

COMPARACIÓN DE LA TOXICIDAD Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Chrysoperla carnea* Y *Bactericera cockerelli* PARA ABAMECTINA Y PROFENOFOS

Carlos Enrique Ail Catzim¹, Ernesto Cerna Chávez², Manuel Cruz Villegas¹, Alejandro Manelik García López¹, Rosario Esmeralda Rodríguez González¹. ¹Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. e-mail: ail_car@yahoo.com.mx; ²Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

RESUMEN: Se evaluó el efecto de los insecticidas abamectina y profenofos sobre la mortalidad de ninfas de *B. cockerelli* y larvas de *C. carnea* mediante bioensayos en laboratorio y se determinó los mecanismos de resistencia mediante pruebas bioquímicas. Para abamectina se observó, mayor mortalidad en ninfas de la plaga en comparación a larvas de crisopa, mientras que profenofos resultó tóxico para ambas especies. Las enzimas α , β -esterasas, fueron los principales mecanismos de resistencia de *C. carnea* para los insecticidas abamectina y profenofos. Para *B. cockerelli* las oxidasas fueron el principal mecanismo de resistencia para abamectina, pero para profenofos ningún sistema enzimático estudiado resultó importante.

Palabras clave: Concentración letal, depredación, bioensayo, selectividad.

Comparison of toxicity and resistance mechanisms of *Chrysoperla carnea* and *Bactericera cockerelli* for abamectin and profenofos

ABSTRACT: The effects of abamectin and profenofos were evaluated on the mortality of nymphs of *B. cockerelli* and larvae of *C. carnea* through laboratory bioassays, besides the mechanisms of resistance were determined by biochemical tests. For abamectin was observed higher mortality in nymphs of the pest compared with lacewing larvae, while profenofos was toxic for both species. The enzymes α , β -esterases, were the main mechanisms of resistance of *C. carnea* for abamectin and profenofos insecticides. *B. cockerelli* oxidases were the major mechanism of resistance for abamectin, nevertheless for profenofos no enzyme system studied resulted important.

Key words: Lethal concentration, predation, bioassay, selectivity.

Introducción

Chrysoperla carnea es considerado como uno de los principales agentes de control biológico de *B. cockerelli* vector importante de enfermedades infecciosas, ocasionadas por bacterias y fitoplasmas (Hansen *et al.*, 2008), sobre plantas solanáceas en México (Vega *et al.*, 2008); además a este depredador se le reporta como tolerante a insecticidas (Nasreen *et al.*, 2003). Las larvas de crisopa son conocidas por presentar tolerancia a piretroides, y parece ser resultado de la alta actividad de enzimas estererasas (Bashir y Crowder, 1983), y al metabolismo oxidativo (Pree *et al.*, 1989), lo cual la hace un candidato adecuado para su integración junto con insecticidas en programas de manejo integrado de esta plaga.

Al respecto Rumpf *et al.* (1997) mencionan que como parte de cualquier evaluación de esta especie de crisopa para su uso en MIP, es importante entender su respuesta a los insecticidas, tanto los efectos letales de estos productos sobre este depredador, como las respuestas subletales inducidas, tal como los efectos sobre la actividad de las enzimas. La respuesta en la actividad de los sistemas enzimáticos son usadas como marcadores biológicos para evaluar la contaminación subletal en invertebrados, indicador de la salud de los enemigos naturales sobrevivientes a la exposición de los insecticidas, pero también puede ser usada para medir o monitorear la resistencia y determinar los mecanismos de resistencia a los insecticidas en las plagas y enemigos naturales (Booth *et al.*, 2007). Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue comparar la toxicidad de los insecticidas abamectina y profenofos sobre *Chrysoperla carnea* y su presa *Bactericera cockerelli*, además de

determinar los mecanismos bioquímicos involucrados en la resistencia de estos insectos hacia abamectina y profenofos.

