

# ADAPTACIÓN DE MÉTODOS EN MICROPLACAS PARA IDENTIFICAR MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *Tetranychus urticae* KOCH

## ADAPTATION OF METHODS USING MICROPLATES TO IDENTIFY MECHANISMS OF RESISTANCE IN *Tetranychus urticae* KOCH

Ernesto Cerna<sup>1</sup>, Yisa Ochoa<sup>2\*</sup>, Mohammad Badii<sup>3</sup>, Jerónimo Landeros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad No. 940, Colonia Ciudad Universitaria. Aguascalientes, Aguascalientes. (yisa8a@yahoo.com) <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Biología. 28710. San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

### RESUMEN

Las pruebas bioquímicas son útiles para conocer la actividad y cantidad de enzimas responsables de la resistencia. En este estudio se recolectaron ácaros *Tetranychus urticae* Koch, en campos productores de fresa del estado de Guanajuato, México. Se realizaron pruebas bioquímicas para determinar los mecanismos enzimáticos de resistencia, usando una línea susceptible de *T. urticae* como referencia y adaptando los métodos en microplacas, según lo describe Fersht para mosquitos. Una vez estandarizado el método se determinó el nivel de enzimas en ambas poblaciones. Se encontró que las oxidasas y las  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas tienen una mayor presencia en la población de campo; por tanto, son responsables de la resistencia a acaricidas de la población de *T. urticae* muestreada en este estudio.

**Palabras clave:** ensayos en microplacas, esterasas, oxidasas.

### INTRODUCCIÓN

**T***tetranychus urticae* Koch ataca a más de 180 especies de plantas y es una de las especies que mayor daño ocasiona a los cultivos. El control químico es el más usado en esta plaga, pero la mala aplicación de los plaguicidas ha provocado el desarrollo de resistencia (Georghiou y Saito, 1983). La de tipo fisiológico es la más importante debido a los sistemas enzimáticos (Lagunes y Villanueva, 1994).

La forma convencional para detectar de la resistencia se basa en pruebas de susceptibilidad a acaricidas,

### ABSTRACT

Biochemical tests are useful to learn about the activity and amount of enzymes responsible for resistance. In this study we collected mites *Tetranychus urticae* Koch in strawberry production fields in the state of Guanajuato, Mexico. Biochemical tests were performed to determine the enzymatic mechanisms of resistance, using a susceptible line of *T. urticae* as a reference, and adapting the methods in microplates, as described by Fersht for mosquitoes. Once the method was standardized, the level of enzymes in both populations was determined. It was found that oxidases and  $\alpha$  and  $\beta$  esterases have greater presence in the field population, hence they are responsible for the resistance to acaricides by the population of *T. urticae* sampled in this study.

**Key words:** tests in microplates, esterases, oxidases.

### INTRODUCTION

**T**he *Tetranychus urticae* Koch attacks more than 180 species of plants and is one of the species that causes most damage to crops. Chemical control is the most used in this pest, but the misapplication of pesticides has led to the development of resistance (Georghiou and Saito, 1983). The physiological type is the most important because of the enzyme systems (Lagunes and Villanueva, 1994).

The conventional way to detect resistance is based on susceptibility testing to acaricides, requiring many organisms enabling to quantify the level of resistance, but the mechanisms responsible remaining undetected (Keiding, 1986). The monitoring and detection of resistance require effective techniques, like the

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Marzo, 2009. Aprobado: Julio, 2010.

Publicado como NOTA en *Agrociencia* 44: 623-630. 2010.

requiriendo numerosos organismos que permitan cuantificar el nivel de resistencia, pero sin detectar los mecanismos responsables (Keiding, 1986). El monitoreo y la detección de la resistencia requieren técnicas efectivas, y las pruebas bioquímicas se usan para conocer la actividad y la cantidad de enzimas responsables de este fenómeno (Hemingway *et al.*, 1986). Además, se puede conocer los fenotipos multirresistentes, la capacidad de detectar etapas iniciales de resistencia en una población y la frecuencia de genes con mecanismos de resistencia específicos (Rodríguez *et al.*, 2001).

