

Cuantificación de enzimas detoxificativas en pulgón amarillo del sorgo (*Melanaphis sacchari*) en Saltillo, México

HERNÁNDEZ-BAUTISTA, Omegar†, ARREDONDO-PÉREZ, Marco Antonio, CERNA-CHAVEZ, Ernesto*, OCHOA-FUENTES, Yisa María y NAVARRO-CAMPOS Fernando Elías

Recibido Enero 25, 2016; Aceptado Marzo 18, 2016

Resumen

México es uno de los principales países productores de sorgo a nivel mundial, recientemente se reportó la presencia de *Melanaphis sacchari* en sus principales estados productores, su control se basa en la aplicación de insecticidas sintéticos, actualmente no existe un listado de insecticidas recomendados ni sus niveles enzimáticos asociados que pudieran presentar riesgo de resistencia, por lo que este estudio tiene como objetivo la determinación de las concentraciones letales medias de insecticidas de diferente grupo toxicológico y la cuantificación de enzimas detoxificativas, para ello se recolectó *M. sacchari* en Saltillo, Coahuila., una vez identificado, se realizaron bioensayos y perfiles enzimáticos. Los resultados muestran que deltametrina es un insecticida eficiente para su control, el cual no hay indicio de que pudiera presentar problemas de resistencia dado a que las enzimas asociadas con la tolerancia a este insecticida son relativamente bajas.

***Melanaphis sacchari*, concentración letal media, Esterasas, Oxidasas**

Abstract

Mexico is one of the major producers of sorghum worldwide, recently the presence of *Melanaphis sacchari* in its main producing states was reported, its control is based on the application of synthetic insecticides, there is currently no list of insecticides recommended or levels enzymatic that could present a risk of resistance, so this study aims at determining the means lethal concentrations of insecticides different toxicological group and quantification of enzymes that have role of metabolic detoxification in insecticides resistance, for that *M. sacchari* was collected in Saltillo, Coahuila., once identified and bioassays and enzymatic profiles were performed. The results show that deltamethrin is an efficient insecticide for control, which no indication that resistance could present problems because the enzymes associated with tolerance to this insecticide are relatively low.

***Melanaphis sacchari*, mean lethal concentration, Esterases, Oxidases**

Citación: HERNÁNDEZ-BAUTISTA, Omegar, ARREDONDO-PÉREZ, Marco Antonio, CERNA-CHAVEZ, Ernesto, OCHOA-FUENTES, Yisa María y NAVARRO-CAMPOS Fernando Elías. Cuantificación de enzimas detoxificativas en pulgón amarillo del sorgo (*Melanaphis sacchari*) en Saltillo, México. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias. 2016, 3-7: 5-12.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: jabaly1@yahoo.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El cultivo de sorgo (*Sorghum* sp.) es uno de los cereales más importantes en el planeta, del cual se alimentan grandes regiones de África, Asia y en los trópicos semiáridos de todo el mundo (Ragae *et al.*, 2006), México ocupa el segundo lugar como mayor país productor de sorgo con 6, 308, 146 ton (FAOSTAT, 2013), donde ha sido un factor importante en el desarrollo de la avicultura y porcicultura, ya que es un componente fundamental de los alimentos balanceados de uso pecuario, utilizado ampliamente para la alimentación de aves, cerdos, bovinos y equinos, (SIAP, 2003), su bajo consumo en humanos es debido a que se ha creado un paradigma de que el sorgo contiene un pobre valor nutricional, siendo un alimento altamente valorado que promueve potencialmente la salud, las dietas con base de granos de sorgo ayudan en la prevención de enfermedades crónicas como la diabetes, la obesidad, y enfermedades del corazón (Stefoska *et al.*, 2015), por su alto contenido de antioxidantes, Kang *et al.* (2016) reportan que es una fuente rica de diversos compuestos fenólicos como flavonoides (lavanonas, flavonoles y flavanonol, y derivados de flavan-3-ol.), por lo que es una alternativa para la producción de etanol (Barcelos *et al.*, 2016).

