

**MECANISMOS BIOQUIMICOS DE RESISTENCIA Y VARIACIÓN
INTRAESPECÍFICA DE *Tetranychus urticae* KOCH EN ZONAS
PRODUCTORAS DE FRESA DEL BAJIO MEXICANO**

ERNESTO CERNA CHÁVEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Octubre de 2006



18638

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Prof. Octavio Cerna Rodríguez

Sra. Guadalupe Chávez Ramírez

Que me han dado la vida y todo el apoyo para lograr la culminación de mis estudios.

A MIS HERMANOS:

Lic. Guadalupe Cerna Chávez

Francisco Emmanuel Cerna Chávez

Que con su cariño, me alentaron toda la carrera a dar lo mejor de mí.

A MI ESPOSA:

Yisa Maria Ochoa Fuentes

Gracias Yisa, por haberme enseñado lo que es el amor a través de comprensión y respeto.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

Que me brindaron su apoyo moral y grata compañía, en los momentos que me encontraba lejos de mi hogar.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Jerónimo Landeros Flores**, por su apreciable amistad, por enseñarme el quehacer científico y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez**, Por su amistad y poder apreciar lo valioso de algunas disciplinas que se consideran inaplicables, y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por su amable disposición para participar asesorando la presente investigación.

Al **Dra. Adriana E. Flores Suárez**, por la innovación en sus investigaciones y proporcionar la semilla para poder plantear la presente investigación.

Al **Dr. Mamad H. Badii**, gracias por su ayuda, ya que pude realizar mis estudios de postgrado en la UAAAN, así por su gran disposición y por su valiosa asesoría de este trabajo.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales**, gracias por su apreciable amistad.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por su apoyo durante mi estancia en el postgrado.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por cobijarme en su seno durante la realización de mis estudios de postgrado.

Al **Personal del Departamento de Parasitología**, por brindar el apoyo necesario para concluir con el grado académico.

COMPENDIO

**MECANISMOS BIOQUIMICOS DE RESISTENCIA Y VARIACIÓN
INTRAESPECÍFICA DE *Tetranychus urticae* KOCH EN ZONAS
PRODUCTORAS DE FRESA DEL BAJIO MEXICANO**

POR

ERNESTO CERNA CHÁVEZ

DOCTORADO

PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 2006

Dr. Jerónimo Landeros Flores - Asesor-

Palabras clave: Arañita de dos manchas, esterases, oxidasas, glutathion s-transferasas, acetilcolinesterasa, pruebas bioquímicas.

El presente trabajo de investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. En los laboratorios del

departamento Parasitología agrícola, durante el periodo de Agosto del año 2003 a Diciembre del año 2005.

Teniendo como objetivo determinar a través de varios métodos de diagnóstico la susceptibilidad y los mecanismos bioquímicos de resistencia; así como la variación intraespecífica de *Tetranychus urticae*, proveniente de campos de fresas del bajo mexicano.

Se colectaron ácaros de dos manchas en campos productores de fresa del estado de Guanajuato, México. El material colectado se trasladó al laboratorio de acarología de la universidad, para determinar el nivel de susceptibilidad, los mecanismos enzimáticos de resistencia presentes y la variación intraespecífica. Utilizando una línea susceptible de *T. urticae* como referencia (Narro susceptible, L-NS).

El primer método utilizado para determinar la susceptibilidad y los mecanismos presentes fueron los Bioensayos, por medio de la técnica de inmersión en hoja, evaluando las poblaciones de *T. urticae* contra los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled. Así como la mezcla de estos con los sinérgicos butóxido de piperonilo (BP), SSS-tributilfosforotriato (DEF) y el dietil maleato (DEM).

El segundo método utilizado fue a base de una serie de pruebas bioquímicas (ensayos en microplacas), Los métodos en microplacas se tuvieron que adaptar a partir de los métodos ya descritos para mosquitos (Brogdon *et al.*, 1983, 1984, 1988, 1990 y

1997), para poder determinar los niveles de α -esterasas, β -esterasas, oxidasas, glutathion s-transferasas, acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible en *T. urticae*.

Por ultimo, para determinar el grado de variabilidad intraespecífica de *T. urticae* en relación a la resistencia a plaguicidas, se utilizó la metodología para PCR-RAPD's descrita por Williams *et al.* (1990), utilizando el kit B de Biomol y el oligonucleotido (5'-GTGCTCGGCG-3') reportado por Udalov *et al.* (2005) para discriminar entre líneas susceptibles y resistentes de *T. urticae*.

Los resultados de los bioensayos muestran una proporción de resistencia entre la línea de campo y la susceptible, con valores de 57.4, 8.0, 11.2, 11.3 y 9.0 veces para los productos abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled respectivamente. La mezcla del sinergista butóxido de piperonilo (BP) más los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled incrementan su toxicidad en 7.86, 3.69, 10.78, 2.45 y 4.79 veces respectivamente. Para el sinergista SSS-tributilfosforotritioato (DEF) el incremento fue 2.15, 6.65, 5.54, 1.73 y 2.65 veces; y para el dietil maleato (DEM) fue 3.17, 2.44, 3.90, 1.95 y 6.34 veces para los mismos acaricidas. Los valores más altos de sinergismo se obtuvieron con el butóxido de piperonilo, lo cual indica que la mayor causa de resistencia fisiológica para la línea de campo de *T. urticae* es por enzimas oxidasas.

De este modo, los resultados obtenidos al utilizar las pruebas en microplacas encontramos que, para las enzimas α y β -esterasas un 40 por ciento de las muestras superaron el umbral de resistencia. Para las glutathion s-transferasas y oxidasas un 17 y

77 por ciento respectivamente. Por último para las enzimas acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible fue de un 10 y un 6 por ciento de las muestras que superaron el umbral. Al realizar una comparación entre la cantidad de enzima presente en base a la cantidad promedio de absorbancia encontramos que el principal factor de resistencia para la línea de campo son las enzimas oxidasas (2.0251), seguida por las α y β -esterasas (1.1784 y 1.3801 respectivamente).

En relación a la variabilidad intraespecífica de *T. urticae*, podemos mencionar que los oligonucleótidos del kit B, no presentaron amplificaciones. Por tal motivo, se corrió la prueba con un oligonucleotido reportado por Udalov *et al.*, 2005. Donde, tres de las 14 líneas utilizadas amplificaron (Líneas 3, 6 y 9), de las cuales dos líneas fueron colectadas en el cultivo de fresa y la otra de maíz, de los estados de Michoacán y Guanajuato.

Por lo que podemos mencionar que la línea de campo de *Tetranychus urticae* colectada en el cultivo de la fresa del estado de Guanajuato, muestra resistencia en la que intervienen principalmente las enzimas oxidasas.

ABSTRACT

**BIOCHEMICAL MECHANISMS OF RESISTANCE AND INTRASPECIFIC
VARIATION OF *Tetranychus urticae* KOCH, IN STRAWBERRY
PRODUCTION REGIONS OF “EL BAJIO”, MEXICO**

BY

ERNESTO CERNA CHÁVEZ

DOCTORATE

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 2006

Dr. Jerónimo Landeros Flores - Advisor-

**Key words: Two spotted spider mites, esterases, oxidases, glutathione s-transferases,
acetyl-cholinesterase, biochemical essays.**

This research work was carried out at “Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro” in Saltillo, State of Coahuila, Mexico, in the Agricultural Parasitology Department, from August 2003 to December 2005.

The purpose of this work was to determine by means of several diagnosis methods, the susceptibility and the biochemical resistance mechanisms; as well as the intraspecific variability of *Tetranychus urticae*, obtained from strawberry fields of “El Bajío” region, Mexico.

Two-spotted spider mites were collected from strawberry fields in Guanajuato , Mexico. This material was transferred to the acarology university laboratory, where several trials were run in order to determine the susceptibility level, the presence of resistance enzymatic mechanisms, and the intraspecific variability using a susceptible line of *T. urticae* as benchmark (Narro susceptible, L-NS).

Leaf immersion bioassays were the first test methods used to determine susceptibility and the presence of enzymatic mechanisms. *T. urticae* populations were studied using the following acaricides: abamectine, biphentrine, dicophol, phenbutatin oxide and naled; as well as a blend of these compounds with the synergistic compounds piperonyl butoxide (BP, SSS-tri-butyl phosphorous tri-thioate (DEF) and malate diethyl (DEM).

A second test method consisted in biochemical tests (microplate essays), adapted from the mosquitoes methods previously described by Brogdon *et al.* (1983, 1984, 1988, 1990 and 1997), to be able to determine the levels of α -esterases, β -esterases, oxidases, glutation s-transferases, acetylcholinesterase and insensible acetylcholinesterase in *T. urticae*.

Lastly, in order to determine the degree of intraspecific variability of *T. urticae* regarding pesticides resistance, the PCR-RAPD's technique described by Williams *et al.* (1990) was used; using kit B of Biomol and the oligonucleotide (5'-GTGCTCGGCG-3') reported by Udalov (2004) to discriminate between susceptible and resistant lines of *T. urticae*.

The bioassays showed that the proportion of resistance between the field line and the susceptible line resulted in values of: 57.4, 8.0, 11.2, 11.3 and 9.0 times for abamectine, biphentrine, dicophol, phenbutatin oxide and naled, respectively. On the other hand, the synergistic blend of piperonile butoxide (BP) plus abamectine, biphentrine, dicophol, phenbutatin oxide and naled, increased their toxicity by: 7.86, 3.69, 10.78, 2.45 and 4.79 times respectively. In the case of SSS-tributyl-phosphorus tri-thioato synergistic compound (DEF), the increase was: 2.15, 6.65, 5.54, 1.73 and 2.65 times; while for malate diethyl (DEM) the results were: 3.17, 2.44, 3.90, 1.95 and 6.34 times for the same acaricides. Thereby, the highest levels of synergism were obtained with piperonile butoxide, indicating that the greatest source of physiological resistance for the field line of *T. urticae* comes from oxidases.

The results obtained from the microplate essays revealed that in the case of α and β -esterases, 40 percent of the samples exceeded the resistance threshold; whereas for glutation s-transferases and oxidases the values were 17 and 77 percent respectively. Finally, in the case of acetylcholinesterase and insensible acetylcholinesterase, 10 and 6 percent of the samples exceeded the threshold. When carrying out a comparison between the amount of enzymes present, according to the average absorbance, we found that the

main resistance factor for the field line came from oxidases (2.0251), followed by α y β -esterases (1.1784 and 1.3801 respectively).

With regards to the intraspecific variability of *T. urticae*; B kit oligonucleotides did not result in any amplification. Therefore, we ran another test using the oligonucleotide reported by Udalov, 2004. This test resulted in three amplifications out of the 14 lines (Lines 3, 6 and 9). Two of these three lines were collected from strawberry and corn crops respectively, in the states of Michoacan and Guanajuato, Mexico..

We can thereby conclude that *Tetranychus urticae* field line, collected from the strawberry field in Guanajuato, showed positive results with the different methods used in resistance detection. With regards to the enzymatic mechanisms, oxidases represented the main resistance factor.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CONTENIDO	xiii
INDICE DE CUADROS	xv
INDICE DE FIGURAS	xxi
INTRODUCCION	1
Objetivos	3
REVISION DE LITERATURA	4
Generalidades de <i>Tetranychus urticae</i>	4
Importancia económica	4
Distribución	5
Ubicación taxonómica	6
Daños	6
Morfología	7
Biología y hábitos	11
Mecanismos de dispersión	14
Control	15
Cultural	15
Legal	17
Biológico	17
Químico	20
Resistencia a plaguicidas	23
Tipos de resistencia	24
Por comportamiento	24
Morfológica	25
Fisiológica	25

Resistencia en <i>Tetranychus urticae</i>	34
Reportada por producto	36
Reportada por país	39
Reportada por año	40
Técnicas de monitoreo de la resistencia	41
Bioensayo o concentración-mortalidad	42
Concentración-Diagnostico	46
Pruebas bioquímicas	47
Pruebas moleculares	49
ARTICULO CIENTIFICO I	
NIVELES DE RESISTENCIA EN POBLACIONES DE <i>Tetranychus urticae</i> KOCH EN EL CULTIVO DE LA FRESA	54
ARTICULO CIENTIFICO II	
DETECCIÓN DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA POR PRODUCTOS SINERGISTAS EN UNA LINEA DE CAMPO DE <i>Tetranychus urticae</i> KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)	69
ARTICULO CIENTÍFICO III	
COMPARACION DE METODOS DE CUANTIFICACION DE PROTEINA EN DIFERENTES LINEAS DE <i>Tetranychus urticae</i> KOCH	96
ARTICULO CIENTÍFICO IV	
ADAPTACION DE LOS METODOS EN MICROPLACAS PARA LA IDENTIFICACION DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN <i>Tetranychus</i> <i>urticae</i> KOCH	121
ARTICULO CIENTÍFICO V	
POLIMORFISMOS AMPLIFICADOS AL AZAR COMO MARCADORES DE ADN EN LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA DEL ACARO DE DOS MANCHAS <i>Tetranychus urticae</i> KOCH	150
CONCLUSIONES GENERALES	169
LITERATURA CITADA	171
APÉNDICE A	183
APÉNDICE B	193
APÉNDICE C	202

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pagina
2.1	Productos acaricidas registrados en CICOPLAFEST-2005 utilizados para el control de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 22
2.2	Insecticidas reportados con problemas de resistencia contra el acaro de dos manchas <i>Tetranychus urticae</i> Koch 37
2.3	Países con reportes de resistencia contra el acaro de dos manchas <i>Tetranychus urticae</i> Koch 39
2.4	Años con reportes de resistencia contra el acaro de dos manchas <i>Tetranychus urticae</i> Koch 40
A1	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch. de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 24 h de exposición 184
A2	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 48 h de exposición 184
A3	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch. de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina a 24 h de exposición 185
A4	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol a 24 h de exposición 185
A5	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch. de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de naled a 24 h de exposición 186

Cuadro	Página
A6 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin a 24 h de exposición	186
A7 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 24 h de exposición	187
A8 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 48 h de exposición	187
A9 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina a 24 h de exposición	188
A10 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol a 24 h de exposición	188
A11 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled a 24 h de exposición	189
A12 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin a 24 h de exposición	189
A13 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 24 h de exposición	190
A14 Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 48 h de exposición	190

Cuadro**Página**

A15	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina a 24 h de exposición	191
A16	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol a 24 h de exposición	191
A17	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de naled a 24 h de exposición	192
A18	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin a 24 h de exposición	192
B1	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición	194
B2	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición	194
B3	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición	195
B4	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición	195
B5	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición	196

B6	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina + dietil maleato a 24 h de exposición	196
B7	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina + dietil maleato a 24 h de exposición	197
B8	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol + dietil maleato a 24 h de exposición	197
B9	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled + dietil maleato a 24 h de exposición	198
B10	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin + dietil maleato a 24 h de exposición	198
B11	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición	199
B12	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición	199
B13	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición	200
B14	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición	200
B15	Mortalidad de hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición.	201

Cuadro		Página
C1	Valores promedio de absorbancia para el método de Bradford con alto contenido de proteína en <i>Tetranychus urticae</i> Koch	205
C2	Valores promedio de absorbancia para el método de Bradford con bajo contenido de proteína en <i>Tetranychus urticae</i> Koch	205
C3	Valores promedio de absorbancia para el método de Brogdon y Dickinson para cuantificación de proteína en <i>Tetranychus urticae</i> Koch	206
C4	Valores promedio de absorbancia para el método de Brogdon para cuantificación de proteína en <i>Tetranychus urticae</i> Koch	206
C5	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato alfa naftil acetato en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	207
C6	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato beta naftil acetato en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	207
C7	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato CDNB en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	208
C8	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato glutation reducido en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	208
C9	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato TMBZ en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	209
C10	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato DTNB en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	209
C11	Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato ATCH en la especie <i>Tetranychus urticae</i> Koch	210

Cuadro	Página
C12	Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa para la línea susceptible de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 211
C13	Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa insensible para la línea susceptible de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 213
C14	Valores promedio de absorbancia de alfa y beta esterasas para la línea susceptible de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 215
C15	Valores promedio de absorbancia de glutathion s-transferasas para la línea susceptible de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 217
C16	Valores promedio de absorbancia de oxidasas para la línea susceptible de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 219
C17	Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa para la línea de campo de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 220
C18	Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa insensible para la línea de campo de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 222
C19	Valores promedio de absorbancia de alfa y beta esterasas para la línea de campo de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 224
C20	Valores promedio de absorbancia de glutathion s-transferasa para la línea de campo de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 226
C21	Valores promedio de absorbancia de oxidasas para la línea de campo de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 228

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
2.1	Hembra ovipositando (A) y huevecillos (B) de <i>Tetranychus urticae</i> 8
2.2	Larva de <i>Tetranychus urticae</i> 9
2.3	Ninfa de <i>Tetranychus urticae</i> 10
2.4	Hembra (A) y macho (B) de <i>Tetranychus urticae</i> 10
2.5	Ciclo de vida de <i>Tetranychus urticae</i> Koch 11
C1	Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Bradford con alto contenido de proteína para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO ₄) 203
C2	Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Bradford con bajo contenido de proteína para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO ₄) 203
C3	Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Brogdon y Dickinson para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO ₄) 204
C4	Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Brogdon para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO ₄) 204

INTRODUCCIÓN

La araña de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es la plaga principal de una gran variedad de plantas y esta catalogada como una de las especies que mas daños ocasionan a la agricultura en el mundo (Jeppson *et al.*, 1975). Su alto potencial reproductivo le permite incrementar su población rápidamente, de tal manera que en un corto tiempo puede rebasar el umbral económico si no se toman las medidas pertinentes para su control (Gould, 1987); Una de las herramientas más utilizadas es el control químico, sin embargo, el mal uso de los plaguicidas ha producido resistencia (Georghiou y Saito, 1983).

La resistencia en esta especie es un problema muy serio en numerosos sistemas de producción, se ha presentado prácticamente a todos los acaricidas en campos agrícolas donde se han utilizado (Georghiou y Lagunes, 1991). El manejo deficiente de acaricidas contra *T. urticae* data de mas de 70 años, iniciando con los primeros registros en la década de los 30's (Georghiou y Saito, 1983) donde reportan problemas de control utilizando selenosulfito potasico. Steiner *et al.* (1944) y Gunthart (1945) reportan que la actividad del DDT, incrementa las poblaciones de ácaros. Posterior a la introducción de los acaricidas organofosforados, Lienk *et al.* (1952) reportan problemas en el control de *T. urticae*, utilizando altas concentraciones de paration metilico. En respuesta a estos problemas se creó la necesidad de contar con acaricidas de larga vida (Haines, 1958), uno de ellos el dicofol, presentándose como un importante acaricida que se ha utilizado

por los últimos 25 años y siendo un candidato positivo para la creación de resistencia (Grafton-Cardwell *et al.*, 1987). Desde su introducción en 1956 los acaricidas organoestanosos, han sido utilizados con regularidad, por lo que también a estos productos se han registrado casos de resistencia, Croft *et al.* (1984) y Hoyt *et al.* (1985), registraron los primeros reportes de resistencia a cihexatin. Finalmente algunas poblaciones de *T. urticae* muestran resistencia a acaricidas más recientes como es el caso de las abamectinas (Campos *et al.*, 1995). Considerando entonces, que desde la década de los 50's y hasta finales de los 80's, la rotación de acaricidas ha sido mínima y basada casi totalmente en el uso de compuestos organoclorados y fosforados; y que las sustancias de reciente uso ya presentan en algunas zonas problemas de resistencia.

En México, los primeros reportes de resistencia fueron hacia productos clorados como el keltane y clorobencilato (Velasco y Pacheco, 1968), Así mismo Cotero y Sánchez (1990) probando una serie de acaricidas en el cultivo del clavel en la zona de Villa Guerrero contra *T. urticae*, reportan para los productos clorados endosulfan y dicofol, así como para el producto fosforado ometoato; un valor superior por mas de 10 veces a los valores reportados de la línea susceptible de referencia; De este mismo modo, Luna (1993), reporta un incremento en las dosis de abamectina para el control de *T. urticae* en cultivos de fresas en el estado de Guanajuato.

Este fenómeno es de suma importancia, ya que se ha encontrado que insectos y ácaros son capaces de resistir los efectos tóxicos de los insecticidas y acaricidas a través de una gran variedad de mecanismos de defensa (Georghiou y Saito, 1983). En la mayoría de los casos el principal mecanismo de resistencia es a través de enzimas

detoxificativas (Beeman, 1982). Este tipo de resistencia se refiere a que los plaguicidas pueden ser metabolizados y transformados en productos menos tóxicos (Georghiou, 1971). Los principales sistemas enzimáticos responsables del metabolismo de insecticidas son: oxidasas microsómicas (Wilkinson, 1983), esterases y carboxiesterasas (Yasutomi, 1983), y glutathion s-transferasas (Dauterman, 1983).

Por lo que, el monitoreo de la resistencia es esencial en el manejo de insecticidas y acaricidas, es por ello, que se han desarrollado varias metodologías para detectar este fenómeno (Dennehy y Granett, 1984); tal es el caso de pruebas de concentraciones múltiples expresada en términos de concentración letal media (CL_{50}), perfiles de ADN que muestran a los genes responsables de la resistencia a plaguicidas (Keiding, 1986); así como, las pruebas bioquímicas que determinan la actividad y cantidad de las enzimas responsables de este fenómeno (Hemingway, 1986). Por lo que, la presente investigación tiene como objetivo; Determinar a través de varios métodos de diagnóstico la susceptibilidad y los mecanismos bioquímicos de resistencia; así como la variación intraespecífica de *Tetranychus urticae*, proveniente de campos de fresas del bajo mexicano.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de *T. urticae*

El ácaro de dos manchas o ácaro de los invernaderos, *Tetranychus urticae* Koch antiguamente formaba parte de un complejo de cerca de 59 sinónimos descritos para diferentes plantas hospederas. Adicionalmente, una revisión de la familia Tetranychidae publicada en 1955 (Pritchard y Baker citados por Jeppson *et. al.*, 1975), incluía 43 sinónimos para *T. telarius* (nombre inicial de este complejo), concluyéndose que era una especie politípica compuesta por varias subespecies. Los ácaros de este complejo de arañitas rojas se les reporta atacando a más de 150 especies de plantas cultivadas, siendo difícil saber con exactitud las especies de plantas dañadas únicamente por *T. urticae*.

Importancia económica

T. urticae ataca a más de 180 especies de plantas cultivadas en invernadero o en condiciones de campo, se sabe que esta especie es un serio problema en frutos deciduos, árboles de sombra y arbustos especialmente de climas templados (Jeppson *et al.*, 1975), de igual forma la reportan como una plaga en cultivos como algodónero, frijol, pepino, arbustos, etc. Por otro lado Sobrino y pacheco (1989), la reportan como plaga importante en berenjena, calabacita, melón, pepino, tomate y fresa.

Otero (1992), menciona que la importancia de los ácaros fitófagos como plagas de cultivos agrícolas ha ido en aumento en las últimas décadas. De ser organismos poco conocidos presentes en muchos cultivos, de una relevancia secundaria, se han tornado como plagas extremadamente dañinas, que han obligado a los productores a tomar medidas necesarias para su control.

Distribución

La especie *T. urticae* se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, principalmente en zonas templadas (Cruz, 1984). Esta especie es muy conocida en árboles frutales deciduos en los Estados Unidos de América y Europa (Tuttle y Baker, 1968). Mullin (1984), indica que *T. urticae* se encuentra atacando cultivos como algodón, papa y básicos en el estado de Michigan, USA. En Venezuela *T. urticae* ataca cultivos de tomate, melón y berenjena (Doreste, 1988).

En México se le reporta ocasionando daños económicos en las zonas freseras de Irapuato, Guanajuato y Zamora, Michoacán; y en menor grado en Jalisco, México, Puebla y Querétaro (Teliz y Castro, 1973). En los estados de Puebla, Morelos, México y Guanajuato ocasiona pérdidas en cacahuete, fresa y papayo (Estébanes, 1989).

Ubicación taxonómica.

De acuerdo a Krantz (1978), *T. urticae* se ubica en los siguiente taxa:

Phyllum	Arthropoda
Subphyllum	Chelicerata
Clase	Acarida
Orden	Acariformes
Suborden	Prostigmata
Superfamilia	Tetranychoida
Familia	Tetranychidae
Subfamilia	Tetranychinae
Tribu	Tetranychini
Genero	<i>Tetranychus</i>
Especie	<i>urticae</i>

Daños

Los daños directos que provoca la araña roja, se deben fundamentalmente a la acción sobre las partes verdes de las plantas producidas por los estiletes, así como la reabsorción del contenido celular al momento de su alimentación (Malais, 1995).

El síntoma más característico de los daños ocasionados por *T. urticae*, es la aparición de punteaduras o manchas amarillentas en el haz, producido por la desecación de los tejidos (cabello, 1995).

La gravedad de los daños causados por estos ácaros en todos sus estadios activos, se han manifestado como uno de los peores enemigos de los cultivos; atacando preferentemente sobre las plantas jóvenes así como en las nervaduras centrales de las hojas. El daño interno consiste en una reducción de la tasa de fotosíntesis y transpiración. Lo que provoca la pérdida de vigor de la planta (Vera *et al.*, 1980).

Las larvas y ninfas se agrupan en colonias, los adultos van dejando una fina telaraña que al transcurso del tiempo se le va acumulando el polvo y da la apariencia peculiar a la hoja; Las arañas prefieren alimentarse hacia los lados de las nervaduras, en ataques muy severos se encuentran en todas las partes (Resendíz, 1985). *T. urticae* se alimenta principalmente del follaje, introduciendo sus estiletes en los tejidos de la planta provocando un daño mecánico al remover el contenido celular. Esta actividad provoca manchas de color rojizo y si el daño es severo, puede provocar colapso del mesófilo dando por resultado la defoliación. Esto ocurre generalmente bajo condiciones de clima seco (Jeppson *et. al.*, 1975).

Morfología

Los huevecillos de *T. urticae* miden en promedio entre 110 y 150 μm . Son de color translúcidos a opaco blanquecinos y cambian a color pardo conforme se va desarrollando el embrión (Figura 2.1). La superficie del corión es lisa con leves irregularidades. En la última etapa del desarrollo embrionario se presenta un cono respiratorio que se proyecta sobre la superficie del huevecillo (Crooker, 1985).

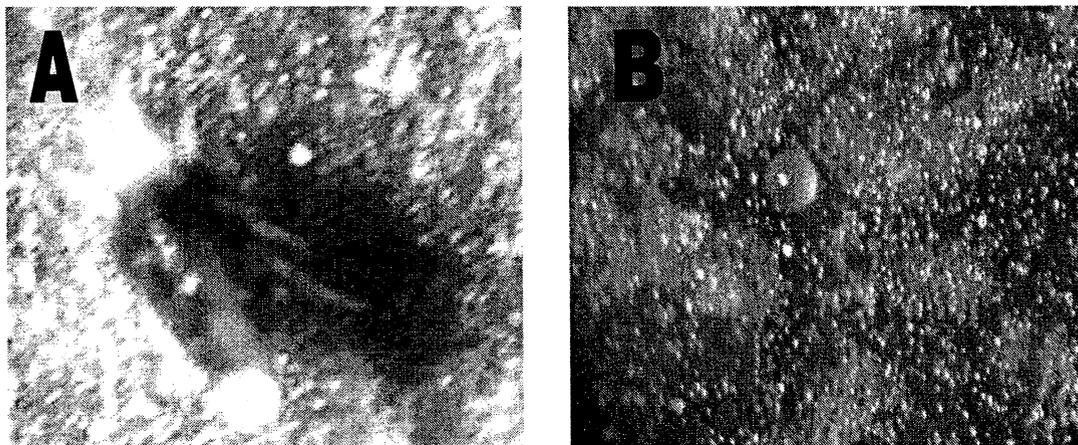


Figura 2.1. Hembra ovipositando (A) y huevecillos (B) de *Tetranychus urticae*.

Dos estigmas embrionarios de estructura complicada que penetran la pared del huevo durante la fase contractiva de la banda germinal, están conectados a una parte altamente especializada de la membrana intermedia que cubre el embrión. Esta membrana tiene numerosas perforaciones, las cuales forman un plastron de aire de 0.2 a 0.3 μ entre la pared del huevecillo y el embrión (Dittrich y Streibert, citados por Van de Vrie *et. al.*, 1972). Mothes y Seitz (citados por Crooker, 1985), estudiando la capa del huevecillo, han determinado que ésta consiste de una granular exterior, una capa densa media y una capa interna transparente. En 1949, Cagle (citados por Nelson y Stafford, 1972), estudió los efectos de la temperatura sobre el periodo de incubación de los huevecillos de *T. urticae*, reportando que a 24°C el período de incubación era de tres días, mientras que se necesitaban 12 días a una temperatura de 11°C.

Las larvas son redondas y poseen tres pares de patas. Al emerger del huevo son blancas y únicamente se les notan las manchas oculares de color carmín (Figura 2.2).

Conforme pasa el tiempo se torna de color verde claro y las manchas dorsales de color gris se empiezan a volver aparentes. Los peritremas tienen forma de bastón y están en posición dorsal al final de las setas propodosomales anteriores (Jeppson *et. al.*, 1975). Las larvas tienen un cuerpo redondeado y blanquecino, con un tamaño de 0,15 mm., siendo lo más característico que poseen tres pares de patas, a diferencia de los estados intermedios entre larvas y adultos, que son las protoninfas y deutoninfas, que ya poseen los cuatro pares de patas (Malais, 1995).

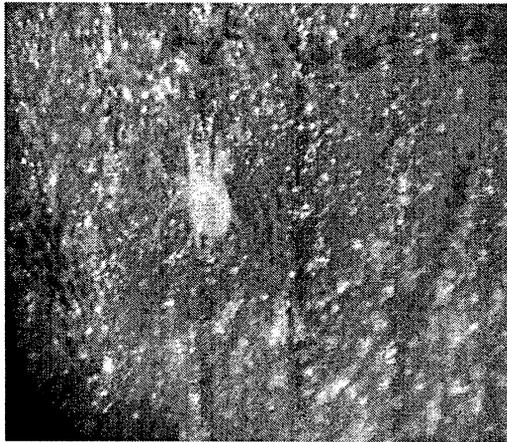


Figura 2.2. Larva de *Tetranychus urticae*

Las protoninfas son ovaladas y poseen cuatro pares de patas, son de color verde claro con manchas dorsales bien definidas y peritremas en forma de hoz. La deutoninfa es muy similar a la protoninfa de tal forma que resulta difícil diferenciarlas (Figura 2.3). Es ligeramente más oscura, de mayor tamaño y ya en esta etapa de desarrollo se les puede reconocer su sexo. Los peritremas son en forma de V. El primer tarso tiene cuatro setas táctiles próximas a la seta dúplex, en tanto que la primera tibia tiene nueve setas táctiles y una sensorial. El integumento es rugoso con lóbulos semi-oblongos en el filo de las arrugas (Jeppson *et. al.*, 1975).



Figura 2.3. Ninfa de *Tetranychus urticae*

El macho adulto es de coloración más pálida y es más pequeño que la hembra (Figura 2.4B). Posee un abdomen puntiagudo y el mismo número de setas. Las manchas dorsales son casi imperceptibles y de color gris. El primer tarso presenta cuatro pares de setas táctiles y dos sensoriales próximas a las dúplex proximales. La primer tibia presenta nueve setas táctiles y cuatro sensoriales (Jeppson *et. al.*, 1975).

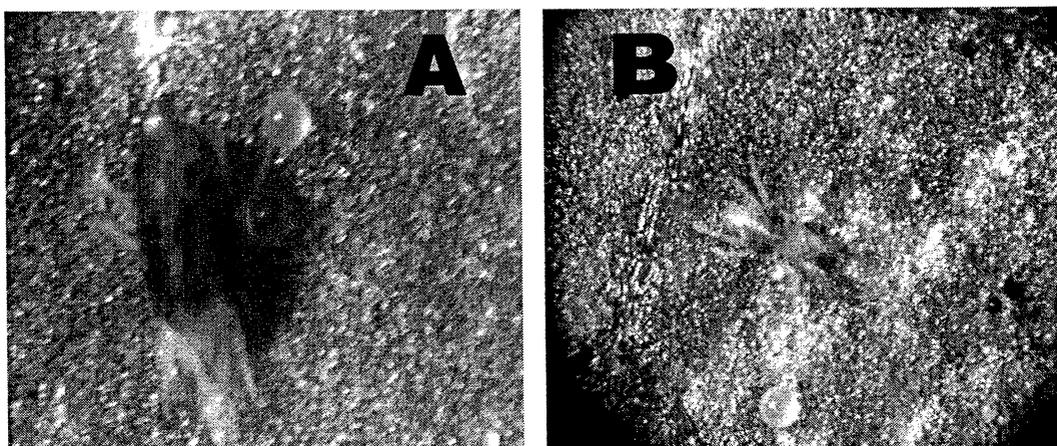


Figura 2.4. Hembra (A) y macho (B) de *Tetranychus urticae*.

Las hembras adultas alcanzan un tamaño de 0,5-0.6 mm. de longitud, tienen coloración variable en función del clima, substrato y edad, pudiendo ser amarillentas, verdosas, rojas, con dos manchas oscuras situadas en los laterales del dorso (Figura 2.4A). Los machos tienen el cuerpo más estrecho y puntiagudo, son de colores más claros y de tamaño inferior, 0,3 mm. de longitud (Malais, 1995).

Biología y hábitos

El ciclo de vida de *T. urticae* comprende las fases de huevecillo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto (Jeppson *et al.*, 1975). Entre sus tres estadios inmaduros se alimentan y entre cada una de estas fases presentan periodos de quiescencia llamados, protocrisálida, deutocrisálida y teliocrisálida (Figura 2.5).

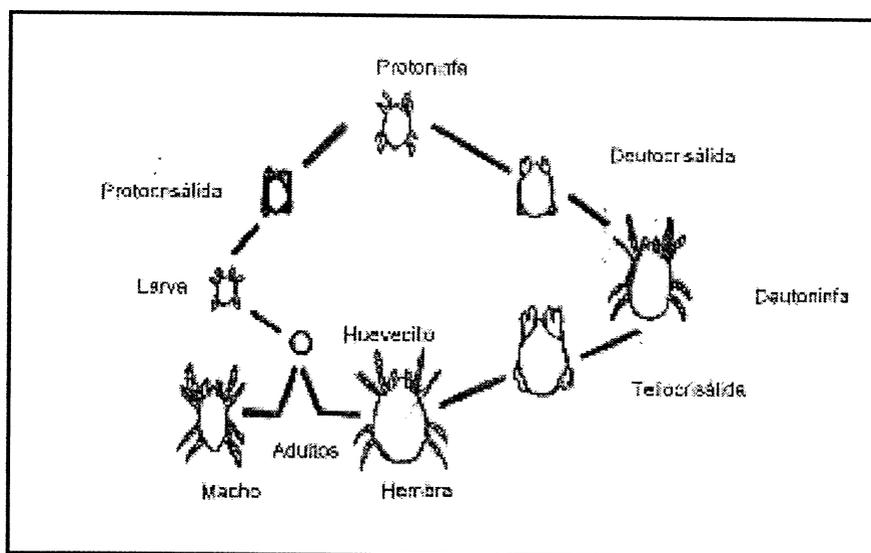


Figura 2.5. Ciclo de vida de *Tetranychus urticae* Koch

T. urticae, se alimenta del contenido celular de las plantas, por lo cuál ocasiona la reducción del contenido de clorofila y daño físico al mesófilo esponjoso; además, se ha determinado que en los tejidos afectados los estomas tienden a permanecer cerrados, lo que disminuye la tasa de transpiración (Sanches *et. al.*, 1979). La mayoría de los ácaros se alimentan del envés de las hojas, cerca de la periferia lo que ocasiona enroscamientos de los bordes, además las hojas se observan cloróticas y en altas infestaciones se observa hilos de seda que envuelven las hojas y ramas (Vera *et. al.*, 1980).

Se ha visto que los daños causados por los ácaros a las plantas debido a sus hábitos alimenticios dependen generalmente de las condiciones del medio, del estado fisiológico de la planta y de la naturaleza de la sustancias inyectadas (Jeppson *et al.*, 1975). Los tetraniquidos al alimentarse introducen sus estiletes en los tejidos de las plantas provocando un daño mecánico, el cuál consiste en la remoción del contenido celular. Los cloroplastos desaparecen y se aglutinan pequeñas cantidades de material celular coagulado, originando manchas color ámbar. Este daño es provocado como resultado de los hábitos alimenticios de los ácaros durante un período de tiempo por la actividad de altas poblaciones; sin embargo, también se ha visto que bajas poblaciones llegan a causar daño severos lo que hace suponer que durante el período de alimentación inyecten toxinas o reguladores a la planta (Jeppson *et al.*, 1975).

Fuentes (1983), señala que algunas especies de arañas rojas pasan el invierno en estado de huevo y otras, en estado de adulto, al resguardo de la corteza de los árboles o cualquier maleza. Al llegar la primavera avivan los huevos o salen los adultos de sus refugios e inician las oviposturas que, generalmente, se efectúan en la cara inferior de las

hojas que es habitualmente donde viven los adultos. Al cabo de pocos días salen las larvas, que llegan al estado adulto en poco tiempo, para iniciar de nuevo las oviposturas. Cuando el tiempo es seco y caluroso, el ciclo se repite de 15 a 30 días. Esto da idea de lo peligrosa que es ésta plaga, pues pueden llegar a invadir todo el cultivo poco tiempo después de aparecer los primeros ácaros. Según Velasco y Pacheco (1968), *T. urticae* presentó un tiempo de desarrollo variable para los estados de desarrollo, para huevecillo fue de 5.6 a 6.4 días; para larva de 1.8 a 2.5 días; para protoninfa de 1.8 a 3.4 días y para deutoninfa de 2.4 a 5 días de duración. El período de oviposición fue de 15 a 20 días y la longevidad en hembras y de 25 a 34 días en machos.

El primer paso importantes para el conocimiento de la biología del grupo de especies de arañas de dos manchas fue dado a principios de los años 20's cuando se encontró que el macho de éstas especies tenía un número de cromosomas haploide y la hembra diploide (Nelson y Stafford,1972). Actualmente se conoce que ésta especie presenta tres pares de cromosomas. Cromosomas y partenogénesis de tipo arrhenotokia (Helle y Bolland, citados por Helle y Pijacker,1985).

El fenómeno de diapausa en el ácaro de dos manchas y otras especies han sido ampliamente documentado por un buen número de acarólogos (Van de Vrie *et. al.*, 1972). Así por ejemplo, Veerman (1977), comenta que *T. urticae* entraba en diapausa bajo la inducción de días cortos, de modo que bajo un régimen de cuatro horas luz por día indujeron la diapausa en la totalidad de los individuos de una colonia del ácaro de dos manchas.

Se ha encontrado también que no todas las poblaciones de *T. urticae* responden con el fenómeno de diapausa al mismo fotoperiodo. Bondarenko y Kuan (citados por Van de Vrie *et. al.*, 1972), reportan que las poblaciones del ácaro de dos manchas que habitan diferentes latitudes responden de diferente manera a las horas de luz. En este caso el fotoperiodo decreció una hora por cada tres grados menos en la latitud.

Mecanismos de dispersión.

Los tetraniquídos han desarrollado algunos mecanismos que le ayudan a dispersarse y colonizar plantas ampliamente separadas y pueden servir también como mecanismos de escape de los enemigos naturales. Para Kennedy y Smitley (1985), este mecanismo es el movimiento de individuos a partir de colonias altamente pobladas, pudiendo ocurrir de las partes infestadas a las no infestadas en una misma planta o bien hacia plantas diferentes. Según Hassey y Coates (citados Kennedy y Smitley, 1985), la dispersión entre plantas en algunas especies es el resultado de la tendencia de un grupo de hembras pre-reproductivas a emigrar de las hojas en las cuales ellas se desarrollaron. Una vez que han ovipositados, pocas hembras de *T. urticae* tienen la tendencia a colonizar hojas nuevas o al menos lo hacen en menor grado que las hembras que no han iniciado la oviposición. En el caso de invadir plantas alejadas a la colonia, esta invasión se produce al viajar hembras pre-reproductivas a través de las corrientes de aire, otra forma es a través de material vegetativo que se transporta de un lugar a otro o por los mismos trabajadores por medio de ropa o herramientas.

Control de *T. urticae*

Desde los inicios de la civilización el hombre ha luchado para mejorar sus condiciones de vida, con el deseo de producir los alimentos necesarios, ha combatido a las plagas que compiten por la comida. Esta idea de combatir a las plagas no es del todo nueva; por ejemplo, el azufre fue utilizado desde el año 1000 a. de C. (Cremllyn, 1985), pasando por el verde de Paris, hasta llegar a la introducción de los compuestos orgánicos; con el desarrollo de estos se pensó que las plagas estaban destinadas a desaparecer, sin embargo, empezó a notarse que a pesar de las aplicaciones continuas; estas persistían e inclusive tendían a incrementarse (Lagunes y Villanueva, 1994). De tal manera, el hombre tuvo que buscar diferentes métodos de control que pudieran controlar a estas plagas. A continuación se mencionan algunos de los métodos de control usados para el control de las poblaciones de ácaros.

Control cultural

El contrarresto cultural de ácaros son aquellas que generalmente incluyen el uso de las practicas agrícolas ordinarias. Usualmente se deben de emplear mucho antes del tiempo en que el daño de las plagas resulta aparente y a veces no llaman mucho la atención del productor. Sin embargo son las mas baratas de todas las medidas de combate (Metcalf y Flint, 1976). Al respecto Knapp *et al.* (1982) trabajando con diferentes métodos de riego y su efecto sobre poblaciones de ácaros plaga en cítricos, reportan un decremento en las poblaciones de ácaros al utilizar el riego por aspersión; así mismo, obtuvieron resultados similares al realizar los riegos en menor volumen de

agua pero con una mayor frecuencia, en la temporada seca del año donde se incrementan de manera notable las poblaciones de ácaros.