Aunque estos métodos se usan para algunas especies de mosquitos de tamaño medio (7 a 20 mm), utilizando hasta un individuo por muestra, no hay técnicas para especies de tamaño pequeño (1 a 6 mm), como los ácaros. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue adaptar el método de microplacas para determinar los mecanismos y niveles de resistencia enzimática en poblaciones del ácaro de dos manchas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Líneas de ácaros

Se usaron dos líneas de *T. urticae*. Una susceptible (N-s), donada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), mantenida por 130 generaciones sin presión de selección por plaguicidas y desarrollada sobre plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad lima, en cámaras bioclimáticas, a  $25 \pm 2$  °C, 60-70 % HR y 12:12 L:O. La otra línea (Lc) se recolectó en campos de fresa en Abasolo e Irapuato, estado de Guanajuato. Los ácaros se llevaron a la UAAAN donde se establecieron en condiciones similares a la N-s

### Determinación de proteína

Para determinar la cantidad de ácaros por muestra se usó como referencia la proteína por mosquito (Brogdon y Barber, 1987). Se usó el método de Bradford (1976) modificado por Brogdon (1984), con el Kit-II de Bio-Rad y la albúmina sérica bovina (ASB) como proteína de referencia. Se usaron hembras adultas (8 d edad) en siete concentraciones en relación al número (10, 30, 50, 100, 300, 500 y 800 ácaros); cada una con 30 repeticiones.

Una vez determinada la cantidad de muestra en relación a la proteína (30 ácaros) se homogenizaron en 100  $\mu$ L de amortiguador fosfato de potasio ( $KPO_4$ ) a 0.05 M y pH 7.2, diluyéndose a 1 mL con el mismo amortiguador, para utilizarlo como fuente de enzima.

biochemical tests, which are used to determine the activity and amount of enzymes responsible for this phenomenon (Hemingway *et al.*, 1986). In addition, multi-resistant phenotypes may be known, as well as the ability to detect early stages of resistance in a population and the frequency of genes with specific resistance mechanisms (Rodríguez *et al.*, 2001).

Although these methods are used for some species of medium-sized mosquitoes (7-20 mm), using up to one individual per sample, there are no techniques for species of small size (1-6 mm), such as mites. Therefore, the aim of this study was to adapt the microplate method to determine the mechanisms and levels of enzyme resistance in populations of two-spot mites.

## MATERIALS AND METHODS

### Mite lines

Two lines of *T. urticae* were used. One susceptible (N-s), donated by the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), maintained for 130 generations without pressure of selection by pesticides and developed on seedlings of the lime bean (*Phaseolus vulgaris*) variety, in bioclimatic chambers at  $25 \pm 2$  °C, 60-70 % HR and 12:12 L: O. The other line (Lc) was collected in strawberry fields in Abasolo and Irapuato, state of Guanajuato. Mites were taken to UAAAN where they were settled in conditions similar to the N-s.

### Determination of protein

To determine the number of mites per sample the protein per mosquito was taken as reference (Brogdon and Barber, 1987). The method by Bradford (1976) was used, as amended by Brogdon (1984), with the Bio-Rad Kit-II and the bovine serum albumin (BSA) as reference protein. We used adult females of 8 d of age in seven concentrations in relation to the number (10, 30, 50, 100, 300, 500 and 800 mites); each with 30 repetitions.

Once the amount of sample in relation to the protein (30 mites) was determined, it was possible to homogenize it in a 100  $\mu$ L potassium phosphate buffer ( $KPO_4$ ) at 0.05 M and pH 7.2, diluted to 1 mL with the same buffer for use as a source of enzyme.

### Adaptation of methods

The L-s was used to determine the levels of  $\alpha$ -esterase ( $\beta$ EST),  $\beta$ -esterase ( $\beta$ EST), oxidases (Ox), glutathione s-transferases (GST), acetylcholinesterase (ACE) and insensitive

### Adaptación de los métodos

La L-s, se usó para determinar los niveles de  $\alpha$ -esterasas ( $\alpha$ EST),  $\beta$ -esterasas ( $\beta$ EST), oxidasas (Ox), glutatión s-transferasas (GST), acetilcolinesterasa (ACE) y acetilcolinesterasa insensible (ACE in) y se adaptaron como se describió para mosquitos (Brogdon *et al.*, 1997), usando la metodología de Fersht (1985). Para cada prueba se usaron 90 muestras de ácaros por triplicado en placas de 96 cavidades y las absorbancias se tomaron con un lector Stat-Fax 2100.

