



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

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

Cerna Chávez, E.¹, Rodríguez Rodríguez, J. F.², Hernández Juárez, A.¹, Aguirre Uribe, L. A.¹, Landeros Flores, J.¹, Cervantes Ortiz, F.³, Guevara Acevedo, L. P.³, Ochoa Fuentes, Y. M.^{1*}

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. ²Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola. Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315. Buenavista, Saltillo; Coahuila, México.

³Instituto Tecnológico de Roque, Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C.P. 38110, Celaya; Guanajuato, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Cerna Chávez, E., Rodríguez Rodríguez, J. F., Hernández Juárez, A., Aguirre Uribe, L. A., Landeros Flores, J., Cervantes Ortiz, F., Guevara Acevedo, L. P., Ochoa Fuentes, Y. M. (2018). Quantification of enzymes associated to insecticide resistance in different populations of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutelliidae) from the State of Guanajuato, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 5(nesp1), e424. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e424>



ABSTRACT

The diamondback moth is one of the main pests that affect cruciferous plants, due to the importance of these crops and the damage generated has become a serious problem for producers. Its control is mainly based on the chemical method, in which only insecticides compatible with the environment and human health are used. Nevertheless, the high pressure of selection of insecticides induced the development of resistance to the different active materials used for its control. Therefore, biochemical tests were performed to quantify α and β esterase, glutathione S-transferase, acetylcholinesterase and oxidases, enzymes related to resistance to insecticides, in four populations of *Plutella xylostella* from the state of Guanajuato, Mexico (Abasolo, Celaya, San Luis de la Paz and Valle de Santiago) and a "susceptible line" as a

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 19th 2017.

Accepted/Aceptado: June 13rd 2018.

Available on line/Publicado: January 23rd 2019.

RESUMEN

La palomilla dorso de diamante es una de las principales plagas que afectan a las crucíferas; debido a la importancia de estos cultivos y al daño generado, se ha convertido en un grave problema para los productores. Su control se basa principalmente mediante el método químico, en el cual solo se emplean insecticidas compatibles con el ambiente y la salud humana. Sin embargo, la alta presión de selección de insecticidas, ha generado el desarrollo de resistencia a las diferentes materias activas utilizadas para su control. Por lo anterior, se realizaron pruebas bioquímicas para cuantificar α y β esterasas, glutatión S-transferasas, acetilcolinesterasas y oxidasas (enzimas relacionadas con la resistencia a insecticidas) en 4 poblaciones de *Plutella xylostella* del estado de Guanajuato, México (Abasolo, Celaya, San Luis de la Paz y Valle de Santiago), y una "línea susceptible" como referencia. Los resultados nos indican que las enzimas con mayor presencia fueron las α y β esterasas en las poblaciones de Celaya y Valle de Santiago, así como oxidasas en poblaciones de la localidad de San Luis de la Paz. Así mismo, podemos mencionar que las enzimas responsables

*Corresponding Author:

Ochoa Funetes Yisa María. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Phone: +52(844) 411 0326. E-mail: yisa8a@yahoo.com.

reference. The results indicate that the enzymes with the highest presence were the α and β esterases in Celaya and Valle de Santiago, as well as oxidases in populations of San Luis de la Paz. Moreover, we can mention that the enzymes responsible for the lack of effectiveness in products applied for the control of this pest as pyrethroids, organophosphates and benzoylureas are the esterase enzymes. On the other hand, the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase enzymes were not relevant as a detoxification mechanism.

KEY WORDS

Detoxification enzymes, diamondback moth, insecticide tolerance.

Introduction

In Guanajuato, Mexico, 20,590.50 hectares of broccoli are annually sown with a production of 292,345.21 t (SIAP, 2014); its production is mainly destined for the export market, which is why cultivation represents an important source of money and significant benefits for producers (Bujanos *et al.*, 2013). The main pest of economic significance in cruciferous plants is the "diamondback moth" *Plutella xylostella* (*P. xylostella*) (INIFAP, 2013), which is a highly destructive cosmopolitan pest (Heckel, 2006), that affects the quality of the product due to the contamination caused by their eggs and larvae, causing its rejection for exportation (INIFAP, 2013). This specialist of cruciferous plants may have its origin in Europe (Sarraz *et al.*, 2006), or eastern Asia (Liu *et al.*, 2003), nonetheless, it can exist in any place where its host plants are found (Torres *et al.*, 2006), causing severe damages on them, since the diamondback moth interferes with plant growth, and it may even cause death or total loss (Da Silva, 2008). The study of moths has become a research topic in all producing regions, with the objective of obtaining technically appropriate, economically satisfactory and ecofriendly control measures (Thüler, 2006). *P. xylostella* is considered to be one of the most difficult pests to control, so far insecticides are the main method for controlling them, diamides, avermectins, pyrethrins and *Bacillus thuringiensis* (Bt) being the main groups of insecticides used for eradicating this pest (Xia *et al.*, 2014). Alongside the consequences for the environment such as elimination of natural

