

Tesis de Posgrado

Caracterización taxonómica, susceptibilidad a insecticidas y resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L) (Coleóptera: Curculionidae) : Plaga del grano almacenado de la República Argentina

Stadler, Teodoro

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Stadler, Teodoro. (1988). Caracterización taxonómica, susceptibilidad a insecticidas y resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L) (Coleóptera: Curculionidae) : Plaga del grano almacenado de la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2165_Stadler.pdf

Cita tipo Chicago:

Stadler, Teodoro. "Caracterización taxonómica, susceptibilidad a insecticidas y resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L) (Coleóptera: Curculionidae) : Plaga del grano almacenado de la República Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2165_Stadler.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Caracterización taxonómica, susceptibilidad
a insecticidas y resistencia a malatión en
Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera : Curculionidae),
plaga del grano almacenado de la
República Argentina.**

Teodoro Stadler

Director
Dr. Eduardo N. Zerba

Lugar de Trabajo
Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas
(CIPEIN)
(CITEFA - CONICET)

- 2.165 -
ef. 2

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1988

**A la memoria de mi Padre
y a mi Madre**

A quién primeramente despertara en mi el interés por la entomotoxicología y me brindara luego la guía, los medios y el apoyo necesario para la realización de este trabajo de tesis. Agradezco sinceramente al Doctor Eduardo N. ZERBA, a quién admiro y respeto como persona y como profesional.

Agradezco también :

A la Dra. M.I. Picollo de Villar y al Dr. E. Wood por su colaboración en algunas de las experiencias realizadas, por su calidez y amistad.

A todo el personal del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) por su continua y desinteresada colaboración, y por haberme aceptado e integrado al Instituto.

Al Dr. D. Boltovskoy por su amistad y sus importantes enseñanzas y colaboración en el manejo de programas de computación.

A Sabina Härtel por su colaboración, apoyo y confianza.

Al Dr. Axel O. Bachmann, por su constante interés, valiosas opiniones, críticas y consejos.

Al Instituto de Investigación de las Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (MACN), a su Director el Dr. J.M. Ballardo y a todo su personal. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). A la firma Kodak Argentina por el procesado de parte del material fotográfico.

...y a todos aquellos que de una u otra manera allanaron el camino que me condujo hasta este punto : a la Dra. A. Aragonés, el Sr. A. Frontera, la Lic. M.M. Schang, a la Dra. G. Esnal y a la secretaria del Dto. Cienc. Biol. FCEyN, la Sra. G. Chiappini.

I N D I C E

INTRODUCCION

I.- TAXONOMIA DE <i>S. oryzae</i>	
I.A.- El status taxonómico de <i>S. oryzae</i>	4
I.B.- Distinción entre <i>S. oryzae</i> y <i>S. zeamais</i>	6
I.B.1.- Diferencias anatómicas en la imago.....	6
I.B.2.- Diferencias anatómicas en las larvas.....	8
I.B.3.- Diferencias biológicas.....	10
I.B.4.- Diferencias bioquímicas.....	14
I.B.4.a.- Serológicas.....	14
I.B.4.b.- Enzimas.....	15
I.B.4.c.- Cutícula.....	18
I.B.4.d.- Feromonas.....	17
I.B.5.- Diferencias etológicas.....	18
II.- ANATOMIA Y FISILOGIA DE <i>S. oryzae</i>	
II.A.- Características anatómicas generales de la especie.....	21
II.B.- Ontogenia y factores que la regulan.....	23
II.C.- Fecundidad.....	31
II.C.1.- Fecundidad y alimentación.....	31
II.C.1.a.- Fecundidad y tamaño del alimento...	31
II.C.1.b.- Fecundidad y características cualitativas del alimento.....	34
II.C.2.- Fecundidad y edad de los individuos.....	35
II.C.3.- Fecundidad y tamaño de los individuos.....	38
II.C.4.- Fecundidad y proporción de sexos.....	38
II.C.5.- Fecundidad y densidad de población.....	40
II.D.- Oviposición.....	45
II.D.1.- Sitio de oviposición.....	45
II.D.2.- Condiciones para la oviposición.....	46
II.E.- Nutrición y metabolismo.....	48
II.E.1.- Nutrición.....	48
II.E.2.- Balance energético.....	51
II.E.3.- Economía del agua.....	55
II.E.4.- Respiración.....	59
II.F.- Simbiosis.....	63
III.- ECOLOGIA - MODELO AMBIENTAL PARA <i>S. oryzae</i>	67

IV.- SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN <i>S. oryzae</i>	
IV.A.- Ensayo biológico.....	69
IV.B.- Insecticidas utilizados en el control de <i>S. oryzae</i>	71
IV.C.- Factores biológicos y ecológicos relacionados con la susceptibilidad a insecticidas en <i>S. oryzae</i> .	72
V.- RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN <i>S. oryzae</i>	
V.A.- Causas bioquímicas y genéticas de la resistencia.....	78
V.B.- Resistencia de <i>S. oryzae</i> a malatión.....	78
V.C.- Características biológicas de las cepas de <i>S. oryzae</i> resistentes a malatión.....	80
VI.- PROPOSITOS DEL PRESENTE TRABAJO.....	81

MATERIALES Y METODOS

1.- CARACTERIZACION DEL MATERIAL BIOLOGICO	
1.A.- Cepas utilizadas : Origen del material biológico.....	84
1.B.- Caracterización anatómica.....	85
1.C.- Caracterización por taxonomía numérica.....	85
1.D.- Caracterización genética.....	86
1.E.- Caracterización bioquímica.....	87
2.- CRIA DE <i>S.oryzae</i>	
2.A.- Alimentación natural.....	91
2.B.- Alimentación artificial.....	92
2.C.- Preferencia alimentaria.....	94
3.- ENSAYO BIOLOGICO - SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS	
3.A.- Anestesia.....	94
3.B.- Sexado de <i>S. oryzae</i>	97
3.C.- Metodología del ensayo.....	97
3.C.1.- Tópico.....	97
3.C.2.- Film.....	100
4.- EVALUACION BIOQUIMICA DE LAS CAUSAS DE RESISTENCIA	
4.A.- Metabolismo - Inhibición de enzimas detoxificantes... 101	
4.A.1.- Inhibición de la actividad carboxiesterásica " in vivo".....	101
4.A.2.- Inhibición de la actividad de las oxidasas (MFO) " in vivo".....	102
4.A.3.- Bloqueo del glutati6n(GHS) " in vivo".....	102

4.B.- Ataque al sitio de acción - Acetilcolinesterasa.....	103
4.B.1.- Medición de la actividad colinesterásica.....	103
4.B.2.- Estabilidad de la enzima.....	104
4.B.3.- Caracterización de la actividad colinesterásica	104
4.B.4.- Inhibición de la actividad colinesterásica.....	105

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- CARACTERIZACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	
1.a.- Cepas utilizadas.....	106
1.b.- Caracterización anatómica.....	107
1.c.- Caracterización por taxonomía numérica.....	112
1.d.- Caracterización genética.....	115
1.e.- Caracterización bioquímica.....	116
2.- CRIA DE <i>S.oryzae</i>	
2.a.- Alimentación natural.....	120
2.b.- Alimentación artificial.....	121
3.- ENSAYO BIOLÓGICO DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS	
3.a.- Anestesia.....	128
3.b.- Sexado.....	131
3.c.- Metodología : tópico y film.....	134
3.d.- Valores de DL ₅₀ de distintos insecticidas.....	138
4.- INFLUENCIA DE DISTINTAS VARIABLES SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS	
4.a.- Estadío.....	140
4.b.- Edad.....	140
4.c.- Sexo.....	142
4.d.- Temperatura.....	143
4.e.- Dieta.....	147
5.- RESISTENCIA A MALATION	
5.a.- Factor de resistencia a malatión.....	149
5.b.- Susceptibilidad a otros insecticidas de las cepas susceptible y resistente.....	151
6.- EVALUACION DE LAS CAUSAS BIOQUÍMICAS DE RESISTENCIA A MALATION	
6.a.- Metabolismo - Efecto de sinergistas.....	152
6.b.- Sitio de acción : Acetilcolinesterasa.....	157
6.b.I.- Caracterización.....	157
6.b.II.- Inhibición por malaoxón.....	180

RESUMEN Y CONCLUSIONES

A.- CARACTERIZACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	163
B.- CRIA DE LAS CEPAS CIPEIN-S Y CIPEIN-RM DE <i>S.oryzae</i>	165
C.- ENSAYO BIOLÓGICO	
C.1.- Anestesia y sexado.....	169
C.2.- Metodología - tópico y film.....	169
C.3.- Susceptibilidad de las cepas CIPEIN a distintos insecticidas.....	170
D.- FACTORES QUE AFECTAN LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN <i>S.oryzae</i>	170
E.- RESISTENCIA A MALATION.....	171
F.- CAUSAS BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA A MALATION	
F.1.- Metabolismo.....	172
F.2.- Sitio de acción.....	173
 BIBLIOGRAFIA.....	 174

Abreviaturas

AChE	:	Acetilcolinesterasa
ATC	:	Acetiltiltiocolina
a_v	:	actividad de vapor de agua
BPP	:	Butóxido de piperonilo
BTC	:	Butiriltiocolina
Cal.	:	Calorías
ChE	:	Colinesterasa
CR	:	Cociente respiratorio
DL ₅₀	:	Dosis letal 50
D°	:	Grados Centigrados/día
F1	:	Primera generación
FR	:	Factor de resistencia
GSH	:	Glutación
GSH-S-T	:	Glutación-S-transferasa
HR	:	Humedad relativa %
L ₁ -L ₄	:	Estadios de la fase larval.
OPs	:	Organofosforados
PTA	:	Acetato de tiofenol
TF	:	Tiempo fisiológico
TOCP	:	Tri-ortocresilfosfato
TPP	:	Tri-fenilfosfato



I n t r o d u c c i ó n

La resistencia a insecticidas, es un fenómeno conocido desde principios de siglo, aunque recién a partir de la finalización de la segunda guerra mundial este hecho adquiere real trascendencia. El desarrollo de resistencia por parte de ciertas poblaciones de especies plaga, coevoluciona cualitativamente con el desarrollo industrial de compuestos fitosanitarios y cuantitativamente con su posterior aplicación. Es así como de año en año se incrementa el número de especies con representantes resistentes, transformando la práctica fitosanitaria en una empresa cada vez más compleja y costosa.

La búsqueda de caminos para revertir o eliminar el fenómeno de resistencia a insecticidas y sus desastrosas consecuencias, es tema de investigación desde hace ya varias décadas. Para lograr aciertos en éste campo y resolver el difícil y siempre latente problema del desarrollo de resistencia en las especies plaga, es indispensable :

- 1.- Definir el fenómeno de resistencia a través del estudio de los mecanismos que conducen a su formación y los procesos enzimáticos relacionados con la degradación de xenobióticos dentro del organismo del insecto.

- 2.- Determinar las causas ecofisiológicas que afectan directamente la magnitud y la velocidad de la evolución del fenómeno de resistencia ; ya que los factores o variables

ambientales y poblacionales, combinados de diferente manera, pueden provocar, promover o retardar el desarrollo de la resistencia.

Reportes de la FAO, citan a *Sitophilus oryzae* (L.) como la más importante plaga del grano almacenado, especialmente en los países con clima tropical y subtropical (Champ & Dyte, 1976). Del último relevamiento mundial sobre resistencia de *S. oryzae* a insecticidas publicado por la FAO (1977), surgen los siguientes datos que ilustran sobre la magnitud y alcances de este problema: De un total de 58 países muestreados, se detectó resistencia a Lindane en 53 ; para Malatión, de 57 países muestreados, se detectó resistencia en 10. En recientes estudios realizados en la Argentina, donde *S. oryzae* es la plaga predominante en el grano almacenado, se determinó resistencia a Malatión, en más del 58% de las cepas muestreadas (Picollo, et al 1985).

Otras especies plaga del grano almacenado como *Tribolium castaneum*, fueron estudiadas en forma intensiva (King & Dawson, 1971) y en la actualidad, se dispone de suficiente información biológica y hasta de cepas de constitución genética conocida, hecho que convierte a *T. castaneum* en un interesante modelo experimental para estudios toxicológicos. Este no es el caso de *Sitophilus oryzae*, para la cuál, inclusive la determinación específica resulta dudosa en ciertas circunstancias. La biología de *Sitophilus oryzae* ha sido estudiada virtualmente en todos sus aspectos, sin embargo, la información disponible es predominantemente puntual. Tampoco se

cuenta, hasta el momento, con cepas caracterizadas, a pesar de la tan frecuentemente citada "variabilidad específica" en relación al ciclo de vida (Satomi,1960; Kiritani,1965; Evans,1982; Thaung & Collins, 1986), respuesta frente a diferentes variedades de alimento (Phadke & Bathia, 1974), (Sharma,1985), etc.

En *Sitophilus* se incluyen tres especies : *S. granarius* (L.), *S. zeamais* Mots. y *S. oryzae* (L.) la especie tipo. La identificación de *S. granarius* de las demás especies a través de sus características morfológicas es clara, pero no así la de las dos especies restantes. Antes del trabajo de Kuschel, 1961, se consideraba a *S.oryzae* y a *S.zeamais* como dos cepas o formas diferentes de *S. oryzae* (Birch,1944), que en general se encontraban asociadas dentro de las mismas muestras (Kiritani, 1965). Es así que en muchos de los trabajos toxicológicos sobre *S. oryzae*, el material biológico no fue precisamente definido, tanto en los anteriores como los posteriores a 1961. El actual estado de los conocimientos sobre *S.oryzae* -a través de la bibliografía existente, algunas veces confusa y contradictoria- y la necesidad de caracterizar el material biológico antes de realizar cualquier tipo de estudio toxicológico, hacen oportuna en primer lugar, una actualización de la información sobre esta especie.

I.- TAXONOMIA DE *Sitophilus oryzae***I.A.- EL STATUS TAXONOMICO DE *S.oryzae***Familia **C u r c u l i o n i d a e**Subfamilia **C a l a n d r i n a e**Género **S i t o p h i l u s** Schoenherr,1838

Sitophilus oryzae (Linne,1763)**Sinonimias:****Curculio oryza** Linnaeus,1763, Amoen.Acad., 6 :395**Curculio frugilegus** DeGeer,1775, Mem.Hist.Ins. ,5 :273**Calandra oryzae var.funnebris** Rey,1895, L.Echange.,11 :50**Calandra oryzae var.minor** Sasaki,1899, Ins.I.Jap.cr.,10ed.:485**Calandra sasakii** Takahashi,1928, Ins.inj.field cr. :164**Sitophilus sasakii** Floyd & Newsom,1959, Ann.ent.Soc.Amer.,52 :694

En 1959 la Comisión de Nomenclatura Zoológica, a través de la OPINION 572 suprime el nombre genérico *Calandra* Clairville & Schellenberg, 1798 y coloca el nombre *Sitophilus* Schoenherr, 1838 en la lista oficial, especie tipo por designación original, *Curculio oryzae* Linnaeus, 1763 (Nombre Nº1375). Por otra parte, bajo los poderes plenarios de dicha comisión <(1)(c), opinión 572>, enmienda el nombre específico *oryza* Linnaeus, 1763, colocando el nombre *oryzae* en la lista oficial.

Richards, 1944 y Birch 1944, 1946, encuentran dentro de las muestras de *S. oryzae*, dos formas o tipos de individuo distintas -no identificables a través de características morfológicas-, denominándolas : "small strain and large strain of *C. oryzae*". Esta denominación permaneció inalterada, hasta que

finalmente Floyd & Newsom, 1959, encuentran diferencias anatómicas de suficiente peso, como para asignarle a estas dos formas el rango de especies, denominando *S. oryzae* (L.) a la forma "grande" y *S. sasakii* Takahashi, a la "pequeña". Con el trabajo de Floyd & Newsom, 1959, quedó aclarado el aspecto taxonómico, pero no el nomenclatorial. Esta situación es aclarada finalmente por Kuschel, 1961. Este autor, establece que la cepa "pequeña" es la originalmente descrita por Linne, *S. oryzae*, y la cepa "grande", *S. zeamais* Motschulsky, 1855.

La identificación de *S. granarius* a través de sus características morfológicas externas es sencilla, inclusive cuando se trata de material vivo. Este no es el caso cuando se pretende separar a *S. oryzae* de *S. zeamais*, ya que es indispensable recurrir a la disección para una correcta determinación. El especial interés en separar a estas dos especies, o definir correctamente el material biológico, se debe a la superposición geográfica y ecológica de *S. oryzae* y *S. zeamais*, que en general, se encuentran asociadas dentro de las muestras. Las frecuencias relativas para *S. oryzae* son de : 5,0 en cebada, 1,0 en trigo, 0,3 en arroz, 0,1 en maiz y 0,04 en oleaginosas (Kiritani, 1965a).

Dispersa en la literatura, puede encontrarse abundante información, que permite la revisión completa y detallada de las diferencias entre ambas especies, considerando los aspectos anatómicos, fisiológicos, bioquímicos, ecológicos y comportamentales.

I.B.- DISTINCION ENTRE *S. oryzae* y *S. zeamais*.

I.B.1.- Diferencias anatómicas en la imago

Floyd y Newson, 1959, encontraron a nivel de los genitales de *S. oryzae* y *S. zeamais*, una serie de diferencias morfológicas que permiten separar a ambas especies. Entre las hembras, la diferencia radica en la forma del octavo esternito (spiculum ventral y hemiesternitos fusionados), que se encuentra reducido a una estructura en forma de Y (Fig: 1 c). En los machos, la diferencia se observa en el esclerito (placa basal) ubicado en la unión del aedeagus y los apodemas basales (Fig: 1 a). Según Halstead, 1963, el amplio margen de variabilidad de la forma de la placa basal en el macho y del octavo esternito en la hembra, le restan valor diagnóstico a estas estructuras. Kuschel, 1961, encuentra características diferenciales en la superficie del aedeagus de los machos, que en una de las especies es lisa mientras que en la otra presenta dos surcos longitudinales (Fig: 1 b). Proctor, 1971 observa que el aedeagus de *S. zeamais* es más curvado en su extremo distal, sin embargo el valor diagnóstico de éste carácter es relativo, dada su variabilidad. Finalmente, Bordeaux, 1969, encuentra diferencias entre ambas especies a nivel de los proepimeros, la ornamentación del pronoto y de las elevaciones escutelares. Este autor sugiere además que a través de cinco características externas "típicas", es posible separar a *S.oryzae* de *S.zeamais* ; pero encuentra por otra parte, ejemplares con caracteres intermedios o "formas

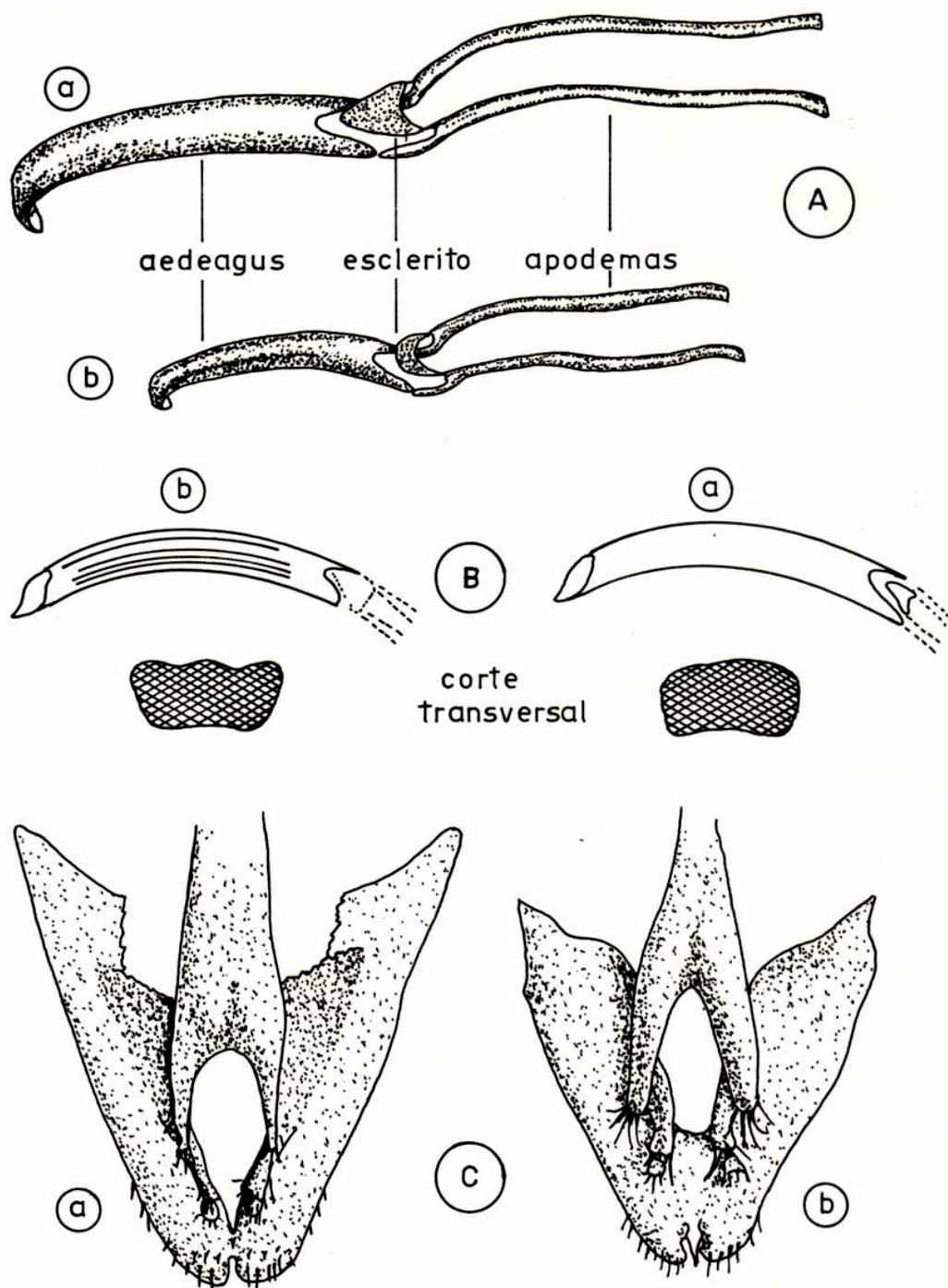


Fig: 1.- A. aedeagus, esclerito y apodemas. B.- aedeagus, vista dorsal. C.- octavo esternito de : (a) *S.oryzae* y (b) *S. zeamais*.

cuestionables", que presentan todas las posibles combinaciones de esas cinco características.

A la luz de los actuales conocimientos sobre la morfología externa de *S. oryzae* y *S. zeamais*, cabe destacar que :

- 1.- La separación de ambas especies a partir de la anatomía externa de las imagines continúa siendo un hecho cuestionable.
- 2.- Solamente los genitales del macho permiten la identificación morfológica precisa.

I.B.2.- Diferencias anatómicas en las larvas

El trabajo de Hossain & Verner, 1979, es un valioso aporte a la taxonomía de *Sitophilus*, y permite separar las especies a través de la anatomía de las piezas bucales de las larvas del cuarto estadio, mediante la siguiente clave.

- 1.- Varas epifaringeas (Fig:2.) delgadas, de ancho más o menos uniforme. Palpos labiales con más de tres setas papiliformes en el ápice..... 2
 - Varas epifaringeas (Fig:2c) de ancho no uniforme, con su región anterior angosta y la basal más ancha. Palpos labiales (Fig:3c) con muy pocas (en gral. 3) setas papiliformes en el ápice.....*S.zeamais* Mot.
- 2.- Palpo labial (Fig:3b) con más (en general 8) setas papiliformes en el ápice, y dos pares de setas cerca del margen distal de la ligula.....*S.oryzae* (L.)
 - Palpo labial (Fig:3a) con menos (en gral. 5) setas papiliformes en el ápice, y un par de setas cerca del margen distal de la ligula.....*S.granarius*(L.)

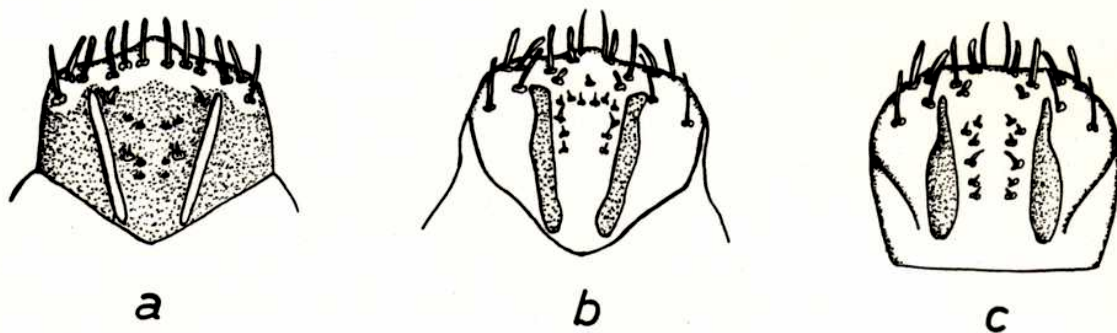


Fig: 2. Vista dorsal (interna) de la epifaringe en : (a).- *S. granarius*, (b).- *S. oryzae*, (c).- *S. zeamais* (de Hssain & Verner, 1979)

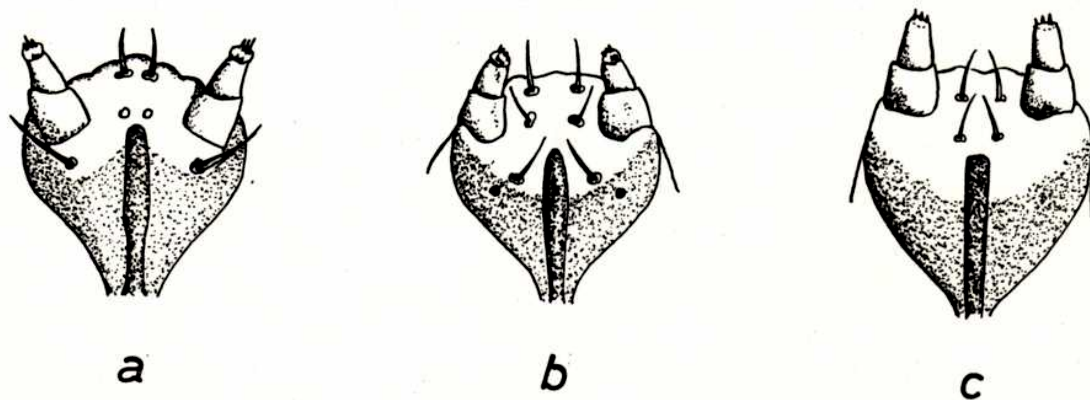


Fig: 3. Vista ventral del labium en : (a).- *S. granarius*, (b).- *S. oryzae*, (c).- *S. zeamais* (de Hssain & Verner, 1979)

I.B.3.- Diferencias biológicas

Las especies de *Sitophilus* poseen características comunes durante su ontogenia. La hembra roe un hueco en el grano, deposita allí un único huevo y obtura finalmente el sitio mediante una secreción mucilaginosa. Con frecuencia se encuentra más de una oviposición por grano, aunque como consecuencia del canibalismo entre las larvas, un sólo individuo completa su desarrollo. *Sitophilus* tiene cuatro estadios larvales que viven en interior del grano, alimentándose del endosperma y del germen. Al finalizar la fase larval, la L₄ obtura el extremo del túnel con una mezcla de excreta y secreciones hasta formar la celda pupal, donde atraviesa por los estadios : prepupal, pupal y de pre-imago. La imago permanece durante algún tiempo dentro de la cámara pupal antes de emerger y la duración de éste período depende de la temperatura.

Sobre la base de los resultados de varios autores, que trabajaron bajo condiciones experimentales similares (25°C a 27°C y 70% H.R.), es posible comparar el desarrollo ontogenético de las tres especies en función de la duración de cada una de las fases (Tabla: 1.).

Duración de los estadios larvales en días

Especie	Autor	huevo	larva total	pupa	pre-imago	total
<u>S. granarius</u>	A	7,0	19,8	8,4	6,5	41,7
	B	4,5	24,0	8,0	-	(36,5)
	C	5,0	24,5	10,5	5,0	45,0
	D	5,0	22,0	16,0	-	43,0
<u>S. oryzae</u>	A	7,0	19,1	6,3	4,6	37,0
	D	4,0	22,0	14,0	-	40,0
	E	4,3	18,4	8,3	3,0	34,1
<u>S. zeamais</u>	A	6,5	18,1	6,3	5,3	36,2
	F	6,1	21,6	6,9	5,7	40,3

Tabla 1.: Duración en días de las fases del ciclo de vida de las especies de *Sitophilus*, según diferentes autores. A.- Sharifi & Mills, 1971; B.-Eastham & Segrove, 1947; C.-Richards, 1947; D.-Khan, 1948; E.-Birch, 1945; F.-Howe, 1952.

Diferencias significativas en la duración de cada fase de los ciclos de vida de *Sitophilus*, se observan en los estadios de pupa y pre-imago. A 27°C y 70% de humedad relativa, el ciclo de *S. granarius* es más largo que el de las restantes especies del género. En general, los resultados de las experiencias de Birch, 1945, son esencialmente similares a los de Sharifi & Mills, 1971, mientras que Eastham & Segrove, 1947, describen un ciclo más corto para *S. granarius* (estos autores no consideran la fase

pre-imago). Los resultados de Khan, 1948, coinciden con los de Sharifi & Mills, 1971 para *S. granarius*, mientras que sus observaciones sobre *S. oryzae*, no concuerdan con las de los demás autores. Sharifi & Mills, 1971 describen, para *S. zeamais*, una ontogénesis más corta que la propuesta por Howe, 1952 y ello se debe probablemente a la diferencia en la temperatura de incubación (Howe, 1952 = 25°C ; Sharifi & Mills, 1971 = 27°C).

S. oryzae y *S. zeamais* muestran básicamente patrones de respuesta similares para diferentes condiciones de temperatura y humedad durante la incubación. Deben destacarse especialmente las diferencias intraespecíficas -por ejemplo, entre razas geográficas- que pueden afectar en hasta 10% la duración de la ontogénesis. Por otra parte, Kiritani, 1965, en condiciones constantes (30°C , 73%HR) y utilizando diferentes tipos de sustrato (trigo, arroz y maíz), determina que: independientemente del origen geográfico de la cepa, el desarrollo ontogenético de *S. zeamais* es más corto en arroz que el de *S. oryzae* sobre el mismo sustrato. También se encuentran en la literatura algunas consideraciones acerca de la variación en la duración del período de desarrollo en función de la edad de los padres (Howe, 1967, Golebiowska, 1969 y Evans, 1977); pero por el momento, son insuficientes los datos experimentales publicados sobre el tema.

Las especies de *Sitophilus* también difieren entre sí en cuanto a su predilección por diferentes sustratos (Tabla: 2.). *S. granarius* muestra una marcada preferencia por oviponer en trigo, luego arroz, maíz y finalmente sorgo. *S. zeamais* prefiere

oviponer en maíz, luego en trigo, arroz y finalmente sorgo. *S. oryzae* es fuertemente atraído por trigo, seguido por arroz, pobremente por el sorgo y finalmente por el maíz. La distribución de los huevos de estas tres especies en los cuatro cereales difiere con un alto grado de significancia.

ESPECIES	OVIPOSICION			
	Trigo	Arroz	Maíz	Sorgo
<i>S. granarius</i>	469	123	94	42
<i>S. zeamais</i>	296	172	345	62
<i>S. oryzae</i>	286	148	40	87

Tabla 2.: Número total de huevos puestos por 160 hembras en 560 granos de cuatro cereales diferentes, en 48 horas ($P < 0.001$) (Bishara, 1967).

Las discrepancias entre los diferentes autores, sobre la duración de la ontogénesis en las diferentes especies, se deben sin lugar a dudas a la interacción de una serie de variables, que no fueron completamente preestablecidas en la metodología de cada trabajo, y que afectan sensiblemente el tiempo de desarrollo. Estas son: a.- Temperatura y humedad ; b.- Alimento (desde el punto de vista cuali y cuantitativo) ; c.- Cepa ; d.- densidad

de población ; e.- proporción de sexos (padres) y f.- simbiosis. Cada uno de estos puntos serán discutidos en profundidad, al tratar los aspectos relacionados con los factores que regulan el desarrollo ontogenético de *S.oryzae* (II.B).

I.B.4.- Diferencias bioquímicas

I.B.4.a.- Serológicas

McLaurin & Downe, 1966, identificaron y separaron a las especies de *Sitophilus* mediante la prueba de la precipitina. Esta técnica serológica, fue utilizada anteriormente por otros autores en el campo de la entomología, para identificar especies e indicar su posición taxonómica relativa (Leone, 1947; Lawlor, 1949; West et al, 1959; Downe, 1953). McLaurin & Downe, 1966, utilizaron los extractos libres de células de las tres especies de *Sitophilus* como antígenos, obteniendo los antisueros a partir de conejos inoculados con los respectivos antígenos. Las diferencias serológicas observadas coinciden con las conclusiones de los estudios de morfología comparada sobre las tres especies, realizados por otros autores (Floyd & Newson, 1959; Kushel, 1961; Bordeaux, 1969 y Proctor, 1971). Es decir:

- 1.- *S. oryzae*, *S.zeamais* y *S.granarius* se comportan como tres especies.
- 2.- *S.oryzae* y *S.zeamais* se encuentran antigenicamente muy próximos y distan claramente de *S. granarius*.

I.B.4.b.- Enzimas

Otra diferencia bioquímica entre las especies, importante desde el punto de vista adaptativo, es la actividad específica media de las alfa-amilasas. Baker & Woo, 1985, obtuvieron en extractos de homogenatos, actividades específicas de : $11,8 \pm 0,3$, $4,3 \pm 2,0$; $1,5 \pm 0,2$ unidades/mg de proteína para *S. oryzae*, *S. granarius* y *S. zeamais* respectivamente. Los elevados niveles de amilasas, le otorgan además a *S. oryzae*, una ventaja adaptativa frente a *S. granarius* y *S. zeamais* cuando se desarrollan sobre trigo -como lo demuestran las experiencias sobre competencia interespecífica de Tripathi & Hodson, 1981- , debido a la mayor disponibilidad de la enzima en presencia de los inhibidores de alfa-amilasas del sustrato. Sin embargo, el nivel de alfa-amilasas no es siempre el factor determinante de la superioridad competitiva de cierta especie, ya que por ejemplo, *S. zeamais*, con bajos niveles de amilasas, se desarrolla más rápidamente que *S. granarius* sobre trigo, maíz y cebada. Así también, los niveles de amilasas medidos en adultos de *S. oryzae*, *S. granarius* y *S. zeamais*, no siempre se encuentran correlacionados con su tasa de crecimiento sobre diferentes sustratos, o con la susceptibilidad del sustrato al ataque de las diferentes especies. De aquí puede concluirse que:

- 1.- Existen claras diferencias, desde el punto de vista cuantitativo, en el contenido de amilasas en las especies de *Sitophilus*. Los niveles de enzima en *S. oryzae* son alrededor de diez veces superiores a los de *S. zeamais*.

2.- Niveles altos de alfa-amilasas representan una ventaja desde el punto de vista adaptativo, pero no se correlacionan con la tasa de crecimiento de una población sobre cualquier tipo de sustrato.

I.B.4.c.- Cutícula

Insectos de especies congénéricas se caracterizan por la similitud, desde un punto de vista cuali y cuantitativo, de sus carbohidratos cuticulares (Lockey, 1980). El contenido de hidratos de carbono en la cutícula de *S. zeamais* es 2 y 3 veces superior al de *S. oryzae* y *S. granarius* respectivamente (Baker et al, 1984a). También los lípidos cuticulares difieren cuantitativamente entre *S. zeamais*, con 2,5 μg por individuo y *S. oryzae* con 1,6 μg por individuo.

Los estudios de Baker et al, 1984b sobre el contenido de alcanos y olefinas (n-alquenos y n-alcadienos) en extractos cuticulares de *Sitophilus*, muestran que entre *S. oryzae* y *S. zeamais* las diferencias no son significativas desde el punto de vista cuantitativo. Los n-alquenos y n-alcadienos, constituyen 72% de la fracción total de carbohidratos de *S. oryzae* y *S. zeamais*, y solamente 55% de la fracción total en *S. granarius*, característica que también se correlaciona con la posición taxonómica relativa de las tres especies.

I.B.4.d.- Feromonas

La presencia de feromonas de agregación en *Sitophilus* fue sugerida por diferentes autores (Sutrees, 1964; Donat, 1970; Sharma & Deora, 1980), hasta que Phillips & Burkholder, 1981 demostraron su existencia a través del bioensayo. Luego, Schmuff et al. 1984, identificaron químicamente la feromona, nominandola *sitophilure*. Los espectros de masa de los extractos de *S. oryzae*, así como de *S. zeamais*, sugieren que se trata de una única substancia de PM=144, cuya fórmula es $C_{10}H_{14}O_2$. El *sitophilure*, es una (R*, S*)-5-hidroxi-4-metil-3-heptanona de composición enantiométrica desconocida (Phillips et al, 1985), para la cual *S. zeamais* y *S. oryzae*, muestran una elevada atracción interespecífica. En *S. granarius* en cambio, ambos sexos responden por igual a los extractos de *S. zeamais*; pero solamente las hembras muestran una respuesta significativamente alta ante los extractos de *S. oryzae*. Por otra parte, *S. oryzae* y *S. zeamais* no experimentan agregación en presencia de extractos de *S. granarius* (Walgenbach et al, 1983).

La función de la *sitophilure* es compleja y probablemente su liberación se relaciona con la alimentación y/o reproducción, promoviendo la agregación de los conoespecíficos en sitios con condiciones óptimas. Las hembras vírgenes de *Sitophilus* muestran una respuesta significativamente mayor a la feromona que las fecundadas, y los machos copulan varias veces a lo largo de su vida, sin que se altere la continuidad de la liberación de la hormona. Este hecho sugiere la función sexual de la hormona

(Walgenbach et al, 1983), aunque ésta sea probablemente sólo secundaria. La *sitophilure* parece tener especial importancia en la alimentación, como ocurre en otros coleópteros (Birch, 1978) donde la agregación beneficia al iniciador, cuando la fuente de alimento no es asequible sin el esfuerzo conjunto de varios individuos.

La información disponible sobre el *sitophilure*, no permite hasta el momento, considerar a esta substancia como un elemento diferencial entre las especies. Solamente el bioensayo sugiere la mayor afinidad interespecífica de *S. zeamais* y *S. oryzae* por esta hormona y cabe esperar que futuras investigaciones sobre la estructura de ésta substancia, establezcan su valor taxonómico.

I.B.5.- Diferencias etológicas

Las especies de *Sitophilus* muestran un comportamiento particular para el vuelo. *S. granarius* posee alas rudimentarias y se encuentra incapacitada para volar. *S. oryzae* no es un hábil volador (Kiritani, 1959) en comparación con *S. zeamais*. El vuelo es inducido por la temperatura y la intensidad de luz en ambas especies (Bishara, 1968), y en general la frecuencia de vuelos en ambos sexos es mayor en *S. zeamais*. Por otra parte, *S. oryzae* es incapaz de volar hasta las dos semanas de edad, mientras que *S. zeamais* puede hacerlo antes de las dos semanas, aunque no con la eficiencia de un individuo de cuatro semanas (Bishara, 1968).

Otra de las diferencias fundamentales entre *S. oryzae* y *S. zeamais* es su ciclo anual y el período de hibernación que atraviesa *S. zeamais*. Grán parte de los adultos de *S. zeamais* abandonan el grano almacenado a principios del otoño para pasar el invierno bajo maderas o piedras, fuera de los silos. Los adultos de *S. oryzae* en cambio, mueren durante el invierno (en recintos no calefaccionados) y sólo las larvas sobreviven dentro del grano (Takahasshi, 1931). Kiritani, 1965, sostiene que *S. zeamais* presenta una generación anual más, en comparación con *S. oryzae* y propone el siguiente modelo para el ciclo anual de ambas especies:

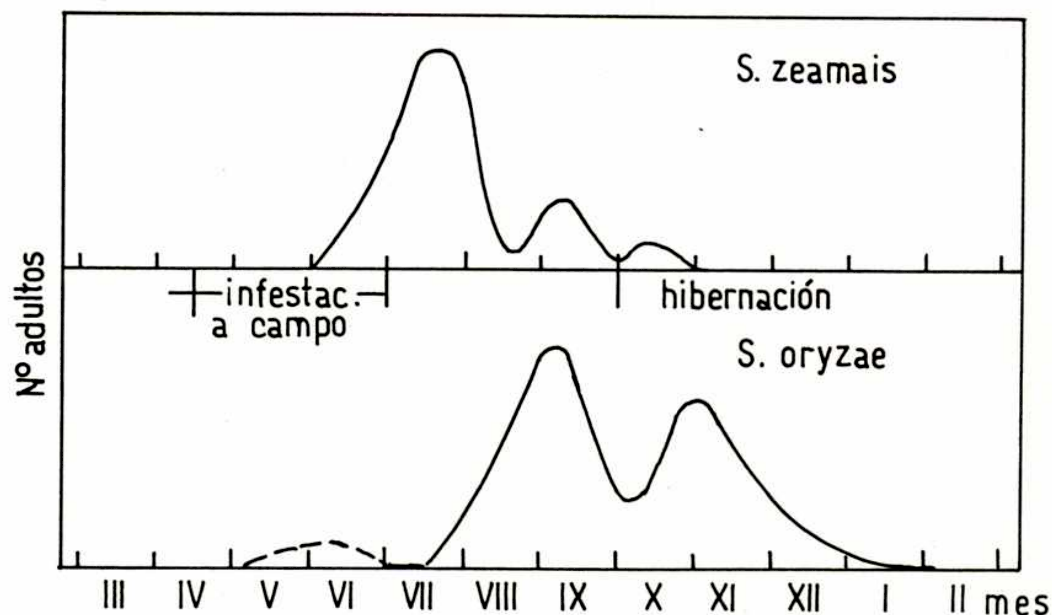


Fig 4.: Modelo del ciclo anual de *S. oryzae* y *S. zeamais*.
(Datos originales de Kiritani, 1965 para Wakayama, Japon)

El hábitat de *S. oryzae* está restringido al grano almacenado y a una ambiente más seco y fresco, mientras que *S. zeamais* desarrolla parte de su ciclo fuera de los silos e infesta el grano antes de la cosecha. *S. zeamais* presenta requerimientos de humedad y temperatura más altos que *S. oryzae*, de aquí su preferencia por zonas tropicales (Kiritani, 1956, 1957 ; Yoshida et al, 1958) y en áreas más secas y frías, queda usualmente restricto al maíz como único hospedador (Champ & Dyte, 1976). En resumen, cabe destacar que:

- 1.- *S. oryzae* adquiere la capacidad de volar dos semanas después de abandonar la cámara pupal y es un volador menos hábil que *S. zeamais*.
- 2.- El hábitat de *S.oryzae* está restringido al grano almacenado, la imago no hiberna y tampoco requiere que parte de su ciclo se cumpla fuera del silo.
- 3.- La distribución geográfica de *S. oryzae* abarca zonas más frías y secas, por debajo de los límites óptimos establecidos para *S. zeamais*.

