

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**Cuantificación de Enzimas de Resistencia del Complejo del Gorgojo de las
Harinas *Tribolium castaneum* (Herbst) y *Tribolium confusum* (Duval)
(Coleóptera: Tenebrionidae)**

Por:

YANIRA JIMENEZ BAUTISTA

T E S I S

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Abril de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Cuantificación de Enzimas de Resistencia del Complejo del Gorgojo de las
Harinas *Tribolium castaneum* (Herbst) y *T. confusum* (Duval)
(Coleóptera: Tenebrionidae)

Por:

YANIRA JIMENEZ BAUTISTA

T E S I S

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Tesis:


Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor Principal


Dr. Jerónimo Landeros Flores

Sinodal


M.C. Antonio Gádenas Elizondo

Sinodal


Dr. Mariano Flores Dávila

Sinodal


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Coordinador de la División de Agronomía


Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Abril de 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar a este momento, por darme salud, sabiduría, fortaleza y entendimiento para poder llegar al final de mi carrera, por proveerme de todo lo necesario para salir adelante y por todo lo que me ha dado, gracias.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional y por ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

Al Doctor Ernesto Cerna Chávez por su apoyo, tiempo, paciencia, consejos y dedicación en mi formación como profesionista.

A mis sinodales Dr. Jerónimo Landeros Flores, MC Antonio Cárdenas Elizondo, Dr. Mariano Flores Dávila por concederme su valioso tiempo, aportaciones y comentarios para poder finalizar mi tesis.

Al MC Rigoberto Jiménez Cordero por sus comentarios y aportaciones para llevar a cabo este trabajo de investigación, y sobre todo por los buenos consejos y amistad brindada.

A la MC Rebeca Gonzales Villegas por concederme parte de su valioso tiempo, por sus consejos y sugerencias para poder concluir mi tesis, por su amistad y por la confianza brindada durante mi estancia en la Universidad.

A todos los profesores del Departamento de Parasitología que han sido pilares en mi formación como profesionista, y que hoy pueden ver el reflejo de todas sus enseñanzas.

DEDICATORIAS

Al culminar con éxito mi carrera profesional y cumplir uno de mis objetivos y mayores deseos e introducirme a un mundo de mejores oportunidades, quiero dedicar esta tesis de manera especial a quienes me apoyaron para lograr este triunfo.

A mis padres

Juan Jiménez Cruz y

Florentina Bautista Alvarado

Con infinito amor y cariño, a ustedes que sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, porque la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho, nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo, eternamente ¡gracias! Los ama, su hija.

A Mildred y Cilene, gracias hermanas por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos compartiendo triunfos, alegrías y tristezas, por apoyarme aun sin darme cuenta de las grandes cosas que han sacrificado por verme cumplir un sueño, las Amo.

A Hilary Andrea, sobrina hermosa que desde tu existir has llenado de alegría y felicidad nuestros corazones, porque tus sonrisas han sido motivo de inspiración aun en momentos difíciles.

A **Leonarda Bautista** gracias prima por tus sabios consejos, he aprendido que las cosas se pueden lograr cuando uno tiene decisión y compromete su voluntad para lograr un sueño.

A **Samuel Zavala Borrego**, gracias por demostrarme tu gran amor, confianza, por quererme, motivarme y por estar siempre pendiente de mí.

A **la generación CX de Parasitología** durante más de cuatro años compartimos alegrías, emociones, triunfos y derrotas y que hoy vemos reflejado el primer fruto de muchos que vendrán, y que son producto de nuestro esfuerzo, constancia y perseverancia.

Si te sientas en el camino, ponte de frente a lo que aun has de andar y de espaldas a lo ya andado."

RESUMEN

Actualmente el uso de insecticidas de síntesis sigue siendo el principal método de lucha para controlar las plagas de almacén, pero el uso continuo e irracional y el mal manejo, han ocasionado problemas tales como la resistencia. Uno de los principales mecanismos de resistencia adquiridos por dichas plagas, son desarrollar mecanismos bioquímicos que permiten incrementar la detoxificación del agente químico. El objetivo del presente trabajo es cuantificar la actividad de enzimas presentes en cinco poblaciones de *T. castaneum* y *T. confusum* provenientes de harineras de Aguascalientes, Coahuila y Nuevo León. Primero se determinó la cantidad de tejido necesario, después se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas para conocer los niveles de seis enzimas (acetilcolinesterasas, acetilcolinesterasa insensible, α y β -esterasas glutatión S-transferasas y oxidasas). Los resultados sugieren que la presencia de esterasas (α y β) 0.9740 y 2.5500, respectivamente se encuentran de forma elevada mientras que las demás enzimas, glutatión S-transferasas, oxidasas y acetilcolinesterasas están presentes en niveles medios y bajos 0.7480, 0.2000, 0.0340, 0.0240 respectivamente. El hecho de encontrar niveles elevados de esterasas en las cinco poblaciones sugiere que estas enzimas están relacionadas directamente a los compuestos químicos que han sido aplicados en los granos almacenados (piretroides, organofosforados y carbamatos), puesto que estas enzimas detoxifican al insecticida en el cuerpo del insecto.

Palabras clave: gorgojo castaño, gorgojo confuso de las harinas acetilcolinesterasas, esterasas, glutatión S-transferasas, oxidasas, resistencia a insecticidas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁG.
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	2
HIPÓTESIS.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Como empezaron las plagas	3
Origen y evolución de los insectos plaga de almacén.....	3
Orígenes de infestación de los granos.....	4
Clasificación y distribución de las plagas.....	5
Gorgojo Confuso de la Harina <i>Tribolium confusum</i>	6
Origen y distribución.....	6
Ubicación taxonómica.....	7
Importancia económica.....	7
Alimentación.....	7
Descripción morfológica.....	8
Ciclo biológico.....	8
Huevo.....	8
Larva.....	8
Pupa.....	8
Adulto.....	8
Gorgojo Castaño de las Harinas <i>Tribolium Castaneum</i>	9
Origen y distribución.....	9

Ubicación taxonómica.....	9
Importancia económica.....	10
Alimentación.....	10
Descripción morfológica.....	10
Ciclo biológico.....	11
Huevo.....	11
Larva.....	11
Pupa.....	11
Adulto.....	11
Alternativas de control.....	12
Control cultural.....	12
Control físico.....	13
Control químico.....	15
RESISTENCIA.....	16
Tipos de resistencia.....	18
Resistencia por comportamiento.....	18
Resistencia morfológica.....	19
Resistencia cruzada.....	19
Técnicas de monitoreo de la resistencia	20
Bioensayo.....	20
Concentración diagnóstico.....	22
Pruebas bioquímicas.....	22
Enzimas de resistencia.....	23
Esterasas.....	23
Oxidasas de Función Múltiple.....	25
Glutación S-transferasas.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Ubicación del experimento.....	28
Incremento de colonias.....	28
Determinación de la cantidad de proteína.....	28
Obtención de la curva estándar.....	29

Cuantificación de proteína en <i>T. castaneum</i> y <i>T. confusum</i>	29
Fuente de enzima.....	30
Cuantificación de enzimas.....	30
Niveles de acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible.....	31
Niveles de α y β esterasas.....	31
Niveles de glutatión S-transferasas.....	32
Niveles de oxidasas.....	32
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS	34
DISCUSIONES.....	48
CONCLUSIONES.....	50
LITERATURA CITADA.....	51
APÉNDICE.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁG.
Cuadro 1. Diluciones de BSA utilizadas para determinar la curva estándar.....	29
Cuadro 2. Concentraciones de insectos utilizadas para determinar la cantidad de proteína	30
Cuadro 3. Niveles de acetilcolinesterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	42
Cuadro 4. Niveles de acetilcolinesterasa insensible en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	43
Cuadro 5. Niveles de α -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	44
Cuadro 6. Niveles de β -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	44
Cuadro 7. Niveles de glutatión S-transferasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	45
Cuadro 8. Niveles de oxidasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	46
Cuadro 9. Niveles de enzimas presentes en poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	47
Cuadro 10. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T.</i>	

	<i>castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	63
Cuadro 11.	Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa insensible en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	63
Cuadro 12.	Valores promedio de absorbancia de α -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	64
Cuadro 13.	Valores promedio de absorbancia de β -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	64
Cuadro 14.	Valores promedio de absorbancia de glutatión S-transferasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	65
Cuadro 15.	Valores promedio de absorbancia de oxidasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Distribución de frecuencia de los niveles de acetilcolinesterasa en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	35
Figura 2. Distribución de frecuencia de los niveles de acetilcolinesterasa insensible en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	37
Figura 3. Distribución de frecuencia de los niveles de α -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	38
Figura 4. Distribución de frecuencia de los niveles de β -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	39
Figura 5. Distribución de frecuencia de los niveles de glutatión S-transferasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	40
Figura 6. Distribución de frecuencia de los niveles de oxidasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas <i>T. castaneum</i> Herbst y <i>T. confusum</i> Duval.....	41

INTRODUCCIÓN

Los cereales son considerados mundialmente como las especies vegetales de mayor importancia para la alimentación de seres humanos y animales domésticos. Por ello, su almacenamiento y conservación por largos periodos de tiempo es esencial para disponer del alimento en forma constante.

Según la FAO (1985), los principales agentes responsables del deterioro en los productos almacenados son hongos, roedores, aves y artrópodos, si bien factores de tipo abiótico, como la temperatura, humedad relativa ambiental y contenido en humedad del producto juegan un papel destacado en la incidencia de estos agentes. Las especies de artrópodos (principalmente insectos y ácaros) han conseguido una mayor adaptación a las condiciones de almacén y causan daños cuantiosos.

Recientemente en México Gutiérrez-Díaz (1999) registra 55 especies de insectos asociados con granos y productos almacenados mencionando sus hospederos y distribución en el país. Entre los más frecuentes se hallan los curculiónidos del género *Sitophilus*, quienes por las pérdidas que ocasiona son considerados como plagas de interés primario, seguido de las especies del género *Tribolium* (Tenebrionidae), las cuales son plagas que se alimentan de granos partidos o lesionados a consecuencia de las infestaciones primarias, así como de las harinas, cereales y derivados amiláceos.

Los métodos de control de plagas en granos almacenados son de muy variada naturaleza, existiendo desde métodos muy sencillos como son: exponer los granos al calor del sol, limpieza de almacenes, uso de métodos como la radiación, temperaturas controladas, hasta la aplicación de insecticidas sintéticos, lo cual contribuye sin duda a la conservación del producto en almacenamiento (ASERCA, 2009).

El uso intenso y prolongado de los compuestos sintéticos ha provocado el desarrollo de la resistencia a través del aumento en los organismos de ciertos grupos de enzimas detoxificantes, situación que debe ser estudiada y a su vez monitoreada. Debido a las razones antes expuestas, es necesario realizar investigaciones sobre el fenómeno de la resistencia enzimática que puede desarrollar la especie, ya que el conocimiento de lo antes expuesto sirve como una herramienta útil que nos ayuda a tomar mejores decisiones en los programas de manejo.

JUSTIFICACIÓN

La resistencia en los insectos plaga, se viene incrementando debido al uso indiscriminado e inadecuado de los compuestos químicos empleados para su control, uno de los factores de resistencia en insectos lo constituye la presencia de enzimas capaces de inactivar las moléculas de los insecticidas, por lo tanto es importante estudiar los niveles de las enzimas detoxificantes involucradas en el fenómeno, la información generada debe contribuir a una mejor toma de decisiones en los programas de Manejo Integrado de Plagas y rotación de plaguicidas.

OBJETIVOS

Cuantificar los niveles de enzimas detoxificantes relacionadas con la resistencia a insecticidas en poblaciones de *Tribolium castaneum* y *T. confusum*.

HIPÓTESIS

Los niveles de enzimas detoxificantes en las cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas, *T. castaneum* y *T. confusum* serán diferentes según la presión de selección a las que han sido sometidas mediante el uso de insecticidas sintéticos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Como empezaron las plagas

Se puede afirmar que en los inicios de la andadura humana sobre el planeta, hace solo un breve lapso en la escala geológica, los insectos ya ocupaban de forma estable cualquier hábitat terrestre concebible y su espectro trófico ya incluía todo tipo de plantas, animales y restos orgánicos de variada procedencia (De los Mozos, 1997).

Las primeras interacciones del hombre con los insectos probablemente fueron muy ambiguas, sin embargo, en la actualidad el hombre y los insectos están condenados a compartir hábitats y recursos, por este motivo la aparición de fenómenos de competencia interespecífica es algo inevitable. Desde sus inicios, el desarrollo de la cultura humana ha permitido la colonización de nuevos hábitats y regiones geográficas, así como la utilización de nuevos recursos; esta ampliación del entorno humano que todavía hoy persiste, ha traído una emparejada y continua confrontación del hombre con diversas especies de insectos que previamente eran desconocidas e intrascendentes para las sociedades humanas. A pesar de los notables avances tecnológicos de la humanidad, este enfrentamiento todavía se mantiene en plena vigencia a juzgar por las graves pérdidas que los insectos continúan ocasionando al hombre en todos los ámbitos (De los Mozos, 1997).

Origen y evolución de insectos plaga de almacén

Se tienen las primeras pruebas escritas sobre el almacenamiento de granos y otros alimentos, así como las primitivas medidas de control de los insectos que atacaban a estos productos, los primeros indicios documentados en relación con la protección de los productos almacenados y los insectos que se hallaron datan de 3500 años y provienen de los egipcios, se trata de un escrito que se considera

una compilación de la medicina terapéutica donde se sugieren una serie de medidas para contrarrestar el efecto de las plagas sobre los granos almacenados. Entre las medidas citadas se encuentra la utilización de: carbonato sódico, grasas y cenizas de excrementos de animales para la aplicación sobre las paredes de los graneros y la fumigación con inciensos preparados a base de resinas, gomas y especias para controlar las plagas en casas y almacenes (Levinson & Levinson, 1994).