El rendimiento promedio en México es de 4.17 ton/ha, cuyo principal estado productor es Tamaulipas con 3 360 845.78 toneladas (SIAP, 2014), sin embargo, la presencia de áfidos reduce los rendimientos, están reportadas como unas de las plagas más representativas en numerosos cultivos, ya que causan daño directo por la alimentación y daño directo como transmisores de virus permitiendo la propagación de enfermedades. (Blackman y Eastop, 2000).

A finales de 2013 se detectó la presencia de *M. sacchari*, en Tamaulipas, México., provocando daños severos cuyas pérdidas se estimaron entre el 30 y 100 % (Maya y Rodríguez, 2014), si bien se han reportado la presencia de enemigos naturales como:

Harmonia axyridis, *Hyppodamia convergens*, *Coleomegilla maculata*, *Olla v-nigrum*, *Cycloneda sanguinea* y *Scymnus* sp. (INIFAP-CIRNE, 2015), pero debido a la reproducción acelerada de estos áfidos, se recomienda la aplicación de insecticidas sintéticos convencionales como medida de control sobre todo en predios donde el umbral rebase los 50 pulgones por planta, con la finalidad de reducir al máximo las poblaciones del Pulgón Amarillo del Sorgo y frenar su diseminación a otros predios (SAGARPA-CESV, 2016), si bien no existe un listado de insecticidas recomendados, por su parte INIFAP (2015), determinó cinco insecticidas con una efectividad superior al 90 % para el control de *M. sacchari*, los cuales fueron: Imidacloprid, Sulfoaxlor, Spirotetramat, Thiametoxam y Metamidofos, los cuales reducen un 90 % el daño provocado por el pulgón amarillo, estos insecticidas aplicados de manera inteligente son una alternativa para el manejo, debido a que las recomendaciones incluyen realizar una nueva aplicación cada 20 días, es innegable creer que se desarrollen mecanismos de resistencia hacia los productos químicos, por lo que esta investigación tiene como objetivo determinar las concentraciones letales medias, determinar y cuantificar sus niveles enzimáticos detoxificativos que inducen tolerancia a insecticidas sintéticos.

Materiales y metodología

Localización.

Para la obtención de las poblaciones, se realizaron muestreos a partir de septiembre del 2015 en cultivos experimentales a campo abierto de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), con ayuda de un GPS, se determinaron las coordenadas: N: 25° 21' 26.45'', O: 101° 02' 25.50'' a una altitud de 1736 msnm, una vez detectada la presencia de *M. sacchari* se procedió a la recolecta tomando hojas enteras con la presencia de áfidos y sus respectivos daños característicos.

Se trasladaron al laboratorio de taxonomía del Departamento de Parasitología de la UAAAN, para su identificación. Una vez identificadas, nuevamente se procedió a la recolecta de material biológico, se tomaron diferentes muestras de las parcelas y se trasladaron al laboratorio de Toxicología de Insectos del mismo departamento.

Bioensayos.

Una vez teniendo la cantidad suficiente de insectos se realizaron bioensayos mediante la técnica de inmersión de hoja para el psílido del peral (*Psylla* spp) con ligeras modificaciones (IRAC, 2005), para ello se prepararon diferentes concentraciones, se utilizó agua destilada y el producto bionex® como dispersante, en una proporción 1mL: 1L de agua. El intervalo de concentraciones utilizadas fue de 10 a 2500 ppm y un testigo sin tratar para cada insecticida; se recortaron 5 cuadrados de 1 cm² cada uno, con diferente número de pulgones entre el tercer y cuarto instar, cada cuadrado considerado como una unidad experimental. Las hojas tratadas se dejaron secar en papel absorbente, y posteriormente se colocaron cajas Petri de vidrio con papel húmedo.