de la falta de efectividad en productos aplicados para el control de esta plaga como piretroides, organofosforados y benzoylureas son las enzimas estereras. Por su parte, las enzimas acetilcolinesterasa y glutatión S-transferasa no presentaron relevancia como mecanismo detoxificante.

PALABRAS CLAVE

Enzimas detoxificativas, dorso de diamante, tolerancia a insecticidas.

Introducción

En Guanajuato, México, anualmente se siembran 20,590.50 ha de brócoli con una producción de 292,345.21 t (SIAP, 2014); cuya producción se destina principalmente al mercado de exportación, por lo que el cultivo representan una importante fuente de divisas y significativos beneficios para los productores (Bujanos *et al.*, 2013). La principal plaga de importancia económica en las crucíferas es la palomilla "Dorso de Diamante" *Plutella xylostella* (*P. 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 rechazado para exportación (INIFAP, 2013). Este especialista de crucíferas puede tener su origen en Europa (Sarraz *et al.*, 2006), o el Este de Asia (Liu *et al.*, 2003), no obstante, puede existir en cualquier lugar donde se encuentren sus plantas huésped (Torres *et al.*, 2006), causando daños graves sobre las mismas, ya que interfiere en su crecimiento e incluso puede causar la muerte o pérdida total (Da Silva, 2008). El estudio de la palomilla se ha convertido en un tema de investigación en todas las regiones productoras, con el fin de obtener medidas de control técnicamente apropiadas, económicamente satisfactorias y respetuosas al medio ambiente (Thüler, 2006). *P. xylostella* se considera que es una de las plagas más difíciles de controlar, hasta ahora los insecticidas 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). Junto a las consecuencias para el ambiente como la eliminación de enemigos naturales y el surgimiento de plagas secundarias, el aumento del riesgo, tanto de presencia de residuos en el producto comestible como para el personal de campo (Bujanos, 2013), el uso inadecuado y continuo de las mismas materias activas ha generado poblaciones de *P. xylostella* resistentes a los insecticidas (Attique *et al.*, 2006, Khaliq *et al.*, 2007). En muchos países *P. xylostella* ha

enemies and the emergence of secondary pests, the increase of risks, as for the presence of residues in the edible product as for farmers (Brujanos, 2013), the inadequate and continuous use of the same active materials generated populations of *P. xylostella* resistant to insecticides (Attique et al., 2006, Khaliq et al., 2007). In many countries *P. xylostella* developed resistance to almost every insecticide used against it, (Furlong et al., 2013). According to the Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD), for the year 2015, the diamondback moth had developed resistance to approximately 91 compounds with different ways of action, including organochloride, organophosphates, carbamates, pyrethroids, nereistoxin analogue, benzoylurea, Bt, avermectins, spinosyn, fipronil, indoxacarb, diacylhydrazines and diamides (APRD, 2015). However, the most important aspect when handling resistance to insecticides is the understanding of mechanisms that lead to the resistance of pests to them. Previous research studies, indicate that the mechanisms of resistance of insects to insecticides involved mutation of amino acids, the overexpression or mutation of detoxification, detoxifying enzymes, resistance to penetration and behavioral resistance (Ahmad et al., 2006; Bass et al., 2015). Nevertheless, most of common resistance mechanisms is metabolic resistance, with an increase in esterase, glutathione S-transferase and oxidases activities (Li et al., 2007; Bass et al., 2011). In *P. xylostella*, high levels of esterases correlate with resistance to organophosphates, carbamates, pyrethroids, indoxacarb, avermectins and benzoyl ureas (Sayyed et al., 2006; Eziah et al., 2009; Furlong et al., 2013); and the overexpression of glutathione S-transferase is responsible for resistance to organophosphates, pyrethroids and diamides, as well as indoxacarb (Furlong et al., 2013; Hu et al., 2014a). Also, the increase of oxidase activities contributes to resistance to carbamates, pyrethroids, nereistoxin analogue and diamides (Bautista et al., 2009; Furlong et al., 2013; Hu et al., 2014b). Insect metabolism plays an important role in the resistance of insecticides and, the knowledge about it can be used to improve the toxicity of insecticides, by mixing them with other insecticides that do not possess the same metabolic pathways (Mohan & Gujar, 2003). In relation to the afore mentioned, the objective of this research paper was to generate data about enzymatic mechanisms of resistance in different populations of *P. xylostella* in Guanajuato, Mexico, and their quantification through biochemical tests.