En relación con los insectos, se han hallado ejemplares de diversos coleópteros (*Lasioderma serricorne*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus granarius*, *Stegobium paniceum*, *Tribolium* spp.), lepidópteros (*Ephestia* spp., *Plodia* spp.). Estos insectos pueden considerarse como una representación fidedigna y evidencia del ataque de insectos a los productos que el hombre pretendía conservar.

Orígenes de infestación de los granos

Las especies evolucionaron y colonizaron zonas de clima templado en otros continentes y comenzaron a utilizar refugios más sofisticados y permanentes, los cuales para su construcción se usaba madera y pieles, probablemente los insectos asociados a estos materiales en el medio natural (termitas, coleópteros, xilófagos y saprófagos, etc.) comenzaron a causar sus primeros daños (De los Mozos, 1997).

Otra situación que pudo originar la infestación de los granos almacenados fue el establecimiento del comercio entre los diferentes países del mundo, la introducción de los diferentes granos en las regiones apropiadas para su cultivo a otras en donde se consumen, han favorecido que muchas plagas que atacan los granos almacenados hayan adquirido una distribución prácticamente cosmopolita, estableciéndose así donde quiera que las condiciones sean favorables para su existencia (Narváez, 2003).

Clasificación y distribución de las plagas

Los insectos encontrados en los productos alimenticios almacenados pueden ser clasificados, según sus hábitos de alimentación en los siguientes tres grupos:

Plagas primarias

Gallo *et al.* (2002) mencionan que las plagas primarias son aquellas capaces de perforar la testa de las semillas y por tanto atacar granos intactos. Existen dos subgrupos: a) Plagas primarias internas: que incluyen a los insectos dotados de mandíbulas desarrolladas, con las cuales rompen las películas protectoras y penetran en los granos alimentándose solo del contenido interno. Son plagas que completan su ciclo evolutivo en el interior del grano, siendo el más perjudicial, como ejemplo se citan el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*, gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus*, y la palomilla de los cereales *Sitotroga cerealella*; y b) Plagas primarias externas: Este grupo incluye insectos que se alimentan de la parte externa de los granos, aunque pueden después de la destrucción, atacar la parte interna. Además de sus daños, favorecen el ataque de otras plagas que son incapaces de romper la película protectora de los granos.

Plagas secundarias

Solo pueden desarrollarse sobre granos dañados o bien, mecánicamente durante su procesado o por la acción de otras plagas, ejemplos típicos son *Tribolium castaneum*, *T. confusum* y *Oryzaephilus surinamensis* (Gallo *et al.*, 2002).

Plagas asociadas

Son aquellas que no atacan a los granos; sin embargo, se alimentan de los desechos y hongos. Como ejemplo se tiene al escarabajo *Tenebrio molitor* L., e insectos del orden Psocóptera que se encuentran en la masa almacenada. Estos insectos si bien no causan daño directo a los granos, contribuyen por perjudicar su aspecto y calidad de los mismos (Gallo *et al.*, 2002).

GORGOJO CONFUSO DE LA HARINA *Tribolium confusum* (Duval).

Origen y distribución

El gorgojo confuso de la harina fue notado primeramente en la India en 1893, actualmente esta especie se encuentra distribuida en todo el mundo, pero es más abundante en la parte norte de los Estados Unidos (Metcalf y Flint, 1979). En México se ha localizado en los estados de Guerrero, Michoacán, Chiapas, Guanajuato y Morelos (Gutiérrez-Díaz 1999).

Ubicación taxonómica

Fue clasificado y descrito por Jacqueline Duval en 1868 citado por Cotton, (1979).

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Mandibulada

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Coleóptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Tenebrionioidea

Familia: Tenebrionidae

Género: *Tribolium*

Especie: *T. confusum*

Importancia económica

Los daños causado por *Tribolium confusum* se caracterizan principalmente por la alteración en la calidad del producto debido a la disminución del valor nutritivo de los granos atacados, disminución del grado de higiene del producto por la presencia de otros insectos, excrementos, huevecillos, etc., y pérdida de calidad de panificación de las harinas (Arthur, 1996)

Alimentación

Este insecto se alimenta de una gran variedad de productos, incluyendo toda clase de granos destruidos, harinas, materias almidonadas, frijol, chícharo, polvo de hornear, raíces vegetales secas, frutas secas, nueces, chocolates, drogas, y muchos otros alimentos (Metcalf y Flint, 1979).

Descripción morfológica

Cuerpo de forma alargada y ligeramente plana. Antenas ensanchándose gradualmente desde la base a los extremos, ojos pequeños, redondos y la distancia entre ellos es tres veces el diámetro del ojo. Protórax densamente cubierto con diminutos puntos negros. Los élitros tienen bandas longitudinales difíciles de ver a simple vista. El adulto mide de 3 a 4 mm y es de color café rojizo brillante, y no es capaz de volar (OIRSA, 1999)

Ciclo biológico

Huevo: Estos son muy pequeños de colores blanco claro cubiertos con una secreción pegajosa que les permite adherirse directamente en el material alimenticio facilitando la infestación. Incuban en un periodo de 5 a 12 días (Metcalf y Flint, 1979).

Larva: Las larvas son pequeñas, delgadas y cilíndricas que llegan a medir 5mm de longitud de color blanco con matices amarillos, alcanzando su completo desarrollo en 1 a 4 meses dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de alimento (Metcalf y Flint, 1979).

Pupa: La pupa al principio es blanca, gradualmente cambia a amarillo, después a café, permaneciendo en este estadio por una o dos semanas, una generación completa tarda de tres a cuatro meses, cuando la temperatura es elevada (Metcalf y Flint, 1979).

Adulto: Los insectos adultos son muy activos moviéndose con rapidez cuando son perturbados, pueden sobrevivir a los inviernos moderadamente fríos si no hay una temperatura controlada, y con frecuencia viven dos años o más en el estado adulto, en cuyo periodo la hembra puede llegar a producir de 350 a 500 huevecillos (Metcalf y Flint, 1979).

GORGOJO CASTAÑO DE LA HARINA *Tribolium castaneum* (Herbst).

Origen y distribución

El gorgojo castaño de las harinas fue conocido mucho antes que el *T. confusum*, de origen Indo-Australiano, tiene la misma distribución mundial que el gorgojo confuso, esta especie se encuentra distribuida en todo el mundo, y prefiere los lugares un poco más cálidos (Mallis, 1990).

Ubicación taxonómica

Borror *et al.* (1976), proporciona la siguiente ubicación taxonómica de esta especie:

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Mandibulada

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Coleóptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Tenebrionioidea

Familia: Tenebrionidae

Género: *Tribolium*

Especie: *T. castaneum*

Importancia económica

Aunque no causan daño directo a los seres humanos, este insecto comúnmente se encuentra en los sitios de almacenamiento utilizados para alimentación humana. Es una de las plagas comunes en almacenes, tiendas de menudeo y con problemas más serios en molinos de harina, en donde su presencia le da un sabor y olor desagradable a la harina infestada (Halstead, 1969).

Alimentación

Estos gorgojos no son capaces de alimentarse de granos enteros o sin daños. Han sido reportados atacando productos como chícharos, frijol, nuez descascarada, frutas deshidratadas, especias, chocolate, medicamentos, chiles, así como especímenes de herbarios, otros insectos, etc. Son atraídos a la harina con alto contenido de humedad (Halstead, 1969).

Descripción morfológica

De apariencia similar al gorgojo confuso de la harina, de forma alargada ligeramente plana, antenas en las que los tres últimos segmentos son marcadamente más grandes que el resto, ojos grandes y la distancia que hay entre ellos es igual al diámetro de los mismos. La característica más fácil para distinguir a esta especie es que los segmentos de las antenas de *T. confusum* se incrementan en tamaño gradualmente de la base a la punta, mientras que en *T. castaneum* los últimos segmentos son abruptamente mucho más grandes que los que les preceden (OIRSA, 1999).

Ciclo biológico

Presenta la misma biología que *T. confusum*, aunque el ciclo biológico es más corto. El aspecto, tamaño y color de las larvas y pupas, son tan parecidas a *T. confusum* que es muy difícil diferenciarlas (OIRSA, 1999)

Huevo: De tamaño pequeño, pegajosos, blanco-transparente lo cual les permite adherirse sobre o entre materiales alimenticios, en grietas, bolsas, o a través de la malla de los sacos que contienen alimento, los huevecillos eclosionan en un periodo de 5 a 12 días (OIRSA, 1999).

Larva: Son de cuerpo duro, cilíndrico, con apariencia de alambre de color marrón blancuzco. Se distingue de algunas otras larvas de apariencia similar por la terminación de su último segmento abdominal con dos prominentes y oscuras púas inmóviles no segmentadas; esta misma diferenciación es cierta para el gorgojo confuso de la harina. El desarrollo larvario varía de 4 a 12 semanas dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de alimento (OIRSA, 1999).

Pupa: Las pupas son de tipo exarate de color blanco y gradualmente cambia a color amarillo. El estado pupal dura alrededor de 6 a 9 días, en otros casos dependiendo de la temperatura del lugar el estado pupal puede prolongarse por más tiempo (OIRSA, 1999).

Adulto: Los adultos miden alrededor de 3 a 4 mm, color marrón rojizo antenas con clava abrupta de 3 segmentos, alas funcionales pero generalmente vuela sólo distancias muy cortas; excepto por las diferencias antenales y del tórax es casi idéntico al gorgojo confuso de la harina (OIRSA, 1999).

Alternativas de control

En la actualidad, el hombre en conjunto con los avances tecnológicos ha desarrollado una variada gama de técnicas de control, basadas en el conocimiento preciso de la biología y comportamiento de las especies consideradas como plagas. Estas técnicas permiten abordar el problema desde distintas perspectivas, ya que las medidas y acciones de control son la pieza clave de cualquier programa de lucha, y deben observarse escrupulosamente para garantizar una adecuada conservación haciendo uso de varios métodos como los que a continuación se mencionan (Lagunes y Rodríguez, 1989).

Control cultural

Las medidas de control cultural difieren del combate físico y mecánico, en que generalmente incluyen el uso de prácticas agrícolas ordinarias y la maquinaria agrícola y en que son usualmente preventivas, indirectas o intangibles; pero usualmente se deben emplear mucho antes del tiempo en que el daño de las plagas resulte aparente, y esto a veces no llaman mucho la atención del agricultor, sin embargo son las más baratas de todas las medidas de combate (Metcalf y Flint, 1979).

Respecto a lo anterior el control cultural de plagas en granos almacenados se basa principalmente en propiciar un ambiente desagradable e inapropiado para el desarrollo de las plagas de insectos, algunos de los ejemplos se mencionan a continuación

Cosecha oportuna

La cosecha con alto contenido de humedad implica depender necesariamente del secado; por otro lado, si el producto se cosecha muy seco, se aumenta el riesgo de pérdida en el campo y de daño por pájaros, roedores, insectos o lluvia (Lindblad, 1979).

Eliminación de residuos

Después de la cosecha, se deben eliminar al máximo los granos quebrados, los residuos de cosecha, polvo y los restos de tierra e insectos vivos o muertos, ya que el grano sucio o dañado se deteriora más rápido en el almacén y facilita el calentamiento y el desarrollo de plagas y enfermedades (Lindblad, 1979).

Limpieza en bodegas y almacenes

Los locales deben limpiarse en sus paredes, techos y piso, procurando eliminar el polvo, basura, productos almacenados infestados, paja, insectos y toda fuente de contaminación. En lo posible deben fumigarse. Se sugiere reparar grietas de las paredes, techos y puertas del almacén, ya que sirven de refugio a las plagas o como puntos de entrada de la humedad (Ramírez, 1982).

Control físico

Además de la destrucción de los insectos que puede ser realizada por las prácticas agrícolas ordinarias, hay ciertas medidas especiales físicas y mecánicas, que resultan valiosas. Estas difieren de las medidas de combate químico en la naturaleza de su efecto sobre los insectos, el cual es una acción física que no incluye acción química sobre el insecto. Pueden ser distinguidos arbitrariamente de las medidas culturales de combate, en que incluyen el uso de ciertas operaciones o equipos especiales y generalmente dan resultados inmediatos y tangibles (Metcalf y Flint, 1979). Dentro de las medidas físicas se mencionan las siguientes:

Uso de temperaturas bajas

El calentamiento o enfriamiento artificial de los productos almacenados, o de los molinos o fábricas donde dichos productos son procesados, es un método

común para evitar el daño de insectos. Casi todos los insectos se vuelven inactivos a temperaturas entre 15 y 4.4°C. Unos cuantos insectos mueren a estas temperaturas, a menos que estén expuestos a ellas por un tiempo considerable. Los insectos en hibernación, frecuentemente resisten temperaturas de 28.8 a 0 °C. No es seguro que la exposición a dichas temperaturas maten los huevecillos de especies tales como los gorgojos de los granos (Metcalf y Flint, 1979).

Las temperaturas bajas no son tan efectivas como las temperaturas elevadas para matar insectos, pero el almacenamiento de productos alimenticios o ropa a temperaturas bajo o cerca de congelación, evitara todo el daño por insectos (Fields y Muir, 1996).

Radiación

El uso de la energía radial para combatir insectos, ha sido una materia favorita para la experimentación. La luz se ha utilizado para atraer a muchas especies fuertemente fototrópicas hacia el interior de trampas de las cuales no pueden escapar o donde son ahogados o envenenados (Metcalf y Flint 1979). Se han utilizado radiaciones de varios tipos con la finalidad de evitar o reducir las infestaciones de insectos plaga de los granos almacenados. A principios del decenio actual, P.B. Cornwall y sus colaboradores del Wantage Research Laboratory del Reino Unido sentaron las bases de un método de lucha contra los insectos del grano almacenado utilizando pequeñas dosis de radiaciones gamma (Mitchell, 1992).