Los insecticidas empleados fueron: Imidacloprid, Endosulfan y Deltmetrina.

Las lecturas de mortalidad se realizaron a las 24 h con ayuda de un microscopio estereoscópico y un pincel.

Se consideró pulgón muerto aquel que presentaba los apéndices pegados al cuerpo, deshidratado y cero reacción al estímulo del pincel.

El porcentaje de mortalidad se calculó contabilizando la cantidad de individuos muertos/la cantidad total de individuos. El máximo nivel de mortalidad aceptable para el testigo absoluto fue 10% y se corrigió mediante la fórmula de Abbott (1925) cuando el testigo presentaba mortalidad.

Por último, a los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis Probit, empleando el método de máxima verosimilitud (Finney, 1971), utilizando el programa estadístico R 3. 1. Para la determinación de sus valores de CL₅₀ y sus límites fiduciales al 95 %.

Niveles enzimáticos.

Se empleó la metodología descrita por Brogdon (1984), utilizando albúmina sérica bovina como proteína de referencia, se colocaron tres insectos de cada especie en tubos eppendorf, se agregaron 100 µL de buffer KPO₄ (BFP) a 0.05 M y 7.2 pH, se trituraron y se aforó a 1 mL, posteriormente se realizaron diferentes diluciones (1, 5, 10, 15, 20 y 30 pulgones de cuarto instar) para su evaluación, en cada cavidad de la microplaca de 96 pozos se colocaron 20 µL de homogenato (HM), y se agregaron 80 µL de BFP y 200 µL de colorante diluido, esto realizado por triplicado para cada repetición, las lecturas de absorbancia se tomaron utilizando un filtro de 630 nm y se calcularon los valores de µg mL⁻¹ de proteína comprendidos en el rango de 80 a 140 µg/mL de proteína.

Una vez calculada la cantidad de insectos a emplear, se determinaron los niveles de α -esterasas (α EST), β -esterasas (β EST), oxidasas (Ox), Acetilcolinesterasas (ACE) y Glutación S-transferasas (GST) utilizando las metodologías descritas por Brogdon, (1988), Brogdon y Barber (1990) y Brogdon *et al.* (1997) empleando los siguientes reactivos:

α -naftil acetato (α NAF), β -naftil acetato (β -NAF), O-Dinanisidina (OD), 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride (TMBZ), H₂O₂ al 3% (PO), glutatión reducido (GR), 1-cloro-2,4'-dinitrobenzenceno (cDNB), yoduro de acetilcolina (YAC), ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB).

Para la determinaron los niveles de α y β -esterasas, se agregaron 100 μ L del HM y 100 μ L de α y β -NAF en cada pozo de la microplaca, se dejó incubar por 10 min, se adicionó 100 μ L de OD, se dejaron incubar durante 2 min y se leyeron con un filtro de 540 nm; Para Ox, se colocaron 100 μ L del HM, 200 μ L de TMBZ, y 25 μ L de PO, se dejó incubar por 5 min y se leyó usando un filtro de 620 nm; Para GST, se colocó 100 μ L del HM, adicionando 100 μ L de GR y 100 μ L de cDNB, se leyó a tiempo cero (T₀), se volvió a leer a los 5 min (T₅) utilizando el filtro de 340 nm, se tomaron las diferencias de ambos tiempos para el análisis de resultados.