desarrollado resistencia a casi todos los insecticidas utilizados en contra de ella, (Furlong et al., 2013). De acuerdo con la Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD), para el año 2015, la polilla de la col había desarrollado resistencia a aproximadamente 91 compuestos con diferentes modos de acción, incluyendo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, benzoilureas, bacillus thuringiensis, avermectinas, espinosinas, fenilpirazoles, indoxacarb, diacilhidrazinas y diamidas (APRD, 2015). Sin embargo, el aspecto más importante en el manejo de resistencia a los insecticidas, es la comprensión de los mecanismos que conducen a la resistencia de las plagas a estos. Investigaciones previas, indican que los mecanismos de resistencia de insectos a los insecticidas involucra mutaciones de aminoácidos de destino, la 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 estererasas, glutatión S-transferasas, y oxidadas (Li et al., 2007; Bass et al., 2011). En *P. xylostella*, niveles elevados de estererasas se correlacionan con la resistencia a organofosforados, carbamatos, piretroides, indoxacarb, avermectina, y benzoilurea (Sayyed et al., 2006; Eziah et al., 2009; Furlong et al., 2013); y la sobreexpresión de glutatión S-transferasa es responsable de la resistencia a los organofosforados, piretroides y diamidas, así como indoxacarb (Furlong et al., 2013; Hu et al., 2014a). Además, el aumento de las actividades oxidadas contribuye a la resistencia a carbamatos, piretroides, análogos de nereistoxina, y diamidas (Bautista et al., 2009; Furlong et al., 2013; Hu et al., 2014b). El metabolismo de los insectos juega un papel importante en la resistencia a insecticidas y, el conocimiento del mismo se puede utilizar para mejorar la toxicidad de los insecticidas, mediante la mezcla de otros insecticidas que no poseen las mismas vías metabólicas (Mohan & Gujar, 2003). Con respecto a lo antes mencionado, el objetivo de la presente investigación fue generar información sobre los mecanismos enzimáticos de resistencia en diferentes poblaciones de *P. xylostella* en Guanajuato, México y su cuantificación mediante pruebas bioquímicas.

Material y Métodos

Se evaluaron 5 poblaciones de *P. xylostella* de Guanajuato, México, las cuales son: Valle de Santiago, San Luis de la Paz, Abasolo, Celaya y como población

Material and Methods

Five populations of *P. xylostella* from Guanajuato, Mexico, were evaluated, which are: Valle de Santiago, San Luis de la Paz, Abasolo, Celaya, and for population known as "susceptible line," individuals provided by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío in Celaya, Guanajuato, Mexico, were used; reproduced since 1996 with no selection pressure to insecticides. Considering they are the populations with the largest surface of sowing broccoli in Guanajuato, Mexico. Sampling was performed manually, in commercial batch of the populations mentioned earlier, pupa larvae and adults of *P. xylostella* were collected, which were placed in plastic containers inside coolers for their transportation into entomological boxes in laboratory at 27 °C, 50 % of relative humidity and 16:8 h light: dark, this for their reproduction until F1 and for having enough individuals of the same age for further study.

For each population of *P. xylostella*, five biochemical tests were used for determining the enzymatic levels of α -esterases (α -Est), β -esterases (β -Est), oxidases (Oxid), glutathione S-transferases (GST) and acetylcholinesterases (AChE). Every test was run by triplicate in 96-wells plates and were read using the microplate reader.