Las radiaciones utilizadas no deben dañar la calidad del producto (apariencia, sabor, color, valor nutritivo, etc.). Las dosis efectivas están entre 45 y 60 kilorads (el rad es una unidad de la dosis de irradiación) y pueden ser toleradas fácilmente por la fruta seca y las nueces (Lindsey *et al.*, 1989).

Se comprobó que dosis de sólo 16000 rads bastaban para matar o esterilizar a la mayoría de los insectos que atacan al grano almacenado. Irradiando una gran variedad de insectos los investigadores comprobaron que: 1) es posible matar insectos adultos; 2) es posible esterilizar insectos adultos; 3) se

puede impedir que se desarrollen los huevecillos de los insectos; 4) las larvas de los insectos no continúan su ciclo de desarrollo, y 5) las pupas no se transforman en insectos adultos, a menos que la metamorfosis esté sucediendo en el momento de la irradiación, en cuyo caso dan lugar a animales estériles (Mitchell, 1992).

Estos estudios y otros muchos realizados por diversos investigadores abrieron el camino para demostrar prácticamente cómo puede aplicarse este método a la conservación de alimentos almacenados.

Control químico

Los insecticidas constituyen recursos de primera importancia contra las plagas, tanto porque sus efectos son más rápidos que cualquier otra forma de represión como por ser fácilmente manejables, considerando que su utilización, conjuntamente con la de otros pesticidas, ha jugado un rol importante en el incremento de la productividad agrícola de las últimas décadas, sobre todo en los países más tecnificados (Klimmer, 1967).

Las primeras aplicaciones de insecticidas modernos fueron tan exitosas, que muchas esperanzas se cifraron en la posibilidad de erradicar las principales plagas y desafortunadamente después de algo más de cuatro décadas de aquellos resultados extraordinarios se puede comprobar que los problemas de plagas no han desaparecido y, por el contrario trajo consigo la aparición de nuevas plagas, contaminación del medioambiente, destrucción de la fauna silvestre, destrucción de enemigos naturales, peligros de intoxicación, fenómenos comunes ligados al uso de insecticidas y el desarrollo de la resistencia por parte de algunas especies (Beingolea, 1958).

El uso de insecticidas ha sido el método más generalizado para el combate de plagas de granos almacenados, empleándose comúnmente los organoclorados, organofosforados y piretroides (Mejía, 2003). El malatión que pertenece al grupo de los organofosforados ha sido el más utilizado para el control de granos en almacenes, pero se ha comprobado que los insectos han desarrollado resistencia (Georghiou y Lagunes, 1991).

En lugares donde se almacenan grandes volúmenes de granos, es muy difícil el tratamiento por aspersión, y más el espolvoreo con insecticidas. Bajo esta situación el uso de insecticidas se restringe a la realización de aspersiones sanitarias en los almacenes, para tratar el producto que se va almacenar se emplean principalmente los fumigantes como el fosforo de aluminio y el bromuro de metilo que son mucho más fáciles de aplicar (Mejía, 2003).

Ramírez y Moreno (1995), ha reportado que metil pirimifós es muy efectivo para proteger de *Dermestes maculatos* durante periodos largos, mientras que en *Tribolium spp.*, *Orizaephilus surinamensis* actúa efectivamente, por otro lado *Sitophilus zeamais* se reporta como resistente a malatión.

Resistencia

El fenómeno de resistencia de las plagas a los plaguicidas ha sido observado donde quiera que se utilicen estos productos en forma rutinaria, y en la actualidad los especialistas lo aceptan como una consecuencia natural del proceso evolutivo (Beingolea, 1958).

Plagas que inicialmente fueron susceptibles a dosis bajas de un producto, después de un tiempo de sucesivas aplicaciones, requieren dosis mayores y eventualmente, terminan por no ser afectadas (Brown, 1959).

Vargas (1996), señala que todas las estrategias de control de plagas utilizadas por el hombre, tales como el control químico a través de clorados, fosforados, piretroides, carbamatos y acilureas, e incluso el control cultural mediante variedades y rotaciones, han originado resistencia.

Georghiou (1991) reporta cifras mayores de especies de artrópodos resistentes a uno más plaguicidas, cuya relación ha cambiado sustancialmente en comparación con años anteriores. Ahora hay un total de 504 especies, de las cuales 481 son dañinas (283 son de interés agrícola, 198 de importancia médico veterinaria) y 23 son especies benéficas. La mayoría de las especies resistentes

son dípteros, seguido de lepidópteros, coleópteros, ácaros, homópteros y heterópteros.

En principio, el desarrollo de resistencia en una población de insectos se basa en la variabilidad natural que presentan los individuos de esa población a los efectos de un producto. Normalmente unos pocos individuos son capaces de tolerar las dosis que producen la muerte de la gran mayoría de la población. Si se ejerce una presión de selección por medio de sucesivas aplicaciones los individuos susceptibles son eliminados y la población se torna resistente (Bielza, 1995).

Hay que distinguir el concepto de *resistencia* que es la pérdida de susceptibilidad de una población como consecuencia de las aplicaciones de insecticidas y la *tolerancia* que es la ausencia de susceptibilidad de una población de insectos a un producto como una característica natural (Georghiou y Taylor, 1986).

Si el DDT no mata moscas ni cucarachas en la actualidad se debe a dos fenómenos diferentes: Las moscas han adquirido resistencia en tanto que las cucarachas presentan tolerancia, pues nunca fueron susceptibles al producto (Georghiou y Taylor, 1986).

Lagunes y Villanueva (1994), definen la resistencia como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia sobrevivir a la exposición que para otros sería letal. En la actualidad la resistencia a insecticidas es un problema asumido y se han desarrollado una serie de estrategias que tienen por objetivo el mantener la expresión de este fenómeno en niveles lo más bajo posibles.

Tipos de resistencia

Según Silva (2003), las vías por la que los insectos se hacen resistentes a los insecticidas se pueden dividir en tres niveles:

Resistencia por comportamiento

Monge (1986), menciona que la resistencia por comportamiento se da cuando los insectos resistentes pueden detectar o reconocer el peligro y eludir el contacto con el insecticida, bien evitando comer, escapando del área donde se ha aplicado el insecticida. Este mecanismo se ha descrito en más de 30 especies de insectos para diferentes clases de insecticidas incluidos organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, de modo que es un mecanismo ampliamente generalizado, si bien ha sido poco estudiado por las dificultades que plantea su análisis en el laboratorio.

Como ejemplo de la acción repelente, tenemos a las moscas, después de un tiempo ya no se acercan a cebos con azúcar que contienen malatión; ésta es un tipo de resistencia que depende del estímulo (Monge, 1986).

Carillo (1984), la define como la pérdida de susceptibilidad por cambio en el comportamiento del insecto frente a los repetitivos programas de control. No es un mecanismo tan importante, sin embargo contribuye en la disminución de la efectividad de la dosis letal del plaguicida. Esta habilidad puede producirse mediante un estímulo dependiente o independiente, el primero se evidencia cuando una plaga evita el contacto con la zona tratada con plaguicida (repelencia) y el estímulo independiente ocurre cuando la plaga abandona la zona tratada con el plaguicida hacia un área sin residuos (irritancia).

Resistencia morfológica

La resistencia morfológica o resistencia a la penetración es donde la composición del exoesqueleto llega a ser modificada inhibiendo la penetración del insecticida Miller (1988).

La velocidad de penetración depende de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del tegumento del insecto, 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).

Barbera (1976), menciona que una vez que el insecto entra en contacto con el insecticida, los individuos resistentes pueden absorber la toxina más despacio que los sensibles; esto ocurre debido a que su cutícula o el epitelio del tracto digestivo han desarrollado barreras contra los productos, lo cual les protege frente a un amplio espectro de insecticidas.

Resistencia cruzada

En el desarrollo de resistencia ocurre con frecuencia el fenómeno de “resistencia cruzada”; es decir que la presión de selección de un insecticida incrementa también la resistencia de la población a otro producto que no fue usado en la selección. Generalmente hay cierto grado de resistencia cruzada entre productos de la misma clase (Herrera, 1963). Por ejemplo, el caso típico corresponde al DDT y los piretroides (debido al gene *kdr*) que a pesar de pertenecer a diferentes grupos químicos comparten el mismo modo de acción, pues ambos actúan sobre la velocidad de los canales iónicos quedando la membrana nerviosa alterada, y entre los carbamatos y los organofosforados por selección a la poca sensibilidad de la colinesterasa (Hama, 1983).

Por otro lado, se consideraba que la tolerancia cruzada entre compuestos clorados era relativamente alta, en cambio entre clorados o fosforados es

relativamente baja. En algunos compuestos se ha encontrado resistencia cruzada de carbamatos a clorados y a fosforados (Moorefield, 1959). Las poblaciones que exhiben resistencia contra diversos productos se denominan poli-resistentes.

Técnicas de monitoreo de la resistencia

Algunos investigadores preocupados por la agudeza del problema de la resistencia, han orientado sus investigaciones hacia la búsqueda de causas, factores y mecanismos involucrados en ello, como consecuencia, varias publicaciones tales como Brown *et al.*, 1971, Brow y Pal 1971, OMS 1980, Georghiou, 1990 y otros, han contribuido al conocimiento del tema, con lo cual además de fomentar e incentivar la búsqueda de nuevos conocimientos, también estimulan la evaluación de técnicas encaminadas a detectar y cuantificar la resistencia (Torres, 1993).

Georghiou (1980) sugiere la idea de que se deben desarrollar por parte de los toxicólogos, entomólogos y/o profesionales relacionados con la salud del hombre, la capacidad de cuantificar el riesgo de resistencia de una plaga en una situación determinada y perfeccionar las especificaciones de manejo de los insecticidas, tales como el umbral de la plaga para los tratamientos, formulación y selección del insecticida entre otros. Entre las metodologías que existen para la detección de la resistencia en los insectos destacan las siguientes:

Bioensayos

Banki (1978), señala al bioensayo como el procedimiento experimental en el que se pretende determinar la efectividad biológica de un plaguicida y en las que se determinan dosis- mortalidad.

En la determinación de la resistencia de los insectos a los insecticidas en el laboratorio, existen diversos procedimientos pero cada uno de ellos se adapta más o menos a determinada plaga, en función de la especie, hábitat, estado biológico, etc. (Reynolds, 1962). Uno de los factores que mayormente influye en la selección

del bioensayo es la entrada del toxico al insecto, a través del exoesqueleto y sus partes asociadas; tracto digestivo y sistema respiratorio. En las técnicas de los bioensayos las mortalidades se determinan en uno o varios individuos que fueron sometidos al insecticida después de un determinado periodo de exposición. Los bioensayos más utilizados para este propósito son:

Técnicas de aplicación tópica. Consisten en la aplicación de un determinado volumen de la sustancia que contiene el tóxico, vía dorsal del insecto, entre el 2° y 3° segmento torácicos, como métodos comúnmente usados para obtener la DL_{50} y la DL_{90} , con más exactitud que otros métodos (Hosking y Gordon, 1956).

Métodos de película residual para venenos de contacto.

- a) Papel filtro impregnado con un volumen y concentración determinadas del ingrediente activo.- con discos de papel son introducidos internamente en frascos de plástico o vidrio en los cuales son expuestos los insectos de prueba, para que al posarse en las paredes se pongan en contacto con el plaguicida, este método ha sido adaptado por la OMS (Busvine, 1971). Comúnmente este tipo de métodos es utilizado en insectos transmisores de patógenos, insectos de interés medico-veterinario.
- b) Usando vidrio como superficie para la película residual.- el insecticida se disuelve en un disolvente volátil, se aplica un volumen determinado a la superficie interna del frasco y se deja que el solvente se volatilice para luego introducir los insectos y determinar la mortalidad a diferentes intervalos de tiempo.

Venenos estomacales usados como residuo en hojas o follaje para insectos masticadores.- Busvine (1971) describió el método, el cual está basado en el uso de hojas tratadas con el insecticida, por diferencia de pesos de las hojas tratadas antes o después de la aplicación del insecticida, considerando también la parte del tejido ingerida por el insecto es como se determina la dosis real que

originan los niveles de mortalidad que se checan. El tratamiento de las hojas puede hacerse por aspersión, inmersión o espolvoreo.

Concentración diagnóstico

Las pruebas de concentración diagnóstico han sido ampliamente usadas debido a su simplicidad y rapidez (Gunning *et al.*, 1995).

Este método se basa en las concentraciones mínimas del insecticida, que son una larga serie de ensayos de laboratorio y campo, permite observar los factores que hayan causado la muerte de todos los integrantes de diversas poblaciones de líneas susceptibles y resistentes en una concentración cuya dosis está entre los límites de confianza de la CL_{99} (Georghiou, 1983).

Este método ha sido recomendado para detección de resistencia en mosquitos *Anopheles*, *Culex*, y *Aedes* (OMS, 1980).

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se usan para conocer la actividad y la cantidad de enzimas responsables de la resistencia (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).

Estas se consideran como un método indirecto, ya que correlacionan un alto nivel de una enzima o una reacción enzimática específica, con la resistencia comprobada de cierta colonia de insectos; a su vez pueden ser generales o altamente específicos, según la metodología utilizada (Lagunes y Villanueva, 1994).

Con los ensayos bioquímicos se puede medir el efecto del tratamiento con plaguicidas en el campo, conociendo la frecuencia de los mecanismos de resistencia específicos y la posible disminución de esta frecuencia en ausencia de

presión selectiva con plaguicida contra una clase de insecticida. Por ejemplo, un sitio blanco insensible combinado con un factor de resistencia metabólica (Bisset, 2002).

Enzimas de resistencia

Los mecanismos de resistencia a insecticidas tienen una base bioquímica, las enzimas detoxificativas (esterasas, oxidasas y glutatión-transferasas), las cuales ya sea por sus niveles elevados o modificación previenen que el insecticida alcance su sitio de acción (Patil, 1996).