Por otro lado, varios autores reportan un efecto importante de la fertilización sobre las poblaciones de *T. urticae*. Como lo mencionan Henneberry y Shriver (1964), quienes trabajaron con una lineal de *T. urticae* probando diferentes concentraciones de nitrógeno sobre plantas de frijol, reportan un incremento considerable del número de huevecillos a medida que se incrementaba las concentraciones de nitrógeno, recomendando estos autores un cuidado especial a la fertilización nitrogenada en aquellos cultivos susceptibles al ataque de esta plaga. Sin embargo Henneberry (1964) reportó que una línea de *T. urticae* desarrollada en plantas de frijol con diferentes dosis de nitrógeno, mostraron un decremento en la resistencia hacia productos acaricidas.

En relación a las coberturas, se consideran una práctica común en huertos frutales. Los costos extras de agua y nutrientes en la mayoría de las veces son amortizados por la disminución de riesgos en la presencia de malezas y plagas. Además de los beneficios de mayor captación de agua y menor evapotranspiración, así como refugio de enemigos naturales (McCoy, 1977).

Por último, la labranza de la tierra juega un papel importante en la regulación de las poblaciones de ácaros. Al realizar un barbecho del suelo ayuda a que las poblaciones de hembras invernantes se reduzca. Así mismo, se recomienda eliminar las malezas cercanas al cultivo después de la cosecha, ya que estas actúan como hospederos alternos sobre todo si están emparentadas taxonómicamente con el cultivo. Sin embargo no es

recomendable destruir las malezas colindantes durante la temporada de cultivo, ya que esto obliga a los ácaros a emigrar (Medina, 2000).

Control legal

En los primeros días del desarrollo agrícola y comercial, en todos los países las plantas y los productos vegetales importados o exportados, no contaban con un seguimiento relacionado a las plagas y enfermedades que podrían ser transportados con ellos. De hecho esta preocupación surgió hasta la segunda mitad del siglo XIX que se han realizado esfuerzos serios en cuanto a su legislación (Metcalf y Flint, 1976).

En lo que respecta a la arañita de dos manchas esta no se encuentra cuarentenada bajo ninguna norma fitosanitaria, sin embargo miembros de su misma familia como son las especies *Eutetranychus orientalis* Klein, *Oligonychus coffeae* (Nietner), se encuentran bajo las normas NOM-007-FITO-1995 (Requisitos Fitosanitarios para la Importación de Material Propagativo) y NOM-009-FITO-1995 (Requisitos y Especificaciones Fitosanitarias para la Importación de flor cortada y follaje fresco). Así como especies de ácaros de importancia cuarentenaria propuestos para futuras inclusiones en normas oficiales fitosanitarias como es *Panonychus ulmi*.

Control biológico

Este método de control se ha practicado desde hace mucho tiempo y consiste en usar a los enemigos naturales de una plaga, para así mantener sus fluctuaciones poblacionales por debajo de los umbrales económicos (Metcalf y Flint, 1976).

Los enemigos naturales son agentes muy importantes en la reducción o regulación de las poblaciones de ácaros que se alimentan de las plantas; entre los agentes mas importantes están ácaros, insectos y entomopatógenos (Jeppson *et al.*, 1975)

De acuerdo a Krantz (1971), dentro de las principales familias de ácaros predadores debe citarse a Phytoseiidae, Ascidae, Anystyidae, Cheyletidae, Bdellidae y Cunaxidae, siendo los miembros de Phytoseiidae los más importantes como depredadores de tetraniquidos. Al respecto Gould (1966) y Goowin (1984), reportan que la especie *Phytoseiulus persimilis* es un predador efectivo de *T. urticae*.

Algunos reportes acerca de trabajos referente al control biológico, son el de Oatman (1977) citado por Doreste (1984), quien demostró que poblaciones de *T. urticae* en fresa podían ser reducidas significativamente con la liberación en masa de *Phytoseiulus persimilis* y *Amblyseius californicus*; ambos pertenecientes a la familia Phytoseiidae. Por otra parte Helle & Sableéis (1985), mencionan que *P. persimilis* es el depredador más usado en invernaderos para el control de *T. urticae*. Actualmente, se usa este depredador en USA, Canadá, Rusia, Japón, Israel y otros países. *P. persimilis* se emplea comercialmente sobre plantas de chile, tomate, pepino, berenjena y fresa, además sobre algunas plantas ornamentales como rosal y crisantemo para el control de *T. urticae* (Badii, *et al.*, 2000).

y varias especies de fitoseidos, principalmente *Metaseiulus occidentales* Nesbutta; estos predadores ayudan a mantener las poblaciones de *T. urticae* a un nivel bajo. Tirado (1977) señala a cuatro especies de ácaros predadores: *Amblyseius elongatus*, *Cunaxa taurus*, *Bidella mexicanus* y *B. longicornis* como predadores de varias especies de ácaros fitófagos.

Jerónimo (1980) citado por Bravo *et al.* (1989) llevaron a cabo un estudio sobre la capacidad de depredación *Orius tristicolor* (white) y *O. thyestes* sobre *T. urticae*; donde observaron que la densidad poblacional de enemigos naturales por planta para mantener a las poblaciones de *T. urticae* por debajo del umbral económico es de 15 ejemplares. Un reporte anónimo (1980) citado por Bravo *et al.* (1989) señala a hipodamia como un buen predador ya que un solo ejemplar en estado de larva consume 500 arañas rojas. Dentro de los insectos depredadores de *T. urticae* los escarabajos del género *Stethorus* (Coccinellidae) y los trips de seis manchas de la familia Thripidae (*Scolothrips sexmaculatus*) han ofrecido buen control de poblaciones altas de arañas rojas (Badii *et al.*, 2000).

Por otra parte, en el caso de los hongos entomopatógenos encontramos que Carner y Canerday (1968), citados por Burges y Husey (1971) observaron al hongo *Metharrizium fresinnii* y *Agistem fiehneri* parásita a *Tetranychus* spp. Así mismo, Weiser (1968) reporta al hongo *Neozygites floridana*, atacando ala araña de dos manchas causando epizootias con una mortalidad hasta del 85 % en árboles frutales. Del mismo modo, Rombach y Gillespie (1988), reportan un excelente control de las especies *T. urticae* y *T. cinnabarinus* con el hongo *Hirsutella thompsonii*.

Control químico

Este método se ha utilizado desde los inicios de la agricultura moderna, para poder competir con las plagas y enfermedades que merman a los cultivos. En el caso de la araña de dos manchas el uso de plaguicidas es la táctica de control mas utilizada. Lo que ha generado una lucha incesante en la búsqueda de nuevas sustancias con mayor capacidad de control y que represente un menor riesgo para el hombre y su ambiente (Velasco y Pacheco, 1968).

Los productos de síntesis química utilizados para el control de los ácaros se denominan acaricidas; Este termino se refiere a aquellos pesticidas los cuales son principalmente efectivos contra los miembros del orden acarina, particularmente contra ácaros fitófagos, en dosis que son ineficaces para el control de insectos. Tales acaricidas por su forma de actuar se diferencian claramente de los insecticidas, sin embargo hay algunos que presentan ambas cualidades (insecticida-acaricida) (March, 1958).

Uno de los primeros acaricidas utilizados fue la Naftalina utilizándose generalmente en invernaderos. Posteriormente bajo condiciones de campo se utilizo el azufre y el aceite de petróleo (Velasco y Pacheco, 1968). Para el año de 1920, Jefferson *et al.* (1956), reportan el uso del sulfuro para el control de ácaros fitófagos de importancia.

A partir de 1930 se desarrollaron los dinitrofenoles, siendo los primeros acaricidas orgánicos utilizados, sin embargo, estos compuestos dejaron de ser utilizados

muy rápido, debido a que presentaba problemas de fototoxicidad a las plantas (Jeppson *et al.*, 1975).

Los insecticidas organofosforados se utilizaron a partir de 1940, para el control de ácaros fitófagos, siendo el producto hexactil tetrafosfato uno de los más utilizados (Fayette, 1946). Posteriormente en la década de los cincuentas, aparecen los acaricidas Organoclorados y para la década de los sesentas aparecen los acaricidas del grupo sulfito ester, destacando de este grupo el acaricida propargite (Jeppson *et al.*, 1975).

Para la década de los setentas aparecen los acaricidas derivados de las lactonas macrocíclicas (Lasota y Dybas, 1991). Actualmente existen nuevos grupos químicos en donde se han desarrollado productos acaricidas, como son: los pirazoles y naftoquinonas (Sato *et al.*, 2004).

Para el control de la araña de dos manchas se han empleado diversos tipos de acaricidas, como son abamectina, dicofol, naled, bifentrina, oxido de fenbutatin, etoxazole, acequinocyl, fenpiroximate, dimetoato y pyridaben, en diferentes cultivos agrícolas (Lee *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2004; Reséndiz, 1985 y Estrada y Sánchez, 1990). Como se puede observar (Cuadro 2.1), en México para el año 2005 están reportados 32 productos acaricidas para el control de *T. urticae*, donde podemos ver, que existen productos con diferente modo de acción, que van desde los que actúan en la transmisión sináptica, axónica, inhibidores del metabolismo energético y reguladores de crecimiento.

Cuadro 2.1. Productos acaricidas registrados en CICOPLAFEST-2005 utilizados para el control de *Tetranychus urticae* Koch.

Nombre Comercial	I. A.	Grupo Toxicológico	Modo de Acción
Abamectina Biomec Instar	Abamectina	Lactona Macrociclica	Activadores de canales de cloro
Koromite Acarin 200 AK-20 Kelthane	Milbemectina		Antagonistas de canales de cloro
Anacrot-600 Suprathion Naled 90 Dicarzol	Monocotrofos Metidation Naled	Organofosforado	Inhibidores de acetilcolinesterasa
Pounce 340 Talstar 100 Capture 100 Acaristop	Clorhidrato de formetanato Permetrina	Carbamato	Inhibidores de acetilcolinesterasa
Acaristop 500 Kanemite	Bifentrina	Piretroide	Antagonistas de canales de cloro
Mitoff Tetrasan	Clofentezine Acequinocyl	Clofentezine Naftoquinonas	Inhibidor de crecimiento Inhibidor en el transporte de electrones (sitio III)
Avolant	Atrazina Etoxazole	Diacilhidrazina Difeniloxazolina	Disruptor de la ecdisona Inhibidores del crecimiento
Comité Omite 6E /30W / CR Propargite 720 Torque 500 Floramite Fungicus	Fenpyroximate	Pirazoles	Inhibidor en el transporte de electrones (sitio I)
Intersul 275 / 725 Sulfocop F Proneem	Propargite Oxido de fenbutatin Bifenazate Azufre Neem	Organoestano Bifenazate Polvos minerales Botánicos	Inhibidor de la fosforilación oxidativa Inhibidor neuronal Taponamiento de espiráculos y pH Isectiostático

I.A.= Ingrediente activo

Resistencia a plaguicidas

Desde los inicios de la civilización el hombre ha luchado para mejorar sus condiciones de vida, con el deseo de producir los alimentos necesarios, ha combatido a los insectos que compiten por la comida (Cremlyn, 1985). Con el desarrollo de productos de síntesis química para el combate de plagas agrícolas se pensó que estas estaban destinadas a desaparecer, sin embargo, empezó a notarse que a pesar de las aplicaciones continuas contra las plagas; estas persistían e inclusive tendían a incrementarse. Al coleccionar ejemplares sobrevivientes, reproducirlos y someterlos a dosis de plaguicidas supuestamente letales, se había encontrado que muchos individuos no mueren y pueden regenerar la población. A estos individuos se les considera como resistentes (Lagunes y Villanueva, 1994).

El termino de resistencia es complejo y controvertido, ya que es un fenómeno muy relativo (Brattsten, 1989). Brown (1941) definió a la resistencia, como el desarrollo de una habilidad adicional en una raza de organismos, a tolerar dosis de tóxicos que son letales para la mayoría de los individuos de una población. La resistencia es una característica hereditaria que se expresa solo en poblaciones que poseen los factores para tal resistencia, y no es posible inducirla durante la vida del organismo, ya que preexiste en su código genético (Plapp, 1976).

Por su parte La FAO (1979) enmarca a la resistencia como la capacidad desarrollada por una población determinada, a no ser afectada por la aplicación de plaguicidas. La resistencia se manifiesta como un fenómeno de selección en el cual

sobreviven los organismos mejor adaptados (Georghiou y Saito, 1983). La resistencia ocasiona fallas en los plaguicidas y por consiguiente la pérdida de vidas humanas, fracasos en los cultivos, molestias sanitarias y salud pública. La resistencia se puede contemplar como un proceso inevitable, debido a la presión de selección continua que se sigue ejerciendo con las aplicaciones de los plaguicidas. Este desafío debe despertar la conciencia de los relacionados al tema, para estar preparados para manejarla convenientemente. Previniendo en lo posible su desarrollo, o en el peor de los casos encauzando la resistencia hacia caminos conocidos, presionando solo algunos caminos de resistencia que puedan ser revertidos mediante el uso de otros productos o métodos de control (Brattsten, 1989).

Tipos de resistencia

Georghiou (1965) clasificó a la resistencia en tres tipos: por comportamiento, morfológica y fisiológica.

Resistencia por comportamiento

Se refiere a los patrones que siguen los organismos que contribuyen a la resistencia. Estos patrones pueden ser como la preferencia en descansar en áreas no tratadas con plaguicidas, en lugar de áreas tratadas. O bien la tendencia de detectar el plaguicida y tratar de evitarlo (Carrillo, 1984). La mayoría de los casos de resistencia por comportamiento se da en aquellas especies muy hiperactivas donde pequeños cambios en cualquiera de las etapas del comportamiento provocan cambios en la

interacción organismo-plaguicida. Así como el mayor porcentaje de resistencia por comportamiento reportada se registra en mosquitos (16,4%), moscas domésticas (20%) y otros dípteros (22,7%). El resto se reparte entre cucarachas y otros insectos (Sparks, 2000).

Resistencia morfológica

Esta se presenta cuando las estructuras cuticulares (pubescencia, ceras, etc.) no permiten que el toxico penetre el integumento (Barbera, 1976). También se le conoce como mecanismo físico de resistencia y contempla muchos casos de penetración reducida que causan resistencia. La velocidad de penetración depende de las características moleculares del producto y de las propiedades del tegumento del organismo, las cuales varían considerablemente entre los estadios de vida y de una especie a otra. Una penetración demorada provee un mayor tiempo para la detoxificación de una dosis tomada (Brattsten *et al.*, 1986).

Resistencia fisiológica

La resistencia fisiológica es el tipo más importante que los insectos y ácaros adquieren. Esta puede ser por adición de un mecanismo protector (enzimas); o por la insensibilidad en el sitio de acción. A estos dos sistemas también se les denomina como mecanismos de resistencia metabólicos y mecanismos de resistencia no metabólicos (Lagunes y Villanueva, 1994).

Resistencia metabólica

Este tipo de resistencia se refiere a que los productos pueden ser metabolizados y transformados en productos menos tóxicos. Como una consecuencia de la acción de sistemas enzimáticos presentes en los organismos. Los principales sistemas enzimáticos responsables del metabolismo de los plaguicidas son: las oxidasas microsómicas (Wilkinson, 1983), Esterasas y Carboxiesterasas (Yasutomi, 1983) y Glutación s-transferasas (Dauterman, 1983).

Oxidasas Microsómicas

Las oxidasas de función múltiple del retículo endoplasmático liso se encuentran en la fracción microsomal de las células. Entre las reacciones de la primera fase aparecen las oxidaciones microsomales que requieren del oxígeno molecular y de la coenzima NADPH. Está comprobado que este sistema hidroxilante contiene además del NADPH, una flavoproteína (NADPH-citocromo c reductasa), una ferropoteína y un citocromo especializado (citocromo P-450) (Sotolongo y Vidal, 1984).

El citocromo P-450 está implicado como el factor principal en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos y también detoxifican organofosforados, piretroides y DDT entre otros (Casida, 1970). Las oxidasas quizás son el grupo más numeroso de enzimas que actúan degradando sustancias tóxicas dentro del cuerpo de las plagas. Preferentemente metabolizan sustratos lipofílicos y los convierten en productos con una mayor solubilidad en agua (hidrofilitos) o con grupos funcionales que permiten

reacciones de conjugación, facilitando así su excreción. Además, se ha comprobado que la exposición crónica de los organismos a ciertos compuestos lipofílicos puede causar la inducción de altos niveles de citocromo P-450 (Soderlund y Bloomkuist, 1990).

La actividad de estas enzimas es alta en plagas fitófagas, siendo comparativamente mayor en los polífagos. Su función al oxidar compuestos xenobióticos es hacerlos atóxicos o más hidrofílicos para excretarlos más fácilmente a través de reacciones de hidroxilación aromática, desulfuración oxidativa, epoxidación, sulfoxidación y demetilación (Wilkinson, 1983).

Glutación s-transferasas

Tienen gran importancia en la detoxificación metabólica en todos los insectos y ácaros. Son conocidas por estar involucradas en la resistencia al grupo de los organofosforados. Se clasifican de acuerdo con la reacción que catalizan como alquil, aril y epoxittransferasas (Terriere, 1984).

Las transferasas del glutatión son importantes en la detoxificación de organofosforados y proveen la forma más importante de resistencia metabólica al DDT a través de la dehidroclorinación al DDE (Brattsten *et al.*, 1986; Lalah, 1995). Para el caso de la desactivación metabólica de la resistencia mediada por Glutación s-transferasas (GST) existen menos datos. Se sabe que la reacción completa involucra la conjugación del compuesto extraño con un Glutatión reducido, seguida por una transferencia del grupo glutamato, una pérdida de glicina y finalmente una acetilación.

Un numero importante de enzimas cataliza los diversos pasos en la biosíntesis del ácido mercaptúrico, y en contraste con otros procesos de conjugación más importantes, tales como la glucosidación, la formación de sulfatos, entre otros. La conjugación del glutati6n no requiere una elevada cantidad de energía intermedia que involucre ATP (Dauterman, 1983).

Esterasas y Carboxiesterasas

En cuanto a las carboxiesterasas poseen capacidad para metabolizar los productos cuya estructura presente ésteres carboxílicos, así como los piretroides sintéticos y naturales. Sin embargo, el grupo requiere una clasificaci6n más amplia porque los ésteres fosfatos y carbamatos son también atacados.

En relaci6n a las enzimas esterasas según Raymond y colaboradores (1987), las esterasas se clasifican en dependencia de la habilidad de hidrolizar los sustratos en dos tipos: A (hidrolizan preferentemente el 1-naftilacetato) y B (hidrolizan preferentemente el 2-naftilacetato) (Pasteur, 1977). Callaghan *et al.* (1991) mostraron la correlaci6n existente entre la elevada actividad de esterasas A y B, y la resistencia a insecticidas organofosforados. En general, la mayor parte de actividad de las esterasas es sobre la uni6n aril, esta acci6n metabólica constituye el principal mecanismo de resistencia a los OF (Lagunes y Villanueva, 1994). Este sistema de enzimas actúa sobre compuestos fosforados, carbámicos y piretroides catalizando la formaci6n de productos hidrolizados similares a los de oxidadas (Dauterman, 1976).

Resistencia no metabólica

Al respecto Lagunes y Villanueva (1994) señalan que estos mecanismos no dependen del metabolismo del organismo, pero por su participación, algunos organismos son capaces de producir altos niveles de resistencia a los productos químicos. Los principales mecanismo de resistencia no metabólicos son: resistencia al derribo (Plapp, 1976), Acetil Colinesterasa Insensible (Hama, 1983), Insensibilidad al sitio de acción (Narahashi, 1983), Penetración reducida (Matsumura, 1983) y Excreción y mayor almacenamiento (Georghiou, 1971).

Resistencia al derribo (kdr)

Teniendo en cuenta que la acción del plaguicida se debe a la unión perfecta del producto con el sitio de acción, cualquier alteración en éste produce cambios en la acción tóxica. La neurona transmite el impulso nervioso a lo largo del axón. En estado de reposo el medio interno es negativo respecto al externo por distintas concentraciones de iones sodio (Na^+) y potasio (K^+). Cuando llega el impulso nervioso cambia la permeabilidad de la membrana para permitir la entrada de Na^+ y disminuir la diferencia de potencial. La membrana nerviosa recupera rápidamente su estado de equilibrio mediante un movimiento de iones Na^+ y K^+ a través de canales específicos. Una simple mutación en la región del gen, confiere resistencia en el sitio blanco de acción de piretroides y DDT (Miyazaki y Ohyama, 1996).

En varios artrópodos los canales de sodio juegan un papel muy importante en el modo de acción de los análogos del DDT y los piretroides. En algunos casos, la disminución de la actividad tóxica de estos compuestos es ocasionada por un decremento en la sensibilidad neuronal debida principalmente a cambios en la estructura y función de este sitio activo (Soderlund *et al.*, 1989). El mecanismo de resistencia no metabólico llamado kdr (“Knock –Down resistanse” o “resistencia al derribo”), le confiere resistencia a ala acción de parálisis rápida ocasionada por el DDT y los piretroides. El kdr está relacionado con alteraciones en las propiedades de los canales de sodio, esto se a interpretado como una reducción en el número y la densidad de los sitios activos en la membrana neuronal (Chang y Plapp, 1983).

Acetil Colinesterasa Insensible

Este tipo de resistencia se atribuye a un mecanismo en el cual los sitios blancos se alteran y esto hace que disminuyan la sensibilidad al ataque del tóxico. Un ejemplo de esto es el de la enzima Acetil Colinesterasa (Ache) y la reducida sensibilidad en el sitio de acción.

La Ache ha sido extensamente investigada como el mecanismo de resistencia principal a productos carbámicos y fosforados; En general, una Ache modificada es menos eficiente al hidrolizar su sustrato que una enzima normal. La alteración en los sitios activos causa una disminución en la reactividad con el inhibidor. Los estudios de inhibición sugieren que el acceso a los centros catalíticos de la enzima modificada es

restringido por un cambio en su conformación (Bourgue *et al.*, 1996). Smissaert y colaboradores (1970) plantearon que en muchos casos, el cambio de conformación se debe a la asociación de un residuo de aminoácido al centro catalítico de la enzima.

Penetración reducida

El rol de la penetración reducida en la expresión final de la resistencia, ha sido debatida por varios autores, la falta de especificidad de este mecanismo de resistencia, hace pensar si es la que podría tener menor influencia. La penetración reducida como un mecanismo de resistencia es más efectiva cuando se presenta asociada con otro mecanismo (metabólica). La existencia de la penetración reducida en el sitio de acción de una especie ha sido comprobada para el insecticida eldrin, en cucarachas, desde la forma en como el producto penetra a través de varios caminos hasta poder penetrar la cutícula. La cantidad de plaguicida que finalmente entra al sistema nervioso es determinado por el equilibrio químico entre el sistema nervioso y los otros tejidos (Matsumara, 1983).

Insensibilidad al sitio de acción

En algunos casos los organismos resistentes sobreviven a la aplicación de un producto, debido a que detoxifican mayores cantidades del producto que los organismos susceptibles que mueren por la aplicación. En otras palabras los organismos resistentes

toleran al tóxico, sin embargo, algunos de los organismos que sobreviven muestran algunos síntomas de envenenamiento, la cantidad de producto que el organismo esta soportando dentro de su cuerpo podría ser suficiente para matar a los organismos susceptibles. Estas observaciones sugieren que en ciertos organismos resistentes el sitio de acción es menos sensible a los plaguicidas, que el de los organismos susceptibles (Narahasi, 1971). El sistema nervioso de los organismos resistentes ha adquirido la insensibilidad por la acción directa y continúa de los plaguicidas. Esto ha sido mostrado para varios casos de resistencia a DDT, BHC, dieldrin y organofosforados (Narahasi, 1964).

Son dos posibles teorías que se pudieran tomar como modelo, para determinar la baja sensibilidad del sistema nervioso a los plaguicidas. El primero se basa en la actividad enzimática detoxificativa del sistema nervioso (Miyake *et al.*, 1957). Sin embargo muchas especies resistentes muestran una baja sensibilidad en el sitio de acción cuando un plaguicida de manera experimental es aplicado directamente en el sistema nervioso; esto es que el mecanismo metabólico detoxificador del plaguicida no será suficiente sino no esta la presencia de la insensibilidad del sistema nervioso a plaguicidas. Esto es claramente mostrado que el gen responsable de la producción de enzimas para la detoxificación de plaguicidas se encuentra ubicado en el cromosoma II y es de tipo dominante (Tsukamoto y Suzuky, 1964). Mientras que la insensibilidad del sitio activo (sistema nervioso) es gobernada por un gen recesivo, localizado en el cromosoma III. La segunda teoría se basa en la incompatibilidad del plaguicida con el sitio de acción y que pudiera ser en el sistema nervioso, o más en específico, en los canales de la membrana de los nervios (Narahasi, 1971). Los posibles mecanismos

incluyen la reducción del acoplo del plaguicida a la membrana del nervio, una modificación en los canales de sodio así como la modificación de las propiedades electro-químicas de la membrana del nervio a reducir respuestas repetitivas después del potencial de acción (Narahasi, 1971).

Excreción y mayor almacenamiento

El papel del organismo en el rol de excreción del plaguicida de su cuerpo sin ser estos metabolizados, es poco común y poca cantidad la que se llega a eliminar por este conducto, este sistema de excreción se ha reportado mas en especies como cucarachas, en donde intervienen los tubos de Malpighi que trabajan en unión con el intestino posterior (Georghiu, 1971). Durante la alimentación el organismo ingiere sustancias tóxicas, algunas de las cuales van a ser absorbidas, de tal manera que algunas especies son capaces de excretar sin metabolizarlas. La excreción de estas sustancias dependerá de su tamaño molecular, por ejemplo moléculas grandes son absorbidas por los nefrocitos en donde son desdobladas y excretadas; en cambio las moléculas chicas son excretadas directamente por los tubos de Malpighi (Georghiu, 1971).

En cuanto al almacenamiento de productos tóxicos para el organismo, esto se presenta generalmente cuando los sistemas excretores y enzimáticos, están a su máxima capacidad y el organismo a través del cuerpo graso y de la epidermis conservan los productos tóxicos dentro de su cuerpo (Georghiu, 1971).

Resistencia en *Tetranychus urticae*

Uno de los grandes cambios en el manejo de la resistencia a plaguicidas en ecosistemas múltiples, es que un cambio en el procedimiento del control para una plaga, puede interferir con el sistema de otras plagas, provocando el desarrollo de nuevas plagas. Esto ocurrió con la araña de dos manchas *Tetranychus urticae* Koch. En varios esquemas de manejo de diferentes cultivos (Pree y Wagner, 1987).

Es alarmante el numero de especies que atacan a los cultivos como plagas potenciales, pero es aun más alarmante el número de especies que son reportadas cada año como resistentes, en el caso de la arañita de dos manchas uno de los primeros reportes de resistencia lo realizo Compton y Kearns en 1937, desde ese momento hasta la fecha se han realizado innumerables investigaciones tanto de la determinación de la resistencia, así como de los medios por las cuales se va adquiriendo (Pree y Wagner, 1987).

El problema de *Tetranychus urticae* como plaga de cultivos se originó a partir de la aparición de los plaguicidas de uso sintético como el DDT y más tarde con algunos insecticidas organofosforados y clorados. Por otro lado, debido a los efectos tóxicos contra los organismos no blanco como son los depredadores, contribuyo al incremento de poblaciones de *T. urticae* en una forma desmedida, provocando que esta plaga de ser secundaria pasara a los primeros planos (Jeppson *et al.*, 1975).

Los casos documentados de resistencia de *T. urticae* con respecto a los acaricidas clorados utilizados para su control; encontramos que uno de los primeros reportes lo hace Ebeling y Pence (1954) en donde estos autores trabajaron comparando diferentes poblaciones de *T. urticae* bajo presión de selección del producto keltane, donde reportaron que la mayoría de las poblaciones muere a una dosis de 200 ppm, pero una población recurrió de 360 ppm.

Los programas de manejo químico de ácaros consistían básicamente en la aplicación de productos clorados, piretroides y organofosforados para el control de las plagas primarias de entonces, por lo que *T. urticae* presentó una rápida inducción de la resistencia hacia los productos fosforados como lo fue para el partion metílico (Lienk *et al.*, 1952; Kensler y Streu, 1967), etion (Mailloux y Morrison, 1962; Cotero y Sánchez, 1990), entre otra gama de productos. Esto propicio que las poblaciones de *T. urticae* además de incrementarse notoriamente debido a la falta de sus reguladores naturales causado este fenómeno por el uso de productos piretroides, los productos organofosforados creaban resistencia cruzada hacia otros productos acaricidas (Penman y Chapman, 1988).

Posteriormente los problemas más fuertes de resistencia de *T. urticae* se presentaron en el producto clorado dicofol, ya que este producto se utilizó extensivamente desde que apareció en el mercado y por los consecutivos 25 años, como lo muestran Shorey *et al.* (1967) en uno de los primeros trabajos en donde se reportó resistencia a dicofol. Otros productos que han mostrado problemas de resistencia hacia *T. urticae* son los productos del grupo de los organoestanosos, donde además de ser

utilizados en altas dosis con controles fallidos (Croft *et al.*, 1984) se presenta una resistencia cruzada contra el producto oxido de fenbutatin del mismo grupo (Edge y James, 1986). Así mismo se ha reportado que *T. urticae* presenta resistencia a productos como propargite y aramite (Goodwing *et al.* 1984; Kensler y Streu, 1967)

En la época actual han salido nuevas moléculas para el control de ácaros la cuales no están exentas de presentar problemas de resistencia para el control de *T. urticae*. Uno de los productos más conocidos y utilizados en la actualidad son las avermectinas en donde uno de los primeros reportes de resistencia lo menciona Banhawy y Anderson (1985) donde al someter diferentes poblaciones de *T. urticae* presentan varios rangos de resistencia al producto, iniciando de una Cl_{50} de .01 ppm, hasta 0.3 ppm.

Resistencia en *Tetranychus urticae* por producto

Dada la gran cantidad de trabajos que se han realizado con respecto a la resistencia de la araña de dos manchas, en el cuadro dos se muestra un resumen de los primeros reportes de resistencia para cada producto. Como se puede ver (Cuadro 2.2) la mayoría de los productos pertenecen al grupo químico de los fosforados con un 58 % del total de los productos, seguido de productos pertenecientes al grupo químico de los clorados y misceláneos, con un 12 y 11 % respectivamente. En relación a los grupos químicos que menos productos muestran con problemas de resistencia encontramos a las lactonas macrocíclicas (1.3 %) y a las formamidinas (2.6 %).

Resistencia en *Tetranychus urticae* por país

En relación a los países en donde se ha reportado resistencia de *T. urticae*, como se puede observar (Cuadro 2.3), son 31 países donde se ha reportado este fenómeno, siendo Estados Unidos de América el país con el mayor número de reportes (36), seguido por Australia y Reino Unido con 26 y 22 reportes respectivamente, en nuestro país hay numerosos trabajos al respecto desgraciadamente este tipo de información se ha quedado a nivel de tesis o en publicaciones de revistas nacionales con poco impacto, por lo que en la base mundial de resistencia no aparece ningún reporte de resistencia en nuestro país.

Cuadro 2.3. Países con reportes de resistencia contra el acaro de dos manchas *Tetranychus urticae* Koch.

País	N. de reportes	País	N. de reportes
Alemania	2	Israel	4
Australia	26	Japón	11
Austria	1	Corea	4
Bélgica	1	Noruega	2
Brasil	11	Nueva Zelanda	6
Bulgaria	3	Polonia	17
Canadá	4	Rusia	10
Checoslovaquia	2	Sudáfrica	9
Chile	2	Suecia	3
Dinamarca	1	Suiza	3
Egipto	4	Taiwán	1
Finlandia	11	Turquía	3
Francia	11	U. K.	22
Grecia	6	U. S. A.	36
Holanda	3	Venezuela	1
Irán	3	México	0

Resistencia en *Tetranychus urticae* por año

En el caso de los reportes de resistencia por año para la araña de dos manchas, podemos observar (Cuadro 2.4) que el grueso de los reportes se encuentran entre las décadas de los años 60's y 70's, esto posiblemente a que esta plaga adquirió el papel de plaga principal en los diferentes cultivos, decayendo notablemente en las décadas mas recientes. En la actualidad el interés no es conocer el grado de resistencia solamente; ya que es buscar de manera conjunta las posibles causas de su origen y las posibles soluciones para esta.

Cuadro 2.4. Años con reportes de resistencia contra el acaro de dos manchas *Tetranychus urticae* Koch.

Año	N. de reportes	Año	N. de reportes
		1981	0
1943	1	1982	1
1960	0	1983	4
1961	3	1984	6
1962	4	1985	5
1963	0	1986	0
1964	0	1987	1
1965	32	1988	0
1966	0	1989	0
1967	10	1990	0
1968	22	1991	4
1969	16	1992	0
1970	8	1993	2
1971	2	1994	0
1972	9	1995	0
1973	4	1996	3
1974	55	1997	0
1975	9	1998	0
1976	0	1999	4
1977	3	2000	0
1978	1	2001	9
1979	5	2002	1
1980	0		

Técnicas del monitoreo de la resistencia

Con el insignificante período evolutivo de solo 85 años de usar plaguicidas, viene de la mano con la aparición de especies resistentes (Georghiou y Lagunes, 1991). La resistencia no se encuentra limitada solo al uso irracional de insecticidas, si no que esto ocurre también en otros organismos tan simples como las bacterias y esporozoarios; así como en organismos más evolucionados como son los mamíferos. Esta resistencia engloba una gran cantidad de sustancias como funguicidas, rodenticidas e incluso antibióticos para el caso de los humanos (Georghiou, 1983).

El costo de la resistencia es evidente, esto se refleja con las aplicaciones mas frecuentes, las altas dosis y cambios en la aplicación de nuevos compuestos más caros (Guillet *et al.*, 1980). Es de considerable importancia para la gente involucrada en estudiar el fenómeno de la resistencia, en estandarizar las pruebas para varios tipos de especies de plagas así como los procedimientos para la detección de la resistencia en varias especies de importancia agrícola.

Con la estandarización de los métodos para determinar los niveles de resistencia de las plagas según sea su especie, se podrá tener certeza que al momento de reportar una nueva especie resistente, la investigación cumpla con los estándares determinados, para poder designar a esta nueva especie el estatus de resistencia. Por lo anterior, el monitoreo de la resistencia es esencial para el manejo de insecticidas y acaricidas, requiriéndose además de técnicas efectivas que nos detecten este fenómeno en cualquier etapa que se presente (Staezt, 1985).

Dentro de las múltiples pruebas para detectar el fenómeno de la resistencia se encuentran el bioensayo, que es un método utilizado para documentar los niveles de resistencia a plaguicidas en poblaciones de campo, en las cuales las decisiones de manejo están basadas. La detección de la resistencia en este tipo de métodos se basa en pruebas de susceptibilidad de insecticidas, que consisten de experimentos dosis-mortalidad que usualmente son realizados en laboratorio (Shah *et al.*, 2002).

Otro método de recién introducción en la determinación de la resistencia, son las pruebas de tipo bioquímico. Estas nos sirven para determinar si los individuos presentan sitios de producción de enzimas detoxificativas alterados y la cantidad de estas enzimas. Por último se encuentran las pruebas moleculares, las cuales nos determinan dentro de las poblaciones o individuos, si poseen alelos mutantes de resistencia. Estos tres componentes son complementarios, el primero detecta la respuesta al insecticida, el segundo proporciona información concerniente a la cantidad de enzimas presentes de la resistencia y con el tercero se obtiene los mecanismos genéticos de resistencia. El uso de todos los acercamientos puede ser más preciso y mutuamente confirmatorio (Brown y Brogdon, 1987).

Bioensayo o concentración-mortalidad

El bioensayo es la medición de la potencia de cualquier estímulo físico, químico, biológico, fisiológico o psicológico, por medio de las reacciones que este produce sobre la materia viva (Finney, 1971). Por su parte Hubert (1980) lo consigna como un conjunto de procedimientos en el que se determina la cantidad o fuerza de un agente o

estímulo mediante la respuesta de un sujeto. Bánki (1978), señala al bioensayo como un procedimiento experimental en el que se pretende determinar la efectividad biológica de un plaguicida.

Por su parte, Busvine (1971) menciona que el termino bioensayo, en el sentido amplio, cubre todos los experimentos en los que la potencia de un plaguicida se mide con referencia a una colonia estandarizada de organismos, y agrega que el termino también cubre a aquellos casos en los que el organismo se usa como una herramienta para medir pequeñas cantidades de plaguicida sobre un sustrato dado.

Esa y Cutkomp (1984) lo definen como la determinación de los efectos de productos químicos en pruebas de organismos vivos y señalan que el termino también se utiliza para denotar un método para la determinación de residuos de insecticidas, empleando graficas dosis-mortalidad previamente establecidas para un cierto compuesto y un determinado organismo de prueba.

Los programas de monitoreo de resistencia generalmente involucran comparación de las CL_{50} y CL_{90} o valores de dosis/ tiempo letal. Así mismo comparan las pendientes entre poblaciones colectadas en campo o líneas de laboratorio (Twine y Reynolds, 1980). Por lo que esta técnica esta basada en utilizar bioensayos con concentraciones múltiples, para producir mortalidades de 5 a 95 % en las líneas de prueba, la resistencia se expresa en términos de CL_{50} o CL_{90} de la línea resistente en relación a la línea susceptible.

Por otro lado, dentro de los bioensayos encontramos que hay de dos tipos, que son: El bioensayo directo, que consiste en la aplicación de una dosis única a un organismo. Involucra la medición de la cantidad exacta de tóxico que produce un determinado nivel de intoxicación en un individuo; en este tipo de pruebas la variable de interés es la dosis. Y el segundo tipo que es el bioensayo indirecto, el cual consiste en la aplicación de una dosis a una muestra representativa de la población, de manera que los resultados son atribuidos a la población de donde se extrajo la muestra (Lagunes y Villanueva, 1994).

También podemos mencionar que los métodos de aplicación de los bioensayos son de tres formas diferentes. El primero llamado de aplicación tópica, que consiste en la aplicación de una cantidad conocida del toxico sobre el cuerpo del organismo.

El segundo que es el método de fumigación, el cual se refiere a la confinación del organismo en un contenedor cerrado donde se libera un toxico que ejerce acción toxica en su fase de vapor.

Y por ultimo, el método de exposición residual, que es donde el organismo se expone a un ambiente contaminado con cierta concentración del toxico (Lagunes y Villanueva, 1994).

Busvine (1971) menciona que este tipo de exposición puede realizarse mediante diversos experimentos: inmersión del organismo en soluciones del toxico, aspersión de insecticida sobre substratos o pintado de superficies con soluciones toxicas.

Uso de bioensayos en el orden acarina

Existen varios métodos estandarizados para el uso de bioensayos en el orden acarina; uno de ellos es el método de inmersión en portaobjetos (FAO, 1974). Este método estandarizado es utilizado para la detección de resistencia en adultos de los ácaros *Tetranychus* spp. y *Panonychus ulmi*. El procedimiento consiste en pegar una tira de cinta adhesiva sobre un portaobjetos y con la ayuda de un pincel, se colocan dorsalmente ácaros hembra adultos sobre la cinta. Posteriormente este debe introducirse en un recipiente con solución, de tal manera que los ácaros queden sumergidos. Este método ha sido reproducido con varias especies, Rield y Hoying (1983) lo emplearon con *Tetranychus urticae* (Tetranychidae), mientras que Ifner y Hall (1983), lo utilizaron con *T. urticae* y *P. ulmi*.

Otro método utilizado es el de Inmersión en hoja (FAO, 1974). El método consiste en confinar con dispositivos de acrílico a grupos de 10 ácaros hembra sobre hojas de tomate tratadas por inmersión en una mezcla de acaricida. Un tercer método es el de película residual en caja petri (FAO, 1974). Dennhey *et al.* (1987) evaluaron la utilidad de un método rápido de bioensayo para detectar resistencia a dicofol en *Tetranychus* spp. Ese ensayo consistía en tratar una caja petri de plástico (50 mm de diámetro x 9 mm) con 1 ml de solución de dicofol formulado en etanol. Después de agregar el acaricida la caja se tapaba y se giraba en todas direcciones durante 5 s, para luego descartar el exceso de solución y dejar abierta la caja por 15 minutos para que seicara. Posteriormente se colocaba en ella un grupo de 20 ácaros hembra con ayuda de un pincel.

Un cuarto método es el de película residual en hoja (FAO, 1974). Donde, Reséndiz (1988) evaluó la respuesta de *T. urticae* a diferentes acaricidas, confinando a los ácaros sobre hojas tratadas con soluciones acuosas en una cámara de observación. Por último tenemos al método de película residual en papel filtro (FAO, 1974). Donde, Keena *et al.* (1991) Evaluaron la respuesta de huevecillos de *Tetranychus* spp. Al acaricida hexythianox, para ello confinaron 24 h a 5 hembras grávidas en discos de papel filtro (diámetro 2.1 cm) que descansaban sobre algodón empapado con agua.

Concentración-Diagnostico

Esta técnica es ampliamente usada a nivel mundial, involucra una comparación de la mortalidad entre líneas susceptibles y resistentes, basadas en la respuesta hacia una concentración determinada. Este método para determinar la resistencia, requiere de menos organismos que una técnica de concentraciones múltiples; al respecto Roush y Miller (1986), mencionan que las pruebas de concentración-diagnostico son rápidas, eficientes y precisas.

Las pruebas de concentración-diagnostico han sido ampliamente utilizadas, debido a su simplicidad y rapidez (Gunning *et al.*, 1984). Una concentración-diagnostico generalmente es seleccionada de una manera arbitraria (Por ejemplo, la CL₉₀ o dos o tres veces esta), sin embargo; la selección de concentraciones muy elevadas, puede resultar en una subestimación del nivel de resistencia, debido a que individuos resistentes de la muestra de la población en estudio pueden morir a estas concentraciones tan elevadas y

enmascarar el resultado. Dennehy *et al.* (1987), trabajaron con dos métodos de bioensayo para detectar la resistencia en ácaros, mostrando que al utilizar como concentración-diagnostico de dos a tres veces la CL_{90} de la población susceptible de referencia, podía matar el 98 % de la población resistente. De este modo, Holliday y Burnham (1990), recomiendan utilizar una concentración-diagnostico que produzca una mortalidad entre el 94-99 % en la línea susceptible de referencia. Sin embargo, McCutchen *et al.* (1989), mencionan que es mejor utilizar una concentración-diagnostico que mate entre el 80 y 90 % de la línea susceptible de referencia.

