

DETERMINACIÓN DE ENZIMAS DE RESISTENCIA EN *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

SANTIAGO PÉREZ OCAMPO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

AGOSTO DE 2012

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIRECCION DE POSTGRADO

DETERMINACIÓN DE ENZIMAS DE RESISTENCIA EN *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

TESIS

POR

SANTIAGO PEREZ OCAMPO

Elaborado bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito parcial para optar el grado de

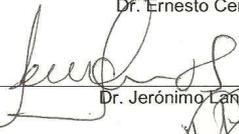
**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal


Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor


Dr. Jerónimo Landeros Flores

Asesor


Dr. Mariano Flores Dávila


Dr. Fernando Ruiz Zarate

Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila; Agosto de 2012

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Balbina Ocampo López

Teodoro Pérez Barranco

Gracias por el apoyo, consejos y guía durante todos estos años.

A mis hermanos

Que me dieron su total confianza y apoyo, sus consejos estarán siempre presentes.

A todos mis amigos quienes aprecio mucho, su amistad la llevare conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez, por su amistad, enseñanzas y consejos, por ser mi maestro y aun mas mi amigo.

Al Dr. Jerónimo Landeros Flores, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Mariano Flores Dávila, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

COMPENDIO**DETERMINACIÓN DE ENZIMAS DE RESISTENCIA EN *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)****POR****SANTIAGO PÉREZ OCAMPO****MAESTRIA****PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA****BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNIO 2011****Dr. Ernesto Cerna Chávez – Asesor –****Palabras clave: gorgojo castaño de la harina, esterasas, oxidasas, glutatión s-transferasas, acetilcolinesterasa, pruebas bioquímicas.**

El presente trabajo se realizó en la Universidad autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. En el laboratorio de toxicología del departamento de Parasitología Agrícola, durante el periodo de Enero del año 2008 a diciembre del año 2009, donde 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.

Teniendo como objetivo determinar a través de varios métodos de diagnóstico la susceptibilidad y los mecanismos de resistencia de *Tribolium castaneum* provenientes de harineras.

Se recolectaron gorgojos en harineras del estado de Saltillo, Aguascalientes y Nuevo León, México. El material recolectado se traslado al laboratorio de toxicología de la Universidad, para determinar el nivel de resistencia, los mecanismos enzimáticos de resistencia presentes.

El primer método utilizado para determinar la susceptibilidad y los mecanismos presentes fueron los bioensayos, por medio de la técnica de película residual, evaluando las poblaciones de *T. castaneum* contra los insecticidas malation, bifentrina, endosulfan, cipermetrina.

El segundo método utilizado fue a base de una serie de pruebas bioquímicas (ensayos en microplacas), los métodos en microplacas se tuvieron que adaptar a partir de los métodos ya descritos para mosquitos (Brogdon et al., 1983, 1984, 1988, 1990 y 1997), para poder determinar los niveles de α -esterasas, β -esterasas, oxidasas, glutatión s-transferasas y acetilcolinesterasa en *T. castaneum*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas muestran una proporción de Resistencia entre la línea de campo de Aguascalientes y la susceptible, con valores de 20 %, 6.6 %, 33.3 %, 53 %, 20 %, 40 %, para acetil colinesterasa, acetil colinesterasa insensible, beta esterasas, alfa esterasas, glutatión s-transferasas y oxidasas, respectivamente.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ENZYMES OF RESISTANCE IN *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).

BY

SANTIAGO PEREZ OCAMPO

MASTER OF SCIENCE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRRO

Dr. Ernesto Cerna Chávez – Advisor –

Key words: red flour beetle, esterases, oxidases, glutathion s-transferases, acetyl-cholinesterase, biochemical assays.

This research work was carried out at “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro” in Saltillo, State of Coahuila, Mexico, in the agricultural Parasitology Department, from January 2008 to December 2009.

The purpose of this work was to determinate by means several diagnosis methods, the susceptibility and biochemical resistance mechanism; as well as the intraspecific variability of *T. castaneum* obtained of flour.

Flour beetles were collected on Saltillo, Nuevo Leon and Aguascalientes. Flour beetles were transfer to laboratory of toxicology of Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro to determinate the level of resistance and enzymatic mechanisms of resistance.

The first method was to determinate the susceptibility and present mechanism was bioassay, by means of the residual film technique, evaluating populations of *T. castaneum* against insecticides malathion, bifentrine endosulfan and cipermetrine.

The second method used was based on a series of biochemical tests (microplate assay), microplate methods had to be adapted from the methods already described for mosquitoes (Brogdon et al, 1983, 1984, 1988, 1990 and 1997), to determinate the levels of α -esterase, β -esterase, oxidase, glutathione s-transferase and acetyl cholinesterase.

INDICE DE CONTENIDO

Contenido

COMPENDIO	iv
ABSTRACT	vi
INDICE DE CONTENIDO	vii
ARTICULO CIENTIFICO	viii
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN	x
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Plagas de granos almacenados	3
<i>Tribolium castaneum</i>	5
Origen y distribución	5
Ubicación taxonómica	6
Importancia económica.....	6
Descripción morfológica y Biología	7
Alternativas de control.....	9
Control cultural	9
Control físico.....	10
Control biológico.....	12
Control químico.....	13
Resistencia	15
Clasificación	15
Determinación de resistencia	17
Bioensayos	17
Métodos bioquímicos.....	17
Resumen	29
Abstract	30
Introducción.....	31

Materiales y Métodos	33
DISCUSIONES	54
CONCLUSIONES.....	57
LITERATURA CITADA	58

ARTICULO CIENTIFICO

Cuantificación de enzimas de resistencia en diferentes poblaciones de *Tribolium castaneum*

(Herbst) (Coleóptera: Tenebrionidae)

.....28

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pagina
1.1	CL50, CL95 y limites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de <i>T. castaneum</i> provenientes de Aguascalientes (A1) a 24 hrs de exposición.	24
1.2	CL50, CL95 y limites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de <i>T. castaneum</i> provenientes de Nuevo Leon (NL1) a 24 hrs de exposición.	24
1.3	CL50, CL95 y limites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de <i>T. castaneum</i> provenientes de Coahuila (C1) a 24 hrs de exposición.	25
1.4	CL50, CL95 y limites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de <i>T. castaneum</i> provenientes de Coahuila (C1) a 24 hrs de exposición.	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de diferentes poblaciones de <i>Tribolium castaneum</i> a 24 hrs de exposición de malation.	26
2	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de diferentes poblaciones de <i>Tribolium castaneum</i> a 24 hrs de exposición de endosulfan.	26
3	Líneas de respuesta dosis-mortalidad de diferentes poblaciones de <i>Tribolium castaneum</i> a 24 hrs de exposición de clorpirifos.	27
4	Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de de la población del Estado de Aguascalientes (A1) de <i>Tribolium castaneum</i> Herbst.	50
5	Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Nuevo León (NL1) de <i>Tribolium castaneum</i> Herbst.	51
6	Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Coahuila (C1) de <i>Tribolium castaneum</i> Herbst.	52
7	Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Coahuila (C2) de <i>Tribolium castaneum</i> Herbst.	53

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 (Silva *et al.*, 2005).

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 que han conseguido una mayor adaptación a las condiciones del almacén y que causan daños más cuantiosos se hallan los artrópodos, especialmente los insectos y algunas especies de ácaros.

En México Gutiérrez-Díaz (1999), enlista 55 especies de insectos asociados con granos y productos almacenados mencionando sus hospederos y distribución. Entre los más frecuentes en nuestro país, se hallan los curculiónidos del género *Sitophilus* que causan importantes pérdidas en granos almacenados considerándolos plagas de interés primario, seguido de las especies de *Tribolium* (Tenebrionidae), que 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 técnicas muy sencillas como son exponer los granos al calor del sol, limpieza de almacenes, uso de atmosferas controladas hasta el uso de insecticidas sintéticos, lo cual contribuye sin duda a la conservación del producto en almacenamiento, pero 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, puesto que es un problema que tiene tanta importancia con el mismo control que se hace de las plagas mediante insecticidas para la conservación de productos almacenados en general, y así la información resultante ayude a tomar mejores decisiones en los programas de control.

La resistencia en los insectos plaga, se viene incrementando debido al uso indiscriminado e inadecuado de los compuestos químicos empleados para su control; por lo tanto es necesario estudiar los niveles de las enzimas detoxificantes involucradas en el fenómeno, para que la información generada contribuya a una mejor toma de decisiones en los programas de manejo integrado de plagas y rotación de plaguicidas, por lo que el objetivo de este trabajo es estimar el contenido de enzimas detoxificantes relacionadas con la resistencia a insecticidas en 5 poblaciones de *Tribolium castaneum*, las cuales proceden de distintos lugares geográficos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Plagas de granos almacenados

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). Dichas plagas pueden ser roedores, insectos, hongos y bacterias que destruyen los granos, derivando así que después de la cosecha, sean el principal problema que enfrenta el agricultor al elevar sus pérdidas en la producción (White, 1995).

A nivel mundial los insectos que infestan productos almacenados se encuentran agrupados en 227 especies, 66 de las cuales han registrado su presencia en México, causando pérdidas entre el 15 y 25 % dependiendo de la región (Nájera, 1991). Dichos insectos infestan al grano porque les proporciona el alimento, aunque existen especies que pueden alimentarse de otros materiales (Lindbland y Druben, 1979). De aquí su diferenciación, las plagas primarias son aquellas capaces de perforar la testa de las semillas y por tanto atacar granos intactos (Dell'orto y Arias 1985). Donde se 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* (Gallo *et al.*, 2002).

Las plagas secundarias de almacén, se encuentran en esta clasificación en base al daño que ocasionan, son aquellas que atacan granos partidos o que previamente han sido dañados por las plagas primarias y se multiplican con facilidad en los productos obtenidos de la molienda de granos, una de ellas es *Tribolium castaneum* (Dell'orto y Arias 1985), otros ejemplos típicos son *T. confusum* y *Oryzaephilus surinamensis* (Gallo *et al.*, 2002).

En México Gutiérrez (1999) registra 55 especies de insectos asociados con granos y productos almacenados mencionando sus hospederos y distribución en el país. De los cuales Gutiérrez y Jiménez (1989), mencionan que las especies de *Sitophilus zeamais* y *T. castaneum*, son las plagas de mayor importancia en granos y productos almacenados.