Para las  $\alpha$  y  $\beta$ -esterasas se determinó la concentración de sustrato saturante (css) de  $\alpha$  y  $\beta$  naftil acetato, el tiempo óptimo de reacción (ToR) y la velocidad inicial (Vo). Las lecturas de absorbancia de  $\alpha$  y  $\beta$  naftil acetato (0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 mM) se analizaron a intervalos de 3 hasta 20 min, para determinar la meseta del ToR. Los valores de Vo se obtuvieron con base en la pendiente de la curva y divididos por el ToR. Para la css se graficaron los resultados de Vo contra cada concentración de  $\alpha$  y  $\beta$  naftil acetato. Respecto a la GST se determinó la css de 1-cloro-2-,4-dinitrobenzeno (CDNB) y de glutatión reducido (GR), el ToR y la Vo. Se mantuvo constante la concentración de GR (2 mM) y las concentraciones de CDNB (2, 5, 10 y 15 mM) se analizaron en intervalos de 1 a 20 min. La css, el ToR y la Vo del GR se encontraron al probar diferentes concentraciones y tiempos (2, 4, 8, y 16 mM; 1 a 20 min) y manteniendo la concentración de CDNB establecida. Para las oxidasa se determinó la css, ToR y Vo para el 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina-dihidrocloruro (TMBZ), con metodología similar para esterasas. Las concentraciones evaluadas de TMBZ fueron 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM, a intervalos de 1 a 20 min. Finalmente, para la ACE y ACE in se determinó la css para el yoduro de acetilcolina (ATCh) y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), el ToR y la Vo. La metodología fue similar a la de GST: concentración de DTNB 0.5 mM, y concentraciones de ATCh (2, 2.5, 3.0 y 4.0 mM) analizadas a intervalos de 3 hasta 20 min. Para el DTNB las concentraciones e intervalos de tiempo fueron 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 mM, y de 3 hasta 20 min; manteniendo la concentración de ATCh establecida.

### Determinación de los niveles enzimáticos

Para las  $\alpha$  y  $\beta$ -esterasas se colocaron 100  $\mu$ L del homogenato en cada celda de la microplaca y 100  $\mu$ L de  $\alpha$  o  $\beta$  naftil acetato al 0.7 mM, por 15 min. Se adicionaron 100  $\mu$ L de Fast Blue y se leyó a 545 nm. Para las GST se colocaron 100  $\mu$ L de la muestra de ácaros más 100  $\mu$ L de GR al 8.0 mM y 100  $\mu$ L de CDNB al 10 mM. Al inicio se tomó una primer lectura ( $T_0$ ) a 340 nm, luego una segunda ( $T_{10}$ ) a los 10 min a 340 nm. La diferencia de lecturas ( $T_{10}-T_0$ ) se usó para el análisis de los resultados. Para

acetilcolinesterase (ACE in), and they were adapted as from those described for mosquitoes (Brogdon *et al.*, 1997), using the method by Fersht (1985). For each test 90 samples of mites were used in triplicate in plates of 96 cavities, and the absorbances were taken with a Stat-Fax 2100 reader.

For the  $\alpha$  and  $\beta$ -esterases, the saturating substrate concentration (css) of  $\alpha$  and  $\beta$  naphthyl acetate was determined, as well as the optimum time of reaction (ToR) and the initial speed (Vo). Absorbance readings of  $\alpha$  and  $\beta$  naphthyl acetate (0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mM) were analyzed at intervals of 3 up to 20 min, to determine the ToR plateau. The Vo values were obtained based on the slope of the curve and divided by ToR. For css the results were plotted against each concentration of  $\alpha$  and  $\beta$  naphthyl acetate. With regard to GST the ccs of 1-chloro-2-,4-dinitrobenzene (CDNB) and reduced glutathione (GR) was determined, also the ToR and Vo. The concentration of GR (2 mM) remained constant, and the CDNB concentrations (2, 5, 10 and 15 mM) were analyzed at intervals of 1 to 20 min. The css, ToR and Vo of GR were found by testing different concentrations and times (2, 4, 8, and 16 mM, 1 to 20 min) and keeping the concentration of CDNB established. For oxidases, we investigated the css, ToR and Vo for 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride (TMBZ), using a methodology similar to that for esterasas. The TMBZ concentrations evaluated were 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM at intervals of 1 to 20 min. Finally, for the ACE and ACE in, we recorded the css for acetylcholine iodide (ATCh) and the acid 5,5'-Diti-bis-2-nitrobenzoic (DTNB), and the ToR and Vo. The methodology was similar to that of GST, namely, a concentration of 0.5 mM DTNB, and ATCh concentrations (2, 2.5, 3.0 and 4.0 mM) tested at intervals from 3 up to 20 min. For the DTNB, the concentrations and time intervals were 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mM, and intervals of 3 up to 20 min, keeping the concentration of ATCh established.