Pruebas bioquímicas

Este tipo de métodos son más precisos y sensitivos para detectar y monitorear la resistencia. Estos métodos pueden complementarse realizando estudios sobre la dinámica de población de los organismos resistentes en campo (Brown y Brogdon, 1987). Los métodos bioquímicos correlacionan el nivel de enzima presente o una reacción enzimática catalítica específica con la cantidad de sustrato producido. Además presentan la cualidad de ser altamente específicos para cada una de las enzimas detoxificativas.

Algunas de las ventajas que presenta este tipo de prueba; es la detección de la resistencia y proporcionar información de los mecanismos involucrados, permite el análisis de la resistencia en organismos individuales, con un solo ejemplar se pueden realizar análisis múltiples para las diferentes enzimas, son rápidos y precisos, el equipo

requerido es simple y no se requiere de mucha experiencia, los métodos pueden ser adaptados para la mayoría de las plagas (Brown y Brogdon, 1987).

Este tipo de pruebas está basado en la colorimetría de una reacción. Esta colorimetría nos permite medir una concentración en una sustancia de interés. La medida usada comúnmente en estas pruebas es la absorbancia de luz. La ley de las masas nos dice que si un soluto absorbe la luz en una longitud de onda en particular, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la sustancia en solución. Un dispositivo llamado espectrofotómetro o actualmente en un lector de placas de Eliza, se utiliza para medir y registrar la absorbancia en unidades cuantificables, así como la utilización de diferentes reactivos y un colorante que puedan marcar la diferencia en una determinada reacción (Stoscheck, 1990).

Por lo anterior, podemos mencionar que las pruebas bioquímicas se componen principalmente de un sustrato de naturaleza conocida, un colorante que permita hacer las lecturas de absorbancia y una fuente de enzima, que es la aportada por los organismos muestra. Al respecto, Sawicki *et al.* (1980), utilizaron como sustrato saturante al 1 y 2 naftil acetato, para la determinación de esterasas y carboxiesterasas, en especies como *Myzus persicae* y varias especies de mosquitos. De este modo, Devonshire y Moores (1984), reportaron que el yoduro de acetilcolina se ha empleado exitosamente como sustrato, para monitorear la actividad de acetilcolinesterasa en varias especies de insectos, como la mosca casera.

Por otro lado Brogdon y Dickinson (1983), Brogdon y Barber (1990) y Brogdon *et al.* (1997), desarrollaron un método que les permitía cuantificar los niveles de esterasas, glutatión s-transferasas y los niveles de oxidasa microsómicas en algunas especies de mosquitos utilizando placas de 96 cavidades para lector de Eliza, lo que les permitía analizar más muestras en menor tiempo.

En estudios realizados en la especie *Tetranychus urticae*, Blank y Osborne (1979), trabajando con homogenatos crudos de la araña de dos manchas, reportaron que al utilizar acetil-metilcolina, estos homogenatos son capaces de hidrolizar la acetilcolina y poder discriminar entre poblaciones susceptibles y resistentes para esta enzima. Por otro lado, Guo *et al.* (1997), determinaron las condiciones óptimas para medir la actividad de glutatión s-transferasas en *T. cinnabarinus* y poder usar esta actividad para diferenciar poblaciones resistentes.

Pruebas moleculares

Las técnicas modernas han permitido la detección más eficiente de variantes genéticas como son los marcadores moleculares (Michelmore y Hulbert, 1987). El diagnóstico molecular ha sido recomendado para incrementar la precisión y disminuir la variabilidad asociada a los otros métodos de detección de resistencia. Para poder llegar a un diagnóstico eficiente se toma como base los marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares son un segmento específico de DNA, que puede ser detectado (Villamón, 2000). Estos son utilizados para detectar variabilidad genética, cambios en el genoma, o para determinar la estructura de poblaciones en animales, plantas superiores y microorganismos. Estos han sido utilizados en estudios de taxonomía, migración, resistencia a plaguicidas y filogenia de fitopatógenos (Michelmore y Hulbert, 1987). Permiten estudiar el origen y la evolución de razas dentro de una población, facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Existen distintos tipos de marcadores, entre ellos están los morfológicos, bioquímicos y moleculares, entre los que destacan RFLPs, AFLPs, RAPDs, VNTRs (mini/microsatélites); los cuales se incorporan a hibridación y/o PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997).

Técnicas basadas en hibridación

Incluye principalmente los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) donde las sondas son hibridadas a membranas que contienen DNA fragmentado por enzimas de digestión.

Estos polimorfismos se detectan por el uso de enzimas de restricción, que cortan el ADN genómico de un individuo en una secuencia nucleotídica específica, de cuatro a seis pares de bases (sitio de restricción), rindiendo fragmentos de ADN de diferente tamaño, que puede variar entre individuos debido a pequeños cambios, en o cerca de los

sitios de restricción . Se separan electroforéticamente y el ADN fragmentado se someten a hibridación tipo Southern con una sonda específica marcada. Las sondas son generalmente pequeñas (500 a 3,000 pb) obtenidas de ADN complementario o ADN genómico (Staub y Serquen, 1996), detectando fragmentos específicos reconocidos por la sonda. La variación observada entre muestras de ADN en el tamaño de los fragmentos de restricción es lo que se conoce como RFLP y es consecuencia de cambios heredables en el ADN, generan o suprimen sitios de restricción (Michelmore y Hulbert, 1987). En la agricultura estos son útiles para distinguir genotipos y caracterizar poblaciones (Boister *et al.*, 1980).

Técnicas basadas en PCR

Tienen la característica de no necesitar mayor información de la secuencia del genoma que se esta investigando. Se pueden mencionar a los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) en el cual los iniciadores son escogidos arbitrariamente.

Los RAPDs se generan en base a una modificación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En lugar de utilizar un par de oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar un segmento de ADN, se usa un oligonucleótido único de secuencia nucleotídica arbitraria (9-10 bases) , con un contenido entre 50 – 80 % de guanina y citosina (Williams *et al.*, 1990). Los polimorfismos se pueden deber a cambios en una o mas bases en la secuencia homologa al oligonucleotido, a deleciones en el sitio de apareamiento inicial y a inserciones o deleciones que pueden cambiar el

tamaño de un segmento de ADN. El número de fragmentos obtenidos es dado por la probabilidad de que una secuencia de ADN complementaria al oligonucleotido esté presente ambas cadenas en orientación opuesta y a una distancia tal que permita su amplificación por PCR (Waugh y Powell, 1992).

En los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), el DNA es digerido con dos enzimas de restricción, adaptadores son ligados y los iniciadores están formados por una parte común comprendida entre el adaptador y el sitio de restricción, y una parte única correspondiente a las bases selectivas.

Esta técnica es la más recientemente desarrollada. Se basa en la amplificación selectiva por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de restricción, provenientes de una digestión total de ADN genómico. En la técnica se corta el ADN genómico con enzimas de restricción (generalmente EcoRI y MseI), seguido de una ligación de adaptadores específicos a los extremos terminales cortados y una amplificación de oligonucleótidos iniciadores homólogos a las secuencias de los adaptadores con la adición de una base selectiva. Para reducir el número de productos amplificados, se lleva a cabo una segunda amplificación que contienen dos o tres bases selectivas en lugar de una y generalmente tienen como resultado de 50 100 fragmentos amplificados que son separados en geles de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995; Lin y Kuo, 1995).

Los microsatélites usados como iniciadores también caen dentro de esta categoría como los Inter SSR o ISSR en el cual se amplifica la región flanqueada por los microsatélites.

Los microsatélites o SSRs, iniciales de su nombre en Inglés (Simple Sequence Repeats), son secuencias cortas de ADN, de 1 a 6 nucleótidos, repetidas cierto número de veces y se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002). Cuando estas regiones son individualmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de oligonucleótidos flanqueantes como iniciadores, muestran casi invariablemente polimorfismo debido a las diferencias en su longitud, como consecuencia de la ocurrencia de los diferentes números de las unidades de repetición (Morgante y Olivieri, 1993).

En relación al uso de estas técnicas aplicadas a la especie *Tetranychus urticae*, Shah *et al.* (2002), trabajando con la araña de dos manchas pudieron diferenciar individuos resistentes a propargite mediante el uso de la técnica molecular de Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD's-PCR). Por su parte Udalov *et al.* (2005) utilizaron esta misma técnica (RAPD's-PCR) para obtener patrones de bandas de ADN, que pudieran ser utilizados como patrones genéticos para detectar resistencia en *T. urticae*.

Cuadro 2.2. Insecticidas reportados con problemas de resistencia contra el acaro de dos manchas *Tetranychus urticae* Koch

Producto	Grupo químico	Cita	Producto	Grupo químico	Cita
Abamectina	Lactonas	Nauen <i>et al.</i> , 2001	Demeton-metil	Fosforado	Bhom, 1974
Acefate	Fosforado	Miur y Craham 1979	Diazinon	Fosforado	Markkula y Tiittanen, 1970
Aldicarb	Carbamato	Stone <i>et al.</i> , 1977	Dicofol	Clorado	Nickel, 1965
Amidithion	Fosforado	Kornilov 1972	Dicotrofos	Fosforado	Stathopoulos, 1974
Amitraz	Formamidina	Fergusson <i>et al.</i> , 1991	Dienoclor	Clorado	McEnroe y Lakocy, 1969
Azinfosmetil	Fosforado	Rock, 1974	Demefox	Fosforado	Anon, 1974
Azobenceno	Misceláneo	Hussey, 1965	Dimetoato	Fosforado	Oden, 1974
azocyclotin	Fosforado	Edge, 1984	Disulfuton	Fosforado	kilov, 1972
BHC	Clorado	Graves, 1965	EPN	Fosforado	Westigard <i>et al.</i> , 1967
Bifentrina	Piretroide	Yang <i>et al.</i> , 2002	Ethion	Fosforado	Misticic, 1965
Binapacryl	Misceláneo	Myburgh, 1968	Etoato	Fosforado	Lakocy, 1974
Bromofos	Fosforado	Markkula y Tiittanen, 1970	Fenazaquin	Misceláneo	Devine <i>et al.</i> , 2001
Bromopropilato	Misceláneo	Fergusson <i>et al.</i> , 1991	Fenbutatin oxido	Estanoso	Edge, 1984
Carbofenotion	Fosforado	Mello, 1968	Fenpyroximate	Pirazol	Devine <i>et al.</i> , 2001
Chlorbenside	Clorado	Asakawa, 1975	Fenkapton	Fosforado	Anon, 1973
Clordimefon	Formamidina	Kerr, 1977	Fentoato	Fosforado	Lakocy, 1974
Clorfenson	Clorado	Kiritani, 1974	Forato	Fosforado	Mello, 1969
Clorfensulfide	Clorado	Lakocy, 1974	Formetanato	Carbamato	Croft <i>et al.</i> , 1984
Clorobenzilato	Clorado	Anon, 1973	Formation	Fosforado	Smirnova, 1974
Cloropropilato	Clorado	Pasfield, 1968	Fosalone	Fosforado	Craham, 1974
Clofentezine	Misceláneo	Herron <i>et al.</i> , 1993	Fosmet	Fosforado	Lakocy, 1974
Clorpyrifos	Fosforado	Nauen <i>et al.</i> , 2001	Fosfamidon	Fosforado	Eldefrawi, 1968
cihexatin	Estanoso	Nelson, 1985	Malation	Fosforado	Miller, 1965
DDT	Clorado	Graves, 1965	Mefosfolan	Fosforado	Muir y Cranham, 1979
Deltametrina	Piretriode	Nauen <i>et al.</i> , 2001	Metamidofos	Fosforado	Cranham, 1974
Demeton	Fosforado	Fritzche, 1965	Metidation	Fosforado	Unwin, 1973

(Continua.....)

(Continuación.....)

Producto	Grupo químico	Cita	Producto	Grupo químico	Cita
Metomil	Carbamato	Cranham, 1974	Pyrindaben	Pirazol	Davin <i>et al.</i> , 2001
Mevinfos	Fosforado	Mello, 1969	Quinometionato	Misceláneo	Kiritani, 1974
Monocotrofos	Fosforado	Coulon, 1971	Selenio	Misceláneo	Quayle, 1943
Naled	Fosforado	Coulon, 1971	Sulfotep	Fosforado	Gasser, 1965
Ometoato	Fosforado	Lambert, 1974	Tebufenpyrad	Pirazol	Devine <i>et al.</i> , 2001
Paration metílico	Fosforado	Caballero, 1968	TEPP	Fosforado	Goodwin, 1965
Paration etílico	Fosforado	Bhom, 1979	Tetradifon	Misceláneo	Asakawa, 1975
Permetrina	Piretriode	Roush y Hoy, 1978	Tiocron	Fosforado	Maher, 1968
Pirimifos	Fosforado	Lakocy, 1974	Thiometon	Fosforado	Balevski, 1974
Profenofos	Fosforado	Bron <i>et al.</i> , 1983	Triclorfon	Fosforado	Cwillich y Ascher, 1961
Propargite	Estanoso	Dennehy, 1984	Trition	Fosforado	Mello, 1969
Protoato	Fosforado	Lakocy, 1974	Vamidotion	Fosforado	Stathopoulos, 1974

NIVELES DE RESISTENCIA EN POBLACIONES DE *TETRANYCHUS* *URTICAE*¹ KOCH EN EL CULTIVO DE LA FRESA

E. Cerna², J. Landeros², E. Guerrero², M. H. Badii³, A. E. Flores³ y A. Flores²

RESUMEN

Se colectaron dos poblaciones de campo de *Tetranychus urticae* Koch, en huertos comerciales de fresa, en el estado de Guanajuato, México y se compararon con una línea susceptible de laboratorio. La población, denominada línea L₁, se colectó en huertos con manejo adecuado, la línea L₂, se obtuvo de huertos sin manejo adecuado de rotación de acaricidas; ambas líneas se trasladaron al laboratorio de acarología de la universidad Antonio Narro, donde se realizaron una serie de bioensayos, mediante la técnica de inmersión en hoja con el propósito de determinar los niveles de resistencia, en relación a la línea susceptible de laboratorio N-s (Línea susceptible Universidad Antonio Narro). Los resultados indican que la línea L₁ presenta una proporción de resistencia de 106.4, 3.7, 5.0, 1.4, y 3.5X para los productos Abamectina, bifentrina, dicofol, oxido de Fenbutatin y naled respectivamente, la línea L₂ presenta una proporción de resistencia de 57.4, 8.0, 11.2, 11.3, y 9X para los mismos acaricidas.

ABSTRACT

Collections of two spotted mites were made in strawberry production fields in the state of Guanajuato, Mexico to compared with a population of reference of laboratory. The population denominated L₁ line, was collected in orchards with management. The

¹ Acari: Tetranychidae

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. C.P. 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

³ Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Biología, Unidad B. C.P. 3916650. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

L₂ line was obtained in orchards without acaricide management. Collected material was taken to the laboratory of acarology in the University Autónoma Agraria Antonio Narro. Several bioassays were conducted using the leaf immersion technique to determine the resistance level, using a *T. urticae* susceptible line as reference (Narro susceptible, L-NS). The results indicated that the L1 line showed resistance proportions of 106.4, 3.7, 5.0, 1.4, and 3.5 times plus the miticides avermectin, bifenthrin, dicofol, fenbutatin oxide and naled respectively. For the other side the L2 line showed resistance proportions of 57.4, 8.0, 11.2, 11.3, and 9 times for the same acaricides.

INTRODUCCIÓN

La araña de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es la plaga principal de una gran variedad de plantas y catalogada como una de las especies que más daños ocasionan a la agricultura en el mundo (Jeppson *et al.*, 1975). Su alto potencial reproductivo le permite incrementar su población rápidamente, de tal manera que en un corto tiempo puede rebasar el umbral económico si no se toman las medidas pertinentes para su control (Gould, 1987); Una de las herramientas más utilizadas es el control químico, sin embargo, el mal uso de los plaguicidas ha producido resistencia (Georghiou y Saito, 1983).

La resistencia en esta especie es un problema muy serio en numerosos sistemas de producción, se ha presentado prácticamente a todos los acaricidas en campos agrícolas donde se han utilizado (Georghiou y Lagunes, 1991). El manejo deficiente de acaricidas contra *T. urticae* data de más de 70 años, iniciando con los primeros registros

en la década de los 30's (Georghiou y Saito, 1983) donde reportan problemas de control utilizando selenesulfito potasico. Steiner *et al.* (1944) y Gunthart (1945) reportan que la actividad del DDT, incrementa las poblaciones de ácaros. Posterior a la introducción de los acaricidas organofosforados, Lienk *et al.* (1952) reportan problemas en el control de *T. urticae*, utilizando altas concentraciones de paration metilico. En respuesta a estos problemas se creó la necesidad de contar con acaricidas de larga vida (Haines, 1958), uno de ellos el dicofol, es un importante acaricida que se ha utilizado por los últimos 25 años y aparece como un candidato positivo para la resistencia (Grafton-Cardwell *et al.*, 1987). Desde su introducción en 1956 los acaricidas organoestanosos, han sido utilizados con regularidad, por lo que también a estos productos se han registrado casos de resistencia, Croft *et al.* y (1984), Hoyt *et al.* (1985) registraron los primeros reportes de resistencia a cihexatin. Finalmente algunas poblaciones de *T. urticae* muestran resistencia a acaricidas más recientes como es el caso de las abamectinas (Campos *et al.*, 1995). Considerando entonces, que desde la década de los 50's y hasta finales de los 80's, la rotación de acaricidas ha sido mínima y basada casi totalmente en el uso de compuestos organoclorados y fosforados; y que las sustancias de reciente uso ya presentan en algunas zonas problemas de resistencia.

Esta investigación tiene como objetivo; Determinar el nivel de resistencia de las poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch, en el cultivo de la fresa en el estado de Guanajuato, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea susceptible (N-s): Para el desarrollo de esta investigación se hizo necesario contar con una línea susceptible por lo cual se inicio una serie de colectas de *T. urticae* en hojas de *Ricinus comunnis* y otras especies de plantas de la región de Saltillo, Coahuila, México. El material colectado se trasportó al laboratorio de acarología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y se multiplico en plántulas de frijol a temperatura de 25 ± 2 °C, de 60 a 70 % de humedad relativa y en condiciones de 12:12 luz: oscuridad, respectivamente. Después de 24 generaciones se desarrollaron una serie de bioensayos con el objetivo de conocer la CL_{50} a cinco acaricidas de diferente grupo toxicológico.

Líneas de campo: Se colectaron dos líneas en campos productores de fresa del estado de Guanajuato, la primera (L_1) se colectó de huertos con manejo adecuado de rotación de acaricidas. La segunda línea (L_2) se obtuvo en huertos sin manejo adecuado.

Las colonias de ácaros colectadas en el cultivo de la fresa se trasladaron a la universidad, en donde se colocaron en plantas de frijol variedad lima, a las mismas condiciones utilizadas en la línea susceptible, e inmediatamente se procedió al desarrollo de los bioensayos.

Bioensayos: Los bioensayos se realizaron de acuerdo a la técnica de inmersión en hoja (FAO, 1979), para ello se seleccionaron foliolos de frijol con al menos 30 ácaros adultos hembra por concentración, los foliolos tratados se depositaban sobre esponjas saturadas de agua en charolas de plástico (Abou-Setta, 1987). Los acaricidas utilizados fueron; abamectina® (1.8%), bifentrina® (12.15%), dicofol® (18.5%), naled® (60%) y oxido de fenbutatin® (44.64%). Para la preparación de las diferentes concentraciones se

utilizo agua destilada y el producto bionex® como dispersante, en una proporción 1mL: 1L de agua. El rango de concentraciones utilizadas fue de 50 ppm a 6000 ppm excepto para la abamectina que oscilo de 0.1 ppm a 8.0 ppm. Se tomo como criterio de muerte la inmovilidad total, síntomas de ataxia o el desplazamiento menor al tamaño de su cuerpo al recibir un estímulo. Las lecturas de mortalidad se realizaron a las 24 hr excepto para la abamectina que se obtuvo a las 48 h.

Análisis de datos: Los resultados obtenidos de mortalidad se corrigieron con la formula de Abbott (1925), y se realizo un análisis Probit, mediante el método de máxima verosimilitud (Finney, 1971).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos de la respuesta de la línea de laboratorio (N-s) de *T. urticae* en relación a cinco acaricidas de diferente grupo toxicológico. Como se puede observar la CL_{50} fue de 0.02, 242, 177, 363 y 302 ppm para los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, oxido de Fenbutatin y naled respectivamente. La CL_{50} registrada para la abamectina (0.02 ppm) en esta investigación es similar a las reportadas para otras líneas susceptibles, James *et al.* (2000) y Campos *et al.* (1995) reportan una CL_{50} de 0.019 ppm para las líneas susceptibles Kennewick-s y RU-s (Rutgers University-susceptible) respectivamente.

En relación al oxido de Fenbutatin el resultado obtenido (363 ppm) fue superior al comportamiento de una línea reportada por Tian *et al.* (1992) con una CL_{50} de 300 ppm. Caso similar a la abamectina.

En relación al acaricida bifentrina los resultados de esta investigación (242 ppm) son 4.8 veces más altos que los reportados por Khambay *et al.* (1999) para una línea susceptible.

CUADRO 1. Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas aplicados a la línea susceptible N-s de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch.

TABLE 1.- Lethal concentration, confidence limits and values slope of the acaricidas applied to the susceptible line N-s of mature females of *Tetranychus urticae* Koch.

Línea susceptible de laboratorio N-s							
Acaricida	n	ppm			pendiente	g.l.	r ²
		CL ₅₀	Límites fiduciales 95%	CL ₉₅			
Abamectina	865	0.02	(0.0025-0.0490)	4.920	0.676 ± 0.231	4	0.845
Bifentrina	627	242	(187.95-296.945)	3569	1.406 ± 0.290	4	0.945
Dicofol	1051	177	(142.42-213.87)	2933	1.348 ± 0.487	4	0.954
Oxido de fenbutatin	729	363	(261.96-459.87)	5578	1.385 ± 0.319	4	0.920
Naled	616	302	(244.92-362.45)	3638	1.521 + 0.484	4	0.865

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad y r²: Coeficiente de determinación.

este mismo acaricida, Rizzieri *et al.* (1988) reportan una línea susceptible Orchard-12 con una CL_{50} de 1 ppm.

En relación al acaricida naled la línea N-s presenta una CL_{50} (302 ppm), la cual es 2.2 veces mayor a la registrada por Sato *et al.* (2000) quienes reportan una CL_{50} de su línea susceptible de 137 ppm.

En los cuadros 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos sobre la respuesta de las líneas de campo de *T. urticae*. La línea L_1 que comprende material colectado en huertos con manejo adecuado de aplicación de acaricidas y una L_2 que comprende ácaros provenientes de huertos sin una rotación adecuada de acaricidas. Como se puede ver, con los productos abamectina, bifentrina, dicofol, oxido de Fenbutatin y naled se obtuvo una CL_{50} de 1.91, 904, 883, 508, 1083 y 1.03, 1943, 1995, 4107, 2720 ppm para la L_1 y L_2 respectivamente. La razón de obtener una CL_{50} en L_1 mayor que en L_2 para el acaricida abamectina, probablemente se debe al número de aplicaciones, ya que información de técnicos del departamento estatal de sanidad vegetal del estado de Guanajuato, mencionan 3 aplicaciones en este cultivo por cada ciclo, mientras que en los cultivos con L_2 escasamente se da una aplicación por ciclo. Campos *et al.* (1995) reportan para líneas de campo en ornamentales una CL_{50} que van de 0.5 ppm a 8.8 ppm; mientras que James (2000) reporta una CL_{50} para líneas de campo sobre lúpulo de 2.5 a 5 ppm.

En relación a la bifentrina la línea L_1 presenta una CL_{50} de 904 ppm, mientras que la L_2 es de 1943, lo cual constituye una diferencia de 2.15 veces más resistente la L_2 . Yang *et al.* (2002) reportan una CL_{50} de 218 ppm en una línea de campo resistente a bifentrina.

En lo que respecta al acaricida oxido de fenbutatin la línea L_1 muestra una CL_{50} de 508 ppm y la línea L_2 de 4107, lo que constituye una diferencia de 8.08 veces menor, lo cual puede considerarse como una clara diferencia. En este acaricida Tian *et al.* (1992) reportan una CL_{50} para una línea de campo sobre perales de 1177 ppm.

CUADRO 2. Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas aplicados a la línea de campo con manejo L_1 de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

TABLE 2. Lethal concentration, confidence limits and value slope of the acaricidas applied to the field line with handling L_1 of mature females of *Tetranychus urticae* Koch and their resistance proportion against the susceptible line.

Línea de campo con manejo L_1								
ppm								
Acaricida	n	CL_{50}	Límites fiduciales 95%	CL_{95}	pendiente	g.l.	r^2	L_1 vs Ns
Abamectina	1247	1.91	(1.5255-2.4243)	58.19	1.109 ± 0.475	4	0.952	106.4X
Bifentrina	1656	904	(803.99-1016.02)	4962	2.224 ± 0.346	4	0.935	3.7X
Dicofol	889	883	(780.33-991.01)	4755	2.248 ± 0.341	4	0.924	5X
Oxido de fenbutatin	1759	508	(402.61-613.86)	5915	1.542 ± 0.318	4	0.899	1.4X
Naled	688	1083	(935.98-1245.92)	8502	1.838 ± 0.281	4	0.974	3.5X

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad, r^2 : Coeficiente de determinación y L_1 vs. Ns: Proporción de resistencia.

Para el caso del dicofol la L_1 (883 ppm) resultó 2.26 veces menor que la L_2 (1995 ppm) estos resultados sin embargo son menores a los reportados por Coterio *et al.* (1989) quienes reportan una CL_{50} de 2804 ppm para una línea de campo sobre ornamentales, y Dennehy *et al.* (1984) determinaron una CL_{50} de 8590 ppm para una línea de campo sobre algodón.

Por ultimo en el caso del acaricida naled la línea L_1 (1083 ppm) resulto 2.51 veces menor que la L_2 (2720 ppm). Estos resultados son mayores a los reportados por Sato *et al.* (2000) quienes reportan una CL_{50} de 586 ppm.

Como se puede observar la línea L_2 , presento los valores mas altos de CL_{50} en comparación a la línea L_1 (excepto para el acaricida Abamectina), esto probablemente debido a la nula rotación de acaricidas, ya que los cultivos donde se colecto esta línea (L_2) se hace uso poco adecuado de los acaricidas, con un uso que puede considerarse excesivo de dicofol y el oxido de fenbutatin, lo que de acuerdo a Yang *et al.*, (2002), puede generar una resistencia cruzada positiva contra productos como la bifentrina.

En los cuadros 2 y 3 se presentan los resultados obtenidos de la proporción de resistencia de las líneas L_1 y L_2 en función a la línea susceptible (N-s). Como se puede observar, las proporciones de resistencia de las líneas L_1 y L_2 en relación a la línea susceptible para la abamectina, bifentrina, dicofol, oxido de fenbutatin y naled fueron de 106, 3.7, 5, 1.4, 3.5 y 57.4, 8, 11.2, 11.3 y 9 veces respectivamente.

Sobre el acaricida abamectina, Campos *et al.* (1996) encontraron una proporción de resistencia de 0.5 a 175 veces, en diferentes líneas provenientes de California, Florida, Islas Canarias y Holanda. Beers *et al.* (1998) observaron una proporción de resistencia de 5 a 27 veces en una población de *T. urticae* provenientes de huertos de pera; Mientras que James *et al.* (2000) registraron una proporción de resistencia de 25 a

50 veces, en una línea de *T. urticae* proveniente del Centro de Extensión e Investigación de Irrigación Agrícola (IAREC) en 1999 y Campos *et al.* (1995) reportan una proporción de resistencia para líneas colectadas en rosal de 1 a 658 veces, los mismos investigadores (1995) mencionan que las líneas que reciben menos de seis aplicaciones por año de abamectina la proporción de resistencia se mantiene estable, mientras que las poblaciones de campo que reciben mas de 30 el incremento de resistencia puede llegar a 1597 veces.

En lo que respecta al acaricida bifentrina, en un estudio realizado por Yang *et al.* (2002) reportan una resistencia de 4.5 veces, así mismo mencionan que el producto puede presentar efectos de resistencia cruzada positiva. Herron y colaboradores (2001) reportan una resistencia de 109 veces, aludiendo que en tres años anteriores era de 1.2 veces.

Para el acaricida dicofol, Dennehy y Grannet (1984) reportan una resistencia de este acaricida de 5.6 veces, en líneas obtenidas en algodón; Dennehy *et al.* (1987) reportan para el mismo cultivo (algodón) una resistencia de 168 veces, y de 15 en poblaciones colectadas en huertos de manzano (Dennehy y Glover, 1988).

En relación a el oxido de fenbutatin Goodwing *et al.*(1995) reportan una proporción de resistencia de 2.4 a 464 veces, en líneas colectadas en rosas; Mientras que Jacobson *et al.* (1999) registran una proporción de resistencia de 3 a 157 veces, en líneas colectadas en diferentes cultivos de Reino Unido.

Por ultimo para el acaricida naled Sato *et al.* (2000) reportan una resistencia de 8.4 veces, el cual es un resultado muy similar al reportado en esta investigación en la línea L₂.

CUADRO 3. Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas aplicados a la línea de campo sin manejo L₂ de hembras adultas de *Tetranychus urticae* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

TABLE 3. Lethal concentration, confidence limits and value slope of the acaricidas applied to the field line without handling L₂ of mature females of *Tetranychus urticae* Koch and their resistance proportion against the susceptible line.

Línea de campo sin manejo L ₂									
ppm									
Acaricida	n	CL ₅₀	Límites		pendiente	g.l.	r ²	L ₂ vs Ns	
			fiduciales 95%						
				CL ₉₅					
Abamectina	789	1.03	(0.82116-1.3012)		22.78	1.224 ± 0.471	4	0.896	57.4X
Bifentrina	2076	1943	(1736.04-2164.70)		9358	2.409 ± 1.118	4	0.977	8X
Dicofol	1950	1995	(1787.69-2217.33)		9213	2.475 ± 0.913	4	0.986	11.2X
Oxido de fenbutatin	1218	4107	(3666.55-4620.39)		23028	2.196 ± 0.919	4	0.941	11.3X
Naled	1935	2720	(2490.56-2951.12)		8815	3.220 ± 1.180	4	0.975	9X

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad, r²: Coeficiente de determinación y L₁ vs. Ns: Proporción de reistencia.

LITERATURA REVISADA

- Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Abou-Setta, M. M. and Childers, C. C. 1987. A modified leaf arena technique for rearing phytoseiid or tetranychid mites for biological studies. *Florida Entomol.* 70: 245-248.
- Beers, E. H., H. Riedl and J. E. Dunley. 1998. Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in the Pacific Northwest. *J. Econ. Entomol.* 91(2): 352-360.
- Campos, F., R.A. Dybas, and D.A. Krupa. 1995. Susceptibility of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. *J. Econ. Entomol.* 88(2) : 225-231.
- Campos, F., D. A. Krupa and R. A. Dybas. 1996. Susceptibility of populations of two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance. *J. Econ. Entomol.* 89(3) : 594-601.
- Cotero, E. S. y G. M. Sánchez. 1989. Niveles de susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acarida: Tetranychidae) a ocho acaricidas en el cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L) en la región de Villa Guerrero México. *Rev. Chapingo.* 14 (6): 145-148.
- Croft, B. A., Miller, R. W., Nelson, R. D. and Westigard, P. H. 1984. Inheritance of early-stage resistance to formetanate and cihexatin in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) *J. Econ. Entomol.* 77 (5): 574-578.

- Dennehy, T. J. and Granett, J. 1984. Spider mite resistance to dicofol in San Joaquin Valley cotton: Inter and intraspecific variability in susceptibility of three species of Tetranychus. J. Econ. Entomol. 77(6): 1381-1385.
- Dennehy, T.J., E.E. Grafton-Cardewell., J. Granett and K. Barbour. 1987. Practitioner assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mite (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 80(5): 998-1003.
- Dennehy, T. J. and T. J. Glover. 1988. Genetic analysis of dicofol resistance in two-spotted spider mite from New York Apple Orchards. J. Econ. Entomol. 81(5): 1271-1276.
- FAO (1979). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Protection Bull. 27: 29-32.
- Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge at the Univ. Press. 3rd Ed. 50-80 pp.
- Georghiou, P. G. and T. Saito. 1983. Resistance to pesticides. Plenum Press. New York, USA. 809 pp.
- Georghiou, G.P and A. Lagunes T. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. FAO. Rome, Italy. 318 pp.
- Goodwin, S., G. Herron, N. Gough, T. Wellham, J. Rophail, and R.Parker. 1995. Relationship between insecticide-acaricide resistance and field control in *Tetranychus urticae* (tetranychidae) infesting roses. J. Econ. Entomol. 88(5): 1106-1112.
- Gould, M. J., Burn, A. J., Croaker, T. H. and Jeppson, P. C. 1987. Protected crops (Integrated pest management). Ed. Academic Press. New York, USA. 605 pp.

- Grafton-Cardwell, E. E., Granett, J. and Dennehy, T. J. 1987. Quick tests for pesticide resistance in spider mites. Calif. Agric. 41 (7): 8-10.
- Gunthart, H. E. 1945. Uber spinnmilben und naturliche feinde. Schweiz Ent. Gesell. Mitt. 19 (8): 279-308.
- Herron, G.A., Rophail J. and Wilson L. J. 2001. The development of bifenthrin resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from Australian cotton. Exp. and Appl. Acarol. 25 (4): 301-310.
- Hoyt, S. C., P.H. Westigard, and B.A. Croft. 1985. Cyhexatin resistance in Oregon populations of *Tetranychus urticae* Koch. J. Econ. Entomol. 78(3): 656-659.
- Jacobson, R.J., Croft, P. and Fenlon, J. 1999. Response to fenbutatin oxide in populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in UK protected crops. Crop Protection. 18 (1): 47-52.
- James, D. G. and Price, T. S. 2000. Abamectin resistance in spider mites on hops. Agrichemical & Environmental News. 170:4-6.
- Jeppson, L. K., H. M. Keifer and E.N. Baker. 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press. The Angeles, USA. 614 pp.
- Khambay, P. S., Duncan B., Cahill M. and Denholm, I. 1999. Isolation, characterization, and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. J. Agric. Food Chem. 47: 770-775.
- Lienk. S.E., P.J. Chapman and A. Myburgh. 1952. Evaluation of acaricidas against three species of orchard mites. Journal. Econ. Entomol. 45(2): 290-297.

- Rizzieri, D.A ., T. J. Dennehy and T. J. Glover. 1988. Genetic analysis of the dicofol resistance in two populations of two-spotted spider mite. J. Econ. Entomol. 81(5) 1277-1283.
- Sato, M. E., Passerotti, C. M., Takematsu, A. P., de Souza M .F. e Potenza, M. R. 2000. Resistência de *Tetranychus urticae* (koch, 1836) a acaricidas, em Pessegueiro (*Prunus persica* (l.) batsch) em Paranapanema e Jundiá, sp. Arquivos Instituto Biológico. 67 (1): 20-24.
- Steiner, L. F., Arnold, C. H. and Summerland S. A. 1944. Laboratory and field tests of DDT for control of the codling moth. J. Econ. Entomol. 37 (1): 156-157.
- Tian, T., Grafton-Cardwell, E. and Granett, J. 1992. Resistance of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to cihexatin and fenbutatin oxide in California pears. J. Econ. Entomol. 85 (6): 2088-2095.
- Yang, X., Lawrent, L., Zhu, K. and Margolies, D. C. 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari: Tetranychidae) after selection with three insecticides. J. Econ. Entomol. 95(2): 399-406.

DETECCIÓN DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA POR PRODUCTOS SINERGISTAS
EN UNA LINEA DE CAMPO DE *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH
(ACARI: TETRANYCHIDAE)

* Ernesto Cerna

** Jerónimo Landeros

** Eugenio Guerrero

** Alberto Flores

*** Adriana E. Flores

*** M. H. Badii

* Alumno del Doctorado en Ciencias en Parasitología Agrícola de la Universidad

Autónoma Agraria Antonio Narro. jabaly1@yahoo.com

** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. C.P. 25315.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. jlanflo@uaaan.mx

*** Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Biología, Unidad B. C.P. 3916650. San Nicolás

de los Garza, Nuevo León, México.

Cerna *et al.*, Resistencia enzimática en *T. urticae*

DETECCIÓN DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA POR PRODUCTOS SINERGISTAS
EN UNA LINEA DE CAMPO DE *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH
(ACARI: TETRANYCHIDAE)

RESUMEN

Se colectaron ácaros de dos manchas en campos productores de fresa del estado de Guanajuato, México. El material colectado se trasladó al laboratorio de acarología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Ahí se realizaron una serie de bioensayos para determinar el nivel de resistencia, coeficiente de cototoxicidad, así como los mecanismos enzimáticos de resistencia presentes. Utilizando una línea susceptible de *T. urticae* como referencia (Narro susceptible, L-NS). Para realizar los bioensayos se utilizó la técnica de inmersión en hoja. Los resultados indican que la proporción de resistencia entre la línea de campo y la susceptible, mostró valores de 57.4, 8.0, 11.2, 11.3 y 9.0 veces para los productos abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled respectivamente. Por otro lado la mezcla del sinergista butóxido de piperonilo (BP) más los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled incrementan su toxicidad en 7.86, 3.69, 10.78, 2.45 y 4.79 veces respectivamente. Para el sinergista SSS-tributilfosforotritioato (DEF) el incremento fue 2.15, 6.65, 5.54, 1.73 y 2.65 veces; y para el dietil maleato (DEM) fue 3.17, 2.44, 3.90, 1.95 y 6.34 veces para los mismos acaricidas. Por lo anterior los valores más altos de sinergismo se obtuvieron

con el butóxido de piperonilo, lo cual indica que la mayor causa de resistencia fisiológica para la línea de campo de *T. urticae* es a causa de enzimas oxidasas.

Palabras clave: ácaro de dos manchas, resistencia enzimática, proporción de resistencia, coeficiente de cotoxicidad

ENZYMATIC RESISTANCE DETECTION BY SYNERGIST PRODUCTS IN A
FIELD *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH STRAIN
(ACARI: TETRANYCHIDAE)

SUMMARY

Collections of two spotted mites were made in strawberry production fields in the state of Guanajuato, Mexico. The collected material was taken to the laboratory of acarology in the University Autonoma Agraria Antonio Narro. Several bioassays were conducted to determine the resistance proportion, cototoxicity coefficient and to determine the enzymatic resistance mechanisms, using a *T. urticae* susceptible line as reference (Narro susceptible, L-NS). For the bioassays using the leaf immersion technique. The results indicated that the resistance proportion among field strain and susceptible line was 57.4, 8.0, 11.2, 11.3 y 9.0 times plus the miticides avermectin, bifenthrin, dicofol, fenbutatin oxide and naled respectively. For the other side the mixture of synergist piperonyl butoxide (PB) plus the miticides avermectin, bifenthrin, dicofol, fenbutatin oxide and naled increased their toxicity in 7.86, 3.69, 10.78, 2.45 and 4.79 times respectively. Using the synergist SSS_tributylphosphorotrithioate (DEF) the increase was 2.15, 6.65, 5.54, 1.73 and 2.65 times; and diethyl maleate (DEM) had 3.17, 2.44, 3.90, 1.95 and 6.34 times more toxicity for the same miticides. The highest values of synergism were obtained with the piperonyl butoxide, which indicates that the greater cause of physiological resistance for *T. urticae* is due to the oxidase enzymes.

Words key: two spotted mites, enzymatic resistance, resistance proportion, cototoxicity coefficient.