II.- ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE S. oryzae

II.A.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS GENERALES DE LA ESPECIE

Huevo: Color marfil, oval, de 460μ - 700μ de largo y 240μ - 300μ de ancho. Los huevos son colocados en forma individual en un hueco roído por la hembra en la semilla, que es obturado finalmente mediante una secreción mucilaginosa. El desarrollo embrionario requiere entre 4 y 7 días a 25°C - 27°C y 70% HR (Sharifi & Mills, 1971; Khan, 1948; Birch, 1945).

Larva: Presenta cuatro estadios larvales (Howe, 1962) que se diferencian claramente a través de las medidas de la cápsula cefálica. Las larvas son blancas, marcadamente convexas dorsalmente y planas en su parte ventral, la segmentación no es precisa, solamente los primeros tres segmentos abdominales se encuentran divididos en pre-tergo, tergo y post-tergo, y la zona hipopleural no posee setas (Sherf, 1964). Su desarrollo transcurre dentro de la semilla y requiere entre 22 y 18 días a 25°C - 27°C y 70% HR (Sharifi & Mills, 1971; Kaan, 1948; Birch, 1945).

Para la distinción de los estadios larvales a través del ancho de la cápsula cefálica, es recomendable utilizar el criterio de Ryoo, 1983, con las siguientes medidas :

Larva	ancho cápsula cefálica en mm
I	0,15 - 0,25
II	0,26 - 0,36
III	0,37 - 0,47
IV	0,48 - 0,65

Pre-pupa: Al finalizar su desarrollo, la larva del cuarto estadio, construye una celda pupal dentro de la semilla, en el extremo del túnel. La cavidad es tapizada con una mezcla de secreciones y material de desecho, que forma finalmente una cápsula rígida (Cotton, 1920). Completado este proceso, la larva se vuelve inactiva y se estira, perdiendo su apariencia globosa.

Pupa: Las pterotecas II sobrepasan en longitud a las I. Cada segmento abdominal porta una corona de setas. Extremo del femur con una seta. Pseudocercos agudos y pequeños (Sherf, 1964).

Pre-imago: Al igual que la pre-pupa, la pre-imago es una forma de transición, que algunos autores citan como: "adulto dentro del grano" (Richards, 1947). Este estadio puede distinguirse especialmente en su primera fase. Las alas aún no se encuentran plegadas y la pigmentación es pobre, debido a que el proceso de curtido de la cutícula finaliza varias horas después de abandonar el grano.

La duración y características de este estadio son de especial importancia, ya que deben ser considerados en aquellos

estudios, donde la duración de las diferentes fases de la ontogenia son indicadoras de factores limitantes del desarrollo.

Imago: La publicación de Linne, 1763, así como la de Cotton, 1920, aportan suficiente información sobre la morfología general de la imago de *S. oryzae*. Otros autores se ocuparon de algunos aspectos de la anatomía interna de esta especie, y pueden encontrarse en la literatura, los datos completos sobre la morfología de : sistema digestivo (Mukharaji & Singh, 1971); reproductor (Khan & Musgrave, 1969), (Mari, 1982), (Mahanta, 1983) y células neurosecretoras laterales (Sandifer & Tombes, 1972). Otros caracteres taxonómicos relevantes fueron discutidos en párrafos anteriores, al tratar las diferencias entre *S. oryzae* y *S. zeamais*.

II.B.- ONTOGENIA Y FACTORES QUE LA REGULAN

El desarrollo ontogenético de *S. oryzae* es regulado principalmente por la humedad y la temperatura, cuyas influencias son especialmente evidentes durante el desarrollo embrionario y larval.

El efecto de la humedad relativa (HR) sobre los diferentes estadios durante la incubación, es variado (Eastman & Segrove, 1947). La humedad del alimento y del ambiente afectan sensiblemente el desarrollo de las larvas, y en menor escala al de embriones y pupas. En las fases que no se alimentan (embrionaria y pupal), el balance del agua es positivo ya que el metabolismo es

principalmente catabólico. En cambio, en la fase que se alimenta y crece rápidamente (larval), predominan los procesos anabólicos y la demanda de agua aumenta.

Las investigaciones más precisas sobre este tema pertenecen a Birch 1944b, 1945b, Hadman, 1978 y Howe, 1952. Birch, 1944b, determinó que la mortalidad de los embriones de *S. oryzae* es mínima a 20°C y 90% HR, y que 15°C a 34,5°C son los límites dentro de los cuales el embrión logra completar su desarrollo (Fig: 5.). La mortalidad embrionaria aumenta drásticamente cerca del límite superior, siendo ésta de 20% a 34,0°C y de 100% a 34,5°C (Fig: 6.).

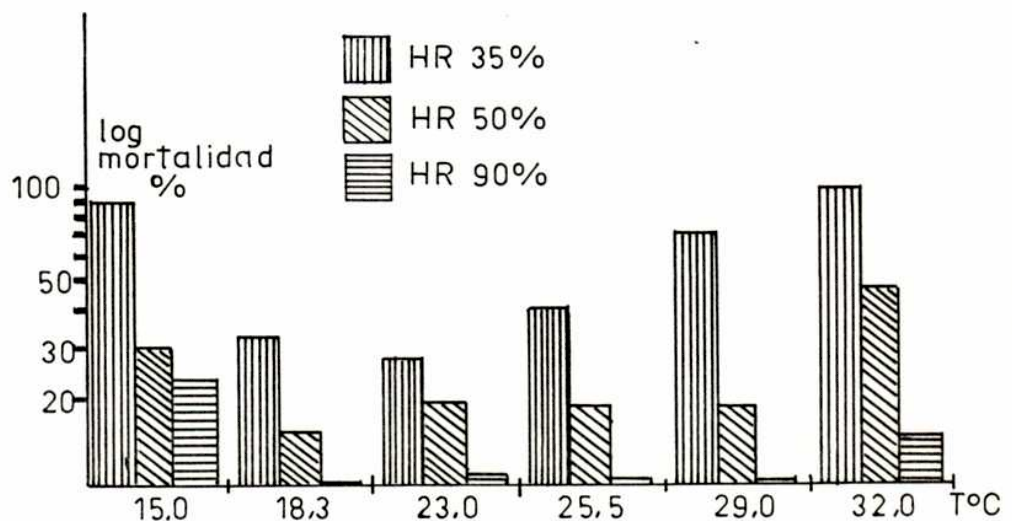


Fig.5 : Mortalidad del embrión de *S. oryzae* a diferentes combinaciones de temperatura y humedad relativa (datos Birch, 1944).

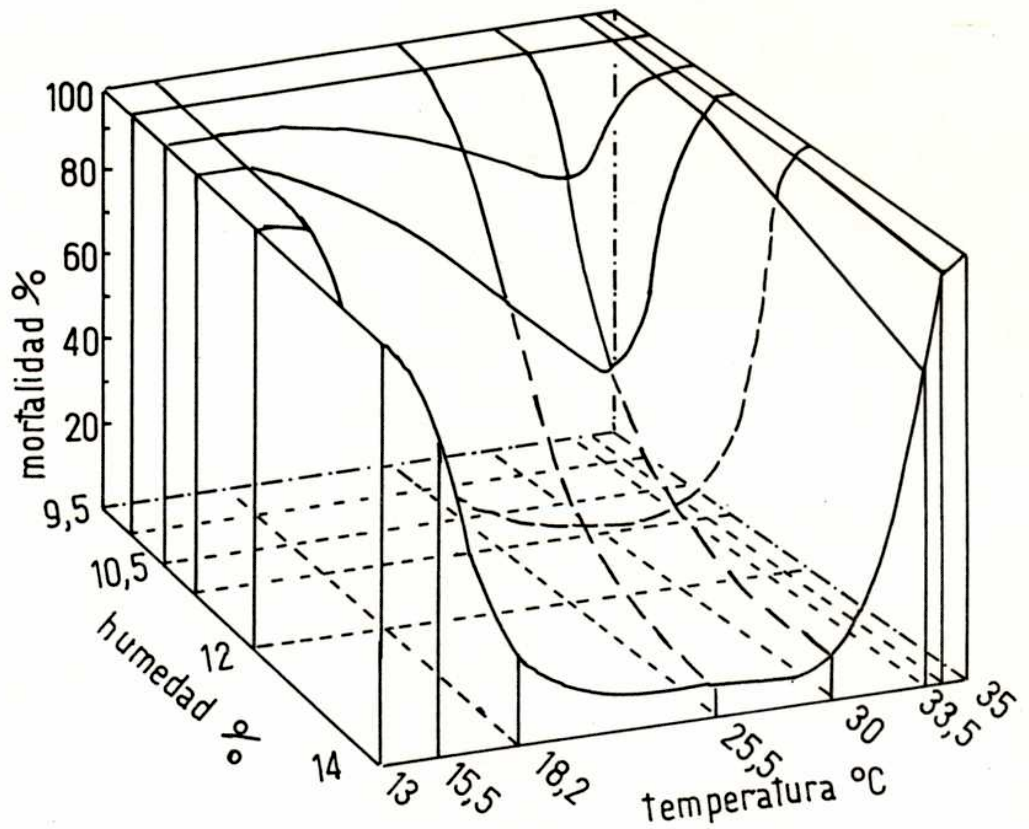


Fig.6 : Influencia de la temperatura y el contenido de humedad del grano sobre la mortalidad de los estadios inmaduros de *S. oryzae* (Birch, 1945b).

La fase más sensible a cambios de temperatura y humedad en el ciclo de vida de *S. oryzae*, es la larval y su primer estadio muestra los índices de mortalidad más elevados. En condiciones suficientemente favorables para la supervivencia de la L_1 , la mortalidad de los estadios subsiguientes es prácticamente nula (Birch, 1945b). Ryoo, 1986, obtiene valores de r (tasa intrínseca de aumento natural semanal) similares a los calculados

por Birch y Howe, aunque sus experiencias (sobre un alimento aparentemente inadecuado), le asignan los mayores índices de mortalidad a los estadios L_3 y L_4 .

Los porcentajes de mortalidad de las fases inmaduras son menores entre 20°C y 30°C con una HR de 60% y el rango óptimo para el desarrollo es 24°C a 30°C (Howe, 1965).

La temperatura, así como el tipo de alimento, influyen sobre el valor de r de la población, como puede verse en la Tabla 3. Longstaff & Evans, 1983 definen también la tasa finita de crecimiento (λ) de la población : 1,495, 1,767 y 2,011 por semana, con un tiempo de generación de 13,4, 12,2 y 8,9 semanas respectivamente, para 21°C, 24°C y 30°C.

Temp.°C	r	Alimento	Autor
15°C	0,0718	trigo	Evans, 1982
18°C	0,2685	trigo	Evans, 1982
21°C	0,4498	trigo	Evans, 1982
20°C	0,1759	arroz pulido	Ryoo, 1986
25°C	0,3242	arroz pulido	Ryoo, 1986
30°C	0,4789	arroz pulido	Ryoo, 1986
30°C	0,762	trigo	Birch, 1948
30°C	0,575	trigo	Singh et al, 1973

Tabla 3.: Valores de r (tasa intrínseca de aumento natural-semanal de una población) según distintos autores, para diferentes temperaturas.

En la tabla 3., son de destacar, las diferencias en los valores de r para los distintos substratos. Al tratarse de substratos y temperaturas iguales, las diferencias observadas, se deben principalmente al origen de las cepas (no deben descartarse las influencias de otras componentes como por ejemplo, el contenido de agua del alimento o la densidad de población inicial en cada uno de los cultivos). Evans, 1977a muestra claramente este hecho, al determinar la tasa reproductiva neta (R_0) sobre diferentes cepas a temperatura y humedad constantes (Tab 4.).

Lugar de origen	R_0
Queensland (Australia)(1)	19,2
Queensland (Australia)(2)	33,4
Tasmania (1)	45,3
Tasmania (2)	31,8
Victoria (Australia)	28,1
West Australia (3)	39,9
West Australia (4)	57,7
Camberra (Australia) (2)	23,0

Tabla 4.: Tasa reproductiva neta ($R_0 = \sum l_x \cdot m_x$) para varias cepas de *S. oryzae*, criados a 15°C y 70% HR (Evans, 1977a)

Los múltiples efectos de la temperatura y la humedad sobre una población de *S. oryzae*, también pueden observarse puntualmente

sobre una población de imagines, donde estas variables afectan especialmente la mortalidad y el período de oviposición.

Sobre la base de los datos obtenidos por diferentes autores, es posible establecer la temperatura a la cual el tiempo de sobrevida de la imago es máximo (Longstaff, 1981).

Aut.	Temp. °C	Humedad Relativa %					
		45%		55%		70%	
		Semana	TF	Semana	TF	Semana	TF
a	15	-	-	-	-	51	1,75
a	18	16	2,0	-	-	32	4,0
a	21	12,7	3,6	-	-	14	4,0
b	24	-	-	21	4,25	25	5,0
a	27	10,8	3,0	-	-	22	6,0
b	27	-	-	16	4,0	28	7,0
c	29,1	-	-	-	-	17	4,25
b	30	-	-	20	5,0	-	-
b	32,3	8,3	2,0	12	3,75	16	3,8
b	33	-	-	-	-	13	3,0
c	34	8	1,6	-	-	11	2,2

Tabla 5.: Datos de mortalidad media para diferentes valores de temperatura y humedad (Longstaff, 1981). (a) Evans, 1977, (b) Longstaff, 1981, (c) Birch, 1953a.

En términos absolutos, los valores máximos de longevidad se obtienen a las más bajas temperaturas experimentadas : 51 semanas a 15°C (Tabla 5.). Sin embargo, si los datos son transformados a una escala de tiempo fisiológico (TF) (basada en la duración de la fase inmadura, donde 1,0 equivale a la duración de la fase inmadura bajo las condiciones establecidas), el cuadro que se observa es totalmente diferente. El pico de longevidad coincide con el valor de la temperatura óptima -TF = 4,25 a 29,1°C-. La tasa de oviposición en *S. oryzae* se reduce con la disminución de la temperatura y la humedad (Fourie, 1967), por otra parte, las condiciones ambientales durante el desarrollo larval tienen el efecto inverso sobre la fecundidad de la generación siguiente de adultos. Las larvas consumen mayor cantidad de alimento a bajas temperaturas (18°C y 22°, con HR de 12%) que a temperaturas altas (26°C y 30°C, HR 14%), dando origen a adultos de mayor tamaño, y valores de fecundidad es más elevada. La fecundidad se encuentra correlacionada con el peso corporal, y las poblaciones criadas a temperaturas próximas al límite inferior (15°C), tienden a producir una mayor proporción de individuos grandes (McFarlane, 1968); de esta manera, el promedio de la productividad también aumenta y es mayor que el esperado para esas condiciones (Tabla 6.). Gráficamente, puede verse en la Fig.7. el incremento de la población en función de la temperatura y la humedad.

Temperatura °C	Humedad Relativa		
	45%	55%	70%
15,0	-	-	363 ○
18,0	242 ○	-	395 ○
21,0	335 ○	-	407 ○
23,0	-	150 #	499 #
24,0	-	454 ○	644 ○
25,5	134 #	-	720 #
26,0	304 <	340 <	519 <
27,0	-	513 ○	527 ○
29,1	123 #	140 #	643 #
30,0	-	507 ○	367 ○
32,3	-	340 ○	369 #
33,5	-	37 #	51 #
35,0	-	-	9 #

Tabla 6.: Número total de huevos puestos durante la fase reproductiva de la hembra a diferentes temperaturas y humedad relativa. (#) Birch, 1945b, (<) Hardman, 1978, (○) Longstaff, 1981.

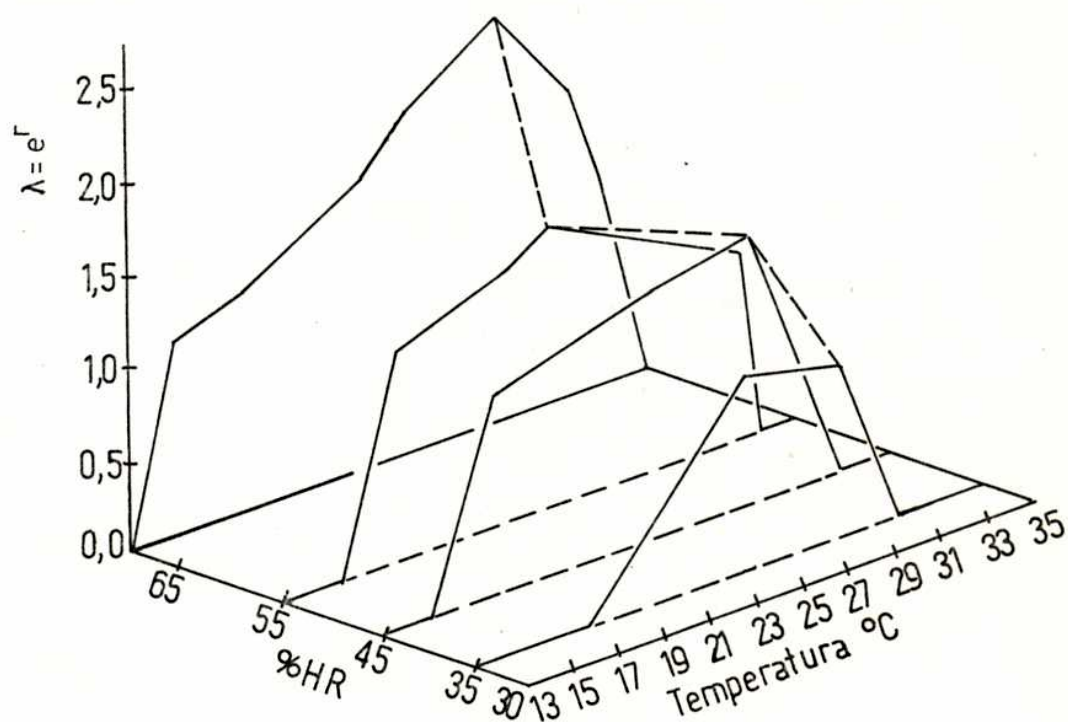


Fig.7.: Relación entre la tasa finita de incremento de la población ($\lambda = e^r$) y la temperatura y humedad relativa (datos de Birch, 1953a).

II.C.- FECUNDIDAD

Las discrepancias entre los distintos autores acerca del potencial reproductivo de *S. oryzae*, son consecuencia de la interacción de una serie de factores que afectan directa o indirectamente la fecundidad de una población en estudio. Grán parte de los datos experimentales publicados, pueden considerarse como valores aislados para determinadas condiciones (que no se encuentran especificadas en su totalidad), y deben utilizarse con suma cautela a los fines comparativos.

Los factores más importantes que actúan como variables, no siempre independientes, afectando la fecundidad de una población son : **humedad, temperatura, alimento** (cuali y cuantitativamente), **edad de los reproductores, proporción de sexos y la densidad de la misma población.** Resulta indispensable definir cada una de estas variables para aquellas experiencias donde la tasa de reproducción se emplea como un indicador, como por ejemplo: ensayos toxicológicos, ensayos con variedades resistentes a la plaga o simplemente la comparación o evaluación de diferentes cepas de la misma.

II.C.1.- Fecundidad y alimentación

II.C.1a.- Fecundidad y tamaño del alimento

Los factores con mayor incidencia sobre la tasa de reproducción de *S. oryzae* (bajo condiciones ambientales óptimas),

son las características cuali y cuantitativas del alimento. Las primeras observaciones sobre este fenómeno son de orden práctico, y a través de ellas se comprobó que el tamaño del grano de trigo está directamente correlacionado con el nivel de daño causado por *S. oryzae* (Doggett, 1957). Luego, Shazali, 1986, determinó experimentalmente la tasa reproductiva de *S. oryzae* en grano grande y pequeño, correlacionándola con la pérdida de peso del grano utilizado (Tab.7.) y calculando además la distribución de frecuencias de oviposiciones por grano (Tab.8.).

	Tamaño del grano	
	grande	pequeño
Nº adultos que emergieron	186,7	112,0
Pérdida de peso (grano) en g	3,96	2,23

Tab.7.: Progenie de *S. oryzae* y tamaño de grano (relación: una hembra por grano en 30g de trigo) y pérdida de peso del grano (Shazali, 1986).

Tamaño del grano	número de huevos por grano				
	0	1	2	3	4
Grande	65,8	23,0	7,8	2,6	0,8
Pequeño	75,0	21,4	3,0	0,6	0

Tabla.8.: Distribución de frecuencias del número de huevos en grano grande y pequeño (Shazali, 1986).

En otras experiencias de cria, utilizando dos tamaños de grano más una mezcla de ambos, la diferencia entre el número de oviposiciones en el grano grande y en la mezcla no fue significativa ; pero 76% de las oviposiciones en la mezcla, se localizaron en el grano grande y 24% en el pequeño.

La preferencia de *S. oryzae* a oviponer en granos de mayor tamaño, fue informada (Richards, 1947, Russell, 1962) y discutida (Shazali,1986) por diferentes autores, sin que hasta el momento se hubiese encontrado una explicación, más allá de lo meramente especulativo.

S. oryzae prefiere oviponer, dentro del mismo tipo de alimento, en granos de mayor tamaño (Shazali,1986); pero cuando se trata de hospedadores diferentes, el tamaño pasa a segundo lugar en orden de importancia (I.B.3.). Por otra parte, el tamaño de las imagines (F1) de *S. oryzae*, se correlaciona con el tamaño del alimento (granos) (Surtees, 1965 ; Lavadinho, 1975), en forma aparentemente independiente del tipo de alimento y directamente relacionada con la fecundidad (F1) (II.C.3.). A este fenómeno, poco conocido hasta el momento, se le brindará especial atención en el capítulo referente a alimentación artificial (2.B.).

De todo lo expuesto hasta aquí y también en relación con párrafos anteriores, puede concluirse que:

- 1.- El tamaño del alimento se encuentra correlacionado con la tasa de reproducción.
- 2.- El tamaño de los individuos (F1) se encuentra correlacionado con el tamaño del alimento.

- 3.- En la literatura disponible, los diferentes autores tratan en general los puntos 1.- y 2.- como sucesos independientes a pesar de la estrecha relación existente entre la fecundidad y el tamaño de los individuos (II.C.3).
- 4.- Resultaría deseable confirmar si el tamaño del alimento afecta a la tasa de reproducción exclusivamente a través del tamaño individual.

II.C.1.b.- Fecundidad y características cualitativas del alimento.

Las diferencias en la tasa de reproducción de dos poblaciones de una misma cepa de *S. oryzae*, criadas sobre diferentes variedades de trigo, pueden ser en algunos casos más significativas que aquellas que se obtienen sobre alimentos diferentes como el maíz y el trigo (Phadke & Bhatia, 1974 , Khare & Agrawal, 1963).

El empleo de distintas variedades de trigo para la cría de *S. oryzae*, no altera solamente la tasa de reproducción de la población, sino que afecta también la tasa de mortalidad (Russell, 1966 , Koura et al, 1971), así como al tamaño y peso de las imagines (F1) (Ungsunantwiwat & Mills, 1985). Los factores responsables de estas diferencias son especialmente físicos y químicos, y están en general relacionados con el pericarpio del grano. Estas conocidas variaciones en los cultivos de diferentes generaciones de una cepa de *S. oryzae*, se deben principalmente a la falta de un alimento "standard", que permita minimizar u homogeneizar el efecto de variables tales como : dureza del

pericarpio, sustancias químicas atractantes o repelentes contenidas en el pericarpio, textura y estructura del pericarpio y tamaño del grano. Estas características varían en los diferentes híbridos (Russell, 1966 ; Stevens & Mills, 1973 ; Gomez et al, 1982 ; Gomez et al, 1983a ; Gomez et al, 1983b), pero también se modifican durante el almacenamiento del cereal (Peng et al, 1983), de modo que la inevitable heterogeneidad en las características del alimento natural, influye negativamente sobre la reproducibilidad de las experiencias.

II.C.2.- Fecundidad y edad de los individuos

La fecundidad tampoco escapa al análisis conjunto de dos variables como la temperatura y la humedad, más la edad de las hembras. En forma condensada, puede decirse que *S. oryzae*, a 27°C se desarrolla en cuatro semanas, a 21°C en ocho semanas, a 18°C en 12 semanas y a 15°C en 30 semanas (Hardman, 1978 ; Evans, 1977 y 1982). A temperatura constante (27°C) y variando el contenido de humedad del alimento, se obtienen diferentes valores de fecundidad por hembra, en un período de 90 días : 11% = 91,8 ; 12,5% = 148,7 y 14% = 192,6. Según Longstaff & Evans, 1983, la fecundidad alcanza su máximo nivel a 24°C, cuando el grano contiene 14% de humedad, y en estas condiciones, el desarrollo completo requiere aproximadamente seis semanas. Con valores altos de fecundidad -similares a los obtenibles a 24°C-, el desarrollo se efectúa en solo cuatro semanas cuando la

temperatura de incubación es de 27°C hasta 30°C y la humedad del grano se encuentra entre 12,5% y 14%. Dentro de este rango, el pico de máxima fecundidad en las hembras se observa en el intervalo de edad comprendido entre una y cuatro semanas.

II.C.3.- Fecundidad y tamaño de los individuos

Distintos autores han mostrado por diferentes vías, como el tamaño y tipo de alimento son responsables directos del tamaño de los individuos en una población de *S. oryzae*. El tamaño de los individuos es otra de las variables que afecta la fecundidad (Fourie, 1967) de la especie (II.C.1.a), como puede observarse en la Tabla: 9.

Peso Padres mg.	Número de individuos de la F1 en periodos de 14 días							Total progenie por cada dos hembras
	1	2	3	4	5	6	7	
1,17	23	54	65	37	34	21	16	250
2,19	35	66	74	46	46	33	24	324
2,54	51	82	86	60	56	42	31	408

Tabla.9.: Fecundidad en función del tamaño de individuo
(Fourie, 1967)

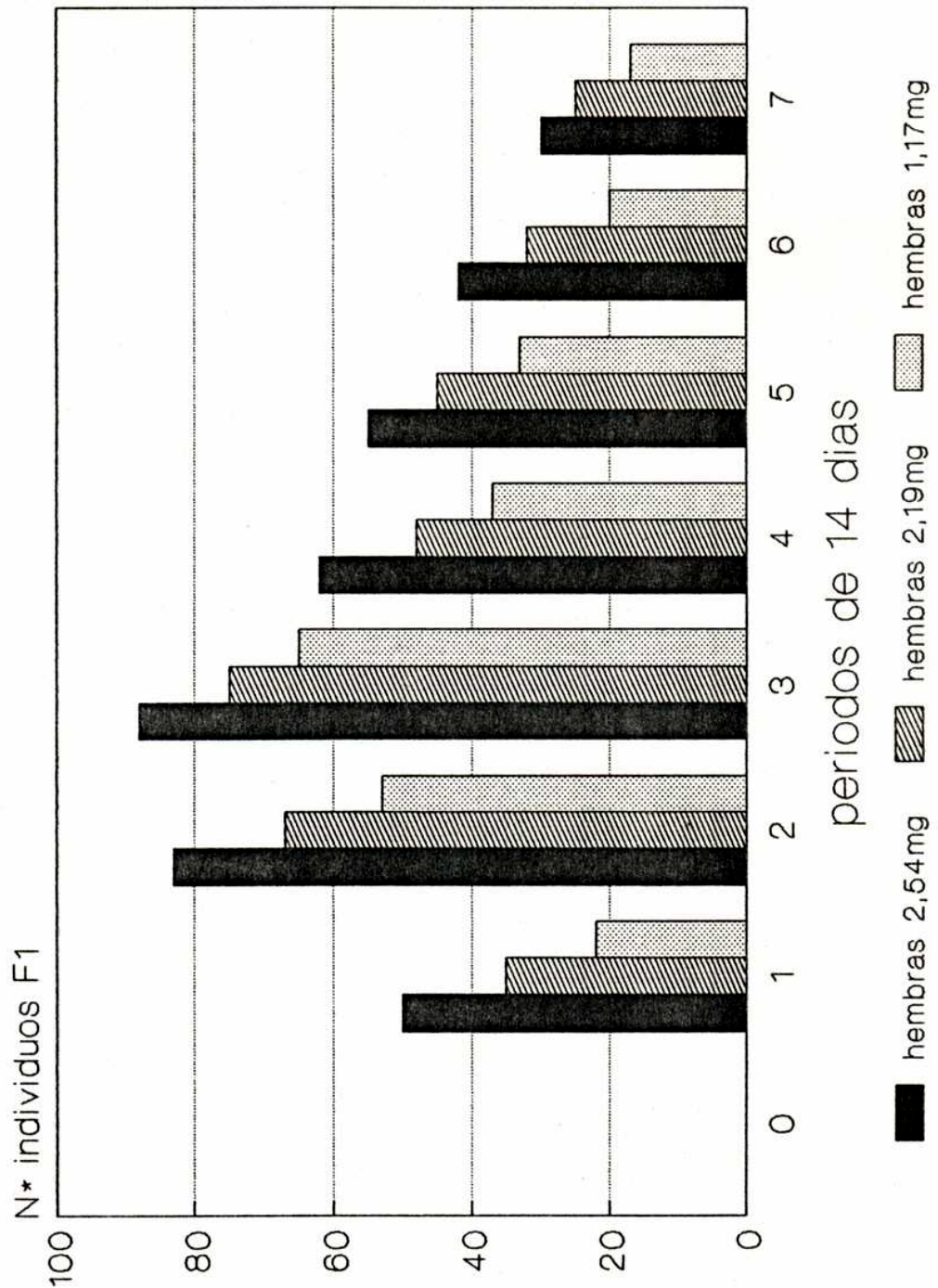


Fig.8.: Relación entre el peso corporal y fecundidad de *S. oryzae* (datos: Fourie, 1967)

La fecundidad se relaciona directamente con el peso corporal de la hembra, sin que se vea afectada la distribución de frecuencias para los diferentes intervalos de edad (Tabla.9. y Fig.8.). En este caso, el tamaño de los individuos (padres) afecta solamente la densidad de población final (F1).

II.C.4.- Fecundidad y proporción de sexos

La proporción de sexos en una población natural de *S. oryzae* es 1:1, según distintos autores (Richards, 1947; Evans, 1977 y Holloway, 1985) y observaciones propias. Los cruzamientos entre cepas arrojan en ciertos casos una F1 con una proporción de sexos desbalanceada a favor de las hembras (Shazali, 1982), este sesgo puede observarse a lo largo de varias generaciones y cruzamientos recíprocos. La proporción de sexos en una población de *S. oryzae* esta regulada genéticamente a través de la interacción de un factor hereditario no cromosómico de la hembra y un factor ligado al cromosoma "Y" (Holloway, 1985).

A pesar de hallarse establecida genéticamente la proporción de sexos (1:1), la fecundidad alcanza niveles óptimos cuando la proporción de machos y hembras es 2:5 (Fig.10.). No se trata en este caso de asegurar elevada frecuencia de cópulas, como puede extraerse de la figura.9., sino de asegurar un mínimo de encuentros entre ambos sexos, reduciendo el número de individuos y evitando la competencia intraespecífica que afecta seriamente la fecundidad y la supervivencia (Fig.10.).

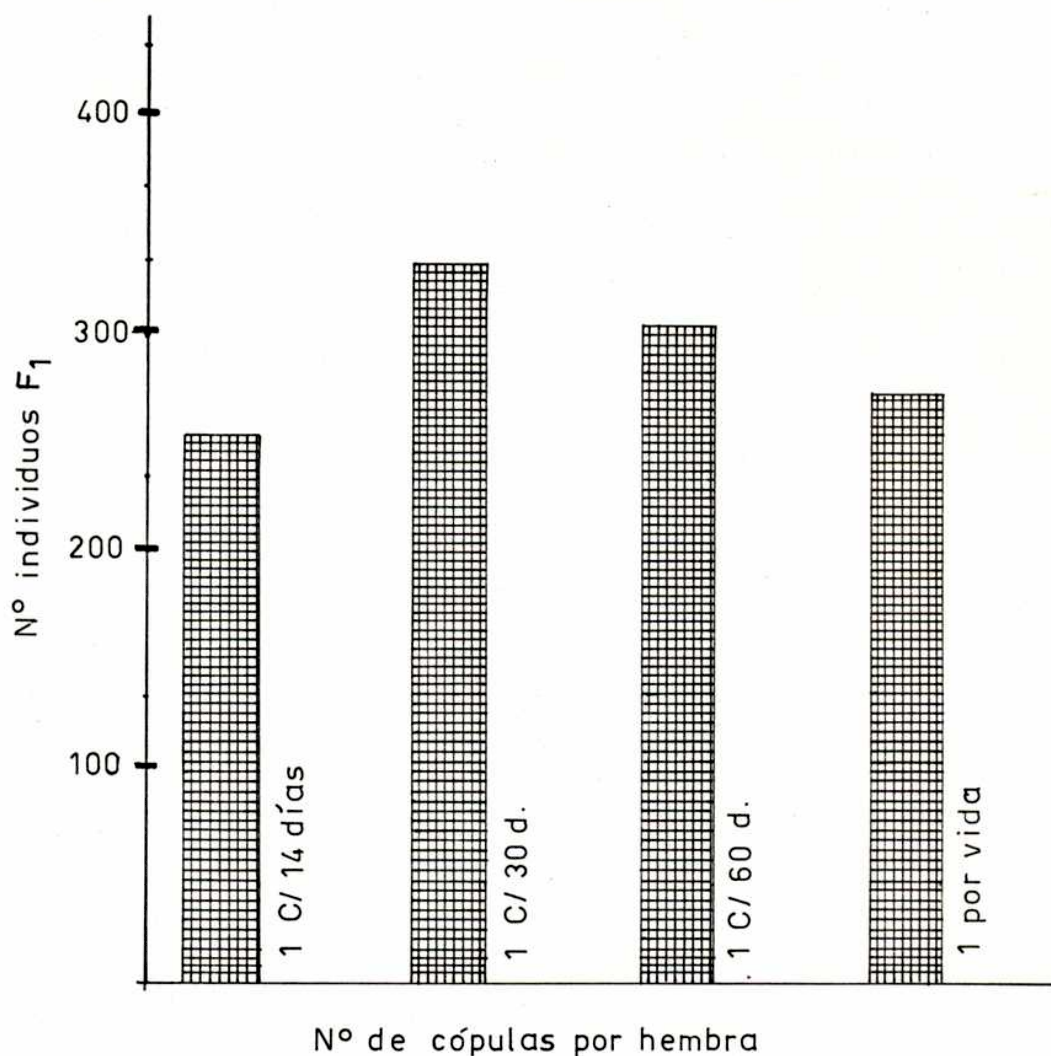


Fig.9.: Fecundidad en función del número de cópulas durante la vida de la hembra (datos, Fourie, 1967).

Con una relación de dos machos por cada cinco hembras, se obtiene por lo menos una cópula por hembra, reduciendo la competencia intraespecífica a su mínima expresión. Sin embargo, este valor debe ser considerado en función de un determinado espacio físico, o, en su defecto, definirse en función de la densidad de población.

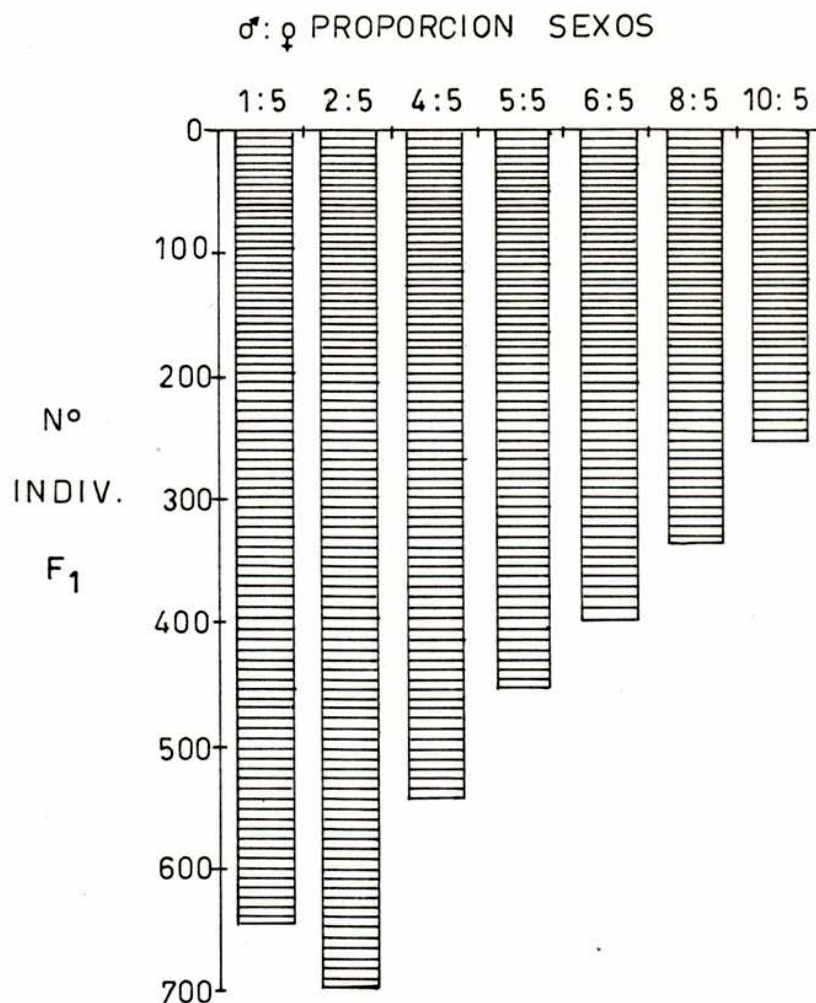


Fig.10.: Efecto de la proporción de sexos de la generación paterna, sobre la fecundidad de *S.oryzae* (datos, Fourie, 1967)

II.C.5.- Fecundidad y densidad de población

La performance reproductiva de *S.oryzae*, en relación con su densidad poblacional, ha suscitado un número importante de trabajos . Las primeras investigaciones en este campo se deben a

MacLagan, 1932, que define a la densidad poblacional y el número de huevos puesto por cada hembra, como una relación inversamente proporcional, que puede describirse a través de una función hiperbólica (MacLagan & Dunn, 1935). Estudios posteriores muestran que a densidades de población muy bajas, la fecundidad decae (Fig.12.), y le asignan a esta relación, una función más compleja que una simplemente hiperbólica.

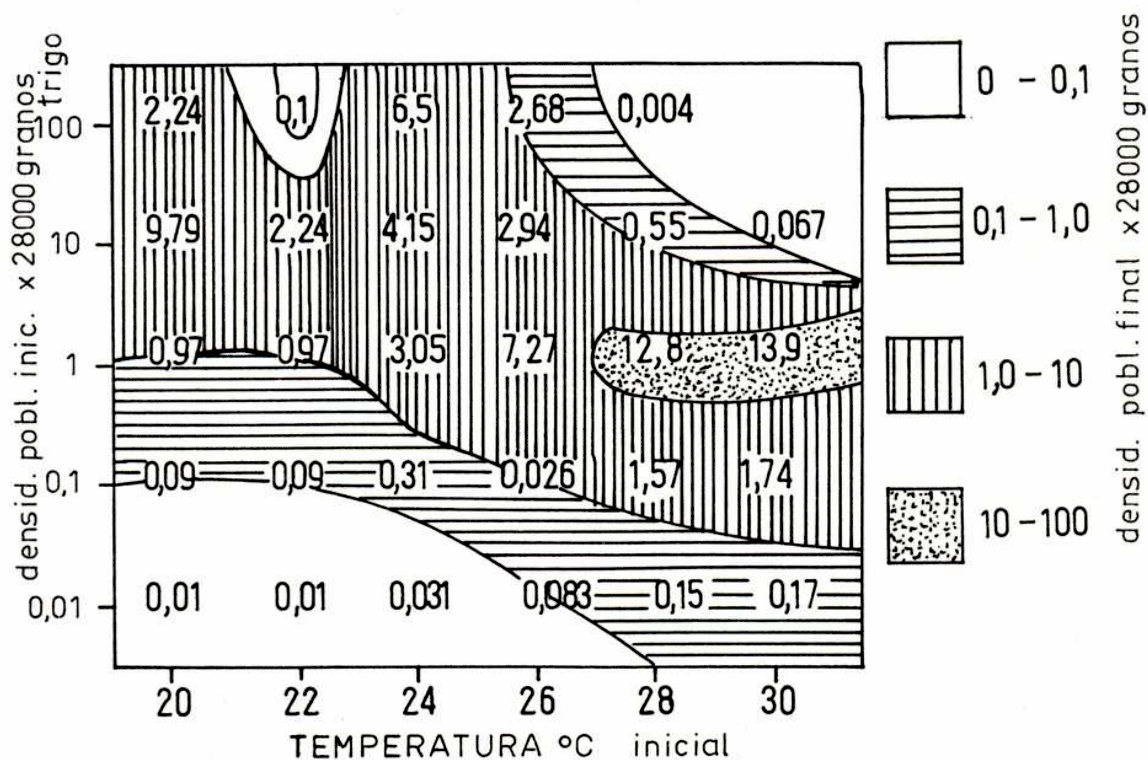


Fig.11: Influencia de la temperatura y la densidad de población iniciales sobre la densidad de población (F1) a los 40 días, en un cultivo de *S. oryzae* < 12,5% HR> (Cuff & Hardman, 1980).

El modelo de Cuff & Hardman, 1980 muestra la evolución de una población de *S.oryzae*, considerando la interacción de la densidad de población inicial con dos variables : la temperatura y la atmósfera dentro de la cámara de incubación. Esta última dependiente de la temperatura y de la densidad de población inicial del cultivo (Fig.11).

La naturaleza de la relación entre la densidad de población y fecundidad puede verse claramente en la figura 12, y es similar a la establecida para *S. granarius* por MacLagan, 1932. La descripción apropiada para esta relación, es el modelo de Longstaff, 1981,

$$f = a.(\log_e N)^b.N^{-c}$$

donde *N* es el número de hembras por número de granos, *f* es el número de huevos depositados por hembra y las constantes valen : *a* = 6,8211, *b* = 2,3221 y *c* = 0,3993 (Longstaff,1981). Esta función refleja dos procesos opuestos que determinan el nivel de fecundidad. El término $(\log_e N)^b$ representa el feed-back positivo, o efecto social de incremento de la densidad poblacional, mientras que N^{-c} se refiere al fenómeno de sobrepoblación o feed-back negativo. Estos dos efectos se anulan en forma recíproca cuando la densidad poblacional es de un individuo por cada 2000 granos de trigo, situación en la cual la fecundidad alcanza su valor máximo.