Tribolium castaneum

Origen y distribución

El gorgojo castaño de las harinas es de origen Indo-Australiano, fue conocido fue clasificado y descrito en 1797 mucho antes que el *T. confusum*, esta especie se encuentra distribuida en todo el mundo (Mallis, 1990). Es una especie cosmopolita, se desarrolla en climas templados y mediterráneos aunque es dominante en climas cálidos, siendo los fríos los menos favorables, Se trata de una de las especies que se encuentran con mayor frecuencia en los productos almacenados; Ataca virtualmente cualquier tipo de producto seco de origen animal o vegetal, siendo especialmente importante como plaga de cereales y granos (Rees, 2004)

La diferencia más significativa entre el gorgojo confuso, radica en las formas de las antenas, los segmentos de las antenas del *T. confusum* aumenta de tamaño gradualmente desde la base de la antena hasta el extremo terminal, en tanto que en el *T. castaneum*, los últimos tres segmentos en el extremo de las antenas son de pronto mucho mas grande que los segmentos que los anteriores (Arias, 1981)

Ubicación taxonómica

Borror *et al.* (2005), ubica taxonómicamente a *T. Castaneum* de la siguiente manera:

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 plaga secundaria de los cereales ya que es incapaz de dañar el grano sano, limpio y seco; tanto el adulto como las larvas se alimentan solo de cereales partidos o dañados (Gutiérrez y Güemes, 1991). 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). *T. castaneum* se considera como la especie plaga más importante de harina almacenada, varios autores mencionan que la presencia de dos larvas de esta plaga por kg. De harina representan pérdidas del 18% (Bennet *et al.*, 1996).

Descripción morfológica y Biología

Huevo: los huevecillos son depositados aisladamente y libres en la harina donde se incuban en un periodo de 5 a 12 días; son húmedos y pegajosos recién ovipositados, de tal manera que le permite cubrirse por pequeñas partículas de harina, los huevecillos son pequeños, delgados, cilíndricos, redondeados de ambos extremos y de un color blanquecino; esta circunstancia dificulta considerablemente su localización (Metcalf y Flint, 1979); Una sola hembra deposita alrededor de más o menos 450 huevecillos en periodo de incubación varia de 5 a 12 días; Se ha observado que la temperatura favorable para su desarrollo es de 27 °c. (Ramírez, 1966).

Larva: Se alimentan en granos perforados y polvo de los cereales, miden aproximadamente de 4 mm. de longitud, son delgadas, cilíndricas de color blanco ligeramente con tintes amarillos, su cabeza obscura y en extremo posterior soportan dos apéndices delgados y agudos (Ramayo, 1983); alcanzando su completo desarrollo en 1 a 4 meses dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de alimento (Metcalf y Flint, 1979).

Pupa: Ramírez (1966) señala que el estado de pupa tiene lugar sobre la superficie del alimento, al principio es blanca y gradualmente se convierte en amarilla, en la superficie dorsal presenta una serie de pelos como en el caso de las larvas. El estado de pupa dura de 6 a 9 días, pero en invierno puede prolongarse por más tiempo, una generación completa tarda de tres a cuatro meses, cuando la temperatura es elevada (Metcalf y Flint, 1979).

Adulto: presentan una coloración marrón rojiza y mide entre 2.6 y 4.4 mm posee los últimos tres segmentos antenales de mayor tamaño que los anteriores; Ventralmente la distancia entre ambos ojos es relativamente estrecha y puede observarse un proceso en forma de hacha entre el primer par de patas; Dorsalmente el tórax presenta pequeños hoyos en la región central del pronoto (Rees, 2004). 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).

Estos 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).

Alternativas de control

Atraves del tiempo, el hombre ha aprendido a establecer una lucha competitiva con los insectos por la defensa del alimento de manera que ha desarrollado diferentes métodos de control que incluye medidas físicas, químicas, y biológicas (Gutiérrez y Güemes, 1991). 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. (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 (Metcalf y Flint, 1979).

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, 1966).

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. En el 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 (aparición, sabor, color, valor nutritivo, etc.) Las dosis efectivas están entre 45 y 60 kilorads, 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).

Control biológico

Brower *et al.* (1996) Mencionan que el uso del control biológico en granos almacenados presenta muchas ventajas, la liberación de los enemigos naturales en ambientes confinados, los agentes controladores sobreviven hasta las últimas etapas del almacenamiento, no son dañinas como pueden llegar a serlo los residuos de plaguicidas, no se conoce resistencia por parte del insecto plaga (huésped) y no ponen en peligro a los operadores que realizan la aplicación (liberación en este caso).

Ramírez *et al.* (1993) ha reportado que en México existen tres especies de depredadores de plagas de granos almacenados: *Cephalonomia tarsalis*, *Teretriosoma nigrescens* y *Xolocoris flavipes*. Un ejemplo exitoso de control biológico de los granos almacenados es el de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidóptera: Pyralidae) por la aplicación de *Bacillus thuringiensis*, esta bacteria actúa ocasionando una reducción de las infestaciones en más de un 80% (Mc Gaughey, 1985).

Control químico

En los casos de los granos destinados a la alimentación, existen severas restricciones al uso de pesticidas impuestas por las normas de bioseguridad, además de las limitaciones toxicológicas y ambientales (Akbar *et al.*, 2004). 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 (Klimmer, 1967).

Ramírez (1966) menciona que las principales ventajas de los fumigantes, es su penetración, ya que estos materiales se introducen en todas partes del espacio disponible que ejerce una acción toxica en forma de gas, ya que 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).

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).

La constante exposición a los tratamientos químicos, ha inducido al desarrollo de resistencia de esta especie a diferentes grupos de insecticidas. (Akbar *et al.*, 2004). Las primeras aplicaciones de insecticidas modernos fueron tan exitosas, posteriormente trajeron 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).

Resistencia

Se define como el desarrollo de la capacidad de tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos de una población de la misma especie (FAO, 1957). Resultado de la selección intensiva, por lo que el insecto adquiere la aptitud de sobrevivir en un ambiente contaminado (Metcalf, 1989), por otra parte 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.

Clasificación

Resistencia por comportamiento.- Se presenta en especies muy hiperactivas, un indicador es la preferencia para descansar en áreas no tratadas, o bien la tendencia de detectar el insecticida y tratar de evitarlo (Carrillo, 1984).

Resistencia morfológica.- mecanismo físico dado por la formación de estructuras cuticulares, no permiten que el tóxico penetre la cutícula del insecto, la velocidad de penetración dependerá de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del integumento del insecto, la cual varía considerablemente entre los estadios de vida (Barbera, 1989).

Resistencia fisiológica.- Esta puede ser de dos formas: No metabólico, por la insensibilidad en el sitio de acción, resistencia al derribo, Acetilcolinesterasa Insensible, penetración reducida, mayor almacenamiento y Excreción (Vais *et al.*, 1997). Resistencia metabólica, por la adición de sistemas enzimáticos, donde los insecticidas son metabolizados y transformados en productos menos tóxicos.

Las enzimas responsables para la detoxificación en los organismos son transcritas por Esterasas, Oxidasas y Glutación S-Transferasas (GST) (Flores *et al.*, 2001), el mecanismo de resistencia más común en insectos es provocado por la actividad de esterasas detoxificativas que metabolizan (hidrolizan enlaces éster) un amplio rango de insecticidas comprendidas en familias proteicas pertenecientes a las α y β hidrolasas (Cygler *et al.*, 1993).

En insectos resistentes se muestra una sobre-expresión de los niveles de oxidasas, los mecanismos de sobreproducción de oxidasas parecen ser resultado de factores cis- y trans- (Liu y Scott, 1997). La mayoría de los organismos poseen múltiples Glutación S-Transferasas, las GST implicadas en la resistencia al DDT están presentes como grupos de genes que han sido mezclados a través del genoma por recombinación (Zhou *et al.*, 1997).

Determinación de resistencia

Como consecuencia, la resistencia profiere cambios genéticos alterando procesos bioquímicos a nivel individual, se hace notable en una población cuando la proporción de resistencia sea tal, que se refleje en una falla en el control (Devonshire, 1990), convencionalmente se puede detectar la resistencia mediante:

Bioensayos

Conocidos también como pruebas de susceptibilidad, son técnicas de laboratorio basado en la dosis-mortalidad (Lagunes y Villanueva, 1994), donde se pretende por medio de un proceso experimental conocer la efectividad biológica del pesticida, determinando la magnitud del estímulo mediante la respuesta del insecto, generalmente involucran comparaciones de la DL_{50} , DL_{90} o de la concentración letal (Twine y Reynolds, 1980).

Métodos bioquímicos

Técnicas sensitivas y precisas que proporcionan información de los mecanismos involucrados, pudiendo ser adaptados para detectar y monitorear la resistencia de muchas especies (Brown y Brogdon, 1987); generalmente correlacionan niveles de una enzima o una reacción enzimática específica, pueden ser cualitativos o cuantitativos, generalista o altamente específicos (Lagunes y Villanueva, 1994).

Electroforesis.- separa moléculas en dependencia fundamental de su carga, desplazando proteínas bajo influencia de un campo eléctrico, se emplean geles de acrilamida que se polimeriza y forma redes que permiten el paso de proteínas de diferentes pesos moleculares (Ibel *et al.*, 1990).

Pruebas moleculares.- incrementa la precisión y reduce la variabilidad asociada a los bioensayos (Devonshire, 1990), se obtienen patrones de banda de ADN que son utilizado como marcadores genéticos para una especie (Ffrench *et al.*, 1994).

Pruebas bioquímicas.- son ensayos múltiples que permiten analizar a una población de insectos cuantifican los niveles de de una reacción enzimática (Brown y Brodon, 1987). Desarrollados para cuantificar niveles de Esterasas (Brogdon y Dickinson, 1983), Acetilcolinesterasa (Devonshire y Moores, 1984), Glutation S-Transferasas (Brogdon y Barber, 1990) y oxidasas (Brogdon *et al.*, 1997).

Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en la Universidad autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, Mexico. En el laboratorio de toxicología del departamento de Parasitología Agrícola, durante el periodo de Enero del año 2008 a diciembre del año 2009, donde 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.

Teniendo como objetivo determinar a través de varios métodos de diagnóstico la susceptibilidad y los mecanismos de resistencia de *Tribolium castaneum* provenientes de harineras.

Se recolectaron gorgojos en harineras del estado de Saltillo y Nuevo León, México. El material recolectado se trasladó al laboratorio de toxicología de la Universidad, para determinar el nivel de resistencia, los mecanismos enzimáticos de resistencia presentes.

El primer método utilizado para determinar la susceptibilidad y los mecanismos presentes fueron los bioensayos, por medio de la técnica de película residual, evaluando las poblaciones de *T. castaneum* contra los insecticidas malation, bifentrina, endosulfan, cipermetrina.

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

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

Estos métodos consiste en cuantificar una proteína de referencia utilizando la BSA (Albumina Sérica Bovina), el cual 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.

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 del gorgojo castaño de la harina. Para trazar la curva de referencia, donde se consideraran los datos comprendidos entre 80 y 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, se utilizaron seis diluciones de BSA: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína.