INTRODUCCIÓN

La arañita de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch, 1968. (Acari: Tetranychidae) es la plaga principal de una gran variedad de plantas y es catalogada como una de las especies que más daños ocasionan a la agricultura en el mundo (Jeppson *et al.*, 1975). Su importancia radica en el uso inapropiado de acaricidas sintéticos para su control, lo que ha ocasionado un elevado desarrollo de la resistencia. (Granham y Helle, 1985). El manejo deficiente de acaricidas contra *T. urticae* data de mas de 70 años, iniciando con los primeros registros en la década de los 30's (Georghiou y Saito, 1983) donde reportan problemas de control utilizando selenosulfito potasico. Steiner *et al.* (1944) reportan que la actividad del DDT, incrementa las poblaciones de ácaros. Posterior a la introducción de los acaricidas organofosforados, Lienk *et al.* (1952) reportan problemas en el control de *T. urticae*, utilizando altas concentraciones de paration metilico. En respuesta a estos problemas se creó la necesidad de contar con acaricidas de larga vida, uno de ellos el dicofol, acaricida utilizado en los últimos 25 años y aparece como un candidato positivo para la resistencia (Grafton-Cardwell *et al.*, 1987). Desde su introducción en 1956 los acaricidas organoestanosos, han sido utilizados con regularidad, por lo que también a estos productos se han registrado casos de resistencia (Croft *et al.* 1984). Finalmente algunas poblaciones de *T. urticae* muestran resistencia a acaricidas más recientes como es el caso de las abamectinas (Campos *et al.*, 1995). En México, los primeros reportes de resistencia fueron hacia productos clorados como el keltane y clorobencilato (Velasco y Pacheco, 1968), Así mismo Cotero y Sánchez (1990) probando una serie de acaricidas en el cultivo del clavel en la zona de Villa Guerrero contra *T. urticae*, reportan una Cl_{50} para los productos clorados

endosulfan y dicofol de 13,180 y 2804 ppm respectivamente, y de 3109 ppm para el producto fosforado ometoato; superando por mas de 10 veces los valores de CI_{50} de la línea susceptible de referencia; de este mismo modo, Luna (1993), reporta un incremento en las dosis de abamectina para el control de *T. urticae* en cultivos de fresas en el estado de Guanajuato. Este fenómeno es un problema serio, ya que se ha presentado prácticamente para todos los acaricidas (Georghiou y Lagunes, 1991). Se ha encontrado que insectos y ácaros son capaces de resistir los efectos tóxicos de los insecticidas y acaricidas a través de una gran variedad de mecanismos de defensa (Georghiou y Saito, 1983). En la mayoría de los casos el principal mecanismo de resistencia es a través de enzimas detoxificativas (Benbrook, 1986). Este tipo de resistencia se refiere a que los plaguicidas pueden ser metabolizados y transformados en productos menos tóxicos (Georghiou, 1971). Los principales sistemas enzimáticos responsables del metabolismo de insecticidas son: oxidasas microsómicas (Wilkinson, 1983), esterasas y carboxiesterasas (Yasutomi, 1983), y glutation s-transferasas (Dauterman, 1983). Se han utilizado pruebas de laboratorio mediante el uso de productos sinergistas para determinar el tipo de complejo de enzimas presente (Metcalf, 1967). De los productos sinergistas más utilizados en pruebas de laboratorio se encuentra el butóxido de piperonilo, el cual es un inhibidor de oxidasas que en su estructura presenta un grupo metileno dioxifenil, el cual es de mayor atracción hacia enzimas oxidasas (Wilkinson, 1973). El SSS-tributilfosforotritioato es un inhibidor de esterasas, con efecto sinergista elevado en fosforados dimetiles, y en menor como un inhibidor de glutation s-transferasas, pero en menor medida; mientras que el dietil maleato es un inhibidor específico de glutation s-transferasas (Lagunes y Villanueva, 1994). Por lo que el objetivo en esta investigación es generar información sobre los

mecanismos enzimáticos de resistencia en líneas de campo de *Tetranychus urticae* Koch colectado en cultivos de fresa de Guanajuato, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea susceptible (N-s): Para el desarrollo de esta investigación se utilizó como referencia una línea susceptible de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. La cual se ha mantenido sin presión de selección por plaguicidas durante cuatro años sobre plantas de frijol en una de las cámaras bioclimáticas del laboratorio de acarología a temperatura de 25 ± 2 °C, 60 a 70 % de humedad relativa y condiciones de 12:12 luz: oscuridad, respectivamente.

Línea de campo: Se colectaron arañas rojas de campos productores de fresa de los municipios de Abasolo e Irapuato Guanajuato (Seis predios por municipio). Los ácaros colectados se trasladaron a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México, en donde se establecieron en una cámara bioclimática del laboratorio de acarología sobre plantas de frijol variedad lima formando una población compuesta, bajo condiciones similares que la línea de referencia descrita antes. Se procedió al desarrollo de los bioensayos en las subsecuentes generaciones (F_1 a F_3).

Bioensayos: Los bioensayos se realizaron de acuerdo a la técnica de inmersión en hoja (FAO, 1979), para ello se seleccionaron folíolos de frijol con al menos 30 ácaros

adultos hembra por concentración, los foliolos tratados se depositaban sobre esponjas saturadas de agua en charolas de plástico (Abou-Setta, 1987). Los acaricidas utilizados fueron seleccionados de acuerdo al manejo reportado por los productores el día de las colectas, así como por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (Campaña de Manejo Fitosanitario de la Fresa, 2002), siendo los acaricidas seleccionados abamectina® (Lactona macrocíclica), bifentrina® (Piretroide), dicofol® (Organoclorado), óxido de fenbutatin® (Organoestano) y naled® (Fosforado); así como los sinergistas butóxido de piperonilo®, dietil maleato® y SSS-tributilfosforotritioato®.

Determinación de la CL₅₀ de los acaricidas: Para la preparación de las diferentes concentraciones se utilizó agua destilada y el producto bionex® como dispersante, en una proporción 1ml: 1L de agua. El rango de concentraciones utilizadas fue de 50 a 6000 ppm, excepto para la abamectina que osciló de 0.1 ppm a 8.0 ppm. Se tomó como criterio de muerte la inmovilidad total, síntomas de ataxia o el desplazamiento menor al tamaño de su cuerpo al recibir un estímulo táctil con un pincel. Las lecturas de mortalidad se realizaron a las 24 h, excepto para la abamectina que se obtuvo a las 48 h.

Proporción de resistencia: Una vez determinados los niveles de CL₅₀ para la línea de campo y la susceptible de referencia, se determinó la proporción de resistencia dividiendo la CL₅₀ de la línea de campo contra la CL₅₀ de la línea susceptible (Georghiou, 1962).

Evaluación de la mezcla acaricida mas sinergistas: Después de determinar los niveles de CL₅₀ de los acaricidas, se realizaron bioensayos para determinar el efecto de

las mezclas de acaricidas con los sinergistas, utilizando diferentes proporciones del sinergista desde 1:20, hasta la proporción 1:2 (Acaricida: sinergista), respectivamente. Se prepararon para ello soluciones seriales, en base a la CL_{50} de los acaricidas. Los sinergistas evaluados fueron butóxido de piperonilo, dietil maleato y SSS-tributilfosforotritioato, en una proporción 1:2 (acaricida: sinergista). Se utilizó el mismo criterio de muerte que en la etapa anterior y las lecturas de mortalidad se realizaron para todas las mezclas a las 24 h. Además se determinó el coeficiente de cototoxicidad, utilizando la CL_{50} de los acaricidas solos contra la CL_{50} de la mezcla con los sinergistas (Lagunes y Villanueva, 1994).

Análisis de datos: Cuando en el testigo se presentó mortalidad, los resultados se corrigieron mediante la fórmula de Abbott (1925). Además se realizó un análisis Probit por el método de máxima verosimilitud (Finney, 1971), mediante el programa computarizado Polo PC (1987).

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados de CL_{50} obtenidos con los acaricidas en la línea de laboratorio (N-s) de *T. urticae*. Como se puede observar la CL_{50} fue de 0.02, 242, 177, 363 y 302 ppm para los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled respectivamente; mientras que, para la línea de campo (Tabla 2), los valores fueron de 1.03, 1943, 1995, 4107 y 2720 ppm, para los mismos acaricidas. Estos

resultados indican una proporción de resistencia de la línea de campo en función a la línea de referencia (N-s), de 51.5, 8.0, 11.2, 11.3 y 9.0 veces (Tabla 2), para la abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled respectivamente.

En el caso de la mezcla de los productos acaricidas con el sinergista butóxido de piperonilo (BP) (tabla 3), se observa que la CL_{50} con abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled, fue de 0.131, 526, 185, 1671 y 567 ppm, respectivamente. Además de estos resultados, se obtuvo un coeficiente de cotoxicidad (CC) de 7.86, 3.69, 10.78, 2.45 y 4.79 X para los mismos productos.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en la mezcla del SSS-tributilfosforotritioato (DEF) mas los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled, como se puede observar la CL_{50} presenta valores de 0.477, 292, 360, 2366 y 1023 ppm respectivamente, y valores de cotoxicidad de 2.15, 6.65, 5.54, 1.73 y 2.65 X, para estos acaricidas respectivamente.

En relación a los resultados obtenidos de la mezcla del dietil maleato (DEM) mas los acaricidas abamectina, bifentrina, dicofol, óxido de fenbutatin y naled. Como se puede observar la CL_{50} presenta valores de 0.324, 796, 511, 2097 Y 429 ppm, respectivamente (Tabla 5). Mientras que el CC fue de 3.17, 2.44, 3.90, 1.95 y 6.34 veces, para los mismos acaricidas.

DISCUSIONES

Proporción de resistencia: La proporción de resistencia de la línea de campo en comparación a la línea de referencia colocan a la abamectina (51.5 X), con la mayor proporción de resistencia, lo anterior se explica por el elevado número de aplicaciones por temporada; en el lugar en donde se obtuvo la línea de campo (10 o más aplicaciones). Al respecto, Campos *et al.* (1996) encontraron una proporción de resistencia de 0.5 a 175 veces, en diferentes líneas provenientes de California, Florida, Islas Canarias y Holanda; estos mismos investigadores (1995), mencionan que las líneas que reciben menos de seis aplicaciones por año de abamectina presentan una proporción de resistencia estable, mientras que las poblaciones de campo que reciben más de 30 el incremento de resistencia puede llegar a 1597 veces.

Una situación importante de señalar para el acaricida bifentrina es su baja proporción de resistencia, el cual no sobrepasa el umbral de resistencia (10 X) y por lo mismo es necesario cuidar su manejo. Un estudio realizado con bifentrina por Yang *et al.* (2002) reportan una resistencia de 4.5 veces, así mismo mencionan que el producto puede presentar efectos de resistencia cruzada positiva a clorados.

Por su parte los productos dicofol y óxido de fenbutatin, sobrepasan el umbral de resistencia, debido en gran parte a que estos acaricidas se emplean mayormente para el control de *T. urticae* en el cultivo de la fresa en el estado de Guanajuato. Al respecto Dennehy *et al.* (1987) reportan para el cultivo del algodón una resistencia de 168 veces, y de 15X en poblaciones colectadas en huertos de manzano para el producto

dicofol (Dennehy y Glover, 1988). En relación a el oxido de fenbutatin Goodwing *et al.*(1995) reportan una proporción de resistencia de 2.4 a 464 veces, en líneas colectadas en rosas.

Efecto del butóxido de piperonilo: La razón de encontrar un mayor coeficiente de cotoxicidad para los acaricidas abamectina (7.86 X) y dicofol (10.78 X), probablemente se debe al hecho de que este tipo de moléculas presentan una mayor afinidad que con los demás acaricidas, por otro lado se muestra que este sinergista actúa inhibiendo las enzimas oxidasas, lo que indica que parte de la población en estudio mostro resistencia en mayor proporción debido a la presencia de esta enzima. Al respecto Clark *et al.* (1994), mencionan que el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina son las enzimas oxidativas. Así mismo, Cremllyn (1985) y Lipke y Kearns (1960), mencionan que las enzimas oxidativas también intervienen en la perdida de la efectividad de acaricidas clorados. Los resultados obtenidos con la abamectina más el butóxido de piperonilo, resultó ser inferior a lo obtenido por Stumpf y Nauen (2002),cuya mezcla les dio un CC de 26 a 54 X en líneas resistentes de *T. urticae*. Por otro lado, Young *et al.* (2004) reportan que el BP presenta buenos efectos como sinergista con el acaricida abamectina para el control de *T. urticae*. En relación al acaricida dicofol, estos resultados difieren a lo reportado por Zhijin y Nian (1996), quienes señalan un CC para una línea de *Tetranychus truncatus* de 6.0 X.

En el caso de los productos bifentrina, óxido de fenbutatin y naled, cuyos CC fueron mas bajos (3.69, 2.45 y 4.79 X, respectivamente); posiblemente se deba a la polaridad de las moléculas y sus diferentes sitios de acción para las enzimas

detoxificativas; al respecto Wilkinson (1983), menciona que el grupo toxicológico donde se conocen más rutas metabólicas por oxidasas son los del DDT, los demás grupos presentan generalmente otros diseños de degradación, aunque también presentan un cierto grado de sinergismo, debido principalmente a que las enzimas oxidasas ayudan a otros mecanismos enzimáticos en diferentes etapas de los procesos de detoxificación (Yasutomi, 1983).

Efecto del SSS-tributilfosforotritioato: El alto grado de sinergismo de este producto se obtuvo con los acaricidas bifentrina y dicofol (Tabla 4), presentando valores de 6.65 y 5.54 X, respectivamente. Para el primer caso resulta obvio ya que de antemano se sabe que al grupo al cual pertenece este acaricida (Piretroides) es detoxificado por esterasas, sin embargo para el caso del acaricida dicofol, no es explicable, aunque Ahmad y Hollingworth (2004) atribuyen el efecto sinergista de dicofol más DEF a un posible estrés oxidativo, provocado por el sinergista. Por su parte, Lagunes y Villanueva (1994), mencionan que, en el caso de la bifentrina la unión éster de los piretroides constituye el sitio vulnerable de la molécula, donde actúan esterasas específicas. Al comparar estos resultados, con respecto a la bifentrina encontramos que, los resultados encontrados (6.65 X), difieren a lo reportado por Bynum *et al.* (1997), quienes encontraron para una línea de *T. urticae* resistente de campo en el cultivo de maíz, un CC de 3.6 X, mientras que, Scott *et al.* (1990), trabajando con cucarachas, reportan un CC para los piretroides cipermetrina y deltametrina de 2.5 y 1.6 X respectivamente. En cuanto al acaricida dicofol el CC (5.54 X), difiere a lo reportado por Prabhaker *et al.* (1988), quienes mencionan que al mezclar DEF con el clorado DDT, en

una línea de campo de *Bemisia tabaci* presentó un efecto antagónico que implicó un aumento en la concentración del acaricida.

La actividad sinergista baja con los acaricidas abamectina, óxido de fenbutatin y naled; se debe en gran medida a que las enzimas esterasas necesitan uniones ester como sitio de acción; al respecto Metcalf (1967), menciona que la acción de los productos sinergistas esta sujeta en gran parte a la combinación del mecanismo detoxificador del producto evaluado y de la buena elección del sinergista.

Efecto del dietil maleato: El grado alto de cotoxicidad obtenido con la mezcla de este sinergista mas el acaricidas naled (Tabla 5), se debe a que la molécula de este acaricida presenta en su estructura dimetil ésteres, los cuales atraen en mayor grado a enzimas glutathion s-transferasas lo que da el efecto sinergista. Al respecto Dauterman (1983), menciona que las enzimas del glutathion s-transferasas es un mecanismo de desactivación originado de un solo gen, trabajando en grupos aquil o aril; del mismo modo, Brasttsten *et al.* (1986), menciona que las enzimas glutathion s-transferasas son importantes en la detoxificación de fosforados. El efecto sinergista obtenido con el acaricida naled (CC = 6.34 X) difiere a lo reportado por otros investigadores, Martín *et al.* (1997) no encontró un efecto sinergista en estudios realizados en el gusano del tabaco con malation. Chen (1990), trabajando con *Rhizoglyphus robini*, al evaluar varios fosforados reportó que no hay efecto sinergista.

CONCLUSIONES

Por el alto grado de proporción de resistencia en las poblaciones de *T. urticae* que se presenta en la región fresera del estado de Guanajuato, se puede mencionar que el producto abamectina presenta ya problemas de resistencia.

En relación a los mecanismos detoxificativos encontrados en estas poblaciones, encontramos que los valores mas altos de sinergismo se obtuvieron con el butóxido de piperonilo en la mezcla con el dicofol, abamectina y naled con 10.78, 7.86 y 4.79 X respectivamente (Fig. 1). Lo anterior es un indicativo que la mayor causa de resistencia fisiológica para la línea de campo de *T. urticae* de Guanajuato, es a causa de enzimas oxidasas. Esto se debe posiblemente a que los productos utilizados desde inicios del cultivo en la región son plaguicidas del grupo de los clorados, que en su mayoría son responsables de alterar este tipo de enzimas detoxificativas.

Al analizar el efecto por producto, los datos obtenidos sugieren que en los acaricidas evaluados, los tres mecanismos fisiológicos como son oxidasas, esterases y glutation s-transferasas, participan en la degradación de los tóxicos aunque en diferentes proporciones.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Abou-Setta, M. M. and Childers, C. C. 1987. A modified leaf arena technique for rearing phytoseiid or tetranychid mites for biological studies. *Florida Entomol.* 70: 245-248.
- Ahmad, M. and Hollingworth, R. M. 2004. Synergism of insecticides provides evidence of metabolic mechanisms of resistance in the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science* 60 (5) : 465-473.
- Brattsten, L. B. 1989. Insecticide resistance: Research and management. *Pestic. Sci.* 26:329-332.
- Benbrook, C. M. 1986. *Pesticide resistance: strategies and tactics for management.* National Academic Press. Washington, D. C. 471 pp.
- Bynum, E. D., Archer, T. L. and Plapp, F. W. 1997. Comparison of banks grass mite and twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae): Responses to insecticides alone and in synergistic combinations. *J. Econ. Entomol.* 90 (5) : 1125-1130.
- CESAPEG. 2002. Campaña de manejo fitosanitario de la fresa. Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato.
- Campos, F., R.A. Dybas, and D.A. Krupa. 1995. Susceptibility of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. *J. Econ. Entomol.* 88(2) : 225-231.

- Campos, F., D. A. Krupa and R. A. Dybas. 1996. Susceptibility of populations of two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance. *J. Econ. Entomol.* 89(3) : 594-601.
- Chen, J. S. 1990. Genetic analysis and effects of synergists on diazinon resistance in the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparede (Acari: Acaridae). *Pesticide Science* 28 (3) : 249-257.
- Clark, J.M., Scott, J. G., Campos, F. and Bloomquist, J. R. 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 1-30.
- Cotero. E.S and G.M. Sanchez. 1989. Niveles de susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acárida: Tetranychidae) a ocho acaricidas en el cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L) en la región de Villa Guerrero México. *Rev. Chapingo* Vol. XIV N° 65*66. pp. 145-148.
- Cremllyn, R. J. 1985. *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Ed. Limusa. 356 pp.
- Croft, B. A., Miller, R. W., Nelson, R. D. and Westigard, P. H. 1984. Inheritance of early-stage resistance to formetanate and cihexatin in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) *J. Econ. Entomol.* 77 (5): 574-578.
- Dauterman, W. C. 1983. Role of hydrolases and glutathione s-transferases in insecticides resistance. in Georghiou G.P. and T. Saito (eds.) *Pest Resistance Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 229-247.
- Dennehy. T.J., E.E. Grafton-Cardewell., J. Granett and K. Barbour. 1987. Practitioner assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 80(5): 998-1003.

- Dennehy T. J. and T. J. Glover. 1988. Genetic analysis of dicofol resistance in two spotted spider mite from New York apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 81 (5): 1271-1276.
- FAO (1979). *Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides*. FAO. Plant Protection Bull. 27: 29-32.
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge at the Univ. Press. 3rd Ed. Pp 50-80.
- Georghiou, G.P. 1962. Carbamate insecticides: Toxication of synergized carbamates against twelve resistant strain of the house fly. *J. Econ. Entomol.* 55: 768-769.
- Georghiou, G.P. 1971. Resistance of insects and mites to insecticides and acaricidas and the future of pesticide chemicals. En: swift, J.E. (ed.) *Agricultural Chemical Harmony or Discord for Food People and Environment*. Univ. California Div. Agr. Sci. 151 p.
- Georghiou, P. G. and T. Saito. 1983. *Resistance to pesticides*. Plenum Press. New York, USA. 809 pp.
- Georghiou, G.P. and A. Lagunes T. 1991. *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods*. FAO. Rome, Italy. 318 pp.
- Goodwin, S., G. Herron, N. Gough, T. Wellham, J. Rophail, and R.Parker. 1995. Relationship between insecticide-acaricide resistance and field control in *Tertranychus urticae* (tetranychidae) infesting roses. *J. Econ. Entomol.* 88(5): 1106-1112.
- Grafton-Cardwell, E. E., Granett, J. and Dennehy, T. J. 1987. Quick tests for pesticide resistance in spider mites. *Calif. Agric.* 41 (7): 8-10.

- Granham J. E. and Helle, W. 1985. Pesticide resistance in Tetranychidae. Pp 405-421.
in W. Helle y M. W. Sabelis (edit). *Spider mites. Their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam.
- Jeppson, L. K., H. M. Keifer and E.N. Baker. 1975. *Mites injurious to economic plants*.
University of California Press. The Angeles, USA. 614 pp.
- Lagunes, T. A. y Villanueva, J. J. A. 1994. *Toxicología y manejo de insecticidas*.
Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 265 pp.
- Lienk, S. E., P. J. Capman and A. Myburgh. 1952. Evaluation of acaricidas against three
species of orchard mites. *J. Econ. Entomol.* 45: 290-297.
- Lipke, H. and Kearns, L. W. 1960. DDT-asa. In: Metcalf, R. L. (edit). *Advances in pest
control research*. Vol. III. Interscience Publishers Inc. New York. pp. 253-
287.
- Luna, B. J. 1993. Determinación de líneas de respuesta Dosis- Mortalidad del ácaro
Tetranychus urticae. A acaricidas en la zona de Abasolo Guanajuato. *Tesis de
licenciatura UAAAN*. Saltillo, Coahuila. México.
- Martin, S. H., Ottea, J. A., Leonard, B. R., Graves, J. B., Burris, E., Micinski, S. and
Church, G. E. 1997. Effects of selected synergists on insecticide toxicity in
tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) in laboratory and field studies.
Jour. Econ. Entomol. 90 (3) : 723-731.
- Metcalf, R. L. 1967. Mode of action of insecticide synergists. *Annu. Rev. Entomol.* 12:
229-256.
- Polo PC. 1987. *Probit or logit analysis* (Software). Berkeley, CA. Loera Software.

- Prabhaker, N., Coudriet, D. L. and Toscano, N. C. 1988. Effect of synergists on organophosphate and permethrin resistance in sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Jour. Econ. Entomol.* 81 (1) : 34-39.
- Scott, G. J., Cochran, G. D. and Siegfried, D. B. 1990. Insecticide toxicity, synergism and resistance in the german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Jour. Econ. Entomol.* 83 (5): 1698-1703.
- Steiner, L. F., Arnold, C. H. and Summerland S. A. 1944. Laboratory and field tests of DDT for control of the codling moth. *J. Econ. Entomol.* 37: 156-157.
- Stumpf, N. and Nauen, R. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pest. Biochem. and Phy.* 72 (2) : 111-121.
- Velasco H. y F. Pacheco. 1968. Biología, morfología y evaluación tóxica de acaricidas en la araña roja de la fresa *Tetranychus telarius* L. *Agrociencia* Vol. 3, N.1: 43-53 pp.
- Wilkinson, C.F. 1973. *Insecticide biochemistry and physiology*. Plenum Press. New York. 753 pp.
- Wilkinson, C.F. 1983. Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 175-205.
- Yang, X., Lawrent, L., Zhu, K. and Margolies, D. C. 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari: Tetranychidae) after selection with three insecticides. *J. Econ. Entomol.* 95: 399-406.

- Yasutomi, K. 1983. Role of detoxication esterases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 249-263.
- Young Joon Kim, Lee Si Hyeock, Lee Si Woo and Ahn Young Joon. 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Mana. Science* 60 (10) : 1001-1006.
- ZhiJin Fan and Chen Nian Chun. 1996. Studies on the insecticidal resistance mechanisms of cotton spider mite. *Acta Phytophylacica Sinica* 23 (2) : 175-180.

TABLA 1.

Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas aplicados a la línea susceptible N-s de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch.

Línea susceptible de laboratorio N-s							
Acaricida	n	ppm			pendiente	g.l.	r ²
		CL ₅₀	Límites fiduciales	CL ₉₅			
		95%					
Abamectina	865	0.02	(0.0025-0.0490)	4.920	0.676 ± 0.231	4	0.845
Bifentrina	627	242	(187.95-296.945)	3569	1.406 ± 0.290	4	0.945
Dicofol	1051	177	(142.42-213.87)	2933	1.348 ± 0.487	4	0.954
Oxido de fenbutatin	729	363	(261.96-459.87)	5578	1.385 ± 0.319	4	0.920
Naled	616	302	(244.92-362.45)	3638	1.521 + 0.484	4	0.865

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad y r²: Coeficiente de determinación.

TABLA 2

Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas aplicados a la línea de campo de hembras adultas de *Tetranychus urticae* y su proporción de resistencia contra la línea susceptible.

Línea de campo								
ppm								
Acaricida	n	CL ₅₀	Límites fiduciales 95%	CL ₉₅	pendiente	g.l.	r ²	L _c vs Ns
Abamectina	789	1.03	(0.82116-1.3012)	22.78	1.224 ± 0.471	4	0.896	57.4X
Bifentrina	2076	1943	(1736.04-2164.70)	9358	2.409 ± 1.118	4	0.977	8X
Dicofol	1950	1995	(1787.69-2217.33)	9213	2.475 ± 0.913	4	0.986	11.2X
Oxido de fenbutatin	1218	4107	(3666.55-4620.39)	23028	2.196 ± 0.919	4	0.941	11.3X
Naled	1935	2720	(2490.56-2951.12)	8815	3.220 ± 1.180	4	0.975	9X

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad, r²: Coeficiente de determinación y L campo vs. Ns: Proporción de resistencia.

TABLA 3

Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas mas Butóxido de Piperonilo aplicados a hembras adultas de campo de la F₁ a F₃ de *Tetranychus urticae* Koch y su coeficiente de cotoxicidad.

Línea de Campo + Butoxido de Piperonilo (BP)								
Acaricida	n	ppm			pendiente	g.l.	r ²	C.C.
		CL ₅₀	Límites fiduciales 95%	CL ₉₅				
Abamectina	699	0.131	(0.093-0.167)	1.884	1.424 ± 0.316	4	0.99	7.86 X
Bifentrina	1213	526	(457 – 591)	2321	2.551 ± 0.396	4	0.93	3.69 X
Dicofol	1303	185	(114 – 252)	1549	1.782 ± 0.446	4	0.91	10.78 X
Oxido de fenbutatin	1011	1671	(1466 – 1891)	11125	1.998 ± 0.371	4	0.96	2.45 X
Naled	951	567	(441 – 687)	8502	1.398 ± 0.316	4	0.97	4.79 X

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad, r²: Coeficiente de determinación y C.C.: coeficiente de cotoxicidad.

TABLA 4

Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas mas SSS-Tributil-Fosforotritioato aplicados a hembras adultas de campo de la F₁ a F₃ de *Tetranychus urticae* Koch y su coeficiente de cotoxicidad.

Línea de Campo + SSS-Tributil-Fosforotritioato (DEF)

Acaricida	n	ppm			pendiente	g.l.	r ²	C.C.
		CL ₅₀	Límites fiduciales 95%	CL ₉₅				
Abamectina	829	0.477	(0.415-0.552)	4.017	1.778 ± 0.333	4	0.99	2.15 X
Bifentrina	1692	292	(211 – 367)	2419	1.793 ± 0.392	4	0.97	6.65 X
Dicofol	847	360	(296 – 418)	1675	2.461 ± 0.429	4	0.95	5.54 X
Oxido de fenbutatin	957	2366	(2092 – 2712)	15522	2.013 ± 0.396	4	0.96	1.73 X
Naled	823	1023	(891 – 1172)	8050	1.836 ± 0.433	4	0.96	2.65 X

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad, r²: Coeficiente de determinación y C.C.: coeficiente de cotoxicidad.

TABLA 5

Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente de acaricidas mas Dietil Maleato aplicados a hembras adultas de campo de la F₁ a F₃ de *Tetranychus urticae* Koch y su coeficiente de cotoxicidad.

Línea de Campo + Dietil Maleato (DEM)								
Acaricida	n	ppm			pendiente	g.l.	r ²	C.C.
		CL ₅₀	Límites fiduciales 95%	CL ₉₅				
Abamectina	692	0.324	(0.272-0.380)	3.768	1.544 ± 0.309	4	0.98	3.17 X
Bifentrina	1047	796	(713 – 879 9	3392	2.612 ± 0.974	4	0.96	2.44 X
Dicofol	903	511	(451 – 569)	1882	2.906 ± 0.424	4	0.92	3.90 X
Oxido de fenbutatin	724	2097	(1880 – 2346)	10740	2.319 ± 0.406	4	0.97	1.95 X
Naled	803	429	(319 – 531)	5756	1.459 + 0.327	4	0.92	6.34 X

n: Número de hembras adultas de *T. urticae*, g.l.: Grados de libertad, r²: Coeficiente de determinación y C.C.: coeficiente de cotoxicidad.

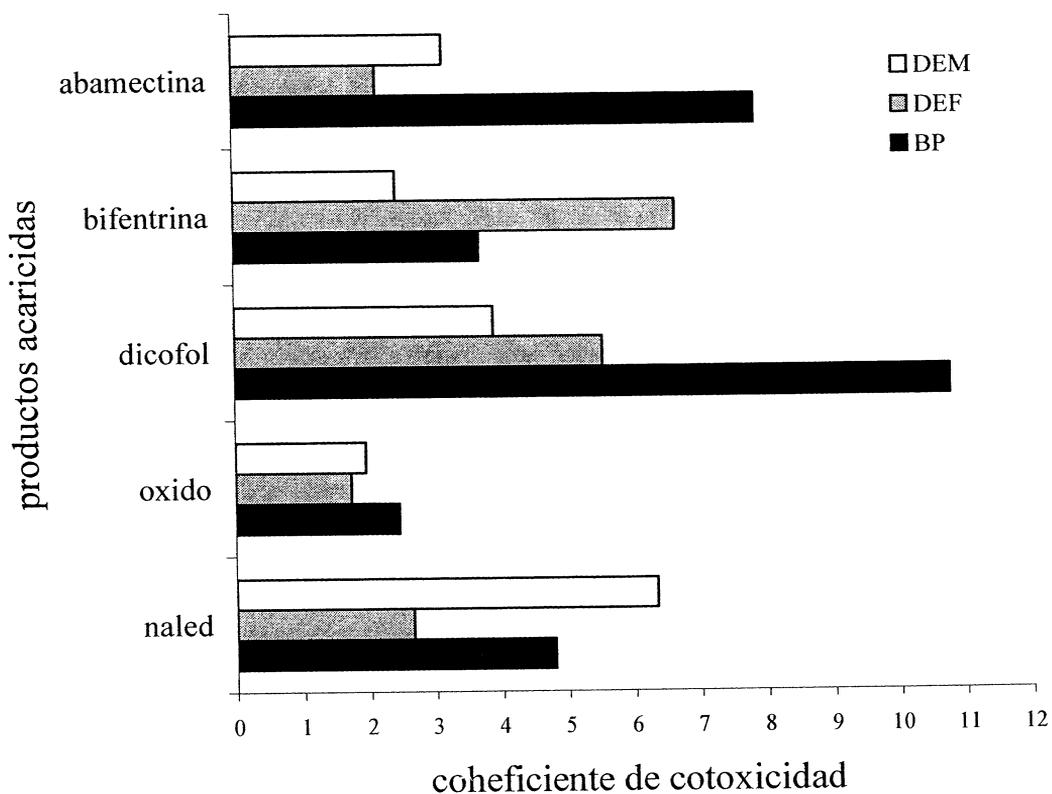


Figura 1

Coeficiente de cototoxicidad de los productos sinergistas butóxido de piperonilo (BP), SSS-tributilfosforotritioato (DEF) y dietil maleato (DEM), para cada uno de los productos acaricidas.

COMPARACION DE METODOS DE CUANTIFICACION DE PROTEINA EN DIFERENTES LINEAS DE *Tetranychus urticae* KOCH

Jerónimo Landeros¹, Ernesto Cerna¹, Eugenio Guerrero¹, Alberto Flores¹, Rosalinda
Mendoza¹ y M. H. Badii²

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. C.P.
25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

² Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Biología, Unidad B. C.P. 39166.
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

RESUMEN

Se determinó un método de cuantificación de proteína para la especie *Tetranychus urticae* Koch, un ácaro fitófago de una gran variedad de plantas tanto cultivadas como silvestres; además se obtuvieron las diferencias en términos de linealidad y absorbancia al probar como diluyentes el buffer fosfato de potasio (pH: 7.2) y el agua desionizada (pH: 7.0). Para el desarrollo del experimento se utilizó una línea susceptible a plaguicidas de *T. urticae*; así como tres líneas de campo, una proveniente de fresa y dos de rosal (variedad Royalty y Rafaela). La cuantificación de proteína se realizó por colorimetría, a través del Kit-II de Bio-Rad, utilizando Albúmina Serica Bobina (BSA) como proteína de referencia. Para la preparación de los homogenatos se utilizaron series de 10, 30, 50, 100, 300, 500 y 800 ácaros, cada una con 30 repeticiones. La linealidad obtenida para la curva estándar de cada uno de los diferentes métodos, mostró valores altos de r^2 (0.876 a 0.988) tanto para las diluciones preparadas con buffer que con agua desionizada; Así mismo, al preparar los homogenatos con los dos diluyentes, se encontró que los homogenatos hechos con buffer de fosfato de potasio

presentaron mayores lecturas de absorbancia. En relación al nivel de proteína de los homogenatos de *T. urticae* el método seleccionado fue el de Bradford modificado por Brogdon (1984), ya que presenta los valores de proteína mas altos para las series de 10, 30 y 50 ácaros, además es mas rápido y versátil. Por último al comparar la cantidad de proteína de las cuatro líneas de ácaros, la línea susceptible de laboratorio presento 0.2148 μg de proteína por cada μg de peso del ácaro, mientras que las líneas de campo de fresa, rosal variedad Royalty y Rafaela mostraron valores de 0.2059, 0.1703 y 0.1550 μg de proteína por cada μg de peso del ácaro.

Palabras clave: Arañita de dos manchas, linearidad, absorbancia, colorimetría, proteína.

ABSTRACT

One method protein quantification was determined for *T. urticae*, is a fitophagous mite of many species of plants. Where was obtained differences in linearity and absorbance to use diluyents destilated water (pH: 7.0) and buffer phosphate (pH: 7.2). For experimental development, was need a susceptible line to plaguicides of *T. urticae* and trhee field lines originating of strawberry and roses (Royalty and Rafaela varieties). The protein quantification was made for the colorimetric method, used Bio-Rad Kit-II, Bovine Serum Albumine (BSA), how reference protein. For homogenates preparate were used series of 10, 30, 50, 100, 300, 500 and 800 mites, for each repetition, with 30 repetitions. The linearity of standard curve for each method, showed high values of r^2 (0.876 to 0.988), for dilutions make with destilated water and buffer phosphate. To homogenates makes with both diluyents, the homogenates were made with buffer phosphate showed highs absorbance lectures. For the protein level in both

homogenates of *T. urticae*, the best method was Bradford's modified by Brogdon (1984). Showed high values the lectin proteins for the series of 10, 30 and 50 mites. To compare amount protein of four lines or mites, the susceptible line showed 0.2148 μg protein for each μg of mite weight, for the field lines of strawberry, rose Royalty variety and Rafaela showed values of 0.2059, 0.1703 and 0.1550 μg protein for each μg of mite weight.

Key words: Twospotted mites, linearity, absorbance, colorimetric, protein.

INTRODUCCIÓN

El monitoreo de la resistencia es esencial en el manejo de insecticidas y acaricidas, es por ello, que se han desarrollado varias metodologías para detectar este fenómeno (Dennehy y Granett, 1984); tal es el caso de pruebas de concentraciones múltiples expresada en términos de concentración letal media (CL_{50}), perfiles de ADN que muestran a los genes responsables de la resistencia a plaguicidas (Keiding, 1986); así como, las pruebas bioquímicas que determinan la actividad y cantidad de las enzimas responsables de este fenómeno (Hemingway, 1986). Por lo que, la determinación y cuantificación de proteína contenida en tejidos y fluidos puede ser usada como referencia para cuantificar diversos componentes en el sistema biológico (Lee *et al.*, 2003). Al respecto Mourya *et al.* (2002), trabajando con la porción cefálica del mosquito *Aedes aegypti*, identificaron mutantes en relación al color de ojos de una población, mediante métodos espectrofotométricos y de cuantificación de proteína. Arilla *et al.* (2002), reportan que los alérgicos del grupo 1 y 5 que más afectan a los

humanos y los cuales son producidos por las plantas gramíneas del tipo de *Dactylis glomerata*, se pueden cuantificar en base al contenido de proteína del polen.

La falta de métodos prácticos para identificar la resistencia en insectos y ácaros, hace necesario relacionar diferentes factores que nos permitan detectar a esta (resistencia), por lo que, podemos asumir que una buena inferencia sería en términos de concentración de proteína relacionada a la cantidad de enzimas responsables de la resistencia a plaguicidas, sin olvidar que esta relación puede ser afectada por el peso, edad, tamaño y número de organismos dentro de la muestra (Brogdon, 1984a). Al respecto Chareonviriyaphap *et al.* (1999), Trabajando con el mosquito *Anopheles albimanus*, de una línea proveniente del salvador, encontraron que la cantidad de proteína y la actividad de las enzimas detoxificativas esta en una relación de 0.554 mg/mL de proteína por mosquito, produciendo una actividad enzimática en α -esterasas de 0.585 y en β -esterasas de 0.711 moles/min/mg de proteína respectivamente; así mismo, Charoenviriyaphap *et al.* (2003) reportan para una línea susceptible del mosquito *Anopheles minimus* proveniente del departamento de salud de Tailandia; presentó un contenido de proteína de 0.781 mg/mL por mosquito, con una actividad enzimática para oxidasas de 4.255 mMol/min/mg de proteína.

Existe una gran variedad de métodos para determinar proteína, como lo es el método de Lowry (1951), el método de Biuret (Layne, 1957) y el método de Bradford (1976), este último es el mas estable y utilizado en los estudios de determinación de proteína en insectos tales como *A. albimanus* (Brogdon, 1984a) y *Plutella xylostella* (Maa y Liao, 2000). Sin embargo este tipo de insectos son de tamaño medio y se pueden

utilizar hasta un individuo por muestra para cuantificar cantidad de proteína y su actividad enzimática. Caso contrario se tiene con especies de tamaño pequeño como son los ácaros. El presente estudio tiene como objetivos, determinar un método de cuantificación de proteína sensible, que permita trabajar con muestras pequeñas de ácaros y comparar las diferencias en términos de linealidad y absorbancia entre los diluyentes agua desionizada y el buffer fosfato de potasio.

MATERIALES Y METODOS

Para la cuantificación de proteína se realizó por colorimetría, a través del Kit-II de Bio-Rad (Azul Brillante de Comassie G-250 como colorante), la Albúmina Serica Bobina (BSA) como proteína de referencia. Las lecturas de absorbancia se realizaron mediante un lector de microplacas Stat-Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, Florida); así como la utilización de pipetas multicanales Rainin (Rainin Instrument Co. Inc., Emeryville, California) y microplacas de 96 posos de fondo plano (Bio-Rad México).

Se utilizó la BSA como proteína de referencia para la formación de una curva estándar para cada método de determinación de proteína. Además se utilizaron dos diluyentes acuosos para preparar las diferentes diluciones. El primero fue buffer de fosfato (pH: 7.2) y el segundo agua desionizada (pH: 7.0). Para trazar la curva de referencia se utilizaron cinco concentraciones de BSA para cada método que variaron de 0.005 a 0.7 mg/mL de proteína, según el rango lineal de cada método.

Obtenidas las curvas de referencia con SBA, se procedió a correr las pruebas con la arañita de dos manchas, para la preparación de los homogenatos se utilizaron los mismos diluyentes (buffer fosfato de potasio y agua desionizada). Estos homogenatos consistieron en siete diferentes concentraciones en relación al número de ácaros (10, 30, 50, 100, 300, 500 y 800 ácaros), cada una con 30 repeticiones. cada repetición se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL agregándole 100 μ L del solvente (buffer o agua) y triturándolos con un homogenizador de tejidos, se aforó a 1 mL con la adición de 900 μ L diluyente, según correspondía.

Los métodos que se compararon fueron; Método de Bradford (1976) para muestras con alto contenido de proteína (Bradford-Alto), Método de Bradford (1976) para muestras con bajo contenido de proteína (Bradford-Bajo), Método de Bradford modificado por Brogdon-Dickinson (1983) y Método de Bradford modificado por Brogdon (1984a).

Para el método de Bradford-Alto, se tomó 10 μ L de BSA para formar curva estándar o 10 μ L del homogenato para realizar la cuantificación, estos se colocaron por triplicado en una placa, se les agregó 200 μ L de colorante diluido (1:4 v/v colorante: agua); se mezcló a 120 vibraciones / minuto y se obtuvo la lectura a T_5 con filtro de 595 nm. En el caso del método de Bradford-Bajo se cambió la cantidad de BSA y del homogenato a 160 μ L; así como, la cantidad del colorante a 40 μ L. Para el método de Brogdon-Dickinson, se tomó 100 μ L de BSA o del homogenato, la muestra se colocó

por triplicado en la placa, se agregó 200 μL de colorante diluido (1:4 colorante: agua), se mezcló a 120 vibraciones / minuto y se obtuvo la lectura a T_{10} con filtro de 595 nm. Por último, para el método de Brogdon se usó 20 μL de BSA o del homogenato, se colocó por triplicado en la placa, se le agregó 80 μL de buffer de fosfato o agua desionizada (según el diluyente preparado para las diluciones de la BSA o el homogenato); así como 200 μL de colorante diluido (1:4 colorante: agua), mezclándose la suspensión a 120 vibraciones / minuto y la lectura a T_0 con filtro de 630 nm.

Para la comparación de los diferentes métodos de cuantificación de proteína se utilizó la línea susceptible a plaguicidas de *T. urticae* (L-Ns), proveniente de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Una vez obtenidos los resultados de la comparación de los métodos y seleccionado a uno de estos, se procedió a determinar y comparar el contenido de proteína de las tres líneas de campo resistentes a plaguicidas.

De las tres líneas de capo utilizadas en este estudio, una de ellas es proveniente del cultivo de fresa variedad Suit Charly del estado de Guanajuato, otra de rosal variedad Royalty del Estado de México y por último una línea de rosal variedad Rafaela proveniente de Coahuila.

El análisis estadístico utilizado para los coeficientes de determinación (r^2) de cada uno de los métodos fue mediante una prueba de "t", con la finalidad de comparar las diferencias entre los dos diluyentes (buffer de fosfato y agua desionizada). De este mismo modo, así mismo, estos coeficientes se analizaron por una prueba de "z". Por

último, se relacionó la cantidad de proteína y el peso de los ácaros mediante una correlación lineal, utilizando el paquete STATISTICA 6.0.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se registran los resultados obtenidos para la obtención de la curva estándar al utilizar BSA para cada uno de los métodos en estudio, como se puede observar en todos los casos se presentó una r^2 adecuada lo cual indica alta linealidad, el método de Brogdon-Dickinson utilizando al buffer de fosfato como diluyente, fue el que presentó el valor más bajo ($r^2= 0.876$), mientras que el valor más alto se obtuvo con el método de Bradford-Alto utilizando como diluyente agua desionizada ($r^2= 0.988$). Al comparar los diluyentes buffer de fosfato de potasio y el agua desionizada mediante la prueba de “t”, mostró diferencia significativa única, ya que solamente, se presentó diferencia para el método de Bradford-Baja ($p: 0.05$).