### Determination of enzyme levels

For  $\alpha$  and  $\beta$ -esterases, 100  $\mu$ L of homogenate were placed in each cell of the microplate and 100  $\mu$ L of  $\alpha$  or  $\beta$  naphthyl acetate at 0.7 mM for 15 min. One hundred (100)  $\mu$ L of Fast Blue were added and read at 545 nm. For GST 100  $\mu$ L of the mite sample were added, plus 100  $\mu$ L of GR at 8.0 mM and 100  $\mu$ L of CDNB at 10 mM. At the beginning, a first reading ( $T_0$ ) was taken at 340 nm, then a second ( $T_{10}$ ) 10 min later at 340 nm. The difference in readings ( $T_{10}-T_0$ ) was used to analyze the results. In the case of oxidases 100  $\mu$ L of the homogenate were applied, plus 200  $\mu$ L of TMBZ at 2.0 mM and 25  $\mu$ L of hydrogen peroxide at 3 %. It was left to react for 10 min and read at 630 nm. Finally, for the ACE and ACE in, the addition was of 100  $\mu$ L of homogenate, plus 100  $\mu$ L of ATCh at 3.0 mM

las oxidadas se colocaron 100  $\mu\text{L}$  del homogenato más 200  $\mu\text{L}$  de TMBZ al 2.0 mM y 25  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno al 3 %. Se dejó reaccionar por 10 min y se leyó a 630 nm. Finalmente, para la ACE y ACE in se colocaron 100  $\mu\text{L}$  del homogenato más 100  $\mu\text{L}$  de ATCH al 3.0 mM y 100  $\mu\text{L}$  de DTNB al 0.25 mM. Se tomó la ( $T_0$ ) a 405 nm, luego de 15 min se tomó una segunda lectura ( $T_{15}$ ) con el mismo filtro. La diferencia entre las lecturas ( $T_{15}-T_0$ ) se usó para el análisis de los resultados. Para determinar los niveles de ACE insensible, la metodología fue similar a la anterior, pero en la solución de ATCH se agregaron 25 mg de naled (1,2-dibromo-2,2-dicloroetil dimetil fosfato) como inhibidor.

### Análisis de los resultados

Con las absorbancias de cada enzima se efectuó una distribución de frecuencias, donde la absorbancia es la variable y la frecuencia el número de muestras de ácaros. Se estableció el umbral de tolerancia, con los valores máximos obtenidos de la línea N-s y determinando la proporción de tolerancia. Se realizó un AN-DEVA de clasificación simple y una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) (SAS Institute Inc, 1985), para determinar las diferencias en la actividad enzimática entre enzimas de ambas poblaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de proteína

Las muestras de 50-800 ácaros presentaron una alta cantidad de proteína que sobrepasó el rango requerido (60 a 140  $\mu\text{g}$ ) y las muestras de 500 y 800 ácaros mostraron valores que sobrepasaban el rango lineal del método (Cuadro 1). Bradford (1976) menciona que valores fuera del rango no son confiables para la cuantificación de proteína en tejidos y fluidos.

and 100  $\mu\text{L}$  of DTNB at 0.25 mM. The ( $T_0$ ) was taken at 405 nm; after 15 min a second reading ( $T_{15}$ ) was made with the same filter. The difference between the readings ( $T_{15}-T_0$ ) was used to analyze the results. To determine the levels of insensitive ACE the methodology was similar to the previous one, but in the ATCH solution 25 mg of naled (1,2-dibromo-2,2-dicloroetil dimethyl phosphate) are added as inhibitor.