Los insectos emplean estos sistemas para transformar la molécula de insecticida, de manera que las poblaciones resistentes pueden tener más cantidad o formas más eficaces de estas enzimas. Con una amplia especificidad de sustratos, la probabilidad de que al menos uno de los miembros de la familia pueda metabolizar a uno o más insecticidas es elevada (Hemingway y Ranson, 2000). Este tipo de resistencia puede, por tanto, ser específica para un compuesto determinado, o ser más general y afectar a un amplio rango de compuestos (IRAC, 2007).

Los mecanismos de detoxificación más importantes que constituyen la resistencia metabólica en insectos se mencionan a continuación:

Esterasas

Las carboxilesterasas, también se reconocen como una de las principales familias de enzimas implicadas en la resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides (Hemingway y Ranson, 2000), y a los insecticidas más recientemente introducidos, tales como reguladores del crecimiento de insectos (IGRs), imidacloprid o toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Oakeshott *et al.*, 2005).

Este grupo de enzimas ha sido reconocido como uno de los sistemas más importantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos, y su mecanismo está

asociado con la producción masiva de enzimas hidrolíticas y de secuestro en varias especies de insectos (Devonshire, 1977).

Los diferentes subtipos de esterasas se definen en base a los tipos de enlaces éster que hidrolizan, entre los cuales distinguimos las acetilesterasas, las arilesterasas, las carboxilesterasas y las colinesterasas (Oakeshott *et al.*, 2005).

La hidrólisis de los ésteres carboxílicos se produce vía acilación reversible de un residuo serina situado en el centro activo de la proteína, esta acilación provoca la salida del alcohol; el posterior ataque nucleofílico del agua restituye la forma libre de la enzima y el correspondiente ácido carboxílico. Éste es el caso de los carbamatos y piretroides, cuyas estructuras químicas se corresponden con las de ácidos carboxílicos y por tanto pueden ser potencialmente hidrolizados por las carboxilesterasas. Para el caso de los organofosforados, las fosfotriesterasas son las principales encargadas de su metabolismo, ya que rompen el enlace entre el átomo de fósforo y el grupo saliente (Sogorb y Vilanova, 2002).

Las carboxilesterasas tipo β ; son un grupo de esterasas que hidrolizan más tipos de ésteres, que reaccionan con los compuestos organofosforados fosforilándose y quedando inhibidas, es el caso de los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, las β esterasas hidrolizan preferentemente el 2- naftilacetato. En las esterasas tipo α , los organofosforados interaccionan con el grupo funcional $-SH$ y forman un enlace $P=S$ que es fácilmente hidrolizado por H_2O inhibiendo su actividad enzimática (Fournier *et al.*, 1989).

Se ha descrito su relación con la resistencia en muchas especies de insectos que se constituyen plaga, como por ejemplo el mosquito *Anopheles gambiae* (Vulule *et al.*, 1999), el gusano negro *Spodoptera littoralis* (Riskallah, 1983), la mosca *Lucilia cuprina* (Campbell *et al.*, 1998) o el barrenador del grano *Anisopteromalus calandrae* (Claudianos *et al.*, 2002).

El caso mejor estudiado es el del áfido *Myzus persicae*, la sobreproducción de una isoenzima carboxilesterasa específica, la E4, es responsable del notable incremento de esta actividad en clones resistentes a organofosforados (Devonshire, 1977), esta resistencia se debe principalmente, a la fosforilación o

carbamilación de la isoenzima E4, impidiendo que el insecticida llegue a su sitio de acción (Devonshire y Moores, 1982).

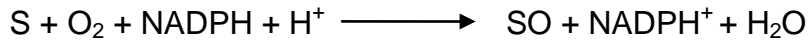
Oxidasas de Función Múltiple

Las oxidasas se encuentran presentes en todos los insectos, aunque habitualmente en cantidades insuficientes para contribuir a la resistencia. No obstante, constituyen una reserva y su actividad puede intensificarse por otros insecticidas o xenobióticos en el medio ambiente, elevando la protección hacia el insecto (Brown, 1987).

El rol de las OFM se ha correlacionado entre las concentraciones enzimáticas y la susceptibilidad (Feyereisen, 1999), sin embargo la resistencia puede aumentar 1000 veces mientras la actividad de las OFM sólo se multiplica entre 2 y 60 veces, en presencia de organofosforados que requieren metabolización previa, la actividad reducida de las OFM puede constituir un modo de resistencia (Scott, 2001).

Este sistema enzimático juega un papel muy importante, siendo el retículo endoplasmático el organelo celular en donde se asocian las diversas enzimas que constituyen el complejo de oxidasas microsómicas de función múltiple, en el caso de los insectos se localizan en tubos de malpighi, cuerpo graso y tracto digestivo por lo que es considerado como la primera defensa contra agentes tóxicos lipofílicos de carácter xenobiótico (Lagunes y Rodríguez, 1985).

Las oxidasas de función múltiple del retículo endoplasmático liso se encuentra en la fracción microsomal de las células, no son específicas y catalizan la reacción siguiente:



S = Sustrato (insecticida).

Entre las reacciones de la primera fase aparecen como fundamentales 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: el citocromo P-450. (Sotolongo, 1988).

El citocromo P-450 está implicado como el factor principal en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos, también detoxifican organofosforados, piretroides y DDT entre otros (Casida, 1970).

Plapp (1976) determinaron que en cepas resistentes de mosca doméstica con altos niveles de oxidasas, existió más citocromo P-450 que en cepas susceptibles, esto sugiere que el citocromo P-450 el cual está presente en todos los individuos, localizado en tejidos estratégicos como es el cuerpo graso, está involucrado en la resistencia a insecticidas, por su localización es un posible reservorio para el desarrollo potencial de la resistencia en cada insecto.

Se han descrito numerosos casos de poblaciones resistentes en los que uno o varios genes que codifican a las oxidasas P-450 presentaban mayor cantidad de transcritos, lo que sugiere que la sobreexpresión de uno o más genes P-450 es un fenómeno común en la resistencia metabólica (Feyereisen, 2005).

Estudios realizados en *Drosophila* con distintas poblaciones resistentes a DDT recogidas por todo el mundo, han encontrado que sólo uno de los 90 genes P-450 de *Drosophila* estaba sobretranscrito, y que esa sobretranscripción era suficiente para conferir la resistencia al insecticida (Daborn, 2002).

Glutación S-transferasas

La glutación S-transferasas (GSTs) es una familia de enzimas que catalizan la conjugación del glutación endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos, protegiendo las macromoléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente con el insecticida (Board *et al.*, 2000).

Estas enzimas tienen gran importancia en la detoxificación metabólica en todos los animales y son conocidas por estar involucradas en la resistencia de los insectos a los insecticidas organofosforados (Terriere, 1984).

La GSTs detoxifican los insecticidas atando al glutación, que los hace más solubles en agua y por lo tanto facilita la excreción por los insectos. En algunos insectos resistentes, tal como en la mosca doméstica, la sobreexpresión de un gen GSTs es responsable para la producción de las cantidades grandes de la enzima (Dauterman, 1983).

Varios estudios han asociado un incremento en la actividad GSTs con la resistencia a las principales clases de insecticidas (Ranson y Hemingway, 2005). Es el caso de *Musca domestica* (Clark y Shamaan, 1984) y los mosquitos *Aedes aegypti* y *A. gambiae* (Grant y Matsumura, 1988) con el DDT, o *Plutella xylostella* (Chiang y Sun, 1993), *Anopheles* (Hemingway *et al.*, 1991) y *M. domestica* (Oppenorth *et al.*, 1979) con los organofosforados. Por otro lado, si bien no parece que estén directamente implicadas en el metabolismo de los piretroides, sí podrían jugar un papel importante en la resistencia a esta clase de insecticidas, al metabolizar los productos resultantes de la peroxidación inducida por ellos (Vontas *et al.*, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxicología de insectos y en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Incremento de colonias

El material biológico utilizado para este estudio fueron dos poblaciones de *T. castaneum* procedentes de harineras de Coahuila (1) y Nuevo León (2), y tres de *T. confusum*, recolectados en ambos lugares (3 y 4), y una población resistente procedente de Aguascalientes. Los insectos se mantuvieron bajo condiciones controladas en una cámara bioclimática del Departamento de Parasitología, a una temperatura constante de 32 °C, con una humedad relativa del 15% y fotoperiodo de 12:12 hrs luz: oscuridad.

Determinación de la cantidad de proteína

Este método consiste en cuantificar una proteína de referencia utilizando la BSA (Albumina Sérica Bovina), y sirve para definir el número de individuos o la cantidad de tejido necesario de insectos para cuantificar enzimas específicas en microgramos en cada mililitro de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) relacionadas con la resistencia de insectos a insecticidas.

Obtención de la curva estándar

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) y Albúmina Sérica Bovina (BSA). 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). Para esto, se utilizó la BSA como proteína de referencia para la formación de una curva estándar para la determinación de proteína en el complejo de gorgojos de la harina. Para trazar la curva de referencia se utilizaron seis diluciones de BSA (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Diluciones de BSA utilizadas para determinar la curva estándar.

$\mu\text{g/ mL}$ de proteína
0.001
0.01
0.1
1.0
10.0
100.0

Cuantificación de proteína en *T. castaneum* (Herbst) y *T. confusum* (Duval).

Una vez obtenida la curva de referencia con BSA, se procedió a correr las pruebas con el gorgojo confuso de las harinas, para la preparación de los homogenatos se utilizaron los diluyentes buffer fosfato de potasio (KPO_4). Estos homogenatos consistieron en diferentes concentraciones en relación al número de gorgojos (Cuadro 2), cada una con 15 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 1mL con la adición de 900 μ L diluyente, según correspondía.

Cuadro 2. Concentraciones de insectos macerados utilizados para determinar la cantidad de proteína.

μ g / mL de proteína
0.05
0.25
0.30
0.35
0.4
0.5
1
2
3

Fuente de enzima

Previo a las pruebas bioquímicas, se homogenizaron 0.5 μ g de individuos de *T. castaneum* y *T. confusum* en 100 μ L de buffer fosfato de potasio (KPO_4), a 0.05 molar y pH 7.2, aforándolo a 1mL con el mismo buffer (Brogdon, 1984). Se prepararon 15 muestras para cada población para realizar las pruebas. La concentración de proteína de la muestra fue de 0.179 μ g de proteína/ 0.5 mg del tejido de los gorgojos determinado por el método de Bradford (1976), modificado por Brogdon (1984).

Determinación de enzimas

Se emplearon seis pruebas bioquímicas para determinar los niveles de acetilcolinesterasas, acetilcolinesterasa insensible, α y β esterasas, glutatión S-transferasas y oxidasas, en 5 poblaciones de gorgojos. Las pruebas se corrieron por triplicado con 15 repeticiones cada una en placas de 96 cavidades,

posteriormente fueron leídas mediante el lector de placas Stat-Fax 2100 (Awareness Technology, Palm, City Florida).

Niveles de acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible

Para determinar los niveles de ACE y ACE in, se utilizó el método de Brogdon (1984). Para llevar a cabo estas pruebas se precisó de colocar 100 μ L del homogenato por triplicado en los pocillos de la placa, más 100 μ L de ATCH al 3.0 mM y 100 μ L de DTNB al 0.25 mM. Se tomó lectura de forma inmediata con un Tiempo cero (T_0) a 405 nanómetros (nm), luego de 10 min se tomó una segunda lectura con un Tiempo diez (T_{10}) utilizando el mismo filtro. La diferencia entre las lecturas $T_{10} - T_0$ se utilizó 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 21 mg de naled (1,2-dibromo-2,2-dicloroetil dimetil fosfato) como inhibidor.

Niveles de α y β esterasas.

Para determinar los niveles de α y β esterasas fue empleado el método de Brogdon y Dickinson (1983). Para llevar a cabo la prueba se colocaron 100 μ L de homogenato de los gorgojos por triplicado en cada cavidad de la placa, después de agregó 10 μ L de acetato β - naftil, la muestra se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se añadieron 100 μ L de dianisidina, la cual se mantuvo a temperatura ambiente por dos minutos y finalmente se tomó lectura de la placa en un lector de absorbancia usando un filtro de 540nm. En el control positivo de la placa se agregaron 100 μ L de β - naftil y en el control negativo se añadieron 100 μ L de buffer KPO_4 .

Niveles de glutatión S- transferasas

Para la determinación de los niveles de GSTs se utilizó la metodología de Brogdon y Barber (1990). Para ello se colocaron 100 μ L del homogenato por triplicado en los pocillos de la placa, más 100 μ L de glutatión reducido al 8.0 mM y 100 μ L de cDNB al 10 mM. Inmediatamente se tomó lectura con T_0 y se utilizó un filtro de 340 nm, al finalizar la lectura se dejó reposar la placa durante 5 min y por último se tomó la segunda lectura con Tiempo cinco (T_5) utilizando el mismo filtro. La diferencia de las lecturas del (T_5-T_0) fue empleada para el análisis de los resultados.

Niveles de oxidasas

Para determinación de las oxidasas se empleó la metodología propuesta por Brogdon *et al.* (1997). Se precisó de colocar 100 μ L del homogenato por triplicado en las cavidades de la placa, más 200 μ L de TMBZ al 2.0 mM y 25 μ L de peróxido de hidrógeno al 3%. La muestra se dejó incubar por 5 min a una temperatura ambiente y finalmente se leyó en el lector de microplacas usando un filtro de 630 nm. En el control positivo se añadió una solución de 100 μ L de citocromo C, y en el control negativo se agregaron 100 μ L de buffer de KPO_4 .