Al analizar los coeficientes de determinación de los métodos de cuantificación de proteína mediante la prueba de “z” por el método de comparación múltiple de Tukey (Cuadro 1), se encontró la formación de tres grupos en relación a los valores transformados de r^2 , donde se observó que el método de Bradford-Alta con valores de r^2 : 0.9881 (agua) y 0.9855 (buffer) y el método de Brogdon con una r^2 : 0.9912 (agua) y 0.9763 (buffer), se registraron los mejores resultados.

En el cuadro 2, se muestran los valores de pH de las diluciones de BSA, como se puede observar los valores se presentan en forma decreciente en relación inversa a la concentración de BSA para ambos diluyentes (agua y buffer). Por otro lado, en el caso del buffer se presentó una menor variación entre la menor y mayor concentración (7.16-7.20 respectivamente), con un 0.5% de diferencia entre ambos valores. Mientras que, en el caso del agua desionizada el margen de diferencia fue de 6.90 a 7.49, con un 7.8% de diferencia entre ambos valores. Sin embargo la diferencia entre los dos diluyentes no es un indicativo que nos impida usar alguno de ellos.

En relación al contenido de proteína de los homogenatos de la línea susceptible de *T. urticae*, utilizando como diluyente buffer de fosfato y agua desionizada, en el cuadro 3 se observa, que en todos los casos se presentaron valores no confiables por estar fuera del rango lineal, sin embargo, el método que pudiera mencionarse como el más adecuado de acuerdo a las condiciones de nuestro estudio es el método de Brogdon, por presentar buena sensibilidad a las muestras pequeñas en relación al número de ácaros, presentando los valores de proteína más altos para las muestras de 10, 30 y 50 ácaros en comparación con los otros métodos, además de la rapidez y versatilidad.

En el cuadro 4, se presentan los resultados de pH obtenidos de las muestras de los homogenatos de una línea susceptible de *T. urticae*, utilizando como diluyente agua desionizada y el buffer de fosfato. Como se puede observar en el diluyente a base de fosfato de potasio se observó más estabilidad en el pH, con un rango entre el valor más alto y más bajo de 0.28 unidades de pH, que representa un 3.8 %. Mientras que, con el diluyente a base de agua desionizada el rango obtenido fue de 9.6 %. Lo anterior coloca

al buffer fosfato de potasio como un mejor diluyente. Una vez determinado la diferencia de pH entre los dos diluyentes, se procedió a realizar la lectura de absorbancia de las muestras, para cada uno de los cuatro métodos en estudio. Como se puede observar (cuadro 5), en el método de Bradford con alto contenido de proteína, para las muestras de 100, 300 y 500 ácaros, presentó una mayor absorbancia al utilizar como diluyente el agua desionizada, por lo que podemos mencionar que el buffer de fosfato se presenta como un mejor diluyente, ya que influye positivamente en los valores de absorbancia de un homogenato.

Una vez que se determinó el método mas adecuado (Brogdon), se busco la relación entre el peso de la muestra y la cantidad de proteína; así como poder determinar la edad más adecuada para la cuantificación de proteína. Recordando que cada serie de evaluaciones estaba formada por 30 ácaros hembra (con 30 repeticiones) y las edades evaluadas fueron de 2, 4, 8 y 16 días. Al respecto se puede observar en el cuadro 6, que el análisis de regresión reveló una alta correlación entre el peso y el contenido de proteína de hembras adultas de diferentes edades de *T. urticae*, con una r^2 que vario de 0.9606 a 0.9844. Por otro lado el contenido de proteína resulto mayor en hembras con 8 días de edad con 0.2119 μg de proteína por cada μg de peso, lo anterior es un indicativo que nos muestra que esta es la edad más adecuada para llevar a cabo este tipo de experimentos.

Por otro lado al relacionar la cantidad de proteína a intervalos de siete días, para evaluar la confiabilidad del método, se observó que la línea susceptible de *T. urticae* utilizada en este estudio se mantuvo estable en los resultados (cuadro 7). Obteniendo

que, los niveles de proteína son iguales para todas las fechas de muestreo con un promedio de 0.21 μg de proteína. Por lo anterior se puede mencionar que el método de Brogdon utilizado es confiable. En el cuadro 8 se presentan los resultados obtenidos de la cantidad de proteína de las diferentes líneas de *T. urticae* en el estudio, como se puede observar los valores obtenidos fueron de 0.2148, 0.2059, 0.1703 y 0.1550 μg de proteína por cada μg de peso, para la línea susceptible, la línea de fresa, en rosal variedad royalty y en rosal variedad Rafaela respectivamente.

DISCUSIONES

El valor más alto de r^2 fue obtenido con el método de Bradford para muestras con alto contenido de proteína ($r^2= 0.988$), donde el valor más bajo de r^2 se presentó con el método de Brogdon-Dickinson ($r^2= 0.876$), al respecto, Hartree (1972) menciona que las ventajas del método de Bradford (1976) y sus modificaciones, sobre el método de Lowry (1951), son una alta estabilidad, sensibilidad y la mas importante una respuesta altamente lineal, encontrando valores de coeficientes de determinación de 0.994, similares a los reportados en este trabajo.

La razón de encontrar valores cercanos a la neutralidad (7.0), son resultado de la alta estabilidad de los dos diluyentes usados así como la poca variabilidad de las muestras. Al respecto Brogdon (1984a) menciona que valores de los diluyentes de pH entre 6.5 y 8.0, dan resultados similares, lo anterior implica que ambos diluyentes pueden ser usados para este tipo de pruebas; sin embargo, en este estudio se encontró

como mejor diluyente al buffer de fosfato en base a que este presentó menos variación en los resultados.

En relación a la comparación de los diferentes métodos en estudio, el método de Brogdon fue considerado como el mejor, debido a que registro las lecturas mas altas de proteína en las muestras con bajo número de ácaros. Por lo tanto presentó una mayor sensibilidad en relación al número de individuos por muestra. Al respecto Stoscheck (1990), menciona que el criterio para seleccionar un método de cuantificación de proteína esta basado usualmente en la conveniencia, sin olvidar el rango de sensibilidad, la cantidad de muestra necesaria para las pruebas y los detalles del procedimiento, parámetros que se cumplen empleando esta metodología.

Por otro lado, al relacionar el peso de la muestra y la cantidad de proteína, el análisis de regresión reveló una alta correlación; así mismo, se determinó que la edad mas adecuada para cuantificación de proteína es entre 4 y 8 días después de haber alcanzado el estado adulto, siendo menor para las edades 2 y 16 días. En ese sentido, Champ y Dyte (1976), mencionan que algunas características inherentes a la biología de los organismos como fase de desarrollo, edad, peso y sexo de los individuos de prueba influyen definitivamente sobre la respuesta de los organismos. Al respecto Brogdon (1984b), trabajando con el mosquito *A. albimanus* determinó que hembras de 3 días de edad presentaron los niveles mas altos de proteína (140 μg de proteína/mosquito), bajando drásticamente a los 11 días de edad (40 μg de proteína/mosquito). Resultados similares han reportado Lang *et al.*, (1965), quienes mencionan, que la cantidad de

proteína se mantiene estable entre las edades 3 y 6 días en adultos de *Aedes aegypti*. En relación a la alta correlación que se presenta entre el peso y la cantidad de proteína Brogdon (1984a) menciona que dichos valores se pueden utilizar como referencia para comparar organismos de otras líneas.

Al comparar el peso y la cantidad de proteína de las cuatro líneas de *T. urticae*, en la que sobresale la línea susceptible con un peso promedio de 0.2148 μg de proteína por μg de peso, seguido por las líneas de fresa, rosál variedad royalty y rosál variedad Rafaela, con valores de 0.2059, 0.1703 y 0.1550 μg proteína respectivamente, implica que el peso de los individuos de las cuatro líneas están influenciados por el tipo de sustrato alimenticio, al respecto, Mothes y Seits (1981) mencionan que la arañita de dos manchas a diferencia de otros organismos fitófagos, es muy selectiva para alimentarse, ingiriendo solamente pequeños compuestos subcelulares. Algunas de las especies de hospederos de estos ácaros pueden generar metabolitos secundarios que dañan al ácaro alterando su sistema filológico (Mullin y Croft, 1983). Jeppson *et al.* (1975) mencionan que el mejor sustrato para el desarrollo de ácaros en laboratorio, tanto por el contenido de nutrientes como por la facilidad y tamaño de planta es el frijol *Phaseolus vulgaris* var. Lima.

Otro aspecto importante en relación a las diferencias de proteína entre la línea susceptible del presente estudio y las provenientes de fresas y rosál, esta en relación a que estas tres líneas de campo estuvieron sujetas a presión de selección por medio de plaguicidas; por lo que, no se descarta la posibilidad de que presenten variantes genéticas en cuanto al peso y tamaño por desarrollar mecanismos de resistencia. Al

respecto Georghiou y Taylor (1977) citan que la evolución de la resistencia en poblaciones de campo esta dada por factores genéticos, biológicos y de manejo; afectando ciclos biológicos, reproductivos, así como peso y tamaño de los individuos. De este mismo modo Charoenviriyaphap *et al.* (2003) reportan para una línea susceptible del mosquito *A. minimus* un decremento en el contenido de proteína a medida que esta colonia de mosquitos estuvo sujeta a presión de selección con deltametrina, reportando que a F_0 mostró un contenido de proteína de 0.7818 mg/mL por mosquito; reduciéndose hasta 0.6885 mg/mL de proteína en F_{14} .

LITERATURA CITADA

- Arilla M.C., Ibarrola I., Eraso E., Martínez A. y Asturias J. A. 2002. Inmunoensayo para la cuantificación de Dac g 1 en extractos de polen. *Alergol. Inmunol. Clin.* 17: 231-237
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brogdon W. G. 1984a. Mosquito protein microassay-I, protein determination from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 457-460.
- Brogdon W. G. 1984a. Mosquito protein microassay-II, modification for potential field use. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 457-460
- Brogdon W. G. and Dickinson C. M. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography evaluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.
- Chareonviriyaphapa T., Golendab C. F., Robertsc D. R. y Andrec R. G. 1999. Identification of elevated esterase activity in a pyrethroid-resistant population of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Science Asia.* 25:153-156.
- Chareonviriyaphap T., Rongnoparut P., Chantarumporn P. y Bangs M. J. 2003. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. *Journal of Vector Ecology.* 108-116 pp.

- Champ B. R. y Dyte C. E. 1976. Informe de la prospección mundial de la FAO sobre la susceptibilidad a insecticidas de las plagas de granos almacenados. Colección FAO; Producción y Protección Vegetal, N. 5. 63 p.
- Dennehy T. J. and Granett J. 1984. Monitoring dicofol-resistance spider mites (Acari: Tetranychidae) in California cotton. *J. Econ. Entomol.* 77: 1386-1392.
- Georghiou G. P. and Taylor C. E. 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
- Hartree E. F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.* 48: 422-427.
- Jeppson L. K., Keifer H. M. and Baker E. N. 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press. 614 pp.
- Keiding J. 1986. Prediction or resistance risk assessment. In *Pesticide Resistance*. National Academy Press. Washington D. C. pp: 279-297.
- Lang C. A., Lau H. Y. and Jefferson D. J. 1965. Protein and nucleic acid changes during growth and aging in the mosquito. *Biochem. Jour.* 95: 372-377.
- Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzimology.* 10: 447-455.
- Lee S. H., Suh J. K. and Li M. 2003. Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile blue fluorescence. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24: 45-48.
- Lowry O. H., Rosbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 265-275.

- Maa W. C. J. and Liao S. C. 2000. Culture-dependent variation in esterase isozymes and malathion susceptibility of diamondback moth *Plutella xylostella* L. Zoological studies. 39: 375-386.
- Mothes U. and Seitz K. A. 1981. Functional microscopic anatomy of the digestive system of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Acarologia 22: 257-270.
- Mourya D. T., Barde P. V., Ghokale M. D., Mishra A. C., Padbidri V. S., Jaykumar P. C. y Shouche Y. 2002. Rapid method for confirming the identity of red eye and rosy eye colour mutants of *Aedes aegypti* mosquito. Current Science. 83: 119-120.
- Mullin C. A. and Croft B. A. 1983. Host-related alterations of detoxication enzymes in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Environ. Entomol. 12: 1278-1281.
- STATISTICA 6.0. 1998. For windows (Computer program manual). StatSoft, Inc.
- Stoscheck C. M. 1990. Quantitation of protein. Methods in Enzymology. 182: 50-69.

Cuadro 1

Comparación de los coeficientes de determinación, de la curva estándar para cada uno de los métodos de determinación de proteína.

Método	Diluyente	r^2	* Prueba de "t" t= 0.680	* Prueba de "z"
Bradford-Alta	Agua	0.9881		2.254 A
	Buffer	0.9855	0.114	2.242 A
Bradford-Baja	Agua	0.9608		1.945 AB
	Buffer	0.9276	2.451 **	1.636 BC
Brogdon-Dickinson	Agua	0.8844		1.393 C
	Buffer	0.8760	0.225	1.358 C
Brogdon	Agua	0.9912		2.699 A
	Buffer	0.9763	0.475	2.205 AB

* P= 0.05

**= Diferente estadísticamente

Cuadro 2

Efecto del pH de las diluciones de Albúmina Serica Bobina (BSA) en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2) y agua desionizada (pH: 7.0).

BSA en mg/mL	pH	
	Agua	Buffer
0.005	7.49 ± 0.015	7.20 ± 0.008
0.010	7.47 ± 0.011	7.20 ± 0.006
0.050	7.44 ± 0.016	7.20 ± 0.011
0.100	7.27 ± 0.014	7.19 ± 0.013
0.500	7.00 ± 0.048	7.18 ± 0.025
0.700	6.94 ± 0.023	7.17 ± 0.021
1.000	6.90 ± 0.012	7.16 ± 0.019

Cuadro 3

Concentración de proteína de homogenatos de la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2) y agua desionizada (pH: 7.0)

N. de ácaros	Bradford-Alta		Bradford-Baja		Brogdon-Dickinson		Brogdon	
	Rango lineal		mg/ mL de proteína		Rango lineal		Rango lineal	
	0.05-0.5		0.008-0.08		0.05-0.5		0.05-0.5	
	buffer	agua	buffer	agua	buffer	agua	buffer	agua
10	0.048 *	0.014 *	0.026	0.006 *	0.005 *	0.004 *	0.086	0.005 *
30	0.068	0.034 *	0.063	0.047	0.149	0.105	0.137	0.073
50	0.090	0.055	0.084 *	0.073	0.164	0.127	0.202	0.100
100	0.155	0.148	0.163 *	0.132 *	0.244	0.212	0.268	0.149
300	0.219	0.233	0.202 *	0.160 *	0.443	0.372	0.461	0.288
500	0.297	0.311	0.272 *	0.214 *	0.515 *	0.434	0.662 *	0.447
800	0.586 *	0.542 *	0.290 *	0.245 *	0.547 *	0.504 *	0.756 *	0.550 *

* valores no confiables por salir del rango lineal.

Cuadro 4

Efecto del pH de los homogenatos de la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch en diluyentes buffer de fosfato (pH: 7.2) y agua desionizada (pH: 7.0).

Homogenato en número de ácaros	pH	
	Agua	Buffer
10	7.06 ± 0.016	7.18 ± 0.021
30	6.98 ± 0.033	7.16 ± 0.040
50	6.93 ± 0.011	7.15 ± 0.018
100	6.81 ± 0.013	7.08 ± 0.012
300	6.75 ± 0.023	7.03 ± 0.014
500	6.58 ± 0.014	7.00 ± 0.017
800	6.38 ± 0.028	6.90 ± 0.026

Cuadro 5

Absorbancias de homogenatos de la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2) y agua desionizada (pH: 7.0).

N. de ácaros	Bradford-Alta		Bradford-Baja		Brogdon-Dickinson		Brogdon	
	buffer	agua	buffer	agua	buffer	agua	buffer	agua
10	0.5673	0.5573	0.4730	0.4620	0.7140	0.6976	0.8133	0.7543
	± 0.010	± 0.011	± 0.011	± 0.010	± 0.011	± 0.017	± 0.019	± 0.015
30	0.5816	0.5716	0.5166	0.5048	1.1760	1.1007	0.8843	0.8433
	± 0.035	± 0.030	± 0.018	± 0.013	± 0.030	± 0.011	± 0.014	± 0.020
50	0.5976	0.5863	0.5343	0.5329	1.2060	1.1410	0.9730	0.8736
	± 0.025	± 0.012	± 0.016	± 0.012	± 0.033	± 0.047	± 0.020	± 0.042
100	0.6456*	0.6530	0.6323	0.5950	1.3566	1.3016	1.0650	0.9290
	± 0.018	± 0.034	± 0.050	± 0.027	± 0.027	± 0.048	± 0.034	± 0.052
300	0.6926 *	0.7136	0.6776	0.6243	1.7323	1.6016	1.3306	1.0870
	± 0.015	± 0.022	± 0.018	± 0.028	± 0.025	± 0.029	± 0.068	± 0.074
500	0.7500 *	0.7690	0.7593	0.6810	1.8690	1.7183	1.6086	1.2676
	± 0.012	± 0.015	± 0.013	± 0.022	± 0.012	± 0.021	± 0.020	± 0.020
800	0.9626	0.9333	0.7800	0.7133	1.9296	1.8503	1.7380	1.3833
	± 0.020	± 0.016	± 0.017	± 0.020	± 0.027	± 0.039	± 0.038	± 0.016

* absorbancias menores de homogenatos en buffer en relación a homogenatos en agua

Cuadro 6

Relación entre el peso de la muestra y la cantidad de proteína para diferentes edades de la línea susceptible (L_{Ns}) de *Tetranychus urticae* Koch .

Días después del estado adulto	N. de ácaros	Peso en μg	μg de proteína	Proteína / peso	r^2	Tukey (P= 0.05)
2	30	550 ± 2	90.5	0.1645	0.9827	D
4	30	600 ± 7	120.5	0.2008	0.9731	AB
8	30	630 ± 9	133.5	0.2119	0.9844	A
16	30	580 ± 5	102.5	0.1767	0.9606	C

Cuadro 7

Comparación de los niveles de proteína para la línea susceptible (L-N₆) de *Tetranychus urticae* Koch a intervalos de siete días.

Intervalo en días	N. de ácaros	Peso en μg	μg de proteína	Proteína / peso
7	30	630 ± 8	135.1	0.2144
14	30	610 ± 4	133.5	0.2188
21	30	630 ± 7	136.2	0.2161
28	30	619 ± 9	134.1	0.2166

Cuadro 8

Regresión entre el peso de la muestra y la cantidad de proteína para cuatro líneas de

Tetranychus urticae Koch.

Línea	N. de ácaros	Peso en μg	μg de proteína	Proteína / peso	Tukey (P= 0.05)
Susceptible (L- N_s)	30	620 ± 6	133.2	0.2148	A
Fresa (Suit Charly)	30	610 ± 8	125.60	0.2059	AB
Rosal (Royalty)	30	580 ± 5	98.80	0.1703	B
Rosal (Rafaela)	30	520 ± 9	80.60	0.1550	C

**ADAPTACION DE LOS METODOS EN MICROPLACAS PARA LA
IDENTIFICACION DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *Tetranychus*
urticae KOCH**

**Jerónimo Landeros¹, Ernesto Cerna¹, Alberto Flores¹, Rosalinda Mendoza¹,
Eugenio Guerreo¹ y M. H. Badii².**

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. C.P.
25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Biología, Unidad B. C.P. 39166.
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Resumen:- Se colectaron ácaros de dos manchas en campos productores de fresa del estado de Guanajuato, México. El material colectado se trasladó al laboratorio de acarología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Ahí se realizaron pruebas bioquímicas para determinar los mecanismos enzimáticos de resistencia presentes, utilizando una línea susceptible de *T. urticae* como referencia. Para tal objetivo se adaptaron y optimización los métodos en microplacas a partir de los ya descritos para mosquitos, mediante la metodología de Fersht, 1985. En donde la cantidad de sustrato saturante de alfa y beta naftil acetato, CDNB, glutation reducido, TMBZ, DTNB y ATCH fue de 0.7, 0.7, 10, 8.0, 2.0, 3.0 y 0.5 mM respectivamente. Mientras que el tiempo optimo de reacción para los mismos sustratos antes mencionados, fueron de 15, 15, 10, 10, 10, 15 y 15 minutos respectivamente. Una vez estandarizado el método, se determino el nivel de enzimas presentes en ambas poblaciones. Tomando como umbral de resistencia el valor máximo de absorbancia de la línea susceptible y poder discriminar entre la población de campo. Donde se encontró que las enzimas oxidasas, seguidas de las alfa y beta esterases son las que aportan una mayor presencia

dentro de la población de campo. Por lo que se puede mencionar que estas enzimas son las responsables de la resistencia a acaricidas de la población de *T. urticae* en estudio.

Palabras clave: Ensayos en microplacas, oxidasas, esterases

Abstract:- Collections of two spotted mites were made in strawberry production fields in the state of Guanajuato, Mexico. Collected material was taken to the laboratory of acarology in the University Autonoma Agraria Antonio Narro. Biochemical tests were conducted to determine resistance enzymatic mechanisms, using a *T. urticae* susceptible line as reference (Narro susceptible, L-NS). For this objective was necessary adaptation and optimization of microplate methods from one described for mosquitoes, used Ferhst methodology, 1985. Where amount of saturant substrate for alpha and beta naphthyl acetate, CDNB, glutathion reductase, TMBZ, DTNB y ATCH was 0.7, 0.7, 10, 8.0, 2.0, 3.0 and 0.5 mM respectively. While reaction time for the same substrates was 15, 15, 10, 10, 10, 15 y 15 minutes respectively. One more standardized the method, was determine enzymatic level in two populations, threshold resistance was the value maximum of absorbance of the line susceptible and can be discriminated in the population field. The oxidase enzymes followed by alpha and beta esterases, they contribute presence major in the population field. We can mention these enzymes are responsible resistance to acaricides the *T. urticae* population in study.

Key words: Microplate assay, oxidases, esterases

INTRODUCCIÓN

La arañita de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) se ha reportado atacando a más de 180 especies de plantas cultivadas y es catalogada como una de las especies que más daño ocasiona a la agricultura (Jeppson *et al.*, 1975). Su alto potencial reproductivo le permite incrementar su población rápidamente, de tal manera que en un corto tiempo puede rebasar el umbral económico si no se toman las medidas pertinentes para su control (Gould, 1987); Una de las herramientas más utilizadas es el control químico, sin embargo, el mal uso de los plaguicidas ha producido resistencia (Georghiou y Saito, 1983), siendo la de tipo fisiológico la más importante reportada en artrópodos, debido a la acción de mecanismos detoxificadores de tipo enzimático (Lagunes y Villanueva, 1994) o en la reducción de la sensibilidad de una enzima blanco.

De este modo, los principales sistemas enzimáticos responsables del metabolismo e inhibición de insecticidas son las oxidasas microsómicas (Wilkinson, 1983), esterasas y carboxiesterasas (Yasutomi, 1983), glutation s-transferasas (Dauterman, 1983) y acetil colinesterasa (Hama, 1983). Por lo anterior, la resistencia en esta especie es un problema muy serio, se ha presentado prácticamente a todos los acaricidas en campos agrícolas donde se han utilizado (Georghiou y Lagunes, 1991). Es por ello, que el monitoreo y detección de la resistencia es esencial en el manejo de insecticidas y acaricidas (Dennehy y Granett, 1984).

La forma convencional esta basada en pruebas de susceptibilidad a acaricidas, como son las dosis diagnostico y las concentraciones múltiples expresadas en términos

de concentración letal media (CL_{50}) (Bronw, 1976), requiriendo de un gran número de organismos para obtener una base de datos confiable, permitiendo cuantificar el nivel de resistencia, pero sin detectar los mecanismos responsables de esta (Keiding, 1986). De este modo, el monitoreo y detección de la resistencia requiere de técnicas más efectivas.

Las pruebas bioquímicas se presentan como una poderosa herramienta, permitiendo conocer la actividad y cantidad de las enzimas responsables de este fenómeno (Hemingway, 1986). Además, permiten conocer los fenotipos multirresistentes mediante el uso de ensayos replicados (Chan, 1985), la capacidad de detectar las etapas iniciales de resistencia en una población (Bronw y Brogdon, 1987) y la frecuencia de genes de los mecanismos de resistencia específicos (Rodríguez *et al.*, 2001).

Sin embargo, estos métodos se han realizado generalmente para algunas especies de mosquitos, siendo estos insectos de tamaño medio y pudiéndose utilizar en estas pruebas hasta un individuo por muestra. Caso contrario se tiene con especies de tamaño pequeño como son los ácaros. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue adaptar y optimizar el método de microplacas para determinar los mecanismos y niveles de resistencia enzimática en poblaciones del ácaro de dos manchas.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico de *T. urticae*

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron dos líneas de *T. urticae*. Una línea susceptible donada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (N-s); la cual se ha mantenido sin presión de selección por plaguicidas por más de 130 generaciones, desarrollada sobre plántulas de frijol variedad lima, bajo condiciones controladas en una de las cámaras bioclimáticas del laboratorio de acarología de la misma universidad, a una temperatura de 25 ± 2 °C, con una humedad relativa del 60 – 70 % y condiciones de 12:12 luz: oscuridad respectivamente. La otra línea utilizada, fué colectada en campos productores de fresa de los municipios de Abasolo e Irapuato, Guanajuato; (Línea de campo). Los ácaros colectados se trasladaron a la Universidad Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. En donde se establecieron bajo condiciones similares que la línea susceptible antes descrita.

Determinación de proteína

Previo a realizar las pruebas bioquímicas se determinó la cantidad de ácaros por muestra, utilizando como rango de referencia la cantidad de proteína por mosquito. Para realizar estas determinaciones se utilizó el método de Bradford (1976) modificado por Brogdon (1984a), a través del Kit-II de Bio-Rad (Azul Brillante de Comassie G-250 como colorante) y la Albúmina Serica Bobina como proteína de referencia. Utilizando para ello, hembras adultas de *T. urticae* de ocho días de edad en siete diferentes concentraciones en relación al número de ácaros (10, 30, 50, 100, 300, 500 y 800 ácaros), cada una con 30 repeticiones.

Preparación de los homogenatos

Una vez que se determinó la cantidad de ácaros por muestra (30 ácaros), se les homogenizó en 100 μL de buffer de fosfato de potasio (KPO_4) a 0.05 M y pH 7.2, diluyéndose a 1 mL con el mismo buffer, para después ser utilizadas como fuente de enzima

Adaptación y optimización de los métodos

Para la adaptación y optimización de los métodos en microplacas se utilizó la línea susceptible (N-s), para compararla después contra la línea de campo (Lc). Los métodos para determinar los niveles de α -esterasas, β -esterasas, oxidasas, glutation s-transferasas, acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible, fueron modificados a partir de los métodos ya descritos para mosquitos (Brogdon *et al.*, 1983, 1984, 1988, 1990 y 1997), estos métodos fueron modificados mediante la metodología de Fersht, 1985. Utilizando para cada prueba 90 muestras de ácaros corriéndose por triplicado en placas de fondo plano de 96 cavidades (Bio-Rad México) y las lecturas de absorbancia se realizaron mediante un lector de microplacas Stat-Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, Florida).

α y β -esterasas

Para adaptar el método de microplacas para α y β -esterasas en *T. urticae*, tuvieron que ser determinadas la concentración de sustrato saturante de α y β naftil acetato, el tiempo óptimo de reacción y la velocidad inicial. Las lecturas de absorbancia de formación de producto para cada concentración de α y β naftil acetato (0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 mM), fueron analizadas a intervalos de 3 minutos hasta llegar a 20, con el objetivo

de obtener el punto dentro de la linealidad que sea estadísticamente similar (Comparación de medias Tukey= 0.05) para determinar la meseta del tiempo óptimo de reacción. En relación a los valores de velocidad inicial, se obtuvieron en base a la pendiente de la curva y dividirla por el tiempo óptimo de reacción. Por último, para tener la concentración de sustrato saturante, se graficaron los resultados de velocidad inicial contra cada concentración de α y β naftil acetato respectivamente. Donde el tiempo óptimo de reacción fue a los 15 min y la concentración de sustrato saturante de 0.7 mM para las dos enzimas.

glutation s-transferasa

En relación a la enzima glutacion s-transferasa, se determinó la concentración de sustrato saturante para el 1-cloro-2-,4-dinitrobenzeno (CDNB) y el glutacion reducido, el tiempo óptimo de reacción y la velocidad inicial. La metodología difirió un poco a la antes descrita, en el sentido de mantener constante la concentración de glutacion reducido (2 mM), mientras se utilizaban diferentes concentraciones de CDBN (2, 5, 10 y 15 mM) analizadas a diferentes intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 min). La concentración saturante, el tiempo óptimo de reacción y la velocidad inicial del glutacion reducido fue encontrada subsecuentemente, al probar sus diferentes concentraciones e intervalos de tiempo (2, 4, 8, y 16 mM; 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 min respectivamente) y al mantener la concentración de CDBN antes establecida. La concentración saturante de CDBN y glutacion reducido resulto ser de 10 y 8.0 mM respectivamente. El tiempo óptimo de reacción fue de 10 min.

oxidasas

Para las enzimas oxidasas, también se determinaron los parámetros concentración saturante, tiempo óptimo de reacción y la velocidad inicial para el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametil-Bencidina-Dihidrocloruro (TMBZ), con la metodología antes descrita para la enzimas esterasas. Las diferentes concentraciones evaluadas de TMBZ fueron de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM, mientras que los intervalos de tiempo a analizar fueron de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 min. Donde el tiempo óptimo de reacción fue a los 10 min y la concentración de sustrato saturante de 2.0 mM.

acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible

En el caso de la enzima acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible, se determinó la concentración de sustrato saturante para el yoduro de acetilcolina (ATCh) y el ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), el tiempo óptimo de reacción y la velocidad inicial. La metodología fue similar a la descrita para la enzima glutatión S-transferasa, siendo la concentración constante de DTNB de 0.5 mM, mientras se probaban diferentes concentraciones de ATCh (2, 2.5, 3.0 y 4.0 mM) analizadas a intervalos de 3 hasta 20 min. Mientras que, para el DTNB, las diferentes concentraciones e intervalos de tiempo fueron de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 mM, así como de intervalos de 3 hasta 20 min respectivamente; manteniendo la concentración de ATCh antes establecida. La concentración saturante de ATCh y DTNB fue de 3.0 y 0.5 mM respectivamente, mientras que, el tiempo óptimo de reacción fue de 15 min.

de TMBZ al 2.0 mM y enseguida se colocaron 25 μ L de peróxido de hidrógeno al 3%. Se dejó transcurrir la reacción durante 10 min y se tomó la lectura de la placa, usando un filtro de 630 nm. De este modo, se utilizó una solución de Citocromo C como control positivo y como control negativo el buffer KPO₄.

acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible

Los niveles de la enzima acetilcolinesterasa se determinaron colocando 100 μ L de la muestra de ácaros a cada pocillo de la microplaca, así como 100 μ L de ATCH al 3.0 mM y 100 μ L de DTNB al 0.25 mM. Se tomó la lectura de la placa a T₀ con un filtro de 405 nm. Posterior a esto, se dejó transcurrir la reacción durante 15 min y se tomó de nuevo la lectura de la placa (T₁₅) con el mismo filtro. La diferencia de lecturas entre el T₀ y T₁₅ se empleó para el análisis de los resultados. Para determinar los niveles de acetilcolinesterasa insensible, la metodología empleada es similar a la anterior, a diferencia que en la solución de ATCH se agregaron 25 mg de naled como inhibidor.

Análisis de los resultados

Una vez obtenidos los registros de absorbancia para cada enzima, los resultados se organizaron en distribución de frecuencias, donde se consideró como variable a la absorbancia y la frecuencia como el número de muestras de ácaros. Se estableció el umbral de tolerancia, considerando los valores máximos de absorbancia obtenidos de la línea susceptible, en base a este valor se concluyó la proporción de tolerancia. Por último, se realizó un Anova de clasificación simple y una prueba de Tukey (P= 0.05), utilizando el programa SAS Sistem Ver. 8 (1985), para determinar las diferencias en la actividad enzimática entre las enzimas de ambas poblaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Contenido de proteína

En el cuadro 1, se presentan los resultados del contenido de proteína por muestra de ácaros. Como se puede observar las muestras de 800 hasta 50 ácaros presentan una elevada cantidad de proteína por muestra, que de acuerdo a las necesidades y objetivos de este trabajo; Estas sobrepasan el rango de proteína requerido (60 a 140 μg de proteína, Brogdon, 1984b). Aunado a lo anterior, las muestras de 500 y 800 ácaros muestran valores que sobrepasan el rango lineal del método utilizado (ver cuadro 1). Al respecto Bradford (1976), menciona que valores por afuera del rango lineal no son confiables para la cuantificación o comparación de proteína contenida en tejidos y fluidos. De este modo, las muestras con 10 y 30 ácaros son las que presentan los valores de proteína dentro del rango. Por lo que, en este trabajo fue seleccionada la cantidad de 30 ácaros para trabajar por muestra. Y esto es debido a que presenta valores mas altos y estables de proteína, así como evitar la variabilidad de resultados al trabajar con muestras mas pequeñas.

Por otro lado, Dary *et al.* (1990), mencionan que existe una estrecha relación entre el tamaño de la muestra y la cantidad de proteína. Por lo que, se pueden presentar diferencias en los resultados obtenidos y estos pueden generar interpretaciones erróneas. Por lo que la cuantificación de proteína es utilizada para corregir las cantidades de actividad enzimática en base al tamaño y etapa de desarrollo de los organismos de prueba (Lang *et al.*, 1965).

Adaptación y optimización de los métodos en microplacas

Se logró adaptar las técnicas de detección de α y β -esterasas, oxidasas, glutathion s-transferasas y acetilcolinesterasa a la especie *T. urticae*.

Para esto, se determinó la concentración de sustrato saturante para cada una de las enzimas, en donde las esterasas presentaron una concentración de sustrato saturante para α y β -naftil acetato de 0.7 mM (Figura 1). En comparación a la concentración de 3.0 mM de α y β -naftil acetato utilizada para mosquitos, reportada por Brogdon y Dickinson (1983), difiere significativamente en un 77 % a nuestros resultados; sin embargo, en estudios realizados por Yang *et al.* (2001) con la especie *T. urticae*, ellos mencionan una concentración de 0.27 mM de α -naftil acetato en muestras de un solo ácaro. En relación a las enzimas oxidasas dependientes del citocromo P-450, mostraron una concentración saturante para el TMBZ de 2.0 mM (Figura 2). Que difieren en un 20 % a las reportadas por Brogdon *et al.* (1997) para mosquitos quienes reportan una concentración de 1.6 mM de TMBZ. De este modo, Li *et al.* (2003), trabajando *in vitro* con cristales de proteína de bacterias como fuente de enzima, reportaron concentraciones de 1.9 mM que son muy similares a las de este trabajo. Para la enzima glutathion s-transferasa la concentración saturante fue de 10 y 8.0 mM para el CDNB y el glutathion reducido respectivamente (Figura 1). Siendo estos resultados muy superiores a los reportados por Brogdon y Barber (1990) para mosquitos, quienes reportan una concentración de 2.0 mM para el glutathion reducido y de 1.0 mM para el CDNB. Mientras que estudios realizados por Yang *et al.* (2002) con la especie *T. urticae*, reportan una concentración de 150 mM para el CDNB y de 10 mM para el glutathion reducido. Por ultimo, para la enzima acetilcolinesterasa, se determinó una concentración

saturante de 3.0 mM para ATCH y de 0.5 mM para DTNB (Figura 2). Siendo resultados similares a los reportados por Brogdon y Barber (1987) para mosquitos, quienes reportan una concentración de 2.6 y 0.33 mM para ATCH y DTNB respectivamente. Por otro lado, estudios realizados por Wang *et al.* (2004) trabajando con la especie *Liposcellis entomophila* (Psocoptera: Liposcellidae), reportó una concentración de 1.5 mM para ATCH y de 1.0 mM para el DTNB, siendo en un 50 % inferior en comparación a las de nuestro estudio. En base a lo anterior, podemos mencionar que posiblemente las diferencias en cuanto a la cantidad de sustrato saturante de cada una de las enzimas en *T. urticae* en relación a lo reportado para mosquitos, posiblemente se deba al tamaño de los tejidos y fluidos en donde están contenidas estas proteínas (Fersht, 1985). Así como por el tipo de sustrato alimenticio ya que algunas de las especies de hospederos de estos ácaros pueden generar metabolitos secundarios que dañan al ácaro alterando su sistema filológico (Mullin y Croft, 1983). Como lo son las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), quienes de forma natural incrementan el contenido de esteroides dentro de las poblaciones de ácaros (Yang *et al.*, 2001).

En relación al tiempo óptimo de reacción, en la figura 3, se puede observar que para el sustrato α y β -naftil acetato el tiempo óptimo de reacción fue a los 15 minutos, ya que en este tiempo de incubación es cuando se presentan las lecturas de absorbancia donde la linealidad de la reacción se va perdiendo debido a que las lecturas de absorbancia de los tiempos superiores ya no incrementan considerablemente y estadísticamente son similares. Estos datos difieren a lo reportado por Brogdon y Dickinson (1983), para la incubación de estos sustratos, ya que estos autores reportan un tiempo de incubación de 10 min. En el caso del sustrato TMBZ, utilizado para medir

cantidad de oxidasas, como se puede ver en la figura 4, el tiempo optimo de reacción fué a los 10 minutos; estos resultados difieren en un 50 % a lo reportado por Brogdon *et al.* (1997), quienes reportan un tiempo de incubación de 5 minutos. Para los sustratos CDNB y el glutation reducido (Glutation s-transferasas), el tiempo optimo de reacción fué a los 10 min (Figura 3), . Siendo resultados con valores muy superiores a los reportados por Brogdon y Barber (1990) para mosquitos, quienes reportan un tiempo optimo de 5 minutos. Por ultimo, para los sustratos ATCH y DTNB (Figura 4), el tiempo optimo de reacción obtenido fue de 15 min. Estos resultados difieren a los reportados por Brogdon y Barber (1987), quienes reportan un tiempo de incubación de 10 min. En este sentido, en el tiempo optimo de reacción, los tiempos se pueden ver alterados por la concentración de la muestra, ya que muchos autores juegan con diluciones del sustrato y pueden colocar la mitad de concentración de la muestra y el tiempo de incubación simplemente se duplica.

Estimación de los niveles enzimáticos

Como podemos observar en el cuadro 2, se muestran los valores máximos de absorbancia para la línea susceptible de *T. urticae*, donde las enzimas α y β -esterasas presentan valores de 1.205 y 1.442 respectivamente. Mientras que las enzimas glutation s-transferasas y oxidasas de 0.526 y 1.683, por último para las enzimas acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible de 0.066 y 0.042 respectivamente. Recordando que estos valores se toman para establecer el umbral de resistencia (Figura 5, 6 y 7).

Una vez que se obtuvo el umbral de resistencia se discriminó a los individuos resistentes de los susceptibles dentro de la población de campo. Como se puede observar en el cuadro 2, para las enzimas α y β -esterasas 24 y 36 de las 90 muestras que se evaluaron para cada una de las enzimas, superaron el umbral de resistencia; lo que representa un 27 y 40 % de la población (Figura 5). Para las enzimas glutathion s-transferasas y oxidasas 15 y 70 de 90 muestras superaron el umbral, siendo un 17 y 77 % de la población (Figura 6). Por último para las enzimas acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible 9 y 5 de 90 muestras evaluadas para cada una de las enzimas superaron el umbral, para ser un 10 y un 6 % respectivamente (Figura 7).

Al realizar una comparación entre la cantidad de enzima presente en base a la cantidad promedio de absorbancia (Cuadro 2), encontramos que el principal factor de resistencia para la línea de campo son las enzimas oxidasas (2.0251 A), seguida por las α y β -esterasas (1.1784 B y 1.3801 B). Por otro lado, encontramos que las enzimas con una menor presencia en la línea de campo fueron las enzimas glutathion s-transferasas, acetilcolinesterasa y acetil colinesterasa insensible (0.4930 D, 0.0401 E y 0.0306 E respectivamente). Por lo que, podemos mencionar que el principal mecanismo de resistencia en la línea de campo utilizada en este estudio es a las enzimas oxidasas; esto posiblemente se deba al elevado número de aplicaciones por temporada de abamectina que se utilizan en la región; ya que se realizan 10 o más aplicaciones por temporada. Al respecto, Campos *et al.* (1996) reportaron un incremento en enzimas oxidasas en líneas de *T. urticae*, que recibieron mas de 6 aplicaciones de abamectina por temporada. Así mismo, Clark *et al.* (1994), mencionan que el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina son las enzimas oxidativas. Por otro lado, el segundo

mecanismo enzimático con mas presencia en la población de campo fueron las enzimas α y β -esterasas, esto quizás se deba a la aplicación alterna de productos químicos como piretroides y fosforados para el control de plagas insectiles dentro del cultivo, al respecto Matsumara y Voss (1964), mencionan que la resistencia en una línea de campo de *T. urticae* se debe a una alta presión de selección con productos piretriodes y fosforados, en donde se incrementa la actividad de carboxiesterasas. Aunado a lo anterior podemos mencionar que la unión éster de los piretroides constituye el sitio vulnerable de la molécula, donde actúan esterases específicas (Lagunes y Villanueva, 1994). En lo que respecta alas enzimas glutation s-transferasas, acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible, varios autores reportan a estas enzimas como causa de resistencia generalmente en especies de insectos, sin embargo en el presente estudio estos sistemas fueron los menos relevantes (Dauterman, 1983 y Clark y Shaman, 1984).