Biochemical tests

For determining protein in *P. xylostella* larvae, the methodology described by Bradford (1976) and modified by Brogdon (1984), and Brogdon & Barber (1987) was used. Eight samples were placed in eppendorf tubes with 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.50, 1.75, and 2 larvae of *P. xylostella* with four repetitions, 500 μ L of buffer solution (KPO_4) were added to 0.05 M and 7.2 pH, they were crushed and gauged to 1 mL in order to use it as an enzyme source. A 96-wells microplate was used, where 20 μ L of homogenate were placed into each well, then 80 μ L of buffer solution were added, plus 200 μ L of diluted dye; this was done by triplicate for each repetition. Absorbance was read, using a 630 nm filter and the values of $\mu\text{g mL}^{-1}$ of protein were calculated, ranging from 80 to 140 μg .

Enzymatic levels of β and α -esterases were determined by means of Brogdon & Dickinson method (1983). In summary, 100 μ L of the homogenate and 100 μ L of β or α -naphthyl acetate were added into each well, it was incubated for 10 min and 100 μ L of O-dianisidine were added, later, it was incubated for 2 min and were read with a 540 nm filter. As

denominada "línea susceptible" se utilizaron individuos proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío en Celaya, Guanajuato, México, reproducidos desde 1996 sin presión de selección a insecticidas. Considerando que son las poblaciones con mayor superficie de siembra de brócoli en Guanajuato, México. La colecta en campo se realizó de forma manual, en lotes comerciales de las poblaciones antes mencionadas, se colectaron larvas pupas y adultos de *P. xylostella*, las cuales se colocaron en contenedores de plástico y se metieron en hieleras para su traslado a cajas entomológicas en laboratorio a 27 °C, 50 % de humedad relativa y 16:8 h luz: oscuridad, esto para su reproducción hasta F1 y tener individuos suficientes de la misma edad para su posterior estudio.

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

Pruebas bioquímicas

Para la determinación de proteína a larvas de *P. xylostella*, se empleó la metodología descrita por Bradford (1976) modificada por Brogdon (1984) y Brogdon & Barber (1987). Se colocaron ocho muestras en tubos eppendorf con 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25, 1.50, 1.75 y 2 larvas de *P. xylostella* con cuatro repeticiones, se agregaron 500 μ L de solución buffer (KPO_4) a 0.05 M y 7.2 pH, se trituraron y se aforaron a 1 mL para emplearlo como fuente de enzima. Se utilizó una microplaca de 96 pozos, donde a cada cavidad se le colocaron 20 μ L de homogenato y se agregaron 80 μ L de solución buffer, más 200 μ L de colorante diluido; esto se realizó por triplicado para cada repetición. Se tomaron las lecturas de absorbancia, utilizando el filtro de 630 nm y se calcularon los valores de $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína comprendidos en el rango de 80 a 140 μg .

Los niveles enzimáticos de β y α -esterasas se determinaron mediante el método de Brogdon & Dickinson (1983). En resumen, 100 μ L del homogenato y 100 μ L de β o α -naphthil acetato fueron adicionados a cada pozo de la microplaca, se dejó incubar por 10 min y se adicionaron 100 μ L de Dianisidina, posteriormente se dejaron incubar durante 2 minutos y fueron leídas con un filtro de 540 nm. En cuan-

for oxidases, the methodology of Brogdon *et al.* (1997) was used, 100 μL of the homogenate, 200 μL of 5,5' Tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB) and 25 μL of H_2O_2 at 3 % were added, it was incubated for 5 min and absorbance was read using a 620 nm filter. For GSTs, the method of Brogdon & Barber (1990) was used, in summary, 100 μL of the homogenate, 100 μL of reduced glutathione and 100 μL of 1-chloro 2,4' dinitrobenzene (CDNB) were added, it was read at time zero (T0) and 5 min later (T5) using a 340 nm filter, the difference between both times were taken for the analysis of results. Lastly, following the methodology of Brogdon (1988), AChE levels were determined, placing 100 μL of the homogenate, 100 μL of acetylcholine iodide 3.0 mM and 100 μL of 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), the first reading (T0) and after 10 min (T10) were taken, using the 414 nm filter, the difference between both times were taken for the analysis of results.

With the absorbance of each enzyme, a frequency distribution was performed and a threshold of resistance was established. Finally, an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's test ($p=0.05$) were performed, using the statistics software, version R 3.3.1.