Materiales y Método

Evaluación de la Toxicidad. Se evaluó la toxicidad residual de tres concentraciones; 0.1, 0.5 y 1.0 % de la concentración de campo recomendada (CCR) de los insecticidas abamectina (18 ppm/L) y profenofos (1400 ppm/L) para el control de *B. cockerelli* en el cultivo de papa, más un testigo (sin aplicar), sobre ninfas (N₄-N₅) de *B. cockerelli* y larvas de primer instar (48 h de edad) de *C. carnea*. Se utilizó el método de bioensayo de película residual en caja Petri (Dennehy *et al.*, 1987). Las concentraciones se realizaron utilizando como solvente etanol al 95% y al testigo se aplicó solo etanol; se incluyeron 10 repeticiones para cada concentración y el testigo, una repetición consistió de una caja Petri (6 cm de diámetro) conteniendo 10 ninfas de la plaga, en el caso del depredador una repetición consistió de 8 larvas, contenidas en forma individual en cada caja Petri. Se depositó 500 µL de la solución insecticida en cada una de las cajas Petri, dos horas después se transfirieron los insectos. Se cuantificó la mortalidad a las 24 h después de introducir los especímenes y se tomó como criterio de mortalidad, cuando los insectos manifestarán un desplazamiento menor de una vez el largo de su cuerpo, después de estimularlos con un pincel fino. Todos los bioensayos se llevaron a cabo bajo condiciones controladas; temperatura 25 ±2°C, humedad relativa de 70 ±10%. Al final del periodo de exposición para cada concentración de insecticida, los organismos vivos y muertos de ambas especies fueron removidos y almacenados a -80°C, para su posterior análisis enzimático.

Análisis de la actividad enzimática. Para determinar la actividad de las enzimas α-esterasas, β-esterasas, y el contenido de oxidazas, se homogenizaron tres larvas de primer estadio de *C. carnea* (hcr) y cinco ninfas (N₄-N₅) de *B. cockerelli* (hps) en 100 µL de tampón fosfato de potasio (Tfos, 100 mM, pH 7.2) y se diluyó a 1 mL con Tfos (Brogdon, 1984). El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) modificado por Brogdon (1984). Se prepararon 10 muestras de los organismos vivos o muertos de ambas especies, expuestos a cada una de las concentraciones de abamectina y profenofos. Todas las pruebas se hicieron por triplicado en placas de 96 pozos y leídas mediante el lector de microplacas Stat fax-2100®.

Actividad de α y β-esterasas. Para ello, se colocó 100 µL de hcr o hps en cada pozo de la placa de Elisa, enseguida se depositaron 100 µL de una solución de α o β-naftil acetato (3 mM; pH 7.4). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se le adicionaron 100 µL de o-dianisidina (2 mM), se mantuvo la mezcla por 2 min y se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 545 nm (Brogdon y Dickinson, 1983). Se determinó la actividad enzimática mediante una curva estándar preparada con α o β-naftol (0.1-1.0 mM).

Estimación de contenido de oxidazas. Para ello, se colocaron 100 µL de hcr o hps en cada pozo, luego se depositaron 200 µL de una solución de 3, 3', 5, 5'-tetrametil-bencidina (1.6 mM), enseguida se colocaron 25 µL de peróxido de hidrógeno (3 %), la mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se realizó la lectura de la placa con un filtro de 630 nm (Brogdon *et al.*, 1997). Se estimó la cantidad de oxidazas usando una curva estándar de Citocromo C (0.8-32 µg).

Análisis estadístico. Los efectos de los factores especie, insecticida y concentración sobre el porcentaje de mortalidad de ninfas *B. cockerelli* y larvas de *C. carnea* expuestos a residuos de los insecticidas abamectina y profenofos, se analizaron con un ANOVA de tres-vías [PROC GLM de SAS/STAT (SAS, 2001)], las medias de los mínimos cuadrados se compararon por Tukey, $p \leq 0.05$ (SAS, 2001). Los resultados de la actividad enzimática y el contenido de oxidazas entre los especímenes vivos y muertos de *B. cockerelli* y *C. carnea* para cada concentración, para cada insecticida y para cada enzima, se compararon a través de la prueba de t-Student [PROC TTEST de SAS/STAT (SAS, 2001)].