LITERATURA CITADA

- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brogdon, W. G. 1984a. Mosquito protein microassay-I, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 457-459.
- Brogdon W. G. 1984b. Mosquito protein microassay-II, modification for potential field use. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 457-460
- Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 90: 145-150.
- 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. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.
- Brogdon, W. G. and Barber. 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pest. Biochem. and Physiol.* 29: 252-259.
- Brogdon, W. G. and Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. *Comp. Biochem. Physiol.* 96: 339-342.
- 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. Jour. Amer. Mosq. Control Assoc. 13: 233-237.

Brown, A. W. A. 1976. How have entomologists dealt with resistance ? Am. Phytopathol. Soc. Proc. 3 : 67-74.

Brown, T. M. and W. G. Brogdon. 1987. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. Ann. Rev. Entomol. 32: 145-162.

Campos, F., D. A. Krupa and R. A. Dybas. 1996. Susceptibility of populations of two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae) from Florida, Holland and the Canary Islands to abamectin and characterization of abamectin resistance. J. Econ. Entomol. 89(3) : 594-601.

Chan, K. L. Singapore's dengue hemorrhagic fever control program. A case study on the successful of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly environmental measures as a part of integrated vector control. Tokyo: Southeast Asian Medical Information Center. 1985: 114.

Clark, J.M., Scott, J. G., Campos, F. and Bloomquist, J. R. 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. Annu. Rev. Entomol. 40: 1-30.

Clark A. G. and Shaman N. A. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione s-transferase. Pestic. Biochem. Physiol. 22: 249-261.

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. Jour. Econ. Entomol. 83: 2187-2192.

- Dauterman, W. C. 1983. Role of hydrolases and glutathione s- transferases in insecticides resistance. in Georghiou G.P. and T. Saito (eds.) *Pest Resistance Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 229-247.
- Dennehy, T. J. and Granett, J. 1984. Spider mite resistance to dicofol in San Joaquin Valley cotton: Inter and intraspecific variability in susceptibility of three species of Tetranychus. *J. Econ. Entomol.* 77(6): 1381-1385.
- Fersht, A. 1985. Measurement and magnitude of enzymatic rate constants Chapter. In: *Enzyme structure and mechanism*. 2 ed. New York. W. H. Freeman. 121-124 p.
- Georghiou, P. G. and T. Saito. 1983. *Resistance to pesticides*. Plenum Press. New York, USA. 809 pp.
- Georghiou, G.P and A. Lagunes T. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. FAO. Rome, Italy. 318 pp.
- Gould, M. J., Burn, A. J., Croaker, T. H. and Jeppson, P. C. 1987. *Protected crops (Integrated pest management)*. Ed. Academic Press. New York, USA. 605 pp.
- Gunning, R. V., C. S. Easton, L. R. Greenup y V. E. Edge. 1984. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hudner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77: 1283-1284.
- Guo, F., X. Deng y Z. Zhao. 1997. Finding optimal conditions for assaying the activity of glutathione s-aromatic group transferases in *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). *Sist. Apli. Acarol.* 2: 63-70.

- Hama, H. 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase in Georghiou G.P. and T. Saito (eds.) *Pest Resistance Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 299-331.
- Hemingway, J., C. Smith, K. J. I. Jayawardena and P. R. J. Heath. 1986. Field and laboratory of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, 76: 559-565.
- Holliday, W. R. y K. P. Burnham. 1990. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 83: 1151-1159.
- Jeppson, L. K., H. M. Keifer and E.N. Baker. 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press. The Angeles, USA. 614 pp.
- Keiding J. 1986. Prediction or resistance risk assessment. In *Pesticide Resistance*. National Academy Press. Washington D. C. pp: 279-297.
- Lagunes, T. A. y Villanueva, J. J. A. 1994. *Toxicología y manejo de insecticidas*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 265 pp.
- Lang, C. A., Lau H. and Jefferson D. J. 1965. Protein and nucleic acid changes during growth and aging in the mosquito. *Biochem. Jour.* 95: 372-377.
- Li, X., Baudry J., Berembaun M. R. and Schuler M. 2003. Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450. *PNA.* 101: 2939-2944.
- Matsumara, F. and Voss G. 1964. Mechanism of malathion and parathion resistance in the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Jour. Econ. Entomol.* 57: 911-917.

- Mullin C. A. and Croft B. A. 1983. Host-related alterations of detoxication enzymes in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Environ. Entomol.* 12: 1278-1281.
- Rodríguez, M. M., Bisset J. A., Molina D., Díaz C. y Soca L. A. 2001. Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterasas y glutation s-transferasas en *Aedes aegypti*. *Rev. Cubana de Med. Trop.* 53 (1): 32-36.
- SAS Institute inc. 1985. Guide for personal computers. SAS Institute, Cary, N. C.
- Wang, J. J., Cheng W. X., Ding W. and Zhao Z. M. 2004. The effect of the insecticide dichlorvos on esterase activity extracted from the psocids, *Liposcelis bostrychophila* and *L. entomophila*. *Jour. Of Insec. Sci.* 5: 23-28.
- Wilkinson, C.F. 1983. Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 175-205.
- Yang X., Marcolies D. C., Yanzhu K. and Buschman L. L. 2001. Host plant changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *Jour. Econ. Entomol.* 94: 381-387.
- Yang X., Buschman L. L., Yanzhu K. and Marcolies D. C. 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mites species (Acari: Tetranychidae) after selection with three insecticides. *Jour. Econ. Entomol.* 95: 399-406.
- Yasutomi, K. 1983. Role of detoxication esterases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum

Cuadro 1

Contenido de proteína de hembras adultas de 8 días de edad de la línea susceptible de

Tetranychus urticae Koch

Cuantificación de proteína en *Tetranychus urticae*^a

Número de ácaros	Absorbancia	mg/mL de proteína	µg de proteína
10	0.8133 ± 0.079	0.0862	80.60
30	0.8843 ± 0.014	0.1377	123.17
50	0.9730 ± 0.020	0.2020	215.60
100	1.0650 ± 0.034	0.3687	278.60
300	1.3306 ± 0.068	0.4612	480.50
500	1.6086 ± 0.080	0.6627*	*
800	1.7380 ± 0.068	0.7565*	*

a: Rango lineal (0.05 a 0.5 mg/mL de proteína)

*: Valores fuera del rango lineal

Cuadro 2

Niveles de absorbancia para cada enzima de las dos poblaciones de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch.

Niveles enzimáticos de *Tetranychus urticae*

Enzimas	Línea susceptible		Línea de campo		Promedio de		Muestras con resistencia
	Absorbancia		absorbancia		absorbancia		
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Susceptible	Resistente	
Alfa- esterasas	0.514	1.205	0.965	1.698	0.9339 C	1.1784 B	24
Beta- esterasas	0.550	1.442	1.023	2.031	1.0392 C	1.3801 B	36
GST's	0.156	0.526	0.389	0.592	0.3231 D	0.4930 D	15
Oxidasas	0.782	1.683	1.150	2.836	0.8480 B	2.0251 A	70
ACH-asa	0.017	0.066	0.020	0.079	0.0403 E	0.0401 E	9
ACH-asa insensible	0.007	0.042	0.011	0.057	0.0203 E	0.0306 E	5

*Letras iguales no difieren estadísticamente (P= 0.05)

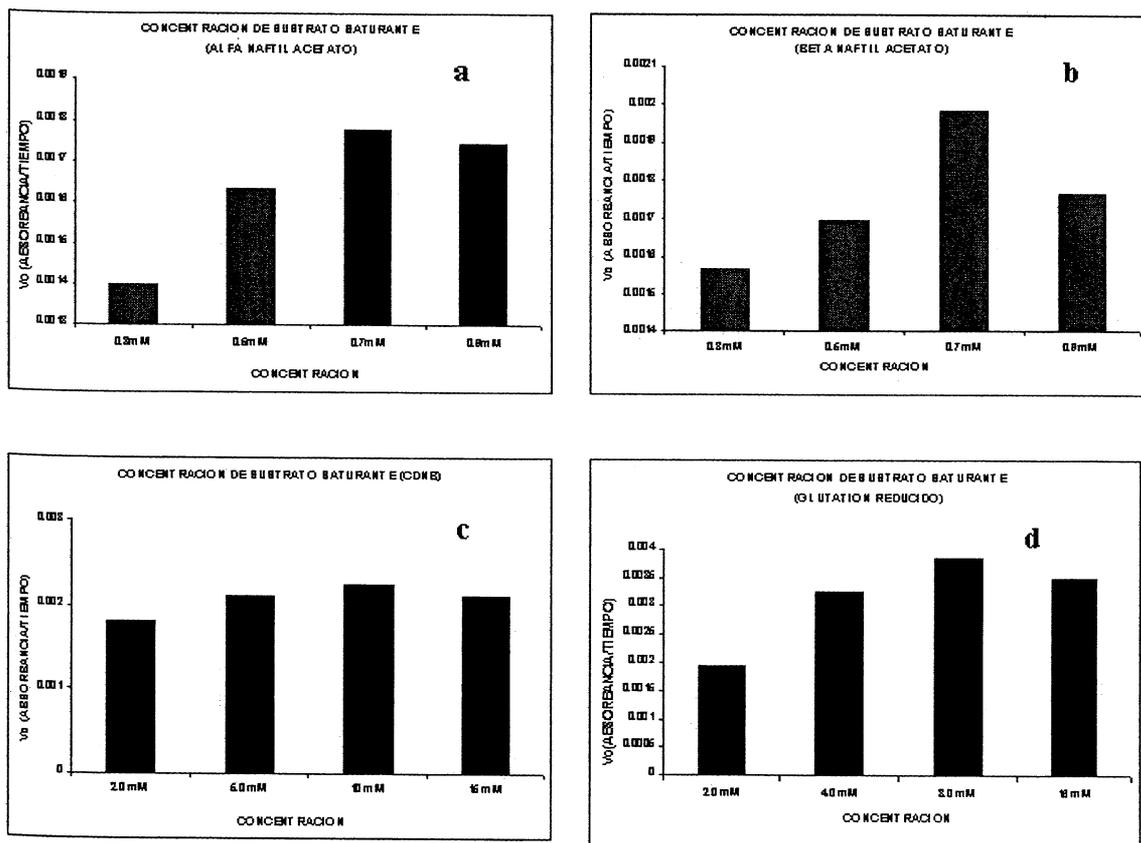


Figura 1. Determinación de la concentración de sustrato saturante para una línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch. Sustratos utilizados en: (a y b) enzimas esterasas y (c y d) glutation s-transferasas.

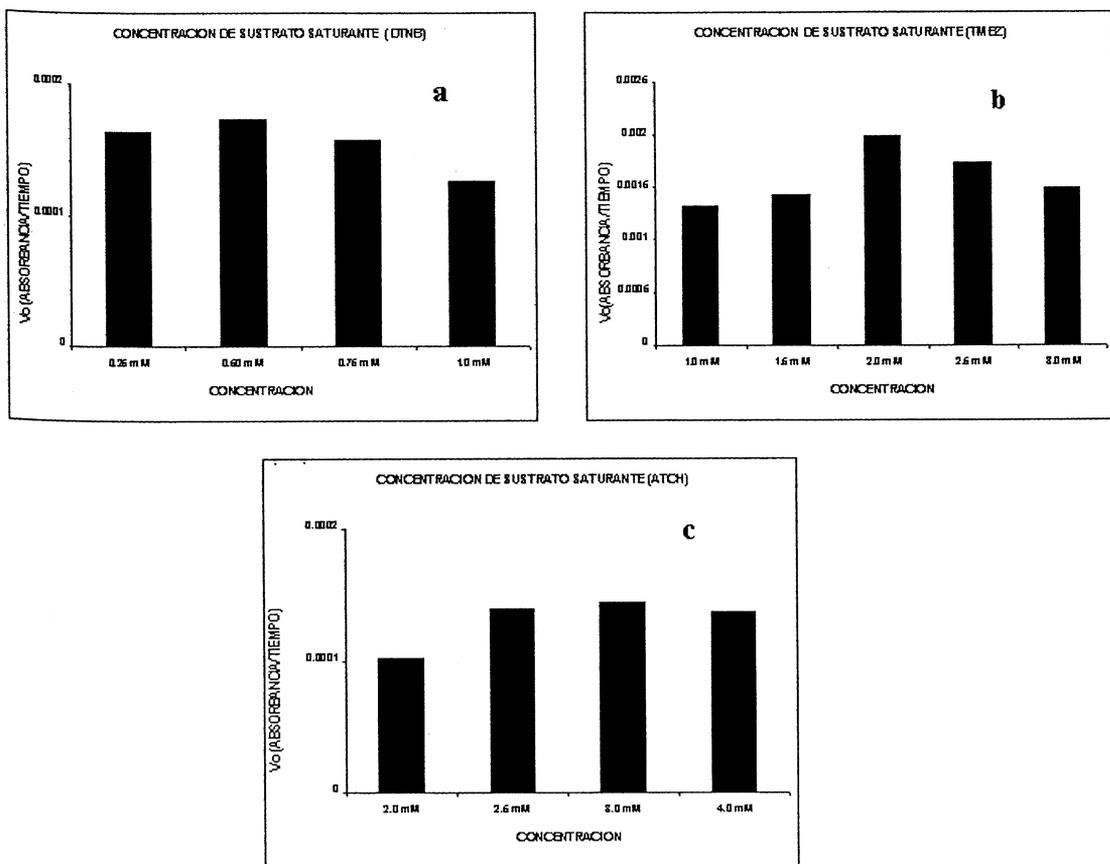


Figura 2. Determinación de la concentración de sustrato saturante para una línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch. Sustratos utilizados en: (a y b) enzima acetilcolinesterasa y (c) oxidasas.

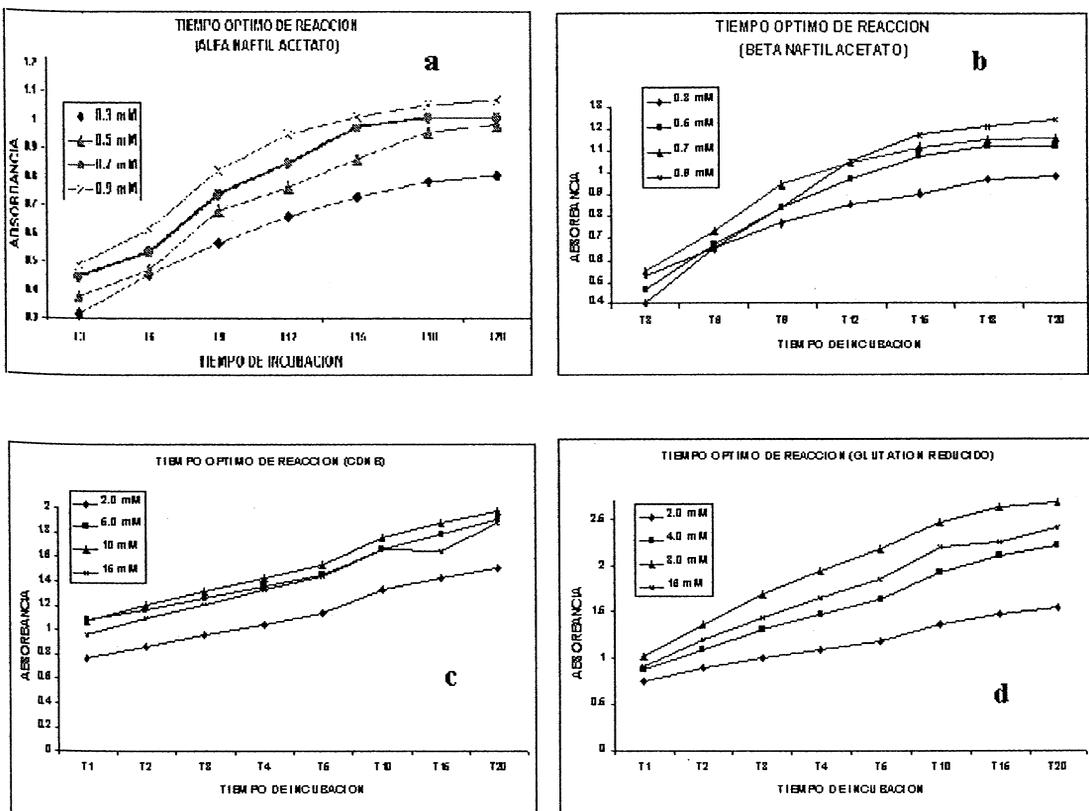


Figura 3. Determinación del tiempo óptimo de reacción para una línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch. Sustratos utilizados en: (a y b) enzimas esterasas y (c y d) en glutación s-transferasas.

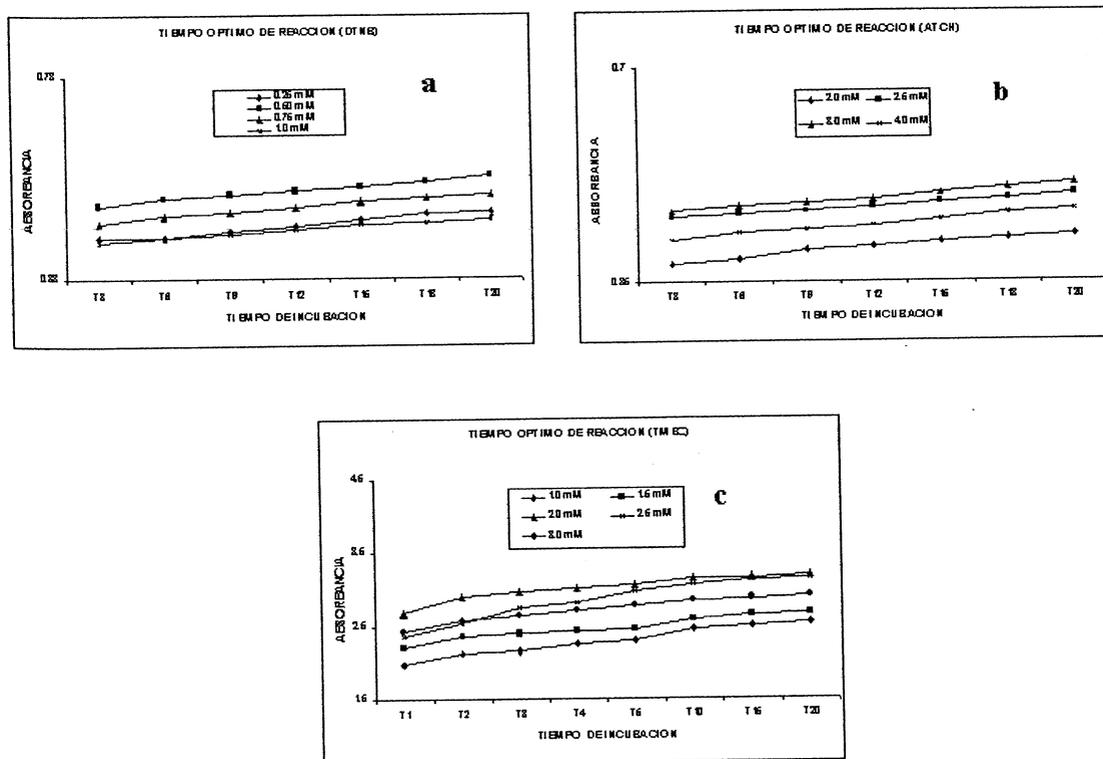


Figura 4. Determinación del tiempo óptimo de reacción para una línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch. Sustratos utilizados en: (a y b) enzimas acetilcolinesterasa y (c) en oxidasas.

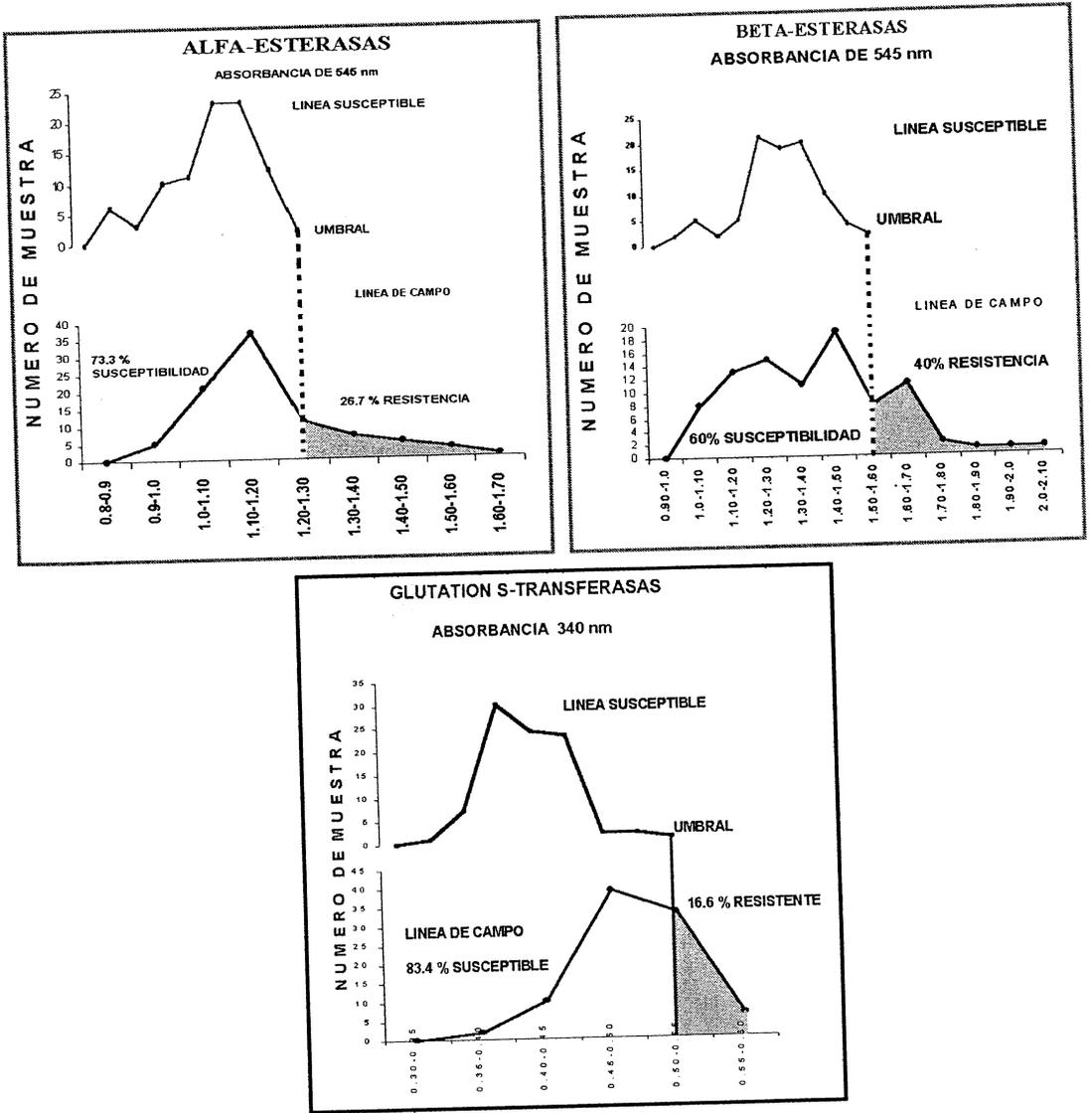


Figura 5. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles de alfa esterasas, beta esterasas y glutation s-transferasas de las dos poblaciones en estudio de *Tetranychus urticae* Koch

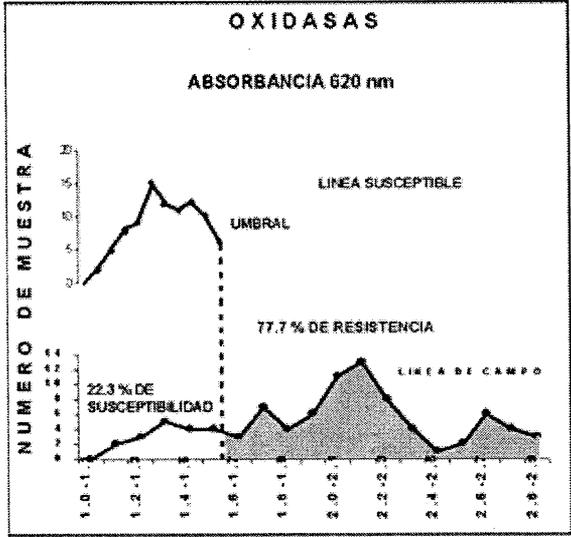
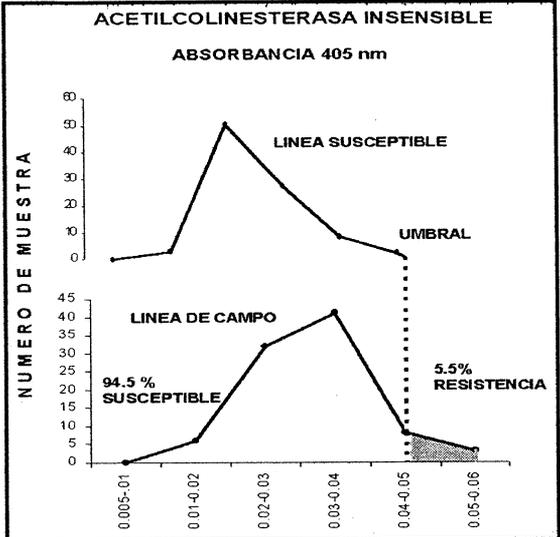
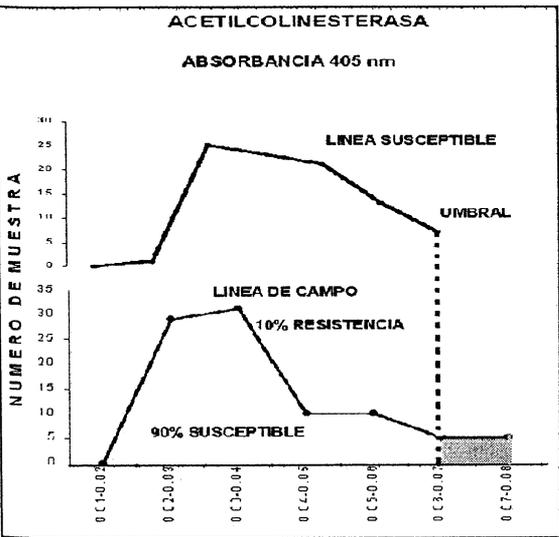


Figura 6. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles de acetilcolinesterasa, acetilcolinesterasa insensible y oxidasas de las dos poblaciones en estudio de *Tetranychus urticae* Koch

**POLIMORFISMOS AMPLIFICADOS AL AZAR COMO MARCADORES DE
ADN EN LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA DEL ACARO DE DOS
MANCHAS *Tetranychus urticae* KOCH**

Ernesto Cerna¹, Jerónimo Landeros¹, Alberto Flores¹, Rosalinda Mendoza¹, M. H. Badii² y Eugenio Guerreo¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. C.P. 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Biología, Unidad B. C.P. 39166. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

RESUMEN

La técnica PCR-RAPD's fue utilizada para la determinación y monitoreo de la resistencia en 14 líneas de *Tetranychus urticae*. Para la extracción del ADN se utilizó el método de Doyle modificado por Vázquez (1990), macerando 50 ácaros hembra por muestra, en donde las concentraciones de ADN oscilaron entre 580 y 2580 ng/mL. Para la amplificación del ADN, se utilizó el kit B en donde todos los oligonucleótidos del kit no presentaron amplificaciones. Por tal motivo, se corrió la prueba con un oligonucleotido reportado para discriminar entre poblaciones susceptibles y resistentes de *Tetranychus urticae* (Udalov *et al.*, 2005). El cual amplifica una banda de 1.2 kb, por lo que, de las 14 líneas utilizadas, solo tres amplificaron (Líneas 3, 6 y 9), de las cuales dos líneas fueron colectadas en el cultivo de fresa y la otra de maíz, de los estados de Michoacán y Guanajuato. Aunque la técnica de PCR-RAPDs no mostró una buena amplificación al seleccionar oligonucleótidos al azar, podemos mencionar,

que esta técnica puede ser usada en un futuro como una poderosa herramienta en la detección, monitoreo y manejo de la resistencia.

Palabras clave: ADN, PCR-RAPD's, *Tetranychus urticae*

ASBTRACT

The RPD's-PCR technique was used for resistance detection and monitoring of 14 lines *Tetranychus urticae*. For DNA extraction was carried for the Doyle Method modified by Vazquez (1990), 50 female mites was homogenated showed concentrations of 580 y 2580 ng/mL. For DNA amplifiyg were used kit B where all oligonucleotics kit B don't amplificated, inthis case, was necesaried use the oligonucleotic reported bandig patterns in the case resistance of *Tetranychus urticae* (Udalov *et al.*, 2005). This oligonucleotic amplifiying 1.2 kb band. The 14 lines used, only three amplifiying (line 3, 6 and 9), this lines were colected in fields strawberry and maize in Michoacan and Guanajuato State respectively. The RPD's-PCR technique showed inconsistant banding patterns, could make RPD's-PCR technique a potential monitoring toll, detection and management the resistance.

Key words: DNA, RPD's-PCR, *Tetranychus urticae*

INTRODUCCION

La arañita de dos manchas, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es una plaga de muchas especies de plantas en el mundo, se ha reportado atacando a más de 180 especies de plantas cultivadas y ornamentales (Jeppson *et al.*, 1975). Esta especie se caracteriza por causar marchitamiento, desecación del follaje y en poblaciones muy altas hasta la muerte de las plantas. Su alto potencial reproductivo le permite incrementar su población rápidamente, de tal manera que en un corto tiempo puede rebasar el umbral económico si no se toman las medidas pertinentes para su control (Gould, 1987); Una de las herramientas más utilizadas es el control químico, sin embargo, el mal uso de los plaguicidas ha producido resistencia (Georghiou y Saito, 1983). Aunado a lo anterior, estos ácaros son capaces de desarrollar resistencia en periodos cortos de tiempo e inducir un alto grado de resistencia cruzada (Sato *et al.*, 2004).

El bioensayo, es el método mas utilizado para documentar los niveles de resistencia a plaguicidas en poblaciones de campo, en las cuales las decisiones de manejo están basadas. La detección de la resistencia en este tipo de métodos se basa en pruebas de susceptibilidad de insecticidas, que consisten de experimentos dosis-mortalidad que usualmente son realizados en laboratorio (Shah *et al.*, 2002). El manejo de la resistencia requiere de técnicas mas efectivas. Por lo que, en etapas iniciales de desarrollo de la resistencia abunda muchos organismos heterocigotos, los cuales son difíciles de detectar mediante las dosis-diagnostico. El diagnostico molecular ha sido recomendado para incrementar la preescisión y disminuir la variabilidad asociada a los

bioensayos con insecticidas, que resultan de factores intrínsecos y extrínsecos (Ffrench-Constant *et al.*, 1995).

En años recientes la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha permitido al análisis molecular ser una parte integral de la biosistemática y de la biología y ecología de poblaciones (Saiki, 1989). Grandes cantidades de segmentos específicos de ADN de longitud definida pueden ser sintetizados como iniciadores, este material también puede ser analizado como un rango de escala evolutiva para ver variabilidad (Wong *et al.*, 1987). El PCR también es aplicable en organismos pequeños como los ácaros, sin importar la cantidad de ADN que se obtenga, pudiéndose utilizar en los métodos moleculares convencionales.

La técnica de PCR esta basada en la amplificación enzimática *in Vitro* de fragmentos de ADN, flanqueados por dos oligonucleótidos como iniciadores (ADN sintético) generalmente de 20 nucleótidos de longitud. Que une las bandas opuestas de la secuencia objetivo. El ADN utilizado como plantilla en el PCR puede ser extraído por varias metodologías, como son el método alto en sales (Katakura *et al.*, 1997), utilizando la resina Chelex-100 (Edward y Hoy, 1993) y por extracción fenólica (Kaliszewski *et al.*, 1992). Repetidos ciclos en base a temperatura desnaturalizan la plantilla de ADN, anillándose por medio de las secuencias complementarias de los iniciadores y por ultimo la alineación de los iniciadores por medio de la enzima Taq-Polimerasa, resultando una acumulación exponencial de fragmentos específicos de ADN en pocas horas (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997).

Williams *et al.* (1990), reportó una nueva técnica basada en PCR, está usa un oligonucleótido único de secuencia nucleotídica arbitraria (9-10 bases), con un contenido entre 50 – 80 % de guanina y citosina.

Esta técnica es llamada Polimorfismos de ADN amplificado al azar (RAPD's-PCR), que nos da una gran versatilidad en aplicaciones biotecnológicas en la entomología. RAPD's-PCR ha sido utilizado para determinar resistencia en la especie *T. urticae* (Shah *et al.*, 2002). Roehrdanz *et al.* (1993), lo utilizaron como banda paternas para diferenciar especies de *Diaeretiella rapae* y *Aphidus matricarie* a ciclodienos. Por su parte, French-Constant *et al.* (1994), trabajando con la especie de mosquito *Aedes aegypti*, para determinar resistencia a ciclodienos. Utilizando esta técnica también en gorgojos (Andreev *et al.*, 1994), pulgones (Black *et al.*, 1992), chapulines (Chapco *et al.*, 1992) y mosquita blanca (Perring *et al.*, 1993). De este modo, el objetivo de la presente investigación fue determinar la susceptibilidad de diferentes líneas de *T. urticae* por medio de la técnica RAPD's-PCR.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico de *T. urticae*

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron 13 líneas de campo de *T. urticae*. Así como una línea susceptible de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (N-s) como referencia; la cual se ha mantenido sin presión de selección por

plaguicidas por más de 130 generaciones, desarrollada sobre plántulas de frijol variedad lima, bajo condiciones controladas a una temperatura de 25 ± 2 °C, con una humedad relativa del 60 – 70 % y condiciones de 12:12 luz: oscuridad respectivamente. Las diferentes líneas de campo fueron colectadas en diferentes cultivos y regiones (Cuadro 1). Los ácaros colectados se trasladaron a la Universidad Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. Por cada línea de campo se colocaron 50 hembras adultas en tobos Eppendorf y se sometieron a refrigeración (-70 °C), para su posterior análisis.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por el método Doyle modificado por Vázquez (1990); 50 ácaros hembra se maceraron con una varilla esmerilada para resuspenderlos en 500 μ L de regulador de extracción (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2 %), se agitó en un vortex durante 30 s, y se dejó reposar en hielo por 15 min. Se agregaron 500 μ L cloroformo alcohol isoamílico 24:1 y agitó en un vortex para posteriormente centrifugarlo a 12,000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le adicionó el mismo volumen de isopropanol, se dejó reposar por 15 min en hielo para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla la cual fue resuspendida en 50 μ L de agua desionizada estéril. Se agregó 10 μ L de RNAsa y se incubó a 37°C por 1 h, finalmente se determinó la concentración de ADN y se diluyó este hasta obtener la concentración de ADN adecuada para la reacción de PCR en este caso se utilizaron 70 ng/ μ L.

Amplificación de ADN

La amplificación del ADN se realizó con el nucleótido de MWG, Inc. (Biomol) Kit de oligonucleótidos B (Cuadro 2), así como el oligonucleotido para detección de resistencia en el ácaro de dos manchas, con una secuencia de nucleótidos 5'-GTGCTCGGCG-3' (Udalov *et al.*, 2005). Estos oligonucleótidos constan de 10 bases de longitud, obtenidos de MWG, Inc. (Biomol). Las condiciones de PCR optimas para la reacción de RAPDs fueron las siguientes. Cada 24 μL de mezcla para PCR contenía 2.5 μL de regulador de la Taq 10X, , 1.2 μL de MgCl_2 , 2 μL de mezcla de DNTPs a 10 mM, 0.2 μL Taq polimerasa 5U/ μL , 1 μL de iniciador 10 pmol, 2 μL ADN a 50 ng y 15.1 μL de agua.

Las condiciones de amplificación incluyen un ciclo inicial de 94°C por 5 min, 45 ciclos a 94 °C por 1 min , alineamiento a 35 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min 10 sec; así como un último ciclo a 72 °C por 7 min (D'Aquila *et al.*, 1991).

Análisis de los productos de PCR.

Se corrió en un gel de agarosa al 2 % (Promega Inc Biomol) en TAE regulador 1X (pH 8.3) a 60 V por 3 h. El gel se tiñó con 5 μL de bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz uv (302 nm).

Análisis de datos.

Se obtuvieron las disimilaridades genéticas, utilizando el coeficiente de apareamiento múltiple (Sneath & Sokal, 1973) y el método de agrupamiento jerárquico UPGMA o método del promedio no ponderado, para obtener un dendograma.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Extracción de ADN

El método de extracción de ADN (Doyle modificado por Vázquez, 1990), para una muestra de 50 ácaros hembra, presentó ADN de elevado peso molecular (Figura 1). En donde las concentraciones oscilaron entre 580 y 2580 ng/mL (Cuadro 3).

Las diferencias encontradas en las concentraciones de ADN, posiblemente se deben a la diferencia en tamaños que presentaban las hembras de las líneas; así como, a la técnica de extracción en donde no se utilizó nitrógeno líquido, por lo que se pudieron presentar pérdidas de ADN. Al respecto, Champ y Dyte (1976), mencionan que algunas características inherentes a la biología de los organismos como fase de desarrollo, edad, peso y sexo de los individuos de prueba influyen definitivamente sobre la respuesta de los organismos. Por su parte Mothes y Seits (1981) mencionan que la arañita de dos manchas a diferencia de otros organismos fitófagos, es muy selectiva para alimentarse, ingiriendo solamente pequeños compuestos subcelulares. Así mismo, Jeppson *et al.*

Análisis de datos.

Se obtuvieron las disimilaridades genéticas, utilizando el coeficiente de apareamiento múltiple (Sneath & Sokal, 1973) y el método de agrupamiento jerárquico UPGMA o método del promedio no ponderado, para obtener un dendograma.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Extracción de ADN

El método de extracción de ADN (Doyle modificado por Vázquez, 1990), para una muestra de 50 ácaros hembra, presentó ADN de elevado peso molecular (Figura 1). En donde las concentraciones oscilaron entre 580 y 2580 ng/mL (Cuadro 3).

Las diferencias encontradas en las concentraciones de ADN, posiblemente se deben a la diferencia en tamaños que presentaban las hembras de las líneas; así como, a la técnica de extracción en donde no se utilizó nitrógeno líquido, por lo que se pudieron presentar pérdidas de ADN. Al respecto, Champ y Dyte (1976), mencionan que algunas características inherentes a la biología de los organismos como fase de desarrollo, edad, peso y sexo de los individuos de prueba influyen definitivamente sobre la respuesta de los organismos. Por su parte Mothes y Seits (1981) mencionan que la araña de dos manchas a diferencia de otros organismos fitófagos, es muy selectiva para alimentarse, ingiriendo solamente pequeños compuestos subcelulares. Así mismo, Jeppson *et al.*

(1975) mencionan que el mejor sustrato para el desarrollo de los ácaros son los cultivos de plantas con hojas suculentas.

Amplificación de ADN

En relación, a las condiciones antes descritas en la utilización de la técnica PCR-RAPDs, todos los oligonucleótidos del kit B, no presentaron amplificaciones; esto, quizás se deba a la naturaleza de la técnica utilizada. Al respecto Valadez y Kahl, 2000, mencionan que la técnica de RAPDs, no es constante; ya que, cualquier cambio en la polimerasa o en el termociclador puede afectar inevitablemente la reproducibilidad de los patrones. Una segunda razón, de la inconsistencia del método puede ser por la presencia de ADN extraño; ya que, en estudios realizados con esta misma especie, se ha encontrado la presencia de el ADN del hospedero y algunos microorganismos parásitos (Persing *et al.*, 1990). Por tal motivo, se corrió la prueba con un oligonucleotido reportado por Udalov *et al.*, 2005. Como se puede observar (Figura 2) este iniciador amplifica una banda de 1.2 kb, la cual ha sido utilizada como patrón para distinguir líneas susceptibles y resistentes de *Tetranychus urticae*; por lo que, de las 14 líneas utilizadas, solo tres amplificaron (Líneas 3, 6 y 9), de las cuales dos líneas fueron colectadas en el cultivo de fresa y la otra de maíz, de los estados de Michoacán y Guanajuato.

Esto posiblemente se deba al manejo de los cultivos antes mencionados; ya que, presentan un elevado número de aplicaciones por temporada. De este mismo modo, Shah *et al.* (2002), mencionan, la importancia de conocer los genotipos de las diferentes

líneas que se serán evaluadas; ya que, el procedimiento de RAPDs, provee marcadores dominantes.

Aunque la técnica de PCR-RAPDs no mostró una buena amplificación al seleccionar oligonucleótidos al azar, podemos mencionar, que esta técnica puede ser usada en un futuro como una poderosa herramienta en la detección, monitoreo y manejo de la resistencia, tomando como base la clara diferenciación entre los diferentes genotipos (RR, RS y SS).

LITERATURA CITADA

- Andreev, D., T. Rocheleau, T.W. Phillips, R.W. Beeman y R.H. Ffrench-Constant, 1994. A PCR diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Pest. Sci., 41: 345-349.
- Black, W. C., N. M. DueTeau, G. J. Puterka, J. R. Nechols y J. M. Pettorini, 1992. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera:Aphididae). Bull. Entomol. Res., 82: 151-159.
- Caetano, A. G. y Gresshoff, P. 1997. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. Ed. Wiley-Liss, Inc. USA pp 353.
- Champ B. R. y Dyte C. E. 1976. Informe de la prospección mundial de la FAO sobre la susceptibilidad a insecticidas de las plagas de granos almacenados. Colección FAO; Producción y Protección Vegetal, N. 5. 63 p.
- Chapco, W.N.W. Ashton, R.K.B. Martel and N. Antonishyn, 1992. A feasibility study of random amplified polymorphic DNA in Genome, 35: 569-574.
- D'Aquila, R. T., L. J. Bechtel, J. A. Viteler, J. J. Eron, P. Gorczyca y J. C. Kaplin, 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. Nucleic Acids Res., 19: 3749.
- Edward, O.R. and M.A. Hoy, 1993. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Biol. Cont., 3: 243-257.
- Ffrench-Constant, R.H., K. Aronstein, N. Anthony and C. Coustau. 1995. Polymerase chain reaction-based monitoring techniques for the detection of

insecticide resistance-associated pointmutations and their potential applications. *Pesti. Sci.*, 43:195-200.