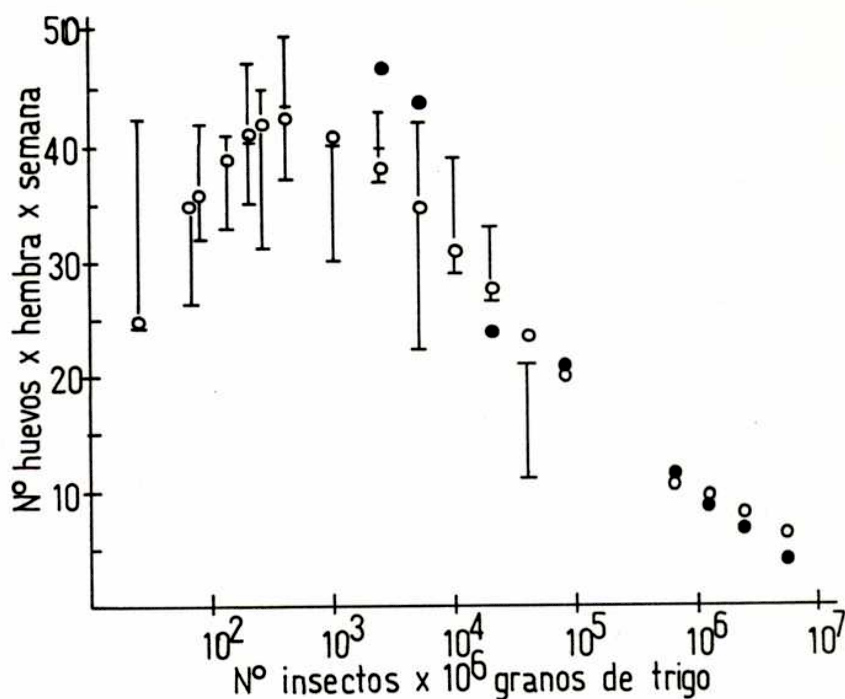


Fig.12.: Relación entre fecundidad y densidad poblacional para *S. oryzae*. (puntos= MacLagan, y Dunn, 1935, círculos= Longstaff, 1981).

Estableciendo la densidad de población inicial en un cultivo de *S. oryzae*, puede predecirse con cierta precisión la evolución de dicha población bajo condiciones controladas (Fig.12.). Con densidades de población mayores que las sugeridas por Longstaff, 1981, disminuye notablemente la supervivencia de las fases inmaduras (Tabla:10.).

Densidad de población (individuos por 10 ⁶ granos de trigo)	Sobrevida fases inmaduras
5000	0,9
20000	0,9
80000	0,67
640000	0,4
1280000	0,3
2560000	0,225
5120000	0,11

Tabla.10: Relación entre la densidad de población y la sobrevida de la fases inmaduras de *S. oryzae* (MacLagan & Dunn, 1935).

Los resultados de Longstaff, 1981 son comparables con el modelo de Cuff & Hardman, 1980, aunque llama la atención que la performance reproductiva se mantenga en su máximo nivel a 32°C (Tabla:11.), cuando la mortalidad de las fases inmaduras a esa temperatura es de 20% aproximadamente (Birch, 1945b) y la tasa finita de incremento de la población (λ) alcanza menos de 1/3 de su valor máximo (Birch, 1953a). Generalizando, puede establecerse que las condiciones óptimas para alcanzar la máxima densidad de población de la F1 son: temperaturas de incubación entre 27°C y 30°C ; alimento con 12,5% a 14% de humedad ; densidad de población inicial (paterna) de 10² - 10⁴ individuos por 10⁴ granos de trigo.

II.D.- OVIPOSICION

II.D.1.- Sitio de oviposición

La hembra de *S. oryzae* ovipone en cavidades especialmente roídas, en un sector del grano previamente seleccionado. El sitio de oviposición en el trigo es preferencialmente la zona de contacto entre el endosperma blando y el embrión, así como el límite entre el endosperma blando y el corneo, en el extremo de la semilla (Lathrop, 1914). La profundidad de la cavidad es igual al largo de la proboscis de la hembra y el tiempo necesario para excavar el hueco es de aproximadamente una hora. Luego de depositado el huevo, el orificio es sellado con una sustancia mucilaginososa secretada a través del oviscapto, en una a tres descargas, hasta formar un tapón al mismo nivel del pericarpio. Este tapón protege al huevo de la desecación, cambios súbitos de temperatura y de algunos enemigos naturales (Lathrop, 1914).

El sector de la semilla a perforar es seleccionado por la hembra (Tab.11.) y difiere en los distintos cereales en función de la dureza de la superficie, rugosidad (Bishara, 1967) y presencia de sustancias químicas atractantes (Pant & Gupta, 1959; Arakaki & Takahashi, 1982; Gomez et al, 1983a; Gomez et al 1983b). En el proceso de selección del sitio de oviposición, intervienen receptores especiales de los palpos maxilares (sensilios basicónicos del ápice) y del oviscapto, como los pelos

sensoriales de cada estilo y las sensilias campaniformes en las coxas (Bishara, 1967).

C E R E A L	SITIO de OVIPOSICION
Trigo	Cara dorsal
Arroz	Cara dorsal
Maiz	Apice
Sorgo	Embrión

Tabla....: Sitio preferencial de oviposición de *S. oryzae* para diferentes cereales ($P < 0.001$) (Bishara, 1967).

Nardon et al, 1981, determinaron dos sitios preferenciales para la oviposición en el trigo. En una muestra de 4820 granos de trigo, 16% de los tapones se localizó en proximidades del germen y 63% en una franja dorsoventral, cerca de la zona pilosa. Otros datos bibliográficos acerca del sitio de oviposición (Lathrop, 1914; Tyagi & Girish, 1975; Nardon et al 1981; Shazali, 1986;) coinciden en su mayoría y a grandes rasgos, con los resultados de la Tabla 11.

II.D.2.- Condiciones para la oviposición

Las condiciones de humedad y temperatura indispensables para el desarrollo de *S. oryzae*, discutidas en capítulos

anteriores, juegan un papel no menos importante en el momento de la oviposición.

El éxito de la oviposición depende, en gran medida, de las características del pericارpo del grano utilizado como sustrato. Estas características son propias de la variedad (híbridos) del cereal, o varían de acuerdo al tratamiento que los granos reciben después de la cosecha. *S. oryzae* es más propenso a oviponer en variedades de trigo con granos de superficie lisa que en aquellas de superficie rugosa (Tyagi & Girish, 1975). En arroz, la oviposición se encuentra significativamente correlacionada con el estado del pericارpo (Peng et al., 1983). Los distintos tratamientos post-cosecha del mismo tipo de grano, influyen sensiblemente sobre las preferencias de oviposición de *S. oryzae*. Pueden definirse órdenes de preferencia, para el arroz por ejemplo: hervido, no pulido > no pulido > hervido y pulido > pulido (Arakaki & Takahashi, 1982).

La preferencia de *S. oryzae* por una u otra variedad o tipo de tratamiento, se encuentra relacionada, por una parte, con la presencia de sustancias químicas atractantes, y por otra, con la textura y estructura del pericارpio del grano. En la mayoría de las experiencias sobre orden de preferencia de cereales con distintos tratamientos, no se consideró una de las principales variables : el contenido de humedad del grano. Cabe esperar que nuevas investigaciones sobre este tema, tan importante desde el punto de vista práctico, se desarrollen bajo condiciones controladas.

II.E.- NUTRICION Y METABOLISMO

II.E.1.- Nutrición

Las investigaciones sobre el metabolismo de esta especie se orientaron, por un lado, al estudio del balance energético y gaseoso, y por otro, a definir los requerimientos nutritivos de las larvas.

Pant & Gupta, 1959 realizaron las primeras experiencias de alimentación artificial en *Sitophilus*, utilizando pellets de caseína-glucosa y caseína-almidón con resultados poco favorables. Chippendale, 1972, determinó los requerimientos de hidratos de carbono de las imagines y encontró además que las amilopectinas contenidas en el endosperma del alimento natural, son un nutriente esencial y al mismo tiempo un fagoestimulante. Baker abordó este tema en forma exhaustiva y sistemática (Baker & Mabie, 1973a,b,c; Baker, 1974a,b; 1975; 1976a,b), ensayando una amplia variedad de sustratos, hasta formular una dieta artificial eficiente, compuesta por caseína, almidón de trigo, levadura de cerveza, colesterol, germen de trigo, aceite de germen de trigo y agua (Baker & Mabie, 1973a). Subsecuentemente, Baker & Mabie, 1973b, reformularon esta dieta "básica", introduciendo cambios cuali y cuantitativos, que permitieron definir con mayor precisión, los requerimientos nutritivos de *S.oryzae*. Se determinó además que el agregado de caseína no influye sobre la tasa de crecimiento de la población, pero mejora la

supervivencia. Por otra parte, una reducción en la proporción de levadura puede compensarse con el incremento de la cantidad de germen, aunque la inversa no se cumple (Baker & Mabie, 1973b). Sobre esta dieta "básica", se ensayaron posteriormente los requerimientos vitamínicos (Baker, 1975; Subba, 1976), de aminoácidos (Baker, 1976; 1978; 1979) y colesterol (Baker, 1973) de esta especie.

S. oryzae requiere, para su normal desarrollo, los siguientes vitaminas en su dieta : tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido fólico, riboflavina, ácido pantoténico y biotina (Baker, 1975; Subba, 1976). Aparentemente, la riboflavina y el ácido pantoténico pueden ser provistos en trazas por microorganismos simbiotes (II.F).

Para su óptimo desarrollo, *S. oryzae* requiere una combinación de 15 diferentes aminoácidos, cuya mezcla debe representar entre 5% y 10% (Baker, 1979) de la dieta (Tabla 12.). La población no se desarrolla cuando la proporción de aminoácidos presentes es de 1% y su crecimiento se inhibe con concentraciones de 3% y 13% (Fig.13.) (Baker, 1976). Un importante factor limitante del desarrollo es la l-lisina (ClH), cuya concentración óptima en la dieta es de 0,2% . Esta no es aportada por los simbiotes en cantidades suficientes como para mantener el crecimiento, cuando los niveles en la dieta se encuentran por debajo del valor óptimo.

COMPONENTE	-A- CANTIDAD requerim. total	-B- CANTIDAD requerim. min.
L-arginina (base libre)	5,5%	0,15%
L-aspartico ac.	7,0%	-
L-cistina	1,5%	-
L-glutamico ac.	19,0%	-
Glycina	10,0%	-
L-histidina (base libre)	4,0%	0,12%
L-isoleucina	8,0%	0,20%
L-leucina	9,0%	0,40%
L-lisina (ClH)	8,5%	-
L-metionina	4,0%	0,10%
L-fenilalanina	3,2%	-
L-treonina	5,8%	0,15%
L-triptofano	1,5%	0,04%
L-tirosina	6,0%	-
L-valina	7,0%	0,18%

Tabla 12: Componentes de la mezcla de aminoácidos en la dieta artificial de *S. oryzae*. A= mezcla completa; B= mezcla de aminoácidos esenciales (datos=Baker,1975;1978;1979).

La larva de *S. oryzae* puede utilizar colesterol, β -sitosterol, ergosterol, colesterol (acetato), y 7-dehidrocolesterol,

desarrollandose con igual eficiencia sobre dietas que contengan alguno de estos compuestos. Esta característica se debe aparentemente a la presencia de microorganismos simbiotes que pueden transformar diferentes esteroides en beneficio del insecto, colaborando en la utilización de esteroides saturados como el colesterol (Baker, 1974).

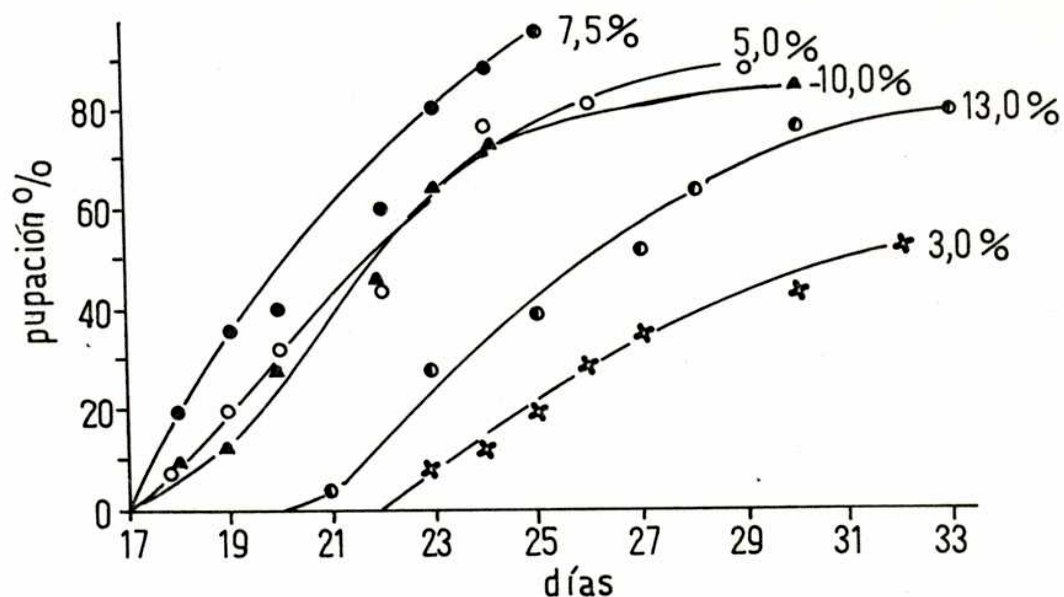


Fig.13: Efecto de las diferentes concentraciones de la mezcla de aminoácidos (Tabla 12 -A-) en el alimento artificial, sobre la pupación de *S. oryzae* (Baker, 1976).

II.E.2.- Balance energético

El primer trabajo sobre bioenergética en *S. oryzae* corresponde a Birch, 1947, quien consideró los efectos de la

temperatura y humedad relativa sobre la tasa de consumo de O_2 durante el desarrollo del tercer estadio larval. Determinó también el efecto de la temperatura sobre el metabolismo de la L_2 , a través de la medición del consumo de O_2 a diferentes temperaturas. Posteriormente, Singh, et al 1976, estudiaron el balance energético de esta especie a través del cociente respiratorio (CR) en cada fase y estadio, bajo condiciones similares a las utilizadas por Birch, 1947.

El valor del CR para los primeros estadios del desarrollo, indica que el metabolismo de los hidratos de carbono es predominante en esta fase (CR = 0.9), dado que la larva se alimenta principalmente del endosperma del grano (H de carbono = 86%, y proteínas 8,3% - 14,8%). En los estadios de pre-pupa y pupa, predomina el metabolismo de los lípidos (CR = 0.8).

La figura 14 representa un resumen esquemático del balance de energía durante el desarrollo de *S. oryzae*, y muestra el flujo de energía desde el alimento a través de los diferentes estadios del desarrollo hasta la imago en 50 días. De las 126cal de un grano de trigo, se requieren 46,78cal para el desarrollo completo y mantenimiento un solo individuo a lo largo de 50 días. La producción de huevos durante dos a tres semanas consume alrededor de 5,47cal, los cuatro estadios larvales requieren 16,73cal, 0,14 cal se consumen en la producción de exuvias y la mayor parte de la energía ingerida (28,25 cal) es invertida en respiración.

Un interesante aporte sobre los requerimientos nutritivos de *S. oryzae*, a través del estudio del contenido corporal de hidratos de carbono, lípidos y proteínas (Fig. 15.), son las investigaciones de Singh & Sinha, 1977, que confirman los resultados de Singh et al, 1976.

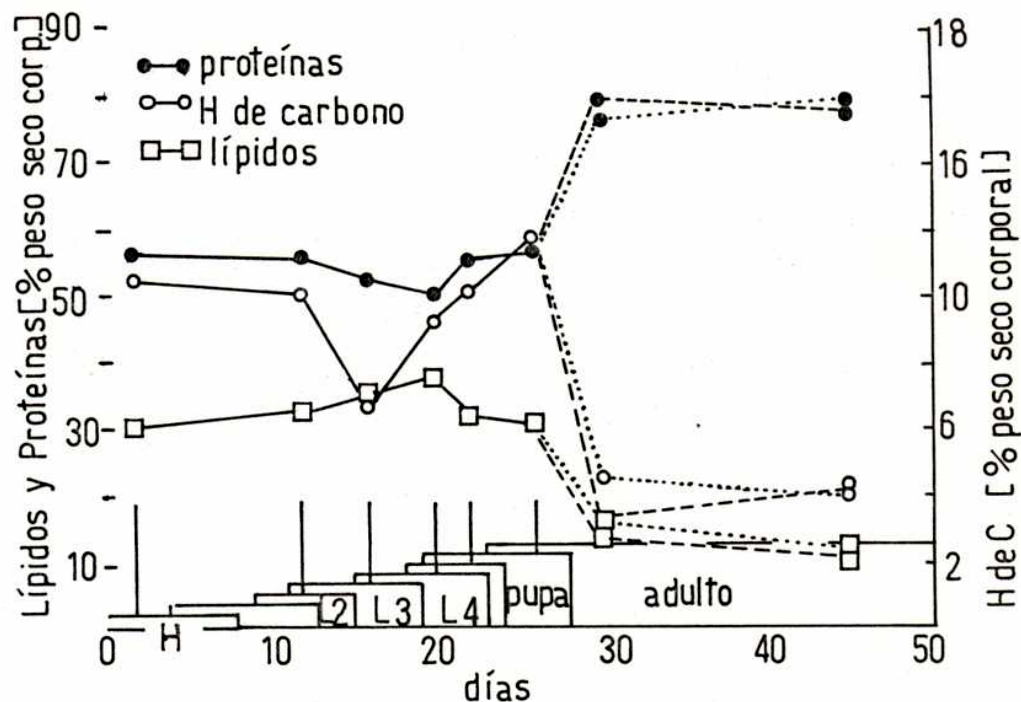


Fig.15: Cambios en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas en los diferentes estadios del ciclo de vida de *S. oryzae*, criado sobre trigo a 30°C y 70% HR. (Singh, 1977).

Durante los primeros estadios del desarrollo, el contenido de carbohidratos disminuye, hasta alcanzar su mínimo en la L₃, luego se incrementa su nivel hasta arribar a su máximo en la pupa. Los carbohidratos contribuyen, aparentemente en mayor grado a la síntesis proteica que a satisfacer la demanda total de energía (Singh & Sinha, 1977). El contenido de lípidos aumenta en todos los estadios larvales y decae finalmente en la fase de prepupa y pupa, fenómeno característico para muchos holometábolos, donde la larva almacena grandes cantidades de lípidos, que luego son consumidos en la fase pupal. Cabe destacar que en las imagines, el nivel de lípidos es similar en ambos sexos.

El nivel de proteínas decae durante la metamorfosis (Birt & Christian, 1969) y aparentemente, su incremento durante la fase pupal y adulta, puede ser atribuido al metabolismo del glicógeno, quitina o de los lípidos (Shingh & Sinha, 1977).

II.E.3.- Economía del agua

Las plagas de los granos almacenados, en general, se encuentran adaptadas a vivir en ausencia de agua libre, en ambientes donde la actividad del vapor de agua (a_v) es particularmente baja. *Ephestia* sp. y *Tenebrio* sp. pueden desarrollarse en condiciones extremas, sobre sustratos con 1% de agua. Los curculionidos del grano almacenado, en cambio, requieren un mínimo de 9% de agua en el alimento (Cotton et al, 1960). Para compensar las pérdidas de agua, estos insectos la

la absorben de la atmósfera o la ganan a partir de la oxidación de carbohidratos primarios y grasas (agua del metabolismo). Todos los insectos terrestres se comportan como cuerpos higroscópicos, absorbiendo agua en forma pasiva (Wharton, 1963); pero esta vía en particular no posee la suficiente eficiencia en *S. oryzae* y requiere el complemento de los restantes mecanismos para que el balance general logre mantenerse.

En *S. oryzae* la mayor parte del agua perdida por transpiración es reemplazada por agua absorbida del ambiente en forma pasiva y activa (Fig.16). La transpiración es regulada a su vez por la concentración interna de agua (a_v interna), que es constante e independiente de la concentración externa (a_v externo).

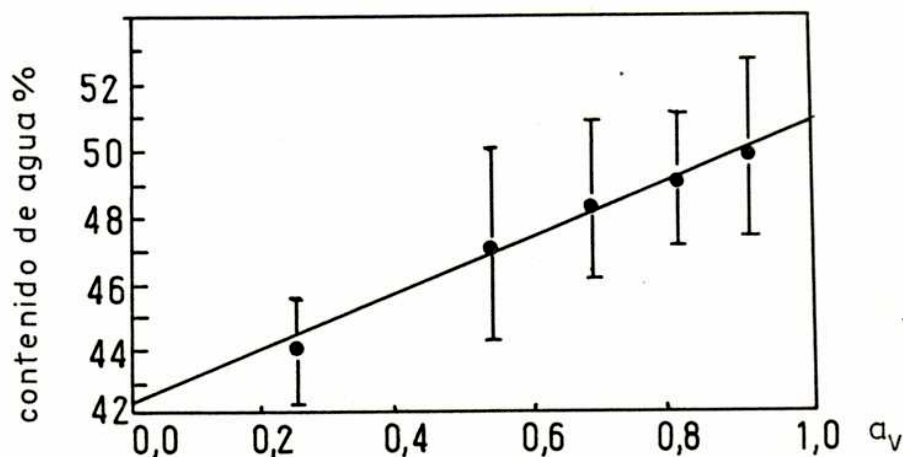


Fig.16: Agua corporal de *S. oryzae* criado sobre trigo, a distintas actividades específicas de vapor de agua (a_v) (Arlian, 1979).

La constante promedio de la transpiración es función de la permeabilidad de la superficie de intercambio; aparentemente no hay cambios en la superficie corporal de *S. oryzae* ya que a diferentes a_v externos, las constantes promedio de transpiración no se ven afectadas. Las constantes promedio determinadas por Arlian, 1979 para *S. oryzae*, se encuentran entre las más bajas reportadas hasta el presente e indican el alto grado de impermeabilidad del cuerpo de esta especie.

Las poblaciones de *S. oryzae* se desarrollan en los silos, donde las condiciones son en general estables y el a_v oscila entre 0,25 y 0,50. En condiciones extremas de desecación, los individuos sometidos a 0,225(a_v) pierden 56% de agua, que equivale a 36,3% de su peso corporal (valores estandarizados, Arlian, 1979) y a pesar de ello, continúan siendo normalmente activos. Una importante adaptación de *S. oryzae* y otros artrópodos que se desarrollan en habitats tan extremos, es la capacidad de regular la incorporación de agua, modificando el consumo de alimento en función del agua disponible en el ambiente y de la de su propio balance interno.

El contenido de agua del alimento (trigo) es proporcional al de la atmosfera que lo rodea, como consecuencia del equilibrio que se establece entre ambos (Fig.17); de tal manera, la cantidad de agua incorporada por el insecto está determinada por la cantidad de alimento consumido. La pérdida neta de agua por transpiración solo puede ser compensada completamente por esta vía en atmósferas con una actividad de vapor de 0,85-0,65(a_v)

(Arlian, 1979). *S. oryzae* reduce significativamente el consumo de alimento en ambientes donde la a_v es muy baja, debido a que la cantidad de agua incorporada con el alimento no logra suplir las pérdidas por transpiración ($a_v \ll 0,65$). En ambientes con valores elevados de actividad de vapor ($a_v \gg 0,85$), el consumo de alimento también se reduce o se anula cuando el balance de agua interno alcanza el límite fisiológico -crítico superior- .

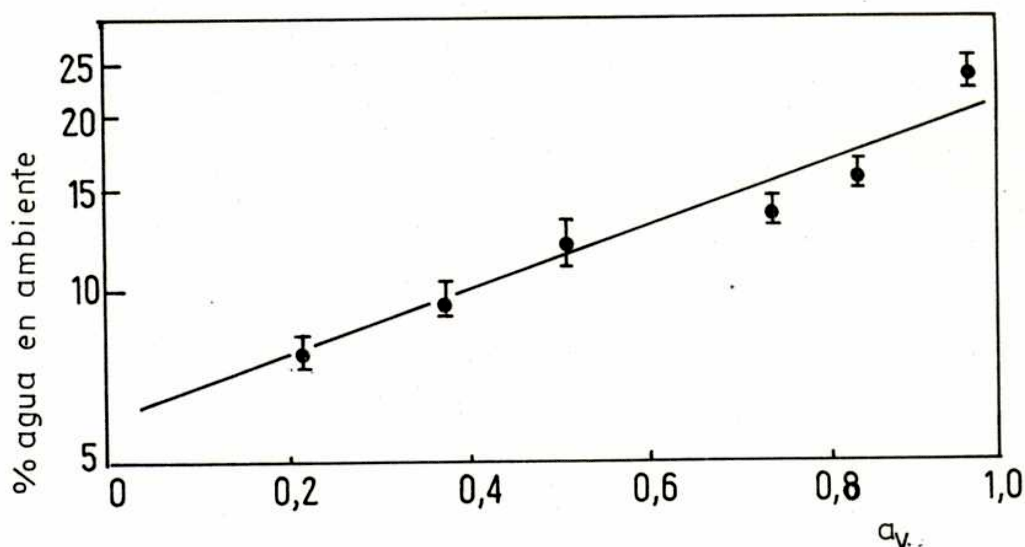


Fig.17: Equilibrio entre la actividad de vapor de agua en el ambiente y el contenido de humedad del trigo (var. Logan) a 23°C (Arlian, 1979).

Un individuo de *S. oryzae* en condiciones standard, metaboliza (oxida) 0,24 mg (1,2%) diarios de carbohidratos; de los productos finales, 40% es eliminado como CO_2 y el agua (60%), pasa a

formar parte de la economía general o es eliminada. El agua del metabolismo, reemplaza solamente una pequeña fracción del agua perdida por transpiración, y en condiciones extremas de desecación, *S. oryzae* no ajusta su actividad metabólica para compensar su balance general de agua.

El balance general de agua en *S.oryzae* puede resumirse de la siguiente manera:

1.- Con actividades de vapor = 0,225, la pérdida de agua por transpiración excede a las ganancias por metabolismo, absorción e incorporación con el alimento. La tasa metabólica no se modifica para compensar el déficit.

2.- Con actividades de vapor entre 0,65 y 0,85 el agua incorporada con el alimento, absorción y metabolismo, compensa las pérdidas por transpiración y metabolismo.

3.- Con actividades de vapor = 0,99, el agua incorporada con el alimento se reduce con la reducción del consumo de alimento y la absorción compensa ampliamente las pérdidas.

II.E.4.- Respiración

Mediante un respirómetro de Warburg de volumen constante, Singh et al, 1976, determinaron la tasa de consumo de O_2 de cohortes de *S. oryzae* de edades especificadas. Para individuos de 7 días de edad el consumo diario de O_2 es de 40 μl , para individuos de 15 días de edad, es de 430 μl / día, a 30°C. Hardman, 1978, considerando la profunda influencia de la temperatura sobre la tasa metabólica, calculó el consumo de O_2 en

función de la suma de temperaturas (grados-día =D°) durante la fase larval en 40407 μ l D°, y durante la pupal, en 17712 μ l D°.

El consumo de O₂ en *Sitophilus* no depende solamente de la tasa metabólica, sino también del O₂ atmosférico disponible. La tasa respiratoria decrece con la disminución del O₂ (Bailey, 1956), observándose una relación lineal negativa entre la concentración de CO₂ atmosférico y el cociente respiratorio del insecto. En larvas de los primeros estadios, el metabolismo decrece linealmente a partir de concentraciones de O₂ menores de 8,5% y se detiene por debajo de 5,3%. En las pupas, decrece a partir de concentraciones menores de 8,8% y se detiene por debajo de 3,6%, mientras que en los adultos disminuye a partir de 4%. La producción de CO₂ puede ser considerada como un indicador del grado de infestación del grano almacenado con *S.oryzae* (Howe & Oxley, 1944), aunque este dato no describe específicamente la densidad de población de la plaga, sino el estado general del grano almacenado. Los cambios en la composición de la atmósfera del "sistema" se deben por una parte a la actividad metabólica de los insectos, y por otra, a la interacción de factores físicos, químicos y biológicos, como la actividad microbiana. Singh et al, 1977, analizan la evolución de la atmósfera intersticial en un cultivo de *S. oryzae* (Fig.18).

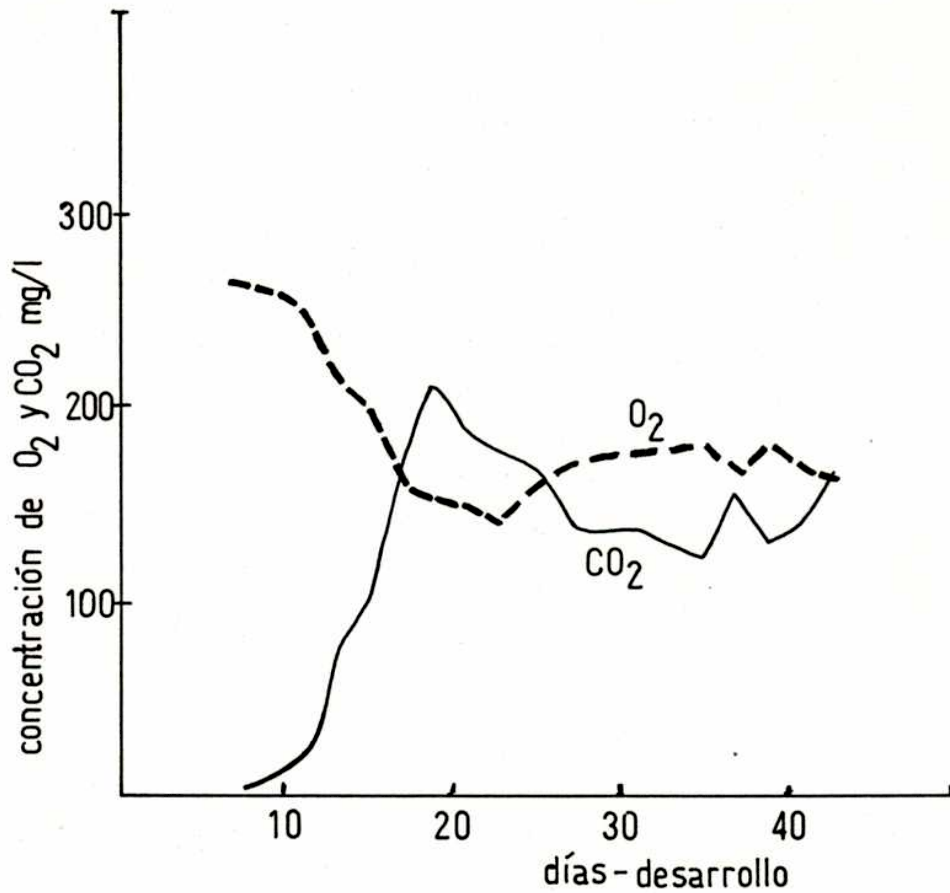


Fig. 18 : Evolución de la atmosfera de CO₂ y O₂ en un cultivo de *S. oryzae* a 27°C y 70%HR (datos : Singh et al, 1977).

Los niveles de O₂ disminuyen abruptamente en el cultivo luego del séptimo día de infestación, para estabilizarse el día 23. Los niveles de CO₂ alcanzan su máximo el día 19 de la infestación. En la atmósfera de los cultivos de laboratorio que

se mantienen durante periodos prolongados, los niveles de CO_2 son considerablemente superiores a los normales (Williams & Wilbur, 1969). Sin embargo, este hecho no afecta significativamente el desarrollo de las poblaciones, a raíz del rápido incremento de la tolerancia al CO_2 en las sucesivas generaciones (Navarro et al, 1985).

El desarrollo, la tasa reproductiva y la actividad metabólica son funciones lineales de la temperatura y su incremento lleva a un aumento súbito de la población y a cambios ambientales más drásticos, siempre que el O_2 no se manifieste como factor limitante. La tasa metabólica, la reproductiva y la de supervivencia son dependientes del O_2 , y por ello la densidad de población se reduce rápidamente con el incremento del CO_2 . Las poblaciones son más pequeñas a bajas temperaturas porque la tasa metabólica desciende con la temperatura, sin que se altere el intercambio gaseoso. Es así como el aumento en el metabolismo en presencia de niveles bajos de O_2 , provoca la reducción de la tasa reproductiva y de supervivencia.

El efecto de la composición de la atmósfera de incubación sobre el desarrollo poblacional de *S. oryzae*, puede resumirse de la siguiente manera :

- 1.- El incremento de la densidad poblacional es función lineal de la temperatura, cuando el O_2 no actúa como factor limitante.
- 2.- Niveles elevados de CO_2 provocan un descenso en la tasa reproductiva y de supervivencia cuando se incrementa el metabolismo a través del aumento de la temperatura.

II.F.- SIMBIOSIS

S. oryzae usualmente alberga bacterias simbiotes intracelulares del tipo *Bacillus circulans* (Pierantoni, 1927; Mansour, 1935; Nardon & Wicker, 1981; Dang, 1983) en el epitelio de la pared intestinal, cerca del lumen. Los micetomas o células que contienen simbiotes, no se comunican directamente con el lumen intestinal (Lum & Baker, 1975), y solamente al finalizar la fase pupal el intestino es invadido completamente por los microorganismos. La infección de *S. oryzae* es precoz, ya que las bacterias penetran en el huevo desde las ovariolas, durante la ovogénesis temprana (Pant, 1983). En la larva, los micetomas se desarrollan en la pared del mesenterón; de allí, las bacterias son liberadas a la hemolinfa y transportadas hasta los rudimentos de los ovarios.

Los micetomas se encuentran estrechamente relacionados con el metabolismo de su hospedador, de diferentes maneras:

a.- Favorecen la síntesis de proteínas en la larva de *S. oryzae* a través del incremento en la eficiencia de la conversión de fenilalanina en tirosina (Wicker et al, 1985).

b.- Los simbiotes posiblemente sintetizan colina, utilizando los grupos metilo de la metionina (Baker, 1978) (Gasnier-Faucet & Nardon, 1987).

- c.- El metabolismo de la metionina difiere entre las cepas simbióticas y aposimbióticas. Los altos niveles de sulfóxido de metionina medidos en las larvas simbióticas, puede considerarse como una respuesta adaptativa a dietas con alto contenido en metionina (Gasnier-Faucet & Nardon, 1987).
- d.- Los niveles de sarcosina y metionina varían en forma inversa durante el desarrollo larval y pupal de *S. oryzae*, y aparentemente ambos aminoácidos se encuentran involucrados en el mismo camino metabólico (Gasnier-Faucet & Nardon, 1987).
- e.- El índice de metilación en los tejidos de la larva aposimbiótica es tres veces superior al determinado para la simbiótica, de manera que los tejidos de la larva aposimbiótica son más eficientes para la transmetilación (Gasnier-Faucet & Nardon, 1987).
- f.- La metionina y la glicina participan en la biosíntesis de la sarcosina en *S. oryzae* (Gasnier-Faucet & Nardon, 1987).
- g.- El lento desarrollo de los individuos aposimbióticos se encuentra relacionado con la deficiente utilización de la tirosina de origen exógeno y la falta de aporte endógeno (provisto por los simbioses) del aminoácido (Wicker & Nardon, 1982).

h.- Los microorganismos simbiotes suplen las deficiencias vitaminicas del complejo B en *S. oryzae* (Dang, 1983).

Las diferencias en el metabolismo de las cepas simbióticas y aposimbióticas de *S. oryzae* se expresan de distinta manera sobre el individuo y la población, afectando principalmente sus características y dinámica.

Color del tegumento: Los individuos aposimbióticos son más claros, debido al déficit en tirosina (Nardon & Wicker, 1981).

Longevidad: Las primeras generaciones aposimbióticas son poco vigorosas y las imagines viven solamente entre 30 y 60 días. Sin embargo, a partir de la sexta generación se observa un fenómeno de adaptación y la esperanza de vida se incrementa en los individuos aposimbióticos, sobrepasando la de los simbióticos (Nardon, 1978a) (Grenier et al, 1986).

Fertilidad: Las primeras generaciones aposimbióticas son poco fértiles, aunque a partir de la octava generación se observa un progresivo aumento de la fertilidad, hasta alcanzar valores que difieren sólo en 20% de la cepa simbiótica en la generación F15 (Nardon & Wicker, 1981). Por otra parte, Grenier et al, 1987, calculan la tasa intrínseca de incremento de la población simbiótica y aposimbiótica en 0,61 y 0,46 respectivamente a 27°C.

Duración de la ontogenia: Una de las características más destacables de las cepas aposimbióticas es el incremento en la extensión de su desarrollo ontogenético. A diferencia de las anteriores, ésta es una característica estable a lo largo de las sucesivas generaciones (Nardon & Wicker, 1981). El tiempo de desarrollo más corto de las cepas simbióticas, hace de la simbiosis un carácter sometido a una selección positiva a través de las generaciones.

Las bacterias que participan de la simbiosis, se encuentran completamente integradas al metabolismo del hospedador, y la tan evolucionada co-adaptación recíproca de ambos ha favorecido el desarrollo de un mecanismo genético de control sobre la población de microorganismos en el insecto (Grenier et al, 1983). A través del metabolismo, los simbiositos se encuentran estrechamente relacionados con la dinámica poblacional del hospedador, como un carácter más que define a una cepa. Sin embargo, este carácter no es estable y su variabilidad depende en gran medida de factores externos como por ejemplo el tipo de alimento que consume el insecto. La presencia de estos microorganismos y su variabilidad, no sólo debe ser tomada en cuenta para estudios poblacionales, sino también en las experiencias de selección de variedades resistentes de cereales, y muy especialmente en los ensayos toxicológicos, ya que los simbiositos pueden participar directa o indirectamente en el proceso de detoxificación. Algunos simbiositos proveen protección natural al hospedador, a través de la hidrólisis de ésteres (Mallory et al, 1967), y otros, del tipo

Bacillus cereus, tienen la capacidad de degradar "in vitro", carbaryl, paratión y DDT (Singh, 1971).

III.- ECOLOGIA - Modelo ambiental para *S. oryzae*

El habitat de *Sitophilus* es un universo tridimensional y heterogéneo, que consiste de compartimientos con diferentes condiciones ambientales y densidades de población, donde la transferencia de calor, agua y gases, determinan finalmente el sentido de la evolución del sistema. La información discutida en los items anteriores, permite integrar ahora las condiciones y situaciones relevantes relacionados con el desarrollo de una población de *S. oryzae* y de su habitat. Las variables definidas pueden incluirse en un modelo general (Longstaff, 1981), que consiste a su vez de dos sub-modelos : el biológico y el ambiental.

El sub-modelo biológico presenta una estructura simple, con un único circuito de feed-back, en función del aumento de la oviposición (Fig.19). Las variables dentro de este sub-modelo, como : alimento, temperatura, humedad inicial, edad y sexo paternos, densidad de población, etc., pueden fijarse previamente.

El sub-modelo ambiental, más complejo que el biológico, evoluciona con este último, estableciéndose una serie de circuitos feed-back dentro del sistema general (Fig.19).

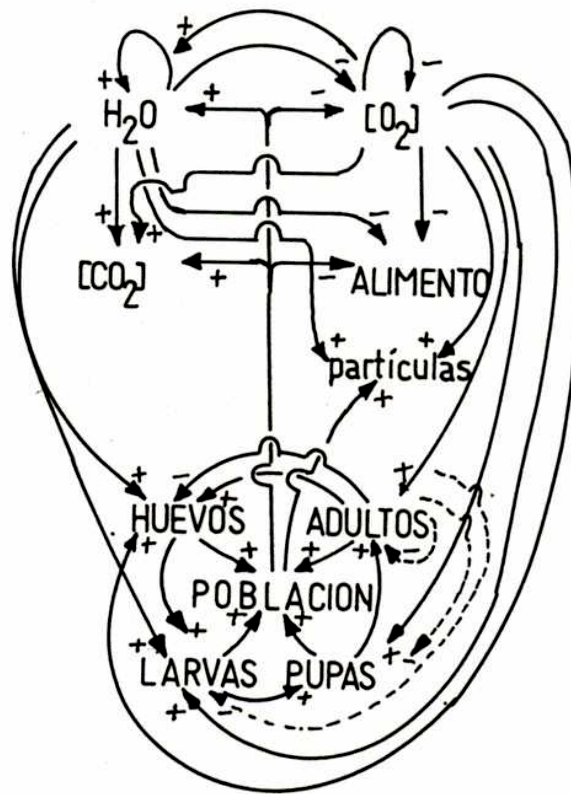


Fig.19: Modelo de las interrelaciones de una población de *S. oryzae* con su ambiente (Longstaff & Cuff, 1984).

Por una parte, la humedad en el sistema sufre retroalimentación positiva, mientras que para la concentración de

O₂, se establece un feed-back negativo. Otro de los circuitos principales parte de la población de insectos e influye positivamente sobre la humedad, retornando a la población a través del pool de huevos y larvas. Por otro lado, se observa un fenómeno de retroalimentación negativa de la población hacia la masa total de O₂, con retorno a la población.

Otros aspectos de la dinámica ambiental, a lo largo de sucesivas generaciones, no fueron aún considerados dentro de los modelos de "ecosistemas" propuestos para *S. oryzae* (Hardman, 1978; Longstaff, 1981b), como los efectos del calor generado por la población en expansión, las consecuencias del aumento de partículas finas o los efectos subletales de ciertas variables físicas y químicas. Esta falta de información hace que los pronósticos sobre la evolución ambiental a largo plazo, en un cultivo de *S. oryzae*, sean inciertos.

IV.- SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN *S. oryzae*

IV.A.- ENSAYO BIOLÓGICO

La base para los ensayos biológicos de susceptibilidad es : exponer una muestra representativa de la población de la plaga al insecticida, bajo condiciones constantes. En el caso de monitoréo de resistencia, el material biológico debe ser expuesto a una dosis tal que elimine -bajo idénticas condiciones- a una

muestra de insectos susceptibles "normales". Los objetivos de estos ensayos son : discriminar entre diferentes insecticidas, detectar resistencia y obtener medidas confiables sobre el nivel de la resistencia. Los ensayos deberían ser comparativos sobre la base de la posibilidad de que éstos sean reproducibles.

El método de ensayo de susceptibilidad por excelencia y monitoréo de resistencia para *S. oryzae*, recomendado por la FAO, es el método del film (Champ, 1968) a pesar de que el método de aplicación por tópico es el más preciso (Champ & Dyte, 1976). Se trata de la exposición continua de ejemplares adultos a un papel de filtro impregnado con una concentración conocida del insecticida en ensayo, en el interior de un aro de vidrio de 5,0cm de diámetro x 2,5cm de altura (S.C.2.). El criterio de respuesta (knockdown), es la falta de coordinación de los insectos, y la incapacidad de sostenerse. Para este tipo de ensayo debe establecerse previamente el tiempo de exposición y la dosis del insecticida a través de un screening preliminar.

Otro tipo de ensayo biológico, con fines prácticos pero de escaso valor comparativo, es la impregnación con concentraciones conocidas del insecticida de volúmenes establecidos de granos ; sobre éste se colocan finalmente los insectos. Esta metodología se presenta en la literatura con una serie de variantes (Cogburn, 1976 ; Davies & Desmarchelier, 1981), debido a que para ella no existen normas definidas.

El método del carrier impregnado con insecticida y mezclado con el grano, así como el de aplicación por fumigación directa

sobre los insectos, están actualmente perimidos por su pobre reproducibilidad (Champ & Dyte, 1976).

IV.B.- INSECTICIDAS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE *S. oryzae*.

Debido a que *S. oryzae* es la plaga más importante del grano almacenado a nivel mundial y su potencial como plaga alcanza el máximo en áreas tropicales y subtropicales (Champ & Dyte, 1976), el almacenaje de cereales requiere control químico complementario para desarrollarse en forma exitosa. Como consecuencia, diferentes poblaciones de *S. oryzae* fueron sometidas en forma extensiva e intensiva a una fuerte presión de selección por diferentes insecticidas ; además, como consecuencia del comercio internacional de granos, estas poblaciones no permanecieron aisladas.