Una vez obtenida la curva de referencia con BSA, se procedió a preparar los reactivos y los homogenatos, para prepara el Reagente: Se disolvió 20 mL de colorante con 80 mL de H_2O esterilizada, se pasó por papel filtro para obtener una dilución,

posteriormente la preparación de Buffer (KPO₄), se disolvió 6.6 g de fosfato dibásico con 1.7 g fosfato monobásico, aforando a 1000 mL de H₂O esterilizada. Para la Preparación de homogenatos, en tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 9 muestras con diferente cantidad de insectos: 0.05, 0.25, 0.30, 0.35, 0.4, 0.5, 1, 2 y 3, cada muestra con 15 repeticiones. Se agregó 500 µL de diluyente buffer KPO₄ (fosfato de potasio), se trituraron con un homogenizador de tejidos, se aforó a 1 mL adicionándole 900 µL de diluyente.

Por consiguiente, a los datos arrojados por el lector de placas, se les obtuvo la media de cada repetición (tres pozos), mediante la ecuación de la curva estándar de referencia del método determinado por Bradford (1976), modificado por Brogdon (1984), dada por la interpolación de µg/mL de proteína y la absorbancia, se obtuvieron analíticamente los valores comprendidos en un rango establecido por el autor. La ecuación de la recta fue: $y = - 0.5033 + 0.7249 (x)$; donde se sustituyen los valores de las medias de las absorbancias, obteniendo los valores de µg/mL de proteína, fueron tabuladas y se obtuvo la media del contenido de proteína, por lo que se homogenizaron 0.5 µg de individuos de *T. castaneum* en 100 µL de buffer fosfato de potasio (KPO₄), a 0.05 molar y pH 7.2, aforándolo a 1mL con el mismo buffer, ya que se encontro 0.179 µg de proteína/ 0.5 mg del tejido de los gorgojos, ya que esta comprendida en el rango antes mencionado.

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).

los resultados se analizaron para obtener las proporciones de resistencia mediante el método gráfico, para poder referenciar las poblaciones respecto a su contenido de enzimas cuantificadas en absorbancias, las cuales fueron arrojadas por un espectrofotómetro, leídos con diferentes filtros según la enzima a analizar; posteriormente se obtuvieron los porcentajes de la proporción de resistencia para cada enzima en cada población, en ausencia de una línea susceptible, se tomó como referencia un umbral que se estableció en base a la media entre el valor máximo y el mínimo, obteniendo por lo consiguiente los porcentajes totales de proporción de resistencia a nivel región.

Con la finalidad de conocer la variación entre los individuos de cada localidad, como entre las poblaciones, los resultados se analizaron estadísticamente mediante el Software SAS System for Windows 9.0, para obtener análisis de varianza con un 0.05 % grado de significancia y comparaciones de medias mediante el método de “tukey” para reducir agrupaciones y hacer mas marcada la diferencia.

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.

Resultados

Bioensayos.

Bioensayos.

A continuación se dan a conocer los resultados obtenidos en los bioensayos realizados mostrando los valores de CL₅₀, CL₉₅ y los límites fiduciales (inferior y superior) a 4 poblaciones de *T. castaneum*.

Cuadro 1.1. CL₅₀, CL₉₅ y límites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de *T. castaneum* provenientes de Aguascalientes (A1) a 24 hrs de exposición.

Aguascalientes (A1)				
Producto	CL ₅₀	Límites Fiduciales		CL ₉₅
		Inferior	Superior	
Malation	3751	3142	4369	55561
Endosulfan	751.87716	397.03501	1152	206413
Clorpirifos	7887	5655	11171	73914

Cuadro 1.2. CL₅₀, CL₉₅ y límites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de *T. castaneum* provenientes de Nuevo Leon (NL1) a 24 hrs de exposición.

Nuevo Leon (NL 1)				
Producto	CL ₅₀	Límites Fiduciales		CL ₉₅
		Inferior	Superior	
Malation	2622	2111	3057	19771
Endosulfan	274.4976	172.57582	391.38237	60365
Clorpirifos	3517	2428	4700	4700

Cuadro 1.3. CL50, CL95 y límites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de *T. castaneum* provenientes de Coahuila (C1) a 24 hrs de exposición.

Coahuila (C1)				
Producto	CL ₅₀	Límites Fiduciales		CL95
		Inferior	Superior	
Malation	1318	1066	1686	35632
Endosulfan	2004	1627	2504	20903
Clorpirifos	1333	975.14321	1827	16689

Cuadro 1.4. CL50, CL95 y límites fiduciales de los diferentes insecticidas usados contra poblaciones de *T. castaneum* provenientes de Coahuila (C1) a 24 hrs de exposición.

Saltillo (C2)				
Producto	CL ₅₀	Límites Fiduciales		CL95
		Inferior	Superior	
Malation	180.11925	75.76511	298.30473	8218
Endosulfan	816.71829	405.2117	1280	12561
Clorpirifos	871.27928	559.89569	1292	8965

A continuación se describen las líneas de respuesta de las poblaciones de *T. castaneum* a los diferentes insecticidas.

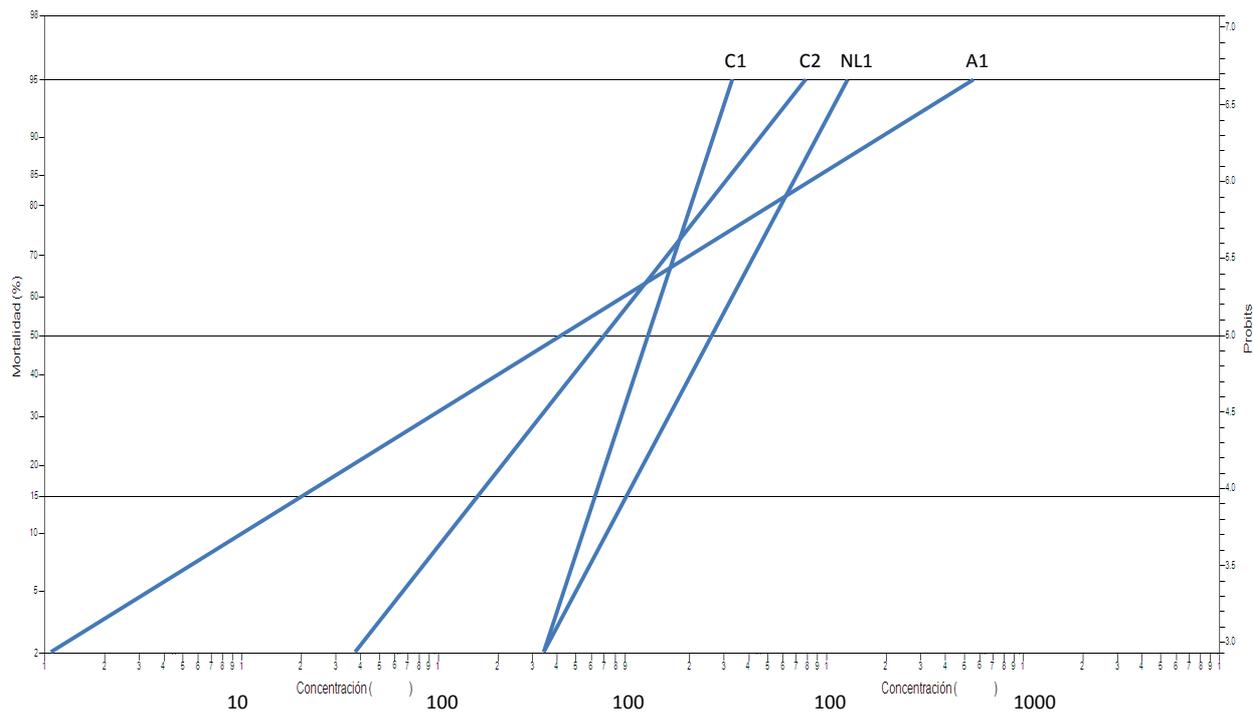


Figura 1. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de diferentes poblaciones de *Tribolium castaneum* a 24 hrs de exposición de malation.

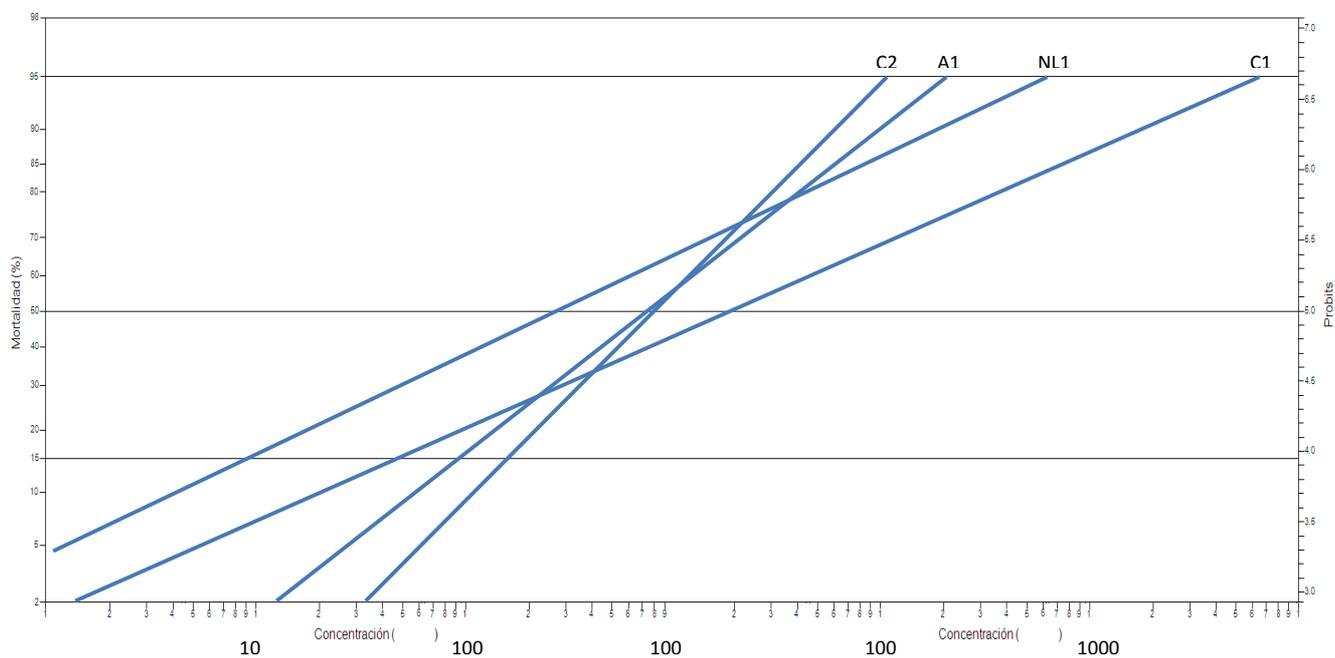


Figura2. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de diferentes poblaciones de *Tribolium castaneum* a 24 hrs de exposición de endosulfan

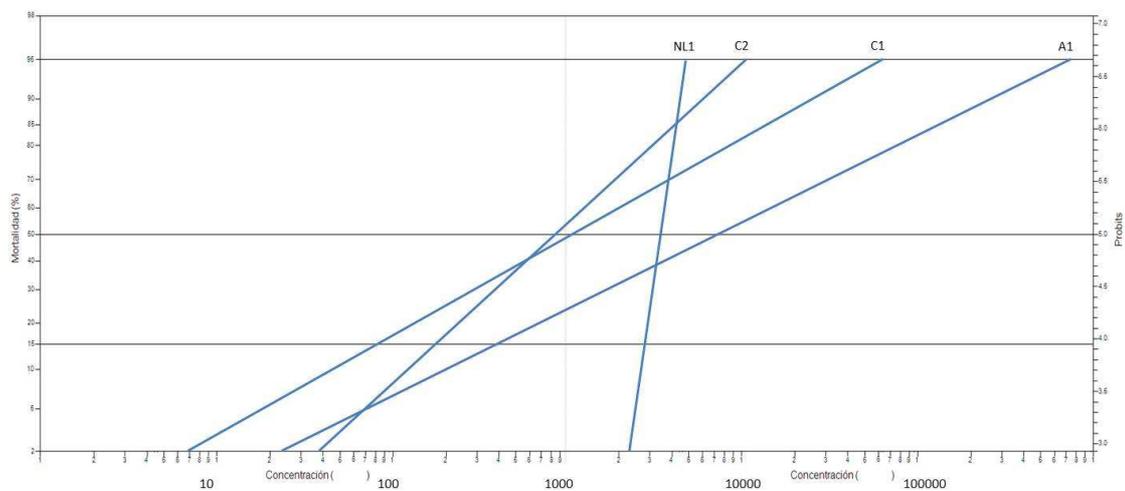


Figura 3. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de diferentes poblaciones de *Tribolium castaneum* a 24 hrs de exposición de clorpirifos.

