánchez y Arregui, 2010).

También conocida como polilla de las crucíferas. Se trata de una pequeña mariposa de color gris pardo y una línea sinuosa cuyos hábitos son crepusculares y nocturnos. Las larvas tienen un color blanquecino primero y verde claro después. Aunque en las primeras fases estas orugas se alimentan de tejido foliar causando pequeños y numerosos agujeros, en los últimos periodos de gran voracidad atacan los brotes terminales, es decir, el futuro cogollo comestible, siendo entonces muy importante el daño causado a las plantaciones (Nebreda, 2005).

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 estadios biológicos de huevecillo, larva, pupa y adulto (Bújanos y Marín, 2001)

Huevo: La hembra oviposita poco más de 200 huevecillos en forma individual, formando pequeños grupos de 2 o 3 en el envés y peciolos de las hojas, en los tallos y floretes (Bújanos y Marín, 1996). 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. Los huevecillos tardan en eclosionar de tres a nueve días dependiendo de la temperatura ambiental.

Larva: La larva del primer estadio es de color amarillo-blanquecino, con la cápsula cefálica oscura; se alimenta del envés de las hojas haciendo pequeños agujeros. Por lo general las larvas de primer y segundo instar minan entre la capas cerosas epidermales de las hojas, mientras que las larvas del tercer y cuarto instar se alimentan por el envés consumiendo toda la lámina foliar. Las larvas maduras del cuarto instar miden un poco menos de 1 cm de longitud y pueden ser de color verde pálido, ocre pálido, amarillo claro y castaño oscuro, con las manchas oculares negras. El último par de falsas patas se encuentra ampliamente separado formando una “V” invertida, característica que permite identificar a las larvas de esta especie.

Pupa: La pupa mide de 0.5 a 0.6 cm de longitud y es de color amarillo claro, amarillo verdoso o verde claro con bandas longitudinales de color café oscuro. Durante el estadio de prepupa la larva teje un cocón blanco dentro del cual se transforma en pupa; esta estructura la adhiere firmemente a diferentes partes de la planta y es una protección física contra algunos parásitos o depredadores.

Adulto: El adulto de dorso de diamante es una palomilla pequeña que mide de 1.2 a 1.5 cm de expansión alar, y de 0.5 a 0.8 cm de longitud. La hembra es color gris pardo oscuro y por lo general es más grande que el macho. El macho en su parte dorsal presenta un patrón de color crema con forma de tres diamantes, los cuales se distinguen cuando las alas están 10 plegadas; las alas anteriores de los machos tienen pequeños puntos negros en sus márgenes que le dan una coloración oscura resaltando la figura de los diamantes (Bújanos y Marín, 2001).

Hospederos

Las orugas de la palomilla dorso de diamante se alimentan exclusivamente de las brassicáceas, incluyendo cultivos en los que se consume la cabeza y los tallos, como la col, el brócoli, la coliflor y las coles de Bruselas; los cultivos de hojas anchas como bok choy, acelga, col rizada y mostaza, además de los tubérculos como rábano y nabos. Las plantas de esta familia contienen compuestos bioquímicos llamados glucosinolatos que la palomilla dorso de diamante utiliza como estimulantes de ovoposición. Aun cuando las palomillas son especialistas en brassicáceas, también se sienten atraídas de manera preferente hacia otros tipos de cultivos y la palomilla dorso de diamante tiene marcada preferencia por las acelgas. Las mostazas, el nabo y el colinabo son sus últimas opciones (Wells, 2018).

Daños

Las larvas se alimentan de la superficie inferior de la hoja, dejando la capa cerosa de la superficie superior intacta, por lo que se forman ventanas transparentes. En caso de infestación grave, se pueden llegar a destruir hojas enteras, dejando solo los nervios. Las larvas también se alimentan de las partes verdes y ricas en clorofila de los tallos y vainas, provocando el blanqueamiento del cultivo. Las plantas muy dañadas tienen un aspecto atrofiado y, en la mayoría de los casos, mueren. En las plantas de colza, las larvas también se alimentan de las yemas florales, flores y de las vainas de semillas, provocando la pérdida de las mismas (Koppert, 2018).

Control cultural.

Debido a que la palomilla dorso de diamante es repelida por compuestos volátiles que genera el tomate, se sugieren siembras intercaladas de este cultivo en col; así mismo los riegos intermitentes provocan la mortalidad de las larvas, principalmente las de primer instar.

Destrucción de los residuos de cosechas.

El repollo es muy atractivo para la palomilla dorso de diamante, por lo que se puede usar esta planta como cultivo trampa, este debe ser manejado en forma adecuada para evitar que sea un foco de infestación para otros sembradíos (Monroy, 2015).