Análisis estadístico

Con las medias de los valores de absorbancia de las 6 enzimas se obtuvo el porcentaje de resistencia, el cual lo definió el contenido de enzimas presentes en las 5 poblaciones de gorgojos, y mediante graficas se expresaron dichos porcentajes. Con los mismos valores de absorbancia se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar para determinar las diferencias entre los tratamientos, para la diferencia se hizo una comparación de medias por el método de Tukey con la finalidad de establecer el orden de eficiencia de los tratamientos con un 0.05% de significancia, los análisis estadísticos nos sirvieron para determinar específicamente los niveles enzimáticos por población, así como para conocer la enzima que mantuvo los niveles más altos en las cinco poblaciones.

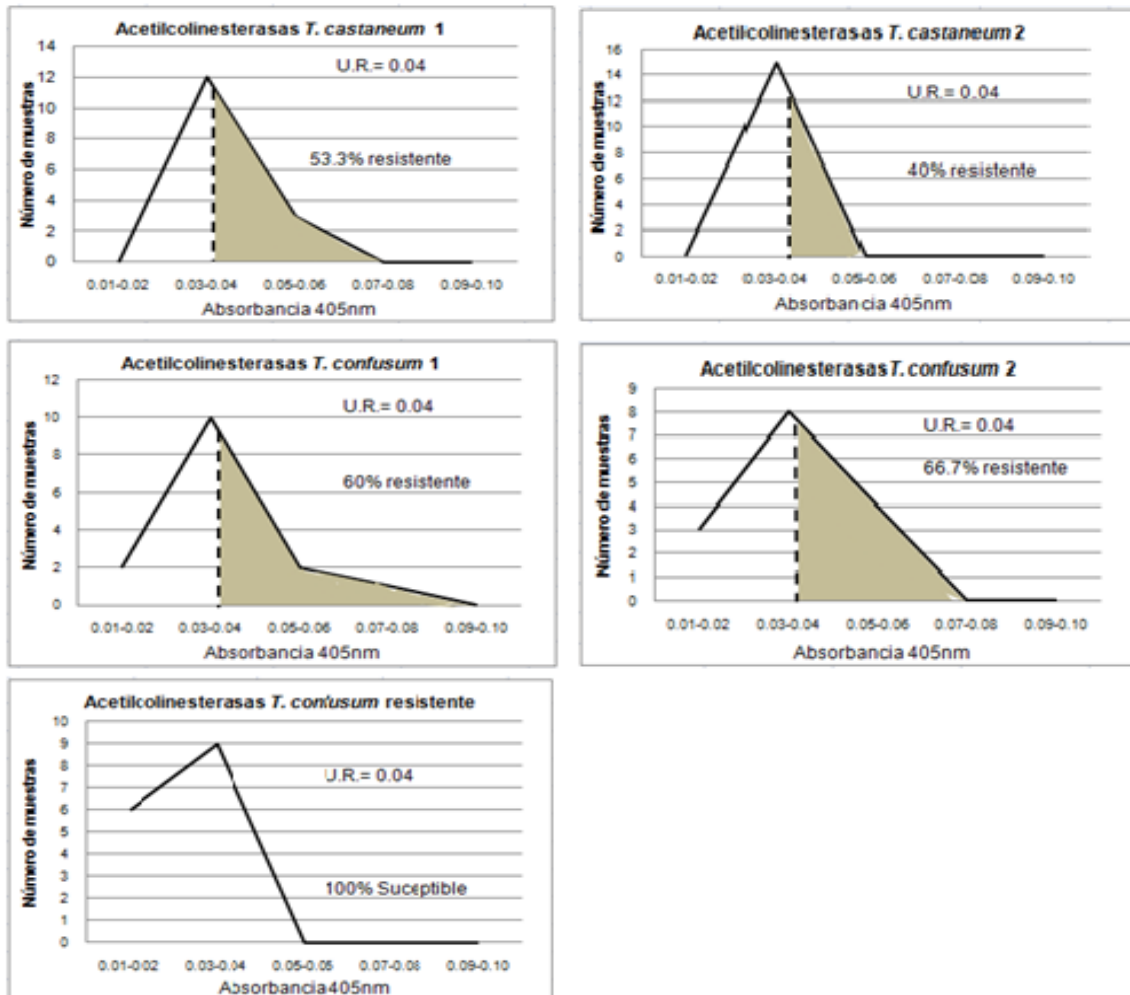
RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, estos resultados se muestran en tres etapas; la primera consiste en mostrar los niveles enzimáticos de manera general, en la segunda etapa se analizaron los niveles enzimáticos por población y en la última etapa se muestran los niveles enzimáticos por cada una de las enzimas.

Niveles enzimáticos

Con los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas se estableció el porcentaje de resistencia para cada enzima en las cinco poblaciones de gorgojos, no habiendo una línea susceptible, se tomó como referencia un umbral de resistencia, el cual se determinó en base a la media entre los valores máximos y mínimos de absorbancia de cada enzima. Los valores que superaron este umbral se consideraron como individuos resistentes. Cabe mencionar que los valores de absorbancia se incluyen en el apéndice.

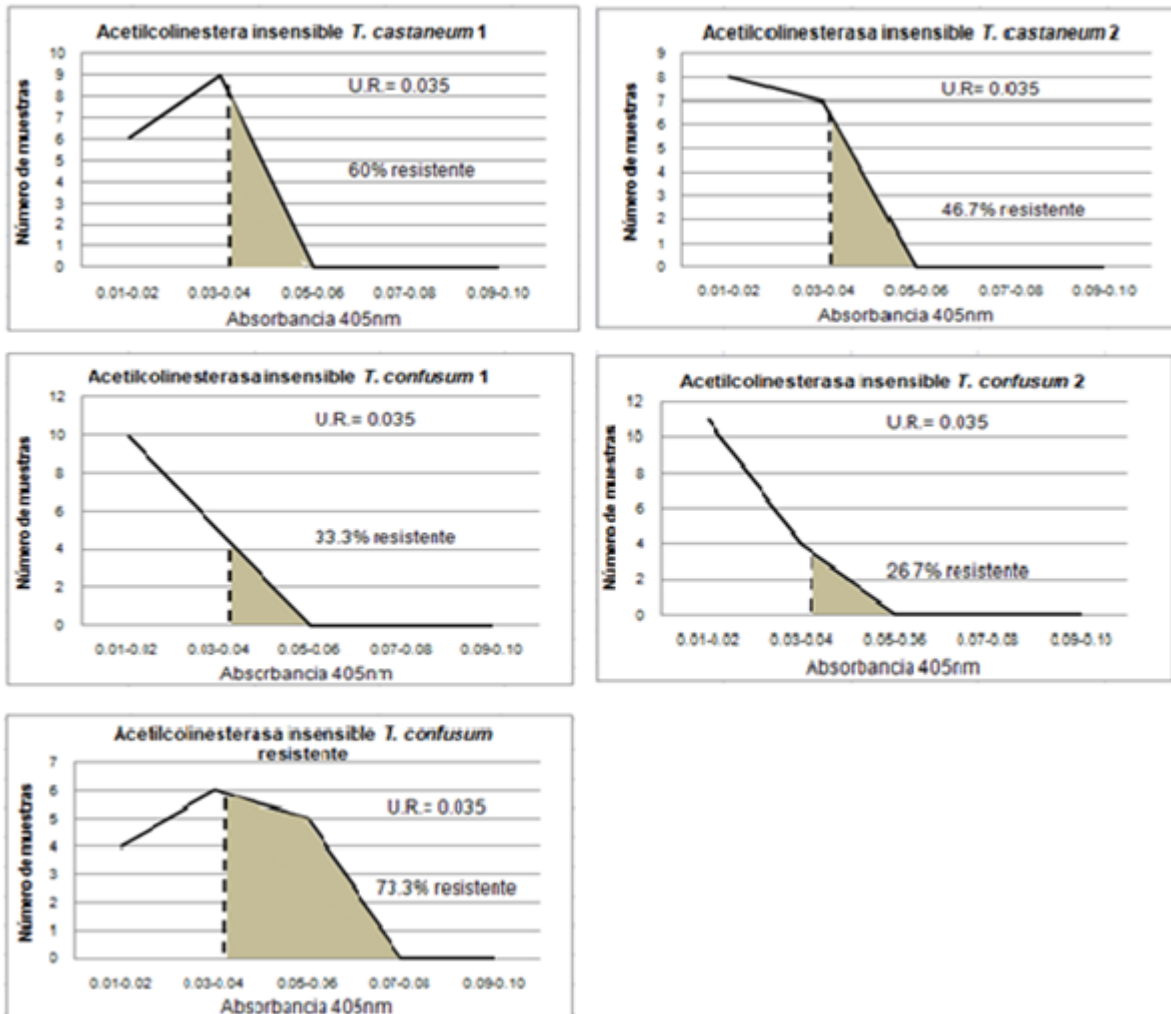
Figura 1.- Distribución de frecuencia de los niveles de acetilcolinesterasa en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.



Como se puede observar en la Figura 1 el umbral de resistencia (U. R.) para la enzima acetilcolinesterasa fue de 0.04, la población *T. castaneum* 1 (región N.L.), presentó valores de absorbancia entre los rangos de 0.03 a 0.05, en donde 8 de 15 muestras superaron el umbral de resistencia, esto significa que un 53.3% de los individuos de la población presentaron resistencia mediante la enzima acetilcolinesterasa. Mientras que la población de *T. castaneum* 2 (región Coah.) arrojó valores de absorbancia de 0.03 a 0.04, indicando que 6 de 15 muestras

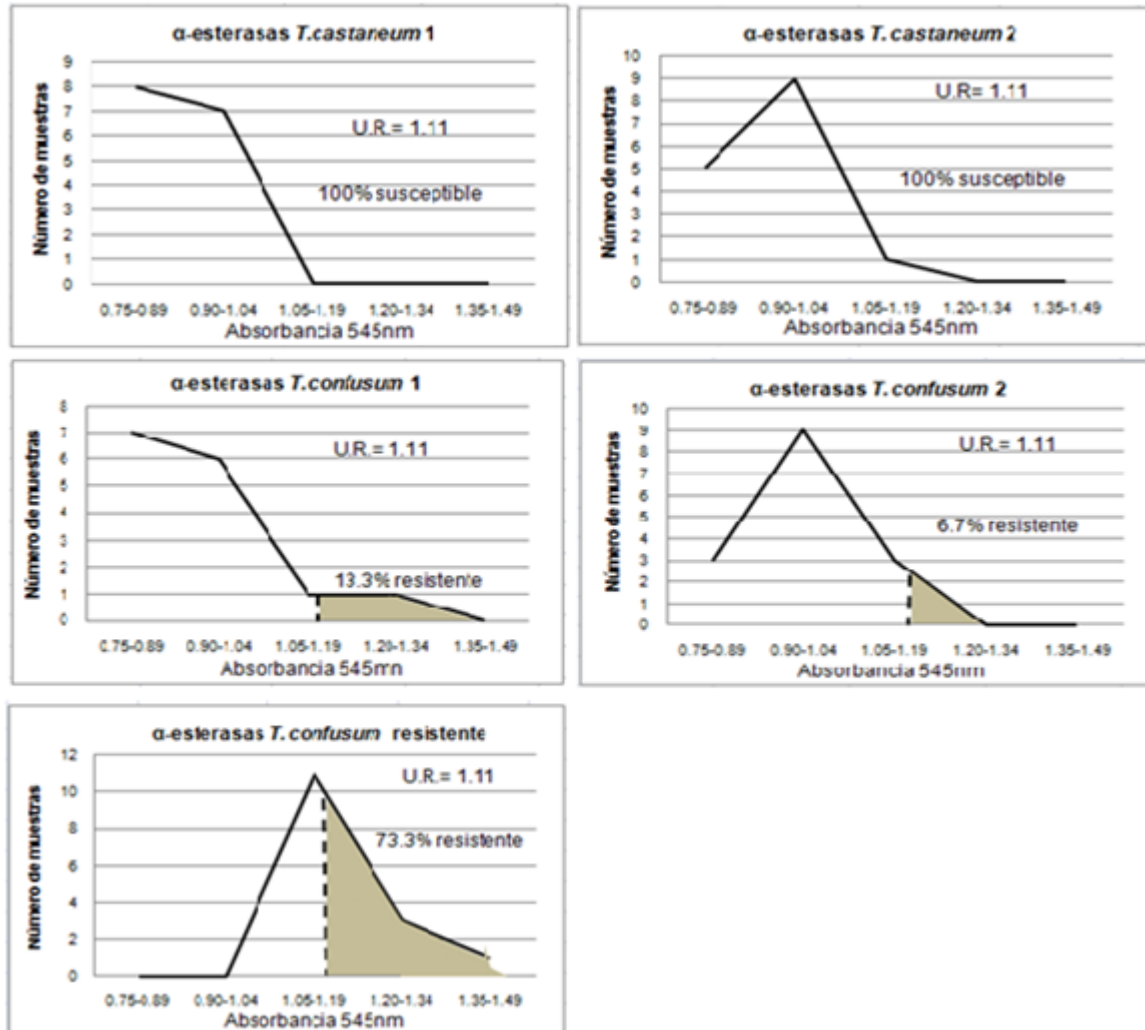
resultaron con valores superiores al umbral de resistencia, dando un 40% de individuos de esta población con resistencia para esta enzima. Para *T. confusum* 1 (región N. L.), 9 de 15 muestras fueron las que registraron los valores más altos, lo que equivale a un 60% de resistencia; así mismo en la población *T. confusum* 2 (región Coah.), 10 de las 15 muestras superaron el umbral de resistencia, equivalente a un 66.7% de individuos, y finalmente para la población de *T. confusum* resistente (región Ags.), ninguna de las muestras superó los niveles del umbral de resistencia de acetilcolinesterasa. De acuerdo a lo anterior, podemos mencionar que *T. confusum* 2 (región Coah.), fue la población que presentó mayores individuos resistentes en presencia de esta enzima.

Figura 2.- Distribución de frecuencia de los niveles de acetilcolinesterasa insensible en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.