- Georghiou, P. G. y T. Saito. 1983. Resistance to pesticides. Plenum Press. New York, USA. 809 pp.
- Gould, M. J., Burn, A. J., Croaker, T. H. y Jeppson, P. C. 1987. Protected crops (Integrated pest management). Ed. Academic Press. New York, USA. 605 pp.
- Jeppson, L. K., H. M. Keifer y E. N. Baker. 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press. The Angeles, USA. 614 pp.
- Kaliszewski, M. J., J. Tobolewski, S. Seyoum, I. Chojnacki, M. M. Kaliszewska, D. J. Stanton y R. K. Colwell, 1992. The polymerase chain reaction and sequencing of mite DNA. *Int. J. Acarol.*, 18: 231-239.
- Mothes U. and Seitz K. A. 1981. Funtional microscopic anatomy of the digestive system of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Acarologia* 22: 257-270.
- Perring, T. M., A. D. Cooper, R. J. Rodrigues, C. A. Farrar y T. S. Bellows Jr. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioural studies. *Science*, 259: 74-77.
- Persing, D. H., S. R. Telford III, P. N. Rys, D. E. Dodge, T. J. White, S. E. Malawista y A. Spielman, 1990. Detection of *Borreliaburgdorferi* DNA in museum specimens of *ixodes dammini* ticks. *Science*, 249: 1420-1423.
- Roehrdanz, R.L., D.K. Reed and R.L. Burton, 1993. Use of polymerase chain reaction and arbitrary primers to distinguish laboratory-raised colonies of parasitic Hymenoptera. *Biol. Cont.*, 3: 199-206.

- Saiki, R.K., 1989. The design and optimization of the PCR. In: Erlich, H.A. (Ed.) PCR Technology. Stockton Press.
- Sato, M. E., T. Miyata, M. D. Silva, A. Raga y M. F. Souza. 2004. Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).
- Shah, R., S. P. Worner y R. B. Chapman. 2002. Selection of a discrimination concentration (DC) for propargite resistance detection in *Tetranychus urticae* Koch. Pakistan J. Biol. Sci. 5: 1074-1076.
- Sneath, P.H. A and R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy . San Francisco, W.H. Freeman and Company.
- Udalov, M.B., A. V. Poskryakov, G. V. Benkovskaya, I. A. Tulaeva, M. K. Barinov y A. G. Nikolenko. 2005. Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Demitan and Talstar Resistance Detection in Spider Mite, *Tetranychus urticae* koch (Acarina, Tetranychidae). Resistant Pest Management Newsletter. 14 (2): 40-43.
- Valadez, E. y K. M. Gunter . 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teorías y protocolos de laboratorio). Edit. Mundi-Prensa. Universidad Autónoma Chapingo. 147 p.
- Williams, J.G.K., A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA. Polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucleic Acids Research 18:6531-6535.

Wong, C., C.E. Dowling, R.K. Saiki, R.G. Higuchi, H.A. Erlich y H.H. Kazazian, Jr.
1987. Characterization of beta-thalassemia mutations using direct genomic
sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, 330: 384-386.

Tabla 1. Líneas de *Tetranychus urticae* Koch utilizadas en polimorfismos de ADN amplificados al azar.

N. de Línea	Cultivo	Municipio
1	L. susceptible	Saltillo, Coahuila
2	Fresa	Abasolo, Guanajuato
3	Fresa	Abasolo, Guanajuato
4	Fresa	Irapuato, Guanajuato
5	Fresa	Irapuato, Guanajuato
6	Maíz	La piedad, Michoacán
7	Maíz	Torreón, Coahuila
8	Fresa	Cotija, Michoacán
9	Fresa	Zamora, Michoacán
10	Fresa	Zamora, Michoacán
11	Rosal	Villa Guerrero, Edo. Mex.
12	Rosal	Villa Guerrero, Edo. Mex.
13	Rosal	Saltillo, Coahuila
14	Rosal	Saltillo, Coahuila

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de MWG Inc. (BIOMOL) oligonucleótidos utilizados en el experimento en *Tetranychus urticae* Koch.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
B-01	GTTTCGCTCC
B-02	TGATCCCTGC
B-03	CATCCCCCTG
B-04	CCGCATCTAC
B-05	GATGACCGCC
B-06	GAAGGGACTC
B-07	GTCCCGACGA
B-08	TGGACCGGTG
B-09	CTCACCGTCC
B-10	TGTCPPGGGTG
B-11	AAAGCTGCGG
B-12	TGTCATCCCC
B-13	AAGCCTCGTC
B-14	TGCGTGCTTG
B-15	GACGGATCAG
B-16	CACACTCCAG
B-17	TTCCCCCAG
B-18	TGAGTGGGTG
B-19	GTTGCCAGCC
B-20	ACTTCGCCAC

Tabla 2. Contenido de ADN de 14 líneas de *Tetranychus urticae* Koch.

N. de Línea	ng/mL	N. de Línea	ng/mL
1	580	8	2010
2	2231	9	2580
3	1856	10	590
4	1532	11	776
5	1313	12	1925
6	1845	13	754
7	878	14	809

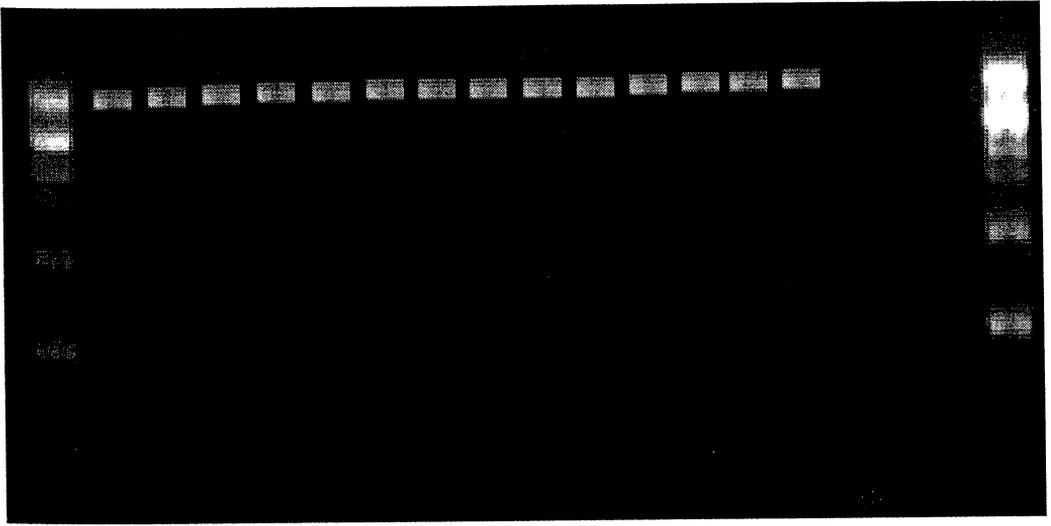


Figura 1.- ADN de *Tetranychus urticae* Koch obtenido por la técnica de Doyle modificada por Vázquez (1990).

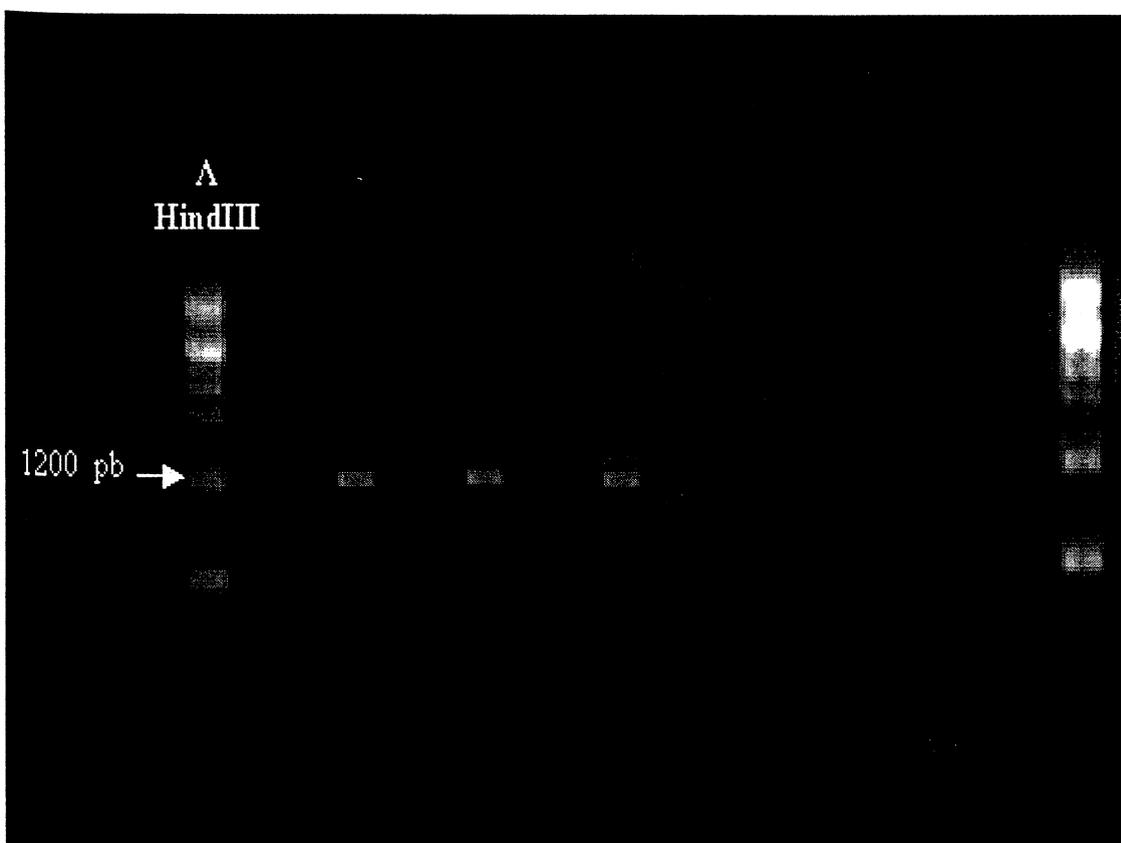


Figura 2.- Banda obtenida utilizando el oligonucleotido 5'-GTGCTCGGCG-3'; con λ HindIII como marcador de peso molecular.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

En la evaluación a la respuesta de la línea de laboratorio de *Tetranychus urticae* a los diferentes acaricidas, la pérdida de la resistencia fue claramente observable a través del tiempo. Presentando los valores más altos de susceptibilidad para el producto abamectina (0.02 ppm). Para las líneas de campo de hembras adultas de *T. urticae* expuestas a diferentes acaricidas, estas mostraron mayor nivel de susceptibilidad de acuerdo al grupo toxicológico según su CL_{50} en el siguiente orden: para la línea de campo con manejo de acaricidas, Lactonas Macroclínicas (1.9 ppm), Organo-Estanosos (508 ppm), Clorados (883 ppm), Piretroides (904 ppm) y Fosforados (1083 ppm). Mientras que, para la línea de campo sin manejo fueron, Lactonas Macroclínicas (1.03 ppm), Piretroides (1943 ppm), Clorados (1995 ppm), Fosforados (2720 ppm) y Organo-Estanosos (4107 ppm).

Con respecto a la proporción sinérgica, esta fue mayor para la mezcla del dicofol y abamectina con el sinérgico butóxido de piperonilo con un valor de 10.78X y 7.86X respectivamente, seguida de los productos bifentrina más sss-tributilfosforotritioato y el naled más dietil maleato, con valores de 6.65 y 6.34X

respectivamente. El sinergismo mas bajo fue para la mezcla del oxido de fenbutatin mas sss-tributilfosforotritioato con un valor de 1.73X.

En relación al método de determinación de proteína encontramos que, el método de Brogdon (1984) modificado, fue el seleccionado para realizar esta investigación, debido a que registró las lecturas mas altas de proteína en las muestras con bajo número de ácaros. Para el caso, del número de ácaros por muestra se determinó la cantidad de 30 ácaros; y por ultimo, la mejor edad para sacar muestras de hembras adultas de *T. urticae* fue a la edad de 8 días.

En el caso de la determinación de los mecanismos de resistencia mediante pruebas bioquímicas, encontramos que, la población mostró mayores niveles que la línea susceptible en todos los casos. Presentando los valores mas altos las enzimas oxidasas seguidas de las alfa y beta esterases.

Para la determinación de la variabilidad intraespecífica de *T. urticae* mediante el uso de la técnica RAPD's-PCR, se encontró que los primers utilizados no presentan una constancia en los resultados, ya que las bandas utilizadas como patrones, se presentaban solo para algunas líneas y no en todas las ocasiones. Por lo que se recomienda estudios posteriores para estandarizar mas la técnica.

Por lo anterior podemos mencionar que la línea de campo de *T. urticae* proveniente de campos cultivados de fresa del estado de Guanajuato, México. su principal mecanismo de resistencia son las enzimas oxidasas.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Badii, H. M., E. A. Flores y W. L. Galán. 2000. Fundamentos y perspectivas del Control Biológico. Universidad Autónoma de Nuevo León. 462 p.
- Bánki, L. 1978, Bossay Of Pesticides In The Laboraty; Research And Quality Control. Akadémiai Kiadó. Budapest, Hungary. 475 p.
- Barberá, C. 1976. Pesticidas Agrícolas. 3a edición. Ed. OMEGA. Barcelona, España. Pp 43-45.
- Beeman, R. W. y Schmidit, B.A. 1982. Biochemical and genetic aspects of malathion specific resistance in the Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 75: 945-949.
- Blank, R. H. y G. O. Osborne. 1979. Studies of cholinesterase of the mites *Sancassania berlesi* and *Tetranychus urticae*, sustrate activity relationships and organophosphorus acaricide inhibition. N. Z. J. Agric. Research. 22: 491-496.
- Boister, D., R.L. White, M. Skolnick, y R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Human. Genet. 32:344.
- Bourgue, D, R. Capela y M. Raymond. 1996. An insesitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Portugal. J Econ. Entomol ;89:1060-6.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the priciples of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-254.
- Brattsten L. B. 1989. Insecticide resistance: Research and management: Pestic. Sci. 26: 329-332.
- Brattsten L. B, C. V. Holyoke, J. R Leeper y Raffa K. F. 1986. Insecticide resistance: challenge to pest management and Basic Research. Science. 2:1255-1260.

- Bravo, M. H., H. H. Gonzáles y C. J. López. 1989. Plagas De Frutales En México. Ed. Montecillo. Colegio De Postgraduados. Pp 14-16.
- Brogdon, W. G. 1984a. Mosquito protein microassay-I, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 457-459.
- Brogdon W. G. 1984b. Mosquito protein microassay-II, modification for potential field use. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 457-460
- Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 90: 145-150.
- Brogdon, W. G. y C. M. Dickinson. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in hig-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.
- Brogdon, W. G. y Barber. 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pest. Biochem. and Phisiol.* 29: 252-259.
- Brogdon, W. G. y A. Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. *Comp. Biochem. Physiol.* 96: 339-342.
- Brogdon, W. G., J. C. McAllister y J. Vulule. 1997. Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals espresing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Jour. Amer. Mosq. Control Assoc.* 13: 233-237.
- Brown, A. W. A. 1941. *Insect Resistance in Arthropods.* World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- Brown, T. M. y W. G. Brogdon. 1987. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 145-162.
- Burges, H. D. y N. W. Husey. 1971. *Microbial control of insects and mites.* Academic Press. London. 861 p.
- Busvine, J. R. 1971. *A Critical Review of The Techniques For Testing Insecticides.* 2nd. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 345 p.
- Cabello, T. y P. Barranco. 1995. *Prácticas De Entomología Agrícola.* universidad de Almería. Almería. 149 p.

- Caetano, A. G. y Gresshoff, P. 1997. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. Ed. Wiley-Liss, Inc. USA pp 353.
- Callaghan, A., C. A. Malcolm y J. Hemingway. 1991. Biochemical studies of A and B carboxylesterases from organophosphates resistant strains of an Italian *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Pest Bio Phys; 41:198-206.
- Campos, F., R. A. Dybas, y D. A. Krupa. 1995. Susceptibility of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. J. Econ. Entomol. 88(2) : 225-231.
- Carrillo, R. H. 1984. Análisis de acción conjunta de insecticidas en larvas del gusano cogollero del maíz (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Tesis de maestría en ciencias. Centro de entomología y acarología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México, 82 pp.
- Casida JE. 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. J Agric Food Chem; 18:753.
- Chang, C.P. y F.W. Plapp. 1983. DDT and Pyrethroids: receptor binding and mode of action in the house fly. Pestic. Biochem. Physiol. 20:76-91.
- CICOPLAFEST. 2005. Catalogo Oficial de Plaguicidas 2005. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes Y sustancias Toxicas. SARH-SEDUE-SS-SECOFI. 469 p.
- Cotero, E. S. y G. M. Sánchez. 1989. Niveles de susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acarida: Tetranychidae) a ocho acaricidas en el cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L) en la región de Villa Guerrero México. Rev. Chapingo. 14 (6): 145-148.
- Cremlyn, R. J. 1985. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Ed. Limusa. México, pp.356.
- Croft, B. A., Miller, R. W., Nelson, R. D. y Westgard, P. H. 1984. Inheritance of early-stage resistance to formetanate and cihexatin in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) J. Econ. Entomol. 77 (5): 574-578.
- Crooker A. 1985. Embryonic and Juvenile Development. En, Helle W. y W. M. Sabelis Edits. : Spider Mites Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 1a. Elsevier Sci. Publ. Co. pp 149 – 160.
- Cruz, M. P. 1984. Ácaros fitófagos de los principales cultivos de México. En G. J. Vera, E. Pardo y A. Lagunes. Edit. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp 255-259.

- Dauterman, W.C. 1976. Extramicrosomal metabolism of insecticides. In Wilkinson, C.F. (ed.) *Insecticide Biochemistry and Physiology*. Plenum Press. New York, USA. Pp 149-175.
- Dauterman, W. C. 1983. Role of hydrolases and glutathione s- transferases in insecticides resistance. in Georgiou G.P. and T. Saito (eds.) *Pest Resistance Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 229-247.
- Dennehy, T. J. y Granett, J. 1984. Spider mite resistance to dicofol in San Joaquin Valley cotton: Inter and intraspecific variability in susceptibility of three species of *Tetranychus*. *J. Econ. Entomol.* 77(6): 1381-1385.
- Dennhey, T. J., E. E. Grafton- Cardwell, J. Garnett, y K. Barbour. 1987. Practitioner. Assessable Bioassay for Detection of Dicofol Resistanse in Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 80 (5): 998-1003.
- Devonshire, A. L. y G. D. Moores. 1984. Characterization of insecticide-insensitive acetylcholinesterase: Microcuomputer-based analysis of enzyme inhibition in homogenates to individual house fly (*Musca domestica*) heads. *Pestic. Biochem. Physiol.* 21: 341-348.
- Doreste, S: E. 1984. Acarología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Ed. Fanny de la T. San José, Costa Rica. p 210.
- Doreste, S. E. 1988. Acarología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 410 p.
- Ebeling, W. y J. R. Pence . 1954. Susceptibility to acaricides of two spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in Australia. *Journ. Econ. Entomol.* 47(5): 789-795.
- Edge, V.E. y D. G. James. 1986. Organotin resistance in *Tetyranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 79:1477-1483.
- Eesa, N. y L. K. Cutkomp. 1984. *Glosary of Pesticide Toxicology and Related Terms*. Thomson Publications. Fresno, Ca., U.S.A. 84 p.
- Estébanes, M. L. 1989. Ácaros en frutales del estado de Morelos. Instituto de biología de la UNAM. Y Dirección General de Sanidad y Protección Forestal SARH México DF. p 360.
- Estrada, C. S. y G. M. Sánchez. 1990. Niveles de susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) a ocho acaricidas en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en la región de Villa Guerrero México. *Rev. Chapingo.* 15: 145-148.

- FAO (1974). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Protection Bull. 20: 11-18.
- FAO (1979). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Protection Bull. 27: 29-32.
- Fayette, L. J. 1946. Hexacthil tetraphosphate for control of mites. J. Econ. Entomol. Vol. 39 p. 812.
- Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen pp220
- Finney, D. J. 1971. Probit Análisis. 3rd. Edition. Cambridge Univ. Press. Great Britain. 333 p.
- Fuentes, J. L. 1983. Diplomado en frutales. UMSNH. Facultad de Agrobiología, Uruapan, Michoacán, México. 120-140 pp.
- Georghiou, G.P. 1965. Genetic studies on insecticide resistance. Adv. Pest Control Res. 6: 171.
- Georghiou, G.P. 1971. Resistance of insects and mites to insecticides and acaricidas and the future of pesticide chemicals. En: swift, J.E. (ed.) Agricultural Chemical Harmony or Discord for Food People and Environment. Univ. California Div. Agr. Sci. 151 p.
- Georghiou, P. G. y T. Saito. 1983. Resistance to pesticides. Plenum Press. New York, USA. 809 pp.
- Georghiou, G. P y A. Lagunes T. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. FAO. Rome, Italy. 318 pp.
- Goodwin, S. 1984. Laboratory evaluation of pesticides on an Australian strain of the Chilean predatory mite, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot. Acarology 2: 647-654.
- Gould, J. H. 1966. Large scale commercial control of *Tetranychus urticae* Koch on cucumbers by the predator *Phytoseiulus persimilis*. In: Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology.
- Gould, M. J., Burn, A. J., Croaker, T. H. y Jeppson, P. C. 1987. Protected crops (Integrated pest management). Ed. Academic Press. New York, USA. 605 pp.
- Grafton-Cardwell, E. E., Granett, J. y Dennehy, T. J. 1987. Quick tests for pesticide resistance in spider mites. Calif. Agric. 41 (7): 8-10.

- Guillet, P., H. Escaffre, M. Quedraogo y D. Quillevere. 1980. Note preliminaire sur une resistanse au temephos dans le confluxe *Simulium damosum* en cote de ibore. Geneva.
- Gunthart, H. E. 1945. Uber spinnmilben und naturliche feinde. Schweiz Ent. Gesell. Mitt. 19 (8): 279-308.
- Guo, F., X. Deng y Z. Zhao. 1997. Finding the optimal conditions for assaying the activity of glutation s-aromatic group transferases in *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). Sist. Apli. Acarol. 2: 63-70.
- Hama, H. 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. In Georghiou, G.P. and T. Saito. (eds.). Plenum Press. New York . USA. pp. 299-301.
- Helle, W. y L. P. Pijnacker. 1985. Parthenogenesis, chromosomes an sex. En Helle y Sabelis, edits: Spider Mites Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 1. Elsevier Sci. Publ. Co. Pp. 129 – 138.
- Hemingway, J., C. Smith, K. J. I. Jayawardena y P. R. J. Hearth. 1986. Field and laboratory of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). Bull. Entomol. Res., 76: 559-565.
- Henneberry, T. J. 1964. Effect of host plant nutrition on susceptibility to malathion of two strain of two-spotted spider mite. Jour. Econ. Entomol. 57: 674-676.
- Henneberry, T. J. y D. Shriver. 1964. Two-spotted spider mite feeding in bean leaf tissue of plants supplied various levels of nitrogen. Jour. Econ. Entomol. 57: 377-379.
- Iftter, D. C. y F. R. Hall. 1983. Toxicities of Selected Syntetic Pyrethroids to two Species of Phytophagous Mites. J. Econ. Entomol. 79: 687-689.
- Hoyt, S. C., P.H. Westigard, y B.A. Croft. 1985. Cyhexatin resistance in Oregon populations of *Tetranychus urticae* Koch. J. Econ. Entomol. 78(3): 656-659.
- Hubert, J. J. 1980. Biossay. Kendall/Hunt pub. Co. U.S.A. 164 p.
- Jefferson, R. L., J. G. Bald y F. S. Morishita. 1956. Effect of vapam on *Rhyzoglyphus*, mites and gladiolus diseases. J. Econ. Entomol. 49 (5): 548-589.
- Jeppson, L. K., H. M. Keifer y E. N. Baker. 1975. Mites injurius to economic plants. University of California Press. The Angeles, USA. 614 pp.

- Keiding, J. 1986. Prediction or resistance risk assessment. In Pesticide Resistance. National Academy Press. Washington D. C. pp: 279-297.
- Kennedy, G. C. y D. R. Smitley. 1985. Dispersal en Helle W. y M. W. Sabelis, edits: Spider Mites Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 1a. Elsevier Science Publishing Company. Pp 233 – 240.
- Kensler, L.D y H.T. Streu.1967. A biological and toxicological study of stain of two spotted spider mites. Department of entomology and Economic Zoology, Rutgers- New Brunswick, New Jersey. Vol 67. N°4 . pp.1073-1078.
- Knapp, J. L., Fasulo, T. R. y Tucker, D. P. 1982. The effects of different irrigation and weed management practices on mite populations in a citrus grove. Proc. Fla. State Horticul. Soc. 95: 47–50.
- Krantz, G. W. 1971. A. Manual of Acarology. O. S. U. Book Stores Inc. Corvallis, Oregon. 458 p.
- Krantz, G. W. 1978. A. Manual of Acarology. Oergon State University. Book Stores Inc. 509 p.
- Lagunes, T. A. y J. A. Villanueva. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en ciencias agrícolas, México 1994. 264 p.
- Lalah J. O, Chien CI, Motoyama y N, Dauterman WC. 1995. Glutathione S-transferases: alpha-naphthyl acetate activity and possible role in insecticide resistance. J Econ. Entomol ;88:768-70.
- Lasota, A. J. y R. A. Dybas. 1991. Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. Ann. Rev. Entomol. 36: 91-117.
- Lee, Y. M. Song, K. Ahn, K. Lee, J. Kim y G. Kim. 2003. Monitoring of Acaricide Resistance in Two-spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) Populations from Rose Greenhouses in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 6(1): 91-96.
- Lienk, S.E., P.J. Chapman y A. Myburgh. 1952. Evaluation of acaricidas against three species of orchard mites. Journal. Econ. Entomol. 45(2): 290-297.
- Lin J. y J. Kuo. 1995. AFLP, a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus 17: 66-70.
- Luna B. J. 1993. determinación de líneas de respuesta Dosis-mortalidad del ácaro *Tetranychus urticae*. A acaricidas en la zona de Abasolo Guanajuato. Tesis de licenciatura UAAAN. Saltillo, Coahuila. México.

- Mailloux, M y F.O. Morrison. 1962. The effects of acaricidas on the developmental stages of the two-spotted spider mite. *Tetranychus urticae*. Journ. Econ. Entomol. Vol 55. N°4. pp.479-482.
- Malais, M. y W. J. Ravensberg,. 1995. Conocer y reconocer la biología de las plagas de invernadero y sus enemigos naturales. Koppert BV. Rotterdam. 109 p.
- March, R. B. 1958. The chemistry and action of acaricidas. Annual Review of Entomology 3: 355-376.
- Matsumura, F. 1983. Penetration, binding and target insensitivity as causes of resistance to chlorinated hydrocarbon insecticides. En: Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). Pest Resistance to Pesticides. Plenum Press. New York. Pp. 367-386.
- McCoy, C.W. 1977. Horticultural practices affecting phytophagous mite populations on citrus. Proc. Int. Soc. Citricult. 2: 459-462.
- McCutchen, B. F., F. W. Plapp, S. J. Nemic y C. Campanhola. 1989. Development of diagnosing monitoring techniques for larval pyrethroid resistance in *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton. J. Econ. Entomol. 82: 1502-1507.
- Medina, W. M. 2000. Plagas Y Enfermedades De Chiles Y Pimientos; Guía De Identificación Y Manejo. The Chile Pepper Institute y New Mexico State University (CAHE).
- Metcalf, R. J. y A. T: Fint. 1976. Insectos destructivos e insectos benéficos. Edit. Limusa. Barcelona, España. 980 p.
- Michelmore, R.W. y Hulbert, S. H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 325 p.
- Millake, S. S., C. W. Kearns, y H. Lipke. 1957. Distribution of DDT- dehydrochlorinase in varius tissues of DDT- resistance house flies, J. Econ. Entomol., 50: 359.
- Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap y F. Matsumura. 1996. Cloning and sequencing of the para-types sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockraches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). Mol. Gen. Genet. 252: 61-68.
- Morgante, M. y A. M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plants. The Plant Journal 3(1), 175-182.
- Mullin, C. A. 1984. Host related alteration of detoxification enzymes in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Environ. Entomol. 12 (4): 1278-1282.

- Narahashi, T. 1964. Insecticides resistance and nerve sensitivity. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 17: 46.
- Narahashi, T. 1964. Insecticides resistance and nerve sensitivity. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 17: 46.
- Narahashi, T. 1971. Effects of insecticides on nervous conduction and synaptic transmission. In : Wilkinson, C.F. (ed.) New York. USA. pp 327-352.
- Narahashi, T. 1983. Resistanse to insecticides due to reduced sensitivity of the nervous system. En: Georghiou, G.P. and T. Saito. *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 333-366.
- Nelson, R. D. y E. M. Stafford. 1972. Effects of gamma radiation on the biology and population suppression of the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Hilgardia* 41: 229 – 341.
- Oatman, E. R. 1974. Effect of phorate on the twospotted spider mite, associated predators, and aphids on strawberry in Southern California. *Environ. Entomol.* 3(4): 624-644.
- Otero, C. G. 1992. Manejo fitosanitario de hortalizas en México. En S. Anaya, N. Bautista y B. Domínguez Edit. *Colegio de Postgraduados*. Chapingo, México. pp 136-151.
- Pasteur N. 1977. Reserche de génétique chez *Culex pipiens* L. Polimorphisme enzymatique, autogénesis et resistance aux insecticides organophosphorés. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 170 pp.
- Penman. D.R., R.B. Chapman y M. H. Bowie. 1988. Selection for behavioral resistance in twospotted spider mite (Acari:Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 81(1): 40-44
- Plapp, F.W. Jr. 1976. Biochemical Genetics of insecticide Resistance. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 179-197.
- Pree, D.J., y H.W. Wagner. 1987. Ocurrence of cyhexatin and dicofol resistance in the European red mite, *Panonychus ulmi* Koch in Southern Ontario. *Can. Entomol.* 119: 287-290.
- Reséndiz, G. B. 1985. Apuntes de acarología. Dpto. de Parasitología agrícola U.A.CH. Chapingo, México. 140 p.
- Reséndiz G. B. 1988. Evaluación del poder de Agregación, Dispersión y Sinergismo de Stirrup-M^R (Alquenol-Multimetil) Solo y Mezclado con acaricidas de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Tesis M. C. Centro de

Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 59 p.

- Riedl, H. y S. A. Hoying. 1983. Toxicity and Residual Activity of Fenvalerate to *Typhlodromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) and its prey *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on Pear. Can Ent. 115: 807-813.
- Rombach, M.C. y Gillespie, A.T. 1988. Entomogenous Hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crops. Biocontr. News and Inform. 9: 7-18.
- Roush, R. T. y G. L. Miller. 1986. Considerations for desing of insecticide resistance monitoring programme. J. Econ. Entomol. 79: 293-298.
- Sánchez, FV., J.A.W. Gimán y I.P. Ting. 1979. Morphological responses of strawberry leaves to infestations of two spotted spider mite. J. Econ. Entomol. 72: 710- 713.
- Sato, M. E., T. Miyata, M. D. Silva, A. Raga y M. F. Souza. 2004. Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae).
- Sawicki, R. M. y A. W. Farnham. 1968. Genetics of resistance to insecticides in the Ska strain of *Musca domestica*. Location and isolation of the factors of resistance to dieldrin. Entomologica Experientia Applicata; 11:133-42.
- Shah, R., S. P. Worner y R. B. Chapman. 2002. Selection of a discrimination concentration (DC) for propargite resistance detection in *Tetranychus urticae* Koch. Pakistan J. Biol. Sci. 5: 1074-1076.
- Shorey, H.H., R.L. Hale y V. Voth. 1967. Comparisions- soil and foliar applications of acaricidas for control of the two sppoted spider mite on strawberries in southern California. University of California Citrus Research Center and Agricultural Experiments Station. Riverside. Vol 60 N° 6. pp. 1722-1724.
- Smissaert, H. R., S. Voerman, L. Oostenbrugge y N. Renooy. 1970. Acetylcholinesterases of organophosphate susceptible and resistant spider mites. J Agric Food Chem ; 18:66.
- Sobrino, I. E. y V. E. Pacheco. 1989. Tratado de horticultura herbácea, hortalizas de flor y de fruto. Aedos, Barcelona, España. 151p.
- Soderlund, D.M., J.R. Bloomquist, F. Wong, L.L Payne y D.C. Knipple. 1989. Molecular neurobiology: Implications for insecticide action and resistance. Pestic. Sci.26: 359-374.

- Sotolongo, M. G. y A. N. Vidal. 1988. Metabolismo y excreción de los compuestos extraños en: Elementos de Toxicología. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; p. 11,12.
- Staetz, C. A. 1985. Susceptibility of *Heliothis virescens* (F) (Lepidopter: Noctuidae) to permethrin from across the cotton belt: a five years study. J. Econ. Entomol. 78: 505-510.
- Staub, J. E. y F. C. Serquen. 1996. Genetic Markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31:729-740.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 17:6463-6471.
- Steiner, L. F., Arnold, C. H. y Summerland S. A. 1944. Laboratory and field tests of DDT for control of the codling moth. J. Econ. Entomol. 37 (1): 156-157.
- Téliz, O. D. y F. J. Castro. 1973. El cultivo de la fresa en México. Folleto de divulgación N. 48 INIA-CIAB. México. 102 p.
- Terriere C L. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. Ann Rev Entomol; 29:71-8.
- Tirado, R. J. A. 1977. Identificación de algunos ácaros asociados con plantas ornamentales en Tenango de las Flores, Puebla. Tesis profesional. E. N. A. Chapingo, México.
- Tsukamoto, M. y R. Suzuki,. 1964. Genetic Analisis DDT- resistance in two strains of the house fly *Musca domestica* L. Botyu- Kagaku, 29:76.
- Tuttle, M.D., Baker, E. W y Abbatiello, J. M. 1976. Spider Mites of Mexico (Acari: Tetranychidae). International journal of acarology 2 (2): 109-124.
- Twine, P. H. y H. T. Reynodl. 1980. Relative susceptibility and resistance of the taabacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. J. Econ. Entomol. 73: 239-242.
- Udalov, M.B., A. V. Poskryakov, G. V. Benkovskaya, I. A. Tulaeva, M. K. Barinov y A. G. Nikolenko. 2005. Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Demitan and Talstar Resistance Detection in Spider Mite, *Tetranychus urticae* koch (Acarina, Tetranychidae). Resistant Pest Management Newsletter. 14 (2): 40-43.
- Van de Vrie, J., A. McMurtry y C. B. Huffaker. 1972. Biology, ecology, and pest status and host – plants relations of tetranychids en ecology of tetranychid mites and their natural enemies: a review. Hilgardia. Vol. 41: 343 – 432.

- Velasco, H. y F. Pacheco. 1968. Biología, morfología y evaluación tóxica de acaricidas en la araña roja de la fresa *Tetranychus telarius* L. Agrociencia Vol. 3, N.1: 43-53 pp.
- Vera, J., E. Prado y A. Lagunes. 1980. Ácaros fitófagos. UACH. México. 125 pp.
- Villamón, F. 2000. Caracterización de microsátélites de *Solanum tuberosum* Subsp *tuberosum* y en las otras especies de papa cultivada. Tesis para optar Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima-Perú.
- Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Waugh, R. y W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotech.* 10: 186-191.
- Weiser, J. 1968. *Triplosporium tetranychii* sp.n. (Phycomycetes: Entomophthoraceae), a fungus infecting the red spider mite *Tetranychus althaeae* Hanst. *Folia Parasitol. (Prague)* 15: 115-122.
- Wilkinson, C.F. 1983. Role of mixed-funtion oxidases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides.* Plenum Press. New York. pp. 175-205.
- Williams, J.G.K., A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA. Polymorfisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Yasutomi, K. 1983. Role of detoxication esterases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides.* Plenum Press. New York. pp. 249-263.
- Zane, L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 1-16p.

APENDICE A

Cuadro A1. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch. de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	69	68	1	99	1	
0.1	40	28	12	70	30	29
0.5	99	60	39	61	39	38
1.0	84	36	48	43	57	56
3.0	102	29	73	28	72	71
5.0	310	47	263	15	85	84
8.0	161	16	145	10	90	89

Cuadro A2. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 48 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	69	66	3	96	4	
0.1	40	11	29	28	72	71
0.5	99	19	80	19	81	80
1.0	84	9	75	11	89	89
3.0	102	7	95	7	93	93
5.0	310	12	298	4	96	96
8.0	161	0	161	0	100	100

Cuadro A3. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch. de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	93	90	3	97	3	
100	68	42	26	62	38	36
250	70	38	32	54	46	44
500	90	33	57	37	63	62
1000	96	19	77	20	80	79
1500	159	13	146	8	92	91
2000	51	0	51	0	100	100

Cuadro A4. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	78	78	0	100	0	
50	134	99	35	74	26	26
100	149	94	55	63	37	37
300	127	55	72	43	57	57
500	206	62	144	30	70	70
700	226	65	161	29	71	71
900	131	6	125	5	95	95

Cuadro A5. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch. de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de naled a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	78	76	2	97	3	
100	66	54	12	82	18	16
250	95	43	52	45	55	54
500	59	18	41	31	69	69
1000	120	28	92	23	77	76
2000	75	13	62	17	83	82
3000	123	4	119	3	97	97

Cuadro A6. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de la línea susceptible de laboratorio, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	72	70	2	97	3	
250	171	92	79	54	46	45
500	88	39	49	44	56	54
1000	95	27	68	28	72	71
2000	96	16	80	17	83	83
3000	125	8	117	6	94	93
4000	82	0	82	0	100	100

Cuadro A7. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	133	126	7	95	5	
0.1	103	88	15	86	14	10
0.5	101	77	24	76	24	20
1.0	107	69	38	65	35	32
3.0	130	73	57	56	34	41
5.0	106	23	83	22	78	77
8.0	109	16	93	15	85	85

Cuadro A8. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 48 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	133	121	12	91	9	
0.1	103	79	24	77	23	16
0.5	101	67	34	66	34	27
1.0	107	48	59	45	55	51
3.0	130	44	86	34	66	63
5.0	106	11	95	10	90	88
8.0	109	0	109	0	100	100

Cuadro A9. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	368	353	15	96	4	
500	386	324	62	84	16	13
1000	332	237	95	71	29	26
2000	326	189	137	58	42	40
3000	280	134	146	48	52	50
4000	183	30	153	16	84	83
5000	201	6	195	3	97	97

Cuadro A10. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	559	551	8	99	1	
500	154	134	20	87	13	12
1000	160	120	40	75	25	24
2000	150	90	60	60	40	39
3000	323	109	214	34	66	66
4000	343	68	275	20	80	80
5000	261	21	240	8	92	92

Cuadro A11. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	240	228	12	95	5	
1000	222	186	36	84	16	12
2000	108	82	26	76	24	20
3000	231	129	102	56	44	41
4000	403	115	288	29	71	70
5000	253	45	208	18	82	81
6000	478	27	451	6	94	94

Cuadro A12. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	331	310	21	94	6	
250	148	121	27	82	18	13
500	173	124	49	72	28	23
1000	108	60	48	56	44	41
2000	185	94	91	51	49	46
3000	116	45	71	39	61	59
4000	157	16	141	10	90	89

Cuadro A13. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	229	218	11	95	5	
0.1	169	151	18	89	11	6
0.5	182	155	27	85	15	11
1.0	189	141	48	75	25	22
3.0	166	101	65	61	39	36
5.0	151	49	102	32	68	66
8.0	161	32	129	20	80	79

Cuadro A14. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina a 48 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	229	218	11	95	5	
0.1	169	139	30	82	18	14
0.5	182	137	45	75	25	21
1.0	189	118	71	62	38	34
3.0	166	90	76	54	46	43
5.0	151	39	112	26	74	73
8.0	161	21	140	13	87	86

Cuadro A15. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	284	266	18	94	6	
250	215	174	41	81	19	14
500	231	155	76	67	33	28
750	336	195	141	58	42	38
1000	179	78	101	44	56	53
2000	188	48	140	26	74	73
3000	223	12	211	5	95	94

Cuadro A16. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	153	149	4	97	3	
250	108	89	19	82	18	15
500	177	124	53	70	30	28
1000	119	64	55	54	46	45
1500	142	46	96	32	68	67
2000	96	15	81	16	84	84
3000	94	8	86	9	91	91

Cuadro A17. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de naled a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	82	80	2	98	2	
250	78	64	14	82	18	16
500	95	68	27	72	28	27
1000	103	59	44	57	43	41
2000	132	48	84	36	64	63
3000	96	20	76	21	79	79
4000	102	8	94	8	92	92

Cuadro A18. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo con manejo de acaricidas, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	359	339	20	94	6	
250	226	143	83	63	37	33
500	152	73	79	48	52	49
1000	271	86	185	32	68	66
2000	215	38	177	18	82	81
3000	340	33	307	10	90	90
4000	196	0	196	0	100	100

APPENDICE B

Cuadro B1. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	115	111	4	97	3	
0.1	97	48	49	49	51	49
0.2	78	31	47	40	60	59
0.4	119	38	81	32	68	67
0.6	79	18	61	23	77	76
0.8	80	11	69	14	86	86
1.0	131	2	129	2	98	98

Cuadro B2. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	188	184	4	98	2	
300	184	132	52	72	28	27
500	189	95	94	50	50	49
1000	92	23	69	25	75	74
1500	184	31	153	17	83	83
1700	183	18	165	10	90	90
1943	193	6	187	3	97	97

Cuadro B3. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	194	178	16	92	8	
300	204	66	138	32	68	65
500	219	41	178	19	81	80
1000	165	22	143	13	87	85
1500	215	13	202	6	94	93
1700	119	4	115	3	97	96
1995	187	1	186	1	99	99

Cuadro B4. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	182	173	9	95	5	
300	148	88	60	59	41	37
500	110	53	57	48	52	49
1000	94	37	57	39	61	59
1500	109	34	75	31	69	67
2000	117	26	91	22	78	77
2720	191	20	171	10	90	89

Cuadro B5. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin + butoxido de piperonilo a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	128	122	6	95	5	
500	116	91	25	78	22	18
1000	134	85	49	63	37	33
2000	99	50	49	50	50	47
2500	143	59	84	41	59	57
3000	176	42	134	24	76	75
4107	215	33	182	15	85	84

Cuadro B6. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina + dietil maleato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	97	91	6	94	6	
0.1	94	67	27	71	29	24
0.2	123	72	51	59	41	38
0.4	75	35	40	47	53	50
0.6	95	35	60	37	63	61
0.8	120	29	91	24	76	74
1.0	88	14	74	16	84	83

Cuadro B7. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina + dietil maleato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	199	193	6	97	3	
300	105	84	21	80	20	18
500	103	73	30	71	29	27
1000	151	76	75	50	50	48
1500	122	40	82	33	67	66
1700	195	25	170	13	87	87
1943	172	11	161	6	94	93

Cuadro B8. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol + dietil maleato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	102	94	8	92	8	
300	89	61	28	69	31	26
500	149	67	82	45	55	51
1000	164	38	126	23	77	75
1500	153	19	134	12	88	87
1700	123	5	118	4	96	96
1995	123	1	122	1	99	99

Cuadro B9. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled + dietil maleato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	185	176	9	95	5	
300	133	74	59	56	44	42
500	106	41	65	39	61	59
1000	113	38	75	34	66	65
1500	129	33	96	26	74	73
2000	73	10	63	14	86	86
2720	64	5	59	8	92	92

Cuadro B10. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin + dietil maleato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	144	136	8	94	6	
500	70	62	8	89	11	6
1000	58	40	18	69	31	27
2000	100	56	44	56	44	41
2500	118	52	66	44	56	53
3000	58	20	38	34	66	63
4107	176	33	143	19	81	80

Cuadro B11. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de abamectina + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	179	170	9	95	5	
0.1	105	86	19	82	18	14
0.2	119	83	36	70	30	27
0.4	90	55	35	61	39	36
0.6	119	56	63	47	53	50
0.8	89	30	59	34	66	65
1.0	128	23	105	18	82	81

Cuadro B12. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de bifentrina + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	283	278	5	98	2	
300	201	92	109	46	54	53
500	229	79	150	35	65	65
1000	259	57	202	22	78	78
1500	218	28	190	13	87	87
1700	236	16	220	7	93	93
1943	266	9	257	3	97	97

Cuadro B13. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de dicofol + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	132	127	5	96	4	
300	130	64	66	49	51	49
500	146	59	87	40	60	58
1000	79	15	64	19	81	80
1500	113	8	105	7	93	93
1700	107	2	105	2	98	98
1995	140	1	139	1	99	99

Cuadro B14. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de naled + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	165	161	4	98	2	
300	85	70	15	82	18	16
500	138	90	48	65	35	33
1000	82	42	40	51	49	48
1500	114	50	64	44	56	55
2000	95	32	63	34	66	65
2720	144	18	126	13	87	87

Cuadro B15. Mortalidad de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch de una línea de campo sin manejo, expuestas a diferentes concentraciones de oxido de fenbutatin + sss-tributilfosforotritioato a 24 h de exposición.