Control biológico

Se han reportado cerca de 90 especies parasitoides para palomilla dorso de diamante de los cuales, han resultado más eficientes en la reducción de la población los siguientes:

- *Apanteles plutellae* (*Braconidae*) (ataca los primeros 3 instares larvarios).
- *Diadegma insulare* (*Ichneuminidae*) (parasita larvas).
- *Diadromus plutellae* (parasita pupas).
- *Trichogramma chilonis*, *T. minutum*, *T. pretiosum* (*Trichogrammatidae*) (parasita huevecillos).

La identificación de especies parasitoides, evaluación del nivel de parasitismo y su manejo (protección contra insecticidas), en la actualidad se están valorando como una de las mejores salidas para enfrentar las poblaciones de la PDD (Monroy, 2015).

Control químico

Debido a que esta palomilla desarrolla resistencia rápidamente (por ser una especie multivoltina) el control químico debe estar encaminado a pruebas de resistencia por medio de sinergistas y rotación de insecticidas, especialmente con productos de ingredientes activos como nicotinoides, abamectinas, etc (Monroy, 2015).

Cuando se apliquen insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* se debe asegurar tener buena cobertura para garantizar que todas las larvas ingieran la bacteria.

Entre los insecticidas organicosintéticos utilizados para el control podemos encontrar:

- Bifentrina: 240 - 400 mL · ha-1.
- Esfenvalerato 5%: 1,0 - 1,5 L · ha-1.
- Imidacloprid: 0,75 L · ha-1.
- Indoxacarb: 100 - 250 g · ha-1.
- Metoxifonozide: 0,33 - 0,5 L · ha-1.
- Thiamethoxam + clorantraniliprole: 0,75 – 1,0 L · ha-1 (al suelo empapado o goteo).
- Triclorfón PS 80: 1,0 - 1,5 kg · ha-1.

Entre los productos de origen biológico o botánico encontramos:

- Argemonina + berberina: 1,0 a 2,0 L · ha-1.
- Azadiractina: 0,36 – 1,53 L · ha-1.
- *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki 17.6 % S.C.: 0,5 a 1,5 kg · ha-1.
- Benzoato de emamectina: 0,15 a 0,3 L · ha-1.
- Spinosad: 100 mL · ha-1 (Monroy, 2015).

Resistencia

La resistencia se define como un cambio genético en un organismo como respuesta a la selección por sustancias tóxicas. El desarrollo de la resistencia no conlleva automáticamente al deterioro del control de la plaga. Por ejemplo, niveles bajos de resistencia pueden observarse en el laboratorio sin que surjan problemas inmediatos en el campo. Sin embargo, si la prevención es alentada, la resistencia

deberá detectarse y abordarse en estadios tempranos antes que el fallo en el control de plagas ocurra en el campo (FAO, 2012).

La resistencia ocurre cuando naturalmente ocurren mutaciones genéticas que permiten a una proporción pequeña de la población resistir y sobrevivir los efectos del plaguicida. Si esta ventaja se mantiene, al usar continuamente el mismo plaguicida, los organismos resistentes se reproducirán y los cambios genéticos que puedan causar la resistencia serán transferidos de los progenitores a las futuras generaciones (FAO, 2012).

Tipos de resistencia

Resistencia metabólica – resistencia inferida por un proceso metabólico, p.ej. en insectos que son capaces de desintoxicar o descomponer la toxina más rápidamente que los insectos susceptibles, o que rápidamente eliminan las moléculas tóxicas de sus cuerpos. Los insectos usan sus sistemas enzimáticos para descomponer los insecticidas y las cepas resistentes pueden poseer niveles más altos de estas enzimas o de enzimas que son más eficientes durante la desintoxicación, además, para ser más eficientes, estos sistemas enzimáticos tienen también un espectro más amplio de actividad, o sea ellos pueden degradar muchos plaguicidas diferentes (FAO, 2012).

Resistencia de conducta – cualquier modificación en la conducta de la plaga que le ayuda a evitar los efectos letales de los plaguicidas. El organismo- plaga es aún sensible al plaguicida y será eliminado de exponerse a una dosis letal del plaguicida. Por consiguiente, aquellos individuos que evaden la exposición logran sobrevivir y reproducirse, lo cual puede conllevar al desarrollo de una cepa o individuo resistente en su comportamiento (FAO, 2012).