Resultados y Discusión

Evaluación de la toxicidad. Los efectos de los factores especie, insecticida, concentración e interacciones de estos, fueron significativos para el porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. cockerelli* y larvas de *C. carnea* ($F = 250.62$; $gl = 11,226$; $P = 0.0001$). En relación a abamectina se observó, mayor mortalidad en ninfas de la plaga en comparación a larvas de crisopa ($F = 769.21$; $gl = 1,226$; $P = 0.0001$), este insecticida fue altamente eficiente sobre *B. cockerelli*, en concentraciones de 1.0 y 0.5% de la CCR, en las que se obtuvo alta mortalidad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Medias de los mínimos cuadrados para el porcentaje de mortalidad de *B. cockerelli* y *C. carnea* expuestos a residuos de diferentes porcentajes de la concentración de campo de los insecticidas abamectina y profenofos, recomendadas para el control de *B. cockerelli* en el cultivo de la papa.

% de concentración de campo**	% de Mortalidad*			
	Abamectina		Profenofos	
	<i>C. carnea</i>	<i>B. cockerelli</i>	<i>C. carnea</i>	<i>B. cockerelli</i>
1.0	0.0Aay	94.0Abx	90.0Aax	93.3Abx
0.5	0.0Aay	80.7Bbx	73.1Bax	75.0Bbx
0.1	0.0Aay	55.4Cbx	46.3Cax	34.6Cby

* Porcentaje de mortalidad corregida por Abbot (1925)

** Concentración de campo de los insecticidas; abamectina (18 ppm) y profenofos (1400 ppm).

Las medias de los mínimos cuadrados en una columna seguida por la misma letra mayúscula (A-C) no son significativamente diferentes entre porcentajes de la concentración de campo, para una sola especie y un insecticida. Las medias de los mínimos cuadrados en una línea seguida por la misma letra minúscula (a-b) no son significativamente diferentes entre especies, para un solo insecticida y un porcentaje de la concentración de campo. Las medias de los mínimos cuadrados en una línea seguidas por la misma letra minúscula (x-y) no son significativamente diferentes entre insecticidas, para una sola especie y un porcentaje de concentración de campo (PROC GLM, Tukey, $P > 0.05$).

Por su parte *C. carnea* no presentó mortalidad en las tres concentraciones de abamectina, mientras que profenofos resultó tóxico para ambas especies ($F = 535.24$; $gl = 1,226$; $P = 0.0001$); en ambos insectos la mortalidad se redujo a medida que la CCR de profenofos disminuyó; sin embargo, la mortalidad fue similar para los dos insectos independientemente de la concentración evaluada (Cuadro 1). Estos resultados coinciden con lo reportado por Legaspi *et al.*, 2000, quienes mencionan que en general los insecticidas con nuevo modo de acción son menos tóxicos para los enemigos naturales en comparación con los insecticidas convencionales. La baja toxicidad de abamectina sobre este depredador y su alta eficiencia exhibida sobre *B. cockerelli*, sugieren que este insecticida puede ser usado en sistemas de MIP, para el manejo de poblaciones de *B. cockerelli* en el cultivo de la papa. Para el caso de profenofos, este insecticida no se recomienda su uso en MIP.

Actividad enzimática. La actividad de las enzimas; α , β -esterasas, entre los organismos vivos y muertos de *B. cockerelli* expuestos a diferentes concentraciones de profenofos no presentaron diferencias significativas, resultado similar se presentó para el contenido de oxidasa (Cuadro 2), lo que indica que estos mecanismos de resistencia no están involucrados en el nivel de tolerancia que presenta esta plaga hacia de profenofos, así también nos sugieren que probablemente otro mecanismos de resistencia pudiera estar involucrado, en general se reporta a acetilcolinesterasa insensible como el principal mecanismos de resistencia a los insecticidas organofosforados en insectos (Kasagami *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Comparación de la actividad enzimática de individuos vivos y muertos de *B. cockerelli* y *C. carnea* expuestos a residuos de diferentes porcentajes de la concentración de campo del insecticida profenofos, recomendada para el control de *B. cockerelli* en el cultivo de la papa.