### Analysis of results

With the absorbences of each enzyme a frequency distribution was made, where the absorbance is the variable and the frequency the number of mite samples. The threshold of tolerance was set with maximum values obtained from the N-s line and determining the proportion of tolerance. We performed a simple classification ANOVA and applied the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) (SAS Institute Inc, 1985) to determine the differences in enzymatic activity between enzymes of both populations.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Protein content

The 50-800 mite samples showed a high amount of protein, which exceeded the required range (60 to 140  $\mu\text{g}$ ) and the samples of 500 and 800 mites exhibited values exceeding the linear range of the method (Table 1). Bradford (1976) mentions that out of range values are not reliable for the quantification of protein in tissues and fluids. Thus, samples with 10 and 30 mites showed values within the range, so 30 mites per sample were taken, for their high and stable values of protein.

**Cuadro 1. Contenido de proteína de hembras adultas de 8 d de edad de la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.**

**Table 1. Table 1. Protein content of adult females aged 8 d of the susceptible line of *Tetranychus urticae* Koch.**

Cuantificación de proteína en <i>Tetranychus urticae</i> <sup>a</sup>			
Número de ácaros	Absorbancia	mg mL <sup>-1</sup> proteína	$\mu\text{g}$ proteína
10	0.8133 $\pm$ 0.079	0.0862	80.60
30	0.8843 $\pm$ 0.014	0.1377	123.17
50	0.9730 $\pm$ 0.020	0.2020	215.60
100	1.0650 $\pm$ 0.034	0.3687	278.60
300	1.3306 $\pm$ 0.068	0.4612	480.50
500	1.6086 $\pm$ 0.080	0.6627*	*
800	1.7380 $\pm$ 0.068	0.7565*	*

a: rango lineal (0.05 a 0.5 mg mL<sup>-1</sup> proteína); \*: valores fuera del rango lineal ♦ a: linear range (0.05 to 0.5 mg mL<sup>-1</sup> protein) \*: values outside the linear range.

Las muestras con 10 y 30 ácaros presentaron los valores dentro del rango, por lo que se tomaron 30 ácaros por muestra, por sus valores de proteína altos y estables.

### Adaptación de los métodos en microplacas

Se adaptaron las técnicas de detección de  $\alpha$  y  $\beta$  EST, oxidasas, GST y ACE en *T. urticae*. Se determinó la css para cada enzima, donde las EST presentaron una css para  $\alpha$  y  $\beta$ -naftil acetato de 0.7 mM (Cuadro 2), en comparación con la concentración de 3.0 mM de  $\alpha$  y  $\beta$ -naftil acetato utilizada para mosquitos (Brogdon y Dickinson, 1983), difiriendo en 77 % de los resultados del presente estudio. Sin embargo, Yang *et al.* (2001) señalan una concentración de 0.27 mM de  $\alpha$ -naftil acetato para *T. urticae*. Las oxidasas mostraron una css para el TMBZ de 2.0 mM (Cuadro 2), que difiere en 20 % a las de Brogdon *et al.* (1997) para mosquitos con una css de 1.6 mM de TMBZ. Para la GST la css fue 10 y 8.0 mM para el CDNB y GR (Cuadro 2), siendo superior a los mencionados por Brogdon y Barber (1990), una css de 2.0 mM para el GR y de 1.0 mM para el CDNB en mosquitos; y similar a los de Yang *et al.* (2001) quienes indican una concentración de 150 mM para el CDNB y de 10 mM para el GR en *T. urticae*. Por último, para ACE se determinó una css de 3.0 mM para ATCH

### Adapting the methods in microplates

The detection techniques of  $\alpha$  and  $\beta$ EST, oxidases, GST and ACE in *T. urticae* were adjusted. The css was determined for each enzyme, where the EST had a css for  $\alpha$  and  $\beta$  naphthyl acetate of 0.7 mM (Table 2) compared to the concentration of 3.0 mM of  $\alpha$  and  $\beta$  naphthyl acetate used for mosquitoes (Brogdon and Dickinson, 1983), differing from the results of this study by 77 %. However, Yang *et al.* (2001) indicate a concentration of 0.27 mM of  $\alpha$ -naphthyl acetate for *T. urticae*. Oxidases showed a css for TMBZ of 2.0 mM (Table 2), which differs by 20 % from those by Brogdon *et al.* (1997) for mosquitoes with a css of TMBZ 1.6 mM. For the GST the css was 10 and 8.0 mM for CDNB and GR (Table 2), being higher than those mentioned by Brogdon and Barber (1990), with a 2.0 mM css for the GR and 1.0 mM for CDNB for mosquitoes; and similar to those by Yang *et al.* (2001) who indicate a concentration of 150 mM for CDNB and 10 mM for GR in *T. urticae*. Finally, in the case of ACE a css of 3.0 mM for ATCH was determined, and of 0.5 mM for DTNB (Table 2). Brogdon and Barber (1987) mention for mosquitoes a concentration of 2.6 and 0.33 mM for ATCH and DTNB.

