

USO DE LA MICROFLUORESCENCIA DE RAYOS X EN LA DISTRIBUCIÓN DE COMPONENTES INORGÁNICOS EN INSECTOS PARASITOIDES

Víctor Manuel Caballero-Chan, Alejandra González-Moreno, Carlos Juan Alvarado-López y Jairo Cristóbal-Alejo

Instituto Tecnológico de Conkal, Yuc. Av. Tecnológico S/N Conkal Yucatán. México. C. P. 97345.

✉ Autor de correspondencia: alejandra.gonzalez@itconkal.edu.mx

RESUMEN. El estudio de los elementos inorgánicos presentes en el cuerpo de los insectos permite conocer la influencia del ambiente sobre estos seres vivos. Actualmente, el desarrollo de nuevas metodologías ha permitido realizar estos estudios de forma práctica, aunque la mayoría utiliza técnicas que destruyen la muestra. Por lo que es necesario explorar nuevos equipos como el de Microfluorescencia de Rayos X (μ XRF), que es un método de análisis elemental altamente sensible y no destructivo que mide una amplia variedad de macro y microelementos. Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de elementos inorgánicos en el cuerpo de los parasitoides mediante el análisis de μ XRF, utilizando un M4 Tornado 100, Bruker, Alemania. Se detectaron nueve elementos (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn), de los cuales el S, K y Ca fueron los macroelementos de mayor concentración; y el Zn fue el microelemento con mayor concentración; los otros microelementos, Mn y Cu, se presentaron en concentraciones mayores en el abdomen de la hembra que en el macho.

Palabras clave: Hymenoptera, parasítica, Micro-XRF, multielemento

X-Ray Microfluorescence use in distributions of inorganic elements in parasitoids insect

ABSTRACT. The study of the inorganic elements present in the body of insects allows us to know the influence of the environment on these living beings. Currently, the development of new methodologies has allowed these studies to be carried out in a practical way, although most use techniques that destroy the sample. So it is necessary to explore new equipment such as X-ray Microfluorescence (μ XRF), which is a highly sensitive and non-destructive elemental analysis method that measures a wide variety of macro and microelements. So, the objective of this study was to determine the presence of inorganic elements in the body of parasitoids by analyzing μ XRF, using an M4 Tornado 100, Bruker, Germany. Nine elements were detected (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn), which S, K and Ca had higher concentrations than other elements; also, higher Zn concentration was founded; other microelements like Mn and Cu were more elevated in concentrations in metasoma of females than males.

Key words: Hymenoptera, parasitic, Micro-XRF, multielement.

INTRODUCCIÓN

Diversos autores han demostrado que el conocimiento de los elementos inorgánicos presentes en el cuerpo de los insectos, constituye información básica para predecir la naturaleza de las alteraciones en ciclos de vida, fisiología, morfología y otros aspectos biológicos, que se producen como consecuencia de los cambios ambientales (Waters, 1962; Hynes, 1976; Hall y Knight, 1981; Marden y Rollins, 1994; Runck y Blinn, 1995; Clarke *et al.*, 1996).

Actualmente para determinar la distribución de elementos inorgánicos en insectos se han usado técnicas como la Ablación Láser con Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (LA-ICP-MS). Wang *et al.* (2013), analizaron abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) y su papel como bioindicadores de contaminación del suelo, plantas, agua y aire, ya que cubren un área de varios kilómetros cuadrados para alimentarse, por lo que son susceptibles a que, durante el vuelo, se adhieran al cuerpo diversas moléculas, incluidos los contaminantes antropogénicos. También se ha utilizado la Fluorescencia de Rayos X de Reflexión Total (TXRF), para evaluar los

efectos de elementos inorgánicos en el desarrollo del parasitoide, *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae), en larvas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae) (Pinheiro *et al.*, 2010).