Resistencia cruzada – cuando la resistencia a un plaguicida es transferida a otro plaguicida aun cuando la plaga no ha estado expuesta a este último producto. La resistencia cruzada ocurre debido a que dos o más compuestos actúan sobre el mismo sitio objeto de acción o se afectan por igual mecanismo de resistencia. La resistencia cruzada se desarrolla más comúnmente con compuestos que tienen el mismo modo

de acción y que son con frecuencia, pero no siempre, químicamente relacionados dentro de un mismo grupo químico. La resistencia puede ser completa o parcial (si hay más de un mecanismo responsable de la resistencia) (FAO, 2012).

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 de penetración – mecanismo de resistencia esencialmente limitado a insectos, en los que la cutícula retarda la penetración del plaguicida en el cuerpo de la plaga. 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 (técnica) – un cambio genético en un organismo como respuesta a la selección por los plaguicidas, que puede influir negativamente en el campo.

Resistencia (práctica) – un cambio heredable en la sensibilidad de una población de plagas que se refleja en el fallo repetido (más de una vez) del producto para lograr el esperado nivel de control cuando se usa de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta para la especie de plaga de interés y donde los problemas del almacenamiento del producto, de aplicación y de las poco usuales condiciones ambientales y climáticas pueden ser eliminadas entre las causas de tales fallos (FAO, 2012).

Determinación de resistencia

La detección de la resistencia es la identificación de un cambio significativo en la susceptibilidad de una población de plaga a los plaguicidas. La resistencia puede detectarse a través de observaciones ad hoc realizadas por investigadores o agricultores, o a través de sistemáticas observaciones de seguimiento. La observación regular del desarrollo de la resistencia pretende medir los cambios en la frecuencia o grado de resistencia en tiempo y espacio. La observación puede usarse para evaluar

la efectividad de diferentes tácticas que son empleadas para prevenir, retardar o manejar el desarrollo de la resistencia. Tanto la detección como el manejo de resistencia son más útiles cuando se hace tempranamente en un episodio de resistencia (FAO, 2012).

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).

Métodos bioquímicos

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

Electroforesis: separa moléculas en dependencia fundamental de su carga, desplazando proteínas bajo influencia de un campo eléctrico (Bisset, 2001), se emplean geles de acrilamida que se polimeriza y forma redes que permiten el paso de proteínas de diferentes pesos moleculares (Ibel *et al.*, 1990).

Pruebas moleculares: incrementa la precisión y reduce la variabilidad asociada a los bioensayos (Devonshire, 1990), se obtienen patrones de banda de ADN que son utilizado como marcadores genéticos para una especie (Ffrench *et al.*, 1994).

Pruebas bioquímicas: son ensayos múltiples que permiten analizar a una población de insectos cuantifican los niveles de una reacción enzimática (Brown 14 y Brodon, 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)

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, 2002):

Hidrólisis catalítica por las fosfotriesterasas (CE3.1.8), conocidas como esterasas-A, porque no son inhibidas por los organofosforados, interaccionan con el grupo funcional sulfidrilo (-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, 15 mientras que una sola de carboxilesterasa hidroliza una del tóxico (Sogorb y Vilanova, 2002).

Glutati6n-S-Transferasa

Las enzimas glutati6n-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) son biomarcadores 6tiles para metales y contaminantes org6nicos que producen estr6s oxidativo (Yang et al., 2001; Ezemonye y Tongo, 2010). GST son una amplia superfamilia de enzimas existentes en organismos procariotas y eucariotas, y est6n implicados en muchas actividades fisiol6gicas celulares, tales como detoxificaci6n 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 (Lamouereus 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-destoxificación 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, paratió y paratió de metilo) y diaarinos diaarínicos y diaoxon (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 (O₂) y nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para su funcionamiento (López, 2008). Está comprobado que este sistema contiene además una flavoproteína, una ferrodoproteína y un citocromo especializado, el citocromo P450. Las P450 son una familia de homoproteínas de baja especificidad, lo que permite que sean capaces de metabolizar un número casi ilimitado de sustratos (Bisset, 2002). Se ha observado en algunos insectos una relación directa entre el consumo de compuestos tóxicos de plantas y la inducción del metabolismo de las P450 dando como resultado una mayor detoxificación del xenobiótico (Snyder y Glendinning, 1996).

Este sistema enzimático también se asocia a la detoxificación de numerosos plaguicidas, siendo común verlas implicadas en resistencia cruzada a más de un tipo de insecticida (López, 2008). Otros autores como Bautista *et al.* (2009), señalan que ha existido un 17 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).

Abamectina

La abamectina, es un producto de origen natural, producido por el microorganismo del suelo *Streptomyces avermitilis*, que actúa como insecticida y acaricida, siendo muy eficaz sobre ácaros, eriófidos, minadores y psílidos (IRAC, 2021).