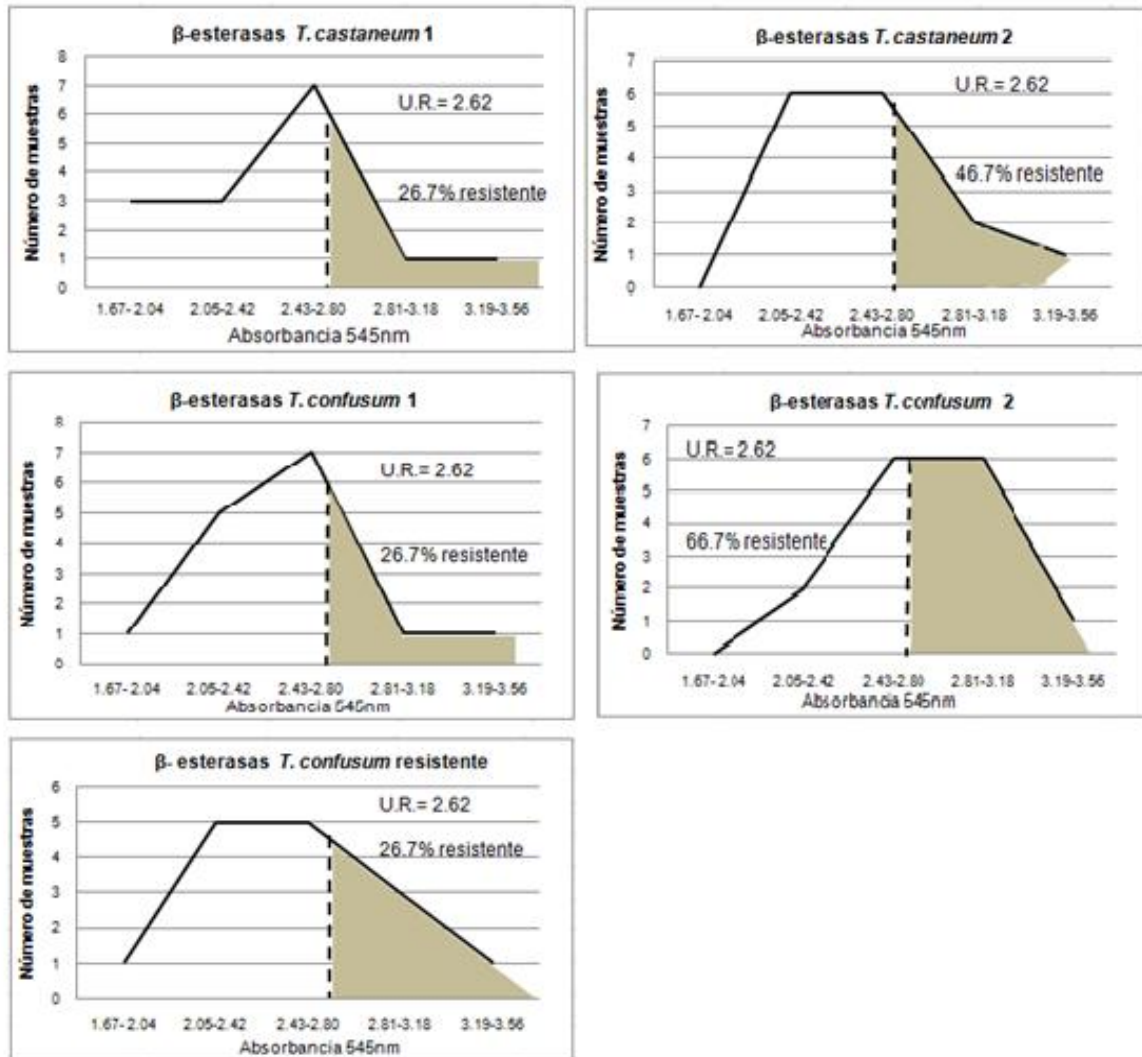
En cuanto a la enzima acetilcolinesterasa insensible podemos apreciar en la Figura 2, un U. R. de 0.03; la población de *T. castaneum* 1(N.L.) mostró que, de 15 muestras, 9 superaron el U. R. (60%). Para la población *T. castaneum* 2 (Coah.), 7 de ellas presentaron niveles superiores a dicho umbral (46.7%). Para *T. confusum* 1(N.L.), solo 5 muestras rebasaron el umbral, (33.3%). Respecto a *T. confusum* 2 (Coah.), 4 muestras superaron el U. R. (26.7%), y finalmente para *T. confusum* resistente (Ags.), 11 muestras obtuvieron valores altos (73.3%) de individuos resistentes por la presencia de esta enzima, por lo que mencionamos que *T. confusum* resistente (Ags.) fue la población que presentó los niveles más altos de acetilcolinesterasa insensible.

Figura 3.- Distribución de frecuencia de los niveles de α -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.



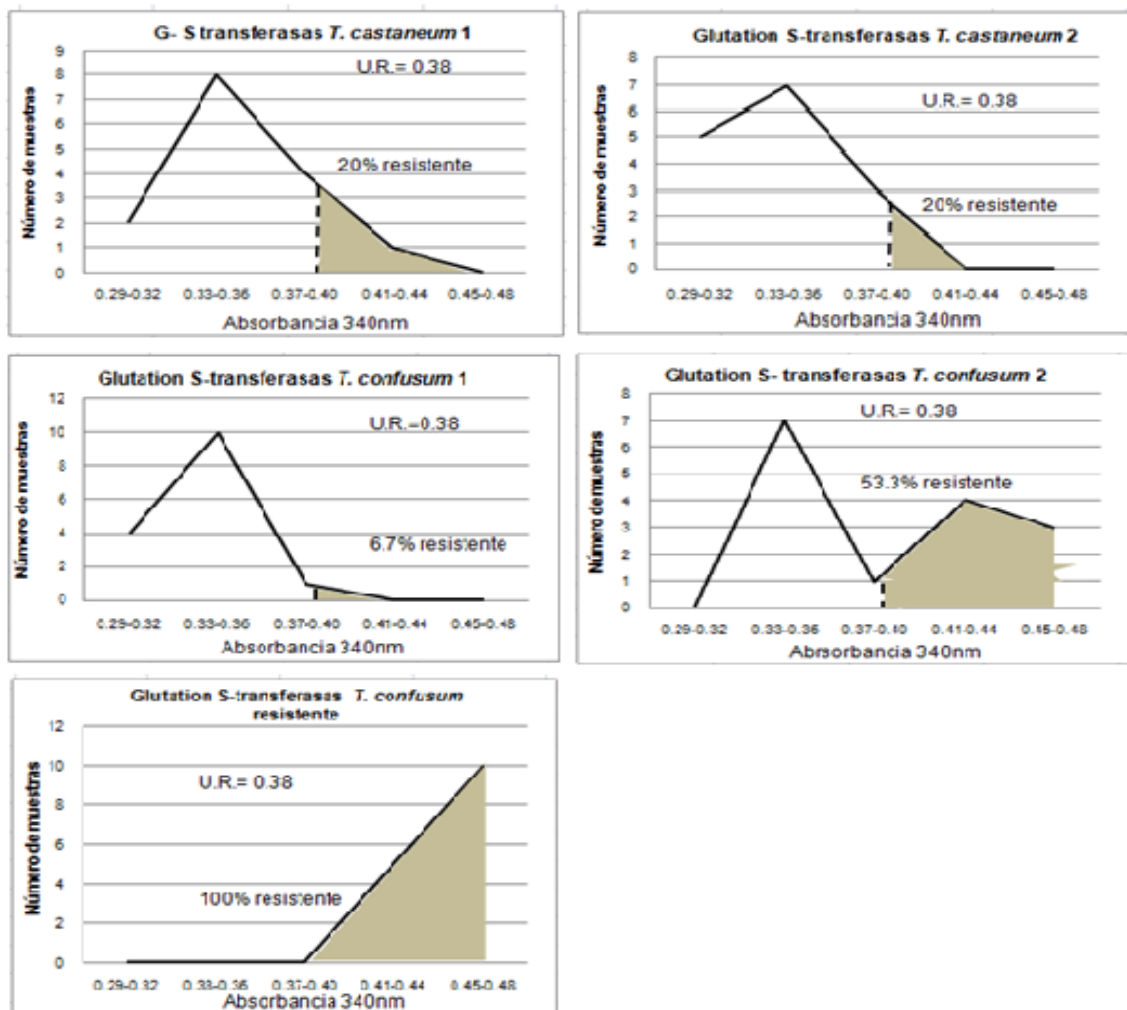
Respecto a las α -esterasas en la Figura 3 se observó que el U. R. fue de 1.11, las poblaciones *T. castaneum* 1 (N.L.) y *T. castaneum* 2 (Coah.) presentaron valores inferiores al umbral, esto indica que los niveles de esta enzima no son un factor de resistencia. Para *T. confusum* 1 (N.L.), 2 de 15 muestras registraron niveles superiores (13.3%). En cuanto a *T. confusum* 2 (Coah.), una muestra fue la que superó el umbral de resistencia (6.7%). Referente a *T. confusum* resistente (Ags.) 11 de 15 muestras rebasaron el umbral de resistencia, lo que corresponde a un 73.3% de individuos resistentes en presencia de esta enzima.

Figura 4.- Distribución de frecuencia de los niveles de β -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.



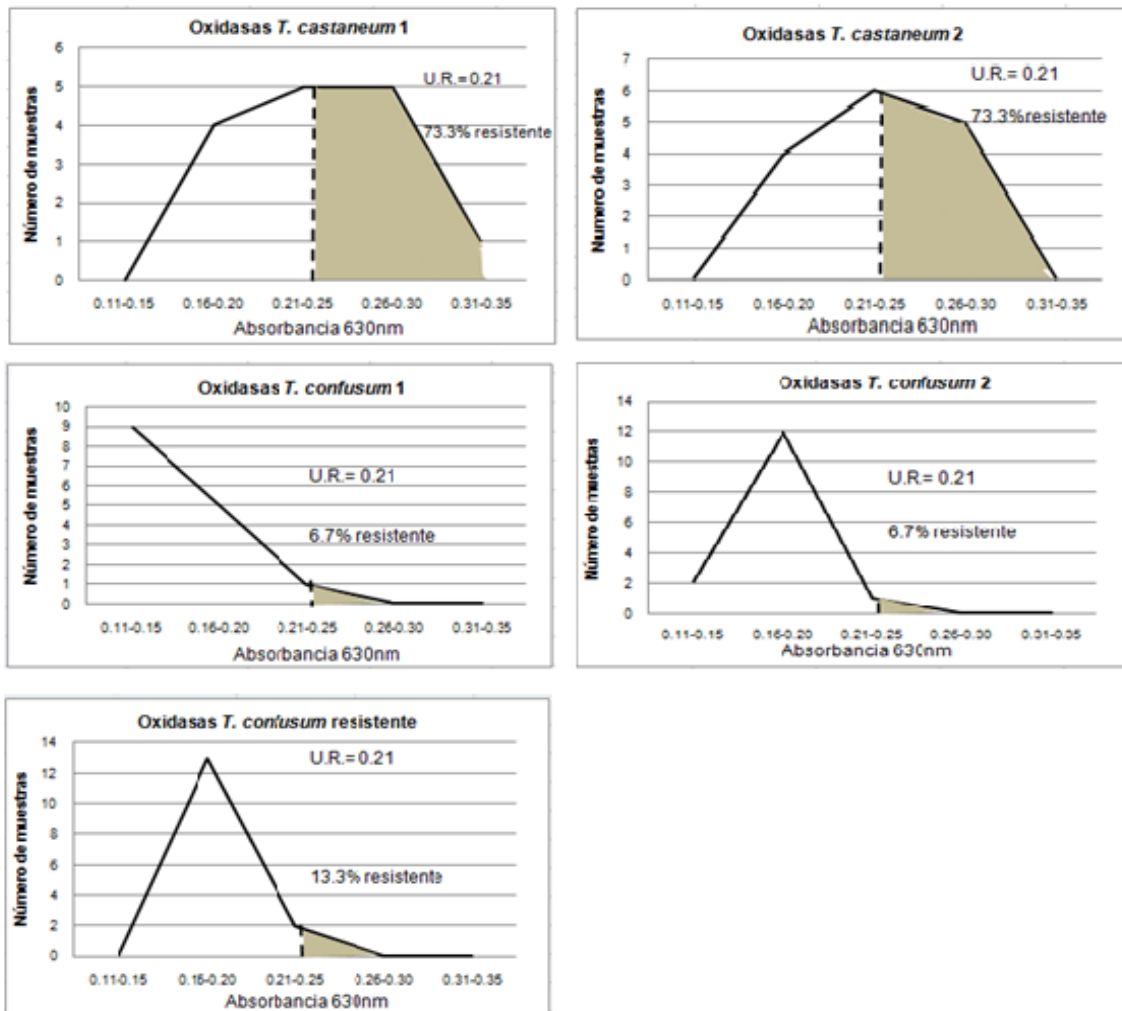
La Figura 4 muestra que el U. R. para las β -esterasas fue de 2.62, Las poblaciones *T. castaneum* 1 (N.L.), *T. confusum* 1(N.L.) y *T. confusum* resistente (Ags.) presentaron el 26.7% de individuos resistentes. Mientras que en la población de *T. castaneum* 2 (Coah.) presentó el 46.7%, y finalmente *T. confusum* 2 (Coah.), fue la población que mostró el mayor porcentaje de individuos resistentes (66.7%).

Figura 5.- Distribución de frecuencia de los niveles de Glutación S-transferasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.



En la Figura 5 se puede observar que el umbral de resistencia para la enzima glutación S-transferasas, fue de 0.38. Las poblaciones *T. castaneum* 1 (N.L.) y *T. castaneum* 2 (Coah.) presentaron el 20% de individuos resistentes por la presencia de esta enzima. En cuanto a *T. confusum* 1 (N.L.), solo el 6.7% de individuos mostró niveles elevados de esta enzima. En tanto la población *T. confusum* 2 (Coah.), mostró 53.3% de individuos resistentes. Con respecto a *T. confusum* resistente (Ags.) muestra un 100% de resistencia.