Results and Discussion

For determining enzymatic levels, firstly, the quantity of proteins contained in *P. xylostella* larvae was calculated, and therefore obtaining the number of insects per sample, where from 0.25 to 1 larvae, protein content was lower than the required interval (from 80 to 120 μg); while from 1.25 to 2 larvae, protein content was within the limit allowed; choosing 1.75 larvae as the number of insects for the enzyme source (Figure 1). In relation to the enzyme source, Bradford (1976) mentions that the out-of-range values are not reliable for the quantification of proteins in tissues. While Dary *et al.* (1990) report that there exists a close relationship between sample size and protein quantity, which is why differences may be observed in the obtained results.

To determine enzymatic levels, we will mention that the studied populations were under management with pyrethroid, macrocycle lactones, spinosads, diamides, phosphates and carbamic insecticides. In Table 1, absorbances per enzyme can be observed for

to a las oxidasas, se utilizó la metodología de Brogdon *et al.*, (1997), se adicionó 100 μL del homogenato, 200 μL de 5,5' Dihidrocloruro de tetrametilbencidina (TMB) y 25 μL de H_2O_2 a 3 %, se dejó incubar por 5 minutos y se tomó lectura usando un filtro de 620 nm. Para las GST, se utilizó el método de Brogdon & Barber (1990), en resumen, se agregó 100 μL del homogenato, 100 μL de glutatión reducido y 100 μL de 1-cloro-2,4'-dinitrobenzeno (CDNB), se leyó al tiempo cero (T0) y se volvió a leer a los 5 minutos (T5) utilizando un filtro de 340 nm, se tomaron las diferencias de ambos tiempos para el análisis de resultados. Por último, siguiendo la metodología de Brogdon (1988), se determinaron los niveles de AChE, colocando 100 μL del homogenato, se agregaron 100 μL de yoduro de acetilcolina al 3.0 mM y 100 μL de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), se tomó la primera lectura (T0) y después de 10 min (T10), utilizando el filtro de 414 nm, se tomaron las diferencias de ambos tiempos para el análisis de resultados.

Con las absorbancias de cada enzima, se realizó una distribución de frecuencias y se estableció un umbral de resistencia. Por último, se realizó un ANOVA y una prueba de Tukey ($p=0.05$), utilizando el programa estadístico R versión 3.3.1.

Resultados y Discusión

Para la determinación de los niveles enzimáticos, en primera instancia se calculó la cantidad de proteína contenida en larvas de *P. xylostella*, y así obtener el número de insectos por muestra, donde de 0.25 a 1 larva, su contenido de proteína fue por debajo del intervalo requerido (80 a 120 μg); 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.

Para determinar los niveles enzimáticos, mencionaremos que las poblaciones en estudio estuvieron bajo un manejo con insecticidas piretroides, lactonas macrocíclicas, espinosinas, diamidas, fosforados y carbámicos. En la Tabla 1, se pueden observar las absorbancias por enzima para las diferentes poblaciones de *P. xylostella*; donde se observó diferencias significativas entre las poblaciones

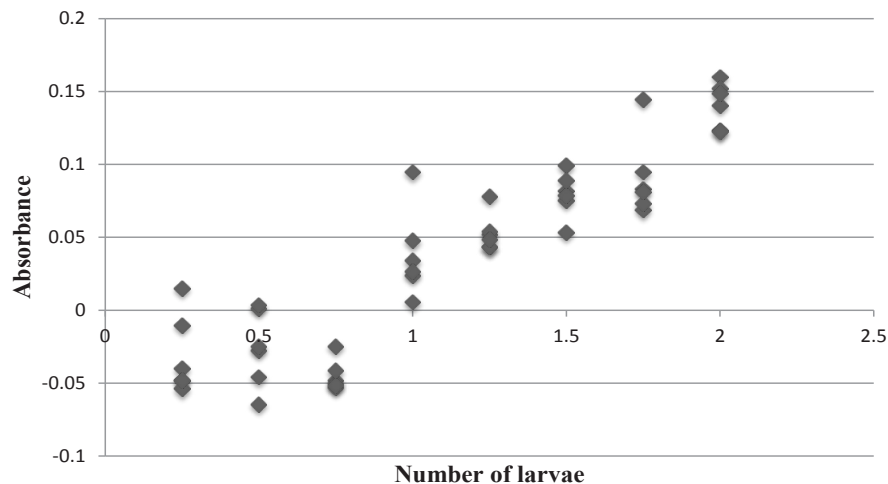


Figure 1. Absorbance of proteins in *Plutella xylostella* homogenates in Phosphate Buffer (pH: 7.2).