Modo de acción

Activan alostéricamente el glutamato en canales de cloro, causando parálisis. El glutamato es un importante neurotransmisor inhibitorio en insectos, bloquean la transmisión de la actividad eléctrica en nervios y músculos al estimular la liberación y enlace del Y-ácido amino butírico (GABA) a los terminales nerviosos. Lo anterior causa la entrada de iones cloruro al interior de las células, hiperpolarizándolas, resultando la parálisis del sistema neuromuscular. Los receptores del GABA se encuentran en las uniones neuromusculares (IRAC, 2021).

Resistencia en *Plutella xylostella*

A partir de 1953, la palomilla dorso de diamante fue el primer insecto plaga de cultivos agrícolas en el mundo que desarrolló resistencia hacia el DDT además, el comportamiento de los insectos puede jugar un papel importante en el desarrollo de resistencia de algunas especies (Stone *et al.*, 1991). Van Rie *et al.* (1990) y Ferre *et al.* (1991).

P. xylostella desarrollaron resistencia a nuevos insecticidas tales como clorfantriliprol, indoxacarb, spinosad y en dos o tres años (Furlong *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Data base (APRD), para el año 2021, 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 (APRD, 2021).

La resistencia a través de la desintoxicación metabólica es más frecuentemente encontrada en insectos y es menos común en malezas o patógenos. La misma está basada en sistemas enzimáticos que los insectos han desarrollado para desintoxicar las toxinas que ocurren naturalmente en sus plantas hospedantes y en la sangre de

los insectos fitófagos. Estos sistemas incluyen esterasas, mono-oxigenasas citocromo P450, y S-transferasas glutatión. Los insectos resistentes pueden tener elevados niveles de una enzima en particular o formas alteradas de la enzima que metaboliza al plaguicida a un nivel más rápido que la forma no alterada. En uno y otro caso los insectos resistentes pueden desintoxicar al plaguicida antes que el químico los mate.

En la actualidad existen diferentes casos de resistencia a *B. thuringiensis*. La palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.), es la primera especie de insecto que a nivel mundial se consigna como resistente en el campo a las delta endotoxinas contenidas en *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (Tabashnik *et al.*, 1990; Shelton *et al.*, 1993).

Considerando que *P. xylostella* está citada como resistente a más de 46 insecticidas en el mundo, que en México es la plaga principal de las crucíferas, sometida a presión de selección con diferentes plaguicidas, incluyendo *B. thuringiensis*, y que es creciente el número de productores que dependen de su uso para controlar plagas (Díaz y Martínez, 2005).

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.



Figura 1. Departamento de parasitología agrícola.

Colecta de material biológico

La recolección del material biológico se realizó en lotes comerciales del brócoli en el municipio de Celaya, en el Estado de Guanajuato. Se recolectaron de forma manual larvas, pupas y adultos de *P. xylostella*, las cuales se colocaron en contenedores de plástico y se depositaron en hieleras para su posterior 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 entomopatógenos o parasitoides que pudieran estar presentes en los individuos traídos de campo. La línea de campo de llevo hasta F3 para 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 insecticida abamectina utilizando un diseño experimental completamente al azar con 6 concentraciones (5, 3, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm) y cuatro repeticiones y un testigo blanco el cual consistió de agua más adherente.

Bioensayos

Para llevar a cabo la evaluación del insecticida abamectina se empleó el método de inmersión (IRAC, 2017), utilizando larvas de *Plutella xylostella* de tercer instar. Se recortaron círculos de hojas de brócoli de 6 centímetros de diámetro, y se sumergieron en las soluciones en estudio por un tiempo de 10 segundos y se colocaron en papel absorbente para eliminar los excesos de humedad durante una hora, de ahí se pasaron a cajas Petri con papel absorbente saturado de agua, posteriormente se transfirieron 10 larvas de *P. xylostella* en cada círculo de la hoja, con 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 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 al estímulo era considerado como muerto.

Inducción de resistencia

Una vez terminado el bioensayo a la generación inicial y obtenida la curva de concentración-mortalidad, a las siguientes 10 generaciones, se les realizó la presión de selección aplicando la CL_{20} mediante un atomizador, realizando coberturas uniformes a las plantas de brócoli infestadas 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

nuestra de larvas de tercer instar, las cuales fueron colocadas en tubos de eppendorf y se congelaron para posteriormente cuantificar 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 usó 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 (KPO_4) a 0.05 M y un pH de 7.2, se trituraron con ayuda de un macerador de tejidos y se aforaron a 1 mL para emplearlo como fuente de enzima.