The differences in the css found in *T. urticae* in relation to the previously reported for mosquitoes

**Cuadro 2. Determinación de la concentración de sustrato saturante y tiempo óptimo de reacción en la línea susceptible de *Tetranychus urticae* Koch.**

**Table 2. Determination of the saturating substrate concentration and optimal time of reaction in the susceptible line of *Tetranychus urticae* Koch.**

Enzima	Sustrato	CSS mM	ToR minutos
Esterasas	$\alpha$ EST	$\alpha$ naftil acetato	0.70
	$\beta$ EST	$\beta$ naftil acetato	0.70
Oxidadasas	TMBZ	2.00	10
Glutation S-transferasas	CDNB	10.0	10
	GR	8.00	15
Acetil colinesterasa	ATCH	3.00	15
	DTNB	0.50	10

CSS: concentración de sustrato saturante; ToR: tiempo óptimo de reacción;  $\alpha$ EST:  $\alpha$  esterasas;  $\beta$ EST:  $\beta$  esterasas; TMBZ: 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina-dihidrocloruro; CDNB: 1-cloro-2-,4-dinitrobenzeno; GR: glutatión reducido; ATCH: yoduro de acetilcolina; DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico ♦ CSS: saturating substrate concentration; ToR: optimum reaction time;  $\alpha$  EST:  $\alpha$  esterases;  $\beta$  EST:  $\beta$  esterases; TMBZ: 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride; CDNB: 1-chloro-2-,4-dinitrobenzene; GR: reduced glutathione; ATCH: acetylcholine iodide; DTNB: acid 5,5'-Diti-bis-2-nitrobenzoic.

y de 0.5 mM para DTNB (Cuadro 2). Brogdon y Barber (1987), para mosquitos, mencionan una concentración de 2.6 y 0.33 mM para ATCH y DTNB.

Las diferencias de la CSS encontradas en *T. urticae* respecto a lo reportado para mosquitos se puede deber al tamaño de la muestra y a los fluidos donde están contenidas estas proteínas (Fersht, 1985). También influye el tipo de sustrato alimenticio ya que algunos hospederos pueden generar metabolitos secundarios que dañan al ácaro en su sistema fisiológico, como en las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), que aumentan naturalmente el contenido de esterases dentro de las poblaciones de ácaros (Yang *et al.*, 2001).

Los valores de ToR se muestran en el Cuadro 2 y para el sustrato  $\alpha$  y  $\beta$ -naftil acetato fue de 15 min, debido a que lecturas en tiempos superiores no modifican estadísticamente las lecturas. Brogdon y Dickinson (1983) registran un tiempo de incubación de 10 min. En el sustrato TMBZ, usado para medir cantidad de oxidasas, el ToR fue a los 10 min lo que contrasta con el tiempo (5 min) sugerido por Brogdon *et al.* (1997). Para los sustratos CDNB y el GR, el ToR fue 10 min que es superior al de 5 min sugerido por Brogdon y Barber (1990). Por último, para los sustratos ATCH y DTNB el ToR fue de 15 min, mientras Brogdon y Barber (1987) reportan 10 min. Estas diferencias se pueden deber a que sólo se tomó la mitad de concentración de la muestra.

### Niveles enzimáticos

En el Cuadro 3 se muestran los valores máximos de absorbancia para la línea susceptible de *T. urticae*, donde las  $\alpha$  y  $\beta$ -EST presentaron valores de 1.205 y 1.442, las GST y oxidasas de 0.526 y 1.683, y las ACE y ACE in de 0.066 y 0.042, y con estos valores se estableció el umbral de resistencia. Después se discriminó a los individuos resistentes de los susceptibles dentro de la población de campo: en  $\alpha$  y  $\beta$ -EST, 24 y 36 de las 90 muestras superaron el umbral de resistencia (26.6 y 40 % de la población); en GST y oxidasas, 15 y 70 de las 90 muestras superaron el umbral (16.6 y 77.7 % de la población); y en ACE y ACE insensible 9 y 5 de las 90 muestras superaron el umbral (10 y 6.5 %).