Artículo científico**Cuantificación de enzimas de resistencia en diferentes poblaciones de *Tribolium castaneum*
(Herbst) (Coleóptera: Tenebrionidae)**

(Con cinco tablas y seis figuras)

**Resistance enzymes quantifying in different populations of *Tribolium castaneum* (Herbst)
(Coleopteran: Tenebrionidae)**

E. Cerna¹, Y. Ochoa¹, S. Perez¹, L. Aguirre¹, M. Flores¹, G. Gallegos¹ y J. Landeros¹

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

Título resumido: Cuantificación de enzimas de resistencia

Palabras clave: Gorgojo de las harinas; absorbancia; colorimetría; enzimas detoxificativas.

Autor para correspondencia:

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Universidad Autónoma Agraria

Antonio Narro

Calzada Antonio Narro No 1923

Col. Buenavista CP 25315

Saltillo, Coahuila, México.

Tel.: (844) 411-03-26

E-mail: yisa8a@yahoo.com

Sistema operativo y procesador de palabras: Windows XP- Microsoft Word 2003

**Cuantificación de enzimas de resistencia en diferentes poblaciones de *Tribolium castaneum*
(Herbst) (Coleóptera: Tenebrionidae)**

Resumen

Se recolectaron cuatro poblaciones de *Tribolium castaneum* en harineras de tres estados de la República Mexicana, dos poblaciones provenientes del estado de Coahuila, una de Nuevo León y una del estado de Aguascalientes. Con el objetivo de determinar los mecanismos enzimáticos de resistencia a través de pruebas bioquímicas. Para esto las poblaciones recolectadas y una línea susceptible de *T. castaneum* como referencia, fueron llevadas al laboratorio de Toxicología donde se mantuvieron en harina de trigo comercial, en cámaras bioclimáticas, a 35 ± 2 °C, 40–50% HR y 12:12 L:O. Los resultados obtenidos muestran que las α y β esterasas, así como las oxidasas son las enzimas con mayor presencia dentro de las poblaciones en estudio, por lo que, estas enzimas son las responsables de la resistencia a plaguicidas de las poblaciones de *T. castaneum* en estudio.

Palabras clave: Gorgojo de las harinas; absorbancia; colorimetría; enzimas detoxificativas.

Abstract

We collected four populations of *Tribolium castaneum* in three states of Mexican Republic, two populations from Coahuila, Nuevo Leon and one Aguascalientes state. With objective of determining the mechanisms of enzymatic resistance through biochemical tests. Harvested populations and susceptible line *T. castaneum* reference, were taken to the laboratory Toxicology where they kept in commercial wheat flour, in bioclimatic chamber at $35 \pm 2^\circ \text{C}$, 40-50% RH and 12:12 L: O. The results obtained show that the α and β esterases, also oxidases are enzymes with greater presence in the study populations, so these enzymes are responsible for pesticide resistance of populations of *T. castaneum* under study.

Key words: Red flour beetle, absorbance; colorimetry; detoxificative enzymes.

Introducción

En México se registran 55 especies de insectos asociados con granos y productos almacenados, entre ellas se encuentran las especies del género *Tribolium* (Tenebrionidae), las cuales se alimentan de granos partidos o lesionados, así como de las harinas, cereales y derivados amiláceos (Gutiérrez, 1999). De este modo *Tribolium castaneum* o gorgojo de las harinas (Herbst) (Coleóptera: Tenebrionidae) está catalogado como la plaga principal de granos y productos almacenados (Howe, 1965). Las pérdidas en granos causadas por este insecto, se estima entre un 10 a un 25% de la producción mundial (Matthews, 1993); y entre un 34 y 40% en harinas y cereales (Ajayi y Rahman, 2006). El control de *T. castaneum* se basa principalmente en el uso de insecticidas y fumigantes. Sin embargo, su uso generalizado a causado algunos problemas, como residuos tóxicos en los productos almacenados, toxicidad para los consumidores y la resistencia a insecticidas (Ribeiro et al., 2003). Siendo esto último el problema más serio y de mayor importancia. Al respecto Subrayanman y Hagstrum (1995), reportaron resistencia de diferentes productos organofosforados a *T. castaneum*. Por su parte Guides et al. (1996) reportan resistencia a malation y clorpirifos en líneas de *T. castaneum* y *T. confusum* provenientes de U.S.A. y Brasil. Por lo anterior dentro de la resistencia a insecticidas, la resistencia del tipo fisiológico es la más importante en artrópodos debido a la acción de mecanismos detoxificadores de tipo enzimático (Lagunes y Villanueva, 1994). Los principales sistemas enzimáticos responsables del metabolismo e inhibición de insecticidas son las oxidetas (Wilkinson, 1983), esterasas y carboxiesterasas (Yasutomi, 1983), glutatión s-transferasas (Dauterman, 1983) y acetil colinesterasa (Hama, 1983). Por lo anterior el monitoreo y detección de la resistencia es esencial en el manejo de insecticidas (Dennehy y Granett, 1984). La forma convencional de la detección de la resistencia se basa en pruebas de susceptibilidad en términos de concentración letal media (CL₅₀) (Bronw, 1976), requiriendo

numerosos que permita cuantificar el nivel de resistencia, los perfiles de ADN que muestran a los genes, pero sin detectar los mecanismos responsables (Keiding, 1986). Por otro lado las pruebas bioquímicas son herramientas efectivas para conocer la actividad y cantidad de las enzimas responsables de este fenómeno (Hemingway, 1986). Además, se puede conocer los fenotipos multirresistentes mediante ensayos replicados (Chan, 1985), la capacidad de detectar las etapas iniciales de resistencia en una población (Bronw y Brogdon, 1987). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación es generar información sobre los mecanismos enzimáticos de resistencia y su cuantificación en diferentes líneas de *T. castaneum* utilizando pruebas bioquímicas.

Materiales y Métodos

Líneas de *T. castaneum*: Se usaron cinco líneas de *T. castaneum*. Una susceptible (T-s), donada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), mantenida desde el año 2002 sin presión de selección por insecticidas, desarrollada sobre harina de trigo comercial, en cámaras bioclimáticas, a 35 ± 2 °C, 40–50% HR y 12:12 L:O. Las otras líneas se recolectaron en dos almacenes de harineras del estado de Coahuila (C1 y C2), un almacén del estado de Nuevo León (NL1) y la última de un almacén del estado de Aguascalientes (A1).

Cría de las colonias de *T. castaneum*: Para obtener individuos de la misma edad para someterlos a las pruebas bioquímicas, una vez que las poblaciones de *T. castaneum* fueron recolectadas, se colocaron en recipientes de vidrio, utilizando harina de trigo comercial como sustrato. La harina fue previamente esterilizada al colocarla por tres días a temperatura baja (-20 °C), con la finalidad de evitar una contaminación por otras especies de insectos. Los recipientes fueron tapados con una tela de tul y asegurados con unas ligas para evitar la salida de los insectos, posteriormente los recipientes fueron colocados dentro de una cámara de cría a una temperatura de 35 ± 2 °C, 40–50% HR y 12:12 L:O por un lapso de 72 hrs, con la finalidad de que los adultos recolectados ovipositaran, posteriormente los adultos fueron retirados y los huevecillos fueron observados hasta llegar a su etapa adulta (F1), donde se utilizaron para las pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas para estimar niveles de enzimas: Se utilizaron en las cinco colonias de *T. castaneum*, seis pruebas bioquímicas para la determinación de los niveles de las enzimas α -esterasas, β -esterasas, oxidasas, glutathion S-transferasas, acetilcolinesterasas y acetilcolinesterasas insensibles. Todas las pruebas se corrieron por triplicado en placas de 96 pozos y leídas mediante el lector de microplacas Stat fax-2100®.

Reactivos utilizados: Tampón fosfato de potasio a 0.05 M y pH 7.2 (BFP), α o β -naftil acetato (α o β NAF), o-dianisidina (OD), albúmina sérica bovina (ASB), homogeneizado de gorgojos (HM), dihidrocloruro de 3, 3', 5, 5'-tetrametil-bencidina (TMBZ), metanol (ME), acetato de sodio (ACE) a 0.25 M, pH 5, peróxido de hidrógeno a 3% (PER), glutatión reducido (GR), 1-cloro-2, 4'-dinitrobenzeno (CDNB), yoduro de acetilcolina (ATCH), 5, 5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB).

Determinación de proteína: La determinación y cuantificación de proteína contenida en tejidos y fluidos es la base la realización de las pruebas bioquímicas, es por ello que se determinó la cantidad de gorgojos por muestra tomando como referencia la proteína por mosquito. Usándose el método de Bradford (1976) modificado por Brogdon (1984), con el Kit-II de Bio-Rad y ASB como proteína de referencia. Se usaron hembras adultas de 3 días de edad en cinco concentraciones diferentes en relación al número de gorgojos (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0 y 3), cada una con 30 repeticiones.

Preparación de los homogenatos: Una vez que se determinó la cantidad de muestra en relación a la proteína (0.5 gorgojos= 100 μ g de proteína/mL), se homogenizó en 100 μ L de BFP y se diluyó a 1 mL (Brogdon 1984). Se prepararon 90 muestras para cada una de las líneas.