En una micro placa 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 .

Preparación de homogenatos

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

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 μL del homogenato más 100 μL de acetato de α ó β -naftil, se dejó incubar por 10 minutos, pasado el tiempo, se agregaron 100 μL de Fast-blue, estos pasos se realizaron por

triplicado para cada repetición, 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 µL del homogenato, se agregaron 100 µL de reduced glutation, y 100 µL de CDNB, estos pasos se realizaron por triplicado para cada repetici3n, 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- DitioBisNitrobenozoico) se prepararon 13 mg de DTNB y se le agregaron 10 mL de soluci3n Buffer (KPO₄).

Lectura de absorbancias: Se colocaron 100 µL del homogenato, se agregaron 100 µL de acetilcolina-yodisada y 100 µL de DNTB, estos pasos se realizan por triplicado para cada repetici3n, 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 (T10-T0) y los n3meros negativos se consideraron como 0 (Brogdon, 1988).

Determinaci3n de oxidasas

Preparaci3n de reactivos: Buffer de Acetato de sodio (0.25 M): se disolvi3 3.32g 3M de sodio acetato en 37.35 mL de H₂O destilada, despu3s se afor3 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 (H_2O_2) estos pasos se realizaron por triplicado para cada repetición, 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%. Con los valores obtenidos en las pruebas bioquímicas se realizó un análisis de varianza (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 a la abamectina durante 10 generaciones. La CL₅₀ para la primera generación fue de 1.32 y de 1.31 para la línea susceptible. Observándose un aumento en la proporción de resistencia desde la generación 1 hasta 10 donde se alcanzó un factor de resistencia de 33.40 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. Abbas *et al.* (2014) obtuvieron una proporción de resistencia para este mismo insecticida de 140.25 veces en 11 generaciones en estudio sobre Mosca doméstica.

Tabla 1. Concentración letal media (CL₅₀) de abamectina en diferentes generaciones de *plutella xylostella*.

Generación	CL ₅₀ (ppm)	LFI-LFS	CL ₂₀ (ppm)	P.R
LS	1.31	0.706 - 2.215	0.210	-
G1	1.32	0.585-2.762	0.282	1.01
G2	1.86	1.029 - 3.466	0.43	1.42
G3	4.38	3.080 - 5.936	1.57	3.34
G4	9.33	7.556 - 11.627	3.57	7.18
G5	17.28	15.971 - 18.664	9.71	13.29
G6	22.78	21.250 - 24.363	12.89	17.52
G7	31.65	25.659 - 42.461	21.25	24.16
G8	32.52	30.404 - 34.738	21.91	24.82
G9	40.62	36.92 - 44.32	31.39	31.01
G10	43.75	41.36 - 46.22	28.43	33.40

LFI: limite fiducial inferior; LFS: Limite 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, las densidades de 0.25 a 1 larva su contenido de proteína fue por debajo del intervalo requerido (80 a 120 μ g), 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.

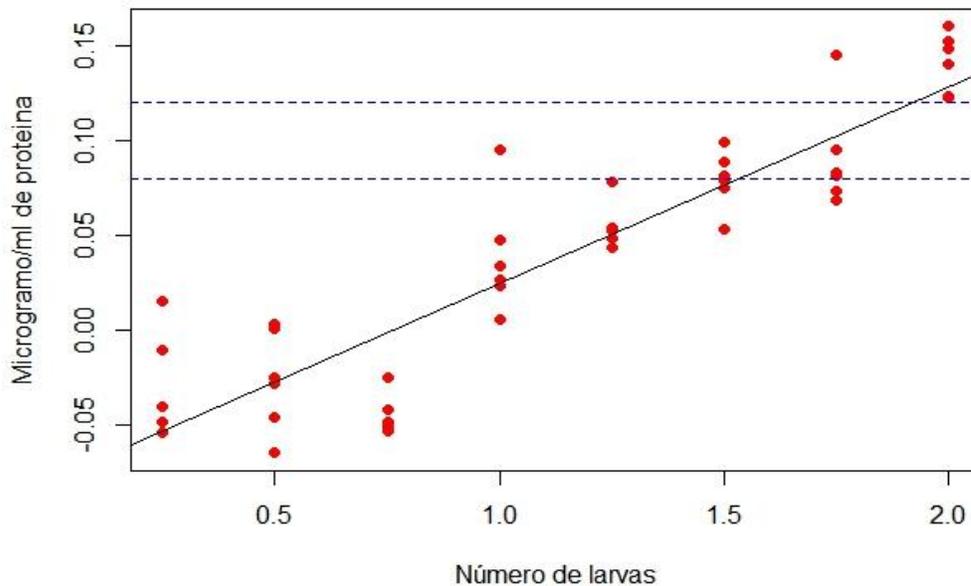


Figura 2. Absorbancias de proteína en homogenatos de *Plutella xylostella* en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2).