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

different populations of *P. xylostella*; where significant differences were observed among studied populations for each enzyme. Where β and α -Est are the enzymes that were expressed in a higher quantity for all of the populations, followed by Oxid, while GST and AChE were the ones that presented a lower content. β -Est was expressed in a higher quantity for the population of Celaya, Guanajuato, Mexico, with an average of 2.337, while San Luis de la Paz, Guanajuato, Mexico and the susceptible line presented the lowest values for this enzyme, with absorbances of 1.722 and 1.847 respectively. While α -Est highest content was reported in Celaya, followed by Valle de Santiago with average values of 2.589 and 2.068 respectively; the susceptible line along with Abasolo, Guanajuato, Mexico presented the lowest absorbances for α -Est with a average of 1.401 and 1.582 respectively. In the case of Oxid, its highest content was observed to be expressed for the population of San Luis de la Paz, Guanajuato, Mexico, with an average value of 2.003, and its lowest content was observed for the population of Celaya, Guanajuato, Mexico, with an absorbance of 0.207. On the other hand, San Luis de la Paz reported the maximum value of absorbances for GST with a mean of 0.016, while Abasolo and Valle de Santiago were the ones that presented the lowest means for this enzyme with values of 0.001 and 0.004 respectively. Regarding AChE, the population corresponding to San Luis de la Paz was the one that presented a higher expression for this enzyme

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

with a mean of 0.130, while the susceptible line reported a null expression for AChE.

Previous studies report that the main mechanism of resistance to pyrethroids, organochlorides Ponce *et al.* (2004), organophosphates (Bisset *et al.*, 2001), indoxacarb Toshio *et al.* (2004), avermectin, and benzoylurea (Sayyed *et al.*, 2006; Eziah *et al.*, 2009; Furlong *et al.*, 2013) is the cause of the high esterase content. For oxidases, which was the second detoxification mechanism, Pimentel *et al.* (2008) mention that the oxidases play an essential role in detoxification of several pesticides, directly participating in the disabling of the product or rusting for others enzymatic systems to enter and to be detoxified. Oxidase high values might be possibly due to the repetitive applications of abamectin in some of the locations; according to Clark *et al.* (1994), oxidative enzymes are the main physiological mechanism of resistance to abamectin. Finally, GSTs, in the production zone of the state of Guanajuato, are not a determinant factor for the

Estudios anteriores reportan que el principal mecanismo de resistencia a piretroides, organoclorados (Ponce *et al.*, 2009), organofosforados (Bisset *et al.*, 2001), indoxacarb (Toshio *et al.*, (2004), avermectina, y benzoilurea (Sayyed *et al.*, 2006; Eziah *et al.*, 2009; Furlong *et al.*, 2013) es a causa del alto contenido de esterases. Para las oxidasas que fue el segundo mecanismo detoxificación, Pimentel *et al.*, (2008) mencionan que las oxidasas juegan un papel fundamental en la detoxificación de diversos plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados. Los altos valores de oxidasas, posiblemente se debe a las repetidas aplicaciones de abamectina en algunas de las localidades; según Clark *et al.* (1994), las enzimas oxidativas son el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina. Finalmente las GST, en la zona productora del estado de Guanajuato, no es un factor determinante para la presencia de resistencia, estos resultados obtenidos concuerdan con los reportados por

Table 1.
Absorbance average of enzyme for different populations of *Plutella xylostella* in the state of Guanajuato, Mexico.

Tabla 1.
Medias de absorbancia de enzimas para diferentes poblaciones de *Plutella xylostella* en el estado de Guanajuato, México.

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

β-Est: β-Esterases, α-Est: α-Esterases, GST: Glutathione S-transferases, AChE: Acetylcholinesterase, Oxid: Oxidases.

β-Est: β-Esterasas, α-Est: α-Esterasas, GST: Glutathion S-transferasas, AChE: Acetilcolinesterasa, Oxid: Oxidasas.

presence of resistance, the obtained results are in agreement with the ones reported by Díaz *et al.* (2004) and Landeros *et al.* (2010), who used this same methodology, they report a low presence of GST in mosquitoes and red spider mites, respectively. One of the possible reasons to find low levels of GST, is that these enzymes are involved in the resistance to organophosphate insecticides (Ortelli *et al.*, 2003); however, the elevated production of esterases in an enzyme more related to this toxicological group (Bisset *et al.*, 2001).