Por último, para ACE, se colocaron 100 μ L de HM, y 100 μ L de YAC al 3.0 mM se agregó 100 μ L de DTNB, se tomó la primera lectura (T₀), se volvió a correr después de 10 min (T₁₀), utilizando el filtro de 414 nm. Una vez consignados los valores de absorbancias de cada enzima, se procedió a realizar un análisis de varianza y se compararon las medias mediante Tukey ($\alpha=0.05$) para comparar el contenido de cada enzima

Resultados y discusión

El sorgo presenta un contenido de almidón alrededor de un 67.5 %, arriba de un 12% de proteína, 1.87 % de minerales y un 3.32 % de grasa totales (Ragae *et al.*, 2006), por lo que diferentes insectos plagas atacan al sorgo para obtener dicha energía, los insecticidas sintéticos son una herramienta eficiente para el manejo de plagas, sin embargo, la resistencia a insecticidas es uno de los mayores obstáculos para el control de plagas en la agricultura (Criniti *et al.*, 2008), los resultados de nuestra investigación registran los valores de las concentraciones letales medias para cada insecticida (Tabla 1) fueron: 914.261, 79.128 y 59.929 para Imidacloprid, Endosulfan y Deltametrina respectivamente. Deltametrina requiere la concentración más baja para matar el 50 % de la población, seguido de Endosulfan e Imidacloprid, este último es el que requiere mayor concentración para tener una eficiencia del 50 % que van de 602.869 a 1716.06 ppm. En estudios similares Anjum y Wright (2016) en *Myzus persicae* reporta que los piretroides son significativamente más tóxicos que los insecticidas carbámicos y que los pertenecientes al grupo de las espinosinas, además los piretroides, lambdacialotrina específicamente, puede incrementar significativamente la mortalidad a las 96 horas de evaluación.

Producto	CL ₅₀	LFI	LFS	CL ₉₅	CL ₉₅	Intercepto	Pendiente	p-valor
Imidacloprid	939.07	602.869	1716.06	41.585	21205.8	-3.6119	1.2115	<0.001
Endosulfan	79.128	1.631	281.759	2.292	2751.87	2.030051	1.069	0.025
Deltametrina	59.929	13.643	135.150	0.005	606169.3	-0.730	0.41	0.004

Tabla 1 Concentraciones letales medias y limites fiduciales de los insecticidas evaluados

CL50: concentración letal media en ppm, LFI: límite fiducial inferior en ppm, LFS: límite fiducial superior en ppm. Intercepto y pendiente son parámetros de regresión probit y p-valor es la significancia de la determinación de la pendiente.

Respecto a los niveles enzimáticos (Tabla 2), las β -Esterasas son el mecanismo detoxificativo con mayor producción dentro de nuestra población de *M. sacchari*, Criniti *et al.*, (2008) reportan diferentes poblaciones de *M. persicae* con una elevada producción de Esterasas las cuales secuestran y detoxifican insecticidas con grupos estéricos.

Tanto α -Esterasas y β -Esterasas fueron la enzimas de mayor producción, diferentes estudios reportan la expresión del gen asociado a la sobreproducción de carboxilesterasas asociadas a la resistencia de organofosforados en *Aphis gossypii* (Cao *et al.*, 2008), por lo que es necesario monitorear la resistencia en cada ciclo de cultivo, ya que puede incrementarse o bien disminuir dado a que los genes de resistencia a insecticidas en áfidos, tiene efectos pleiotrópicos negativos, los individuos resistentes presentan un mala adaptación en la selección por un nivel trófico superior, mientras que los individuos de tipo silvestre presentan menor vulnerabilidad al ataque de un parasitoide (Foster *et al.*, 2007), este grupo toxicológico no fue evaluado pero limitamos el uso de insecticidas ya que los perfiles enzimáticos fueron muy elevados respecto a las demás enzimas.

Por otra parte las GST, fueron las enzimas de menor contenido en *M. sacchari*, este mecanismo no es significativo en áfidos, ya que se han reportado cambios en la actividad de enzimas detoxificativas, asociadas en el metabolismo de glutatión en el áfido de la avena *Rhopalosiphum padi*, los migrantes alados de hospederos alternos, cuando comenzaron alimentarse de los cereales la actividad de GST aumentó, mientras que Glutation Reductasa disminuyó (Laskowska *et al.*, 1999).