Determinación de los niveles enzimáticos: Para determinar los niveles de α -esterasas (α EST), β -esterasas (β EST), oxidasas (Ox), glutatión s-transferasas (GST), acetilcolinesterasa (ACE) y acetilcolinesterasa insensible (ACE in), Se utilizaron las metodologías descritas por Brogdon (Brogdon *et al.*, 1983, 1984, 1987, 1990 y 1997). Para determinar los niveles enzimáticos; para las α y el β -esterasas, se colocaron 100 μ L del HM a cada pocillo de la microplaca y 100 μ L de α o β NAF acetato (Mezcla de 56 mg de α o β NAF en 20 mL de acetona y aforada a 100 mL con BFP) y se dejó reaccionar 15 min. Se adicionaron 100 μ L de OD y se tomó la lectura usando el

filtro de 545 nm. Para las GST, se colocaron 100 μ L del HD más 100 μ L de GR y 100 μ L de CDNB (Mezcla de 20 mg de CDNB diluida en 10 mL y aforada con 90 mL de BFP). Se tomó la lectura a T_0 con filtro de 340 nm. Se dejó reaccionar por 10 min y se tomó la lectura con el mismo filtro. La diferencia de lecturas se usó para el análisis de los resultados. Para las Oxidasas, se colocaron 100 μ L del HM más 200 μ L de TMBZ (Mezcla de 50 mg de TMBZ, diluida con 25 mL de ME y aforada con 75 mL de ACE y 25 μ L de PER). Se dejó reaccionar por 10 min y se tomó la lectura con el filtro de 630 nm. Finalmente, para la ACH y ACH in, se colocaron 100 μ L del HM más 100 μ L de ATCH (Mezcla de 75 mg de ATCH/ 100 mL de BFP) y 100 μ L de DTNB (Mezcla de 13 mg de DTNB/100 mL de BFP). Se tomó la lectura a T_0 con filtro de 405 nm, se dejó reaccionar por 15 min y se tomó la lectura con el mismo filtro. La diferencia de lecturas entre se empleó para el análisis de los resultados. Para determinar los niveles de ACH in, la metodología es similar a la anterior, a diferencia que en la solución de ATCH se agregaron 25 mg de naled como inhibidor.

Análisis de los resultados: Con las absorbancias de cada enzima, se realizó una distribución de frecuencias, donde la absorbancia es la variable y la frecuencia el número de muestras de gorgojos. Se estableció el umbral de resistencia, con los valores máximos obtenidos de la línea T-s y se determinó la proporción de resistencia. Para determinar la resistencia de la población de campo se utilizó el criterio propuesto por Dennehy *et al.* (1987), el cual indica que si la población en estudio supera al 20 % se le considera como una población resistente, mientras que; si dicha población no supera al 20 % se le considera como susceptible.

Por último, se realizó un Anova de clasificación simple y una prueba de Tukey ($P= 0.05$) Utilizando el programa SAS system for Windows ver 9.0 (2002), para determinar las diferencias en la actividad enzimática de las poblaciones.

Resultados

En la tabla 1, se puede observar que las muestras de 1 hasta 3 gorgojos presentan elevada cantidad de proteína, que sobrepasan el rango de proteína requerido (60 a 140 μg). La muestra de 3 gorgojos, muestra valores que sobrepasan el rango lineal del método (cuadro 1). De este modo, las muestras con 0.2 a 05 gorgojos son las que presentan los valores dentro del rango, por lo que se seleccionaron 0.5 gorgojos para trabajar por muestra, debido a que presenta valores de proteína más altos, estables y evita la variabilidad de resultados.

En las Tablas 2, 3, 4 y 5 se presentan los valores máximos de absorbancia obtenidos para cada una de las poblaciones, así como el número de muestras que superaron el umbral de tolerancia. Como puede observarse, los valores máximos de absorbancia para la línea susceptible (L-s) fueron de 0.0437, 0.5421, 1.1377, 2.6433, 0.0457 y 0.2527 para las enzimas ACE, ACE-in, αET , βEST , GST y Ox respectivamente. Recordando que estos valores se toman para establecer el umbral de resistencia. Para la línea A1 los valores máximos de absorbancia oscilaron entre 0.0475 a 3.5104 para las mismas enzimas. Superando el umbral de resistencia todas las enzimas (Tabla 2), siendo las de mayor presencia las αET , βEST y Ox con 30, 48 y 36 muestras que superan el umbral. Para la línea NL1 los valores máximos de absorbancia oscilaron entre 0.0443 a 3.341, superando el umbral de resistencia las enzimas αET y βEST con 12 y 24 muestras (Tabla 3). Para la línea C1 los valores máximos de absorbancia oscilaron entre 0.0437 a 2.6433, superando el umbral de resistencia las enzimas ACE, αET , βEST y Ox con 12, 6, 18 y 12 muestras (Tabla 4). Finalmente para la línea C2 los valores máximos de absorbancia oscilaron entre 0.0458 a 3.2573, superando el umbral de resistencia las enzimas

ACE, α ET, β EST y Ox con 18, 12, 36 y 30 muestras (Tabla 5). Así mismo, podemos mencionar, que de la línea A1 aunque todas las enzimas superaron el umbral de resistencia, las enzimas que presentaron los mayores valores fueron las α ET, β EST y Ox, con un 33.3, 53 y 40 % de la población con problemas de resistencia (Figura 1). Para la línea NL1 (Figura 2) la enzima que presento el mayor porcentaje de resistencia en la población fue la β EST con un 26.6 %. En relación a la línea C1 (Figura 3) fue la β EST con un 20 % y finalmente para la línea C2 (Figura 4) fueron las enzimas ACE, β EST y Ox con 20, 40 y 33.3 % de la población con problemas de resistencia.

Discusión

En relación al contenido de proteína las muestras de 1 hasta 3 gorgojos presentan una elevada cantidad de proteína, sobrepasando el rango de proteína requerido, por lo que fueron descartadas para el estudio. Al respecto Bradford (1976), menciona que valores fuera del rango no son confiables para la cuantificación de proteína en tejidos y fluidos. De este modo, las muestras con 0.2 a 05 gorgojos son las que presentan los valores dentro del rango, por lo que se seleccionaron 0.5 gorgojos para trabajar por muestra, Al respecto Dary *et al.* (1990), mencionan que existe estrecha relación entre tamaño de muestra y cantidad de proteína, por lo que se pueden presentar diferencias en los resultados obtenidos y la cuantificación de proteína es utilizada para corregir las cantidades de actividad enzimática en base al tamaño y etapa de desarrollo de los organismos de prueba.

Por otro lado la enzima que más presencia tuvo en las cuatro poblaciones de campo, fueron las enzimas β EST, con 53, 26.6, 20 y 40 % la líneas A1, NL1, C1 y C2; presentando todas las poblaciones problemas de resistencia por esta enzima (de acuerdo al criterio de Dennehy < 20%). Al respecto Brown (1990) menciona que los insecticidas usados convencionalmente en el control de plagas de granos almacenados, son insecticidas organofosforados, carbamicos y piretroides, los cuales son altamente susceptibles al ataque de enzimas esterases, provocando en las poblaciones de insectos el incremento de esterases como medio de detoxificación de los plaguicidas (Lagunes y Villanueva, 1994). El segundo grupo de enzimas que presento valores más altos fueron las Ox, con valores de 40 y 33.3 % de la población con resistencia. Pimentel *et al.* (2008), mencionan que las enzimas oxidasa juegan un papel fundamental en la

detoxificación de varios compuestos plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y los puedan detoxificar (Benhalima et al., 2004). En lo que respecta a las GST, ACE y ACE-in, varios autores reportan a estas enzimas como causa de resistencia en especies de insectos, sin embargo en el presente estudio estos sistemas fueron los menos relevantes (Dauterman, 1983).

Conclusiones

La línea de campo A1 fue la que presentó los niveles y porcentajes más altos en todas las enzimas detoxificativas, los sistemas enzimáticos responsables de la generación de la resistencia en la mayoría de las poblaciones en estudio fueron las esterasas y oxidasas. En lo que respecta a las GST, ACE y ACE-in, en el presente estudio estos sistemas fueron los menos relevantes.

Literatura citada

- Ajayi FA, Rahman SA (2006). Susceptibility of some staple processed meals to red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:Tenebrionidae) Pakistan J. Biol. Sci. 9(9):1744-1748.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brogdon, W. G. 1984. Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 457-459.
- Brogdon, W. G., and C. M. Dickinson. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.
- Brogdon, W. G., and Barber. 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pest. Biochem. and Physiol.* 29: 252-259.
- Brogdon, W. G., and Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. *Comp. Biochem. Physiol.* 96: 339-342.
- Brogdon, W. G., J. C. McAllister, and J. Vulule. 1997. Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Jour. Amer. Mosq. Control Assoc.* 13: 233-237.

- Brown, A. W. A. 1976. How have entomologists dealt with resistance ? Am. Phytopathol. Soc. Proc. 3 : 67-74.
- Brown, T. M., and W. G. Brogdon. 1987. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. Ann. Rev. Entomol. 32: 145-162.
- Carvalo G., Nariko R.; Barry D.; Kambhampati S. 1996. Resistance to Chlorpyrifos-Methyl, Pirimiphos-Methyl, and Malathion in Brazilian and U.S. Populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Jour econ entomol. 89: 27-32.
- Chan, K. L. 1985. Singapore's dengue hemorrhagic fever control program. A case study on the successful of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly environmental measures as a part of integrated vector control. Tokyo: Southeast Asian Medical Information Center. 114 p.
- Dauterman, W. C. 1983. Role of hydrolases and glutathione S-transferases in insecticide resistance. in Georgiou G.P. and T. Saito (eds.) *Pest Resistance Pesticides*. Plenum Press. New York. pp. 229-247.
- Dennehy, T. J., and J. Granett. 1984. Spider mite resistance to dicofol in San Joaquin Valley cotton: Inter and intraspecific variability in susceptibility of three species of Tetranychus. J. Econ. Entomol. 77(6): 1381-1385.
- Dennehy, T. J.; Grafton-Cardwell, E. E.; Granett, J.; Barbour, K. 1987. Practitioner assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae). Journal Economic Entomology 80: 998-1103.

- Gutiérrez, Díaz L.J. 1999. Insectos asociados a granos y productos almacenados. In: Catalogo de insectos y ácaros plaga de los cultivos agrícolas de México. Sociedad Mexicana de Entomología. Publicaciones Especiales Numero 1. México. Pp. 107-124.
- Hama, H. 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase in Georghiou G.P. and T. Saito (eds.) *Pest Resistance Pesticides*. Plenum Press. New York. 299-331 pp.
- Hemingway, J., C. Smith, K. J. I. Jayawardena, and P. R. J. Hearth. 1986. Field and laboratory of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, 76: 559-565.
- Howe RW (1965). Losses caused by insects and mites in stored foods and foodstuffs. *Nutr. Abstr. Rev.* 35: 285-302.
- Keiding, J. 1986. Prediction or resistance risk assessment. In *Pesticide Resistance*. National Academy Press. Washington D. C. 279-297 pp.
- Lagunes, T. A., y J. J. A. Villanueva. 1994. *Toxicología y manejo de insecticidas*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 265 pp.
- Matthews GA (1993). Insecticide application in stores. In: Matthews GA, Hislop EC (Eds) *Application Technology for Crop Protection*. CAB International, Wallingford, UK pp 305-315.
- Riebeiro BM, Guedes RNC, Oliveira EE, Santos JP (2003). Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 39: 21-31.