Pese a que el uso de estas técnicas permiten realizar nuevas investigaciones, la mayoría de estos métodos son destructivos y en muchos trabajos es importante mantener intactos los ejemplares, ya que pueden ser necesarios para trabajos posteriores o para tenerlos como referencia de la fauna que existe en un lugar. Por lo que es importante implementar otro tipo de metodologías que puedan analizar piezas de alto valor añadido, sin destruir la muestra, como en el caso de los equipos anteriormente descritos. En este sentido, la Microfluorescencia de Rayos X (μ XRF) es un método de análisis elemental altamente sensible y no destructivo que mide una amplia variedad de muestras pequeñas y grandes, con cualquier forma o con formas irregulares y genera información acerca de la composición y la distribución de los elementos, con la realización de análisis rápidos y además, es posible obtener distribuciones espaciales de elementos (mapping).

En el campo medioambiental, la Microfluorescencia de Rayos X se está aplicando en multitud de matrices, con el fin de realizar estudios de control de la contaminación. En este campo, la (μ XRF) es una técnica especialmente adecuada para el análisis de todo tipo de suelo, agua y organismos como plantas e insectos (Bruker, 2015). Por lo que en este trabajo se eligió a los parasitoides (Hymenoptera: Ichneumonidae) como modelo para la aplicación de esta tecnología.

Se le denomina parasitoide a todo insecto que en estado larvario se desarrolla sobre o dentro de otro artrópodo, mientras que en estado adulto vive libremente (Bernal, 2007). Se seleccionó este grupo de insectos como modelo de estudio, por su importancia ecológica, al ser uno de los grupos de insectos más diversos (Ruíz-Cancino *et al.*, 2014), no sólo por la riqueza de especies, sino por su gran variedad de hábitos alimenticios y de desarrollo; características que los vuelven importantes económicamente, al ser usados como una de las estrategias de control de plagas importantes (Hochberg e Ives, 2000). El conocimiento de los elementos minerales presentes en el cuerpo de estos insectos, permitirá información de la parte abiótica de los ecosistemas donde se desarrollan estos organismos. Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la distribución de elementos inorgánicos en las principales partes del cuerpo de los parasitoides mediante el análisis de μ XRF.

MATERIALES Y MÉTODO

Preparación de la muestra. Las muestras de parasitoides, se obtuvieron de las colecciones del Instituto Tecnológico de Conkal Yucatán. Se seleccionaron dos parasitoides adultos (macho y hembra) de la subtribu Cryptina (Ichneumonidae: Cryptinae). Los parasitoides se depositaron en papel MYLAR® TF-160 y colocados en un porta muestra marca Fluxana de 32mm.

Análisis μ XRF. Se utilizó el sistema de Microfluorescencia de Rayos X (μ XRF) (M4 Tornado 100, Bruker, Alemania), con detector de deriva de silicio de dispersión de energía, XFlash™, con una superficie sensible 30 mm². Las mediciones se tomaron en condiciones de vacío de 20 mbar y se realizaron directamente en los cuerpos de cada insecto. Los mapas se realizaron con un espaciado de píxeles de 2mm, para cubrir completamente la muestra, con un tiempo de medición de 35 ms por píxel, y las imágenes finales se crearon con el software integrado del M4 Tornado 100, ESPRIT. Las fracciones de masa obtenidas no se corrigieron con la biomasa total de los parasitoides y, por lo tanto, Los valores para las estructuras individuales dentro de los parasitoides se presentaron en porcentaje de masa. En ambas muestras se tomó como punto de análisis el tórax y el abdomen.

En todas las mediciones, el generador de rayos X se hizo funcionar a 50 kV y 200 μ A sin el uso de filtros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó la presencia de nueve elementos en el cuerpo de los parasitoides: Fósforo (P), Azufre (S), Cloro (Cl), Potasio (K), Calcio (Ca), Manganeso (Mn), Hierro (Fe), Cobre (Cu) y Zinc (Zn). En general, los macroelementos que se encontraron en mayor porcentaje de concentración fueron K, Ca y S, (Cuadro 1). El K tiene un papel fundamental en ambientes fríos, ya que muchos insectos utilizan este macroelemento para mantener un equilibrio interno estable (MacMillan *et al.*, 2015), y el Ca lo utilizan la mayoría de los insectos voladores para desarrollar tolerancia al frío y tolerar los cambios en la disminución de temperatura en el ambiente en que se desarrollan (Teets *et al.*, 2013). El contenido de S, puede estar relacionado con la eumelanina, pigmento que da la coloración marrón y que funciona como agente de endurecimiento cuticular (esclerotización) en insectos (Sugumaran, 2002; Marín y del Pozo, 2005). Por el contrario, los macroelementos que se encontraron en menor proporción en ambos insectos, fueron el Cl y P. La presencia de Cl, aunque baja, puede deberse al filtrado isosmótico de la hemolinfa de los insectos, la cual es alta en K, baja en Na y tiene Cl como anión mayoritario (Gullan and Cranston, 2000). Con relación al P, los resultados fueron contrarios a lo esperado, ya que el P, es un elemento esencial para la formación de ácidos nucleicos, fosfolípidos, estructuras de membranas y una gran variedad de enzimas (Tsing-Hai *et al.*, 2013).