La práctica del control de *S. oryzae* comenzó con DDT en la post-guerra, continuando con lindane y piretroides. Finalmente se utilizaron malatión y fumigantes como la fosfina y el bromuro de metilo, habiéndose empleado preferentemente aquellos compuestos con buena acción residual. A los fines comparativos, puede verse en la tabla 13 la susceptibilidad de una misma cepa a diferentes compuestos:

COMPUESTO	CL ₅₀ mg/cm ²
metil-parati6n	0,001
diclorvos	0,003
etil-parati6n	0,007
fenitroti6n	0,010
diazin6n	0,051
p,p DDT	0,083
iodofenfos	0,323
endrin	0,336
fosfamidon	0,375
piretrina	0,482
dieldrin	0,484
disyston	0,547
isodrin	0,665
endosulfan	0,863
lindane	1,317

Tabla: 13. Susceptibilidad de *S. oryzae* a diferentes compuestos insecticidas (datos : Bansode & Bhatia, 1978).

IV.C.- FACTORES BIOL6GICOS Y ECOLOGICOS RELACIONADOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN *S. oryzae*.

En los 6ltimos a6os, diversos autores (Georghiou & Taylor, 1976, 1977 ; Champ et al, 1976 ; Cook, 1980) han brindado especial atenci6n a la influencia de las variables ex6genas o ambientales y las end6genas o poblacionales sobre la

susceptibilidad y el desarrollo de resistencia a insecticidas. La variabilidad en la susceptibilidad de *S. oryzae* registrada en la literatura, se debe principalmente -considerando sólo los factores exógenos- a la temperatura, humedad y dieta imperantes durante el desarrollo de la población. Estas variables también se relacionan estrechamente con la evolución de la resistencia, actuando sobre su velocidad y magnitud.

TEMPERATURA : La temperatura es probablemente el factor extrínseco más importante entre todos aquellos que afectan la respuesta de *S. oryzae* a un xenobiótico a corto y largo plazo. La velocidad del desarrollo de resistencia en *S. oryzae* a DDT y a fosforados también es función de la temperatura, como lo demuestran las experiencias de Cichy, 1971, donde para alcanzar un GR = 40, se requieren 20 generaciones a 25°C y solamente 10 generaciones si la incubación se realiza a 30°C.

HUMEDAD RELATIVA : Cichy, 1971, incubando a 30°C y a 55% y 75% de HR respectivamente, determina que el desarrollo de resistencia a DDT y fosforados se correlaciona en forma negativa con la humedad. En la generación 15, el grado de resistencia a fosforados alcanzado en las poblaciones criadas con 55% HR es 21,14, mientras que con 75% HR el grado de resistencia alcanzado es 6,78. A través de la información disponible sobre el balance del agua en *S. oryzae* -discutida en el punto II.E.3. - puede considerarse que el rápido incremento de la resistencia en cultivos con baja

hunedad es consecuencia exclusiva del aumento de la dosis. Es decir que : las pérdidas por transpiración no son compensadas a través del aumento de la absorción (poco eficiente en estas condiciones de HR), sino por el incremento de la cantidad de alimento incorporado, ya que la actividad metabólica permanece inalterada.

DIETA : El tipo y la cantidad de alimento disponible en el medio, influye sobre el tamaño del insecto, su estado general, supervivencia y su tolerancia a los pesticidas. La respuesta de una población a un insecticida o a algún otro factor adverso, está influida por el alimento incorporado durante el desarrollo y por la ingesta más reciente (Champ & Dyte, 1976).

Para poblaciones de *S. oryzae* criadas y sometidas a DDT sobre centeno, se obtienen valores de resistencia a DDT 15 veces superiores a aquellos que se obtienen sobre cebada. Para fosforados, en las poblaciones criadas sobre trigo, el desarrollo de la resistencia es 37 veces superior que en aquellas criadas sobre cebada (Cichy, 1971). Por otra parte en las cepas en las que la dieta se modifica durante la cría de una generación, el desarrollo de la resistencia muestra características diferentes y las distintas dietas tienen un efecto particular, en función del insecticida utilizado. En términos generales, puede decirse que : la dieta juega un rol importante para la susceptibilidad de una población a determinado insecticida y también afecta la velocidad de la evolución de la resistencia.

V.- RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN *S.oryzae*

El desarrollo de resistencia a insecticidas es la consecuencia de un proceso evolutivo que depende de factores genéticos, biológicos y ecológicos que varían con la especie, población y localización (Georghiou & Taylor, 1977, Wood & Mani, 1981, Cichy, 1971). El modelo de Georghiou & Taylor, 1976, describe algunos de los fenómenos que intervienen en el proceso de evolución de la resistencia como: la frecuencia inicial de alelos resistentes, el potencial reproductivo, la migración, la dominancia de los alelos que confieren resistencia, y la disponibilidad de refugios en el habitat. Los autores señalan que este último factor ejerce un fuerte impacto sobre la evolución de la resistencia, de modo que cuando 20% de la población cuenta con refugios son necesarias 20 generaciones para que los alelos R alcancen una frecuencia génica de 0,50, mientras que en ausencia de refugios, esta frecuencia génica es alcanzada en una generación solamente. En *Sitophilus oryzae* la embriogénesis, así como el desarrollo larval y pupal, se cumplen dentro de la semilla, hecho que equivale a disponer de refugio durante un periodo importante del ciclo vital. La consecuencia de esta particularidad son los relativamente bajos valores de resistencia a malatión (FR = 5,8; 6,7; 8,0; 2,4)# encontrados en poblaciones naturales de distintas partes del mundo por diferentes autores (Rajak, 1973; Bins, 1983; Picollo, et al

#Sin considerar los casos especiales o dudosos (Champ & Dyte, 1976) x24, x68.

1985). Bansode & Bhatia, 1976, demuestran experimentalmente, que a partir de una población susceptible de *S. oryzae*, presionando a cada generación con insecticida (malatión) antes del apareamiento, se anulan los efectos del refugio y de la superposición de generaciones, de modo que el factor de resistencia alcanzado en la décima generación es casi cuatro veces superior al máximo valor relevado en condiciones naturales (F10, FR=39).

Muchos de los factores biológicos y ecológicos pueden pre-establecerse durante los ensayos toxicológicos eliminando la interferencia combinada de variables como la temperatura, humedad, densidad poblacional, dieta, etc., con la finalidad de unificar criterios y obtener resultados comparables. Sin embargo es necesario, en primer lugar, comprender la magnitud y la manera de intervenir de cada uno de estos factores o variables que afectan la susceptibilidad y el desarrollo de resistencia a insecticidas.

V.A.- CAUSAS BIOQUIMICAS Y GENETICAS DE LA RESISTENCIA

La resistencia fue definida como "*la habilidad desarrollada por una cepa de insectos para tolerar dosis de tóxicos, que resultan letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie*" (Anon., 1957). La resistencia es un fenómeno preadaptativo que se manifiesta a nivel poblacional.

Los mecanismos responsables del fenómeno de resistencia, son aquellos relacionados con :

1.- alteración del sitio de acción

El mejor ejemplo para describir este mecanismo es el caso de la AChE con sensibilidad reducida para OPs y carbamatos. En la AChE alterada la tasa de reacción con el inhibidor se reduce, aunque también la hidrólisis de la ACh, que sin embargo continúa en un nivel compatible con la vida (Oppenoorth, 1985).

2.- detoxificación incrementada

Es el grupo de mecanismos más estudiado y se relaciona con una capacidad incrementada para metabolizar insecticidas. Estos sistemas de detoxificación parecen poseer una amplia flexibilidad y la variada gama de mecanismos intervinientes puede presentarse en forma individual o en combinación. Aquellas especies con mayor adaptabilidad pueden dar origen a cepas con resistencia múltiple (Oppenoorth, 1985).

3.- penetración reducida

La absorción reducida del tóxico es un mecanismo de importancia secundaria en comparación con la alteración del sitio de acción o el incremento de la detoxificación, y puede considerarse como un mecanismo complementario (Oppenoorth, 1985).

La explicación para la presencia y funcionamiento de estos mecanismos de resistencia se basa en que cada uno de ellos se encuentra genéticamente codificado. Como modelo general se plantea la existencia de un gen responsable de la penetración reducida, un gen relacionado con el sitio de acción alterado para cada insecticida en particular, y un gen regulador relacionado con la resistencia por metabolismo (detoxificación aumentada) a todos los insecticidas. Este último controla el instante y el tipo de expresión de los genes estructurales localizados en otro sitio del genoma. De esta manera son inducidos en forma

coordinada, diferentes tipos de enzimas como por ejemplo :
oxidadasas, esterasesas y GSH-transferasas (Plapp, 1986)

V.B.- RESISTENCIA DE *S. oryzae* A MALATION

La resistencia a malati3n de las plagas del grano almacenado en general, se ha transformado en un serio problema en varias partes del mundo, sin que en la Argentina sea una excepci3n (Champ, 1978 ; Bansode & Campbell, 1979 ; Villar et al, 1985). El malati3n es uno de los m1s comunmente utilizados insecticidas de contacto, cuya aplicaci3n esta limitada al tratamiento de superficies; para este caso en silos, graneros, molinos harineros, etc.

Las primeras investigaciones sobre el uso de malati3n en granos almacenados fueron realizadas por Lindgren et al., 1954 y Gore, 1958. Parkin, 1958 comprueba las ventajas del uso de malati3n contra las plagas del grano almacenado dentro de un amplio rango de condiciones. Posteriormente Champ et al., 1969 demuestran la efectividad del malati3n, no solamente contra las imagos de *S. oryzae* sino tambi3n contra las larvas del primer estadio. La acci3n residual del malati3n conferia entre 6 y 12 meses de protecci3n en el silo (Tilton, 1961), pero con la aparici3n de resistencia, estos datos perdieron vigencia r1pidamente. La respuesta ante 3ste fen3meno, fue la b1squeda y el ensayo de productos alternativos como diazin3n, fenitroti3n, diclorvos, pirimifos-metilo, clorpirifos-metilo y carbaryl

(Champ et al, 1969 ; Zettler, 1975 ; Cogburn, 1976; Davies & Desmarchelier, 1981 ; Binns, 1983).

Sobre los mecanismos de resistencia de *S. oryzae* a malatión existen muy pocos antecedentes. En algunas cepas la resistencia a malatión es inhibida por TPP, hecho que sugiere resistencia específica a malatión (Champ & Dyte, 1976). Por otro lado se encontraron cepas resistentes a malatión que, sin embargo, no era sinergizado por TPP, mostrando paralelamente resistencia cruzada con otros organofosforados (Binns, 1983 ; Champ & Dyte, 1976) (Tabla 14).

Insecticida	FR
etil-paratión	32,8#
metil-paration	26,0#
pirimifos-metilo	1,9*
clorpirifos-metilo	2,5*
diazinón	17,7#
fenitrotión	39,0#
diclorvos	8,6#
fosfamidón	6,0#
iodofenfós	8,8#
disyston	7,4#
p,p DDT	11,5#
lindane	2,6#
endosulfan	0,9#
dieldrin	3,6#
endrin	2,8#
isodrin	1,5#
piretrinas	3,5#
carbaril	>5,3#

Tabla 14: Resistencia cruzada para diferentes insecticidas en cepas de *S. oryzae* resistentes a malatión, según : (#) Bansode & Bhatia, 1978 y (*) Binns, 1983 ($CL_{50R}/CL_{50S} = FR$)

V.C.- CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LAS CEPAS DE *S. oryzae* RESISTENTES A MALATION

La intensa presión de selección con insecticidas, cuyo resultado es el desarrollo de resistencia, provoca también la segregación simultánea de otros caracteres o factores sintomáticos de la resistencia (Metcalf, 1955). Diferencias entre cepas susceptibles y resistentes en cuanto al potencial de reproducción, tamaño de los individuos, longevidad, coloración, cambios morfológicos o de comportamiento, fueron frecuentemente citados para *S. oryzae* y otros taxones (Knutson, 1969; Tewari & Pandey, 1977; Bansode & Bhatia, 1981).

Las cepas de *S. oryzae* resistentes a malatión, se caracterizan por la reducción en 20% ($P < 0.05$) de su fecundidad y el incremento de 18% ($P < 0.05$) en la mortalidad de los estadios inmaduros; sin embargo, la duración de los estadios preimaginales no se ve afectada (Bansode & Bhatia, 1981). Los resultados de las experiencias de estos autores coinciden con los de Tewari & Pandey, 1977, y aparentemente el potencial reproductivo y la tasa de supervivencia de los estadios inmaduros, son las únicas diferencias entre las cepas resistente y susceptible a malatión de *S. oryzae*.

VI.- PROPOSITOS DEL PRESENTE TRABAJO

El objetivo de este trabajo es por una parte, sentar las bases biológicas para éste y futuros estudios sobre el control químico de *Sitophilus oryzae* a través de su caracterización taxonómica, fisiológica y toxicológica.

Los estudios fueron realizados sobre dos cepas argentinas de *S. oryzae*, la CIPEIN-S, susceptible a insecticidas y la CIPEIN-RM, colectada a campo y resistente a malatión. Se consideró necesario, como primer objetivo, una caracterización taxonómica del material biológico en estudio, que cubriera los siguientes aspectos :

- a.- discutir y evaluar los diferentes y controvetidos conceptos acerca del valor taxonómico de determinadas estructuras para la determinación específica de *S. oryzae*
- b.- aplicarlos a las dos cepas locales en estudio
- c.- establecer un criterio para separar ejemplares de *S. oryzae* de los de *S. zeamais*, ya que ambas especies cohabitan generalmente en el grano almacenado
- d.- brindar un tratamiento preferencial a aquellas características como las fisiológicas, bioquímicas y etológicas, como valioso complemento para la identificación específica, considerando que : las diferencias morfológicas externas hasta ahora conocidas entre ambas especies, no son siempre elementos suficientes para la identificación.

Un segundo objetivo central de esta tesis, es el de unificar criterios para los ensayos toxicológicos con *S. oryzae*. Esto sólo es posible mediante el control cuali y cuantitativo del material biológico, a través de la standardización de las variables exógenas y endógenas (poblacionales) que afectan tan significativamente el resultado de los estudios toxicológicos. Para tal fin se trabajó en el desarrollo de un sistema de cría que considere a aquellos aspectos y variables ecofisiológicos relacionados con la susceptibilidad y con el desarrollo de resistencia a insecticidas en *Sitophilus oryzae*.

El hecho de unificar criterios también se hizo extensivo al propio ensayo toxicológico a través de la implementación de un método más preciso que el del film, para el caso particular de *Sitophilus oryzae*.

Un tercer propósito de este trabajo es el de tipificar la susceptibilidad de las cepas CIPEIN a diferentes compuestos insecticidas, bajo condiciones standard y mediante una metodología apropiada, determinando las correspondientes DL_{50} en cada caso y las variables bióticas y abióticas que las modulan.

Finalmente, el último objetivo, es cuantificar el fenómeno de resistencia a malatión de la cepa CIPEIN-RM bajo distintas condiciones y estudiar algunas de sus posibles causas bioquímicas : el metabolismo degradante a través de inhibidores y la inhibición de la AChE por maloxón, metabolito activo del malatión.

Este trabajo constituye un aporte inicial para la caracterización biológica, fisiológica y toxicológica de cepas

locales de *S. oryzae*, una de las plagas más importantes de los granos almacenados en la República Argentina, y es de aplicación al estudio del fenómeno de resistencia a malatión ya detectado en nuestro país. Los resultados aquí obtenidos pretenden ser un punto de partida para resolver algunos de los problemas que afectan al control químico de esta plaga de gran importancia económica.

M a t e r i a l e s
y
M é t o d o s

1.- CARACTERIZACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

En las experiencias bioquímicas, de cruzamientos y de taxonomía numérica, se utilizó el mismo criterio para la selección de los ejemplares de *S. oryzae* (según I.B.1 y II.A). El material se seleccionó por caracteres sencillos, como el tamaño y el color de los ejemplares, de acuerdo con el criterio de Richards, 1944 y Birch, 1944.

1.A.- CEPAS UTILIZADAS : ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

1.- Cepa CIPEIN-S : <<Cepa susceptible>>. Obtenida a partir de una población sin historia previa de control químico, de la Cátedra de Terapéutica Vegetal de la Facultad de Agronomía de la U.N. de La Plata, y criada posteriormente sobre trigo durante siete años en el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEFA-CONICET).

2.- Cepa CIPEIN-RM : <<Cepa resistente a malatión>>. La población inicial que dió origen a esta cepa fue obtenida en 1983 en las instalaciones de la empresa Molinera Leticia (Buenos Aires), con un FR inicial de 6,7 (Villar et al, 1985) y criada sobre trigo en el CIPEIN.

1.B.- CARACTERIZACION ANATOMICA

El estudio de la variabilidad del octavo esternito, esclerito, aedeagus y zona media del pronoto, se realizó sobre una muestra de 100 hembras y machos, extraídos al azar de los cultivos de las cepas CIPEIN-S Y CIPEIN-RM respectivamente. El esclerito y octavo esternito se obtuvieron por disección con ayuda de un microscopio estereoscópico y fueron luego fijados en EtOH 70% durante 24 hs. y montados en solución HOYER (Benbrook & Sloss, 1961). Las fotomicrografías se realizaron con película Kodak-color 400 ASA, un microscopio Leitz y un equipo fotográfico Olympus OM1 adaptado.

El material fotografiado con microscopio electrónico de barrido fue fijado previamente con EtOH 70% y deshidratado en una serie acetona-EtOH : 30/70 ; 50/50 ; 70/30 (v/v) y acetona 100%, colocado luego en un desecador con Cl_2Ca , y finalmente metalizado con oro-vanadio. Las larvas recibieron idéntico tratamiento.

1.C.- CARACTERIZACION POR TAXONOMIA NUMERICA

Se utilizó el método WPGMA (weighted pair group method with arithmetic averages, IBM) y el índice de correlación "r" de Pearson. Los cálculos y dendrogramas se ejecutaron con una computadora IBM-PC.

Muestra y tamaño muestral: Se utilizaron exclusivamente individuos de la cepa CIPEIN-S fijados en EtOH 70%. Las mediciones se realizaron sobre 25% de la F1, resultante de 48 hs

de oviposición de 100 hembras (separadas al azar) sobre 50g de trigo a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%$ HR.

Elementos utilizados para la matriz de datos: Se consideraron las medidas de 12 partes anatómicas, ampliando el criterio de Birch, 1944 para la separación de las especies. Se utilizó para ello un estereomicroscopio, ocular de medición y la correspondiente escala micrométrica.

La matriz de datos fue desarrollada según Romesburg, 1984, y los caracteres medidos fueron agrupados de la siguiente manera: 1.- largo de la trompa ; 2.- ancho de la trompa (distal) ; 3.- largo flagelo de la antena ; 4.- largo tarso pata I^o ; 5.- largo protórax ; 6.- largo élitro ; 7.- largo total ; 8.- ancho cabeza ; 9.- ancho protórax ; 10.- ancho metatórax ; 11.- ancho abdomen y 12.- largo abdomen. El material fue agrupado como sigue:

HG= hembras >2,7mm (grande)
 HP= hembras <2,7mm (pequeña)
 HM= hembras (marron)
 HN= hembras (negro)

1.D.- CARACTERIZACION GENETICA

Obtención de individuos vírgenes : En una grilla de polietileno de baja densidad de 40cm x 40cm dividida en cubículos de 1cm³ con un solo lado descubierto, se colocó un grano de trigo infestado con *S. oryzae* por cubículo. La grilla se cubrió con una placa de vidrio para mantener a cada individuo aislado en su celda y se incubó en estufa a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%$ HR.

Criterio para la selección de los padres: Con estereomicroscopio y anestesia con CO₂ (3.A.), se seleccionaron, de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, individuos con más de 2,7mm de largo total, denominándolos "grande", y a los de menos de 2,5mm se los denominó "pequeño" (se descartaron los ejemplares entre 2,5mm y 2,7mm). También se seleccionaron individuos del tipo "marrón" e individuos del tipo "negro" (Birch, 1944 y Richards, 1944). Los ejemplares separados fueron sexados según el método descrito en 3.B.

Desarrollo de la experiencia: En recipientes de polietileno con adecuada ventilación se colocaron 5g de trigo y una pareja de insectos susceptibles vírgenes de cinco días de edad en el siguiente orden: (A_♂) macho grande + hembra grande ; (B_♂) macho grande + hembra pequeña ; (C_♂) macho pequeño + hembra grande ; (D_♂) macho pequeño + hembra pequeña ; (E_♂) hembra marrón + macho negro ; (F_♂) hembra negra + macho marrón. Cada uno de estos ensayos se replicó diez veces y la experiencia se desarrolló en estufa a 29°C ±1°C y 77% ±2% HR. El mismo esquema se repitió para los resistentes (A_♀ ; B_♀ ; C_♀ ; D_♀ ; E_♀ ; F_♀). Los padres se retiraron de los recipientes después de 10 días y el recuento de la F1 tuvo lugar 30 días más tarde.

1.E.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA

Para obtener los proteinogramas correspondientes a los distintos grupos de individuos, se utilizaron imagines de entre 5

y 10 días de edad, que fueron sexados por disección con estereomicroscopio y separados según clase de tamaño (mayores de 2,7mm y menores de 2,5mm) y color. Esta técnica se desarrolló solamente con individuos enteros de la cepa susceptible y el material quedó finalmente agrupado de la siguiente manera:

Muestra	Homogenatos	Material por Homogenato
I	a, b, c	20 machos >2,7mm
II	a, b, c	20 hembras >2,7mm
III	a, b, c	20 machos <2,5mm
IV	a, b, c	20 hembras <2,5mm
V	a, b, c	20 machos-B (marrón)
VI	a, b, c	20 hembras-B(marrón)
VII	a, b, c	20 machos-S (negro)
VIII	a, b, c	20 hembras-S(negro)

Para preparar los homogenatos, se utilizó un homogenizador Sorvall, modelo Omni-Mixer 17106 con pistón de teflon para tubos Potter de 2 ml de capacidad. Se homogeneizó en 1 ml de buffer fosfato 0,02M ; pH 7,0 durante 30seg. por muestra (previamente enfriado) y luego se filtró por lana de vidrio, para retener los restos de cutícula. El filtrado se centrifugó a 10.000G durante 15 minutos en una centrifuga Sorwall Superspeed SS-3 automática, instalada en cámara fría. Se separó el sobrenadante del sedimento y se descartó este último.

Por el método de Lowry et al, 1951, se determinaron las proteínas en los tres homogenatos (a,b,c), correspondientes a cada muestra. Las mediciones se realizaron mediante un espectrofotómetro UV-visible Varian 634, doble haz, en celdas de cuarzo de 5mm de paso óptico. Para cada medición se utilizaron 50 μ l de homogenato, 950 μ l de agua dest. y 4ml de solución alcalina de cobre, se dejó 10 min. a temperatura ambiente, se agregaron luego 0,4ml del reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1+2 (Wood, 1978) y se incubó a temperatura ambiente, para leer finalmente a 660nm. La cantidad de proteína se extrapoló de una curva standard obtenida con albúmina de suero humano (Sigma) 1 mg/ml. De esta manera se determinaron las proteínas totales correspondientes al sobrenadante de 10.000G para los tres homogenatos y se estableció el volumen a sembrar por cada tubo de gel en la electroforesis.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizó una fuente de poder Bio-Rad, modelo 500 y celda electroforética Bio-Rad modelo 150A, de acrílico, con 12 alojamientos para tubos de 12,5cm x 0,7cm (diámetro externo) y con camisa de circulación de agua. Los geles se prepararon con acrilamida (monómero), bisacrilamida (co-monómero), temed (acelerador), persulfato de amonio (catalizador) y Tris. Las soluciones stock, de trabajo, el buffer stock de corrida y los geles se prepararon según Wood, 1978.

Para la corrida electroforética se colocaron los tubos en los alojamientos correspondientes de la cuba y se llenaron los

recipientes inferior (anódico) y superior (catódico) con buffer stock de corrida 1/10, cuidando de no dejar burbujas en la parte inferior de los geles. Los tres homogenatos de cada muestra, previamente preparados, fueron sembrados (Wood, 1978) mediante una jeringa Hamilton de 100 μ l a través del buffer de la celda catódica. Por cada tubo se sembraron 50 μ l, lo que equivale aproximadamente a 90 μ g - 100 μ g de proteína. Junto con cada muestra se sembraron 0,2 μ l de azul de bromofenol 0,001% en glicerol, que actuó como colorante trazador.

Los recipientes catódico y anódico se conectaron a la fuente de poder y se aplicaron 2mA por tubo hasta que las muestras atravesaron el gel de poro grueso y luego se aplicaron 4mA por tubo, trabajando a corriente constante durante aproximadamente 6 hs y en condiciones refrigeradas. La electroforésis fue interrumpida cuando el colorante trazador alcanzó los últimos 5mm del gel. La tinción, luego de extraer los geles de los respectivos tubos, se realizó mediante una solución de brillant blue R-250 durante 3 hs sin previo fijado.

Brillant blue R-250	0,125g
Acido acético glacial	46,00ml
Metanol(sol. acuosa 50%)	45,40ml

La decoloración se llevó a cabo en 72 hs, con :

Metanol	50ml
Acido acético glacial	75ml
Agua dest. c.s.p.	1000ml

renovando la solución decolorante 3 veces. Los geles fueron conservados en la misma solución decolorante.

2.- CRIA DE S. oryzae

2.A.- ALIMENTACION NATURAL

Ambas cepas fueron criadas en recipientes de vidrio de 9,0 cm de diámetro y 12,0cm de altura, con una abertura de 4,5cm de diámetro en su parte superior, cubierta con una malla de alambre de bronce de # 0,8mm, para facilitar el intercambio gaseoso. La cría se desarrolló en una estufa de cultivo a $29^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%$ HR, la que fue mantenida mediante una solución saturada de ClNa (Winston & Bates, 1960)(II.B ; II.D.2 ; II.E.3).

Como alimento natural se utilizó, por recipiente, 140g de trigo (*Triticum aestivum*, germoplasma Mexicano, Victoria-INTA) libre de insecticidas, tratado con frío (-18°C) durante 15 días y conservado posteriormente entre $+2^{\circ}\text{C}$ y $+5^{\circ}\text{C}$. Cuarenta y ocho horas antes de utilizar el trigo para la incubación, se lo colocó sobre una bandeja en la estufa de cultivo ($29^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%$ HR) para estabilizar el contenido de agua de los granos en 12,5% aproximadamente (II.B ; II.D.2 ; II.E.3).

En cada recipiente se colocaron 220 hembras y 80 machos ("padres") (II.C.4 ; II.C.5), de 0 - 5 días de edad (II.C.2), sexados bajo anestesia (3.A). Los **padres** fueron retirados de los recipientes luego de 5 días (II.C.2) por succión, mediante un aspirador eléctrico, sobre un tamiz (# 1,0mm), separando además las partículas finas. El trigo fue colocado nuevamente en el respectivo recipiente, y en estufa ($29^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%$ HR) hasta 5 días de después de emergidos las primeras imagines (F1).

2.B.- ALIMENTACION ARTIFICIAL

Según los resultados parciales de los diferentes autores que se ocuparon de los aspectos nutricionales y metabólicos de *S.oryzae* (II.E.), se formuló un alimento balanceado que cubre las necesidades de hidratos de carbono, proteínas, vitaminas y otras sustancias esenciales.

Composición cuali-cuantitativa:

Composición		Referencia
L - lisina (clorhidrato).....	300 mg	Baker, 1976
L - arginina.....	150 mg	Baker, 1979
L - histidina.....	120 mg	Baker, 1979
L - isoleucina.....	200 mg	Baker, 1979
L - leucina.....	400 mg	Baker, 1979
L - treonina.....	150 mg	Baker, 1979
L - triptofano.....	40 mg	Baker, 1979
L - valina.....	180 mg	Baker, 1979
L - metionina.....	200 mg	Baker, 1978
Colesterol.....	100 mg	Baker, 1974
Amilopectina.....	20,0 g	Chippendale,1972
Levadura de cerveza (polvo).....	7,5 g	Baker & Mabie,1959
Caseina (devitaminizada).....	5,0 g	Baker & Mabie,1959
Germen de trigo.....	2,5 g	Baker & Mabie,1959
Almidón de trigo c.s.p.....	100,0 g	Baker & Mabie,1959

Tabla 15: Composición cuali-cuantitativa de la dieta artificial para la cría de *S. oryzae* bajo condiciones controladas.

Esta mezcla fue fraccionada y comprimida mediante una pastilladora automática en comprimidos de 500mg con doble ranurado (debido a que *S. oryzae* solamente ovipone sobre sustratos compactos <Davis & Bry, 1985>). Los comprimidos pueden conservarse entre +2°C y +5°C durante más de seis meses ya que no contienen agua. Por este motivo fueron hidratados (12,5%) antes de ser utilizados (II.E.3), colocándolos en una estufa a 29°C, en presencia de una solución saturada de BrNa (Solomon, 1951) durante 72hs, y transferidos luego a los envases de cría procediendo como en 2.A.

Para discriminar en esta experiencia la influencia del tamaño del alimento sobre la fecundidad y el tamaño de los individuos (II.C.1.a) se realizaron dos ensayos paralelos : uno, con 150 comprimidos enteros ($\frac{1}{1}$) y otro con 150 comprimidos partidos en cuartos ($\frac{1}{4}$). Cada ensayo se realizó por triplicado, los individuos de la F1 fueron contados y sexados, y se utilizó el largo del élitro como standard del tamaño individual. Ambas F1 ($F1_{\frac{1}{1}}$; $F1_{\frac{1}{4}}$) fueron comparadas con la F1 de un ensayo paralelo ($F1_{\top}$) (padres extraídos de la misma población), realizado sobre 75g de trigo (*Triticum aestivum*, germoplasma Mexicano, Victoria-INTA).

Sobre la medida de los élitros se calculó el coeficiente de variación del tamaño individual entre las F1 de los tres ensayos, comparando además a los grupos entre sí, a través de un test F de diferencias entre varianzas. Se utilizó un test F de Anova y el método de contrastes según Scheffé para considerar las

diferencias de tamaño entre los grupos para los distintos alimentos, según el sexo.

2.C.- PREFERENCIA ALIMENTARIA

En tres cápsulas de Petri de 15cm de diámetro se colocaron enfrentados : un comprimido del alimento artificial y aproximadamente 5 g de trigo (Victoria-INTA, germoplasma Mexicano) y en el centro, 10 imagines de *S. oryzae* (2 individuos x grano). La cajas de Petri se conservaron cerradas, a temperatura de incubación y en ausencia de luz. Durante 10 días, cada 12hs se contabilizaron los individuos que se encontraban sobre el trigo y sobre el alimento artificial.

3.- ENSAYO BIOLÓGICO - SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS

3.A.- ANESTESIA

Para el sexado masivo de individuos se utilizó un flujo continuo de CO_2 a temperatura ambiente, dentro de un recipiente especialmente adaptado para trabajar con estereomicroscopio. El flujo continuo de CO_2 se reguló mediante una columna de mercurio en una válvula de seguridad de un aparato de Kipp (Fig.20 A), estableciéndose como volumen ideal de trabajo $1200cm^3$ /minuto ($25^\circ C$ y $760mmHg$). El gas (comprimido) fue lavado y llevado a temperatura ambiente, por burbujeo en 500 ml de agua con CO_3Ca en suspensión, en un frasco de Woulff de tres bocas (Fig.20.C). La

salida del frasco de Woulff, lleva a una cámara cilíndrica de 7cm de diámetro y 4cm de alto, que se encuentra sobre la platina del estereomicroscopio (Fig.20.B). Allí el gas llena primeramente una cámara (Fig.20.a), difunde luego en un soporte de 1cm de espuma de polietileno (b) y pasa posteriormente por una malla metálica (c), sobre la cual se encuentran los insectos.

Para determinar la toxicidad del CO₂ para *S. oryzae* y establecer la influencia que el método de sexado bajo anestesia pueda tener sobre los resultados de los ensayos toxicológicos posteriores, se sometió durante 10, 15, 20 y 30min. a lotes de 30 individuos de cada sexo a una atmósfera de CO₂ dentro de la cámara (Fig.20.B). Transcurrido el tiempo de exposición para cada caso, se retiraron los ejemplares de la cámara colocándolos en un recipiente ventilado. Cada 30min. se contaron los individuos recuperados de la anestesia. Los ensayos se realizaron por duplicado y a temperatura ambiente.

En una experiencia posterior se topicaron con malatión (3.C.1.) dos grupos de 30 individuos cada uno, previamente sometidos a anestesia durante 30 minutos, y un tercer grupo control (sin anestesiar), para conocer posibles influencias del método de la anestesia, sobre los resultados de los ensayos toxicológicos.

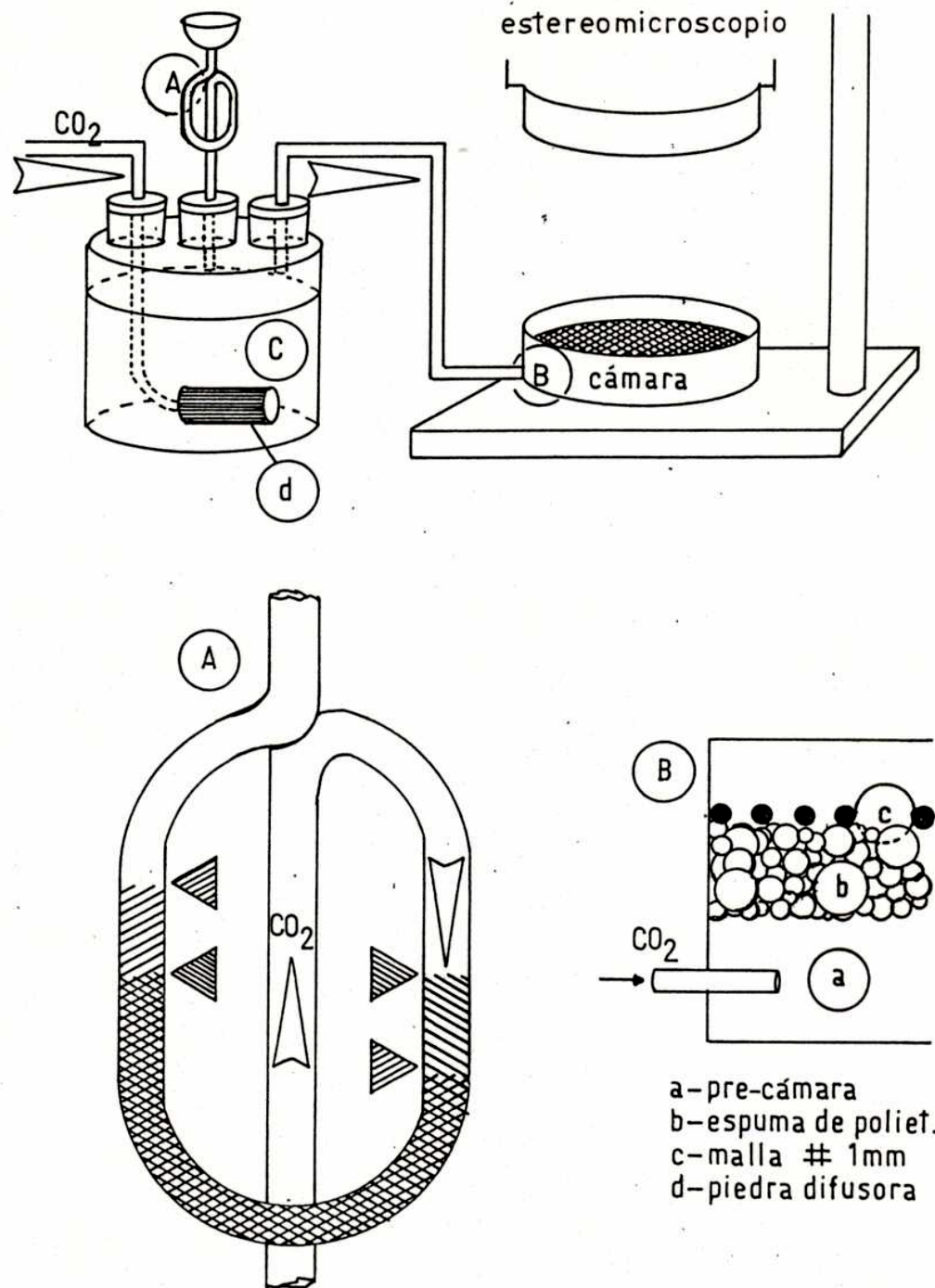


Fig.20: Equipo de anestesia para el sexado y topicación de *S. oryzae* con estereomicroscopio.

3.B.- SEXADO DE *S. oryzae*

Para el sexado de *S. oryzae* se utilizó un estereomicroscopio y el método de anestesia detallado en 3.A. Como carácter sexual secundario se consideró el largo de la proboscis, desde su extremo distal hasta la base del escapo (Fig.31.a). Las medidas fueron tomadas sobre 100 ejemplares de cada sexo, de los cuales una mitad pertenecía a la cepa CIPEIN-S y la restante a la cepa CIPEIN-RM.

3.C.- METODOLOGIA DEL ENSAYO

3.C.1.- Tópico

MATERIAL BIOLÓGICO : De los cultivos CIPEIN-S y CIPEIN-RM (cepas susceptible y resistente) se seleccionaron individuos de 5 - 10 días de edad, que fueron anestesiados y sexados como en 3.A y 3.B. Los insectos no fueron sometidos a ayuno previo a los ensayos toxicológicos.

INSECTICIDAS UTILIZADOS :

MALATION: S-1,2-di(etoxicarbonil)etil-0,0-dimetil fosforoditioato

SUMITION : 0,0-dimetil-0-(3-metil-4-nitrofenil)-fosforotioato

PIRIMIFOS-METILO : O-<2-(dimetilamino)-6-metil-4-pirimidil)-0,0-dimetil-tiofosfato

DELTAMETRINA : (S)-ciano-(3-fenoxi-fenil)-metil-(1R,3R)-3-(2,2-dibromometil)-2,2-dimetil ciclopropan-carboxilato

CARBARYL : alfa naftil-N-metilcarbamato

LINDANE : gamma-hexacloro-ciclo-hexano

COMPUESTO	ORIGEN	GRADO DE PUREZA
MALATION	Cyanamid Argentina	purif.por cristaliz.>98%
SUNITION	Sumitomo Chem.	97%
PIRIMIFOS -METILO	Duperial	96%
CARBARYL	Union Carbide	purif.por cristaliz.>98%
DELTAMETRINA	Roussel Uclaf	97%
LINDANE	Syntial	95%

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES : El solvente utilizado es una mezcla de tres partes de éter de petróleo y una de acetona (v/v). Luego de un 'screening', que permitió ajustar las correspondientes concentraciones para cada insecticida, se prepararon las siguientes series de diluciones a partir de soluciones de 10mg/ml de cada compuesto :

MALATION : 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 y 0,50mg/ml

SUNITION : 0,060; 0,080; 0,010; 0,012 y 0,014mg/ml

PIRIMIFOS-METILO : 0,010; 0,030; 0,050; 0,07 y 0,010mg/ml

CARBARYL : 8,00; 12,00; 16,00 y 18,00 mg/ml

DELTAMETRINA : 0,005; 0,010; 0,015; 0,20; 0,025 y 0,030mg/ml

LINDANE : 0,50; 2,00; 2,00; 4,00 y 6,00mg/ml

APLICACION DEL TOXICO : Se aplicó un volumen de 0,2 μ l sobre la superficie ventral del abdomen de cada insecto. Para ello se utilizó una jeringa Hamilton N° 701-N de 10 μ l provista de un

"repeating dispenser" Hamilton N° PB-600-1 con una adaptación especial, desarrollada para jeringas de 50 μ l o menores. La topicación se realizó con esteromicroscopio y anestesia con CO₂ como en 3.A. Por cada concentración del xenobiótico, se topicaron 30 individuos de cada sexo, que fueron postertiormente colocados en recipientes separados (frascos de vidrio de de 20ml con ventilación en el extremo superior), en estufa de cultivo a 28° \pm 1°C y 77% \pm 2%HR y en ausencia de alimento, durante 24 horas. Por cada serie de diluciones y bajo las mismas condiciones se preparó un control, topicando con 0,2 μ l de solvente por individuo.

EVALUACION DE LOS ENSAYOS : Transcurridas 24 horas a partir de la tópicación, se anotaron los datos de mortalidad. El criterio para evaluar la respuesta fue la caída del insecto ("knockdown"), definida como la incapacidad para sostenerse y caminar.

El cálculo de la dosis letal para 50% de la población (DL₅₀) se realizó mediante un programa de computación de probabilidad estadística, basado en el método de Litchfield & Wilcoxon, 1949. El factor de resistencia (FR) de la cepa resistente a malatión, se calculó de la siguiente manera :

$$FR = DL_{50} \text{ CIPEIN-RM} / DL_{50} \text{ CIPEIN-S}$$

3.C.2.- Film

La técnica utilizada se basa en la exposición continua de 15 imagines en ausencia de alimento, a un papel de filtro Whatman Nº1, de 7cm de diámetro impregnado con 0,5ml de la solución de insecticida. Sobre el papel de filtro se coloca un aro de vidrio de 5,0cm de diámetro y 2,5cm de altura (Champ, 1968), tapándolo por su parte superior mediante una placa de vidrio para evitar el escape de los ejemplares.

Mediante una mezcla de éter de petróleo y acetona (3:1, v/v) se prepararon las correspondientes soluciones de malatión que se utilizaron para impregnar los respectivos papeles de filtro, de manera de obtener las siguientes concentraciones del tóxico por unidad de superficie : 1,0µg/cm² , 2,5µg/cm², 5,0µg/cm², 7,5µg/cm², 10µg/cm², 20,0µg/cm², 25,0µg/cm², 30,0µg/cm² y 35,0µg/cm².

Los papeles impregnados se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas, antes de iniciar el ensayo. Los ejemplares fueron expuestos al film durante 12 hs y posteriormente se los colocó, durante 24 hs, en frascos de vidrio de de 20ml con ventilación en el extremo superior, en ausencia de alimento. El criterio utilizado para la evaluación fue el mismo que en 3.C.1 y el factor de resistencia, se calculó así :

$$FR = CL_{50} \text{ CIPEIN-RM} / CL_{50} \text{ CIPEIN-S}$$

4.- EVALUACION BIOQUIMICA DE LAS CAUSAS DE RESISTENCIA

4.A.- METABOLISMO - INHIBICION DE ENZIMAS DETOXIFICANTES.

4.A.1.- Inhibición de la actividad carboxiesterásica "in vivo"

Para los ensayos toxicológicos "in vivo" se empleó la misma metodología como en 3.C.1., para las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM y se utilizaron los siguientes sinergistas :

(TPP) trifenil fosfato de Aldrich, 98%.

(TOCP) tri o-cresil fosfato de Kodak, 99%.

Antes de realizar el cotratamiento con los sinergistas, se ensayó por topicación la toxicidad de cada uno de ellos en forma individual.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES : Se prepararon las siguientes soluciones madre de malatión-TPP y malatión-TOCP en éter de petróleo-acetona (3:1, v/v):

A	B
malatión.....10,0mg	malatión.....10,0mg
TPP.....100,0mg	TOCP.....100,0mg
éter p.-acetona,c.s.p..1,0ml	éter p.-acetona,c.s.p..1,0ml

a partir de las soluciones madre, se prepararon las siguientes diluciones en éter p.-acetona (3:1, v/v) (las concentraciones se encuentran expresadas en función del insecticida :

A.- 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 y 0,50mg/ml

B.- 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 y 0,50mg/ml

La evaluación de los ensayos se realizó como en 3.C.1.