En la Tabla 2 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* con presión de selección a abamectina. α -Est presentó una mayor expresión en la generación 5 con una media de 6.198, seguido de la generación

8 con una absorbancia de 4.045, mientras que la generación 7 reportó el valor más bajo (3.500). Por su parte β -Est se expresó su mayor contenido para la generación 6 con valor medio de 5.523. 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 2. Comparación de medias de α - Esterasas y β - Esterasas en 10 generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección a Abamectina.

G ¹	α -Esterasas (Media \pm SD ²)	β -Esterasas (Media \pm SD ²)
LS ³	3.800 \pm 0.096 bcde	3.818 \pm 0.080 b
G1	3.626 \pm 0.090 cde	3.631 \pm 0.110 bc
G2	4.00 \pm 0.180 b	3.818 \pm 0.203 b
G3	3.895 \pm 0.116 bcd	3.693 \pm 0.086 bc
G4	3.768 \pm 0.118 bcde	3.595 \pm 0.198 bc
G5	3.793 \pm 0.252 bcde	3.683 \pm 0.246 bc
G6	5.198 \pm 0.489 a	5.523 \pm 0.802 a
G7	3.500 \pm 0.033 e	3.336 \pm 0.096 c
G8	4.045 \pm 0.124 b	3.861 \pm 0.143 b
G9	3.926 \pm 0.290 bc	3.467 \pm 0.040 bc
G10	3.589 \pm 0.107 de	3.448 \pm 0.150 bc

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 no presenta diferencias significativas entre las generaciones de estudio, como se muestra en la Tabla 3. La generación 2 fue la que reportó el valor máximo con una media de 0.030, mientras que las generaciones 4 y 9 obtuvieron el valor más bajo para con 0.016. Estudios previos demuestran que la sobreexpresión de

glutación S-transferasa es responsable de la resistencia a los organofosforados, piretroides y diamidas, así como indoxacarb (Furlong *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014). En el caso de las oxidasas se presentan diferencias significativas en las generaciones en estudio, sin embargo, ninguna generación sobre paso el valor medio de la línea susceptible (3.470) como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de medias de GST y oxidasas en 10 generaciones de *Plutella xylostella* con presión de selección a Abamectina.

G ¹	GST (Media ± SD ²)	Oxidasas (Media ± SD ²)
LS ³	0.026 ± 0.041 a	3.470 ± 0.306 a
G1	0.019 ± 0.009 a	3.298 ± 0.062 abcd
G2	0.030 ± 0.013 a	3.368 ± 0.033 abc
G3	0.018 ± 0.013 a	3.303 ± 0.055 abcd
G4	0.016 ± 0.006 a	3.191 ± 0.039 cd
G5	0.017 ± 0.010 a	3.193 ± 0.078 cd
G6	0.022 ± 0.015 a	3.233 ± 0.046 bcd
G7	0.020 ± 0.007 a	3.102 ± 0.027 d
G8	0.018 ± 0.017 a	3.424 ± 0.215 ab
G9	0.016 ± 0.010 a	3.269 ± 0.101 abcd
G10	0.025 ± 0.014 a	3.261 ± 0.162 bcd

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

En la Tabla 4 se muestra la comparación de medias para la enzima Aclt, donde se puede observar que hay diferencias significativas en las generaciones en estudio, sin embargo, ninguna de las generaciones con presión de selección supero en contenido enzimático a la línea susceptible que presenta una absorbancia media de

0.040 seguida de la generación 9 con un valor de 0.037, mientras que la generación 1 reporta un contenido nulo para esta enzima. Esto se puede deber a que 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)

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

G ¹	Aclt (Media ± SD ²)
LS ³	0.040 ± 0.033 a
G1	0.000 ± 0.001 c
G2	0.003 ± 0.005 c
G3	0.002 ± 0.005 c
G4	0.004 ± 0.004 c
G5	0.008 ± 0.007 bc
G6	0.004 ± 0.005 c
G7	0.011 ± 0.008 bc
G8	0.002 ± 0.004 c
G9	0.037 ± 0.11 a
G10	0.024 ± 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.

