

CUANTIFICACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNA EN NINFAS Y ADULTOS DE *Bemisia tabaci* Gennadius, 1889 (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE)

Carlos Enrique Ail-Catzim✉, Cesar Abraham Rodríguez-Morales, Alejandro Manelik García-López, Rosario Esmeralda Rodríguez-González y José Luis Velasco-López

Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. Carretera a Delta S/N. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, C. P. 21705, México.

Autor para correspondencia ✉ Autor de correspondencia: carlos.ail@uabc.edu.mx

RESUMEN. El objetivo del estudio fue determinar el contenido de proteínas en ninfas y adultos de *Bemisia tabaci*, para definir el número de especímenes por muestra y estadio de desarrollo de la plaga para determinar la actividad enzimática mediante pruebas bioquímicas. La cuantificación de proteínas se realizó por colorimetría, mediante el Kit-II de Bio-Rad. Se emplearon densidades 1, 5, y 10 ninfas o adultos de *B. tabaci*, cada una con 10 repeticiones. El contenido de proteína en muestras de 10 individuos, fue de 93.857 y 113.186 μg de proteína ml^{-1} para ninfas y adultos respectivamente, valores ubicados en el rango base (60 -140 μg de proteína ml^{-1}) que se ha empleado en la adaptación de pruebas bioquímicas en otras especies de insectos y ácaros. En la densidad de 5 especímenes, los valores de contenido de proteína fueron similares para ambos estadios, 56.057 y 56.314 μg de proteína ml^{-1} para ninfas y adultos respectivamente, estos valores fueron muy cercanos al valor inferior del rango base (60 μg) por lo que es probable utilizar la densidad de 5 especímenes para realizar la adaptación de las pruebas bioquímicas para la detección de mecanismos de resistencia a insecticidas en *B. tabaci*.

Palabras clave: Mosquita blanca, absorbancia, microplaca.

Quantification of protein content in nymphs and adults of *Bemisia tabaco* Gennadius, 1889 (Hemiptera: Aleyrodidae)

ABSTRACT. The aim of the study was to determine the protein content in nymphs and adults of *Bemisia tabaci* to define the number of specimens per sample and stage of development of the pest to determine enzyme activity by biochemical tests. Protein quantification was performed by colorimetry, using the Kit-II of Bio-Rad. Densities 1, 5, and 10 nymphs or adults of *B. tabaci* were used; each with 10 repetitions. Protein content in samples of 10 individuals was 93.857 and 113.186 $\mu\text{g ml}^{-1}$ protein for nymphs and adults respectively, located in the base range de 60-140 $\mu\text{g ml}^{-1}$ protein, which has been used in the adaptation of biochemical tests in other species of insects and mites. In the density of 5 specimens, the values of protein content were similar for both stages, 56.057 and 56.314 $\mu\text{g ml}^{-1}$ protein for nymphs and adults respectively, these values are very close to the lower value of the base range (60 μg) for so it is likely to use the density of 5 specimens for the adaptation of biochemical tests for the detection of mechanisms of insecticide resistance in *B. tabaci*.

Keywords: Whitefly, absorbance, microplate.

INTRODUCCIÓN

La mosquita blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius, 1889, es una plaga importante en diversos cultivos agrícolas (Oliveira *et al.*, 2001), tanto ninfas como los adultos causan daño directo al succionar la savia de las plantas y a través de su secreción de melaza que propicia el desarrollo de hongos como fumagina (Schuster *et al.*, 1996). Debido a esto, los productores de los cultivos se ven obligados a realizar repetidas aplicaciones de insecticidas para su control, dependiendo exclusivamente de este método, lo que ha provocado desarrollo de resistencia a insecticidas químicos por parte de esta plaga (Palumbo *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2010).

La detección de la resistencia a un insecticida es esencial para el manejo de este problema. Debido a esto, se han desarrollado diferentes metodologías para detectar este fenómeno (Dennehy

y Granett, 1984), que van desde bioensayos con múltiples concentraciones (CL_{50}), perfiles de ADN y las pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas muestran una mayor explicación del origen y de las fuentes de resistencia a insecticidas. Para el caso de *B. tabaci* existen pruebas bioquímicas que sirven para determinar la actividad de enzimas relacionadas con el fenómeno de resistencia, esterasas, glutatión S-transferasas y oxidasas (Ma *et al.*, 2010), sin embargo en la mayoría de estas pruebas se usan un gran número de especímenes para realizar estos ensayos, que van desde 30 mosquitas adultas (Xie *et al.*, 2011) hasta 200 especímenes. Lo que resulta poco práctico si no se cuenta con suficiente material biológico, además de un alto consumo de tiempo para la recolecta de los especímenes.