CCR*	Actividad Enzimática				Oxidasas***	
	α -esterasas**		β -esterasas**		Muertos	Vivos
%	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos
<i>B. cockerelli</i>						
1.0	120.0a	130.0a	184.0a	189.0a	465.0a	406.0a
0.5	112.0a	116.0a	193.0a	196.0a	511.0a	639.0a
0.1	139.0a	159.0a	258.0a	301.0a	609.0a	483.0a
<i>C. carnea</i>						
1.0	118.0b	140.0a	109.0a	120.0a	343.0a	389.0a
0.5	105.0b	190.0a	107.0b	340.0a	347.0a	335.0a
0.1	108.0b	188.0a	113.0b	329.0a	401.0a	305.0a

Las medias de la actividad enzimática seguida por la misma letra mayúscula (a-b) no son significativamente diferentes entre individuos vivos y muertos, para una sola enzima y un porcentaje de la concentración de campo (PROC TTEST, t-Student, $P>0.05$). *Concentración de campo recomendada. **Expresado en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína/min. ***Expresado en ng de grupo hemo/mg de proteína

La actividad de las enzimas α y β -esterasas, fue significativamente mayor en los individuos vivos en comparación con organismos muertos de *C. carnea* expuestos a diferentes porcentajes de CCR de profenofos (Cuadro 2), lo que indica que estas enzimas pudieran estar relacionadas con el nivel de tolerancia que presento esta crisopa a concentraciones bajas de profenofos, no se tienen reportes de los posibles mecanismos de resistencia de *C. carnea* hacia este insecticida, sin embargo, su tolerancia natural a los insecticidas piretroides (Grafton-Cardwell y Hoy, 1985), parece ser resultado de la alta actividad de enzimas esterasas (Bashir y Crowder, 1983), lo que coincide con nuestros resultados. Para el caso de las oxidasas no hubo diferencias significativas en el contenido de estas enzimas entre los individuos vivos y muertos de *C. carnea* expuestos a diferentes concentraciones de profenofos (Cuadro 2).

La actividad de las enzimas; α , β -esterasas entre los organismos vivos y muertos de *B. cockerelli* expuestos a diferentes concentraciones de abamectina no presentaron diferencias significativas (Cuadro 3), estos resultados sugieren que estos sistemas enzimáticos no intervienen en el nivel de tolerancia de esta plaga hacia abamectina. Por otro lado los organismos vivos de *B. cockerelli* expuestos a diferentes concentraciones de abamectina presentaron mayor contenido de oxidasas en comparación a los especímenes muertos (Cuadro 3), sugiriendo que estas enzimas se encuentran involucradas en el nivel de tolerancia hacia este insecticida, lo que coincide con Clark *et al.*, 1994 quienes involucran a las enzimas oxidativas como principal mecanismo fisiológico de resistencia a abamectina. En el cuadro 3 se observa la actividad de las enzimas α y β -esterasas, en los individuos vivos expuestos a diferentes porcentajes de CCR de abamectina, y debido al bajo efecto de este insecticida sobre el depredador no se presentaron individuos muertos en las tres concentraciones evaluadas. Clark *et al.*, 1994 mencionan que el principal mecanismo fisiológico de resistencia o tolerancia a la abamectina son las enzimas oxidativas, y por su parte Argentine *et al.*, 1992, reportan que además del metabolismo oxidativo, la actividad de las carboxilesterasas pudieran estar

involucradas en la resistencia de abamectina, lo que pudiera explicar estos resultados con nuestros resultados.