Díaz *et al.* (2004) y Landeros *et al.* (2010), quienes utilizando esta misma metodología, reportaron una baja presencia de GST en mosquitos y araña roja respectivamente. Una de las posibles razones de encontrar bajos niveles de GST, es que estas enzimas están involucradas en la resistencia a insecticidas organofosforados (Ortelli *et al.*, 2003); sin embargo, la elevada producción de esterases es una enzima más relacionada con este grupo toxicológico (Bisset *et al.*, 2001).

Conclusions

In the production zone of the state of Guanajuato, Mexico, esterases and oxidases are the enzymes with the highest presence, responsible for the resistance in *P. xylostella*. As for GST and AChE, they do not present relevance as a detoxification mechanism, therefore reducing the application of organophosphate and carbamate products is proposed.

Conclusiones

En la zona productora del estado de Guanajuato en México, las estererasas y oxidasas son las enzimas con mayor presencia, responsables de la resistencia en *P. xylostella*. Por su parte, GST y AChE no presentan relevancia como mecanismo de detoxificación, por lo que se propone reducir las aplicaciones de productos organofosforados y carbamatos.

References

- Ahmad, M. I. Denholm, R. H. and Bromilow, C. (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. <https://doi.org/10.1002/ps.1225>
- APRD (Arthropod Pesticide Resistance Database). (2015). <https://www.pesticideresistance.org/> [Last checked: August 23rd 2017].
- Attique, M. N. R., Khaliq, A. and 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01035.x>
- 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., Miyataa, M. T., Miuraa, K. and Tanaka, T. (2009). RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.005>
- Bisset, J. A., Rodríguez, M. M., Molina, D., Díaz, C. and Soca, L. A. (2001). Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(1): 37-43. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602001000100007
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brogdon, W. G., (1984). Mosquito protein microassay-1: Protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79: 457-459. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90405-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90405-X)
- Brogdon, W. G. & Barber A. (1987). Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 29: 252-259. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(87\)90155-6](https://doi.org/10.1016/0048-3575(87)90155-6)
- Brogdon, W. G., (1988). Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90: 145-150. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(88\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(88)90110-7)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90385-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90385-7)
- Brogdon, W. G. & Dickinson, M. C. (1983). A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry*, 131: 499-503. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90204-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90204-X)
- Brogdon, W. G., Mcallister, J. C. and 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. https://www.researchgate.net/profile/Janet_Mcallister/publication/13845800_Haem