Enzima	n	Absorbancia \pm SD*
α -Esterasas	20	0.892 \pm 0.105 ^B
β -Esterasas	20	1.403 \pm 0.201 ^A
Acetilcolinesterasas	20	0.137 \pm 0.035 ^D
Glutathion S-Transferasas	20	0.003 \pm 0.003 ^E
Oxidasa	20	0.302 \pm 0.051 ^C

Tabla 2 Niveles enzimáticos de *M. sacchari*. n:número de repeticiones, SD: desviación estándar. *: absorbancias con la misma letra no son estadísticamente significativas

Por su parte Wondji *et al.*, (2009) señalan que es el mecanismo detoxificativo más significativo en la resistencia a piretroides dado por el citocromo P450, asociadas a las oxidasa de función múltiple, a su vez en insectos también se han reportado a Glutathion S-Transferasas responsables de la resistencia a deltametrina (Lumjuan *et al.*, 2011), sin embargo, es este estudio estas enzimas presentaron niveles enzimáticos bajos, siendo las GST las de menor producción respecto al resto de las enzimas, con una media de 0.302 y 0.003 para Ox y GST respectivamente, por lo que los insecticidas piretroides pueden ser una alternativa eficiente para infestaciones altas del pulgón amarillo *M. sacchari* en donde no se tenga problemas con tolerancia hacia este grupo de insecticidas.

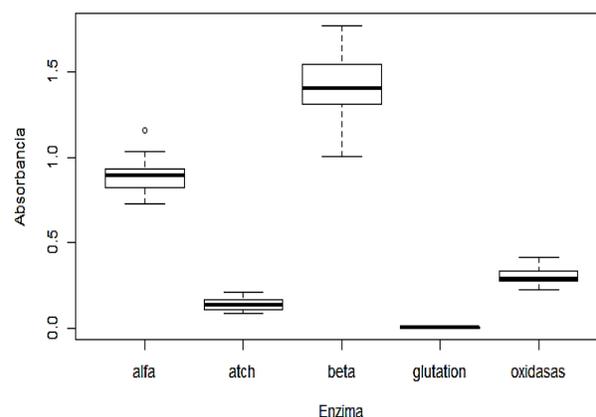


Figura 1 Distribución de los niveles enzimáticos de *M. sacchari*

Por otra parte las aplicaciones deben ser alternadas con diferente grupo toxicológico, ya que las cepas con acetilcolinesterasa modificada no es un factor clave en los niveles enzimáticos, sin embargo, por la presencia de adultos alados previamente tratados con insecticidas, pueden arribar al cultivo, ciertos especímenes pudieran tener genes de AChE asociadas a la resistencia a diversos grupos toxicológicos en el pulgón del algodón *Aphis gossypii* (Li y Han, 2004), ya que los mecanismos de resistencia mediados por el gen *Kdr* y acetilcolinesterasa modificada, resultan en un desequilibrio en el ensamble, afectando la respuesta en los canales de sodio a piretroides (Criniti *et al.*, 2008), incluso una sustitución de aminoácidos, también permite la resistencia a carbamatos en el áfido de la papa (Nabeshima *et al.*, 2003).

Conclusiones

La enzima con mayor sobreproducción como mecanismo detoxificativo fueron las β -esterasas seguidas de las α -Esterasas, por lo que no se recomienda el uso de insecticidas organofosforados; los piretroides como deltametrina, son una herramienta eficiente en el manejo de *Melanaphis sacchari* al presentar la concentración letal media más baja y por la deficiente producción de Oxidasas y glutatión S-Transferasas, las están como principal mecanismo detoxificativo en la tolerancia de áfidos a los piretroides, también se recomienda limitar el uso de estos productos ya que la producción de Acetilcolinesterasas es pequeña pero pueden arribar individuos tratados y la tolerancia puede a los piretroides puede crecer significativamente.

Referencias

Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.