Durante 10 generaciones α y β Esterasas es el principal mecanismo de detoxificación a la Abamectina con valores promedio de 49.99% y 45.55% clasificándose moderadamente alterada. Flores *et al.* (2006) determinaron frecuencias de resistencia de 100% en mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus) a causa de α -Est con el insecticida de Abamectina. Glutathion-S-Transferasas, oxidasas y Aclt no presentan un efecto importante, dado que la proporción fue de 0, 3.3 y 1.11 respectivamente,

clasificándose como una resistencia inalterada. Siqueira *et al.* (2001), menciona que en general las enzimas GST tienen un rol secundario en la detoxificación de insecticidas.

Tabla 5. Proporción de resistencia del contenido de enzimas en 4 generaciones de *Plutella xylostella*.

Generación	α -Esterasas	β -Esterasas	GST	Oxidasas	Acht
1	88.88 E	66.66 D	0.00 A	0.00 A	0.00 A
2	77.77 E	77.77 E	0.00 A	0.00 A	0.00 A
3	33.33 C	33.33 C	0.00 A	0.00 A	0.00 A
4	11.11 B	55.55 D	0.00 A	0.00 A	0.00 A
5	33.33 C	33.33 C	0.00 A	0.00 A	0.00 A
6	100 E	100 E	0.00 A	0.00 A	0.00 A
7	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A
8	100 E	88.88 E	0.00 A	33.33 C	11.11 B
9	55.55 D	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A
10	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A
Promedio	49.99	45.55	0	3.33	1.11

A: Inalterado (0-5%); B: Incipientemente alterado (6- 30%); C: Moderadamente alterado (31-50%); D: Alterado (51-75%); E: Muy alterado (> 76%). Montella *et al.* 2007.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

P. xylostella es un insecto que desarrolla rápidamente resistencia a la Abamectina, realizando una presión de selección en las 10 generaciones utilizadas durante este estudio.

A-Esterasas y β -Esterasas son el principal mecanismo de detoxificación para la Abamectina en *P. xylostella*, sin embargo, en Glutathion S-transferasas se puede considerar como un mecanismo detoxificativo poco relevante para Abamectina.

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
- APRD, Arthropod Pesticide Resistance Database www.pesticideresistance.com. 2021.
- Barrera Urzúa, R., Bujanos Muñiz, R., Rodríguez Maciel, J. C., Mora Aguilera, G., & Martínez Téllez, M. Á. (2006). Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae) del estado de Guanajuato, México. *Agrociencia*, 40(3).
- Bass, C. I. Denholm, M. S., Williamson, A. and Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 12: 178-87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Bass, C. L. M. (2011). Gene Amplification and Insecticide Resistance, *Pest Management Science*, 67: 886-890. <https://doi.org/10.1002/ps.2189>.
- Bautista, M. A. M. T. Miyataa, K. Miuraa, T. Tanaka. (2009). RNA interferencemediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback
- Bisset, A. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana Medicina Tropical* 54 (3).
- Bisset, J. A.; Rodríguez, M. M.; Molina, D.; Díaz, C.; y Soca, L. A. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en

cepas de *Aedes aegypti*. REV CUBANA MED TROP 53(1): 37-43.

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

Brogdon, W. G. (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. (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. En *Analytical Biochemistry*, 131: 549-503).

Brogdon, W. G., Mcallister, J. C., & Vulule, J. (1997). Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13: 233-237

Bujanos Muñoz, R., Rodríguez Maciel, J. C., Byerly Murphy, K. F., Hoy, C. W., & Díaz Gómez, O. (2003). Dilución de insecticidas y reducción de toxicidad sobre 43 larvas de dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.)(Lepidoptera: Plutellidae). *Agricultura Técnica en México*, 29(2) consultada el 15 de febrero 2020.

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. y Marín, J., A. 2001. Insectos plaga de brócoli y coliflor y sus enemigos naturales en la región del bajo, México. Publicación especial número 2. INIFAP.

Corpocauca. 2007. Alianza Productiva para el Fortalecimiento a la Cadena de hortalizas en Brócoli. Colombia. Pág.1-25.

Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. Clin Chim Acta. 2006; 366(1-2):1-13.

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.

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

Enayati, A.A. Ranson, H. Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance, Insect Mol. Biol. 14 3–8.

Ezemonye, L., & Tongo, I. (2010). Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). Chemosphere, 81(2), 214-217.

FAO, 2019. Producción/Rendimiento de Coliflor y brécol en Mundo + (Total. En línea en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>

FAO. 2012 Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas en línea en: <http://www.fao.org/3/a-bt561s.pdf> consultado el 15 de febrero del 2020

Ffrench, C. R. H.; steinchen J. C. and 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.

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, Annu. Rev. Entomol. 58, 517-541.