Figura 6.- Distribución de frecuencia de los niveles de oxidasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.



Como se puede observar en la Figura 6 el umbral de resistencia para la enzima oxidasas es de 0.21, en donde *T. castaneum* 1 (N.L.) y *T. castaneum* 2 (Coah.) presentaron el 73.3% de individuos resistentes, siendo las poblaciones con los niveles mayores de esta enzima. Referente a *T. confusum* 1 (N.L.) y *T. confusum* 2 (Coah.), ambas poblaciones mostraron el 6.7% de individuos con casos de resistencia por la presencia de la enzima. Y finalmente *T. confusum* resistente (Ags.) mostró solo un 13.3% de individuos resistentes en su población.

Niveles enzimáticos por población

Acetilcolinesterasas

Con respecto al los niveles enzimáticos por población, podemos observar (Cuadro 3) que la mayoría de las poblaciones presentaron un elevado nivel enzimático de acetilcolinesterasa, siendo *T. confusum* resistente (Ags.), la población que mostró el menor nivel de esta enzima, sin embargo no se presentaron diferencias significativas en dichas poblaciones.

Cuadro 3.- Niveles de acetilcolinesterasa en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
<i>T. confusum</i> 1	0.0380 A
<i>T. castaneum</i> 1	0.0373 A
<i>T. confusum</i> 2	0.0373 A
<i>T. castaneum</i> 2	0.0340 A
<i>T. confusum</i> resistente	0.0240 B

Acetilcolinesterasa insensible

En el Cuadro 4 podemos observar que la única población que mostró diferencia estadística fue la de *T. confusum* resistente (Ags.) presentando los niveles más altos (0.0360), mientras que las otras cuatro poblaciones fueron del mismo grupo estadístico con valores de 0.0207 a 0.0267.

Cuadro 4.- Niveles de acetilcolinesterasa insensible en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
<i>T. confusum</i> resistente	0.0360 A
<i>T. castaneum</i> 1	0.0267 B
<i>T. castaneum</i> 2	0.0247 B
<i>T. confusum</i> 1	0.0220 B
<i>T. confusum</i> 2	0.0207 B

α -esterasas

En el Cuadro 5 se observa que se formaron cuatro grupos estadísticos, donde el primer grupo corresponde a la población de *T. confusum* resistente (Ags.) quien presentó los niveles más altos, mientras que el segundo grupo lo conforma la población *T. confusum* 2 (Coah.); seguido por *T. confusum* 1 (N.L.) y *T. castaneum* 2 (Coah.). Finalmente la población que presentó los niveles más bajos fue la población de *T. castaneum* 1 (N.L.) que pertenece al grupo cuatro.

Cuadro 5.- Niveles de α -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
<i>T. confusum</i> resistente	1.1653 A
<i>T. confusum</i> 2	0.9727 B
<i>T. confusum</i> 1	0.9340 BC
<i>T. castaneum</i> 2	0.9273 BC
<i>T. castaneum</i> 1	0.8793 C

β - esterassas

En el Cuadro 6 se puede observar que las cinco poblaciones gorgojos mostraron los mismos niveles de β -esterasas, ya que de acuerdo al análisis estadístico, la similitud en los valores obtenidos fue similar, por lo que no hubo diferencia significativa en los tratamientos.

Cuadro 6.- Niveles de β -esterasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
<i>T. castaneum</i> 1	2.4086 A
<i>T. castaneum</i> 2	2.5553 A
<i>T. confusum</i> 1	2.4740 A
<i>T. confusum</i> 2	2.7786 A
<i>T. confusum</i> resistente	2.5333 A

Glutación S- transferasas

Respecto a la enzima GSTs podemos observar (Cuadro 7) que se formaron tres grupos estadísticos, el grupo 1 corresponde a la población *T. confusum* resistente (Ags.), mostrando los niveles más altos para esta enzima, el grupo 2 corresponde a la población *T. confusum* 2 (Coah.). Y finalmente las poblaciones *T. castaneum* 1 (N.L.), *T. castaneum* 2 (Coah.) y *T. confusum* 1 (N.L.) respectivamente presentaron valores similares, siendo de menor importancia para esta enzima.

Cuadro 7.- Niveles de GSTs en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
<i>T. confusum</i> resistente	0.4480 A
<i>T. confusum</i> 2	0.3900 B
<i>T. castaneum</i> 1	0.3533 C
<i>T. castaneum</i> 2	0.3400 C
<i>T. confusum</i> 1	0.3360 C

Oxidasas

En el Cuadro 8 se puede observar que las poblaciones *T. castaneum* 1 y 2 (N.L. y Coah.) fueron las poblaciones que presentaron los niveles más altos, mientras que las poblaciones *T. confusum resistente* (Ags.) y *T. confusum* 2 (Coah.) mostraron valores intermedios; y finalmente *T. confusum* 1 (N.L.) fue la población que presentó los niveles más bajos.

Cuadro 8.- Niveles de oxidasas en cinco poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
<i>T. castaneum</i> 1	0.2460 A
<i>T. castaneum</i> 2	0.2327 A
<i>T. confusum</i> resistente	0.1867 B
<i>T. confusum</i> 2	0.1813 B
<i>T. confusum</i> 1	0.1553 C

Niveles enzimáticos por cada enzima

En el Cuadro 9 podemos observar que la actividad de las seis enzimas es completamente diferencial, ya que al hacer la comparación de medias se formaron cinco grupos estadísticos, siendo las β -esterasas las que presentaron mayor actividad en las cinco poblaciones respecto a las demás enzimas, α -esterasas, GSTs, oxidasas, y acetilcolinesterasas.

Cuadro 9.- Niveles de enzimas presentes en poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

TRATAMIENTO	MEDIA
β -esterasas	2.5500 A
α -esterasas	0.9740 B
GSTs	0.7480 C
Oxidasas	0.2000 D
Acetilcolinesterasas	0.0340 E
Acetilcolinestera insensible	0.0240 E

DISCUSIONES

Para la población *T. confusum* resistente (Ags.) fue la que registró menor contenido de acetilcolinesterasa (Cuadro 3); Al compararlo con el Cuadro 4 (Acetilcolinesterasa insensible) se invierten los resultados, dado que la poca presencia de esta enzima no reacciona con la presencia de naled, alterando los valores de absorbancia.

Para el caso de α -esterasas (véase Cuadro 5) la población que registró mayor contenido fue *T. confusum* resistente (Ags.), tomando en cuenta lo anterior deducimos que la resistencia de dicha población. La producción de acetilcolinesterasa no es un factor que influye en la resistencia antes reportada, pero si se da por la presencia de α -esterasas.

Por otra parte se ha registrado un incremento en la aplicación de piretroides para el control de plagas de granos almacenados (Brown, 1990); en este caso Respecto al Cuadro 6 solo podemos deducir que la presencia de β -esterasas se registra de forma uniforme para las cinco poblaciones, dado que no encontramos diferencia estadística entre los valores de estos. Estos factores enzimáticos están relacionados con la detoxificación para este grupo de insecticidas (Terriere, 1984). Si observamos el Cuadro 9, esta enzima fue la que presentó mayor contenido en comparación con las demás, similarmente a los estudios de Hernández-Bautista (2011) quien reporta este grupo de enzimas como un factor enzimático importante en la resistencia en poblaciones de *Bactericera cockerelli*. A dichas enzimas en algunas especies de insectos se han relacionado un incremento en la actividad con la resistencia a los insecticidas (Soderlund y Bloomquist, 1990) a su vez Devonshire y Moores (1982) señalan que este factor es de mayor importancia, ya que las poblaciones de insectos han sido sometidas a una elevada presión de selección con piretroides.

Tomando en cuenta a las GSTs, una vez más la población *T. confusum* resistente (Ags.), fue la que presentó niveles elevados de esta enzima (ver Cuadro 7), por lo que también se puede atribuir a la producción de GSTs como un mecanismo enzimático de resistencia para la población de *T. confusum* resistente (Ags).

En cuanto a las oxidasas (Cuadro 8) observamos que *T. castaneum* 1 (N.L.) fue la población con mayor contenido de dicha enzima, caso diferente en el Cuadro 5, donde registro menor contenido de α -esterasas. Espinosa *et al.* (2005), reportan que la adición de compuestos enzimáticos como lo son las acetilcolinesterasas, GSTs, y las oxidasas también pueden contribuir a la resistencia frente a diferentes insecticidas, ya que estas enzimas metabolizan dichos compuestos y los hacen menos tóxicos.

CONCLUSIONES

De manera general podemos concluir que las β - esterasas son el mecanismo enzimático implicado en la resistencia en las poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas, seguido de las α -esterasas, GSTs, oxidasas y acetilcolinesterasas.

Para la población de *T. confusum* resistente, dicha resistencia se le atribuye a las enzimas α -esterasas y GSTs.

El contenido de β - esterasas se presenta en una forma muy similar en todas las poblaciones.

LITERATURA CITADA

- Arthur, F.H. 1996. Grain protection: Current Status and Prospects for the Future, *Journal of the Stored Products Research*, 32 (4): 293-302.
- ASERCA. 2009. El manejo de los granos básicos. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. SAGARPA. México, D.F. 37p.
- Banki, L.1978. Bioassay of pesticides in the laboratory. *Research and Quality Control*. Academia Kiadó. Budapest, Hungary. P. 475.
- Barbera, C. 1976. Pesticidas agrícolas. 3ª edición. Edit. Omega. Barcelona, España. Pp. 43-45.
- Beingolea, G. O. 1958. Resistencia de los insectos a los insecticidas, con ejemplos en el Perú. *Rev. Peruana de Entomol. Agric.* 1 (1): 51-58.
- Bielza, P. 2005. La Resistencia a insecticidas: de los mecanismos a las estrategias de manejo. *Phytoma España*. 173: 36-38.
- Bisset, J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. *Rev. Cubana de Medicina Tropical* 54, ISSN 0375-0760 versión online: http://scielo.prueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_serial&pid=0375-0760In.
- Board, P.G. Coggan M, Chelvanayagam G, Eastal S, Jermin LS, Schulte GK. 2000. Identification, characterisation, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol. Chem*; 275:24798-806.
- Borror, J.D., D.M. de Long y Ch. A. Triplehorn. 1976. *An introduction to the study of insects*. Cuarta edición. Editorial Holt, Rinehart and Winston, U.S.A.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for cuantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brattsten, L.B, Holyoke C.V, Leeper J.R. Raffa K.F. 1986. Insectide resistance: Challenge to pest management and basic research. *Science* 12:1255-60.
- 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.
- Brogdon, W.G. 1984. Mosquito protein microassay-I, protein determination for small potions of single mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 457-460.
- 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. and C.M. Dickinson. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in highpressure liquid chromatography eluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.
- Brown, A.W.A. 1959. Inheritance of insecticide resistance and tolerances. *Symp. research progress on insect resistance. Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.* Washington D.C. 20-26.
- Brown. T.M.; Brogdon, W. G. 1987.Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 145-162.

- Brown, T.M. 1990. Biochemical and genetic mechanisms of insecticide resistance. In management resistance to agrochemicals (eds. M B. Green. H.M. Lebaron and W. K. Mobereg). Pp. 61-76 Amer. Chem. Soc. Washintong. DC.
- Busvine, J.R. 1971. A Critical Review of the techniques for testing insecticides, C.A.B.pp. 126-128.
- Campbell, P. M.; Newcomb, R. D.; Rusell, R. J; Oakeshott, J. G. 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorous insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 139-150.
- Carillo, R.H. 1984. Análisis de acción conjunta de insecticidas en larvas de gusano cogollero del maíz (J.E. Smith) (Lepidóptera: noctuidae) Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Chapingo México. P. 82.
- Casida, J.E. 1970 Mixed function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. Journal of Agricultural Food Chemistry 18:753-772.
- Chiang, F. M.; Sun, C. N. 1993. Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorous insecticides. Pestic. Biochem. Physiol. 45: 7-14.
- Clark, A. G.; Shamaan, N. A. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. Pestic. Biochem. Physiol. 22: 249-261 (1984).
- Claudianos, C.; Crone, E.; Coppin, C.; Russell, R.; Oakeshott, J. 2002. A genomics perspective on mutant aliesterases and metabolic resistance to organophosphates. En: Agrochemical resistance: Extent, mechanism and

- detection. Marshall Clark, J.; Yamaguchi, I. (eds.). American Chemical Society, Washington.
- Cotton, T.R. 1979. Silos y graneros: Plagas y desinsectación. Oikos-Taw. Edición Vilassar De Mar- Barcelona, España. 328p.
- Daborn, P. J. A single P450 allele associated with insecticide resistance in global populations of *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256 (2002).
- Dauterman, W.C. 1983. Role of Hydrolases and Gluthathione S- transferases in Insecticide Resistance en Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest resistance to pesticides*. Plenum Press. New York, pp.229-247.
- De los Mozos P.M. 1997. Plagas de los productos almacenados. Centro de Investigación Agraria de Albaladejito. Cuenca España. 17p.
- Devonshire, A. L. 1977. The properties of a carboxylesterase from the peach potato Aphid *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.* 167: 675-683.
- Devonshire, A. L.; Moores, G. D. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 235- 246.
- FAO.1985. Manual of pest control for food security reserve grain stocks. FAO. Plan production and protection paper n° 63 Rome (Italy).200 pp.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 507-533.