SAS Institute Inc. 2002. Guide for personal computers. SAS institute, Cary, N.C.

Subrayanman B. and Hagstrum D. W. 1995. Inteeegrated management of insects in stored products. Edit Merzell-Decker. New York. Pp. 331-397.

Wilkinson, C.F. 1983. Role of mixed-funtion oxidases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. New York. 175-205 pp.

Yasutomi, K. 1983. Role of detoxication esterases in insecticide resistance. in Georghiou, G.P. and T. Saito (eds.). *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. New York. 249-263 pp.

APENDICE

Tabla 1.- Absorbancias y concentración de proteína en homogenatos de *Tribolium castaneum* en diluyente buffer de fosfato (pH: 7.2).

Concentración	Absorbancia	Mg/mL de proteína	µg de proteína
0.1	0.659 ± 0.015	- 0.100*	-
0.2	0.789 ± 0.018	0.030	68.640
0.3	0.832 ± 0.020	0.080	99.816
0.4	0.857 ± 0.022	0.093	115.039
0.5	0.889 ± 0.034	0.106	140.113
1.0	0.992 ± 0.37	0.380	215.800
2.0	1.126 ± 0.031	0.402	312.937
3.0	1.330 ± 0.043	0.528*	-

Tukey (P= 0.05)

Rango lineal: 0.050-0.500 (*Valor no confiable, sale del rango lineal)

Tabla 2. Niveles máximos de absorbancia para cada enzima de la población del Estado de Aguascalientes (A1) de *Tribolium castaneum* y número de muestras que superan el umbral de tolerancia.

Enzima	Absorbancia		N
	Línea susceptible	Línea C1	
Acetilcolinesterasa	0.0437 ^{&} ±0.0012 ^{SD}	0.0754 [§] ±0.0126 ^{SD}	18
Acetilcolinesterasa insensible	0.5421 ^{&} ±0.0076 ^{SD}	0.0690±0.0135 ^{SD}	6
α-esterasa	1.1377 ^{&} ±0.0849 ^{SD}	1.4753±0.0191 ^{SD}	30
β-esterasa	2.6433 ^{&} ±0.1048 ^{SD}	3.5104±0.1324 ^{SD}	48
Glutation S-transferasa	0.0457 ^{&} ±0.0051 ^{SD}	0.0475±0.0066 ^{SD}	18
Oxidasa	0.2527 ^{&} ±0.0132 ^{SD}	0.3103±0.0649 ^{SD}	36

⁺Número de muestras que superaron el umbral de tolerancia

[&]Umbral de tolerancia para cada enzima

^{SD} Desviación Estándar

Tabla 3. Niveles máximos de absorbancia para cada enzima de la población del Estado de Nuevo León (NL1) de *Tribolium castaneum* y número de muestras que superan el umbral de tolerancia.

Enzima	Absorbancia		N
	Línea susceptible	Línea C1	
Acetilcolinesterasa	0.0437 ^{&} ±0.0012 ^{SD}	0.0443 [§] ±0.0016 ^{SD}	0
Acetilcolinesterasa insensible	0.0542 ^{&} ±0.0076 ^{SD}	0.0560±0.0121 ^{SD}	0
α-esterasa	1.1377 ^{&} ±0.0849 ^{SD}	1.2347±0.081 ^{SD}	12
β-esterasa	2.6433 ^{&} ±0.1048 ^{SD}	3.341±0.0824 ^{SD}	24
Glutation S-transferasa	0.0457 ^{&} ±0.0051 ^{SD}	0.0460±0.0086 ^{SD}	6
Oxidasa	0.2527 ^{&} ±0.0132 ^{SD}	0.2544±0.0.0649 ^{SD}	0

⁺Número de muestras que superaron el umbral de tolerancia

[&]Umbral de tolerancia para cada enzima

^{SD} Desviación Estándar

Tabla 4. Niveles máximos de absorbancia para cada enzima de la población del Estado de Coahuila (C1) de *Tribolium castaneum* y número de muestras que superan el umbral de tolerancia.

Enzima	Absorbancia		N
	Línea susceptible	Línea C1	
Acetilcolinesterasa	0.0437 ^{&} ±0.0012 ^{SD}	0.0531 [§] ±0.0028 ^{SD}	12
Acetilcolinesterasa insensible	0.0542 ^{&} ±0.0076 ^{SD}	0.0556±0.061 ^{SD}	0
α-esterasa	1.1377 ^{&} ±0.0849 ^{SD}	1.2473±0.0719 ^{SD}	6
β-esterasa	2.6433 ^{&} ±0.1048 ^{SD}	3.341±0.0824 ^{SD}	18
Glutation S-transferasa	0.0457 ^{&} ±0.0051 ^{SD}	0.0460±0.0086 ^{SD}	0
Oxidasa	0.2527 ^{&} ±0.0132 ^{SD}	0.2783±0.0.0837 ^{SD}	12

⁺Número de muestras que superaron el umbral de tolerancia

[&]Umbral de tolerancia para cada enzima

^{SD} Desviación Estándar

Tabla 5. Niveles máximos de absorbancia para cada enzima de la población del Estado de Coahuila (C2) de *Tribolium castaneum* y número de muestras que superan el umbral de tolerancia.

Enzima	Absorbancia		N
	Línea susceptible	Línea C1	
Acetilcolinesterasa	0.0437 ^{&} ±0.0012 ^{SD}	0.0583 [§] ±0.0083 ^{SD}	18
Acetilcolinesterasa insensible	0.0542 ^{&} ±0.0076 ^{SD}	0.0539±0.023 ^{SD}	0
α-esterasa	1.1377 ^{&} ±0.0849 ^{SD}	1.2254±0.0264 ^{SD}	12
β-esterasa	2.6433 ^{&} ±0.1048 ^{SD}	3.2573±0.0424 ^{SD}	36
Glutation S-transferasa	0.0457 ^{&} ±0.0051 ^{SD}	0.0458±0.0076 ^{SD}	0
Oxidasa	0.2527 ^{&} ±0.0132 ^{SD}	0.3063±0.0467 ^{SD}	30

⁺Número de muestras que superaron el umbral de tolerancia

[&]Umbral de tolerancia para cada enzima

^{SD} Desviación Estándar

Figura 4. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de de la población del Estado de Aguascalientes (A1) de *Tribolium castaneum* Herbst.

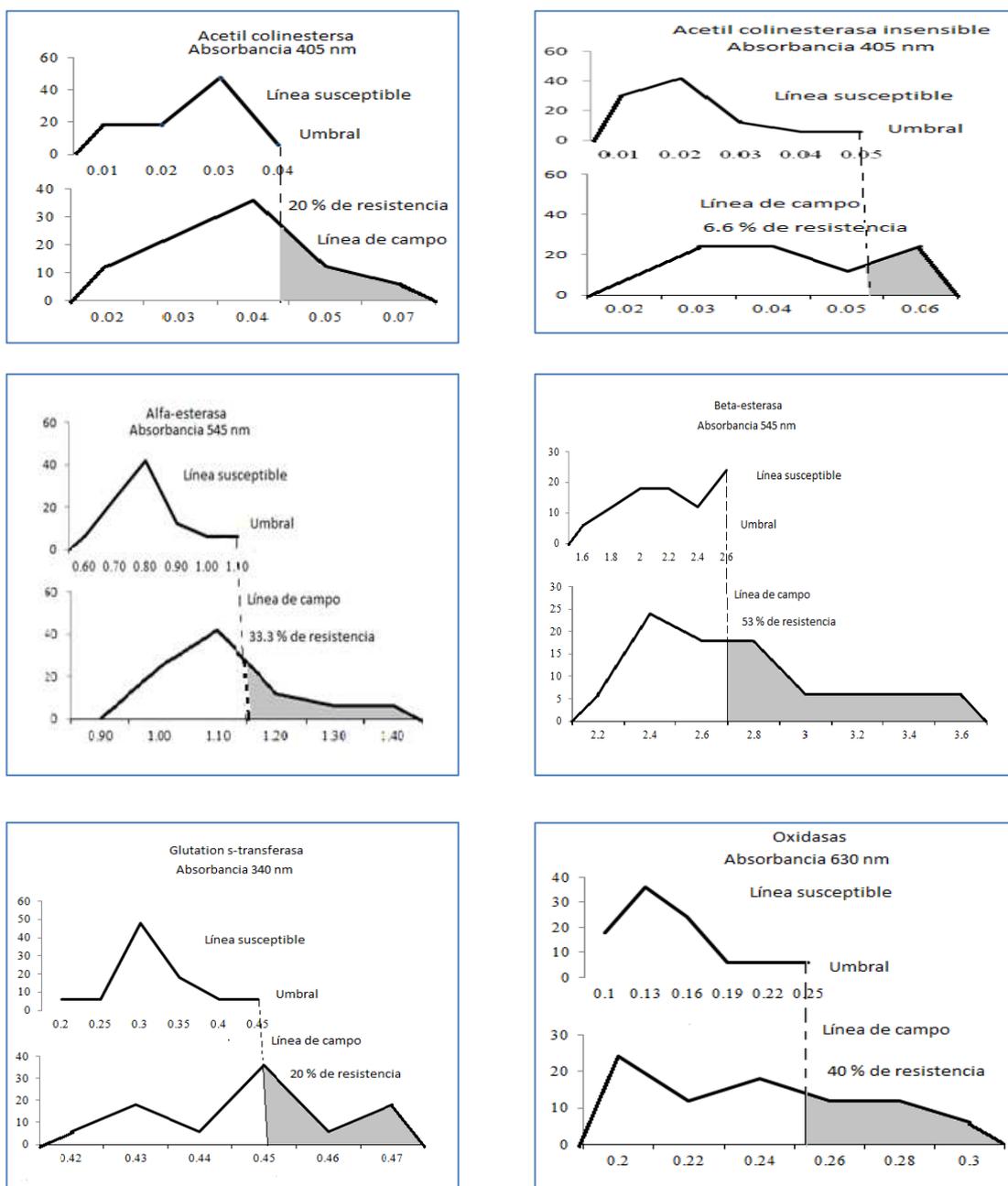


Figura 5. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Nuevo León (NL1) de *Tribolium castaneum* Herbst.