Concentración ppm	Numero de individuos			% S	% M	% M. C. (Abbott, 1925)
	Expuestos	vivos	Muertos			
Testigo	123	118	5	96	4	
500	96	81	15	84	16	12
1000	89	67	22	75	25	22
2000	125	76	49	61	39	37
2500	111	57	54	51	49	47
3000	204	80	124	39	61	59
4107	209	47	162	23	77	76

APENDICE C

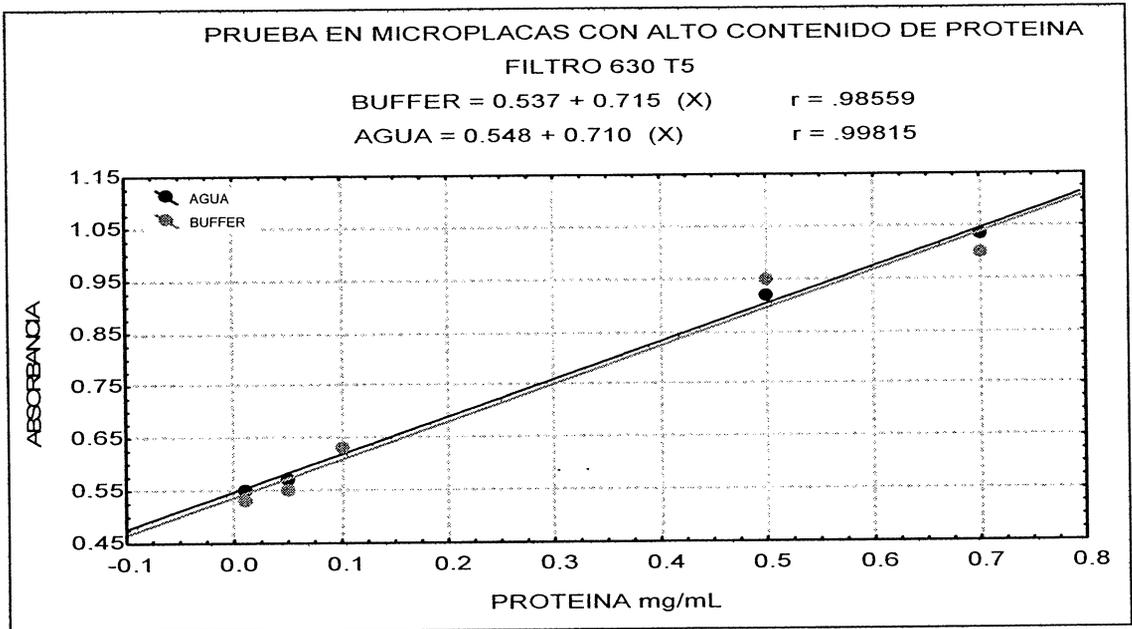


Figura C1. Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Bradford con alto contenido de proteína para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO_4).

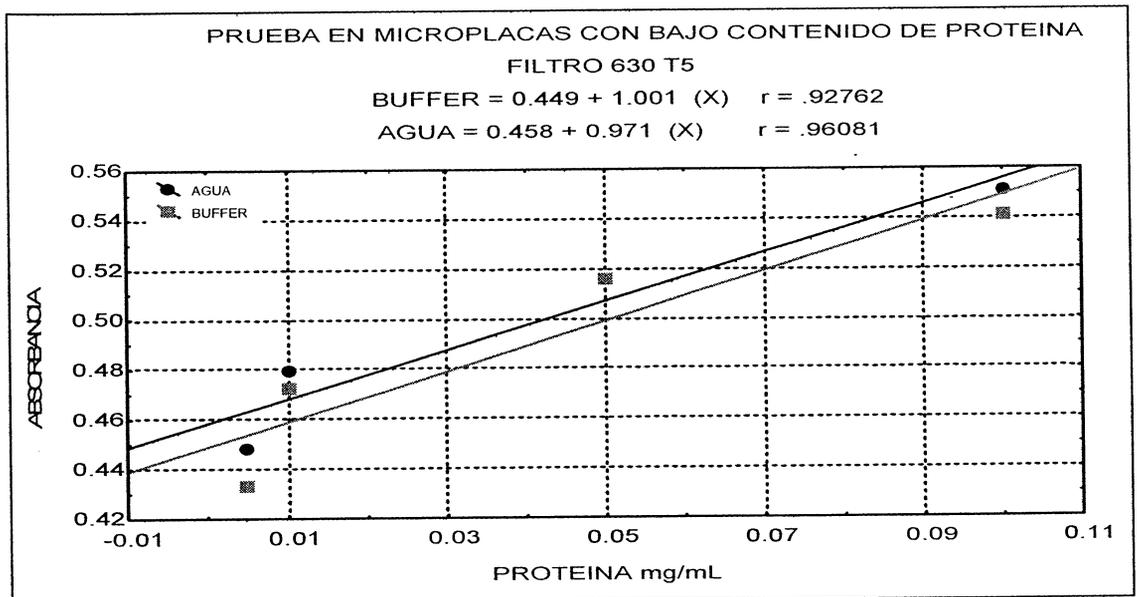


Figura C2.- Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Bradford con bajo contenido de proteína para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO_4).

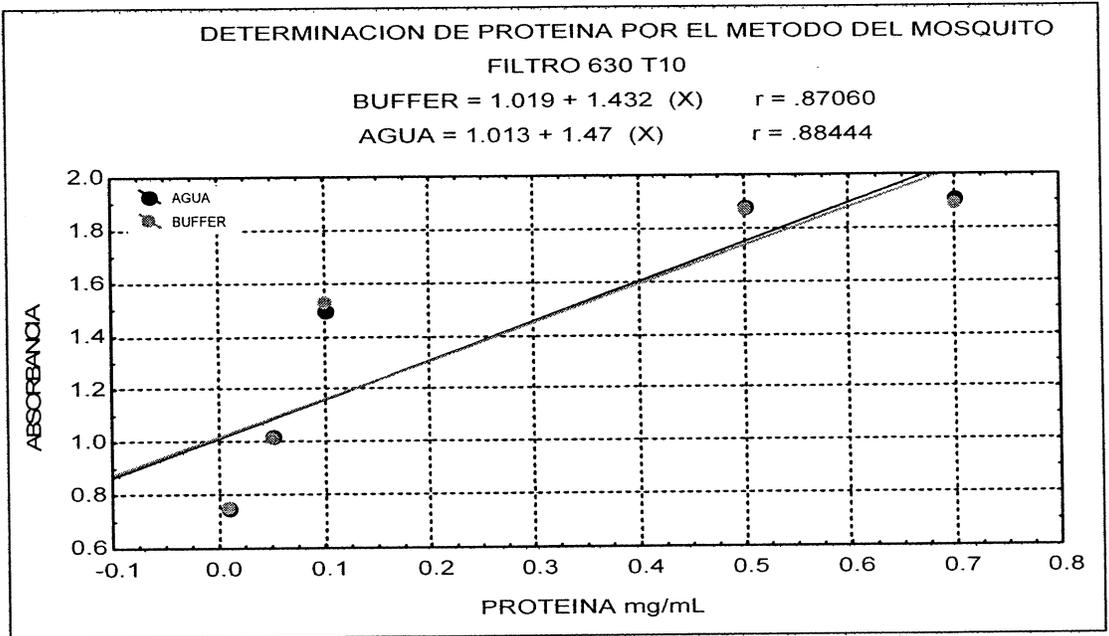


Figura C3.- Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Brogdon y Dickinson para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO₄).

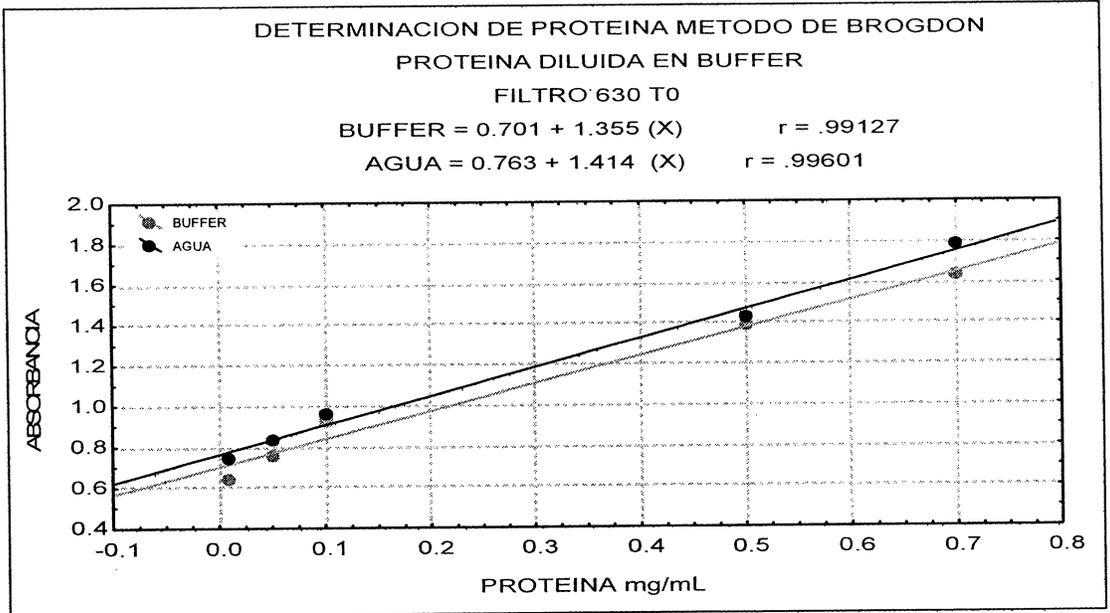


Figura C4.- Curva estándar de Albúmina Serica Bobina para el método de Brogdon para los solventes agua destilada y fosfato de potasio (KPO₄).

Cuadro C1.- Valores promedio de absorbancia para el método de Bradford con alto contenido de proteína en *Tetranychus urticae* Koch.

Absorbancia promedio				
Numero de ácaros	T ₀		T ₅	
	Agua	KPO ₄	Agua	KPO ₄
10	0.536	0.538	0.557	0.567
30	0.554	0.574	0.571	0.581
50	0.577	0.588	0.586	0.597
100	0.664	0.630	0.653	0.645
300	0.726	0.641	0.713	0.692
500	0.811	0.756	0.769	0.75
800	0.830	1.143	0.933	1.062

Cuadro C2.- Valores promedio de absorbancia para el método de Bradford con bajo contenido de proteína en *Tetranychus urticae* Koch.

Absorbancia promedio				
Numero de ácaros	T ₀		T ₅	
	Agua	KPO ₄	Agua	KPO ₄
10	0.460	0.470	0.452	0.450
30	0.497	0.568	0.482	0.526
50	0.592	0.608	0.562	0.584
100	0.637	0.618	0.595	0.632
300	0.664	0.650	0.624	0.677
500	0.695	0.720	0.681	0.759
800	0.748	0.772	0.713	0.780

Cuadro C3.- Valores promedio de absorbancia para el método de Brogdon y Dickinson para cuantificación de proteína en *Tetranychus urticae* Koch.

Absorbancia promedio				
Numero de ácaros	T ₀		T ₁₀	
	Agua	KPO ₄	Agua	KPO ₄
10	0.725	0.712	0.667	0.714
30	0.975	0.921	0.736	0.901
50	1.154	1.089	1.031	0.960
100	1.436	1.447	1.301	1.156
300	1.672	1.778	1.601	1.732
500	1.731	1.822	1.718	1.869
800	1.984	2.025	1.850	1.929

Cuadro C4.- Valores promedio de absorbancia para el método de Brogdon para cuantificación de proteína en *Tetranychus urticae* Koch.

Absorbancia promedio		
Numero de ácaros	T ₀	
	Agua	KPO ₄
10	0.607	0.713
30	0.694	0.784
50	0.720	0.873
100	0.828	0.965
300	1.274	1.430
500	1.394	1.608
800	1.532	1.738

Cuadro C5. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato alfa naftil acetato en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reacción para alfa naftil acetato				
Tiempo de reacción	Absorbancia promedio			
	0.3 mM	0.5 mM	0.7 Mm	0.9 mM
3	0.3434 F	0.3785 E	0.4499 E	0.4870 F
6	0.4540 E	0.4730 D	0.5325 D	0.6165 E
9	0.5680 D	0.6820 C	0.7390 C	0.8030 D
12	0.6585 C	0.7610 C	0.8495 B	0.9490 C
15	0.7290 B	0.8680 B	0.9850 A	1.0200 AB
18	0.7810 A	0.9570 AB	1.006 A	1.0515 A
20	0.8050 A	0.9825 A	1.007 A	1.0695 A

Cuadro C6. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacción para el sustrato beta naftil acetato en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reacción para beta naftil acetato				
Tiempo de reacción	Absorbancia promedio			
	0.3 mM	0.5 mM	0.7 Mm	0.9 mM
3	0.4005 F	0.4640 E	0.5490 F	0.5270 F
6	0.6540 E	0.6695 D	0.7325 E	0.6560 E
9	0.7680 D	0.8420 C	0.9425 D	0.8410 D
12	0.8585 C	0.9700 B	1.0495 C	1.0510 C
15	0.9025 B	1.0718 A	1.1215 B	1.1715 B
18	0.9685 A	1.1230 A	1.1515 AB	1.2145 A
20	0.9860 A	1.1250 A	1.1645 A	1.2425 A

Cuadro C7. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacci3n para el sustrato CDNB en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reacci3n para CDNB				
Tiempo de reacci3n	Absorbancia promedio			
	2.0 mM	5.0 mM	10 Mm	15 mM
1	0.7628 G	1.0906 G	1.0702 G	0.9665 G
2	0.8865 F	1.1637 F	1.2072 F	1.1010 F
3	0.9635 E	1.2671 E	1.3130 E	1.2135 E
4	1.0460 D	1.3623 D	1.4221 D	1.3318 D
5	1.4440 C	1.4628 C	1.5328 C	1.4403 C
10	1.3326 B	1.6652 B	1.7606 B	1.6593 B
15	1.4281 AB	1.7841 BA	1.8823 AB	1.6517 AB
20	1.5092 A	1.9037 A	1.9737 A	1.8712 A

Cuadro C8. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacci3n para el sustrato glutation reducido en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reacci3n para glutation reducido				
Tiempo de reacci3n	Absorbancia promedio			
	2.0 mM	4.0 mM	8.0 Mm	16 mM
1	0.7585 H	0.8670 G	1.0250 G	0.9185 G
2	0.8907 G	1.0997 F	1.3671 F	1.2027 F
3	1.0060 F	1.3091 E	1.6983 E	1.4455 E
4	1.0995 E	1.4815 D	1.9452 D	1.6611 D
5	1.1923 D	1.6418 C	2.1788 C	1.8558 C
10	1.3657 C	1.9405 B	2.4615 AB	2.1950 B
15	1.4842 B	2.1150 AB	2.6361 A	2.2483 B
20	1.5523 A	2.2155 A	2.6877 A	2.4143 A

Cuadro C9. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reaccion para el sustrato TMBZ en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reaccion para TMBZ					
Tiempo de reaccion	Absorbancia promedio				
	1.0 mM	1.5 mM	2.0 Mm	2.5 Mm	3.0 mM
1	1.9768 D	2.2156 E	2.6788 E	2.3585 F	2.4261 E
2	2.1183 C	2.3676 D	2.8943 D	2.5355 E	2.5648 DE
3	2.1541 C	2.3925 CD	2.9560 CD	2.7530 D	2.6428 CD
4	2.2410 B	2.4171 CD	2.9975 CD	2.8006 CD	2.7091 BCD
5	2.2995 B	2.4370 C	3.0373 BC	2.9600 BC	2.7633 BC
10	2.4570 A	2.5890 B	3.1295 AB	3.0603 AB	2.8386 AB
15	2.4946 A	2.6336 AB	3.1463 A	3.1226 AB	2.8683 A
20	2.5350 A	2.6625 A	3.1840 A	3.1446 A	2.8890 A

Cuadro C10. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reaccion para el sustrato DTNB en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reaccion para DTNB				
Tiempo de reaccion	Absorbancia promedio			
	0.25 mM	0.5 mM	0.75 Mm	1.0 mM
3	0.4118 E	0.4758 E	0.4401 D	0.4048 EF
6	0.4131 DE	0.4886 DE	0.4530 CD	0.4111 DE
9	0.4226 D	0.4973 CD	0.4613 C	0.4183 CD
12	0.4335 C	0.5043 C	0.4708 B	0.4278 BC
15	0.4466 AB	0.5135 B	0.4811 AB	0.4356 AB
18	0.4573 A	0.5213 AB	0.4880 A	0.4415 A
20	0.4636 A	0.5345 A	0.4956 A	0.4468 A

Cuadro C11. Valores promedio de absorbancia para obtener el tiempo optimo de reacci3n para el sustrato ATCH en la especie *Tetranychus urticae* Koch.

Tiempo optimo de reacci3n para ATCH				
Tiempo de reacci3n	Absorbancia promedio			
	2.0 mM	2.5 mM	3.0 Mm	4.0 mM
3	0.3785 E	0.4553 E	0.4655 E	0.4178 E
6	0.3871 DE	0.4620 DE	0.4740 DE	0.4296 DE
9	0.4008 CD	0.4651 DE	0.4786 CD	0.4351 CD
12	0.4075 BC	0.4713 CD	0.4840 BC	0.4413 BC
15	0.4153 AB	0.4786 B	0.4941 AB	0.4523 AB
18	0.4196 AB	0.4855 AB	0.5008 AB	0.4598 AB
20	0.4256 A	0.4913 A	0.5101 A	0.4661 A

Cuadro C12. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa para la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	T ₀	T ₁₅
1	0.364	0.423
2	0.359	0.425
3	0.397	0.459
4	0.403	0.45
5	0.399	0.457
6	0.4	0.425
7	0.373	0.415
8	0.379	0.419
9	0.359	0.425
10	0.288	0.342
11	0.274	0.34
12	0.395	0.43
13	0.385	0.427
14	0.408	0.433
15	0.409	0.447
16	0.409	0.469
17	0.367	0.408
18	0.4	0.435
19	0.398	0.44
20	0.39	0.437
21	0.294	0.351
22	0.363	0.429
23	0.374	0.42
24	0.391	0.441
25	0.408	0.44
26	0.397	0.443
27	0.386	0.429
28	0.389	0.417
29	0.391	0.436
30	0.386	0.417
31	0.366	0.419
32	0.31	0.345
33	0.293	0.341
34	0.415	0.453
35	0.427	0.462
36	0.414	0.46
37	0.409	0.458
38	0.433	0.45
39	0.408	0.44
40	0.404	0.432
41	0.386	0.422
42	0.406	0.442
43	0.286	0.349
44	0.291	0.334
45	0.356	0.454

Continuación

Muestra	To	T ₁₅
46	0.374	0.409
47	0.349	0.406
48	0.387	0.44
49	0.398	0.442
50	0.387	0.431
51	0.387	0.414
52	0.383	0.405
53	0.369	0.409
54	0.365	0.412
55	0.303	0.331
56	0.281	0.339
57	0.39	0.415
58	0.38	0.417
59	0.418	0.441
60	0.407	0.429
61	0.408	0.452
62	0.36	0.397
63	0.398	0.428
64	0.39	0.415
65	0.394	0.429
66	0.29	0.342
67	0.268	0.326
68	0.37	0.41
69	0.388	0.424
70	0.4	0.438
71	0.39	0.433
72	0.396	0.422
73	0.385	0.413
74	0.386	0.416
75	0.38	0.405
76	0.376	0.404
77	0.32	0.347
78	0.302	0.328
79	0.41	0.447
80	0.42	0.477
81	0.41	0.438
82	0.402	0.443
83	0.43	0.455
84	0.406	0.428
85	0.408	0.436
86	0.38	0.415
87	0.4	0.429
88	0.28	0.336
89	0.29	0.322
90	0.294	0.324

Cuadro C13. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa insensible para la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	To	T ₁₅
1	0.388	0.399
2	0.381	0.396
3	0.383	0.398
4	0.378	0.388
5	0.375	0.391
6	0.34	0.353
7	0.356	0.365
8	0.352	0.363
9	0.341	0.378
10	0.372	0.386
11	0.384	0.4
12	0.394	0.435
13	0.396	0.416
14	0.413	0.438
15	0.382	0.4
16	0.386	0.405
17	0.375	0.391
18	0.356	0.375
19	0.354	0.366
20	0.325	0.343
21	0.353	0.373
22	0.398	0.428
23	0.385	0.399
24	0.385	0.398
25	0.395	0.402
26	0.399	0.428
27	0.381	0.395
28	0.396	0.419
29	0.37	0.392
30	0.344	0.362
31	0.339	0.361
32	0.331	0.362
33	0.387	0.402
34	0.396	0.415
35	0.394	0.411
36	0.403	0.419
37	0.407	0.425
38	0.415	0.446
39	0.396	0.412
40	0.398	0.418
41	0.371	0.386
42	0.364	0.389
43	0.371	0.397
44	0.373	0.391
45	0.318	0.336

Continuación

Muestra	To	T ₁₅
46	0.399	0.424
47	0.395	0.416
48	0.338	0.367
49	0.382	0.405
50	0.375	0.408
51	0.38	0.406
52	0.375	0.398
53	0.368	0.41
54	0.345	0.363
55	0.354	0.376
56	0.35	0.362
57	0.34	0.375
58	0.37	0.387
59	0.381	0.402
60	0.392	0.405
61	0.393	0.414
62	0.415	0.433
63	0.387	0.405
64	0.389	0.411
65	0.376	0.391
66	0.356	0.383
67	0.357	0.388
68	0.325	0.343
69	0.364	0.379
70	0.395	0.418
71	0.382	0.395
72	0.385	0.397
73	0.391	0.406
74	0.394	0.407
75	0.382	0.393
76	0.399	0.411
77	0.397	0.418
78	0.374	0.399
79	0.348	0.362
80	0.334	0.352
81	0.331	0.371
82	0.387	0.405
83	0.395	0.414
84	0.384	0.411
85	0.412	0.439
86	0.417	0.447
87	0.415	0.448
88	0.392	0.415
89	0.393	0.411
90	0.374	0.399

Cuadro C14. Valores promedio de absorbancia de alfa y beta esterases para la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	Alfa-esterasas	Beta-esterasas
1	0.514	0.55
2	0.519	0.591
3	0.529	0.625
4	0.536	0.632
5	0.548	0.652
6	0.564	0.654
7	0.608	0.687
8	0.683	0.745
9	0.692	0.786
10	0.709	0.844
11	0.725	0.845
12	0.728	0.89
13	0.735	0.89
14	0.735	0.891
15	0.738	0.904
16	0.76	0.904
17	0.761	0.909
18	0.765	0.909
19	0.785	0.941
20	0.802	0.942
21	0.844	0.942
22	0.851	0.944
23	0.871	0.944
24	0.873	0.949
25	0.877	0.949
26	0.88	0.951
27	0.89	0.951
28	0.89	0.956
29	0.891	0.963
30	0.893	0.964
31	0.904	0.964
32	0.904	0.972
33	0.909	0.972
34	0.909	0.973
35	0.917	0.985
36	0.926	1.002
37	0.93	1.002
38	0.941	1.012
39	0.942	1.014
40	0.942	1.014
41	0.944	1.024
42	0.949	1.025
43	0.949	1.025
44	0.95	1.035
45	0.951	1.036

Continuación

Muestra	Alfa-esterasas	Beta-esterasas
46	0.963	1.036
47	0.964	1.058
48	0.964	1.071
49	0.972	1.071
50	0.972	1.084
51	0.972	1.089
52	0.973	1.092
53	0.985	1.093
54	1.002	1.096
55	1.005	1.116
56	1.012	1.118
57	1.013	1.119
58	1.014	1.128
59	1.014	1.129
60	1.015	1.13
61	1.024	1.13
62	1.025	1.131
63	1.029	1.135
64	1.031	1.135
65	1.035	1.136
66	1.04	1.138
67	1.056	1.148
68	1.065	1.152
69	1.071	1.157
70	1.08	1.157
71	1.085	1.16
72	1.089	1.164
73	1.089	1.165
74	1.092	1.183
75	1.093	1.204
76	1.096	1.204
77	1.138	1.209
78	1.157	1.209
79	1.16	1.215
80	1.164	1.223
81	1.165	1.233
82	1.183	1.251
83	1.185	1.261
84	1.187	1.261
85	1.19	1.38
86	1.191	1.38
87	1.194	1.388
88	1.195	1.388
89	1.203	1.407
90	1.205	1.442

Cuadro C15. Valores promedio de absorbancia de glutation s-transferasas para la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	To	T ₁₅
1	0.85	1.193
2	0.833	1.177
3	0.83	1.168
4	0.858	1.11
5	0.819	1.166
6	0.823	1.161
7	0.724	1.027
8	0.726	1.031
9	0.736	1.048
10	0.743	1.026
11	0.717	1.007
12	0.724	1.017
13	0.758	1.053
14	0.755	1.033
15	0.78	1.069
16	0.833	1.18
17	0.81	1.148
18	0.816	1.156
19	0.873	1.264
20	0.827	1.227
21	0.854	1.25
22	0.829	1.221
23	0.836	1.236
24	0.843	1.247
25	0.864	1.256
26	0.849	1.234
27	0.867	1.245
28	0.726	1.003
29	0.699	0.993
30	0.711	0.998
31	0.675	0.962
32	0.692	0.971
33	0.691	0.98
34	0.686	0.979
35	0.691	0.975
36	0.683	0.985
37	0.859	1.245
38	0.825	1.209
39	0.804	1.118
40	0.805	1.194
41	0.801	1.17
42	0.825	1.189
43	0.81	1.198
44	0.838	1.364
45	0.809	1.121

Continuación

Muestra	To	T ₁₅
46	0.811	1.07
47	0.754	1.01
48	0.736	1.108
49	0.725	1.006
50	0.717	1.117
51	0.707	1.027
52	0.734	1.003
53	0.728	1.025
54	0.735	1.085
55	0.79	1.13
56	0.823	1.128
57	0.801	1.106
58	0.826	1.164
59	0.877	1.127
60	0.817	1.025
61	0.844	1.121
62	0.829	1.286
63	0.816	1.248
64	0.834	1.156
65	0.846	1.134
66	0.859	1.145
67	0.877	1.033
68	0.736	0.956
69	0.701	0.98
70	0.721	0.948
71	0.685	0.932
72	0.702	0.984
73	0.711	0.99
74	0.696	0.989
75	0.701	0.945
76	0.693	0.995
77	0.869	1.145
78	0.835	1.209
79	0.824	1.194
80	0.815	1.187
81	0.84	1.196
82	0.768	1.085
83	0.884	1.103
84	0.839	1.185
85	0.863	1.163
86	0.765	1.227
87	0.879	1.133
88	0.845	1.204
89	0.83	1.209
90	0.79	1.147

Cuadro C16. Valores promedio de absorbancia de oxidasas para la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	Oxidasas	Muestra	Oxidasas
1	0.782	46	1.229
2	0.798	47	1.236
3	0.805	48	1.256
4	0.822	49	1.256
5	0.874	50	1.266
6	0.874	51	1.282
7	0.899	52	1.322
8	0.93	53	1.324
9	0.933	54	1.334
10	0.933	55	1.337
11	0.96	56	1.355
12	0.975	57	1.356
13	0.98	58	1.357
14	0.987	59	1.357
15	0.989	60	1.382
16	1.025	61	1.387
17	1.029	62	1.39
18	1.032	63	1.422
19	1.035	64	1.424
20	1.053	65	1.427
21	1.055	66	1.431
22	1.067	67	1.433
23	1.095	68	1.441
24	1.098	69	1.446
25	1.109	70	1.45
26	1.116	71	1.451
27	1.116	72	1.49
28	1.123	73	1.492
29	1.133	74	1.499
30	1.148	75	1.517
31	1.152	76	1.518
32	1.153	77	1.522
33	1.174	78	1.527
34	1.177	79	1.555
35	1.182	80	1.557
36	1.183	81	1.567
37	1.189	82	1.574
38	1.195	83	1.576
39	1.195	84	1.599
40	1.209	85	1.651
41	1.217	86	1.661
42	1.221	87	1.679
43	1.224	88	1.68
44	1.224	89	1.68
45	1.229	90	1.683

Cuadro C17. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa para la línea de campo de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	T ₀	T ₁₅
1	0.499	0.522
2	0.53	0.556
3	0.528	0.564
4	0.572	0.599
5	0.595	0.624
6	0.504	0.526
7	0.514	0.536
8	0.472	0.5
9	0.467	0.504
10	0.432	0.459
11	0.426	0.46
12	0.512	0.54
13	0.539	0.583
14	0.559	0.598
15	0.575	0.596
16	0.643	0.669
17	0.493	0.516
18	0.502	0.536
19	0.49	0.521
20	0.502	0.539
21	0.455	0.479
22	0.436	0.463
23	0.535	0.595
24	0.54	0.561
25	0.573	0.599
26	0.584	0.611
27	0.471	0.513
28	0.495	0.521
29	0.515	0.565
30	0.509	0.541
31	0.48	0.518
32	0.426	0.465
33	0.435	0.475
34	0.55	0.582
35	0.571	0.603
36	0.582	0.615
37	0.59	0.623
38	0.519	0.559
39	0.498	0.541
40	0.503	0.536
41	0.513	0.55
42	0.52	0.58
43	0.465	0.51
44	0.468	0.526
45	0.46	0.53

Continuación

Muestra	To	T ₁₅
46	0.409	0.463
47	0.406	0.485
48	0.44	0.517
49	0.442	0.499
50	0.441	0.513
51	0.417	0.487
52	0.425	0.5012
53	0.409	0.48
54	0.412	0.446
55	0.431	0.471
56	0.439	0.492
57	0.43	0.471
58	0.427	0.492
59	0.433	0.463
60	0.447	0.514
61	0.469	0.536
62	0.408	0.456
63	0.435	0.483
64	0.44	0.496
65	0.437	0.474
66	0.351	0.391
67	0.398	0.425
68	0.53	0.56
69	0.54	0.57
70	0.57	0.6
71	0.58	0.62
72	0.574	0.611
73	0.49	0.51
74	0.51	0.534
75	0.51	0.558
76	0.48	0.518
77	0.42	0.46
78	0.444	0.48
79	0.56	0.585
80	0.58	0.6
81	0.58	0.62
82	0.59	0.625
83	0.52	0.575
84	0.53	0.568
85	0.5	0.534
86	0.5	0.548
87	0.52	0.58
88	0.52	0.548
89	0.47	0.526
90	0.47	0.498

Cuadro C18. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa insensible para la línea de campo de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	To	T ₁₅
1	0.478	0.494
2	0.471	0.499
3	0.478	0.502
4	0.379	0.393
5	0.38	0.412
6	0.426	0.453
7	0.446	0.495
8	0.55	0.587
9	0.366	0.398
10	0.376	0.402
11	0.387	0.411
12	0.395	0.422
13	0.475	0.503
14	0.477	0.501
15	0.432	0.479
16	0.377	0.399
17	0.388	0.409
18	0.427	0.454
19	0.418	0.441
20	0.413	0.435
21	0.318	0.34
22	0.379	0.403
23	0.373	0.397
24	0.381	0.414
25	0.494	0.525
26	0.48	0.52
27	0.389	0.411
28	0.37	0.407
29	0.508	0.523
30	0.433	0.456
31	0.439	0.466
32	0.401	0.426
33	0.399	0.434
34	0.38	0.402
35	0.395	0.427
36	0.398	0.409
37	0.521	0.562
38	0.528	0.559
39	0.435	0.471
40	0.418	0.439
41	0.442	0.478
42	0.465	0.497
43	0.466	0.499
44	0.418	0.436
45	0.41	0.447

Continuación

Muestra	To	T ₁₅
46	0.465	0.48
47	0.424	0.458
48	0.414	0.442
49	0.388	0.445
50	0.385	0.438
51	0.382	0.436
52	0.387	0.428
53	0.378	0.419
54	0.372	0.413
55	0.379	0.42
56	0.374	0.415
57	0.47	0.502
58	0.475	0.514
59	0.431	0.464
60	0.461	0.495
61	0.372	0.405
62	0.426	0.461
63	0.422	0.455
64	0.403	0.438
65	0.37	0.405
66	0.371	0.403
67	0.369	0.4
68	0.378	0.411
69	0.489	0.524
70	0.468	0.5
71	0.387	0.421
72	0.378	0.414
73	0.504	0.537
74	0.421	0.456
75	0.432	0.463
76	0.399	0.437
77	0.387	0.424
78	0.392	0.43
79	0.368	0.399
80	0.374	0.406
81	0.422	0.456
82	0.372	0.393
83	0.422	0.444
84	0.421	0.446
85	0.482	0.503
86	0.384	0.405
87	0.375	0.399
88	0.391	0.415
89	0.398	0.421
90	0.395	0.416

Cuadro C19. Valores promedio de absorbancia de alfa y beta esterazas para la línea de campo de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	Alfa-esterazas	Beta-esterazas
		1.023
1	0.965	1.025
2	0.987	1.032
3	0.987	1.057
4	0.995	1.059
5	0.999	1.076
6	1.004	1.084
7	1.008	1.085
8	1.016	1.1
9	1.025	1.122
10	1.025	1.123
11	1.025	1.129
12	1.033	1.136
13	1.036	1.147
14	1.038	1.147
15	1.046	1.15
16	1.046	1.156
17	1.056	1.166
18	1.058	1.171
19	1.058	1.172
20	1.058	1.19
21	1.069	1.201
22	1.076	1.211
23	1.077	1.214
24	1.081	1.215
25	1.087	1.217
26	1.087	1.217
27	1.101	1.22
28	1.105	1.233
29	1.109	1.234
30	1.109	1.24
31	1.112	1.243
32	1.113	1.256
33	1.116	1.268
34	1.117	1.287
35	1.122	1.289
36	1.123	1.3
37	1.125	1.333
38	1.127	1.336
39	1.129	1.345
40	1.13	1.356
41	1.135	1.364
42	1.137	1.365
43	1.138	1.368
44	1.143	1.387
45	1.147	

Continuación

Muestra	Alfa-esterasas	Beta-esterasas
46	1.147	1.39
47	1.147	1.399
48	1.148	1.415
49	1.15	1.415
50	1.152	1.416
51	1.154	1.423
52	1.158	1.433
53	1.164	1.437
54	1.169	1.44
55	1.17	1.443
56	1.177	1.443
57	1.181	1.456
58	1.183	1.465
59	1.184	1.465
60	1.19	1.471
61	1.192	1.472
62	1.193	1.479
63	1.195	1.485
64	1.2	1.485
65	1.202	1.488
66	1.203	1.49
67	1.235	1.5
68	1.238	1.507
69	1.24	1.515
70	1.247	1.525
71	1.257	1.563
72	1.268	1.577
73	1.289	1.587
74	1.289	1.593
75	1.302	1.611
76	1.331	1.632
77	1.352	1.634
78	1.369	1.641
79	1.377	1.651
80	1.389	1.66
81	1.39	1.66
82	1.404	1.66
83	1.419	1.666
84	1.438	1.671
85	1.452	1.679
86	1.487	1.712
87	1.52	1.723
88	1.546	1.829
89	1.587	1.93
90	1.698	2.031

Cuadro C20. Valores promedio de absorbancia de glutatión s-transferasa para la línea de campo de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	To	T ₁₅
1	0.97	1.459
2	0.948	1.425
3	0.946	1.433
4	0.923	1.405
5	0.934	1.427
6	0.948	1.432
7	0.927	1.422
8	0.939	1.435
9	0.927	1.434
10	0.998	1.52
11	0.973	1.486
12	1.159	1.74
13	1.043	1.56
14	1.029	1.556
15	0.989	1.514
16	1	1.528
17	0.985	1.533
18	0.955	1.517
19	0.996	1.524
20	0.961	1.458
21	1.042	1.556
22	0.957	1.474
23	0.926	1.424
24	0.952	1.461
25	1.002	1.51
26	0.967	1.473
27	0.959	1.479
28	0.966	1.471
29	0.888	1.413
30	0.88	1.406
31	0.887	1.413
32	0.988	1.394
33	0.974	1.394
34	1.101	1.667
35	0.975	1.374
36	0.987	1.404
37	0.987	1.451
38	0.993	1.454
39	0.885	1.447
40	0.991	1.452
41	0.98	1.47
42	0.948	1.528
43	0.976	1.483
44	0.983	1.41
45	0.974	1.457

Continuación

Muestra	To	T ₁₅
46	0.958	1.482
47	0.937	1.472
48	0.943	1.436
49	0.975	1.52
50	0.988	1.456
51	0.993	1.489
52	1.128	1.72
53	1.039	1.54
54	1.089	1.576
55	1.056	1.495
56	1.02	1.508
57	0.99	1.503
58	0.995	1.507
59	0.987	1.514
60	0.981	1.438
61	1.046	1.526
62	0.987	1.434
63	0.996	1.424
64	0.972	1.468
65	1.015	1.51
66	0.984	1.475
67	0.989	1.489
68	0.976	1.491
69	0.917	1.423
70	0.902	1.38
71	0.889	1.373
72	0.894	1.384
73	1.121	1.51
74	0.925	1.4
75	0.924	1.375
76	0.889	1.304
77	0.924	1.451
78	0.913	1.424
79	0.985	1.447
80	0.941	1.382
81	0.834	1.324
82	0.956	1.412
83	0.974	1.504
84	0.984	1.476
85	0.925	1.388
86	0.991	1.427
87	0.998	1.48
88	1.025	1.527
89	1.047	1.502
90	1.115	1.573

Cuadro C21. Valores promedio de absorbancia de oxidasas para la línea de campo de *Tetranychus urticae* Koch.

Muestra	Oxidasas	Muestra	Oxidasas
1	1.15	46	2.056
2	1.198	47	2.077
3	1.234	48	2.087
4	1.258	49	2.098
5	1.269	50	2.135
6	1.345	51	2.139
7	1.347	52	2.146
8	1.369	53	2.149
9	1.38	54	2.152
10	1.397	55	2.156
11	1.425	56	2.16
12	1.433	57	2.162
13	1.469	58	2.167
14	1.487	59	2.172
15	1.506	60	2.176
16	1.522	61	2.185
17	1.547	62	2.19
18	1.589	63	2.205
19	1.654	64	2.217
20	1.678	65	2.23
21	1.696	66	2.236
22	1.714	67	2.242
23	1.725	68	2.257
24	1.732	69	2.267
25	1.754	70	2.292
26	1.756	71	2.317
27	1.763	72	2.375
28	1.789	73	2.378
29	1.814	74	2.382
30	1.837	75	2.403
31	1.865	76	2.521
32	1.895	77	2.578
33	1.924	78	2.646
34	1.946	79	2.664
35	1.952	80	2.674
36	1.956	81	2.674
37	1.96	82	2.681
38	1.968	83	2.683
39	2.014	84	2.708
40	2.024	85	2.713
41	2.034	86	2.72
42	2.036	87	2.753
43	2.041	88	2.818
44	2.045	89	2.832
45	2.055	90	2.836