Al comparar la cantidad de enzima con el promedio de absorbancia (Cuadro 3) se encontró que el principal factor de resistencia para la Lc son las oxidasas (2.0251 A), seguidas por las  $\alpha$  y  $\beta$ -EST

may be due to the size of the sample and the fluids containing these proteins (Fersht, 1985). It may have to do also with the type of food substrate as some hosts may generate secondary metabolites that damage mites in their physiological system, as in bean plants (*Phaseolus vulgaris*), which naturally increase the content of esterases within mite populations (Yang *et al.*, 2001).

The ToR values are shown in Table 2 and for the substrate  $\alpha$  and  $\beta$ -naphthyl acetate it was 15 min, because readings for longer time periods do not change such readings statistically. Brogdon and Dickinson (1983) report an incubation time of 10 min. In the TMBZ substrate, used to measure the amount of oxidasas, ToR occurred after 10 min, in contrast with the time (5 min) suggested by Brogdon *et al.* (1997). For substrates CDNB and GR, ToR was 10 min which is longer than the 5-min time suggested by Brogdon and Barber (1990). Finally, for substrates ATCH and DTNB, ToR was 15 min, while Brogdon and Barber (1987) report 10 min. These differences could be explained since only half of the sample concentration was taken.

### Enzyme levels

In Table 3 it is shown the maximum absorbance values for the susceptible line of *T. urticae*, where  $\alpha$  and  $\beta$ -EST showed values of 1.205 and 1.442; the GST and oxidasas 0.526 and 1.683, and the ACE and ACE in 0.066 and 0.042, and with these values the threshold of resistance was established. Then, the resistant individuals were discriminated against the susceptible within the field population: for  $\alpha$  and  $\beta$ -EST, 24 and 36 of the 90 samples exceeded the threshold of resistance (26.6 and 40 % of the population); for GST and oxidasas, 15 and 70 of the 90 samples exceeded the threshold (16.6 and 77.7 % of the population); and for ACE and ACE insensitive 9 and 5 of the 90 samples exceeded the threshold (10 and 6.5 %).

Comparing the amount of enzyme to the average of absorbance (Table 3) it was found that the main factor of resistance to Lc are oxidasas (2.0251 A), followed by  $\alpha$  and  $\beta$ -EST (1.1784 B and 1.3801 B). Enzymes with a smaller presence in Lc were GST, ACE and ACE in (0.4930 D, 0.0401 E and 0.0306 E). Therefore, the main mechanism of resistance in Lc are oxidasas because of the numerous

**Cuadro 3. Niveles de absorbancia para cada enzima de las dos poblaciones de hembras adultas de *Tetranychus urticae* Koch.**  
**Table 3. Absorbance levels for each enzyme in the two populations of adult females of *Tetranychus urticae* Koch.**

Enzimas	Niveles enzimáticos de <i>Tetranychus urticae</i>						N+	% de la población que supera*
	Ls absorbancia		Lc absorbancia		Promedio de absorbancia			
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Susceptible	Resistente		
Alfa-esterasas	0.514	1.205*	0.965	1.698	0.9339 C	1.1784 B	24	26.7
Beta-esterasas	0.550	1.442*	1.023	2.031	1.0392 C	1.3801 B	36	40.0
GST	0.156	0.526*	0.389	0.592	0.3231 D	0.4930 D	15	16.6
Oxidasa	0.782	1.683*	1.150	2.836	0.8480 B	2.0251 A	70	77.7
ACH-asa	0.017	0.066*	0.020	0.079	0.0403 E	0.0401 E	9	10.0
ACH-asa insensible	0.007	0.042*	0.011	0.057	0.0203 E	0.0306 E	5	6.50

\*Valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ); Ls: línea susceptible; Lc: línea de campo; \*: umbral de resistencia  
 ♦ \* Values with different letters are statistically different ( $p \leq 0.05$ ); Ls: susceptible line; Lc: field line, \*: threshold of resistance.