Por lo tanto se requiere estandarizar estas pruebas para utilizar muestras de menor tamaño, hacerlas más fáciles y rápidas de realizar. El principio básico consiste en determinar el contenido de proteínas que presentan las muestras (Hemingway *et al.*, 1986), antes de realizar dicha estandarización. Por tal motivo, el presente estudio tiene como objetivo determinar el contenido de proteínas en ninfas y adultos de *Bemisia tabaci* en tres densidades de muestra, para definir el número de especímenes por muestra y estadio de desarrollo de la plaga para realizar dichas pruebas.

MATERIALES Y MÉTODO

Ubicación del experimento. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Entomología del Instituto de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en Ejido Nuevo León, en el Valle de Mexicali, el cual se localiza a 32° 24' 34'' N y 115° 11' 31'' W.

Material biológico. Se utilizó ninfas y adultos de una colonia de *B. tabaci* mantenida sobre plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C) y fotoperiodo (12:12 h luz oscuridad).

Preparación de la muestra. Se emplearon tres concentraciones diferentes en relación al número de ninfas y adultos de *B. tabaci* (1, 5 y 10 especímenes) cada una con 10 repeticiones. Cada densidad se colocó en tubos Eppendorf de 1,5 ml, se agregó 100 μ l de amortiguador fosfato de potasio (KPO_4 , 0.05M y pH 7.2), posteriormente fueron triturados con un homogenizador de tejidos; se aforó a 1 ml agregándole 900 μ l del amortiguador (Brogdon, 1984), posteriormente cada una de las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga refrigerada a 4 °C con 10,000 rpm por cinco minutos y el sobrenadante se empleó como fuente de proteína.

Cuantificación de proteína. La cuantificación de proteínas se realizó por colorimetría, a través del Kit-II de Bio-Rad®. Se utilizó la albumina sérica de bovino (BSA) como proteína de referencia. El procedimiento consistió en colocar por duplicado 100 μ l del homogenizado del insecto en una microplaca de 96 pocillos, se agregó 200 μ l de colorante diluido (1: 4 colorante: agua) del Kit II y posteriormente se realizó las lecturas de absorbancia mediante un lector de microplacas ELx 800 con un filtro de 630 nm (Brogdon y Dickinson, 1983). Se realizó una curva estándar con BSA como proteína de referencia, para esto se utilizaron seis concentraciones de BSA que variaron de 0.01 a 0.1 mg ml⁻¹ de proteína, el procedimiento fue similar al descrito para las muestras de la plaga.

Análisis de resultados. Los resultados de la curva estándar se analizaron mediante regresión lineal con el procedimiento REG (SAS, 2001) para obtener la ecuación de predicción y estimar con esta el contenido de proteína de las muestras. Los resultados del contenido de proteína de ninfas y adultos de *B. tabaci* se analizaron mediante un ANDEVA de dos vías usando el procedimiento GLM y las medias de los mínimos cuadrados se compararon con Tukey con $p \leq 0.05$ (SAS, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de los factores densidad, estadio y las interacciones de estos fueron significativos para el contenido de proteína en ninfas y adultos de *B. tabaci* (Cuadro 1). Hubo mayor cantidad de

proteína en la densidad de 10 mosquitas adultas en comparación a las densidades de uno y cinco adultos (Cuadro 2). Resultados similares se presentaron cuando se determinó el contenido de proteínas para ninfas de la plaga, a mayor densidad mayor contenido de proteína (Cuadro 2). El contenido de proteína no fue diferente entre ninfas y adultos para las densidades de uno y cinco especímenes, sin embargo en la densidad de 10 especímenes, el contenido de proteína fue mayor en los adultos (Cuadro 2).

Cuadro 1. Análisis de varianza para el contenido de proteínas de tres densidades de ninfas y adultos de *Bemisia tabaci*.

Fuente de Variación	GL	CM	F _{valor}	P _{valor}
Densidad	2	42335.891	439.15	0.0001
Estadio	1	805.611	8.26	0.0058
Densidad x Estadio	2	634.027	6.50	0.0030
Error	54	97.514		
Total Correcto	59			

La cuantificación total de las proteínas en tejidos y fluidos puede ser usada como referencia para la cuantificación de diversos componentes en el sistema biológico (Lee *et al.*, 2003), en este estudio se cuantificó la proteína total de muestras de *B. tabaci*, con la finalidad de conocer el número de especímenes por muestra y estadio de desarrollo de la plaga necesarios para realizar la adaptación de ensayos bioquímicos para cuantificar la actividad de las enzimas esterasa, glutatión S-tranferasas y oxidasas reportadas como principales mecanismos involucrados en la resistencia a insecticidas (Ndakidemi y Dakora, 2003).