4.A.2.- Inhibición de la actividad de las oxidasas (MFO)"in vivo"

Se emplea la misma metodología como en 4.A.1., utilizando como sinergista el butóxido de piperonilo (Aldrich, 90%), y a partir de una solución madre de :

deltametrina.....	10,0mg
BPP.....	50,0mg
éter p.-acetona,c.s.p.....	1,0ml

se preparan las siguientes diluciones con éter p.-acetona (3:1) :
0,005; 0,010; 0,015; 0,20; 0,025 y 0,030mg/ml

Se empleó la misma técnica y tratamiento posterior como en 3.C.1.

4.A.3.- Bloqueo del glutatión (GHS) "in vivo"

De la manera descrita en 3.C.1 se topicaron ejemplares de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM con una solución acetónica de maleato de dietilo (Aldrich, 98%), 10mg/ml. Luego de 60 minutos fueron topicados nuevamente con soluciones de malatión de : 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45 y 0,50mg/ml

La evaluación de los ensayos se realizó de la misma manera como en 3.C.1.

4.B.- ATAQUE AL SITIO DE ACCION - ACETILCOLINESTERASA

4.B.1.- Medición de la actividad colinesterásica (AChE)

Con estereomicroscopio se disecaron 60 cabezas de *S. oryzae* sin sexar, que fueron homogeneizadas (como en 1.E.) en 0,5ml de ClNa 0,5M en buffer fosfatos 0,02M, pH: 7,2. El homogenato fue filtrado por lana de vidrio y centrifugado a 10.000G, separando luego el sobrenadante y descartando el sedimento.

Para la medición de la actividad colinesterásica se utilizó una adaptación del método de Ellman (Ellman et al, 1961), con los siguientes reactivos: Reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) con el cual se preparó la solución de buffer-cromógeno, pesando 10mg de DTNB en 100 ml de buffer-fosfatos 0,2M, pH= 7,2 y una solución 12 mM de ioduro de acetiltiocolina (ATC), que se preparó con 34,7mg de ATC en 10ml de agua destilada.

El producto de la reacción enzimática (o anión 5-tio-2-nitrobenzoato ; $E_m = 13.600$ a 412nm), se midió con un espectrofotómetro Varian 634 doble haz. En una celda de 5 mm de paso óptico se colocaron 0,95 ml de buffer-cromógeno (DTNB), 100ul del preparado enzimático (homogenato) y finalmente 50ul de sustrato (ATC), con los que se inició la reacción. En la celda de referencia se colocó buffer-cromógeno y sustrato para medir la autohidrólisis del segundo. El cálculo de la actividad enzimática se realizó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Unidades Enzimáticas (U.E.)} &= \frac{\mu \text{ moles sustrato hidroliz.}}{\text{minuto}} \\ &= \frac{\text{Abs/min.} \times 1,1 \times 10^3}{13,6} \end{aligned}$$

$$\text{Actividad específica (A.E.)} = \frac{\mu \text{ moles sustrato hidroliz.}}{\text{min.} \times \text{mg de proteínas}}$$

Se define U.E. como la cantidad de enzima hidrolizada por μmol de sustrato por minuto, a pH=7,2 y 22°C.

4.B.2.- Estabilidad de la enzima

El homogenato de 60 cabezas de *S. oryzae* (1.E) se incubó en un baño termostatzado a 30°C, retirándose alicuotas a los 0, 30 y 60 minutos para determinar el tiempo de inactivación de la enzima a temperatura constante, de la manera descrita en 4.B.1.

4.B.3.- Caracterización de la actividad colinesterásica

La actividad de la enzima frente al sustrato (ATC) y la concentración ideal del mismo, se determinó mediante la técnica de Ellman. Se utilizó un homogenato de 60 cabezas de *S. oryzae* (4.B.1.) y se prepararon soluciones de ATC : 1mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM, 500mM, 1000mM y 2000mM. Para cada determinación se utilizaron:

0,95 ml de buffer-cromógeno

100 μl de homogenato (envejecimiento = 30min.)

50 μl de sustrato (ATC)

Se registró la actividad enzimática por minuto y se descontó la autohidrólisis del sustrato en la celda de referencia.

Finalmente, se graficó la actividad específica vs. pS ($pS = -\log$ de la concentración molar del sustrato).

4.B.4.- Inhibición de la actividad colinesterásica "in vitro"

Se prepararon homogenatos de 60 cabezas de *S. oryzae* (4.B.1.) de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, que se dejaron envejecer durante 30min. a temperatura ambiente. Se utilizó como inhibidor, una solución 10^{-2} M de malaoxón (S - (1,2 - Di (etoxicarbonil) etil) dimetil fosforotiolato, PM:314) en etanol absoluto.

La actividad control (A_0) del preparado enzimático (homogenato) se midió sobre 100ul del mismo más 0,95ml de buffer-cromógeno y 100ul de ATC 12mM según el método descrito en G1. Del homogenato restante, 0,5ml se incubaron a 30°C con 5 μ l de malaoxón 10^{-2} M y de aquí se tomaron alícuotas de 100ul para medir la actividad enzimática durante tres minutos con 3, 6, 9 y 12 minutos de incubación, para obtener los distintos valores de (A_e). Finalmente se graficó el $\ln A_0/A_e$ para ambas cepas y para los diferentes tiempos de incubación y se obtuvo k_1 a partir de $k_1 \times (I)$ con las pendientes de las rectas obtenidas y la concentración del inhibidor.

R e s u l t a d o s

y

D i s c u s i ó n

1.- CARACTERIZACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

1.a.- CEPAS UTILIZADAS

Debido a que ninguno de los criterios conocidos hasta el momento para la determinación específica de las imágenes vivas de *S. oryzae* es suficiente por sí sólo (I.B.1.) fue necesario corroborar, a través de todos los métodos disponibles, si las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM se encuentran "contaminadas" con *S. zeamais*. La metodología aplicada permitió además, tipificar las cepas CIPEIN.

La variabilidad, especialmente en cuanto al tamaño, que se destaca a primera vista entre los individuos de una muestra de *Sitophilus*, no sólo puede deberse a la presencia de más de una especie, sino también a los efectos sobre la población de una serie de variables vinculadas con la cepa y las condiciones generales de cría (I.B.). El intervalo dentro del cual varía el peso de los individuos de *S. oryzae* (cepa CIPEIN-S y -RM), criados sobre trigo en condiciones standard ($29^{\circ}\text{C} \pm 1$ y $77\% \pm 2\%$ HR), es amplio : para las hembras es de 0,80 mg - 2,20 mg ($\bar{x} = 1,52$; $S = 0,31$) y para los machos de 0,60 mg - 1,70 mg ($\bar{x} = 1,27$; $S = 0,27$). Estas diferencias saltan a la vista en ésta y otras cepas (Fourie, 1987 ; Evans, 1982) y son el origen de una serie de desaciertos que pueden encontrarse dispersos en la bibliografía (II.A. - II.F.).

Tanto Richards, 1944 como Birch, 1944 separaron el material para sus experiencias, identificando dos "cepas" o "formas" por

caracteres sencillos como el tamaño de los ejemplares o su color. Estos mismos "caracteres sencillos", sabemos ahora, aparecen además como polimorfismos dentro de una misma población.

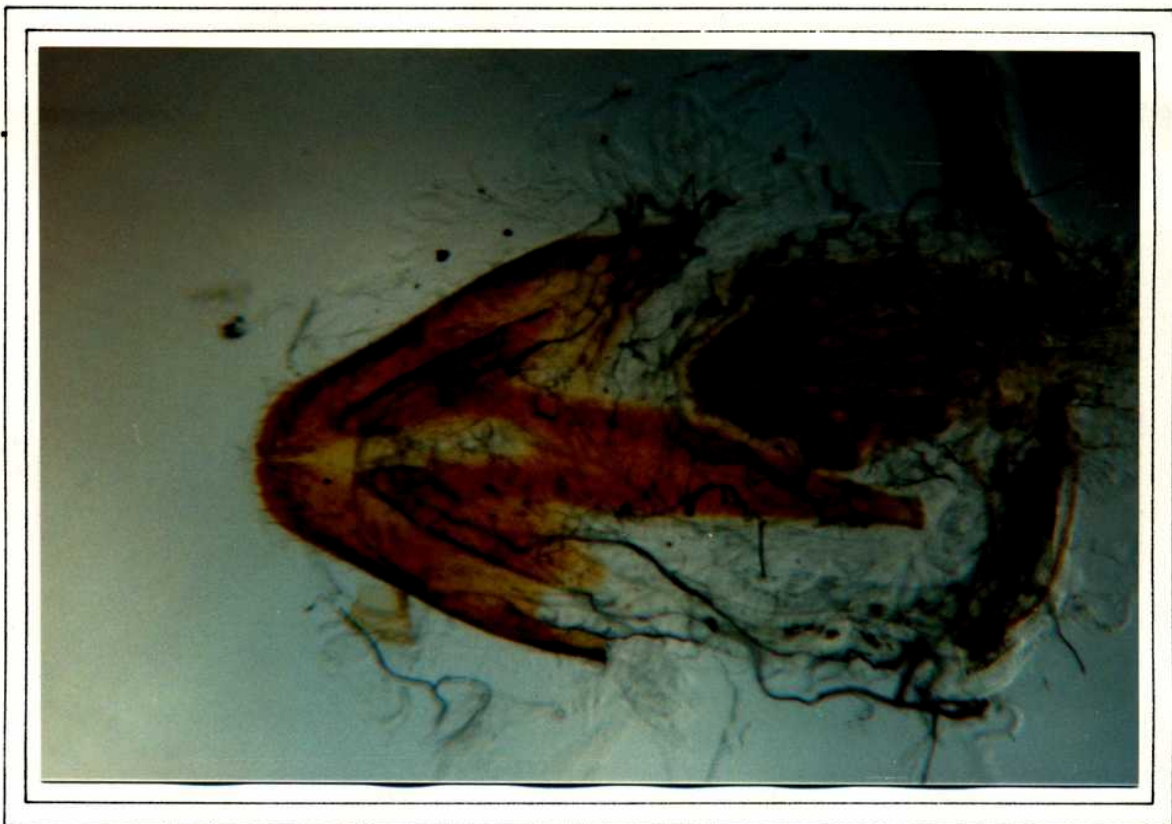
1.b.- CARACTERIZACION ANATOMICA

Los caracteres anatómicos descritos por Floyd y Newson, 1959 y discutidos en (I.B.1.) no se consideraron para la determinación específica de *S. oryzae*, debido a la variabilidad observada en las muestras, tanto en la forma del octavo esternito (Fig.1.C) de la hembra, como del esclerito (Fig.1.A) en el macho. Especialmente la placa basal es una estructura sumamente variable desde el punto de vista morfológico (I.B.). En la misma población (CIPEIN-S y CIPEIN-RM) puede encontrarse, desde la forma "triangular y ancha" (característica para *S. oryzae* según Floyd y Newson, 1959) hasta la "angosta y acintada" (característica para *S. zeamais*), además de todas las formas intermedias posibles. Cabe destacar que la forma de la placa basal no muestra ningún tipo de correlación con el tamaño o la pigmentación de los individuos.

La superficie lisa del aedeagus (Fig.22.A) es una característica de alto valor diagnóstico (I.B.2) y estable dentro de la población, así como a través de las generaciones. Este carácter puede también observarse "in vivo" ya que la mayoría de los ejemplares anestesiados mediante CO₂, protruyen el aedeagus (Fig.22.A).

De las características diagnósticas citadas por Bordeaux, 1969 para *S. oryzae*, se utilizó como carácter complementario para la identificación la zona media, no ornamentada, del pronoto (Fig.22.B). Las puntuaciones del pronoto "Punctures on dorsum of pronotum longitudinally elliptical.." (Bordeaux, 1969), carecen de valor diagnóstico, debido a su variabilidad dentro de la población e inclusive en el individuo, sobre el cual pueden encontrarse combinadas las formas elípticas con las circulares (Fig.22.B).

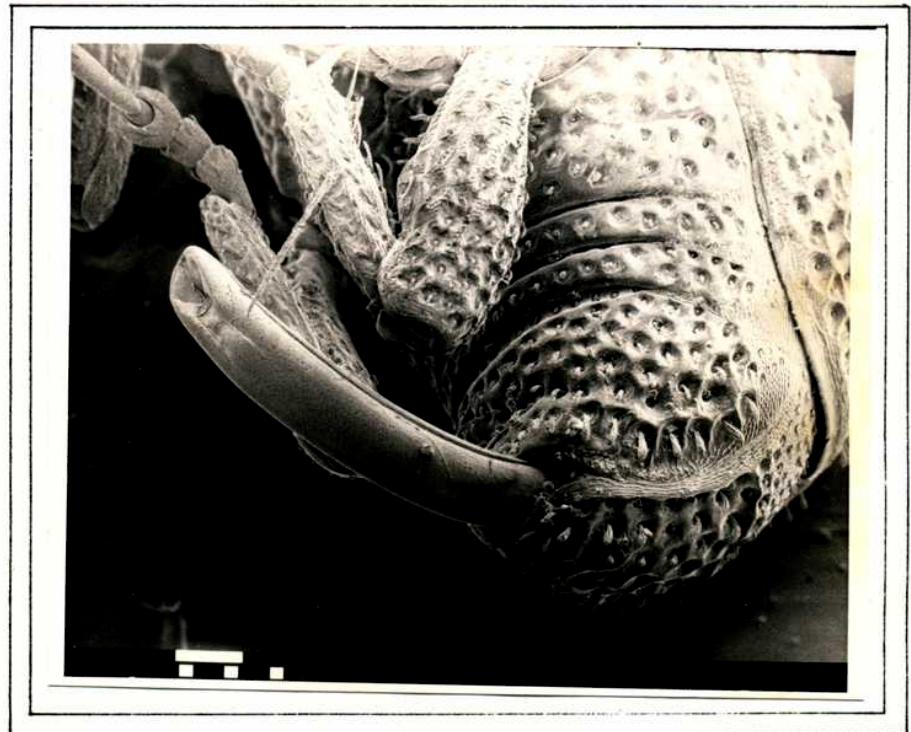
Otro de los criterios de identificación "in vivo" exitosamente utilizados -sobre material criado con alimento artificial-, es la anatomía de la cápsula cefálica de la larva del cuarto estadio (Fig.22.C) basada en la descripción de Hossain & Verner, 1979 (I.B.2.).





C

Fig.21: A.- octavo esternito ; B.- aedeagus y esclerito, vista lateral ; C.- esclerito, vista dorsal.



A

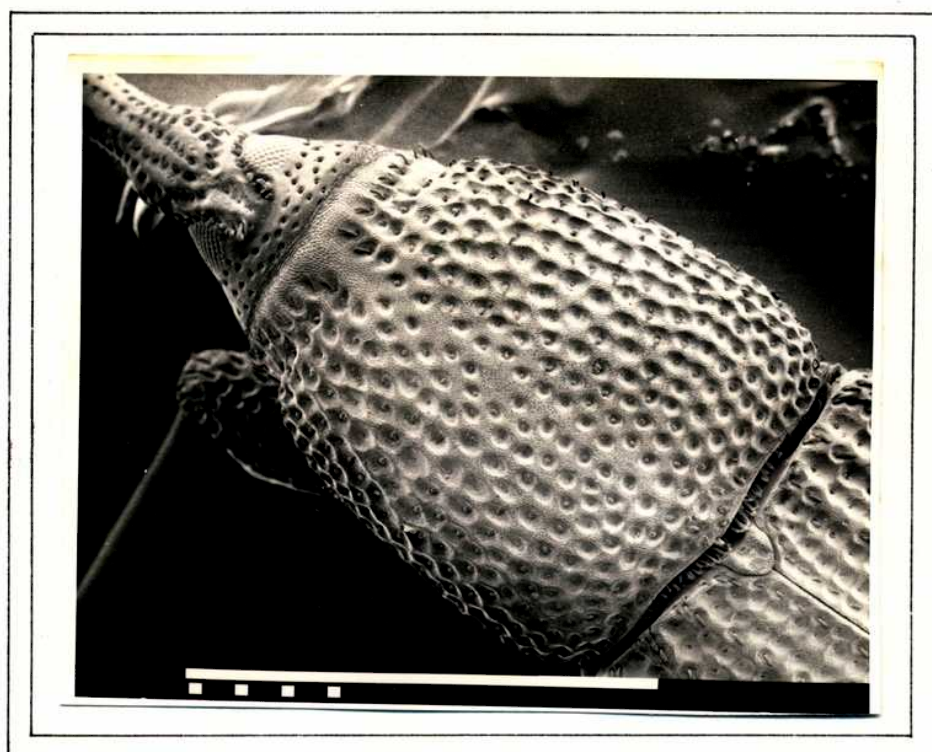


Fig.22: A.- aedeagus, 100x ; B.- pronoto, dorsal, 70x ; C.- vista frontal de la cápsula cefálica de la L₄, 450x.

1.c.- CARACTERIZACION POR TAXONOMIA NUMERICA

Birch, 1944, así como Richards, 1944 separaron a *S. oryzae* de *S. zeamais*, basándose en caracteres simples como tamaño y color. Por medio del análisis multivariado (cluster analysis) se determinó el grado de heterogeneidad de las muestras, considerando el criterio utilizado por estos autores.

Grupo	HG		HP		HN		HM	
	x	S ²	x	S ²	x	S ²	x	S ²
1	803,5	552,3	749,0	426,5	768,3	586,6	788,9	379,8
2	138,7	14,8	145,0	15,8	145,3	17,9	135,8	07,0
3	473,5	126,9	461,3	77,0	474,8	100,5	463,2	76,7
4	441,7	61,5	425,0	63,0	439,0	57,3	437,9	61,7
5	1032,2	359,0	992,8	516,9	1020,8	377,6	1001,6	619,1
6	1364,8	372,6	1288,5	643,8	1351,5	434,1	1307,4	823,1
7	2810,4	2325,8	2682,5	3093,2	2775,5	2240,4	2736,8	3405,6
8	520,3	94,9	511,3	75,9	518,8	115,9	514,7	87,0
9	928,3	336,0	894,0	288,1	919,8	346,4	897,9	358,4
10	924,8	279,8	854,5	388,6	918,3	360,9	856,3	466,9
11	632,6	157,4	614,5	142,5	629,5	175,3	617,4	192,0
12	906,1	472,4	877,3	332,3	900,3	461,2	889,5	442,7

Tabla 16: Media y varianza de las medidas correspondientes a cada grupo de caracteres considerados para los dendrogramas (Fig.23 y Fig.24) (medidas en micrones).

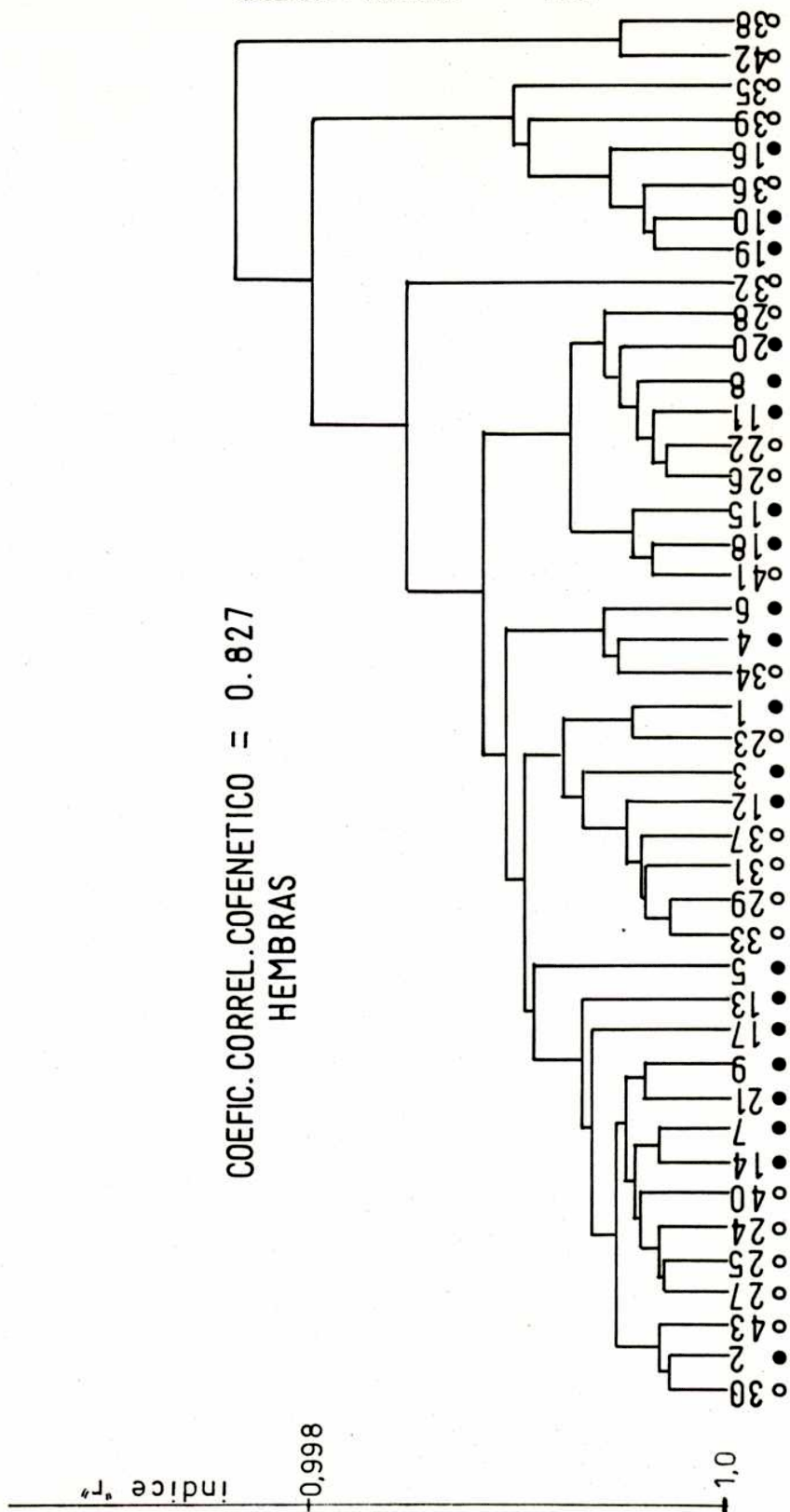


Fig.23 : Dendrograma de hembras "grande" vs. hembras "pequeña"
Caracteres utilizados y datos en tabla 16.

COEFIC. CORREL. COFENETICO = 0.832
HEMBRAS



Fig.24: Dendrograma de hembras "marrón" vs. hembras "negro"

En los dendrogramas obtenidos (Fig.23 y Fig.24), todos con buen índice de correlación cofenético, no es posible separar OTU's (unidades taxonómicas operacionales) o "fenones" en el caso de su clasificación por tamaño o por color. Se estableció a través de esta metodología, que las diferencias en tamaño y color observadas en las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM se deben a la variabilidad dentro de la especie y no a la presencia de más de una especie.

1.d.- CARACTERIZACION GENETICA

Los cruzamientos entre *S. oryzae* y *S. zeamais* son infértiles (Birch, 1944) o producen una descendencia híbrida muy escasa (Richards, 1944), de modo que los cruzamientos pueden considerarse como una técnica complementaria apropiada para la identificación específica.

Todos los cruzamientos entre individuos de las cepas CIPEIN, resultaron interfértiles, como puede observarse en la Tabla 17. Se advierte un descenso en el número de la progenie proveniente de las hembras pequeñas (B y D) y de la cepa resistente en general. Los resultados de B y D eran esperables, ya que la fecundidad en *S. oryzae*, muestra una relación directa con el tamaño de los individuos (II.C.3). Por otra parte, también era esperable la baja en la descendencia (F1) de la cepa CIPEIN-RM, debido a la disminución de la fecundidad y al incremento en la mortalidad de los estadios preimaginales en esta cepa (V.C).

Cruzamiento	Nº ind.F1 máximo		Nº ind.F1 mínimo		Nº ind. F1 medio			
	S	R	S	R	S	(S)	R	(S)
A	40	36	4	10	29,9	(10,1)	23,6	(8,5)
B	26	22	8	6	20,2	(6,7)	17,3	(5,2)
C	38	30	12	9	28,5	(9,8)	24,0	(7,1)
D	25	20	9	7	21,5	(5,3)	17,1	(4,0)
E	30	21	3	4	18,3	(9,9)	15,8	(6,3)
F	38	32	16	12	27,6	(8,6)	23,8	(7,6)

Tabla 17 : Descendencia de los ensayos de cruzamientos de individuos grandes (> 2,7mm) y pequeños (< 2,5mm) de cinco días de edad, de las cepas susceptible y resistente (S y R) de *S. oryzae*. (S)=desviación standard.

Estos resultados corroboran que CIPEIN-S Y CIPEIN-RM son dos cepas de *S. oryzae*.

1.e.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA

La electroforésis en gel de poliacrilamida de proteínas es un método bioquímico lo suficientemente sensible para detectar diferencias cuali o cuantitativas entre dos especies e inclusive, entre dos poblaciones. Esta técnica no solo se aplicó a los ejemplares de diferente clase de tamaño, sino también a aquellos de diferente color (según el criterio de Birch, 1944 y Richards, 1944), debido a que en ambas cepas se encuentran individuos claros ("marrones") (de más de 7 días de edad) y oscuros ("negros").

Proteínas totales en los diferentes grupos :

Muestra	Homogenatos	µg proteína por animal			
		MAXIMO	MINIMO	MEDIO	S
I	machos >2,7mm	110	105	106,6	2,8
II	hembras >2,7mm	140	135	138,3	2,8
III	machos <2,5mm	90	85	86,6	2,8
IV	hembras <2,5mm	115	110	111,6	2,8
V	machos - B	100	95	95,6	2,8
VI	hembras - B	115	105	110,0	5,0
VII	machos - S	105	100	101,6	2,8
VIII	hembras - S	130	125	126,0	2,8

Tabla 18: Proteínas totales por el método de Lowry (muestras por triplicado).

Electroforesis en gel de poliacrilamida :

La única diferencia cualitativa observada en los distintos proteinogramas (Fig.25) es la presencia de la banda 12', característica de los machos (Tabla 19). Entre las distintas muestras, para un mismo sexo, se reconocen diferencias cuantitativas (Tabla 19), especialmente significativas para los grupos V y VI. En las muestras correspondientes a los machos, no se observan diferencias cuantitativas entre los grupos I, III y VII; en cambio, la muestra V se distingue de las tres primeras a través de las bandas 12', 13, 14, 20 y 21. En las hembras solo los grupos II y VIII son similares entre si y el grupo VI se destaca del resto, por diferencias cuantitativas a nivel de las bandas 7, 12 y 21 (Tabla 19).

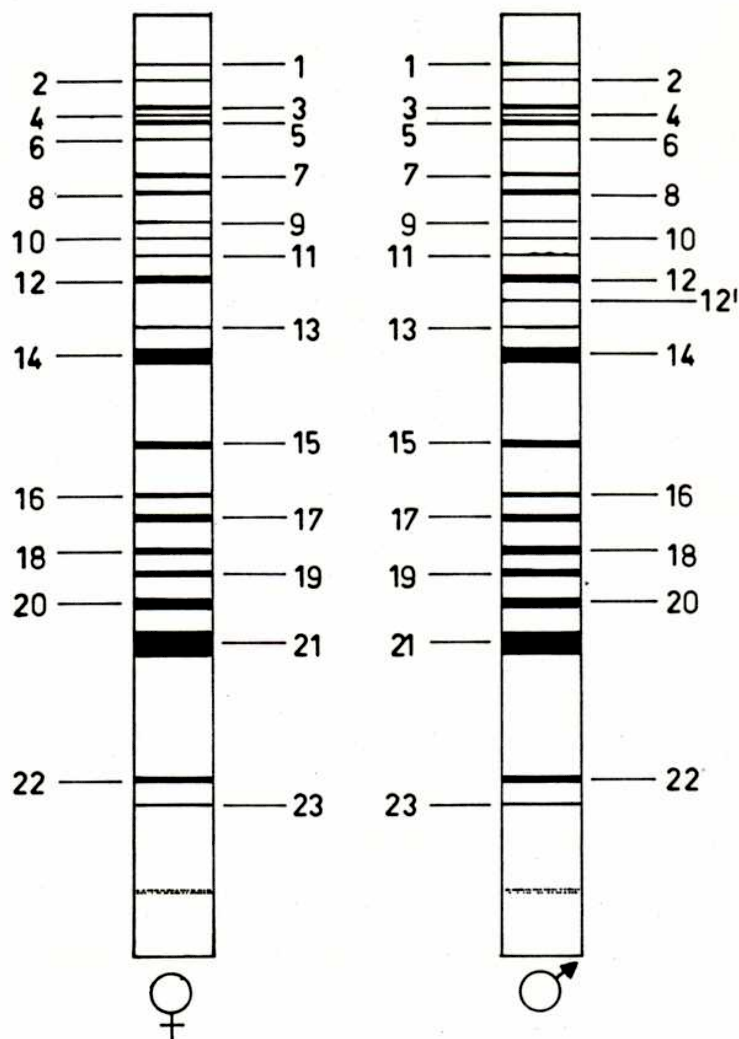


Fig.25: Representación esquemática de los geles revelados con Brilliant blue R-250.

	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	<i>VIII</i>
<i>I</i>		12'						
<i>II</i>	7 10 20 21							
<i>III</i>	—			12'				
<i>IV</i>		9 10 19 20 21	9					
<i>V</i>	12' 13 14 20 21		12' 13 14 20 21			12'		
<i>VI</i>		7 12 21		7 9 13 21	14 16 17 19 20			
<i>VII</i>	—		—		12' 13 14 20 21			12'
<i>VIII</i>		—		9 19 21		7 12 21	7 20 21	

← DIF. CUANTITATIVAS →

↑ DIF. CUALITATIVAS

Tabla 19: Diferencias cuali y cuantitativas entre las diferentes muestras, según los correspondientes proteinogramas.

Los proteinogramas correspondientes a los homogenatos de insectos provenientes de distintos grupos, mantienen suficiente similitud cualitativa y sugieren que las cepas en estudio están constituidas por una sola especie.

2.- CRIA DE S. oryzae

A través de la standardización del método de cría de *S. oryzae*, fijando todas las variables posibles, se obtuvieron sucesivas generaciones con características similares, así como poblaciones con un bajo coeficiente de variación en el tamaño de los individuos.

2.a.- ALIMENTACION NATURAL

Los parámetros considerados para la cría de *S. oryzae* favorecieron el desarrollo de poblaciones de características relativamente constantes, en intervalos regulares de 30 días aproximadamente. Este sistema de cría permitió eliminar por un lado, los altos índices de mortalidad provocados por situaciones desfavorables que se generan en condiciones no controladas (II.B. ; II.D. ; II.E.3) y por otro, los bajos índices de fertilidad que surgen a partir de la interacción de ciertas variables (II.C). Con la standardización de los valores de humedad (II.B), temperatura (II.B), densidad de población (II.C.5), proporción de sexos (II.C.4); y la práctica de retirar los padres luego de un corto período de oviposición, y eliminar las partículas finas

originadas por su actividad, pudieron preestablecerse los valores de :

- a.- fecundidad
- b.- mortalidad de estadios preimaginales
- c.- competencia intraespecífica
- d.- balance de agua en el ambiente de cría
- e.- atmósfera del ambiente de cría
- f.- producción de calor durante la incubación

pudiéndose evitar además, el desarrollo masivo de hongos y la invasión de ácaros en los cultivos.

El ciclo de vida de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM se desarrolla bajo estas condiciones en 32 ± 2 días y el número de descendientes para la cepa CIPEIN-S es de 3300 (S=297) y para la cepa CIPEIN-RM es de 2600 (S=349). En ambas cepas el largo de los individuos oscila entre 2,61mm y 3,01mm ($\bar{x} = 2,67$ mm ; S=0,17) en los machos y entre 2,69mm y 3,23mm ($\bar{x} = 2,77$; S=0,13) en las hembras (en las condiciones generales y con el alimento antes especificados).

2.b.- ALIMENTACION ARTIFICIAL

La dieta artificial, especialmente formulada para la cría de *S. oryzae*, fue aceptada por el insecto que además mostró cierta predilección por ésta, en comparación con el trigo en los ensayos de preferencia alimenticia (2.C.), como puede verse en el gráfico (Fig.26).

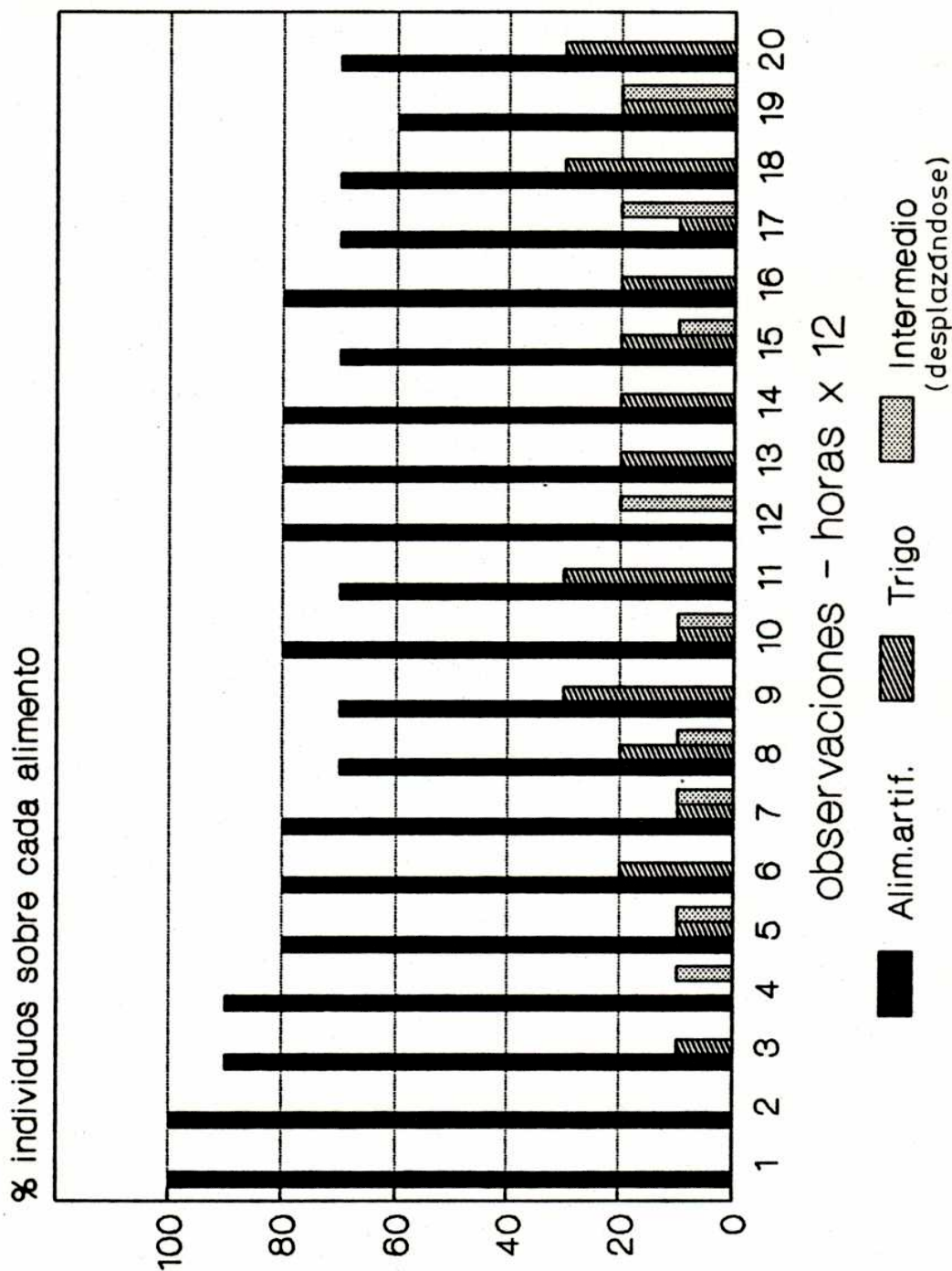


Fig.26: Ensayo de preferencia para la dieta artificial con *S. oryzae*. Número medio de individuos alimentándose de la dieta artificial (comprimido) y de trigo, observados en intervalos de 12 hs.

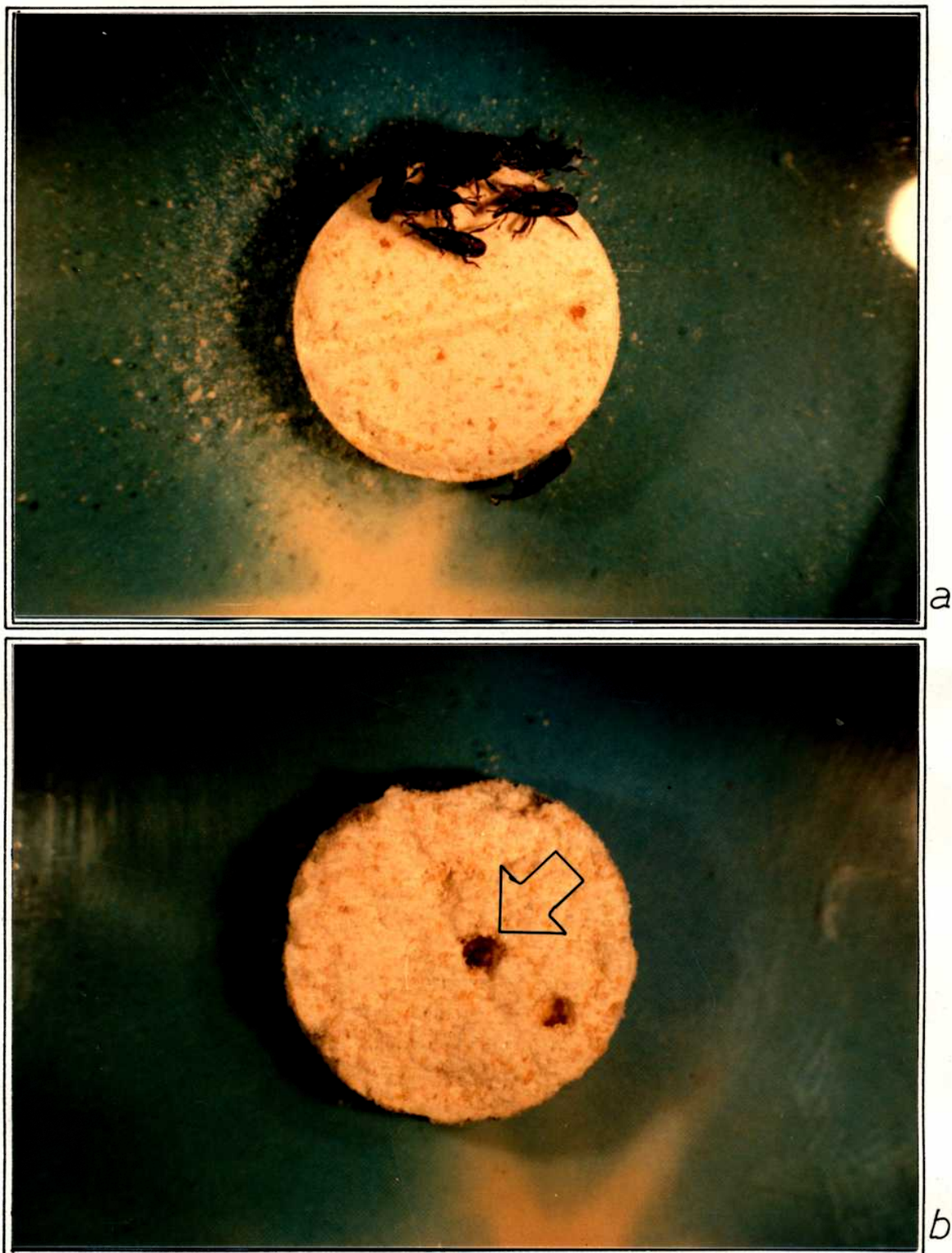


Fig.27 : a.- dieta artificial para *S. oryzae* en comprimidos de 500mg. b.- aspecto del comprimido después de 20 días de incubación (flecha: cápsula cefálica de una L₄ de *S. oryzae*)

Bajo las condiciones ambientales antes especificadas, se comprobó que el número de descendientes (F1) obtenidos del trigo y del alimento artificial, de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, no varía de modo significativo. Las diferencias encontradas entre las poblaciones sometidas a las diferentes dietas son exclusivamente cualitativas y se resumen en las siguientes tablas:

Grupo	sexo	media	S	C.V.	N
F _{1 1/1}	hembras	1.4736	0.0337	3.270	50
F _{1 1/4}	hembras	1.4528	0.0453	3.918	50
F _{1 T}	hembras	1.3824	0.0732	6.374	50
F _{1 1/1}	machos	1.4096	0.0461	2.286	50
F _{1 1/4}	machos	1.3680	0.0536	3.118	50
F _{1 T}	machos	1.3114	0.0836	5.295	50

Tabla 20: Media y coeficiente de variación (C.V.= $S(100/\bar{x})$) del tamaño de los individuos de la F1, obtenidos de las diferentes dietas. Los valores medidos corresponden al largo del élitro expresado en mm. Se comparan tres grupos : F_{1 1/1} = comprimidos enteros; F_{1 1/4} = comprimidos partidos y F_{1 T} = trigo.

Grupos enfrentados	sexo	F	V1	V2	P
F _{11/1} vs. F _{11/4}	macho	1.35	49	49	P<0.001
F _{11/1} vs. F _{1T}	macho	3.28	49	49	P<0.001
F _{11/4} vs. F _{1T}	macho	2.43	49	49	P<0.01
F _{11/1} vs. F _{11/4}	hembra	1.81	49	49	P<0.05
F _{11/1} vs. F _{1T}	hembra	4.73	49	49	P<0.001
F _{11/4} vs. F _{1T}	hembra	2.61	49	49	P<0.01

Tabla 21: Test de diferencia entre las varianzas para el tamaño de los individuos de las F1 con diferente alimentación.

MACHOS (F_{11/1} + F_{11/4} + F_{1T}) F = 30.414 , V1=2, V2=147

Método de contrastes segun Scheffé :

Hay diferencias significativas entre los tres grupos (P<0.05).

HEMBRAS (F_{11/1} + F_{11/4} + F_{1T}) F = 40.065 , V1=2, V2=147

Método de contrastes segun Scheffé :

No hay diferencias significativas (P<0.05) entre los grupos F_{11/1} y F_{11/4}.

Entre los grupos restantes hay diferencias significativas (P<0.05).

Tabla 22: Test F de Anova para el tamaño de los individuos de las F1 con diferente alimentación.