En relación a los microelementos, el Zn fue el que presentó mayor concentración (Cuadro 1). Este elemento está involucrado en los procesos de encapsulación y fagocitosis que regulan la respuesta inmune del insecto. También está involucrado en la homeostasis y el proceso de crecimiento y diferenciación celular (Tsing-Hai *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Porcentajes de los elementos en el tórax y abdomen de parasitoides en estudio.

Muestra		Masa (%)								
		P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Macho	Tórax	0.12	0.17	0.03	0.78	0.31	0.01	0.12	0.03	0.09
	Abdomen	0.44	0.45	0.04	0.51	0.48	0.02	0.06	0.03	0.13
Hembra	Tórax	0.05	0.16	0.08	0.35	0.28	0.01	0.10	0.06	0.10
	Abdomen	0.23	0.46	0.06	0.68	0.51	0.15	0.06	0.17	0.17
Total		0.84	1.24	0.21	2.32	1.58	0.19	0.34	0.29	0.49

Cabe resaltar que otros microelementos, como Mn, Cu y Zn, se presentaron en concentraciones mayores en la hembra que en el macho (Cuadro 1). Esto puede deberse a los diferentes requerimientos energéticos y actividades enzimáticas entre machos y hembras (Tsing-Hai *et al.*, 2013); por lo que la hembra podría tener concentraciones más altas de estos elementos, al requerir mayores tasas de producción de ATPs y síntesis de enzimas relacionados con la producción de huevos y al proceso de oviposición. Así mismo, se ha demostrado que altos niveles de Mn y Zn en el abdomen, mandíbulas y oviposidores de muchas avispas parasíticas están involucrados en el endurecimiento cuticular (Hillerton y Vincent, 1982). Es probable que la hembra necesite mayores concentraciones de Mn en el abdomen, en comparación con los machos (Fig. 1), porque necesitan un abdomen fuerte que les permita plegarse para ovipositar ventralmente en su hospedero (Hochberg e Ives, 2000), además de ser necesario un ovipositor endurecido para perforar a través de sustratos duros (Hillerton y Vincent, 1982; Gauld y Bolton, 1988; Quicke, 1997).