- Feyereisen, R. 2005. Insect cytochrome P450. En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol.4: 1-77.
- Fields, P; W. Muir. 1996. Physical control. In: Subramanyam, B y D. Hagstrum (Eds). Integrated management of insects in stored products. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. Pp. 195-222.
- Fournier, D.; Karch, F.; Bride, J. M.; Hall, L. M. C.; Bergb, J. B.; Spierer, P. 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. J. Mol. Biol. 210:15-22.
- Gallo, D., O. Nakano, S.S. Neto, R.L.P. Carvalho, G.C. Baptista, E.B. Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, L.C. Marchini J.R.S. López y C. Omoto. 2002. Entomologia Agrícola. Fundação de Estudios Agrarios Luiz de Queiroz- FEALQ. Piracicaba, Brasil. Pp. 815- 912.
- Geoghiou, G.P. 1980. Insecticides Resistance and Prospects for its management. Residue Reviews, Vol. 76 pp.136.
- Geoghiu, G.P. and Lagunes, V. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in athropodos. FAO. Roma. 317p.
- Georghiou, G.P. and R.B. Mellon. 1983. Pesticides resistance in time and space. 46p.
- Georghiou, G.P. and Taylor C.E. 1986. Factors influencing the evolution of resistance, pp. 157-169. Pesticide resistance, strategies and tactics for management. Nacional Research Council, Board of Agriculture. Eds. National Academic Press. Washintong D.C.
- Georgiou, G. P. y A. Lagunas-Tejada. 1991. The occurrence of resistance to pesticidas in arthropods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome Italy p. 318.

- Grant, D. F.; Matsumura, F. 1988. Glutathione S-transferase-1 in *Aedes aegypti* larvae. purification and properties. *Insect Biochem.* 18: 615-622.
- Gunning, S., G. Herron, N. Gough, T. Wellham, J. Rophail and R. Parker. 1995. Relationship between insecticide-acaricide resistance and field control in *Tetranychis urticae* infesting roses. *J. Econ. Entomol.* 88 (5):1106-1112.
- Gutiérrez, Díaz L.J. 1999. Insectos asociados a granos y productos almacenados. In: *Catálogo de insectos y ácaros plaga de los cultivos agrícolas de México.* Sociedad Mexicana de Entomología. Publicaciones Especiales Numero 1. México. Pp. 107-124.
- Halstead, D.G.H. 1969. A new species of *Tribolium* from North America previously confused with *Tribolium madens* (Charp.). (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal stored prod. Res.* 2 (4) 273-313.
- Hamma, H. 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitive of acetylcholinesterase. pp 229-331. In *pest resistance to pesticides.* G.P. Georgiou y T. Saito, eds. New York Plenum.
- Hemingway, J.; Miyamoto, J.; Herat, P. R. J. 1991. A possible novel link between organophosphorous and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pest. Biochem. Physiol.* 39: 49-56.
- Hemingway, J.; Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 371-391.
- 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.

Hernández, B. O. 2011. Determinación de enzimas de resistencia en poblaciones de *Bactericera cockerelli* (Sulc) procedentes de la zona papera de Coahuila y Nuevo León. Tesis de licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila. 63 pp.

Herrera, A. J. 1963. Resistencia de ciertas plagas del algodón a los insecticidas orgánicos en el valle de cañete. Rev. Peruana de Entomol. Agríc 1 (1): 47-51.

Hosking, W.M. y H.T. Gordon. 1956. Arthropoda Resistance to Chemical. Ann. Rev. Ent. 1,89-122.

IRAC (Insecticide Resistance Action Comitte). <http://www.iraconline.org/resources/guide.asp>. Fecha de acceso 3 febrero 2011 (2011).

Klimmer, O.R. 1967. Plaguicidas, lexicología, sintomatología y terapia. Oikos-Taw S.A. Ediciones Barcelona, España. 162p.

Lagunes, A., C. Rodríguez H. 1989. Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. CONACYT. Colegio de Postgraduados. México. 150 p.

Lagunes, T. A. y Villanueva J. A. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco México. Pp. 152,157-175.

Levinson, H.Z. and Levinson, A.R. 1994. Origin of grain storage and insects species consuming desiccated food. Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz, 67: 47-59.

Lindblad, C. y L. Druben. 1979. Almacenamiento del grano: Manejo, secado, silos, control de insectos y roedores. Editorial Concepto. México, D.F. 331p.

- Lindsey, P. J., S. S. Briggs, a. a. Kader y K. Moulton. 1989. Methyl Bromide on dried fruits and nuts: Issues and alternatives. En chemical use in food processing and postharvest handling: Issues and alternatives. Agricultural Issues Center. University of California. Davis. Pp. 41-50.
- Mallis, A. 1990. Handbook of pest control, Franzals & Foster. Co. 1, 152p.
- Mejía. O.R. 2003. Estudio de efectividad biológica de insecticidas en las siguientes plagas de granos almacenados: *Sitophilus granarius* (L), *Prostephanus truncatus* (Horn) y *Tribolium confusum* (Duval). Tesis de Licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila. 68p. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Metcalf, C.L. y W. P. Flint. 1979. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control. Editorial Continental S.A. Cuarta edición. México, D.F. 1208 p.
- Miller, T.A. 1988. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticide. Parasitology Today. 4: 8-12.
- Mitchell, F. Gordon y Adel A. Kader. 1992. Postharvest treatments for insect control. En: Postharvest technology of horticultural crops. Editado por A. A. Kader. University of California. Pp. 161-165.
- Monge, L.A. 1986. Manejo racional de insecticidas, resistencia y rotación. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. p.74
- Moorefield, H.H. 1959. Insect resistance to the carbamate insecticides. Symp. Research Progression Insect Resistance. Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer. Washintong. D.C. 141-152.

- Narváez, Z. 2003. Entomofauna Agrícola Venezolana. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía departamento de Zoología Agrícola. Fundación Polar. Maracay, Venezuela. 191 p. En [http:// www.plagas-agricolas.info.ve/doc/pdf/entomofaunaven.pdf](http://www.plagas-agricolas.info.ve/doc/pdf/entomofaunaven.pdf) [acceso: 11-02-2011].
- Oakeshott, J. G.; Claudianos, C.; Campbell, P. M.; Newcomb, R. D.; Rusell, R. J. 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier. Ltd. Oxford. Vol. 5: 309-381.
- OIRSA.1999. Hoja de datos sobre plagas y enfermedades de productos almacenados de importancia cuarentenaria y/o económica para los países miembros de OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. OIRSA. El Salvador, Centro América. 171p.
- OMS.1980. Resistencia de insectos vectores de enfermedades a los plaguicidas. 5to informe. No. Pp. 44-57.
- Oppenoorth, F. J.; Van der Pas, L. J. T.; Houx, N. W. H.1979.Glutathione Stransferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 11: 176-188.
- Patil, N.S., K.S. Lole and D. N. Deobagkar. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticides in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Med. Vet. Entomol. 10: 277-282.
- Plapp, F. W. Jr. 1976. Biochemical genetics of Insecticide Resistance. Ann Rev. Entomol. 31:179-197.
- Ramírez G., M. 1982. Almacenamiento y Conservación de granos y semillas. Editorial CECSA. México, D.F. 300p.

- Ranson, H.; Hemingway, J. 2005. Glutathione Transferases. En: Comprehensive Molecular Insect Science. Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. (eds.). Elsevier Ltd. Oxford. Vol 5: 383-402.
- Reynolds, H.T. 1962. Standardized Laboratory Detection Methods for Resistance Detection in Agricultural Arthropods Pests. Bull. Entomol. Soc. Amer. 8:9-14.
- Riskallah, M. R. 1983. Esterases and resistance to synthetic pyrethroids in Egyptian cotton leafworm. Pestic. Biochem. Physiol. 19: 184-189.
- Rodríguez, M. M., J. A. Bisset, D. Molina, C. Díaz, y L. A. Soca. 2001. Adaptación de los métodos en placas de micro-titulación para la cuantificación de la actividad de esterases y glutatión S-transferasas en *Aedes aegypti*. Rev. Cub. Med. Trop. 53 (1): 32-36.
- Scott, J. G.; Wen, Z. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. Pest Manag. Sci. 57: 958-967.
- Silva, G. 2003. Resistencia a los insecticidas En: Silva G y R Hepp. (Eds) Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción, Fundación para la Innovación Agraria. Pp. 237-260.
- Sogorb, M.A. Vilanova. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorous, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicol. Lett. 128: 215-228.
- Sotolongo, M. G. Vidal A. N. 1988. Metabolismo y excreción de los compuestos extraños en: Elementos de Toxicología. La Habana: Editorial Pueblo y Educación. Pp. 11-12.

- Terriere C. L. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. Ann Rev. Entomol. 29:71-8
- Torres, Z.R. 1993. Suceptibilidad de *Culex pipens quinquefasciatus* Say (Diptera: culicidae) a larvicidas organofosforados y efecto de dosis subletales sobre el potencial reproductivo. Tesis de Maestria. UANL. Monterrey, Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Vargas, R. 1996. Resistencia a pesticidas de plagas agrícolas. Tierra Adentro N°. 8. Mayo-Junio. Pp. 50-52.
- Vontas, J. G.; Small, G. J.; Hemingway, J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. Biochem. J. 357: 65-72.

A P E N D I C E

Cuadro 10. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa en 5 poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>T. castaneum</i> 1	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04
<i>T. castaneum</i> 2	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03
<i>T. confusum</i> 1	0.05	0.07	0.04	0.04	0.02	0.03	0.04	0.05	0.02	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04
<i>T. confusum</i> 2	0.04	0.02	0.03	0.02	0.02	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.05	0.05	0.05
<i>T. confusum</i> resistente	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01

Cuadro 11. Valores promedio de absorbancia de acetilcolinesterasa insensible en 5 poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>T. castaneum</i> 1	0.04	0.03	0.02	0.01	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
<i>T. castaneum</i> 2	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03	0.04	0.03
<i>T. confusum</i> 1	0.01	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01
<i>T. confusum</i> 2	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03
<i>T. confusum</i> resistente	0.02	0.06	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.05	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.02	0.02

Cuadro 12. Valores promedio de absorbancia de α -esterasas insensible en 5 poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>T. castaneum</i> 1	0.96	0.84	0.80	0.92	0.83	0.79	0.96	0.80	0.93	0.86	0.88	0.78	0.96	0.94	0.94
<i>T. castaneum</i> 2	0.90	1.05	0.88	0.98	0.96	0.80	0.98	0.75	0.88	0.99	0.94	0.94	1.00	0.98	0.88
<i>T. confusum</i> 1	0.94	0.82	0.77	0.98	1.23	1.00	1.02	1.04	0.81	0.86	0.81	0.83	1.11	0.94	0.85
<i>T. confusum</i> 2	1.04	0.88	1.01	1.03	0.97	1.06	1.12	1.05	0.78	0.94	0.97	0.89	0.91	0.97	0.97
<i>T. confusum</i> resistente	1.08	1.09	1.32	1.06	1.47	1.12	1.09	1.11	1.11	1.21	1.17	1.13	1.13	1.26	1.13

Cuadro 13. Valores promedio de absorbancia de β -esterasas en 5 poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>T. castaneum</i> 1	1.67	1.93	2.83	3.23	2.47	2.57	2.62	2.64	2.61	2.15	2.64	2.14	2.21	1.99	2.43
<i>T. castaneum</i> 2	2.30	2.23	2.53	3.25	2.19	2.75	2.65	2.63	2.82	2.67	3.00	2.27	2.31	2.55	2.18
<i>T. confusum</i> 1	2.29	2.08	2.17	3.30	2.88	2.48	2.68	2.43	1.83	2.38	2.68	2.36	2.56	2.54	2.45
<i>T. confusum</i> 2	2.43	2.73	2.82	3.51	2.92	3.10	3.03	2.63	2.38	2.88	2.42	2.63	2.58	3.08	2.54
<i>T. confusum</i> resistente	2.22	2.45	2.16	3.56	2.46	2.84	3.05	2.45	2.18	2.59	2.61	2.16	2.02	2.36	2.89

Cuadro 14. Valores promedio de absorbancia de Glutación S-transferasas en 5 poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>T. castaneum</i> 1	0.37	0.38	0.32	0.33	0.37	0.41	0.38	0.36	0.36	0.34	0.33	0.31	0.36	0.34	0.34
<i>T. castaneum</i> 2	0.30	0.38	0.34	0.29	0.32	0.31	0.34	0.30	0.35	0.35	0.35	0.35	0.38	0.36	0.38
<i>T. confusum</i> 1	0.33	0.34	0.34	0.35	0.36	0.33	0.34	0.29	0.32	0.34	0.30	0.35	0.32	0.35	0.38
<i>T. confusum</i> 2	0.33	0.36	0.36	0.34	0.41	0.38	0.34	0.33	0.36	0.45	0.41	0.41	0.47	0.46	0.44
<i>T. confusum</i> resistente	0.45	0.46	0.47	0.47	0.45	0.43	0.42	0.44	0.45	0.45	0.43	0.45	0.47	0.45	0.43

Cuadro 15. Valores promedio de absorbancia de oxidasas en 5 poblaciones del complejo del gorgojo de las harinas *T. castaneum* Herbst y *T. confusum* Duval.

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>T. castaneum</i> 1	0.31	0.28	0.28	0.23	0.27	0.27	0.24	0.20	0.24	0.23	0.20	0.20	0.29	0.25	0.20
<i>T. castaneum</i> 2	0.21	0.28	0.22	0.17	0.21	0.27	0.23	0.20	0.20	0.26	0.24	0.20	0.30	0.29	0.21
<i>T. confusum</i> 1	0.17	0.14	0.15	0.15	0.19	0.17	0.15	0.15	0.16	0.15	0.15	0.16	0.22	0.11	0.11
<i>T. confusum</i> 2	0.14	0.20	0.17	0.15	0.16	0.20	0.18	0.17	0.18	0.20	0.18	0.19	0.19	0.20	0.21
<i>T. confusum</i> resistente	0.18	0.19	0.18	0.17	0.20	0.18	0.22	0.19	0.19	0.17	0.17	0.19	0.21	0.19	0.17