En la Tabla 20 puede verse claramente que el coeficiente de variación -en cuanto a tamaño individual- para los grupos de ambos sexos alimentados con la dieta artificial, es menor que el calculado para los grupos alimentados con trigo. El test de

diferencia entre las varianzas (Tabla 21) y el test F de anova (Tabla 22) destacan la diferencia entre los grupos alimentados con trigo y los que se desarrollaron sobre alimento artificial así como también las diferencias inducidas por el tamaño de comprimido ($1/2$ y $1/4$), que son significativas para los machos, pero no así para las hembras (Tabla 22, método de contrastes según Scheffé para $F_{1,1/2}$ y $F_{1,1/4}$ ($P < 0.05$)).

Con alimento artificial, se obtienen poblaciones más homogéneas en cuanto al tamaño de los individuos y a su estado fisiológico general. La estabilidad de ambos factores actúa como coadyuvante en función de la verosimilitud de las experiencias toxicológicas. Por otra parte, el empleo de alimento artificial para la cría de *S. oryzae* en laboratorio presenta ciertas ventajas operacionales :

a.- las imagines (F1) de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM que emergen del trigo a lo largo de 14 días aproximadamente, lo hacen del alimento artificial sólo en 8 días (Fig.28). Esto permite obtener mayor número de individuos del mismo intervalo de edad a partir de cultivos más pequeños.

b.- para ensayos toxicológicos, pueden obtenerse en forma rápida y en número prácticamente ilimitado, los huevos, larvas de diferentes estadios y pupas, disgregando los comprimidos bajo un chorro de agua sobre un tamíz (250u), método que desplaza la técnica de disección de semillas (Soderstrom, 1960).

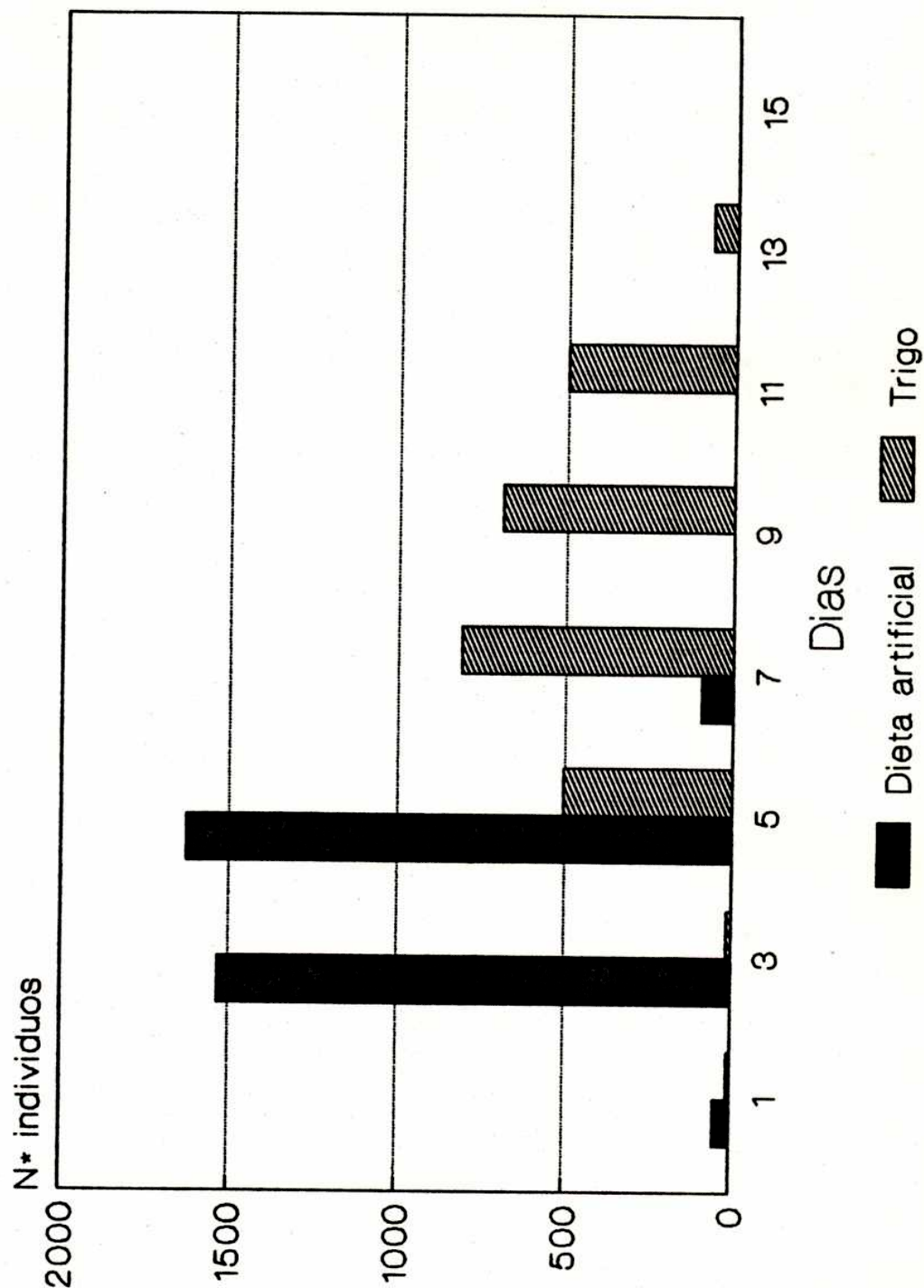


Fig.28: Tiempo transcurrido desde la aparición de la primera imago (F1) hasta la aparición de la última e individuos que emergen en intervalos de 48hs, en cultivos de *S. oryzae* con trigo y alimento artificial.

3.- ENSAYO BIOLÓGICO DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS

3.a.- ANESTESIA

Los antecedentes bibliográficos sobre la susceptibilidad de *S. oryzae* a diferentes atmósferas o mezclas de gases (Evans, 1979 ; Navarro et al 1985) se refieren exclusivamente a la adaptación de esta especie, a través de las generaciones, a desarrollarse en atmósferas extremadamente pobres en O_2 . No se conocen, en cambio, datos sobre toxicidad aguda de CO_2 para *Sitophilus* en general.

La exposición de hembras y machos de *S. oryzae* a una atmósfera de CO_2 durante 30min. no provoca la muerte de los individuos. El tiempo de recuperación de la anestesia se encuentra en relación directa con el tiempo de exposición como puede observarse en las figuras (Fig.29 y Fig.30). Así también la velocidad de recuperación de las hembras es mayor que la de los machos.

Tiempos de exposición a CO_2 de hasta 30min. no alteran significativamente los resultados de los ensayos toxicológicos realizados por el método del tópico.

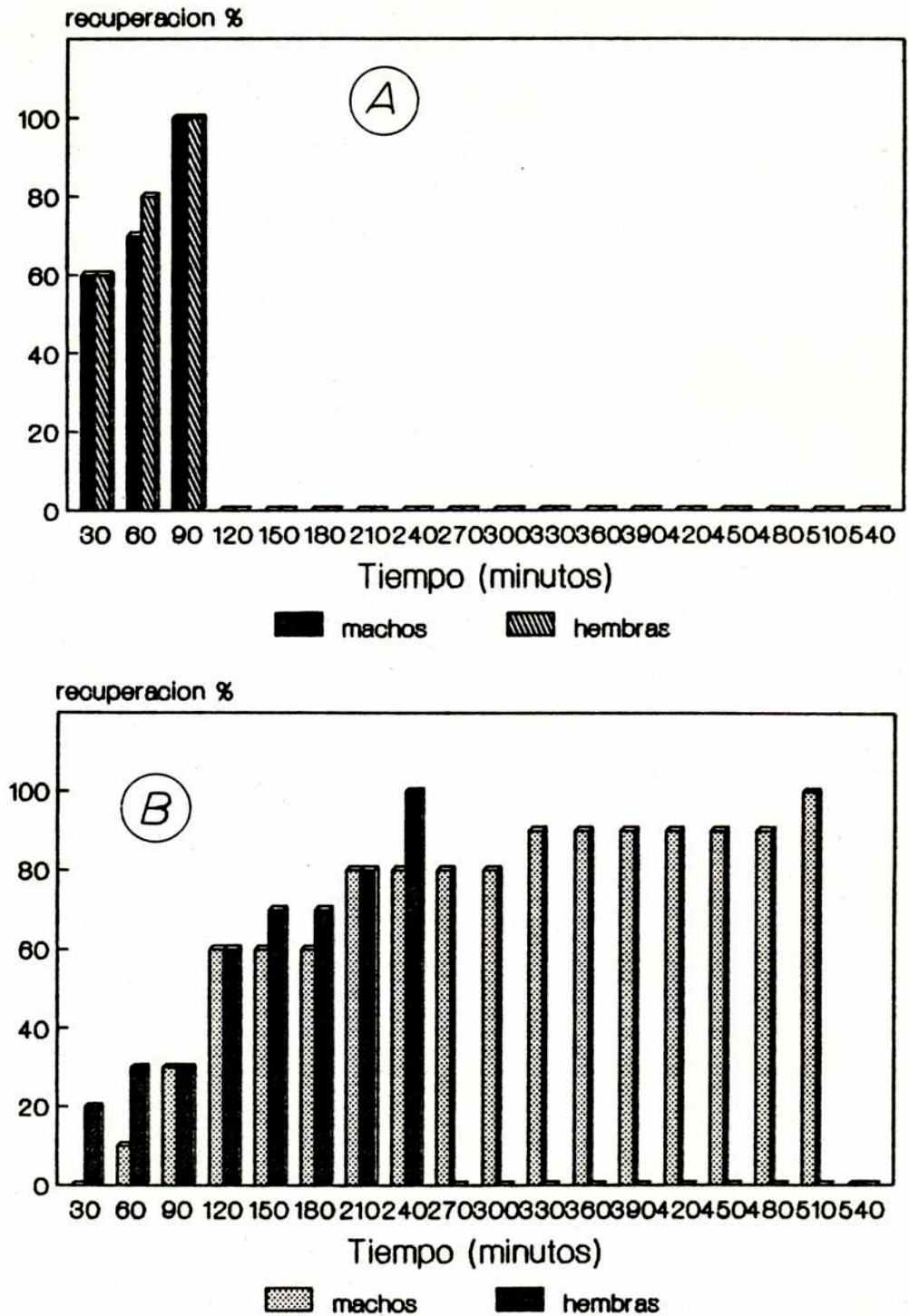


Fig.29: Tiempo de recuperación de la anestesia con CO₂ para machos y hembras luego de : A = 10min.de permanencia en la cámara (Fig.20) en atmósfera de CO₂ y B = 15min.de permanencia en la cámara.

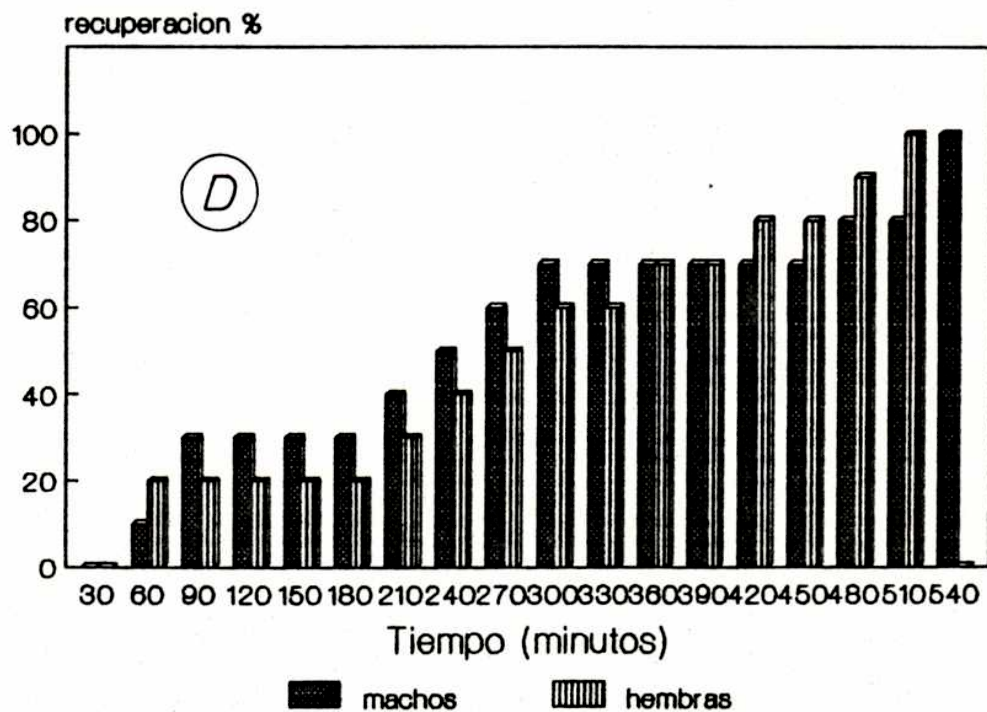
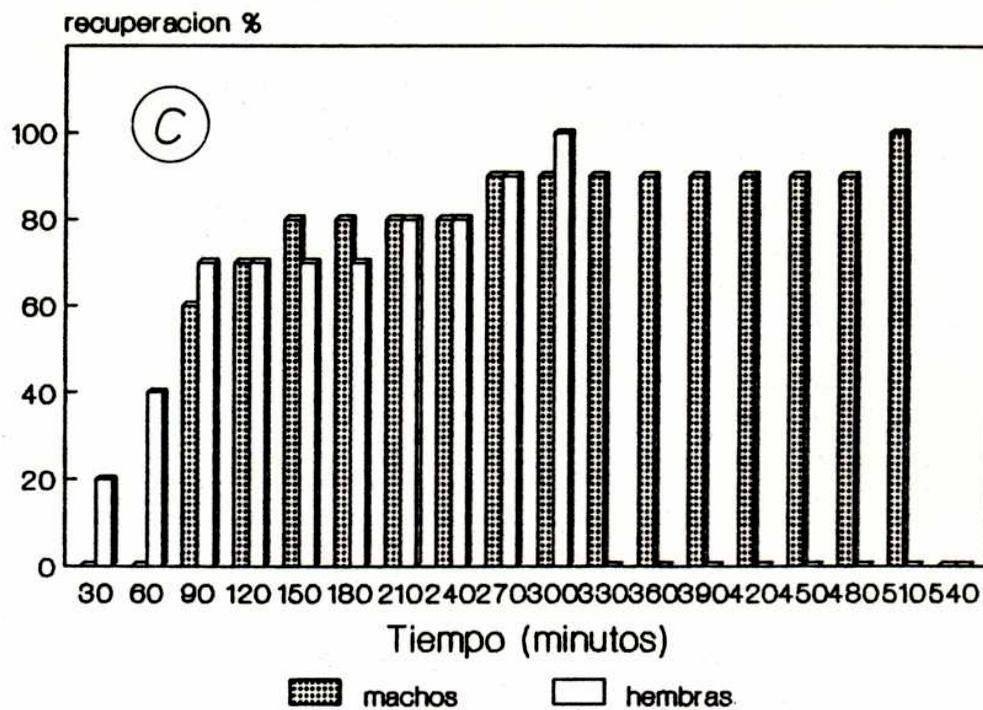


Fig.30: Tiempo de recuperación de la anestesia con CO₂ para machos y hembras luego de : C = 20min.de permanencia en la cámara (Fig.20) en atmósfera de CO₂ y D = 30min. de permanencia en la cámara.

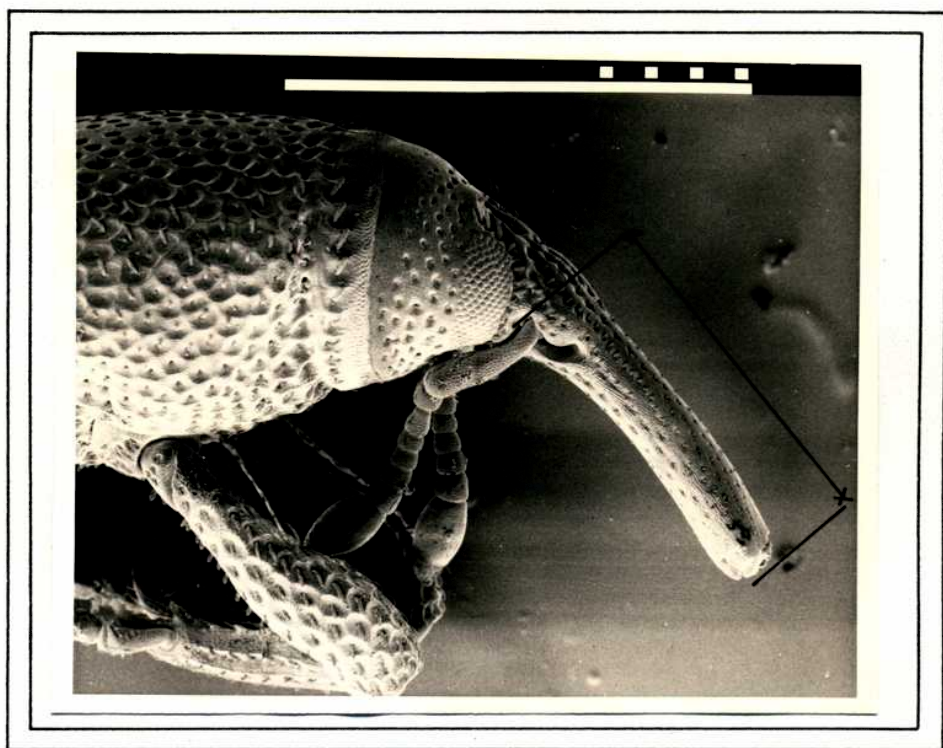
3.b.- SEXADO

Distintos autores citan las evidentes diferencias de tamaño observadas entre los individuos de *S. oryzae* de distinto sexo (Birch, 1944, Richards, 1946, Fourie, 1967). Otros hacen referencia a la diferencia en el largo de la proboscis, destacando que en los machos, ésta es más corta que en las hembras (Reddy, 1951 ; Sevintuna & Musgrave, 1960 ; Halstead, 1963 ; Da Fonseca, 1965 y Lum & Baker, 1975). Sin embargo, la literatura no ha aportado hasta el momento la descripción de una metodología sencilla para el sexado de *S. oryzae* y como consecuencia, la mayoría de los trabajos toxicológicos con esta especie fueron realizados sobre un pool de individuos, sin discriminar los datos de susceptibilidad por sexo (Pandey et al, 1979; Hole, 1981).

Para el sexado se consideró el largo de la proboscis, estableciendo así un criterio estadísticamente fundamentado y altamente confiable.

Sexo	máx	mín	medio	S
macho	770	650	713,78	38,25
hembra	850	730	788,37	44,81

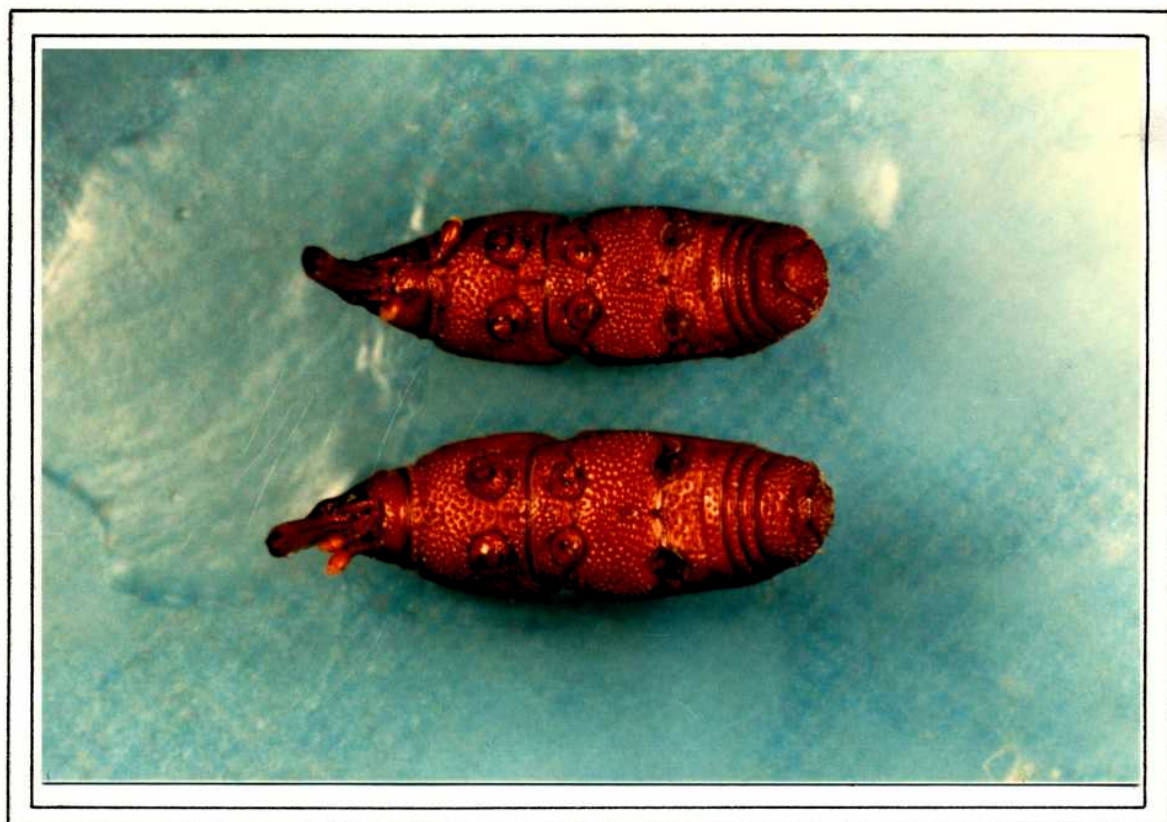
Tabla 23: Largo de la proboscis en micrones, en ambos sexos para las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM (medidas en micrones).



a



b



C

Fig.31 : a.- criterio para la medición de la proboscis en *S.oryzae*. b.- dimorfismo sexual en *S.oryzae*. c.- el tamaño de la depresión medial en el cuarto esternito abdominal como carácter sexual secundario en *S.oryzae*.

Dentro de las poblaciones se distingue un grupo de individuos de ambos sexos en el cual la medida del largo de la proboscis se superpone entre los 730μ y 770μ . Este grupo intermedio puede ser descartado durante el sexado masivo o sometido al análisis de otro carácter sexual secundario como el tamaño de la depresión medial en el cuarto esternito abdominal (Fig.31.C) (Lum & Baker, 1975). El largo de la proboscis puede considerarse un carácter confiable para el sexado (Fig.31.B), separando a las

hembras, cuya proboscis supere los 800 μ , y machos, cuya proboscis no supere los 700 μ (en las cepas CIPEIN). El sexado puede realizarse simultáneamente con la topicación durante los ensayos toxicológicos.

Cabe destacar que no se observaron diferencias entre los valores standard del largo de la proboscis entre los individuos de las cepas resistente y susceptible.

3.c.- METODOLOGIA : TOPICO Y FILM

La casi totalidad de los ensayos toxicológicos con *S. oryzae* que se describen en la literatura fueron realizados a través del método del film o el de ingestión. El método del film, recomendado por la FAO para los monitoreos de resistencia (Anon, 1975), tiene sus limitaciones bajo ciertas circunstancias y con determinados insecticidas. Los carbamatos, por ejemplo, son adsorbidos por las fibras de celulosa del papel de filtro, donde quedan retenidos. Champ-Champbell & Brown, 1970a, a raíz del bajo coeficiente de regresión y la alta DL_{50} en una cepa DDT-resistente de *T. castaneum*, no lograron establecer valor absoluto de la DL_{50} a través del método del film. En cambio Dyte & Blackman, 1967b, con material biológico similar, obtuvieron el valor práctico de la DL_{50} y una recta de regresión empinada a través del método del tópico. Una comparación entre los coeficientes de regresión determinados por el método del film y del tópico, con diferentes insecticidas en *T. castaneum*, no

muestra un patrón que permita generalizar sobre la superioridad de alguno de estos dos métodos en particular.

Durante el transcurso de los ensayos toxicológicos por el método del film (Anon., 1975), *S. oryzae* se desplaza sobre las paredes del aro de vidrio y permanece sobre ellas, lejos del papel de filtro impregnado. Es así como diferentes compuestos - más o menos repelentes para *S. oryzae* - afectarán de distinta manera a este comportamiento. Por otra parte pudo demostrarse que la penetración del xenobiótico no se realiza exclusivamente por vía tarsal, ya que *S. oryzae* roe el papel de filtro durante el ensayo, sumando a la anterior, la intoxicación por ingestión. Finalmente y debido a la necesidad de evitar el escape de los individuos durante el ensayo, es necesario cerrar el extremo superior del aro de vidrio, hecho que provoca la concentración de vapores e incremento de la intoxicación por vía traqueal.

A valores constantes de humedad y temperatura la intoxicación por vía traqueal y digestiva es relativamente constante (II.E) ; pero en cambio, la penetración tarsal es un fenómeno aleatorio que depende del número de veces que el individuo toma contacto con la superficie impregnada. A esto debe sumarse el hecho de que las poblaciones de la cepa CIPEIN-S son más activas que las de CIPEIN-RM, fenómeno que favorece la penetración del tóxico por cualesquiera de las vías. La reducción de la actividad general en cepas resistentes a insecticidas, no es característica exclusiva de *S. oryzae*, ya que

Pinniger, 1975, describe un fenómeno similar en una cepa de *T. castaneum* resistente a fosforados.

La rapidez y practicidad del método del film para monitoréos de resistencia en *S. oryzae*, es indiscutible, a pesar de los ya citados inconvenientes. Sin embargo, el método del tópico es la manera más precisa de medir susceptibilidad utilizando dosis conocidas del insecticida. Se agrega además la posibilidad de sexar simultáneamente durante la aplicación del tóxico y por otra parte, se elimina el cálculo del tiempo de exposición para cada tipo de compuesto. Las desventajas del método del tópico son : el manejo individual de los insectos y la restricción en el número de ejemplares por ensayo, aunque ésta última puede descartarse si se utiliza la técnica sugerida en 3.C.1.

3.d.- VALORES DE DL_{50} DE DISTINTOS INSECTICIDAS

De acuerdo con lo discutido en el punto anterior, se eligió el método del tópico para todos los ensayos toxicológicos, si bien, a los fines comparativos, se utilizó el método del film para malatión (3.C.2).

Los valores de dosis letal 50 para seis diferentes insecticidas obtenidos por el método del tópico se resumen en los cuadros siguientes :

CEPA SUSCEPTIBLE (CIPEIN-S)

sexo	comp.	DL ₅₀ µg/l	intervalo de confianza	DL ₉₅ µg/l	DL ₅₀ µg/g
M	MALATION	0,024	0.022-0.026	0.064	33,6
A	SUMITION	0,016	0,015-0,017	0,023	22,4
C	PIRIMIFOS METILO	0,017	0,015-0,019	0,059	23,8
H	DELTAMETRINA	0,002	0,001-0,002	0,012	2,8
D	LINDANE	0,309	0,260-0,367	1,83	432,6
S	CARBARIL				>4000

sexo	comp.	DL ₅₀ µg/l	intervalo de confianza	DL ₉₅ µg/l	DL ₅₀ µg/g
H	MALATION	0,029	0,028-0,031	0,058	33,6
E	SUMITION	0,016	0,016-0,017	0,023	22,4
M B	PIRIMIFOS METILO	0,017	0,015-0,019	0,059	23,8
R	DELTAMETRINA	0,002	0,001-0,002	0,012	2,8
A	LINDANE	0,650	0,588-0,720	1,85	910,0
S	CARBARIL				>4000

Tabla 24: Valores de dosis letal media (DL₅₀) para diferentes insecticidas, determinados para ambos sexos de la cepa CIPEIN-S.

CEPA RESISTENTE (CIPEIN-RM)

sexo	comp.	DL ₅₀ µg/I	intervalo de confianza	DL ₉₅ µg/I	DL ₅₀ µg/g
M	MALATION	0,168	0,164-0,171	0,219	235,2
A	SUNITION	0,024	0,023-0,025	0,045	33,6
C	PIRIMIFOS METILO	0,030	0,026-0,034	0,101	42,0
H	DELTAMETRINA	0,002	0,001-0,003	0,008	2,8
O	LINDANE	0,092	0,070-0,120	1,39	128,8
S	CARBARIL				>4000

sexo	comp.	DL ₅₀ µg/I	intervalo de confianza	DL ₉₅ µg/I	DL ₅₀ µg/g
H	MALATION	0,169	0,165-0,172	0,216	236,6
E	SUNITION	0,015	0,014-0,015	0,045	21,0
M B	PIRIMIFOS METILO	0,030	0,026-0,034	0,101	42,0
R	DELTAMETRINA	0,002	0,001-0,002	0,008	2,8
A	LINDANE	0,188	0,145-0,245	2,86	263,2
S	CARBARIL				>4000

Tabla 25: Valores de dosis letal media (DL₅₀) para diferentes insecticidas, determinados para ambos sexos de la cepa CIPEIN-RM.

Tanto para la cepa susceptible como para la resistente, se observa una alta susceptibilidad a la deltametrina y en orden decreciente para el sumitió n > pirimifos-metilo > malatió n > lindane. El carbaril no fue tóxico en ninguna de las dos cepas hasta una dosis de 4000µg/g.

4.- INFLUENCIA DE DISTINTAS VARIABLES SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS

Como ya fuera discutido en IV.C., son numerosos los factores que afectan la susceptibilidad de *S. oryzae* a diferentes insecticidas. El rango de variabilidad de la respuesta es característico para la especie (IV.) y para el insecticida, pero también difiere entre poblaciones de una misma especie, o entre fases, estadios, intervalos de edad en un estadio o simplemente entre individuos con diferente estado fisiológico.

Una buena medida para definir la variabilidad de la respuesta a un xenobiótico, es la pendiente de la recta de regresión en el gráfico dosis-respuesta. Dyte & Blackman, 1967b y Dyte, 1970, discutieron ampliamente la importancia de señalar las variaciones en la pendiente de las rectas de los ensayos de toxicidad para determinar la resistencia, así como las precauciones que deben tenerse al utilizar una cepa de referencia, ya que según los autores, el material biológico criado en laboratorio está sujeto a "stress" y como consecuencia, a presión de selección.

4.a.- ESTADIO : Es importante la fase o estadio del desarrollo seleccionado para realizar los ensayos toxicológicos - especialmente para los estudios de acción residual-, ya que debe arribarse a una solución de compromiso entre : los aspectos prácticos y operacionales del ensayo y monitoréo, el ciclo de vida del insecto y las posibles diferencias en la tolerancia de huevos, larvas, pupas e imagines al insecticida. Para *S. oryzae*, Adkisson, 1957 demuestra que el orden de tolerancia al Cl_4C es : pupa >larva >huevo >imago, y para el $Cl_2 C_2H_2$: pupa >huevo >larva >imago.

El monitoreo directo de resistencia en *S. oryzae*, sólo es realizable con imagines, mientras que en ensayos posteriores (sobre la F1), es posible comparar la tolerancia de huevos, larvas, pupas e imagines utilizando la alimentación artificial (2.b) y el método de topicación (3.C.1).

4.b.- EDAD : La edad del material biológico es otra de las importantes variables que influyen sobre los resultados de los ensayos toxicológicos. Para una cepa malatión-resistente de *T. castaneum*, la tolerancia de las imagines se encuentra incrementada tres veces durante los primeros 4 - 5 días de vida (Champbell & Brown, 1970a). En la cepa susceptible, los cambios en la tolerancia a malatión son menos evidentes durante el mismo período y la tolerancia sufre un paulatino incremento con la edad.

En la Fig.32, puede observarse, para la cepa CIPEIN-S, un incremento gradual de la susceptibilidad a malatión durante los primeros tres días de vida de la imago.

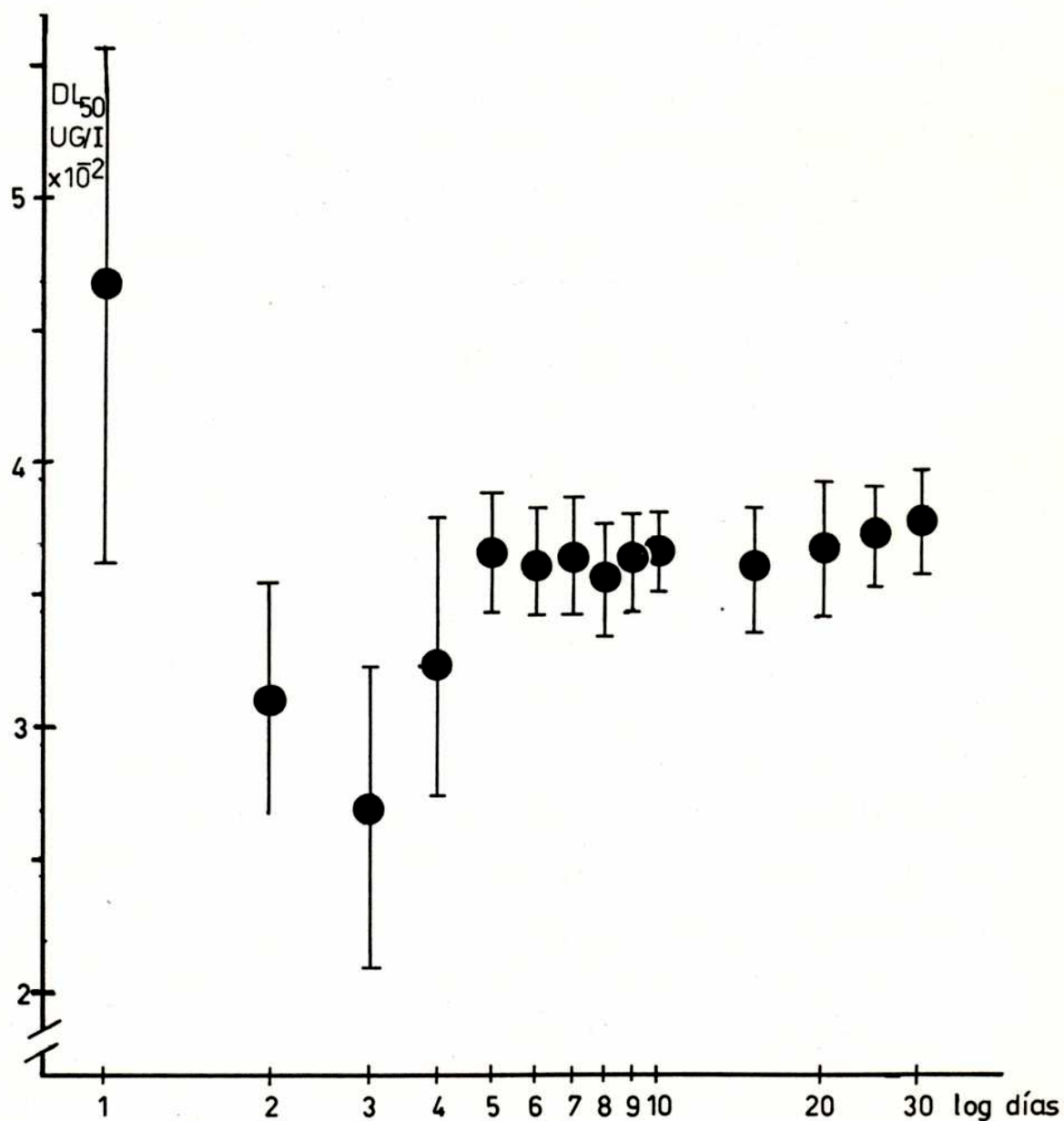


Fig.32 : Variaciones de la tolerancia a malatión en función de la edad de los individuos, en la cepa CIPEIN-S (25°C y 75%HR).

Después del tercer día sobreviene un descenso de la susceptibilidad, y finalmente los valores se estabilizan en el quinto día de vida, mostrando un incremento constante pero muy discreto a partir del día 15. Durante los primeros cinco días de vida de la imago, el intervalo de confianza de la respuesta toxicológica es sumamente amplio, reduciéndose notablemente al quinto día.

La variabilidad observada en la susceptibilidad durante los primeros cinco días de vida de la imago, se debe probablemente a una serie de eventos fisiológicos que modifican la penetración y el metabolismo del xenobiótico. Estos fenómenos se relacionan probablemente con el curtido de la cutícula, la maduración sexual y con los importantes cambios en el metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono que se producen al comenzar la fase adulta (II.E.2.).

Tomando estos ensayos como punto de partida, puede decirse que el intervalo de edad recomendado para el material biológico destinado a experiencias toxicológicas es de 5 a 10 días.

4.c.- SEXO : En insectos plaga del grano almacenado, generalmente se observa una diferencia en la susceptibilidad a pesticidas en ambos sexos aunque ésta, en general, no es altamente significativa. Las diferentes respuestas no siempre se deben a las diferencias de tamaño entre los sexos, sino también a diferencias en la tasa de asimilación y metabólica (Busvine, 1971). En varias especies plaga así como en el presente caso, la relación de sexos en la población es 1:1, de modo que este factor

no representa una fuente de variación importante en los monitoreos toxicológicos. Sin embargo, es fundamental considerarlo, ya que es uno de los más importantes factores modificadores de la resistencia en *S. oryzae*, cuando ésta está ligada al sexo. Este es un fenómeno conocido para el caso de los piretroides (Heather, 1986) y para el DDT (Champ, 1967).

A pesar de que el promedio del peso corporal de las hembras es aproximadamente 15% superior al de los machos (HEMBRAS, \bar{x} = 1,52mg, S=0,314 ; MACHOS, \bar{x} = 1,27mg, S=0,277), la respuesta toxicológica es similar en ambos para el malatión, pirimifosmetilo, sumition y la deltametrina. Para el lindane en cambio, la susceptibilidad del macho es 100% mayor que la de la hembra en las cepas susceptible y resistente.

4.d.- TEMPERATURA : La temperatura es el factor extrínseco que más significativamente afecta la respuesta de una población de insectos a un xenobiótico. Este efecto es triple, e involucra a :

- a.- la temperatura de incubación,
- b.- la temperatura a la cual evolucionó la cepa resistente (los puntos a y b fueron discutidos en el punto IV.C.)
- c.- la temperatura a la que los insectos fueron mantenidos antes, durante y después del ensayo. Este último punto es particularmente importante, debido a la estrecha interrelación de la temperatura con la actividad de los individuos, los fenómenos de intoxicación y detoxificación, concentración del xenobiótico en el sitio de acción y eventual recuperación de la intoxicación.

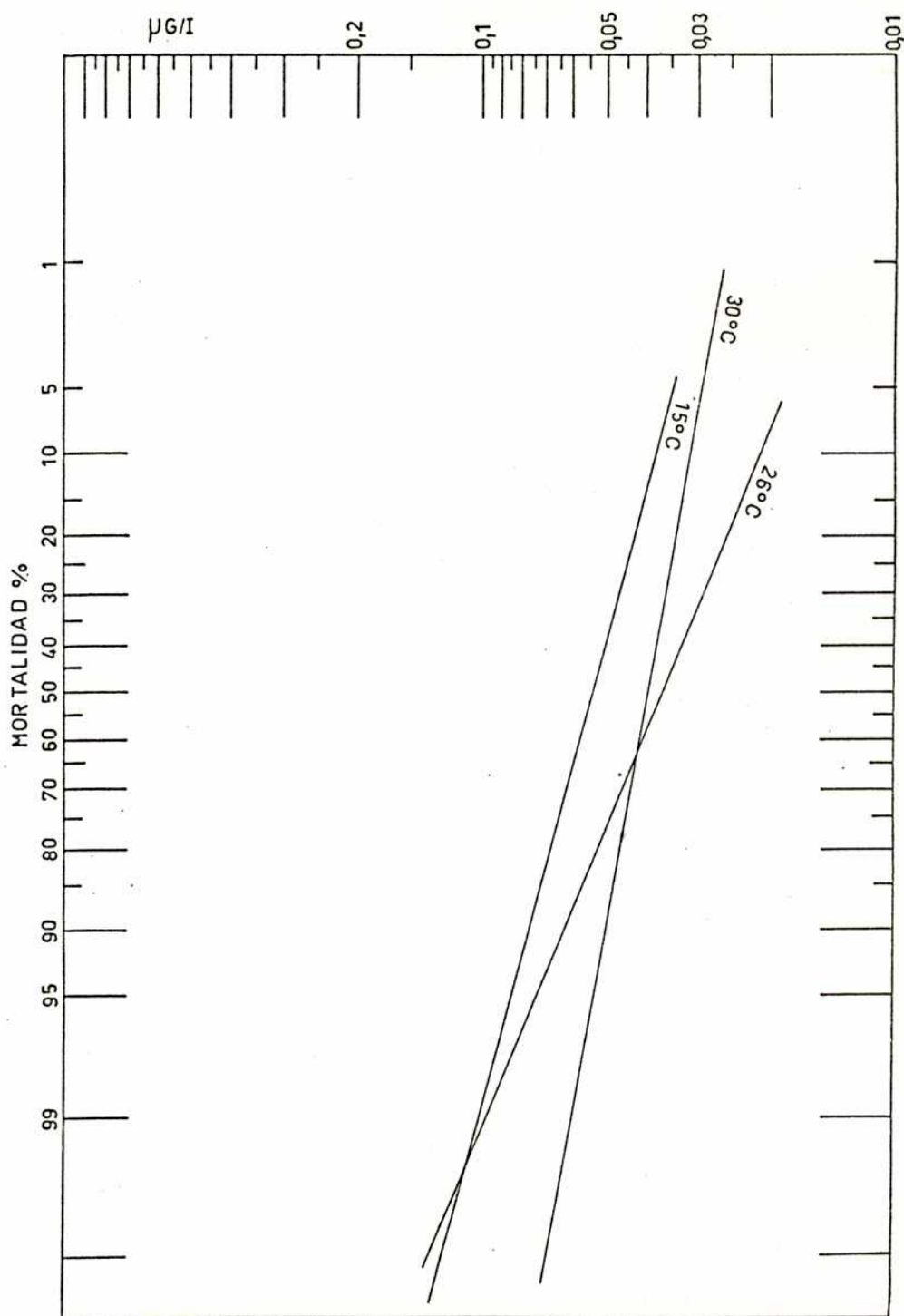


Fig.33: Toxicidad del malatión a diferentes temperaturas y 75%HR Cepa CIPEIN-S, criada sobre alimento artificial.