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/annurevento120811-153605>

Garcia, R., G (2018). Perspectivas de mercado para el brócoli. En línea en: <https://www.horticultivos.com/cultivos/cruciferas/brocoli/perspectivas-de-mercado-para-el-brocoli/>

Guengerich, F.P., (1963). Bioactivation and detoxification of toxic and carcinogenic chemicals. Drug Metabolism and Disposition 21, 1–6.

Hernández, A Rodríguez A. (2018) Guanajuato encabeza la producción de brócoli; EU, su principal mercado. En línea en:

<https://www.elfinanciero.com.mx/economia/guanajuato-encabeza-la-produccion-de-brocoli-eu-su-principal-mercado/>

Huang, H. S., Hu, N. T., Yao, Y. E., Wu, C. Y., Chiang, S. W. & Sun, C. N. (1998).

Hubert, J. J. 1980. Bioassay. Kendall/Hunt Pub. Co. USA. 164 p.

Hutson, D. H., Pickering, B. A., and Donninger, C. (1972) Phosphoric acid triester-glutathione alkyltransferase. A mechanism for detoxification of dimethyl phosphate triesters. Biochem. J. 127, 285–293.

Ibel, K.; May, R. P.; Kirscheer, K.; Szadkowski, H.; Mascher, E. and Lundahl, P. 1990. Proteindecorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfato proyein complexes as determinadesd by neutrón scattering. Eur. J. Biochem. 190: 311-318.

IRAC, 2021. Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas.

Jakobsson, P.J. Mancini, J.A. Ford-Hutchinson, A.W. (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase, J. Biol. Chem. 271 22203–22210.

Koppert Biological Systems. 2018. *Plutella xylostella* Palomilla dorso de diamante en línea: <https://www.koppert.mx/retos/orugas/palomilla-dorso-de-diamante/>. Consulta el 15 de febrero del 2020.

Lagunes, T. A. Y J. Villanueva, J. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos, Edo. De México. 264 pp.

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. and 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>.

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.

Miyamoto, T., and Mikawa, T. (2005) Oxidative glutathione conjugation and its novel role in activation of the organophosphorus insecticide prothiofos. *J. Pestic. Sci.* 30, 31–38.

Mohammad, H., B y Garza A., V. (2007). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. Consultada el 14 de febrero del 2020.

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.

Monroy, L. 2015. PALOMILLA DORSO DE DIAMANTE (*Plutella xylostella* L.): BIOLOGÍA Y CONTROL En línea en:
https://infoagro.com/hortalizas/palomilla_dorso_diamante.htm

Montella, I. R., Martins, A. J., Fernández, V., Pereira, L. B., Braga, I. A., & Valle, D.

(2007). Insecticide resistance mechanism of Brazilian *Aedes aegyti* populations from 2001-2004. *The American Journal of Tropical Medical and Hygiene*, 77: 467-477.

Nebreda, H., M. 2005. Dinámica poblacional de insectos homópteros en cultivos de lechuga y brócoli, identificación de parasitoides asociados y evaluación de alternativas físicas de control. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Pp. 11-17

Sánchez y 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.

Santoyo, J., J. Y Martínez, C. (2011). Tecnología de la producción de brócoli. Consultado en: 15 de febrero del 2020.

SAS, I. I. (2002). Guide for personal computers. SAS institute, Cary, N.C.

Sayyed, A. H. D. J. Wright. (2006). Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), *Pest Manag. Sci.* 62. 1045-1051.

Scott JG, Wen Z 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Sci* 57: 958-967.

Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, B. (2012). Glutathione Stransferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*, 100(5), 327-335.

- Siqueria, H.; Guedes, R.; Fragoso, D. Y Magalhaes, L. (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Pest Management* 47 (4): 247-251.
- Sogorb MA, Vilanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett.* 128(1-3):215-28.
- Taysse, L., Chambras, C., Marionnet, D., Bosgiraud, C., Deschaux, P., (1998). Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology* 6, 300–305.
- Twine, P. H. and Reynolds H. T. 1980. Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. *J. Econ. Entomol.* 73: 339-242.
- USAID. 2008. Proyecto de Diversificación Económica Rural. Producción de Brócoli. La Lima Cortes Honduras. Pág.1-37.
- 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, Y., Qiu, L., Ranson, H., Lumjuan, N., Hemingway, J., Setzer, W. N. (2008). Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT detoxifying activity. *J. Struct. Biol.* 164, 228–235.
- Wells, B. 2018. Florida Grower.

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.

Zilli, C., R. (2018). México, quinto productor mundial de brócoli (I). En línea en: <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/Mexico-quinto-productor-mundial-de-brocoli-I-20180404-0116.html> 15 de febrero del 2020.