- [peroxidase activity in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance/links/545a5fed0cf25c508c308a38/Haem-peroxidase-activity-in-single-mosquitoes-identifies-individuals-expressing-an-elevated-oxidase-for-insecticide-resistance.pdf](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153605)
- Bújanos, M. R., Marín, J. A., Díaz, E. L., Gámez, V. J., Ávila, P. M. A., Herrera, V. R., Dorantes G. J. and Gámez, V. F. (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/bitstream/handle/123456789/3911/CIRCE_01020851200053062ok.pdf?sequence=1
- Clark, J. M., Scott, J. G., Campos, F. and Bloomquist, J. R. (1994). Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. *Annual Review Entomology*, 40: 1-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento.40.010195.000245>
- Da Silva, C. J. (2008). *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Efeito Da Sinigrina Aplicada Em Folhas De Couve E Brócolis. (Tesis de maestría). Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho" Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Campus De Jaboticabal. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/91377>
- Dary, O. Georghiou, G. P., Parsons, E. and Pasteur, N. (1990). Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *Journal Economic Entomologist*, 83: 2187-2192. <https://doi.org/10.1093/jee/83.6.2187>
- Díaz, C., Rodríguez, M. M., Fresneda, M. and Bisset, J. A. (2004). Determinación de la actividad glutatión-s-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(2): 111-116. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000200005
- Eziah, V. Y. H., Rose, M. and Wilkes, A. D. (2009). Biochemical mechanisms of insecticide resistance in the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), in the Sydney region Australian. *Australian Journal Entomology*, 48: 321-327. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2009.00723.x>
- Furlong, M. J. D., Wright, L. M. and Dossdall, M. L. (2013). Diamondback moth ecology and management: Problems, progress, and prospects. *Annual Review Entomologist*, 58: 517-541. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153605>
- Heckel, D. G. (2006). Chemical and biological insecticides: Resistance mechanisms and management in diamondback moth, in *The Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests: Proc 5th Internal Workshop*, ed. by Shelton, A.M., Collins H.L., Zhang, Y. and Wu, Q. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing, China, pp. 30-43. [Last checked August 23th 2017]
- Hu, Z. D. X., Feng, S. Q., Lin, H. Y., Chen, Z. Y., Li, F., Yin, P. and Liang, X. W. (2014a). Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal Integrative Agriculture*, 13: 2452-2459. [http://www.chinaagrisci.com/Jwk_zgnykx/en/10.1016/S2095-3119\(14\)60748-6](http://www.chinaagrisci.com/Jwk_zgnykx/en/10.1016/S2095-3119(14)60748-6)
- Hu, Z. D. X., Lin, H. Y., Chen, Z. Y., Li, F. and Yin, X. (2014b). Identification of a novel cytochrome P450 gene, CYP321E1 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 716-723. <https://doi.org/10.1017/S0007485314000510>
- INIFAP (Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias). (2013). Producción de brócoli en el bajío. Instituto Nacional De Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias. Centro De Investigación Regional Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Guanajuato, México. [file:///C:/Users/FAMILIA/Downloads/PRODUCCION%20DE%20BROCOLI%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/FAMILIA/Downloads/PRODUCCION%20DE%20BROCOLI%20(1).pdf)
- Khaliq, A., Attique, M. R. and 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. <https://doi.org/10.1017/S0007485307004877>
- Landeros, J., Ail, C., Cerna, E., Ochoa, Y., Guevara, L. and Aguirre, L. (2010). Susceptibilidad y mecanismos de resistencia de *Tetranychus urticae* en rosal de invernaderos. *Revista Colombiana de Entomología*, 36 (1): 5-9. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v36n1/v36n1a02.pdf>
- 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.51.110104.151104>
- Lui, T. X., Hutchison, W. D., Chen, W. and Burkness, E. C. (2003). Comparative susceptibilities of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) from Minnesota and South Texas

- to Cyhalothrin and Indoxicarb. *Journal of Economic Entomology*, 94(4): 1230-1236. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1230>
- Mohan, M. & Gujar, G. T. (2002). Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop Protection*, 22(3): 495-50. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00201-6](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00201-6)
- Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J., Ranson, H. and Hemingway, J. (2003). Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 373(3): 957-63. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.578.2879&rep=rep1&type=pdf>
- Pimentel, M. A. G., Antonino F. L. R., Duarte B. M. and Humberto S. (2008). Resistance of stored product insects to phosphine. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 43: 1671-1676. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2008001200005&script=sci_arttext&tlng=pt
- Ponce, G. G., Badii, M., Mercado, R. and Flores, A. E. (2009). Esterases in *Aedes albopictus* from Northeastern Mexico. *Southwestern entomologist*, 34(4): 477-484. <https://doi.org/10.3958/059.034.0411>
- Sarfraz, M., Dossall, L. M. and Keddie, B. A. (2006). Diamondback moth-host plant interactions: implications for pest management. *Crop Protection*, 25(7): 625-639. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.09.011>
- Sayyed, A. H. & Wright, D. J. (2006). Genetics and evidence for an esterase associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Management Science*, 62: 1045-1051. <https://doi.org/10.1002/ps.1270>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2018). <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> [Last checked: April 30th 2017].
- Thüler, R. T. (2006). *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae): estratégias para o manejo integrado. 83f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola), Universidade Estadual Paulista, Unesp, Jaboticabal, Brasil. [Check link: August 28th 2017]. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/102318>
- Torres, A. L., Boiça Júnior, A. L., Medeiros, C. A. and Barros, R. (2006). Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia Campinas*, 6(3): 447-457. <http://www.scielo.br/pdf/%0D/brag/v65n3/a11v65n3.pdf>
- Toshio, S., Zhang, L. and Scott, J.G. (2004). Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 8: 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.06.004>
- Xia, Y. M., Lu, Y. H., Shen, J., Gao, X. W., Qiu, H. and Li, J. H. (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>