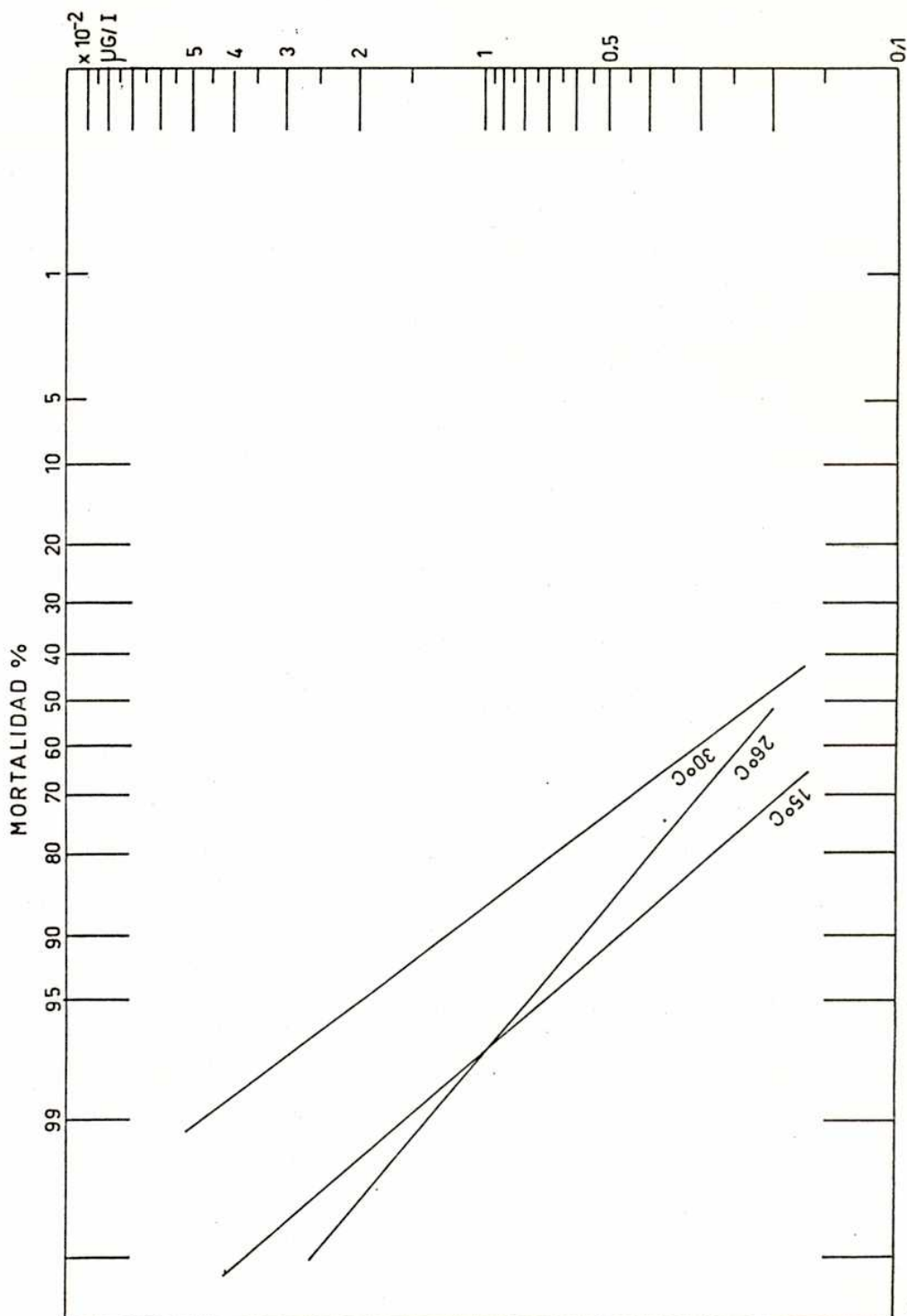


Fig.34: Toxicidad de la deltametrina a diferentes temperaturas y 75%HR. Cepa CIPEIN-S, criada sobre alimento artificial.

Champ et al, 1969, mostraron que un cambio de la temperatura, de 25°C a 30°C, provoca un incremento de aproximadamente x1,5 en la toxicidad de malatión, diazinon y fenitrotion en *S. oryzae*. Por otra parte, Thaug & Collins, 1986 comprobaron que la toxicidad del fenitrotión para *S. oryzae* se ve incrementada con la temperatura, en contraste con la cipermetrina que muestra un efecto negativo.

Los ensayos realizados con malatión y deltametrina a 15°C, 26°C y 30°C muestran la correlación positiva del malatión con la temperatura (Fig.33), mientras que la deltametrina se correlaciona negativamente con la misma (Fig.34).

INSECTICIDA	Temp.°C	DL ₅₀ µg/I	INTERVALO DE CONF.
malatión	15°C	0,053	0,051-0,062
malatión	26°C	0,037	0,035-0,039
malatión	30°C	0,039	0,038-0,040
deltametrina	15°C	0,0010	0,0006-0,0010
deltametrina	26°C	0.0019	0,0016-0,0021
deltametrina	30°C	0,0022	0,0018-0,0028

Tabla 26: Valores de DL₅₀ para malatión y deltametrina a diferentes temperaturas y 75%HR para la cepa CIPEIN-S de *S. oryzae* criada sobre dieta artificial.

De acuerdo con las anteriores consideraciones, se estableció que 28° ± 1°C es un valor aceptable desde el punto de vista fisiológico así como del operacional para los ensayos toxicológicos.

4.e.- DIETA : Las poblaciones de *S. oryzae* alimentadas sobre sustratos de bajo valor nutritivo (dieta incompleta), conteniendo casi exclusivamente hidratos de carbono, muestran mayor susceptibilidad a malatión en los ensayos toxicológicos (Fig.35). También es apreciable la diferencia en la susceptibilidad entre las poblaciones alimentadas a base de trigo y a base de alimento artificial. El origen de este fenómeno puede ser en parte la distribución homogénea de todos los componentes dentro del comprimido, los que en la semilla de trigo se encuentran compartimentalizados y no siempre al alcance de la larva, especialmente durante los primeros estadios.

alimento	DL ₅₀ µg/I	intervalo confidencial	DL ₉₅ µg/I
d.incompleta	0,022	0,020-0,031	0,094
d.artific.	0,037	0,035-0,039	0,073
trigo	0,027	0,025-0,028	0,061

Tabla 27: Datos toxicológicos comparativos para malatión de poblaciones de CIPEIN-5 criadas sobre tres tipos de dieta diferentes.

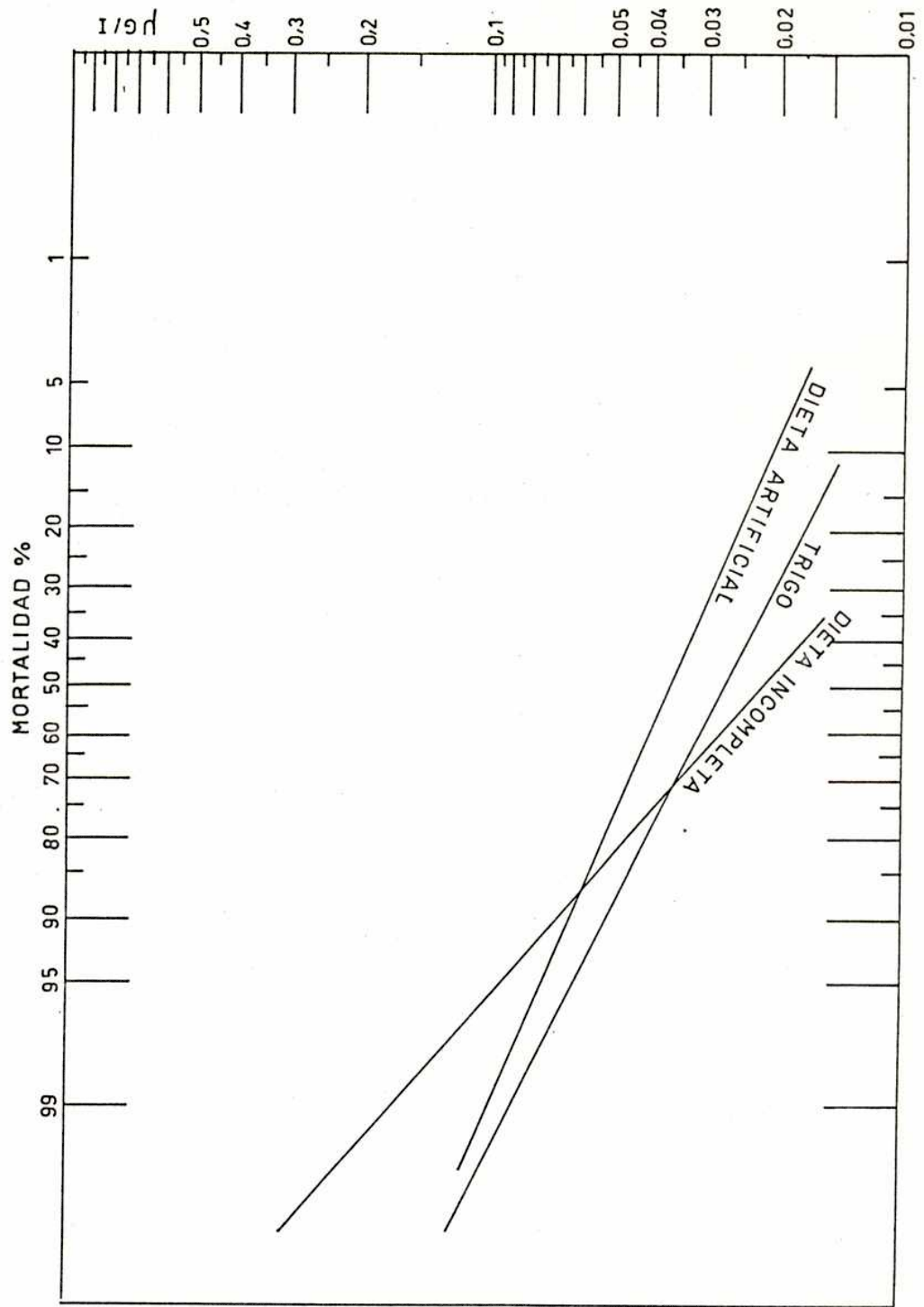


Fig.35 : Curvas de mortalidad para tres poblaciones de *S. oryzae* criadas sobre diferentes dietas.

5.- RESISTENCIA A MALATION

5.a.- FACTOR DE RESISTENCIA A MALATION

El factor de resistencia a malatión de la cepa CIPEIN-RM fue obtenido a partir de las DL_{50} determinadas por el método del tópico en machos y hembras y de las CL_{50} , sin sexar, medidas por el método del film en poblaciones de las cepas susceptible y resistente criadas sobre trigo.

Los resultados obtenidos en poblaciones criadas sobre trigo, que se resumen en la tabla 28, indican un FR de 7,0 en machos y de 5,8 en hembras, para el método del tópico y de 5,4 para el método del film, sin discriminar sexos. Cabe destacar la escasa variabilidad del FR en ambos sexos, como asimismo entre los obtenidos por metodologías tan disímiles, como son las del film y tópico.

TOPICO MACHOS				
CEPA	DL_{50} $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	INTERVALO DE CONF.	DL_{75} $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	FR DL_{50R}/DL_{50S}
CIPEIN-S	0,024	0,022-0,026	0,064	7,0
CIPEIN-RM	0,168	0,164 -0,171	0,0219	

TOPICO HEMBRAS				
CEPA	DL_{50} $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	INTERVALO DE CONF.	DL_{75} $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	FR DL_{50R}/DL_{50S}
CIPEIN-S	0,029	0,028-0,031	0,058	5,8
CIPEIN-RM	0,169	0,165 -0,172	0,0216	

FILM HEMBRAS + MACHOS				
CEPA	CL ₅₀ µg/cm ²	INTERVALO DE CONF.	CL ₉₅ µg/cm ²	FR CL ₅₀ R/CL ₅₀ S
CIPEIN-S	5,35	4,24 - 6,03	10,22	5,4
CIPEIN-RM	28,98	28,66-29,30	35,76	

Tabla 28 : Susceptibilidad a malatión y factor de resistencia para las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, por el método del tópico en material sexado y por el método del film, sin discriminar sexos.

Fue de interés establecer la influencia de la dieta sobre el factor de resistencia (Tabla 29). El FR (poblacional) de la cepa CIPEIN-RM calculado por el método del tópico es de 6,2 para poblaciones criadas sobre trigo y 5,4 para las criadas sobre dieta artificial. Estos resultados sugieren que en este caso, la dieta no es un factor relevante como modificador del FR.

cepa	DIETA	DL50 µg/I	intervalo de conf.	DL95 µg/I	FR
CIPEIN-S	Trigo	0,027	0.025-0.029	0,061	6,2
CIPEIN-RM	Trigo	0,168	0,164-0,172	0,218	
CIPEIN-S	Artif.	0,037	0.035-0.039	0.073	5,4
CIPEIN-RM	Artif.	0,201	0,198-0,205	0,229	

Tabla 29: Caracterización toxicológica para malatión, de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM criadas sobre trigo y sobre dieta artificial (sin sexar).

En términos generales, los valores de FR obtenidos concuerdan con los citados en la bibliografía para cepas salvajes resistentes (V), que se encuentran entre 2,4 y 8,0.

5.b.- SUSCEPTIBILIDAD A OTROS INSECTICIDAS DE LAS CEPAS SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE

El factor de resistencia (FR) calculado para los diferentes compuestos es cercano a 1 en todos los casos (Tabla 30), aunque en el caso particular del pirimifos-metilo y del sumition, se observa una muy leve resistencia cruzada, comparable con los valores obtenidos por Binns, 1983.

compuesto	cepa	DL ₅₀ µg/I	intervalo de conf.	DL ₉₅ µg/I	FR
SUMITION	S	0,016	0,015-0,017	0,023	1,4
	R	0,024	0,023-0,025	0,045	
PIRIMIFOS MET.	S	0,017	0,015-0,019	0,059	1,7
	R	0,030	0,026-0,034	0,101	
DELTAMETRINA	S	0,0018	0,0015-0,0022	0,012	1
	R	0,0019	0,0016-0,0023	0,027	
LINDANE	S	0,479	0,424-0,543	1,482	<1
	R	0,140	0,107-0,182	2,128	
CARBARIL		>5,6			

Tabla 30: Cuadro comparativo de la susceptibilidad a insecticidas de las cepas CIPEIN-S (S) Y CIPEIN-RM (R) (sin sexar).

Con respecto al lindane, el $FR < 1$ indica un fenómeno de correlación negativa, es decir, es más tóxico a la cepa resistente que a la susceptible (Oppennorth, 1985)

6.- EVALUACION DE LAS CAUSAS BIOQUIMICAS DE LA RESISTENCIA AL MALATION

6.a.- METABOLISMO : EFECTO DE SINERGISTAS

Se reconocen varios mecanismos a través de los cuales los insectos pueden degradar el malation (detoxificación). Dyte & Rowlands, 1968, encontraron para *T. castaneum*, un tipo de resistencia a malation por una carboxiesterasa que puede ser inhibida en forma específica por TPP. Un segundo tipo de resistencia a malation involucra a un mecanismo aumentado de detoxificación de fosfatos (Dyte et al 1970, 1973c), que no es inhibido por TPP. Este segundo tipo de mecanismo de resistencia, muestra un amplio espectro de resistencia cruzada con otros fosforados.

Es un hecho conocido que el TPP o compuestos similares pueden antagonizar o actuar como sinergistas del malation en cepas susceptibles (Champ & Dyte, 1976). Este fenómeno plantea un serio inconveniente en la interpretación de los resultados de los monitoreos de resistencia, de modo que la respuesta a TPP debe especificarse al tipificar una cepa susceptible (Champ & Dyte, 1976).

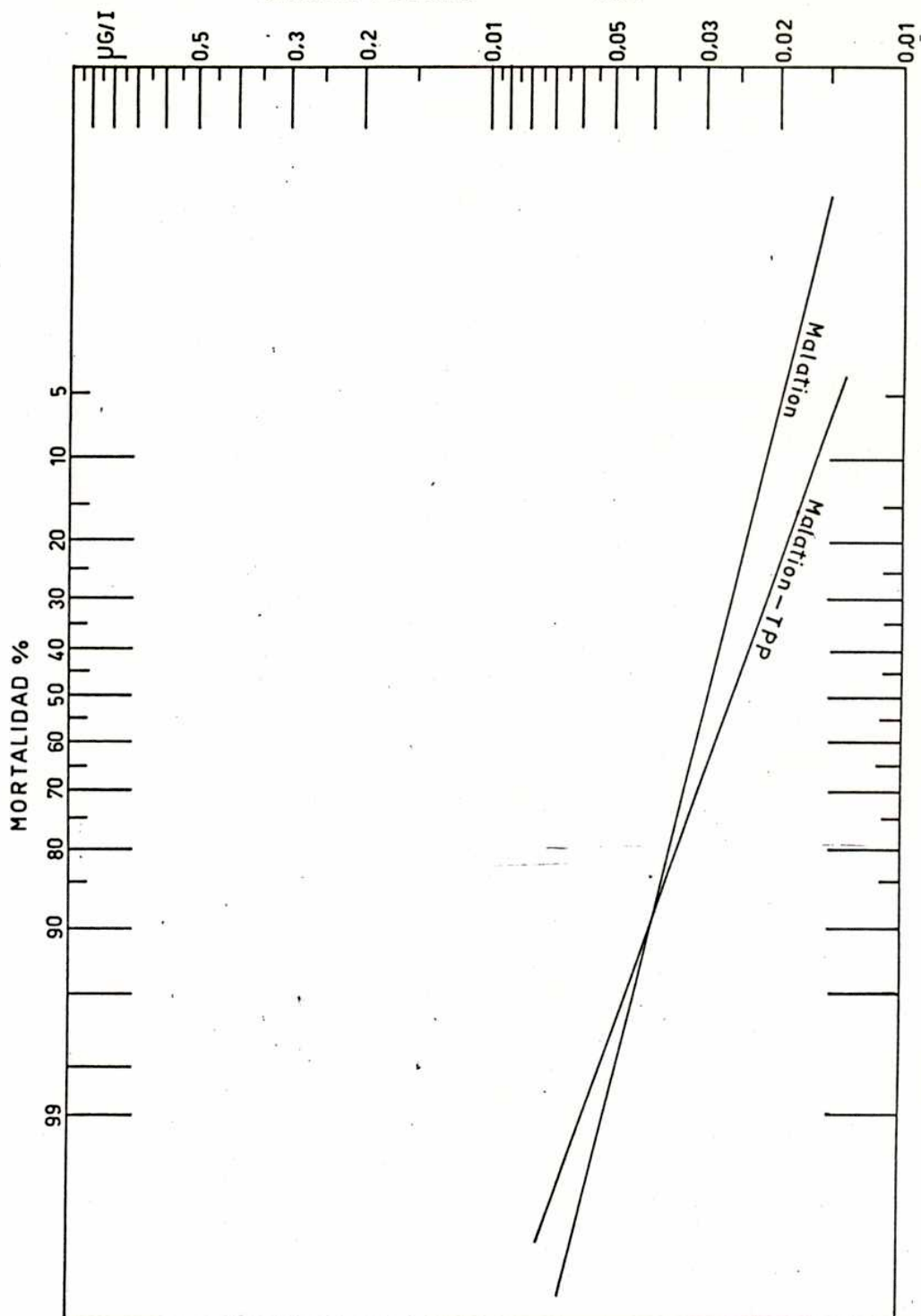


Fig.36: Respuesta a malatión y a malatión sinergizado con TPP de la cepa susceptible (CIPEIN-S) criada sobre alimento artificial.

Como puede verse en la fig.36, en la cepa CIPEIN-S el TPP sinergiza poco significativamente al malatión.

Los sinergistas TPP y TOCP, inhibidores de las carboxiesterasas, no revirtieron el fenómeno de resistencia a malatión en la cepa CIPEIN-RM, de manera que no se trata de un fenómeno de resistencia específica a malatión. Este hecho concuerda con el fenómeno de resistencia cruzada incipiente con otros fosforados (Tabla 31).

INSECTICIDA SINERGISTA	cepa	DL ₅₀ µg/I	intervalo de conf.	DL ₉₅ µg/I	FR
MALATION	S	0,027	0,025-0,029	0,061	
	R	0,168	0,164-0,172	0,218	6,2
MALATION - TPP	S	0,025	0,019-0,032	0,045	
	R	0,156	0,152-0,166	0,195	6,2
MALATION - TOCP	S	0,020	0,015-0,029	0,078	
	R	0,123	0,110-0,125	0,188	6,1
MALATION - MALEATO	S	0,025	0,024-0,027	0,065	
	R	0,155	0,153-0,158	0,220	6,2
DELTAMETRINA	S	0,0018	0,0015-0,0022	0,012	
	R	0,0019	0,0016-0,0023	0,017	1,0
DELTAMETRINA - BPF	S	0,0015	0,0010-0,0025	0,010	
	R	0,0015	0,0011-0,0020	0,015	1,0

Tabla 31 : Efecto de sinergistas "in vivo" sobre la susceptibilidad a insecticidas, de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM. (sin sexar)

Binns, 1983, obtiene resultados similares al comparar una cepa de referencia de *S. oryzae*, susceptible a malatión, con una resistente de Rampur, Nepal, con resistencia no específica a malatión (no inhibida por TPP) y cruzada a pirimifos-metilo, sumitión, clorpirifos-metilo y metacrifos.

En ambas cepas, el cotratamiento del malatión con maleato de dietilo, compuesto que bloquea el glutatión (GSH), cofactor de las GSH-S-transferasas (Fukami, 1980), tampoco modificó el efecto tóxico del insecticida. Este resultado sugiere que este sistema enzimático, importante en la detoxificación de OPs, no está involucrado en el fenómeno de resistencia.

Las oxidasas de función mixta (MFO) microsomales, representan otro importante grupo de enzimas que detoxifican xenobióticos. En el caso de los fosforotiónatos, las MFO no sólo actúan en su degradación, sino también en la vía metabólica activante, como es la desulfuración oxidativa (Eto, 1974). Por tal razón, el uso de inhibidores de estas enzimas, como el BPP, no puede utilizarse en fosforotiónatos para reconocer la importancia de este mecanismo degradante. No obstante, fue de interés aclarar diferencias de este mecanismo detoxificante entre las cepas CIPEIN-S y RM. Para tal fin, se estableció en ambas cepas, el efecto sinergista del BPP sobre el insecticida piretroide deltametrina, cuya degradación por MFO en insectos ya fue establecida (Ishaaya & Casida, 1983). La falta de sinergismo observada en ambas cepas, sugiere que esta vía metabólica no es relevante en la degradación de piretroides en

S. oryzae y no muestra diferencias entre las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM.

De acuerdo con Plapp, 1986, la clave de la resistencia por metabolismo es la actividad de diferentes enzimas detoxificantes en forma coordinada. Es así como las oxidasas de función mixta (MFO), glutatión transferasas (GSH), y DDT dehidroclorinasas son inducidas genéticamente y en forma coordinada en la mosca doméstica, y así también las MFO y GSH en *Spodoptera*. Este tipo de resistencia por metabolismo - en *M. domestica* (Plapp, 1986)- involucra a varios tipos de insecticidas como OPs, carbamatos, piretroides, DDT, hormonas juveniles y se presenta también en ciertas poblaciones de *T. castaneum*, y probablemente en otras especies de insectos.

De acuerdo con el mecanismo postulado por Plapp, 1986, puede esperarse que en aquellos casos donde el factor de resistencia es elevado en valor absoluto, el uso de determinado sinergista puede ofrecer una mayor claridad con respecto al tipo de enzima involucrada en el fenómeno de resistencia. En el caso de la cepa CIPEIN-RM, con un factor de resistencia de bajo valor absoluto y tratándose de resistencia no específica a malatión, es posible relacionar el fenómeno de resistencia con una serie de factores, difíciles de individualizar por su bajo aporte, entre ellos quizás también el metabolismo degradante.

6.b.- SITIO DE ACCION : ACETILCOLINESTERASA

6.b.I.- Caracterización

Las colinesterasas son un conjunto de enzimas (hidrolasas, que hidrolizan ésteres de colina) con propiedades diferentes, que pueden clasificarse por lo menos en dos grupos (I y II) de acuerdo al tipo de actividad enzimática. Al grupo I pertenecen las llamadas acetilcolinesterasas (AChE), colinesterasas verdaderas o específicas, y en el grupo II se incluyen las pseudocolinesterasas, no específicas o butirilcolinesterasas. La AChE se localiza en el tejido nervioso y los eritrocitos de la mayoría de los animales, y su función es la de hidrolizar la acetilcolina.

Las colinesterasas catalizan la hidrólisis de ésteres de tiocolina (ATC y BTC) y tioésteres aromáticos (PTA) bajo condiciones óptimas y son inhibidas además por eserina y organofosfatos a baja concentración. Muchos ésteres OPs son, o pueden transformarse en buenos insecticidas ya que su "blanco" es el sistema nervioso, donde inhiben de modo irreversible la AChE.

La AChE de los homogenatos de cabeza de *S. oryzae* no requiere proceso de purificación a los fines del ensayo toxicológico, ya que su actividad decae levemente durante los primeros 30min. (Fig.37), manteniéndose luego constante hasta los 60min. Por este motivo, todas las determinaciones se realizaron sobre homogenatos con 30min.de envejecimiento.

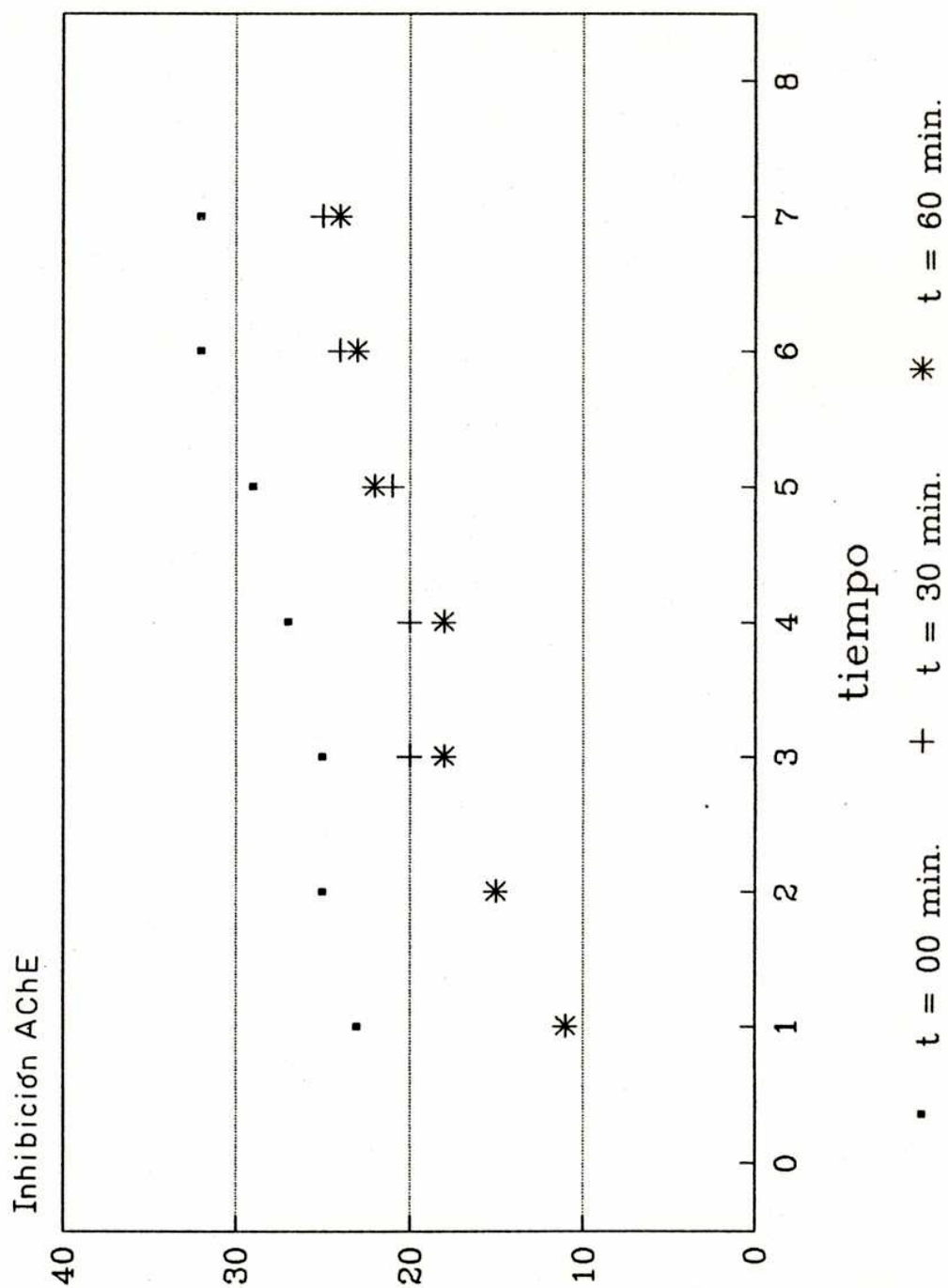


Fig.37: Estabilidad de la AchE en el homogenato crudo de cabeza de *S. oryzae*.

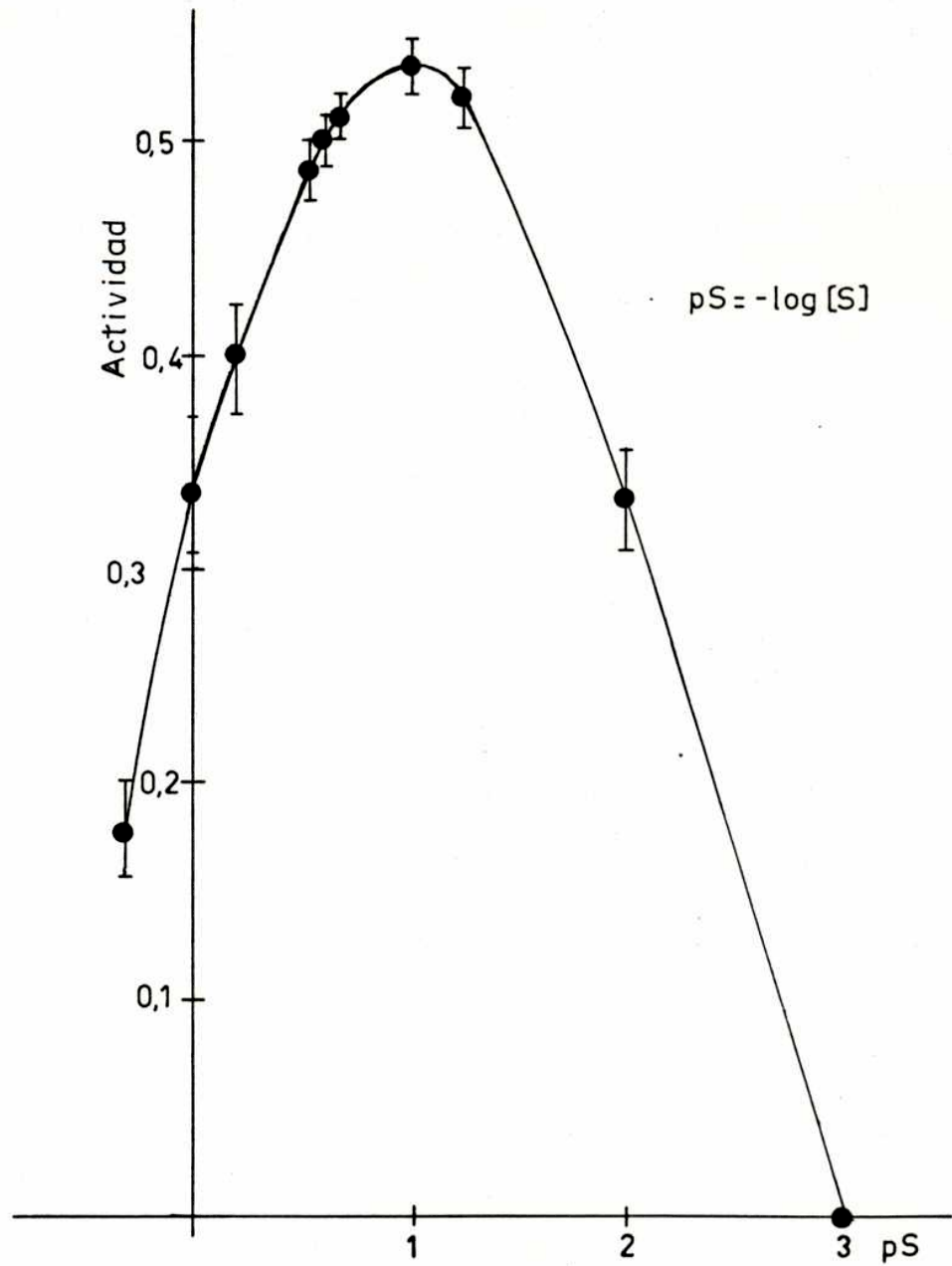
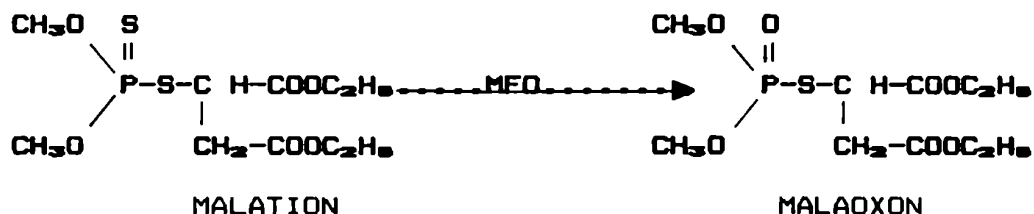


Fig.38: Curva de actividad específica vs. concentración de sustrato para homogenato crudo de cabeza de *S. oryzae*.

Los homogenatos crudos de cabeza de *S. oryzae* presentan una respuesta evidente frente a concentraciones crecientes de sustrato (ATC) mostrando una curva típica en forma de campana con un valor óptimo de concentración de ATC (100nM) y una pronunciada inhibición por exceso de sustrato (Fig.38). Por otra parte, se trata del tipo de respuesta característica para las AChE.

6.b.II.- Inhibición por malaoxón

El malatión pertenece al grupo de los tiofosfatos que requieren, para manifestar su efecto insecticida, un paso metabólico activante como es la oxidación a fosfatos por las MFO, ya que son los fosfatos los verdaderos inhibidores de la colinesterasa.



El malatión es un insecticida con baja actividad mamalícida (toxicidad oral en rata $DL_{50} = 1,375\text{g/kg}$) y buena acción insecticida, gracias a que la eficiente acción de las carboxiesterasas de mamíferos lo inactivan rápidamente al hidrolizar el grupo carboxiester. En insectos, la actividad carboxiesterásica es baja, de manera que la bioactivación ocurre en mayor extensión.

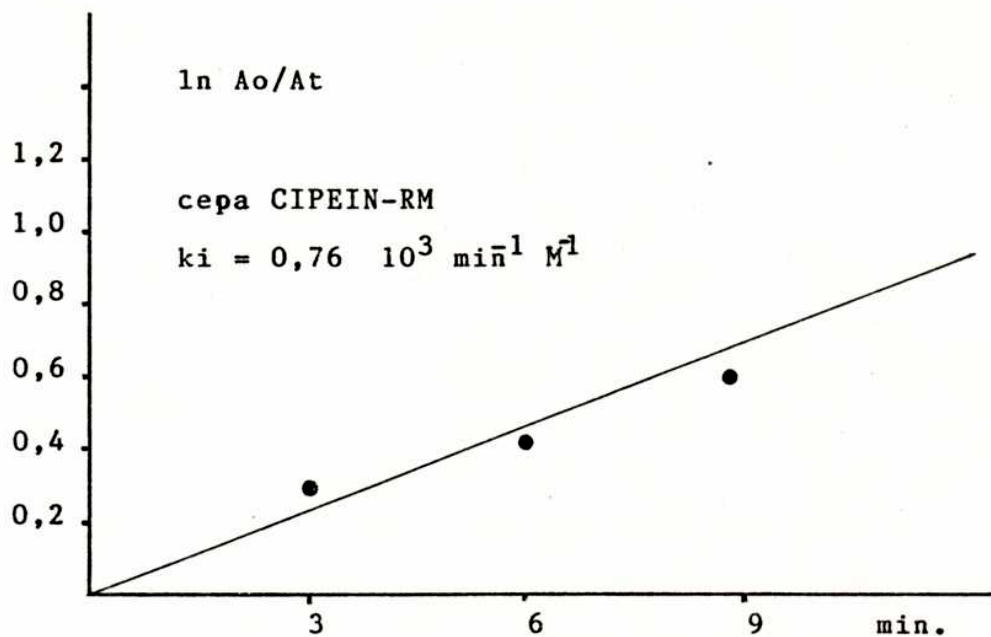
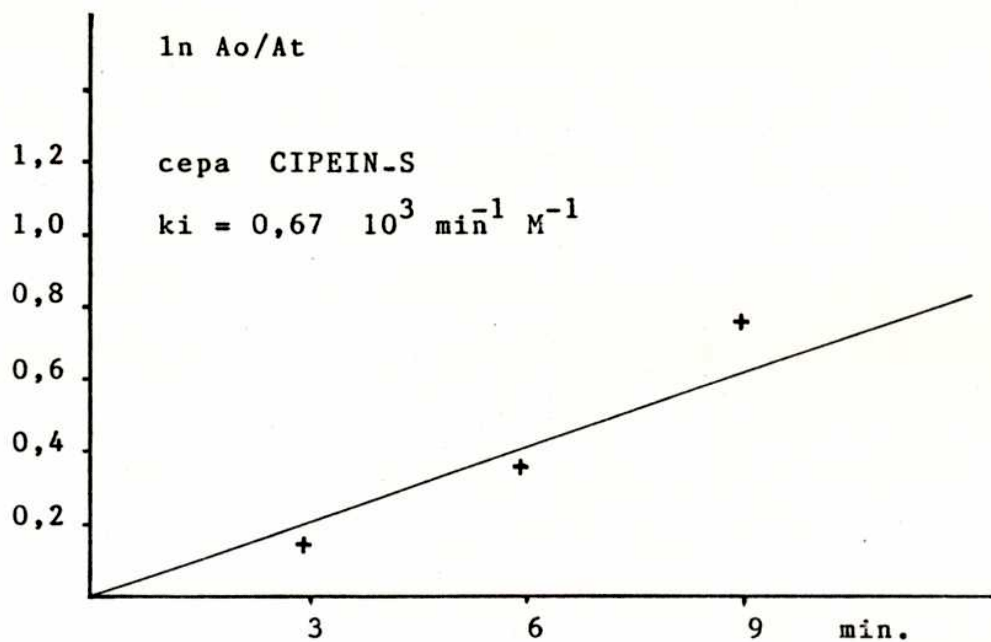


Fig. 39: ln Ao/At para las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-MR vs los diferentes tiempos de incubación.

Para los estudios del efecto anticolinesterásico "in vitro" se utilizó como inhibidor el malaoxón y se determinó que la respuesta de la actividad colinesterásica ante el inhibidor en el homogenato de cabeza de la cepa CIPEIN-S, fue similar al obtenido del homogenato de la cepa CIPEIN-RM (Fig.39). Los resultados obtenidos sugieren que no hay diferencia en ambas cepas en la susceptibilidad de la AChE a la inhibición por malaoxón. Por lo tanto se puede afirmar que esta enzima no representa un factor responsable de resistencia a malatión en la cepa CIPEIN-RM.

R e s u m e n
y
C o n c l u s i o n e s

A.- CARACTERIZACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los resultados obtenidos respecto a la caracterización del material biológico (cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM) a través de criterios morfológicos, de taxonomía numérica, bioquímicos y genéticos, indican que :

1.- El material tipificado -a través de su anatomía y métodos bioquímicos, genéticos y de taxonomía numérica- como cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, pertenece a *Sitophilus oryzae*.

1a.- La separación de *S. oryzae* y *S. zeamais* "in vivo", a través de caracteres anatómicos, es poco precisa.

En cuanto al valor diagnóstico de los caracteres definidos por los diferentes autores, debe considerarse que :

1a₁.- La forma del esclerito (placa basal), es un carácter que carece de valor diagnóstico para separar a ambas especies (Halstead, 1963); en las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM se encuentran todas las posibles formas, desde la ancha triangular hasta la angosta y acintada. La forma del esclerito no muestra ningún tipo de correlación con el tamaño o la pigmentación de los individuos.

1a₂.- la superficie del aedeagus es una característica de alto valor diagnóstico y estable dentro de la población (Kushel, 1961), así como a través de las generaciones.

1a₃.- la zona media, no ornamentada, del pronoto es un carácter complementario para la identificación de *S. oryzae* (Bordeaux, 1969), no así la forma de las puntuaciones del pronoto, que en el caso de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM varían en la población así como sobre el individuo, combinándose formas elípticas y circulares (Fig.22.B).

1a₄.- la anatomía de la cápsula cefálica de la larva del cuarto estadio posee un alto valor diagnóstico (Hossain & Verner, 1979). En la práctica, este criterio puede ser aplicado "in vivo", solamente cuando la cría se realiza sobre alimento artificial.

1b.- por el análisis de cluster, no es posible separar OTU's (unidades taxonómicas operacionales) o "fenones" dentro de las poblaciones de las cepas CIPEIN, en base a los criterios de Richards, 1944 y Birch, 1944 (Fig.23 y Fig.24).

1c.- en las experiencias genéticas, todos los cruzamientos resultaron interfértiles, observándose sólo una esperable variación (Bandsode & Bathia, 1981) en el número de descendientes de la cepa resistente. Este hecho corrobora que CIPEIN-S y CIPEIN-RM son dos cepas de *S. oryzae* y que el polimorfismo observado se debe a la variabilidad intraespecífica.

1d.- desde el punto de vista cuantitativo, no se observan diferencias significativas en la composición protéica (Fig: 25 y Tabla: 19), entre los distintos grupos de individuos seleccionados según el criterio de Richards, 1944 y Birch, 1944. Los proteinogramas no muestran diferencias cualitativas entre los grupos, solamente se destaca la banda 12', característica de los machos. Las diferencias cuantitativas entre los geles son poco significativas y sólo sobresalen aquellas especificadas en la tabla 19.

2.- CIPEIN-S y CIPEIN-RM son dos cepas de *S. oryzae*

3.- La variabilidad en la anatomía y fisiología de las poblaciones de CIPEIN-S y CIPEIN-RM, se debe al polimorfismo, propio de la especie, que puede ser acentuado por la influencia de variables exógenas durante el desarrollo individual y poblacional.

B.- CRIA DE LAS CEPAS CIPEIN-S Y CIPEIN-RM DE *S.oryzae*

El hecho de hallar, definir y prefijar los principales factores exógenos y endógenos relacionados con la variabilidad intraespecífica en *S.oryzae*, permitió standardizar la cria de esta especie y obtener :

- a.- poblaciones con un bajo coeficiente de variación en el tamaño y estado fisiológico de los individuos, y como consecuencia, una mejor reproducibilidad de los ensayos toxicológicos.
- b.- sucesivas generaciones con características poblacionales similares.
- c.- mayor número de individuos dentro de un mismo intervalo de edad a partir de cultivos más pequeños.
- d.- para ensayos toxicológicos, en cantidad prácticamente ilimitada, todas las fases y estadios del ciclo de vida, dentro de intervalos de edad estrechamente acotados.
- Las variables exógenas y poblacionales preestablecidas fueron las siguientes :

SUSTRATO: alimento artificial 150g



ESTABILIZACION
DEL ALIMENTO: hidratar (Solomon, 1951) BrNa



incubar $29^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%\text{HR}$

ESTABILIZACION
DE LA ATMOSFERA: $77\% \pm 2\%\text{HR}$ (Solomon, 1951) ClNa
 $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$



POBLACION PATERNA: 220 hembras + 80 machos
2 individuos por gramo de alimento



OVIPOSICION: 5 días a $29^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $77\% \pm 2\%\text{HR}$



INCUBACION: eliminación de la generación paterna
eliminación de las partículas finas
incubar 30 días a $29^{\circ}\text{C} \pm 1$ y $77\% \pm 2\%\text{HR}$

A través de los ensayos comparativos de cría de *S. oryzae* sobre alimento artificial y natural, resultó posible determinar que :

a.- la expresión del polimorfismo, a través de las generaciones y en ambas cepas, puede minimizarse con el uso de alimento artificial.

b.- el coeficiente de variación -en cuanto a tamaño individual- para los grupos de ambos sexos alimentados con la dieta artificial, es menor que el calculado para los grupos alimentados con trigo (Tabla 20).

c.- el número de descendientes (F1) obtenidos del trigo y del alimento artificial, de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, no varía de modo significativo.

d.- las diferencias en el tamaño de los individuos, inducidas por el tamaño del alimento, son significativas solo para los machos, de acuerdo al análisis por el método de contrastes según Scheffé ($P < 0.05$).

e.- el uso de alimento artificial en comprimidos desplaza la técnica de disección de semillas (Soderstrom, 1960), para obtener huevos, larvas de diferentes estadios y pupas de *S. oryzae*.

f.- las imagines (F1) de las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM, que emergen del trigo a lo largo de 14 días aproximadamente, lo hacen del alimento artificial sólo en 8 días.

g.- Como lo demuestran las experiencias sobre preferencia alimentaria (Fig: 26), la dieta artificial es aceptada por *S. oryzae* y seleccionada por éste, cuando se la ofrece junto con trigo (Victoria-INTA, germoplasma Mexicano).

h.- Los intervalos de confianza, correspondientes a los valores de la DL_{50} para poblaciones criadas sobre dieta natural y artificial no muestran diferencias significativas (Tabla 29). En cambio, los valores de la DL_{50} para trigo, dieta incompleta y alimento artificial son significativamente diferentes (Fig: 35).

i.- La dieta artificial no afecta en forma significativa el factor de resistencia calculado para las poblaciones CIPEIN-RM criadas sobre trigo (Tabla 29).