(1.1784 B y 1.3801 B). Las enzimas con una menor presencia en la Lc fueron GST, ACE y ACE in (0.4930 D, 0.0401 E y 0.0306 E). Por ello, el principal mecanismo de resistencia en la Lc son oxidasas, debido al elevado número de aplicaciones de abamectina en la región (10 a 12). Al respecto, Campos *et al.* (1996) señalan un aumento de oxidasas en líneas de *T. urticae* que recibieron más de seis aplicaciones de abamectina por temporada. Asimismo, Clark *et al.* (1994) mencionan que el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina son las enzimas oxidativas. Otro mecanismo enzimático en la Lc fueron las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -EST, lo que se puede deber a la aplicación alterna de productos como piretroides y organofosforados para el control de plagas del cultivo. La resistencia en *T. urticae* se debe a una alta presión de selección con piretroides y organofosforados, donde se incrementa la actividad de carboxiesterasas. Además, la unión éster de los piretroides constituye el sitio vulnerable de la molécula, donde actúan esterases específicas (Lagunes y Villanueva, 1994). Las enzimas GST, ACE y ACE in causan resistencia en especies de insectos; sin embargo, en el presente estudio estos sistemas fueron los menos relevantes (Dauterman, 1983).

### CONCLUSIÓN

Las oxidasas, y las  $\alpha$  y  $\beta$  esterases aportaron mayor presencia dentro de la población de campo, por lo que estas enzimas son las responsables de la resistencia a acaricidas de la población de *T. urticae* Koch en estudio.

applications of abamectin in the region (10 to 12). In this regard, Campos *et al.* (1996) indicate an increase in oxidases in lines of *T. urticae* which received more than six applications of abamectin per season. Also, Clark *et al.* (1994) mention that the main physiological mechanism of resistance to abamectin are oxidative enzymes. Another enzymatic mechanism in the Lc were enzymes  $\alpha$  and  $\beta$ -EST, which may be due to the alternating application of products such as pyrethroids and organophosphates for controlling crop pests. Resistance in *T. urticae* is due to a high selection pressure with pyrethroids and organophosphates, which increases the activity of carboxylesterases. Also, the ester bond of pyrethroids is the vulnerable site of the molecule, where specific esterases act (Lagunes and Villanueva, 1994). The GST, ACE and ACE in enzymes cause resistance in insect species; however, in this study these systems were the least relevant (Dauterman, 1983).

### CONCLUSION

The oxidases and  $\alpha$  and  $\beta$  esterases were found to have greater presence in the population field, so these enzymes are responsible for resistance to the acaricides of the *T. urticae* Koch population under study.

—End of the English version—

-----\*-----

## 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. 1984. Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 457-459.
- Brogdon, W. G., and C. M. Dickinson. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.
- Brogdon, W. G., and A. M. Barber. 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pest. Biochem. Physiol.* 29: 252-259.
- Brogdon, W. G., and A. M. 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. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 233-237.
- 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.
- Clark, J. M., J. G. Scott, F. Campos, and J.R. Bloomquist. 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 1-30.
- Dauterman, W. C. 1983. Role of hydrolases and glutathione S-transferases in insecticide resistance. *In: Georghiou, G.P., and T. Saito (eds). Pest Resistance Pesticides.* Plenum Press. New York. pp: 229-247.
- Fersht, A. 1985. Measurement and magnitude of enzymatic rate constants. *In: Enzyme Structure and Mechanism.* 2 ed. New York. W. H. Freeman and Company. pp: 121-124,
- Georghiou, P. G., and T. Saito. 1983. Resistance to Pesticides. Plenum Press. New York, USA. 809 p.
- 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.
- Keiding, J. 1986. Prediction or resistance risk assessment. *In: Pesticide Resistance.* National Academy Press. Washington D. C. pp: 279-297.
- Lagunes, T., y J. J. Villanueva, A. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 265 p.
- Rodríguez, M. M., J. A. Bisset, D. Molina, C. Díaz, y L. A. Soca. 2001. Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterasas y glutatión s-transferasas en *Aedes aegypti*. *Rev. Cub. Med. Trop.* 53 (1): 32-36.
- SAS Institute Inc. 1985. Guide for Personal Computers. Ver 8. SAS Institute, Cary, N. C. 243 p.
- Yang, X., D. C. Marcolies, K. Yanzhu, and L. L. Buschman. 2001. Host plant changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 94: 381-387.