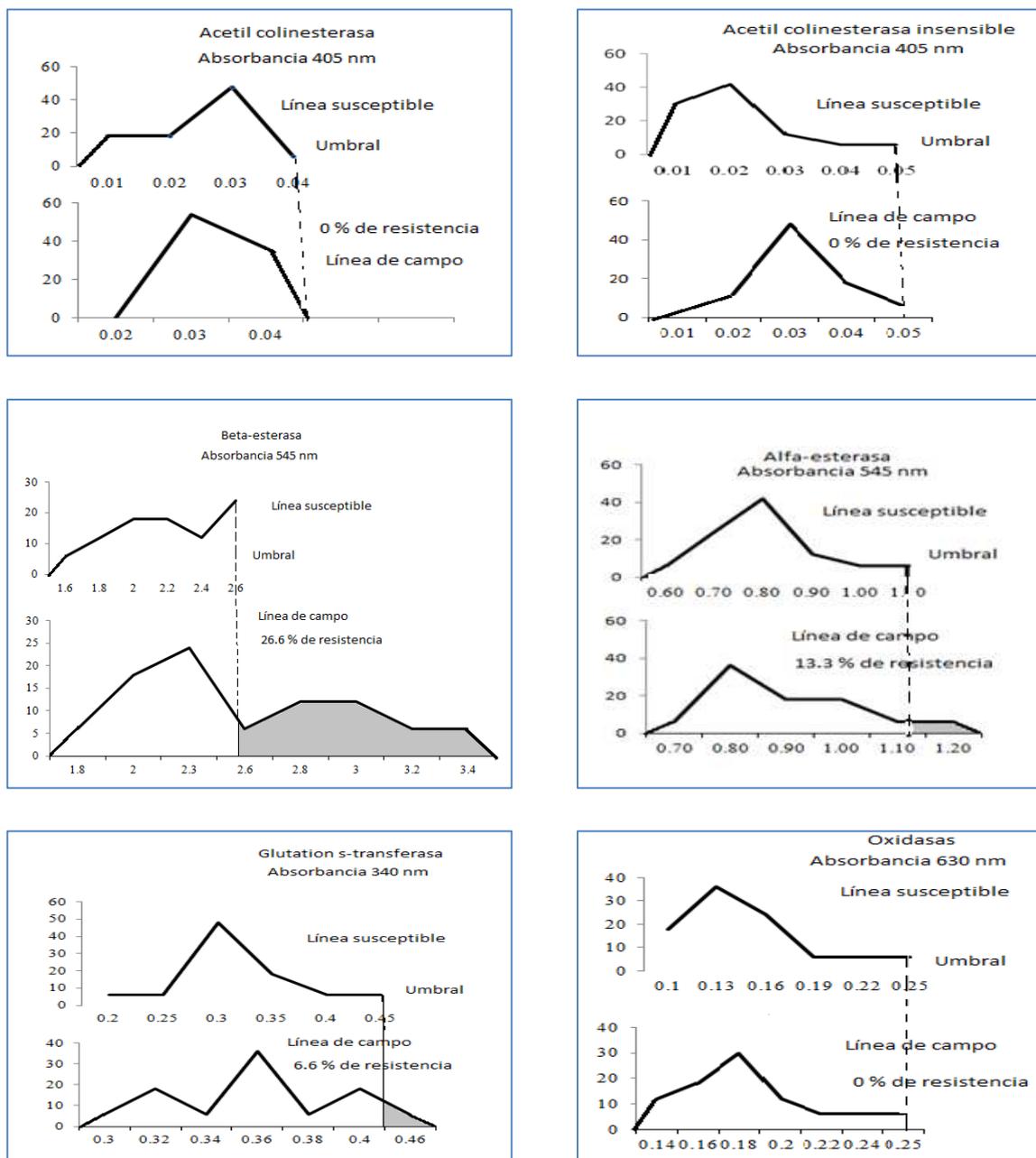


Figura 6. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Coahuila (C1) de *Tribolium castaneum* Herbst.

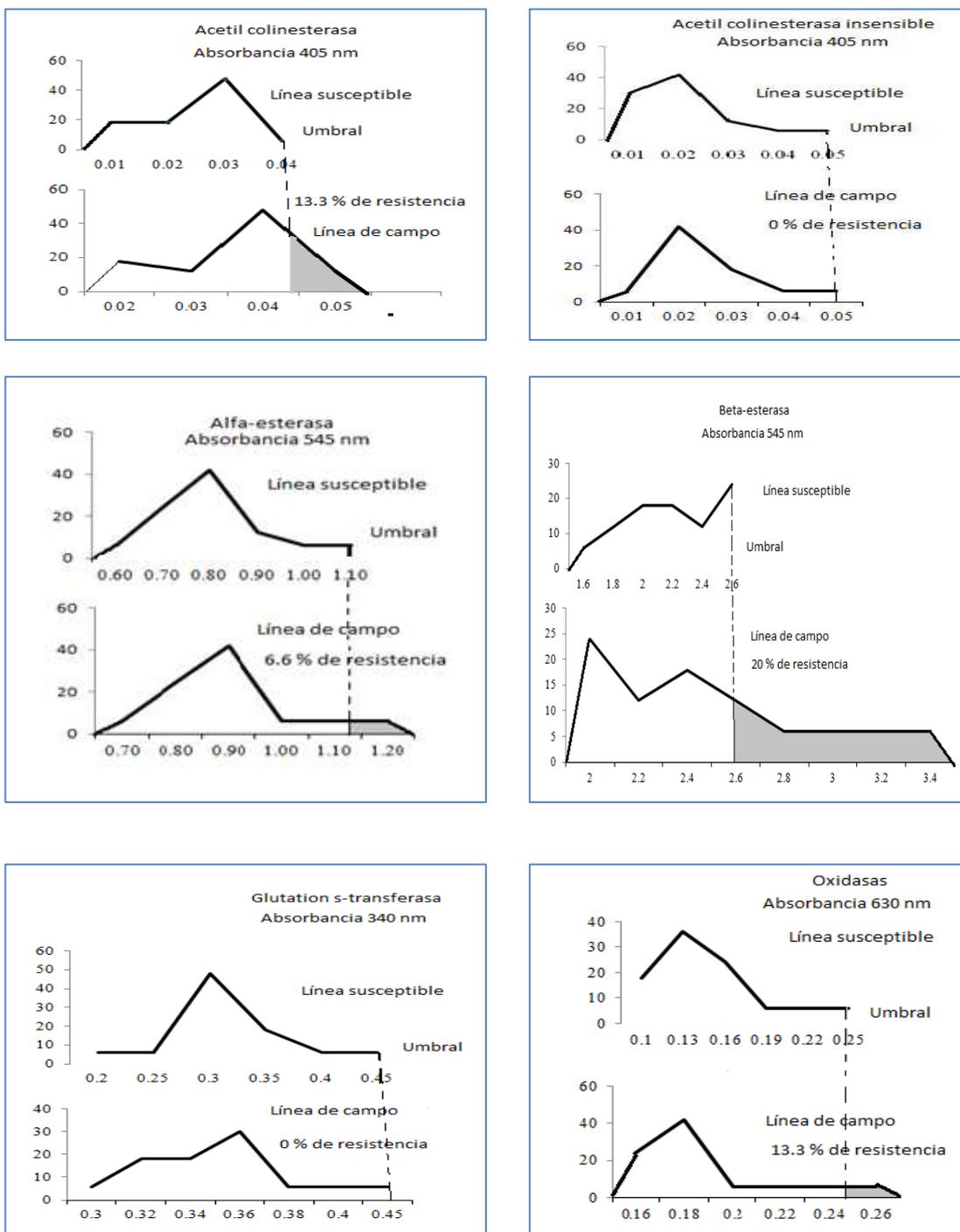
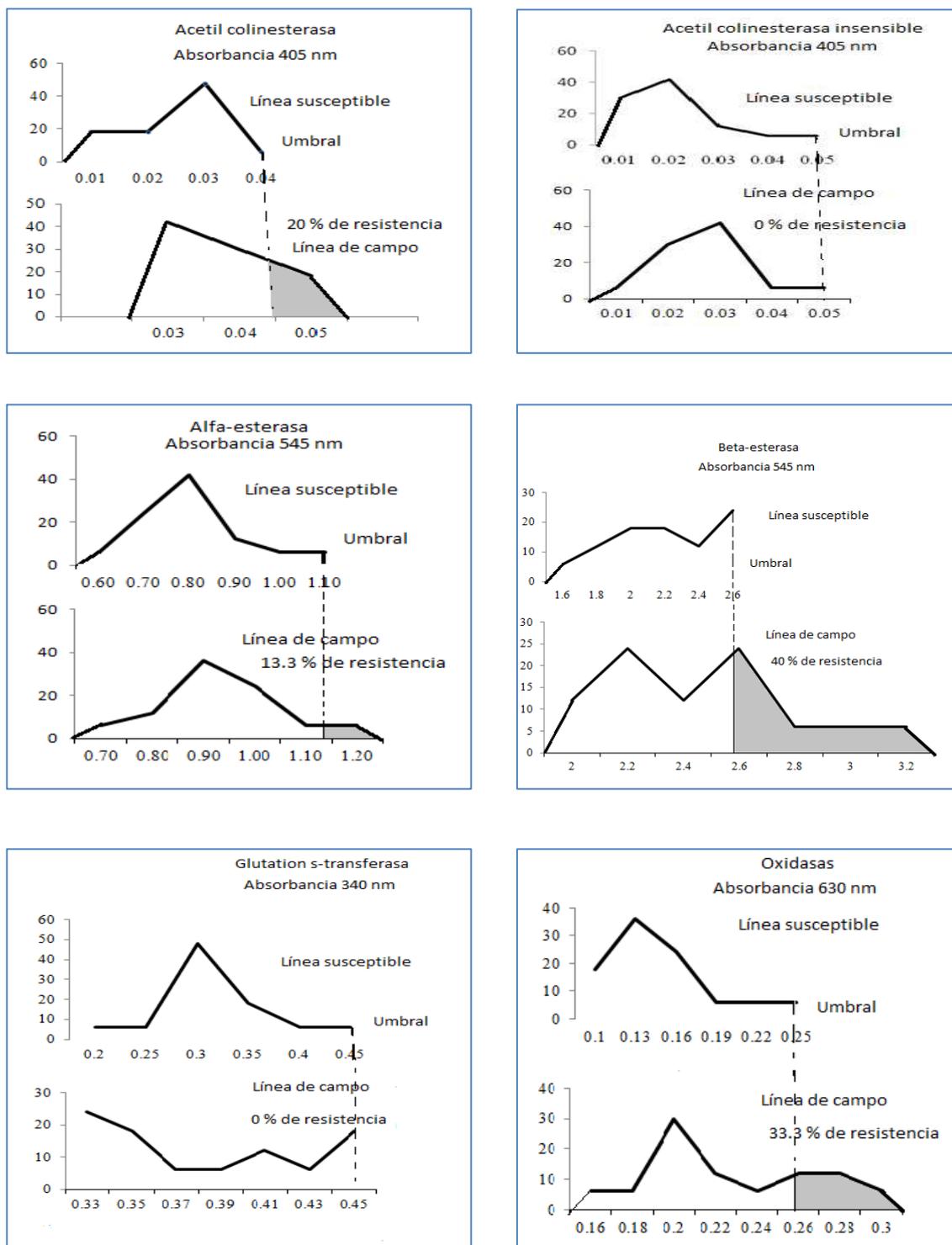


Figura 7. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Coahuila (C2) de *Tribolium castaneum* Herbst.