Con la standardización de todas las posibles variables en los cultivos, se evitó además, el desarrollo de hongos y la invasión de ácaros que alteran la producción de calor, el balance de agua y modifican la atmósfera de incubación.

C.- ENSAYO BIOLÓGICO

C.1.- ANESTESIA Y SEXADO

1.- El método de anestesiado es confiable y expeditivo para los ensayos toxicológicos. La exposición durante 30min. de hembras o machos de *S. oryzae* a una atmósfera saturada de CO₂ no provoca la muerte de los individuos y no interfiere en los resultados de los ensayos toxicológicos.

2.- El largo de la proboscis es un caracter sexual secundario y confiable para el sexado "in vivo" de *S. oryzae*. En poblaciones de las cepas CIPEIN, criadas sobre dieta artificial, puede separarse a los individuos por sexo de acuerdo con el siguiente criterio : MACHO = proboscis < 700 μ ; HEMBRAS = PROBOSCIS > 800 μ .

C.2.- METODOLOGIA - TOPICO Y FILM

El ensayo toxicológico por el método del film presenta en el caso de *S. oryzae*, además de los propios del método, algunos inconvenientes adicionales. Estos son consecuencia de que el aro de vidrio, no representa un límite físico para el desplazamiento de los ejemplares durante el ensayo. El método del tópico en cambio, combinado además con el de anestesia y sexado simultáneo, es una manera más precisa de medir susceptibilidad utilizando dosis conocidas del xenobiótico.

C.3.-SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS CIPEIN A DISTINTOS INSECTICIDAS

Los valores de Dosis Letal 50 obtenidos para seis diferentes insecticidas por el método del tópico, señalan que tanto la cepa susceptible como la resistente evidencian una gran susceptibilidad a la deltametrina y en orden decreciente al sumitió n > pirimifos-metilo > malatió n > lindane. El carbaril no mostró acción insecticida significativa en ninguna de las dos cepas.

D.- FACTORES QUE AFECTAN LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN *S. oryzae*

EDAD : Durante los primeros cinco días de vida de la imago, se observa menor susceptibilidad a malatió n así como mayor desviación en la respuesta toxicológica. Este fenómeno se revierte gradualmente al 5º día, permaneciendo estable el grado de susceptibilidad hasta el 10º día, a partir del cual sufre un leve incremento, con intervalos de confianza que se mantienen dentro de límites aceptables (Fig: 32).

SEXO : A pesar de la diferencia en el peso corporal, a favor de las hembras (15% $P < 0.05$), la respuesta toxicológica por insecto a malatió n, pirimifos-metilo, sumitió n y deltametrina es similar en ambos sexos. Para el lindane en cambio, la susceptibilidad de los machos es 100% superior a la de las hembras (Tabla: 24).

TEMPERATURA : Los ensayos toxicológicos a 15°, 26° y 30°C muestran que la susceptibilidad para el malatión se correlaciona positivamente con la temperatura (Fig: 33), mientras que para el caso de la deltametrina, esta correlación es negativa (Fig: 34).

A través de estos ensayos, se estableció además que 28° ±1°C es un valor aceptable desde el punto de vista fisiológico y operacional, para los ensayos toxicológicos.

DIETA : Esta define el tamaño y estado fisiológico general del material biológico. Las poblaciones alimentadas sobre sustratos de menor valor nutritivo (dieta incompleta) muestran mayor susceptibilidad a malatión en los ensayos toxicológicos (Fig: 35). Este fenómeno puede deberse en parte, a la distribución homogénea de todos los componentes dentro del comprimido de alimento artificial, los que en la semilla de trigo se encuentran compartimentalizados y no siempre al alcance de la larva, especialmente durante los primeros estadios de su desarrollo.

E.- RESISTENCIA A MALATION

El factor de reistencia a malatión calculado para la cepa CIPEIN-RM es :

cepas CIPEIN-RM y S (criadas sobre alimento artif.)(tóxico) = 5,4

cepas CIPEIN-RM y S (criadas sobre trigo)(tóxico) = 6,2

cepas CIPEIN-RM y S (criadas sobre trigo)(film) = 5,4

El factor de resistencia calculado para los restantes insecticidas es cercano a uno, aunque en el caso particular del pirimifos-metilo y el sumiti6n se observa una muy leve resistencia cruzada. En el caso del lindane el $FR < 1$ indica la presencia de un fen6meno de correlaci6n negativa (Tabla 30).

F.- CAUSAS BIOQUIMICAS DE LA RESISTENCIA A MALATION

F.1.- METABOLISMO

CARBOXILESTERASAS = El cotratamiento con TPP y el TOCP no revirti6 el fen6meno de resistencia a malati6n en la cepa CIPEIN-RM. El fen6meno de resistencia cruzada a otros OPs (pirimifos-metilo y sumiti6n), sumado a la falta de sinergismo por TPP, sugieren la presencia de un fen6meno de resistencia no especifica a malati6n (Champ & Dyte, 1976).

OXIDASAS DE FUNCION MIXTA (MFO) : El cotratamiento de la deltametrina con BPP, sugiere que entre las cepas CIPEIN-S y CIPEIN-RM no hay diferencias apreciables a nivel de este mecanismo detoxificante.

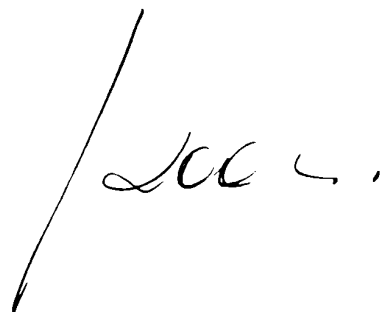
GLUTATION-S-TRANSFERASAS (GSH-S-T) : El pretratamiento del malati6n con maleato de dietilo tampoco modific6 el efecto t6xico del malati6n en la cepa CIPEIN-RM.

F.2.- SITIO DE ACCION

1.- La ChE de los homogenatos de cabeza de *S. oryzae* no requiere proceso de purificación a los fines del ensayo toxicológico, ya que su actividad decae levemente durante los primeros 30min. (Fig. 37), manteniendose luego constante hasta los 60min.

2.- La respuesta de la actividad colinesterásica ante el inhibidor (malaoxón) en los homogenatos de cabezas de la cepa CIPEIN-S, fue similar a la obtenida de los homogenatos de la cepa CIPEIN-RM, de modo que diferencias en la AChE de ambas cepas no pueden considerarse un factor relevante en el fenómeno de resistencia a malatión estudiado.

Debido al bajo factor de resistencia de la cepa CIPEIN-RM y a que se trata de resistencia no específica a malatión (6.), puede considerarse que : es posible relacionar el fenómeno de resistencia de la cepa CIPEIN-RM a malatión con una serie de factores, difíciles de individualizar por su bajo aporte, entre ellos quizás también el metabolismo degradante.





Bibliografía

- ADKISSON, P.L., 1957. The relative susceptibillity of the life history stages of the rice weevil to certain fumigants. J. econ. Ent. 50 :761-764
- ANON., 1957. World Health Expert Committee on Insecticides , 7th. Report. WHO Technical Rep. Ser. n°. 125.
- ANON., 1974. Recomendated methods for the detection and measurment of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Method n°. 15. Plant Prot. Bull. FAO., 17 :76-82
- ANON., 1975. Recomendated methods for the detection and measurment of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Method n°. 16. Plant Prot. Bull. FAO., 23 (1) :12-25
- ARAKAKI, N. & TAKAHASHI, F., 1982. Oviposition preference of rice weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera : Curculionidae), for unpolished and polished rice. Jap. J. appl. Ent. Zool., 26 :166-171
- ARLIAN, L.G., 1979. Significance of passive sorption of atmospheric water vapor and feeding in water balance of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. Comp. Biochem. Physiol., 62A :725-733
- BAKER, J.E. 1974. Differential sterol utilization by larvae of *Sitophilus oryzae* and *S. granarius*. Ann. entom. Soc. Am., 67 :591-594
- BAKER, J.E., 1974a. Differential sterol utilization by larvae of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. Ann. Ent. Soc. Amer., 67 (4) :591-594
- BAKER, J.E., 1974b. Differential net food utilization by larvae of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. J. Insect Physiol., 20 :1937-1942
- BAKER, J.E., 1975. Vitamin requirements of larvae of *Sitophilus oryzae*. J. Insect Physiol., 21 :1337-1342
- BAKER, J.E. 1976a. Total dietary amino acid and lysine requeriments for larvae of *Sitophilus oryzae*. J. Georgia Ent. Soc., 11(2) :173-176
- BAKER, J.E., 1976b. Nitrogenous excretory products of adults of *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. Comp. Biochem. Phys., 53B :107-109
- BAKER, J.E. 1978. Sulfur amino-acid requirements of larvae of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae). Comp. Biochem. Phys., B 60 (4) : 355-360

- BAKER, J.E. 1979. Requirements for the essential dietary amino-acids of larvae of the rice weevil. *Environ. Entomol.*, 8 (3) :451-453
- BAKER, J.E. & MABIE, J.M. 1959. Growth responses of larvae of three species of *Sitophilus* on a meridic diet. *J. econ. Entomol.*, 6 :723-726
- BAKER, J.E. & MABIE, J.M., 1973a. Growth responses of larvae of the rice weevil, maize weevil and granary weevil on a meridic diet. *J. Econ. Ent.*, 66(3) :681-683
- BAKER, J.E. & MABIE, J.M., 1973b. Development of aposymbiosis in larvae of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae) by dietary treatment with antibiotics. *J. Stor. Prod. Res.*, 9 (4) :241-245
- BAKER, J.E. & WOO, S.M., 1985. Purification, partial characterisation, and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granarius*. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.*, 2 :415-428
- BAKER, J.E., WOO, S.M., NELSON, D.R. & FATLAND, C.L., 1984. Olefins as major components of epicuticular lipids of three *Sitophilus* weevils. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B :877-884
- BANSODE, P.C & CAMPBELL, W.V., 1979. Evaluation of North Carolina field strains of the red flour beetle for resistance to malathion and other organo-phosphorous compounds. *J. econ. Ent.*, 72 :331-333
- BANSODE, P.C & BHATIA, S.K., 1976. Selection for resistance to malathion in the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Bull. Grain Techn.*, 14 (2) :118-123
- BANSODE, P.C & BHATIA, S.K., 1981. Note on reduced reproductive ability in a malathion-resistant strain of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). *Protection Ecology*, 3 :63-64
- BENBROOK, E.A. & SLOSS, M.W., 1961. *Veterinary Clinical Parasitology*. Iowa State Univ. Press, 260pp.
- BINNS, T.J., 1983. Evaluation of insecticides against malathion-resistant and susceptible strain of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*. *Test Agrochem. Cult.*, 4 :30-31
- BIRCH, L.C. 1944a. The effect of the temperature and dryness on the survival of the eggs of *Calandra oryzae* (L) (small strain) and *Rizopertha dominica* Fab. (Coleoptera). *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. Adel.*, 22 :265-269

- BIRCH,L.C.,1944b. An improved method for determining the influence of temperature on the rate of development of insect eggs (using eggs of the small strain of *Calandra oryzae* L.(Coleoptera)). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.,22 (4) :277-283
- BIRCH,L.C.,1945a. The influence of temperature on the development of the different stages of *Calandra oryzae* L.and *Rizopertha dominica* Fab. (Coleoptera). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.,3 (1) :29-35
- BIRCH,L.C.,1945b. A contribution to the ecology of *Calandra oryzae* L. and *Rhizopertha dominica* Fab. (Coleoptera) in stored wheat. Trans. Roy. Soc. S.A.,69 (1) :140-149
- BIRCH,L.C.,1945c. The mortality of the immature stages of *Calandra oryzae* L. (small strain) and *Rhizopertha dominica* Fab. in wheat of different moisture contents. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.,23 (2) :141-145
- BIRCH,L.C.,1945d. The influence of temperature, humidity and density on the oviposition of the small strain of *Calandra oryzae* L. and *Rhizopertha dominica* Fab. (Coleoptera). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.,23 (3) :197-203
- BIRCH,L.C.,1946. The biotic potential of the small strain of *Calandra oryzae* and *Rhizopertha dominica*. J. Anim. Ecol., 14 :125-127
- BIRCH,L.C.,1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. J. Anim. Ecol.,17 :15-26
- BIRCH,L.C.,1953. Experimental background to de study of the distribution and abundance of insects. I.- Influence of temperature, moisture and food on the innate capacity for increase of the grain beetles. Ecology,34 :698-711
- BIRT,L.M. & CHRISTIAN,B.,1969. Changes in nitrogenous compounds during the metamorphosis of the blowfly, *Lucila cuprina*. J. Insect Physiol.,15 :711-719
- BISHARA,S.I.,1967. Factors involved in the recognition of the oviposition sites of three species of *Sitophilus*. Bull. Soc. ent. Egypte, LI (71) :72-84.
- BISHARA,S.I.,1968. Comparison of some aspects of flight activity of *Sitophilus zea-mais* Mots. and *Sitophilus oryzae* L. Bull. Soc. ent. Egypte, LII :477-501

- BOUDREAUX, B. 1969. The identity of *Sitophilus oryzae*. Ann. Ent. Soc. Amer., 62 (1) :169-172
- BUSVINE, J.R., 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. Cwllth. Agric. Bureau 2* ed.
- CHAMP, B.R., 1967. The inheritance of DDT resistance in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera:Curculionidae) in Queensland. J. Stor. Prod. Res., 3 :321-334
- CHAMP, B.R., 1968. A test method for detecting insecticide resistance in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). J. Stor. Prod. Res., 4 :175-178
- CHAMP, B.R., 1978. Pesticide resistance and its current significance in control of pests of stored products in: DAVIS, R. (Ed.) Proc. 2nd. Work Conf. Stored-Product Entomology (Ibadan, Nigeria). :159-181
- CHAMP, B.R. & CHAMPBELL-BROWN, M.J., 1970. Insecticide resistance in Australian *Tribolium castaneum* (Herbst). I.- A test method for detecting insecticide resistance. J. Stor. Prod. Res., 6 :53-70
- CHAMP, B.R. & DYTE, C.E., 1976. Pesticide susceptibility of stored grain pests. FAO plant production and protection series N#5. :55-297
- CHAMP, B.R. & DYTE, C.E., 1977. FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. FAO Plant Prot. Bull., 25 (2) :49-67
- CHAMP, B.R., STEELE, R.W., GENN, B.G. & ELMS, K.D., 1969. A comparison of malathion, diazinon, fenitrothion and dichlorvos for control of *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhizopertha dominica* (F.) in wheat. J. stored Prod. Res., 5 :21-48
- CHIPPENDALE, G.M. 1972. Dietary carbohydrates - Role in survival of the adult rice weevil *Sitophilus oryzae*. J. Ins. Phys., 18 (5) :949-957
- CICHY, D., 1971. The role of some ecological factors in the development of pesticide resistance in *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* Herbst. Ekol. Polska, XIX (36) :567-616
- COGBURN, R.R., 1976. Pirimiphos-methyl as protectant for store rough rice : Small bin test. J. Econ. Ent., 69 (3) :369-373
- COMISION DE NOMENCLATURA ZOOLOGICA, 1959. Opinion 572. Bull. zool. Nomencl. vol.17, pts. 3-5 :112-115

- COTTON,R.T.,1920. Rice weevil, (*Calandra*) *Sitophilus oryza*.
J. Agric. Res.,20 (5) :409-422
- COTTON,R.T., WALKDEN,H.H., WHITE,G.D. & WILBUR,D.A.,1960. Causes
of outbreaks of stored grain insects. Kansas State Univ.
Agric. Appl. Sci. Bull., 416 :3-35
- CUFF, W.R. & HARDMAN,N. 1980. A development of the Leslie matrix
formulation for restructuring and extending an ecosystem
model : The infestation of stored wheat by *Sitophilus*
oryzae. Ecological Modelling,9 :281-305
- Da FONSECA, J.P.C.,1965. Sur le dimorphisme sexuel chez
charancons du blé du genre *Sitophilus* Schönh. (Coléoptère :
Curculionidae). Bull. Mus. Hist. nat. Paris, 37 (2) :290-293
- DANG,K.,1983. Intracellular symbiontes and their functions in
Sitophilus oryzae L. India Illust. Paper,0(0) :251-255
- DAVIES,R.A.H. & DESMARCHELIER,J.M.,1981. Combinations of
pirimiphos-methyl and carbaryl for stored grain protection.
Pestic. Sci.,12 :669-677
- DAVIS,R. & BRY,R.E. 1985. *Sitophilus granarius*, *S. oryzae* and *S.*
zeamais. in Handbook of Insect Rearing.,vol.I-II, : 287-289
ed. Singh,P & Moore,R.F. Elsevier Sc. Publ. Inc. Co. NY
- DOGGETT,H. 1957. The breeding of sorghum in East Africa.
I.- Weevil resistance in sorghum grain. Emp. J. exp. Agric.,
25 :1-9
- DDNAT,H.J.,1970. Zur Kenntnis des chemorezeptorischen Verhaltens
der Kornkäfer. *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera) beim
Auffinden seiner Nahrung. Z. Angew. Entomol. 65 :1-13
- DOWNE,A.E.R.,1953. Mosquitoes. Comparative serology of four
species of *Aedes* (*Ochlerotatus*). Science 139 :1286-1287
- DYTE,C.E.,1970. Insecticide resistance ein stored product insects
with special reference to *Tribolium castaneum*. Trop. stored
Prod. Inf., 20 :13-18
- DYTE,C.E. & BLACKMAN,D.G.,1967. Selection of a DDT-resistant
strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera :
Curculionidae). J. Stor. Prod. Res.,2 :211-228
- EASTHMAN,L.E.S. & SEGROVE,F. 1947. The influence of temperature
and humidity on instar length in *Calandra granaria* Linn.
J. Exp. Biol. 24 : 79-94

- ETO, M., 1974. *Organophosphorous Pesticides : Organic and Biological Chemistry*. Acad. Press Inc. 257pp
- EVANS, D.E. 1977. The capacity for increase at a low temperature of several Australian populations of *Sitophilus oryzae* (L). *Aust. J. Ecol.* 2 : 55-67
- EVANS, D.E., 1979. The effect of thermal acclimatation and relative humidity on the oxygen consumption of three *Sitophilus* species. *J. stored Prod. Res.*, vol.15 :87-93
- EVANS, D.E. 1982. The influence of temperature and grain moisture content on the intrinsic rate of increase of *Sitophilus oryzae* (L) (Coleoptera : Curculionidae). *J. stor. Prod. Res.* 18 : 55-66
- FLOYD, E.H. & NEWSOM, L.D., 1959. Biological study of the rice weevil complex. *Ann. Ent. Soc. Amer.* vol.52 :687-695
- FOURIE, G.J.J., 1967. The influence of certain factors on the fecundity of *Sitophilus oryzae* (L.). *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 10 :331-344
- FUKAMI, J., 1980. Metabolism of several insecticides by glutation-S-transferase. *Pharmac. Ther.* vol 10 :473-514
- GASNIER-FAUCHET, F. & NARDON, P., 1987. Comparison of sarcosine and methionine sulfoxide levels in symbiotic and aposymbiotic larvae of two sibling species, *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* Mots. (Coleoptera : Curculionidae). *Insect Biochem.*, 17 (1) :17-20
- GEORGHIOU, G.P. & TAYLOR, C.E., 1977. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.*, 70 (3) :319-323
- GOLEBIEWSKA, Z., 1969. The feeding and fecundity of *Sitophilus granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rizopertha dominica* (F.) in wheat grain. *J. stored Prod. Res.*, 5:143-155
- GOMEZ, L.A., RODRIGUEZ, J.G., PONELEIT, C.G., BLAKE, D.F. 1982. Preference and utilization of maize endosperm variants by the rice weevil. *J. Econ. Entom.* 75 (2) : 363-367
- GOMEZ, L.A., RODRIGUEZ, J.G., PONELEIT, C.G., BLAKE, D.F. 1983. Relationship between some characteristics of the corn kernel pericarp and resistance to the rice weevil (Coleoptera : Curculionidae). *J. Econ. Entom.* 76 (4) : 797-800

- GOMEZ, L.A., RODRIGUEZ, J.G., PONELEIT, C.G., BLAKE, D.F. & SMITH, C.R. 1983. Chemosensory responses of the rice weevil (Coleoptera : Curculionidae) to a susceptible and a resistant corn genotype. J. Econ. Entomol. 76 (5) :1044-1048
- GORE, K.S., 1958. Laboratory experiments with some organic phosphorous insecticides as wheat protectants. PhD Thesis. Cornell Univ. N.Y.
- GRENIER, A.M., NARDON, P. & BONNOT, G., 1986. The role of symbiosis in population growth of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae), experimental and theoretical study. Acta. Decol. Appl., 7 (1) :93-110
- GRENIER, A.M., NARDON, P. & WICKER, C., 1983. Influence of changement de nourriture sur le development, l'activité de la N-acétylglucosamidase et les symbiontes de *Sitophilus oryzae* L. (Col. Curculionidae). Bull. Soc. ent. France, 88 :323-332
- HALSTEAD, D.G.H., 1963. The separation of *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motschulsky (Col., Curculionidae) with a summary of their distribution. Ent. mon. Mag. London., vol. 99 :72-74
- HARDMAN, J.M., 1978; . A logistic model simulating environmental changes associated with the growth of populations of the rice weevils, *Sitophilus oryzae*, reared in small cells of wheat. J. Appl. Ecol., vol. 15 : 65-87
- HEATHER, N.W., 1986. Sex-linked resistance to pyrethroids in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). J. stored Prod. Res., 22 (1) :15-20
- HOLE, B.D., 1981. Variation in tolerance of seven species of stored product coleoptera to methyl-bromide and phosphine in strains from twenty-nine countries. Bull. ent. Res. 71(2) :299-306
- HOLLOWAY, G.J. 1985a. An analysis of inherited factors affecting the sex ratio in the rice weevil *Sitophilus oryzae* L. Heredity 55 : 145-150
- HOLLOWAY, G.J., 1985b. The effect of increase grain moisture content on some life history characters of *Sitophilus oryzae* (L.) after staining egg-plugs with acid fuchsin. J. stored Prod. Res. vol. 21 (4) : 165-169
- HOSSAIN, M. & VERNER, P.H., 1979. Larvae of three species of *Sitophilus* (Coleoptera : Curculionidae). Bangladesh J. Zool. 7 (1) :45-51

- HOWE, R.W., 1952. The biology of the rice weevil *Calandra oryzae*. Ann. Appl. Biol., 39 :168-180
- HOWE, R.W., 1962. The entomological problems as assessing the success of a fumigation of stored produce. Proc. 11th. Int. Congr. Entomol., 2 :288-290
- HOWE, R.W., 1967. The influence of age of the parents on some characteristics of the offspring of insects bred in laboratory. J. stored Prod. Res., 3 :371-385
- HOWE, R.W. & OXLEY, T.A., 1944. The use of carbon dioxide production as a measure of infestation of grain by insects. Bull. Ent. Res., 35 :11-22
- ISHAAYA, I & CASIDA, J.E., 1983. Pyrethroid detoxification and synergism in insects. IUPAC Pestic. Chem. :307-310, MIYAMOTO, J. et al ed. Pergamon Press.
- KHAN, M.Q., 1948. A contribution to a further knowledge of the structure and biology of the weevils *S. oryzae* and *S. granarius*, with special refernce to the effects of temperature and humidity on the rate of their development. Indian J. Entomol., 11 :143-202
- KHAN, N.R. & MUSGRAVE, A.J., 1969. Observations on the functional anatomy of the reproductive organs of *Sitophilus* (Coleoptera : Curculionidae). Canadian J. Zool. vol.47 :665-669
- KHARE, B.P. & AGRAWAL, N.S. 1963. Effect of temperature, relative humidity, food material and density of insect population on the oviposition of *Sitophilus oryzae* (Linn.) and *Rhyzopertha dominica* Fab. Bull. Grain Technol. 1 : 48-60
- KING, C.E. & DAWSON, P.S., 1971. Population biology and the *Tribolium* modell. Evol. Biol., 5 :133-227
- KIRITANI, K., 1957. The investigations on the faunal composition in stored products: The faunal composition in relation to kinds of stored products. Japan J. App. Ent. Zool., 1 :8-14
- KIRITANI, K., 1959. Flying ability and some of the characters associated with it in *Calandra*. Japan J. Ecol., 9 :69-74
- KIRITANI, K. 1965. Biological studies on the *Sitophilus* complex (Coleoptera : Curculionidae) in Japan. J. Stor. Prod. Res. 1 : 169-176
- KNUTSON, H., 1969. Changes in reproductive potential in houseflies in respose to dieldrin. Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer., 1 :27-32

- KOURA, A., EL HALFAWY, M., RISK, S. & ALY, F.D., 1971. Type of food as a factor influencing the longevity of some stored products insects. *Agric. Res. Rev.* vol.49 : 30-33
- KUSCHEL, G., 1961. Problems of synonymy in the *Sitophilus oryzae* complex (30th contribution, Col. Curculionoidea). *Ann. Mag. nat. Hist., ser.13, vol.4* : 241-244
- LATHROP, F.H., 1914. Egg-laying if the rice weevil *Calandra oryzae* Linn. *The Ohio Naturalist*, XIV (7) : 321-327
- LAVADINHO, A.M.P. 1975. Toxicological studies on adult *Sitophilus granarius* (L), influence of individual body weight on the susceptibility to DDT and malathion. *J. Stor. Prod. Res.* 12 : 215-224
- LAWLOR, N.E., 1949. Immunological studies on antigens extracted from mosquitoes and their applications in taxonomy. D.Sc. Thesis, J.H.Hopkins Univ. Baltimore
- LEONE, C.A., 1947. A serological study of some orthoptera. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 40 : 417-433
- LINDGREN, D.L., KROHNE, H.E. & VINCENT, L.E., 1954. Malathion and chlorthion for control of insects infesting stored grain. *J. econ. Entomol.*, 47 : 705-706
- LOCKEY, K.H., 1980. Insect cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65B : 457-462
- LONGSTAFF, B.C., 1981a. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera : Curculionidae) : a critical review. *Protection Ecology*, 2 : 83-130
- LONGSTAFF, B.C. 1981b. Density-Dependent fecundity in *Sitophilus oryzae* (L) (Coleoptera : Curculionidae). *J. stor. Prod. Res.* 17 : 73-76
- LONGSTAFF, B.C. 1981c. The manipulation of the population growth of a pest species : an analytical approach. *J. Appl. Ecol.*, vol.18 : 727-736
- LONGSTAFF, B.C. & CUFF, W.R., 1984. An ecosystem model of the infestation of stored wheat by *Sitophilus oryzae* : A reappraisal. *Ecological Modelling*, 25 : 97-119
- LONGSTAFF, B.C. & EVANS, N. 1983. The demography of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L) (Coleoptera : Curculionidae) submodels of age-specific survivorship and fecundity. *Bull. Ent. Res.* 73 : 333-344

- LOWRY, D.H., ROSENBOURGH, N.J., FARR, A.L. & RANDAL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275
- LUM, P.T.M., & BAKER, J.E., 1975a. Accessory cells of the mycetome in the rice weevil *Sitophilus oryzae*: Post-embryonic development. Ann. ent. Soc. Amer. 68 (6) : 1074-1076
- LUM, P.T.M., & BAKER, J.E., 1975b. Sexual dimorphism in the sixth abdominal sternite of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). J. stored Prod. Res. vol. 11 : 57-59
- MacLAGAN, D.S. 1932. The effect of population density upon rate of reproduction with special reference to insects. Proc. R. Soc. London, Ser. B, 111 : 437-454
- MacLAGAN, D.S. & DUNN, E. 1935. The experimental analysis of the growth of an insect population. Proc. R. Soc. Edinburgh, 55 : 126-138
- MacLAURIN, B.F. & DOWNE, A.E.R., 1966. Serological comparison of three species of grain weevils (Curculionidae : *Sitophilus*). J. Kansas Ent. Soc., 39 (3) : 500-505
- MAHANTA, H.C., 1983. The female reproductive system of rice weevil *Sitophilus oryzae* with special reference to its abnormal development. The Indian Zoologist 7 (1-2) : 1-4
- MALLORY, N., BOUSCH, G. & MATSMURA, F., 1967. Insecticidal degradation of *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiont of apple maggot. J. econ. Ent., : 918-920
- MANSOUR, K., 1935. On the microorganism free and the infected *Calandra granaria* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). Bull. soc. r. ent. Egypte, 290 : 306
- MARI, Z., 1982. Oogenesis and morphology of the genital apparatus of four species of coleoptera that damages grain and its derivative products. IZV Timiryazev S-KH. Akad. vol. 1 : 123-127
- METCALF, R.L., 1955. Physiological basis for insect resistance to insecticides. Physiol. Rev., 35 : 197-232
- MUKHARAJI, S.P. & SINGH, C.B., 1971. The structure of alimentary canal of *Sitophilus oryzae* Linn. (Curculionidae, Coleoptera). Ind. J. Zootomy, 12 (2) : 91-102

- NARDON, P., 1978. Etude des interactions physiologiques et genetiques entre l'hôte et les symbiotes des coleoptere curculionide *Sitophilus sasakii* (S. oryzae). These docteur des Sciences. INSH, Univ. Lyon.
- NARDON, P., GRENIER, A.M. & CHESSEL, D., 1981. Comportement de ponte de la femelle de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptere : Curculionide) : Probleme du choix du grain et du site de ponte sur le grain. Bull. Soc. Zool. France, 106 (4) :487-496
- NARDON, P. & WICKER, C., 1981. La symbiose chez le genre *Sitophilus* (Coleoptere Curculionide). Ann. Biol. 20 (4) :327-373
- NAVARRO, S., DIAS, R. & DONAHAYE, E., 1985. Induced tolerance of *Sitophilus oryzae* adults to carbon dioxide. J. stored Prod. Res., vol. 21 (4) :207-213
- OPPENDORTH, F.J., 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. in Comparative Insect Physiology, biochemistry and pharmacology. KERKUL, G.A & GILBERT, L.J. ed. vol.12 :731-773, Pergamon Press.
- PANDEY, G.P., SRIVASTAVA, J.L. & VARMA, B.K., 1979. Differences in resistance to malathion in *Sitophilus oryzae* Linn. and *Tribolium castaneum* (Herbst) occurring in diferent regions in India. Indian J. agric. Sci. 49 (10) :810-812
- PANT, N.C., 1983. Physiology of symbiotes in insects. India Illust. Papers 0 (0) : 239-250
- PANT, N.C. & GUPTA, P., 1959. Physiological studies on *Sitophilus oryzae* Linn. I.- Oviposition and larval development on artificial grains. Indian J. Ent. vol. 21 :15-19
- PARKIN, E.A., 1958. A provisional asesment of malathion for stored product insect control. J. sci. Fd. Agric., 9 :370-375
- PENG, W.K., HSU, S.J. & HO, K.K. 1983. Studies on the varietal resistance of rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.). Phitopathologist & Entomologist NTU (19) : 27-38
- PHADKE, K.G. & BHATIA, S.K. 1974. Population growth of *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F) in wheat varieties. Ind. J. Entomol., 36 :251-260
- PHILLIPS, J.K & BURKHOLDER, W.E., 1981. Evidence for a male-produced aggregation pheromone in the rice weevil. J. Econ. Enom., 74 (5) : 539-542

- PHILLIPS, J.K., WALGENBACH, C.A., KLEIN, J.A., BURKHOLDER, W.E., SCHMUFF, N.R. & FALES, H.M., 1985. (R,S)-5-hydroxy-4-methyl-3-heptanone. Male-produced aggregation pheromone of *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motsch.. J. Chem. Ecol., 11 (9) :1263-1274
- PICCOLO de VILLAR, M.I., SECCACINI, E. & ZERBA, E.N., 1985. Resistencia a malation en insectos plaga del grano almacenado de la Republica Argentina. IDIA N*.441-444 : 59-63
- PIERANTONI, V., 1927. L'organo simbioto nello sviluppo de *Calandra oryzae*. Re. reale Acad. Sci. nat. napoli., 35 :244-250
- PINNIGER, D.B., 1975. The behaviour of insects in presence of insecticides : the effect of fenitrothion and malathion on resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* Herbsdt. Proc. 1st. int. wking. Conf. Stored Prod. Ent., Savannah, 1974 :301-308
- PLAPP, F.W., 1986. Genetics and biochemistry of insecticide resistance in arthropods : Prospects for the future. in Pesticide Resistance; strategies and tactics for management. GLASS, E.H. ed. Nat. Res. Council. Nat. Acad. Press, Washington D.C. :74-86
- PROCTOR, D.L., 1971. An additional aedeagal character for distinguishing *Sitophilus zeamais* Motsch. from *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae) J. stor. Prod. Res., vol.6 :351-352
- RAJAK, R.L. 1973. Bioassay technique for resistance to malathion of stored product insects. Internat. Pest. Cont. 15 (6) : 11-16
- REDDY, D.P., 1951. Influence of the interaction of environmental factors upon the immature stages of the rice weevil. Ecology, 31 :641-642
- RICHARDS, O.W. 1944. The two strains of the rice weevil, *Calandra oryzae* (L.) (Coleopt., Curculionidae). Trans. R. Ent. Soc., London. 94 (2) :187-200
- RICHARDS, O.W. 1947. Observations on grain-weevils *Calandra* (Coleoptera : Curculionidae) I.- General biology and oviposition. Proc.Zool.Soc. London 117 : 1-43
- ROMESBURG, H.C., 1984. Cluster analysis for researchers. Lif. Learn. Pub. Belmont, 334pp.

- RUSSELL, M.P. 1962. Effects of sorghum varieties on the lesser rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). Oviposition, immature mortality and size of adults. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 55 : 1335-1336
- RUSSELL, M.P. 1966. Effects of four sorghum varieties on the longevity of the lesser rice weevil *Sitophilus oryzae* (L). *J. Stor. Prod. Res.* 2 : 75-79
- RYOO, M.I., 1983. Characterizing distribution of the head width in a holometabolous insect larvae. *Korean J. Plant. Prot.* 22 (1) : 46-48
- RYOO, M.I. & CHO, K-J., 1986. Life history and intrinsic rate of natural increase of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae) in rice. *The Korean J. of Entom.* 16 (1) : 1-5
- SANDIFER, J.B. & TOMBES, A.S., 1972. Ultrastructure of the lateral neurosecretory cells during reproductive development of *Sitophilus granarius* (L.) (Insecta : Coleoptera). *Tissue & Cell*, 4 (3) : 437-446
- SATOMI, H. 1960. Differences in some physiological and ecological characters between two allied species of the rice weevils *C. oryzae* and *C. sasakii* collected from different districts of the world. *Jap. J. Ecol.* 10 (6) : 218-226
- SCHEFFE, H., 1959. *The analysis of Variance.* Publ. J. Wiley N.Y. 477pp
- SCHERF, H., 1964. Die entwicklungsstadien der mitteleuropäischen Curculioniden (Morphologie, Bionomie, Ökologie). *Abh. senckenb. naturf. Ges.* 506 : 1-335
- SCHMUFF, N.R., PHILLIPS, J.K., BURKHOLDER, W.E., FALES, H.M., CHEN, C-W. ROLLER, P.P. & MA, M., 1984. The chemical identification the rice weevil and maize weevil aggregation pheromone. *Tetrahedron Letters*, 25 (15) : 1533-1534
- SEVINTUNA, C. & MUSGRAVE, A.J., 1960. A note on sexual dimorphism in *Sitophilus* weevils. *Can. Entomol.*, 92(6) : 467-469
- SHARIFI, S. & MILLS, R.B., 1971. Developmental activities and behavior of the rice weevil inside wheat kernels. *J. Econ. Ent.* 64 (5) : 1111-1118
- SHARMA, V.K. 1985. Optimal ovipositional period in relation to number of eggs laid by *Sitophilus oryzae* (L) in different wheat varieties. *J. Ent. Res.* 9 (2) : 160-164

- SHARMA, S.P. & DEORA, R.K., 1980. Factors affecting production, release & response of the female sex pheromones in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). Indian J. exp. Biol. vol. 18 :463-465
- SHAZALI, M.E.H. 1982. The biology and population ecology of four insect pests of stored sorghum with particular references to competition and succession. Ph.D. Thesis, Univ. of Reading, Sudan.
- SHAZALI, M.E.H. 1986. Effect of sorghum grain size on developmental ecology of *Sitophilus oryzae*. Z. angew. Zool 73 (3) : 293-300
- SINGH, G., 1971. Studies on the endosymbiotic microorganisms in the *Cletus signatus* Walker (Coreidae : Heteroptera). PhD. Thesis. IARI, New Delhi-India
- SINGH, K., AGAWAL, N.S. & GIRISH, G.K., 1973. The oviposition response and development of *Sitophilus oryzae* (L.) in different high yielding varieties of wheat. J. stored Prod. Res., 10 :105-111
- SINGH, N.B., CAMPBELL, A. & SINHA, R.N., 1976. An energy budget of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 69 :503-512
- SINGH, N.B. & SINHA, R.N. 1977. Carbohydrate, lipid and protein in the developmental stages of *Sitophilus oryzae* and *S. granarius* (Coleoptera : Curculionidae). Ann. Ent. Soc. Amer. 70 (1) : 107-111
- SINGH, N.B., SINHA, R.N. & WALLACE, H.A., 1977. Changes in O₂, CO₂ and microflora of stored wheat induced by weevils. Environmental Entomology, 6 (1) :111-117
- SODERSTROM, E.L. 1960. Recognition and duration of larval instars of the rice weevil and the granary weevil. J. Kansas. Ent. Soc. 33 (4) : 157-161
- SOLOMON, M.E. 1952. Control of humidity with potassium hydroxide, sulfuric acid, or other solutions. Bull. ent. Res. 42, : 543-554
- STEVENS, R.A. & MILLS, R.B. 1973. Comparison of techniques for screening sorghum grain varieties for resistance to rice weevil. J. Econom. Entomol. 66 (5) : 1222-1223

- SUBBA, J.R., 1976. Studies on quantitative requirements for vitamins of B-complex up to second generation of *Tribolium castaneum* Herbst and *Sitophilus oryzae* Linnaeus and on artificial diet of *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus). Ent. Newsletter, vol.6 :22
- SURTEES, G. 1965. Effect of grain size on development of the weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera : Curculionidae) Proc. Roy. ent. Soc. London A 40 : 38-40
- TAKAHASSHI, S., 1931. Insect pests of grain and their control measures. Meibundo Tokyo
- TEWARI, G.C. & PANDEY, N.D., 1977. some biological comparisons of insecticide-resistant and susceptible strains of rice weevil, *Sitophilus oryzae* Linn. Bull. Grain. Techn., 15 (1) :3-8
- THAUNG, M. & COLLINS, P.J. 1986. Joint effects of temperature and insecticides on mortality and fecundity of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidae) in wheat and maize. J. econ. Entomol. 79 (4) : 909-914
- TILTON, E.W., 1961. Field test of fumigants on rough rice. Rice J., 64 :8-10
- TRIPATHI, R.L. & HODSON, A.C., 1981. Factors responsible for the competitive superiority of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* Linn. over the granary weevil *Sitophilus granarius* Linn. Indian J. Ent., 43 (1) :1-11
- TYAGI, A.K. & GIRISH, G.K., 1975. Studies on the oviposition site of *Sitophilus oryzae* on wheat and effect of size and outer surface. Bull. Grain Technol., 13 (3) :144-150
- UNGSUNANTWIWAT, A. & MILLS, R.B. 1985. Influence of rearing medium on size and weight of adults of four *Sitophilus* populations and on weight of host kernels (Coleoptera : Curculionidae). J. stor. Prod. Res. 21 (2) : 89-93
- WALGENBACH, C.A., PHILLIPS, J.K., FAUSTINI, D.L. & BURKHOLDER, W.E., 1983. Male-produced aggregation pheromone of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, and interspecific attraction between three *Sitophilus* species. J. Chem. Ecol., 9 :831-841
- WEST, A.S., HORWOOD, R.H., BOURNS, T.K.R. & HUDSON, A., 1959. Systematics of *Neodyprion* sawflies. I.- Preliminary report on serological and chromatographic studies. Ann. Rept. Entomol. Soc. Ont., :59-65

- WHARTON, G.W., 1963. Equilibrium humidity. *Adv. Acarol.*, 1 : 201-208
- WICKER, C., GUILLAUD, J. & BONNOT, G., 1985. Comparative composition of free, peptide and protein amino acids in symbiotic and aposymbiotic *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). *Insect Biochem.* 15, (4) : 537-541
- WICKER, C. & NARDON, P., 1982. Development responses of symbiotic and aposymbiotic weevils *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera : Curculionidae) to a diet supplemented with aromatic amino acids. *J. Insect Physiol.*, 28 (12) : 1021-1024
- WILLIAMS, J.H. & WILBUR, D.A., 1969. Respiratory environments of grain-infesting weevils. II.- Comparison of respiratory atmospheres produced by laboratory populations of three species of grain weevils. *J. Econ. Entomol.*, 62 (3) : 693-697
- WINSTON, P.W. & BATES, D.H. 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41 : 232-237
- WOOD, E.J., 1978. Propiedades del sistema colinesterásico de la cabeza de *Triatoma infestans* y su relación con la acción insecticida de compuestos organofosforados. Tesis Doctoral, FCEyN, UBA
- WOOD, R.J. & MANI, G.S., 1981. The effective dominance of resistance genes in relation to the evolution of resistance. *Pestic. Sci.* vol.12 : 573-581
- YOSHIDA, T. & TAKUMA, T., 1958. Seasonal fluctuation of the number of the flower visiting rice weevil *Sitophilus oryzae* Linne. *Japan J. Appl. Entomol. Zool.*, 3 : 281-285
- ZETTLER, J.L., 1975. Malathion resistance in strains of *Tribolium castaneum* collected from rice in the USA. *J. stored Prod. Res.*, 11 : 115-117