Anjum, F. y Wright, D. (2016). Relative toxicity of insecticides to the crucifer pests *Plutella xylostella* and *Myzus persicae* and their natural enemies. *Crop Protection* 88:131-136

Blackman, R. y Eastop, F. 2000. *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*, Wiley, second edition. 476 p.

Barcelos, C., Maeda, R., Santa Anna, L. y Pereira, N. (2016). Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 94: 46-56

Cao, C.W., Zhang, J, Gao, X.W., Liang, P. y Guo, H.L. (2008). Overexpression of carboxylesterase gene associated with organophosphorous insecticide resistance in cotton aphids, *Aphis gossypii* (Glover). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90:175–180

Criniti, A., Mazzoni, E., Cassanelli, S., Cravedi, P., Tondelli, A., Bizzaro, D. y Manicardi, G. 2008. Biochemical and molecular diagnosis of insecticide resistance conferred by esterase, MACE, *kdr* and super-*kdr* based mechanisms in Italian strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90: 168–174

FAOSTAT. (2013). food and agriculture organization of the united nations. statistics división. Production of top 5 producers in 2013. Consultado en línea el 08 de octubre de 2016. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. Cambridge at the Univ. Press. 3rd Ed. 120 p.

Foster, S., Tomiczek, M., Thompson, R., Denholm, I., Poppy, G., Kraaijeveld, A. y Powell, W. 2007. Behavioural side-effects of insecticide resistance in aphids increase their vulnerability to parasitoid attack. *Animal behaviour*, 74: 621-632.

INIFAP. (2015). Control químico del pulgón amarillo del sorgo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Programa de Investigación: Sanidad Forestal y Agrícola. Informe de proyecto. Proyecto No. 1025432562. 2 p.

INIFAP-CIRNE. (2015). El pulgón amarillo, una nueva plaga del sorgo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias- Centro de Investigación Regional del Noreste. Boletín electrónico, 1(16). 3 p.

IRAC. (2005). Susceptibility Test Methods Series: Method 2. *Psylla* spp. (Insecticide Resistance Action Committee) In: www.iraonline.org/documents/method2.pdf

Kang, J., Price, W., Ashton, J., Tapsell, L., y Johnson, S. (2016). Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSⁿ. *Food Chemistry* 211:215–226.

Laskowska, I., Leszczynski, B., y Markowski, J. 1999. Activity of glutathione transferase and reductase in tissues of bird cherry-oat aphid during its host-plant alternation. *Exp Toxic Pathol.* 51: 357-359.

Li, F. y Han, Z. 2004. Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:397–405

Maya, V. y Rodríguez, L. (2014). Pulgón amarillo: una nueva plaga del sorgo en Tamaulipas. Centro de Investigación Regional Noreste, campo experimental Río Bravo. Desplegable para productores. INIFAP/CIRNE: A-532.

Nabeshima, T., Kozaki, T. Tomita, T. y Kono, Y. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307:15–22

Ragae, S., Abdel-Aal, E.-S. M., Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, 98 (1) (2006), pp. 32–38

SAGARPA-CESV. (2016). Presencia del Pulgón Amarillo en el cultivo del Sorgo en el Valle de Mexicali: SAGARPA-CESV. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California, Boletín de prensa. Boletín 189-2016. 2 p.

SIAP. (2003). Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Situación actual y perspectivas de la producción de sorgo en México 1992-2004. Boletín informativo. 93 p. Consultada en línea el 08 de octubre de 2016. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/97935/sorgo92-04.pdf>

SIAP. (2014). Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consultada en línea el 08 de octubre de 2016. http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap/icultivo/index.jsp

Stefoska-Needham, A., Beck, E.J., Johnson, S.K., y Tapsell, L. (2015). Sorghum: an underutilized cereal whole grain with the potential to assist in the prevention of chronic disease. *Food Reviews International*, 31 (4) (2015), pp. 401–437

Wondji, C.S., Irving, H., Morgan, J., Lobo, N.F., Collins, F.H. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res.* 19:452-459.