Los resultados de esta investigación indican que se presentó mayor cantidad de proteína en muestras de 10 individuos independientemente del estado de desarrollo de la plaga, presentándose 93.857 y 113.186 μg de proteína ml^{-1} para ninfas y adultos respectivamente (Cuadro 2). Se han realizado la adaptación de estas pruebas en otras especies de insectos y ácaros, tomando como base un rango de contenido de proteína de 60 a 140 μg de proteína ml^{-1} (Cerna *et al.*, 2010; Cerna *et al.*, 2013), considerando este criterio nuestros resultados indican que la densidad de 10 especímenes es la más adecuada para realizar dichas pruebas y además nos indican que indistintamente se puede emplear ninfas o adultos de mosquita blanca para su adaptación, ya que el contenido de proteína de estos estadios estuvieron dentro del rango base.

Cuadro 2. Contenido de proteína para tres densidades de ninfas y adultos de *Bemisia tabaci*.

Densidad de Mosquita blanca	Contenido de proteína μg de proteína ml^{-1}	
	Ninfas	Adultos
1	11.314 ax	12.729 ax
5	56.057 ay	56.314 ay
10	93.857 bz	113.186 az

Las letras x-z muestran la interacción de un estadio y tres densidades de mosquitas blanca. Las letras a-b indican la interacción entre ninfas y adultos para una densidad. Valores promedios seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente según Tukey (0.05)

En cuando a la densidad de cinco especímenes, los valores de contenido de proteína fueron similares para ambos estadios, 56.057 y 56.314 μg de proteína ml^{-1} para ninfas y adultos respectivamente, estos valores son muy cercanos al valor inferior del rango base (60 μg) por lo que es probable utilizar la densidad de cinco especímenes para realizar la adaptación de las pruebas

bioquímicas para la detección de mecanismos de resistencia a insecticidas en *B. tabaci*. En relación a la densidad de 1 individuo de ambos estadios de la plaga se puede observar que el contenido de proteína resulta menor al rango base de proteína requerido para realizar la adaptación de las pruebas bioquímicas como lo sugiere Cerna *et al.* 2013.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados de esta investigación se concluye que es posible utilizar la densidad de cinco especímenes para realizar las pruebas bioquímicas en la detección de los mecanismos de resistencia en esta plaga, sin importar el estadio de desarrollo, con lo cual se reduciría el número de especímenes empleados en otras metodologías para realizar estas pruebas, además se reduciría el tiempo de recolección de las muestras para llevarlas a cabo.

Literatura Citada

- Ahmad, M., Arif, M. I. and M. Naveed. 2010. Dynamics of resistance to organophosphate and carbamate insecticides in the cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Pakistan. *Journal of Pest Science*, 83(4): 409–420.
- Brogdon, W. G. 1984. Mosquito protein microassay-I, protein determination from small portions of single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 79: 457–460.
- 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 evaluate fractions. *Analytical Biochemistry*, 131: 499–503.
- Cerna, E., Ochoa, Y., Mendoza, R., Badii, M. H., Gallegos, G. y J. Landeros. 2010. Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencias a plaguicidas. *PHYTON*. 79: 4–11.
- Cerna, E., Bautista, O., Landeros, J. y M. Ochoa. 2013. Cuantificación de enzimas asociadas a la resistencia de insecticidas en *Bactericera cockerelli* (Sulc) de la zona papera de Coahuila y Nuevo León, México. *Investigación y Ciencia*, 21: 5–12.
- Dennehy, T. J. and J. Granett. 1984. Monitoring dicofol-resistance spider mites (Acari: Tetranychidae) in California cotton. *Journal of Economic Entomology*, 77: 1386–1392.
- Hemingway, J., Smith, C., Jayawardena, K. J. I. and P. R. J. Hearth. 1986. Field and laboratory of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bulletin Entomological Research*, 76: 559–565.
- Lee, S. H., Suh, J. K. and M. Li .2003. Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile blue fluorescence. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 24: 45–48.
- Ma, W., Li, X., Dennehy, T. J., Lei, C., Wang, M., Degain, B. A. and R. L. Nichols. 2010. Pyriproxyfen resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B: Metabolic mechanism. *Journal of Economic Entomology*, 103(1): 158–165.
- Ndakidemi, P. A. and F. D. Dakora. 2003. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Functional Plant Biology*, 30(7): 729–745.
- Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. J. and P. Anderson. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20: 709–723.
- Palumbo, J. C., Horowitz, A. R. and N. Prabhaker. 2001. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20(9): 739–765.
- SAS Institute 2001. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schuster, D. J., Stansly, P. A. and J. E. Polstan. 1996. Expressions of plant damage by *Bemisia*. Pp. 153–165. *In: Gerling, D. and R. T. Mayer (Eds.). Bemisia, 1995: Taxonomy, biology, damage, control and management.* Intercept Ltd. Andover, Hants. United Kingdom.
- Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Feng, Y., Pan, H., Jioa, X., Zhou, L., Yang, X., Fu, W., Teng, H., Xu, B. and Y. Zang. 2011. Induction effects of host plants on insecticide susceptibility and detoxification enzymes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 67: 87–93.