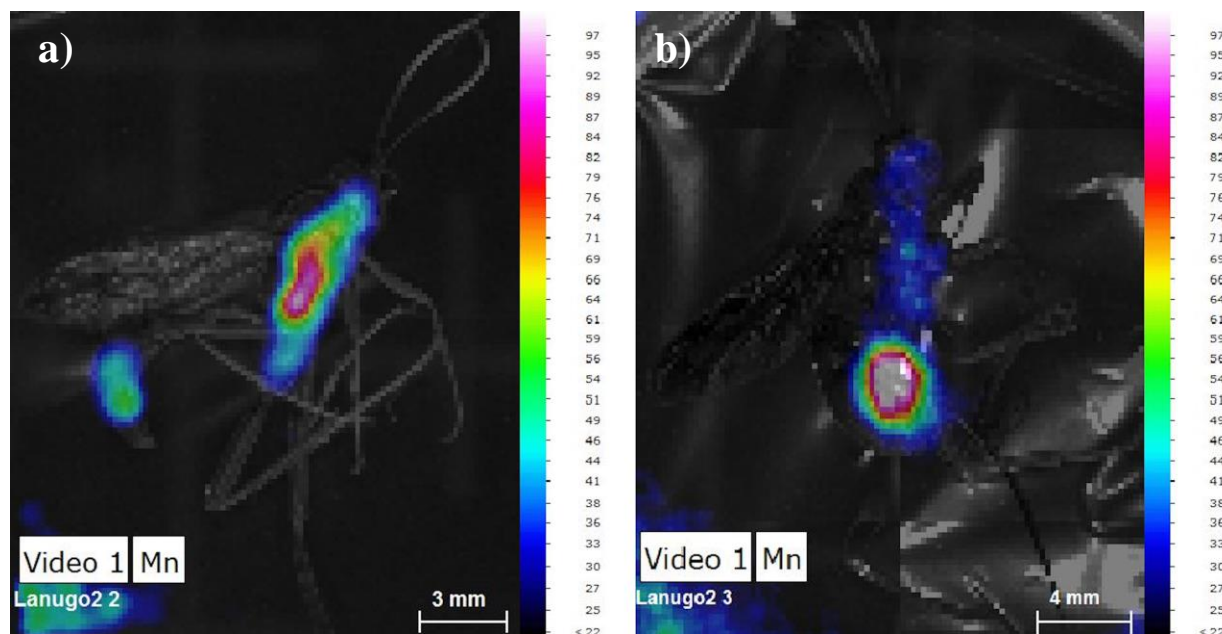


Figura 1. Mapa de distribución del Mn en insectos parasitoides correspondientes a diferentes sexos. a) Ejemplar macho b) Ejemplar hembra. El valor del eje representa el porcentaje de señal de fluorescencia emitida por el elemento.

Otro de los elementos que se presentaron en diferentes concentraciones en el abdomen de la hembra, en comparación con el macho, fue el Cu; lo que puede estar relacionado con los venenos derivados de este elemento, utilizados para detener el desarrollo del hospedero, presentes en la hembra (Vinson *et al.*, 2001). El Cu también se ha descrito como un cofactor de dos enzimas importantes implicadas en la melanización de la cutícula, las tirosinasas y las fenoloxidasas (Kim *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Las fenoloxidasas son un elemento clave en la respuesta inmune de insectos; principalmente para el proceso de encapsulación, que convierte a los hospederos como objetivo principal para la supresión de su sistema inmune invadido por parasitoides (Vinson, 1990; Schmidt *et al.*, 2001; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

La Microfluorescencia de Rayos X es una técnica no destructiva que permite medir la concentración y distribución de elementos inorgánicos en diferentes partes de insectos parasitoides. Los macroelementos que se encontraron en mayor concentración fueron el K, Ca y S. Los microelementos que se presentaron en mayor porcentaje fueron Mn, Cu y Zn, principalmente en el abdomen de las hembras.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Biol. María Virginia Solís Montero y Santos Armin Uc, por su ayuda en el trabajo de campo. Las colectas de este trabajo fueron financiadas con los proyectos “Diversidad de parasitoides y su relación con la vegetación: modelos predictivos a nivel climático y de paisaje” (Ciencia Básica Conacyt, Referencia: 241138) y por el proyecto “Efecto de la superficie del cultivo de maíz sobre la diversidad y emergencia de parasitoides” (TecNM Referencia: 6255.17-P). El equipo de μ XRF fue adquirido con apoyo CONACYT bajo el proyecto 269700 para el fortalecimiento de infraestructura.