DISCUSIONES

Para la población *T. castaneum* resistente (Ags.) fue la que registró menor contenido de acetilcolinesterasa; Al compararlo con los resultados de 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; en cuanto acetilcolinesterasa, [Hernández-Bautista \(2011\)](#) reporta un 33.5 % de resistencia en poblaciones de *Bactericera cockerelli*, y la distribución de este mecanismo enzimático es homogéneo, por su parte [Trumble \(1998\)](#) sugiere tomar en cuenta la ubicación geográfica de la localidad y grupo toxicológico de insecticidas usados anteriormente.

Caso contrario con el contenido de α -esterasas, la población que registró mayor contenido fue *T. castaneum* 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 en el caso de 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.

Cabe mencionar que anteriormente se ha registrado un incremento en la aplicación de piretroides para el control de plagas de granos almacenados ([Brown,](#)

1987), estos factores enzimáticos están relacionados con la detoxificación para este grupo de insecticidas. Esta enzima fue la que presentó mayor contenido en comparación con el resto de las demás estudiadas, 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, [Devonshire y Moores \(1982\)](#) también señalan que las poblaciones de insectos han sido sometidas a una elevada presión de selección con piretroides, como resultado varios autores mencionan que su actividad enzimática también está asociada con resistencia a este grupo químico ([Brogdon y Barber, 1990](#); [Flores et al., 2005, 2006](#)), este factor es de mayor importancia ya que también estas son las responsables de resistencia, a través de la detoxificación de organofosforados y carbamatos ([Georghiou, 1994](#)).

Tomando en cuenta a las GSTs, una vez más la población *T. castaneum* resistente (Ags.), fue la que presentó niveles elevados de esta enzima, por lo que también se puede atribuir a la producción de GSTs como un mecanismo enzimático de resistencia para la población de *T. castaneum* resistente (Ags), ya que se presenta en mayor proporción que en cuanto a porcentajes de resistencia con un 100 %, esto concuerda con autores que han demostrado que las GSTs son uno de los factores responsables de la resistencia a varios insecticidas ([Paton et al., 2000](#)). Sin embargo, [Hernández-Bautista \(2011\)](#) el contenido de Glutathion S-transferasas no es un factor determinante para la presencia de resistencia de *Bactericera cockerelli* a insecticidas en la zona papera del sur de Coahuila

y Nuevo León, concordando con los resultados obtenidos por (Díaz-Cristina *et al.*, 2004) donde la frecuencia de GST es muy baja.

En cuanto a las oxidasas observamos que *T. castaneum* 1 (N.L.), 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. Las Oxidasas de Función Múltiple, son una familia de enzimas que cumplen un importante rol en la degradación de esteroides y hormonas juveniles en insectos hemi y holometábolos, así como en la degradación de compuestos químicos de origen natural (fitotoxinas) o sintético (insecticidas) (Danielson *et al.*, 1998). Por su parte Hernandez-Bautista (2011) reporta que la producción de Oxidasas como mecanismo detoxificante depende tanto de la ubicación geográfica específica de cada población como de los factores que intervienen y/o inducen su producción para posteriormente generar resistencia.

CONCLUSIONES

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, por lo que en esta investigación se peortan las siguientes conclusiones:

De manera general podemos concluir que las β - esterasas son el mecanismo enzimático implicado en la resistencia en las poblaciones del gorgojo castaño 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 los mecanismos enzimáticos detoxificativos mediante enzimas α -esterasas y GSTs.

El contenido de β - esterasas se presenta en una forma muy similar en todas las poblaciones y su producción como mecanismo de resistencia es homogéneo.

LITERATURA CITADA

- Akbar, W.; Lord, J. C.; Nechols, J. R. () Howard, R.W. 2004.** Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *Journal of Economic Entomology* 97: 273-280.
- Arias Velázquez, C. 1981.** Manual de procedimientos para el análisis de granos. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Barbera C. 1989.** Pesticidas agrícolas. Cuarta edición. Ediciones Omega S.A. Pp 506-507.
- 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.
- Bennett G. W., Owens J. M. Y Corrigan R. M. 1996.** Guía técnica de Truman para operaciones de control de plagas. Editorial Purdue University.
- Brower, J.; L. Smith. P. Vail. y P. Flinn. 1996.** Biological Control In: Subramanyam. B y D. Hagstrum (Eds). *Integrated Management of insects in stored products.* Marcel Dekker, Inc. New York. USA p 223-286.
- Brogdon, W. G. and Dickinson, C. M. 1983.** A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography aluate fractions. *Analyt. Biochem.* 131: 499-503.

- Brogdon, W. G. and Barber, A. M. 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 Barber, A. M. 1990b.** Fenitrothion-deltametrina cross resistance conferred by Esterasas in Guatemala *Anopheles albimaus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 130-139.
- Brogdon, W. G.; McAllister and Vulule J. 1997.** Heme peroxidase activity measured in single-mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc* 13: 223-237.
- Brown, T. M. and Brogdon, W. G. 1987.** Improved detection of insecticid resistance through conventonal and molecular techniques. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 145-162.
- Carrillo, R. H. 1984.** Análisis de acción conjunta de insecticidas en larvas del gusano cogollero del maíz (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) Tesis de maestría en ciencias. Centro de entomología y acarología. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México, 82 pp.
- Cygler, M.; Schrag, J. D.; Sussman, J. L.; Harel, M.; Silman, I. and Gentry, M. K. 1993.** Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382.
- Danielson, P. B.; Foster, J. L. M.; McMahill, M. M.; Smith, M. K. and Fogleman, J. C. 1998.** Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 Cytochrome P450s in

Drosophila?: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular and general genetics* 259: 54 – 59.

Dell'orto T. H.; Arias V. C. 1985. Insectos que dañan granos y productos almacenados. Chile, Proyecto FAO-INIA. 142 p.

Devonshire, A. L. 1990. Biochemical and molecular genetic analysis of insects populations resistant to insecticides. Brighton crop protection conference. Pest and Diseases. Pp 889-896

Díaz-Cristina; Rodríguez, M. M.; Fresneda, M. y Bisset, J. A. 2004. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Rev. Cub. Med. Trop.* 56(2):111-116.

FAO 1957. Technical report, No. 125.

FAO.1985. Manual of pest control for food security reserve grain stocks. FAO. Plan production and protection paper n° 63 Rome (Italy).200 pp.

Ffrench, C. R. H.; steinchen J. C. and Brun, L. O. 1994. A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) *Bull. Entomol. Res.*84:11-16.

Flores E. A.; Badii, M. H. y Ponce, G. G. 2001. Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición.* Vol. 2 No.4 Octubre-Diciembre. 8 pp.

Flores E. A.; Albeldaño, W. V.; Fernandez, I. S.; Badii, M. H.; Loaiza, M. H. B.; Ponce, G. G.; Lozano, S. F.; Brogdon, W. G.; Black IV, W. C. and Beaty, B. 2005. Elevated α esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pestic. Biochem. Physiol.* 82: 66-78.

Flores E. A.; Grajales, J. S.; Fernandez, I. S.; Ponce, G. G.; Loaiza, M. H. B.; Lozano, S.; Brogdon, W. G.; Black IV, W. C. and Beaty, B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 672-677.

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 Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ. Piracicaba, Brasil. Pp. 815-912.*

Georghiou, G. P. 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* 75 Suppl.51-59.

Georghiu, G.P. and Lagunes, V. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. *FAO. Roma. 317p.*

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.*

Gutiérrez, G. L. J., Y S. R. Jiménez. 1989. Distribución de los insectos que dañan los productos almacenados en algunas localidades de la república mexicana. XXIV. Congreso nacional de entomología. Primer simposio. Problemas entomológicos de granos almacenados. Oaxtepec, Morelos. Pp. 56-90.

Gutiérrez, D. L. J. y Gulmes. 1991. Manejo pos cosecha de maíz en el estado de Morelos.

Gutiérrez, Díaz L.J. 1999. Insectos asociados a granos y productos almacenados. In: Catalogo 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.

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

Hubert, J. J. 1980. Bioassay. Kendall/Hunt Pub. Co. USA. 164 p.

Ibel, K.; May, R. P.; Kirscheer, K.; Szadkowski, H.; Mascher, E. and Lundahl, P. 1990. Protein-decored micelle structure of sodium-dodecyl-sulfato proyein complexes as determinadesd by neutrón scattering. Eur. J. Biochem. 190: 311-318.

- 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.
- 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.
- Liu, N. and Scott, J. G. 1997.** Phenobarbital induction of Cyp6D1 is due to a *trans* acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. Insect. Mol. Biol. 6: 77-81.
- Mallis, A. 1990.** Handbook of pest control, Franzals & Foster. Co. 1, 152p.
- Mc. Gaughey, W. H. 1985.** Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling indian meal moths (Lepidoptera: Pyralidae) infarm grain bins and elevator silos. J. Econ. Entomol. 78 (5):1089-1094.

- 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.
- Metcalf, R. L. 1989.** Insect Resistance to Insecticides. Pestic. Sci. 26:333-358.
- 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.
- Nájera, R, M, 1991.** Ecología y control del barrenador de los granos *Prostephanustruncatus* en el centro de Jalisco. INIFAP publicación especial No.5 México.
- 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].
- 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.

Paton, M. G.; Karunaratne, S. H. P. P.; Giakoumaki, E.; Roberts, N. and Hemingway, J. 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide resistant *Culex* mosquitoes. *Biochem J.* 346:17-24.

Ramayo, G. M. 1983. Tecnología de granos. Universidad autónoma de Chapingo, México.
216p.

Ramírez, G.M. 1966. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Ed. CECSA,
México. 300 p.

Ramírez, M. M., J. A. González J.J. Olmos y J. M Márquez 1993. Entomofauna en los
sistemas de almacenamiento de maíz y sorgo de san Juan de los lagos, jal.

Rees, D. 2004. Insects of Stored products. CSIRO. Australia. 181pp.

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.

Trumble, J. T. 1998. IPM: overcoming conflicts in adoption. *Integr. Pest Manage. Rev.* 3, 195–
207.

- Twine, P. H. and Reynolds H. T. 1980.** Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. *J. Econ. Entomol.* 73: 339-242.
- Withe, D. G.** 1995. Insects, mites and insecticides in stored-grain Ecosystems. In: JAYAS, D.S.; WHITE, N,D,; MUIR, W. (Ed). *Stored Grain-ecosystems*. New York: M. Dekker, 1995. P.123-168.
- Vais, H., Williamson, M. S.; Hick, C. A.; Eldursi, N.; Devonshire, A. L. and Usherwood, P. N. 1997.** Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (kdr) to pyrethroids. *FEBS Lett.* 413: 427-332.
- Zhou, Z. H. and Syvanen, M. A. 1997.** A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 187-194.