Cuadro 3. Comparación de la actividad enzimática de individuos vivos y muertos de *B. cockerelli* y *C. carnea* expuestos a residuos de diferentes porcentajes de la concentración de campo del insecticida abamectina, recomendada para el control de *B. cockerelli* en el cultivo de la papa.

CCR*	Actividad Enzimática				Oxidasas***	
	α -esterasas**		β -esterasas**		Muertos	Vivos
%	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos		
<i>B. cockerelli</i>						
1.0	333.0a	331.0a	471.0a	521.0a	651.0a	856.0b
0.5	352.0a	373.0a	506.0a	576.0a	649.0a	771.0b
0.1	340.0a	372.0a	501.0a	530.0a	590.0a	715.0b
<i>C. carnea</i>						
1.0	----	306.0	----	670.0	----	268.0
0.5	----	364.0	----	793.0	----	262.0
0.1	----	306.0	----	717.0	----	287.0

Las medias de la actividad enzimática seguida por la misma letra mayúscula (a-b) no son significativamente diferentes entre individuos vivos y muertos, para una sola enzima y un porcentaje de la concentración de campo (PROC TTEST, t-Student, $P > 0.05$). *Concentración de campo recomendada. **Expresado en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína/min. ***Expresado en ng de grupo hemo/mg de proteína

Literatura Citada

- Argentine, J.A., J.M. Clark and H. Lin. 1992. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 44: 191-207
- Bashir, N. H. H., and L. A. Crowder. 1983. Mechanisms of permethrin tolerance in the common green lacewing. *Journal of Economic Entomology*. 76: 407-409.
- Booth L. H.; S. D. Wratten and P. Kehrli. 2007. Effects of reduced rates of two insecticides on enzyme activity and mortality of an aphid and its lacewing predator. *Journal Economic of Entomology*. 100(1): 11-19.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
- Brogdon, W. G. 1984. Mosquito protein microassay-I, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry Physiology* 79: 457-459.
- Brogdon, W. G. and C. M. Dickinson. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry* 131: 499-503.
- Brogdon, W. G.; J. C. McAllister, and; J. Vulule. 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.
- Clark, J. M., J. G. Scott, F. Campos, and J.R. Bloomquist. 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. *Annual Review of Entomology*. 40: 1-30.

- Dennehy, T. J., E. E. Grafton-Cardwell, J. Granett and K. Barbour. 1987. Practitioner assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae). *Journal Economic of Entomology*. 80: 998-1103.
- Grafton-Cardwell, E.E., and M.A. Hoy. 1985. Intraspecific variability in response to pesticides in the common green lacewing, *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae). *Hilgardia*. 53: 1-31.
- Kasagami, T., T. Miyamoto and I. Yamamoto. 2002. Activated transformations of organophosphorus insecticides in the case of non-AChE inhibitory oxons. *Pest Management Science*. 58:1107-1117
- Legaspi, J. C., J. V. French, and B. C. Legaspi Jr. 2000. Toxicity of novel and conventional insecticides on selected beneficial insects. *Subtropical Plant Science*. 52: 23-32
- Nasreen, A., G. Mostafa, and M. Ashfaq. 2003. Selectivity of some insecticides to *Chrysoperla carnea* (Stephen) (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory. *Pakistan Journal Biological Science*. 6: 536-538.
- Pree, D. J., D. E. Archibald, and R. K. Morrison. 1989. Resistance to insecticides in the common green lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae) in southern Ontario. *Journal of Economic Entomology*. 82: 29-34.
- Rumpf, S., F. Hetzel, and C. Frampton. 1997. Lacewings (Neuroptera: Hemerobiidae and Chrysopidae) and integrated pest management: enzyme activity as biomarker of sublethal insecticide exposure. *Journal Economic of Entomology*. 90(1): 102-108.
- SAS Institute 2001. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Vega, G. M. T., J. C. Rodríguez, O. Díaz, R. Bujanos, D. Mota, J. L. Martínez, A. Lagunes, y J. A. Garzón. 2008. Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones mexicanas del salerillo, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Agrociencia*. 42: 463-471.