LITERATURA CITADA

- Bernal, J. S. 2007. Biología, ecología y etología de parasitoides. Pp. 61-74. *In*: L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (Eds.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México, D. F.
- Bruker, Nano GmbH. 2015. *M4 Tornado, High performance Micro-XRF spectrometer*. User Manual. Berlin, Germany.
- Clarke, A., Price, P. A. and Clarke, R. 1996. The energy content of dragonflies (Odonata) in relation to predation by falcons. *Bird study*, 43(3): 300- 304.
- Gauld, I. D. and Bolton, B. 1988. *The Hymenoptera*. Oxford University Press/Natural History Museum, Oxford, 332p.
- Gullan, P.J and Cranston, P.S. 2000. *The Insects, An Outline of Entomology*. 2nd ed. Blacwell Science, Oxford, 470p.
- Hall, J. D. and Knight, N. J. 1981. Natural variation in abundance of salmonid populations in streams. Dept. Fish. Wild., Oregon State Univ. Corwallis, Oregon report. N° 97331.
- Hillerton, J. E. and Vincent, J. F. V. 1982. The specific location of zinc in insect mandibles. *Journal of Experimental Biology*, 101(1): 333-336.
- Hochberg, M. E. and Ives, A. R. 2000. *Parasitoid population biology*. Princeton University Press. 366p.
- Hynes, H. B. N. 1976. *The ecology of running waters*. Liverpool Univ. Press, Liverpool.
- Kim, J., Marshall, M. and Wei, C. 2000. Polyphenoloxidase. *In*: N. F. Haard and B. K. Simpson (Eds.). *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EUA, 217-315.
- MacMillan, H. A., Andersen, J. L., Davies, S. A. and Overgaard, J. 2015. The capacity to maintain ion and water homeostasis underlies interspecific variation in *Drosophila* cold tolerance. *Scientific reports*, 5, 18607.
- Marden, J. H. and Rollins, R. A. 1994. Assessment of energy reserves by damselflies engaged in aerial contests for mating territories. *Animal Behaviour*, 48(5): 1023-1030.
- Marín, D., and del Pozo, A. 2005. Pigmentación de la piel (I). Melaninas: conceptos generales e implicaciones cosméticas. *Offarm: farmacia y sociedad*, 24(1), 116-118.
- Pinheiro D. O., Zucchi T. D., Zucchi O. L. A. D., Nascimento Filho V.F., Almeida E. and Cônsoli F.L. 2010. Inorganic elements in the fat bodies of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae parasitized by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 156(4): 273-278.
- Quicke, D. L. J. 1997. *Parasitic wasps*. Chapman and Hall, Inc., London, 470p.
- Rodríguez-Pérez, M. A. y Beckage, N. E. 2006. Estrategias co-evolutivas de la interacción entre parasitoides y polidnavirus. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48, 31-43.
- Ruíz-Cancino, E., Rafaelevich-Kasparyan, D., González-Moreno, A., Khalaim, A.I. and Coronado-Blanco, J. M. 2014. Biodiversidad de Ichneumonidae (Hymenoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1): 385–391.
- Runck, C. and Blinn, D. W. 1995. Daily energy ingestion by the predatory *Ranatra montezuma* (Heteroptera) on two prey types: Importance of prey behaviour. *Ecoscience*, 2(3): 280-285.
- Schmidt, O., Theopold, U. and Strand, M. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays*, 23(4), 344-351.
- Sugumaran, M. 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 15(1), 2-9.

- Teets, N. M., Yi, S. X., Lee, R. E. and Denlinger, D. L. 2013. Calcium signaling mediates cold sensing in insect tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22): 9154-9159.
- Tsing-Hai, W., Chia-Hung J., Yi-Kong H., Fu-Nien W., and Chu-Fang W. 2013. Spatial Distributions of Inorganic Elements in Honeybees (*Apis mellifera* L.) and Possible Relationships to Dietary Habits and Surrounding Environmental Pollutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 5009-5015.
- Vinson, S. B. 1990. How parasitoids deal with the immune system of their host: an overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 13(1-2), 3-27.
- Vinson, S. B., Pennachio, F. and Consoli, F.L. 2001. The parasitoid–host endocrine interaction from a nutritional perspective. Pp. 187-205. In: Edwards, J. P., Weaver, R. J. (Eds.), *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. The Cromwell Press, Trowbridge.
- Wang, T. H., Jian, C. H., Hsieh, Y. K., Wang, F. N. and Wang, C. F. 2013. Spatial distributions of inorganic elements in honeybees (*Apis mellifera* L.) and possible relationships to dietary habits and surrounding environmental pollutants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(21), 5009-5015.
- Waters, T. F. 1962. Diurnal periodicity in the drift of stream invertebrates. *Ecol*, 43(2): 316-320.
- Zhou, H., Cadigan, K. M. and Thiele, D. J. 2003. A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48210-48218.