

## Tesis de Posgrado

# Toxicidad y resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Tribolium castaneum* de la República Argentina

Casadío , Adriana Andrea

1994

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Casadío , Adriana Andrea. (1994). Toxicidad y resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Tribolium castaneum* de la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2641\\_Casadio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2641_Casadio.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Casadío , Adriana Andrea. "Toxicidad y resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Tribolium castaneum* de la República Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2641\\_Casadio.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2641_Casadio.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Tesis  
2641  
Ej.2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Toxicidad y resistencia a insecticidas  
organofosforados en cepas de *Tribolium castaneum* de  
la República Argentina**

Adriana Andrea Casadío

Director: Dr. Eduardo Nicolás Zerba

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

Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Biológicas

Tesis  
2641  
ej.2

**A mis padres**  
**A mi esposo**  
**A mi hijo**

## INDICE

	Pág.
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1.- RESISTENCIA.....	1
1 A.- Definición.....	1
1 B.- Antecedentes históricos de la resistencia .....	1
1 C.- Base genética de la resistencia.....	4
1 D.- Mecanismos bioquímicos y fisiológicos .....	5
1 E.- Impacto ambiental de la resistencia .....	10
2.- INSECTOS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS .....	10
3.- CARCOMA DE LA HARINA, <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst).....	11
3 A.- Sistemática.....	11
3 B.- Distribución y biología.....	11
3 C.- Control.....	12
3 D.- Resistencia.....	13
4.- PROPOSITOS DE ESTE TRABAJO.....	14
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	16
1.- MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
2.- TÉCNICA DE SEXADO .....	16
2 A.- Microscopía electrónica de barrido .....	16
3.- ESTUDIOS POBLACIONALES E INFLUENCIA DEL MEDIO DE CRÍA .....	17
3 A.- Seguimiento poblacional .....	17
4.- MEDICIÓN DE TOXICIDAD.....	18
4 A.- Insecticidas y drogas usados.....	18
4 B.- Determinación de la toxicidad del solvente .....	18
4 C.- Determinación de CL50 por exposición a film .....	18

4 D.- Determinación de CL50 por exposición a alimento tratado .....	19
4 E.- Procesamiento de datos .....	19
<b>5.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD ESTERASICA.....</b>	<b>20</b>
5 A.- Drogas utilizadas.....	20
5 B.- Preparación de homogenatos.....	20
5 C.- Medición por el método de Ellman.....	21
5 D.- Medición por el método de Gomori.....	22
5 E.- Medición de proteínas .....	23
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>24</b>
1.- SEXADO.....	24
2.- ESTUDIOS POBLACIONALES E INFLUENCIA DEL MEDIO DE CRIA .....	29
2 A.- Estudios en la cepa susceptible.....	31
2 B.- Estudios en la cepa resistente .....	39
3.- TOXICIDAD Y RESISTENCIA.....	41
3 A.- Influencia de la alimentación.....	41
3 B.- Influencia del estadio y del método de bioensayo .....	49
3 C.- Resistencia cruzada a fenitrotión .....	51
4.- ACTIVIDAD ESTERASICA.....	51
4 A.- PTA - Esterasas.....	53
4 B.- $\alpha$ - NA Esterasas .....	53
<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
1.- Estudios morfológicos .....	56
2.- Estudios poblacionales.....	56
3.- Estudios toxicológicos.....	56
4.- Estudios bioquímicos.....	57
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

*Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Eduardo N. ZERBA por abrirme las puertas de la investigación entomotoxicológica, por su interés y dedicación en la dirección de la presente tesis y por brindarme todos los medios a su alcance para la concretización de este trabajo.*

Agradezco también:

- A la Dra. María Inés PICOLLO de VILLAR por las constantes enseñanzas en el área entomotoxicológica, por la colaboración en la corrección de este trabajo y por los consejos y el afecto brindado en todo momento.
- A los Dres. Susana ARNSTEIN de LICASTRO, Edgardo WOOD, Norma CASABE de MALKENSON y Andrea FONTAN por la importante colaboración en algunas de las experiencias realizadas.
- A Susana FIGUEREDO de SEGOVIA y Emilia SECCACINI, quienes me transmitieron los conocimientos de la cría de insectos, y a María SEGOVIA de de ARRIBAS por su colaboración en las tareas administrativas. Un agradecimiento especial por su amistad, confianza y apoyo en los momentos más difíciles y en los más lindos que me tocaron vivir.
- A la Lic. Adriana MARTINEZ por la enorme colaboración en la corrección del trabajo y la amistad brindada.
- A mis compañeros del CIPEIN por la colaboración en el manejo de diferentes programas de computación (en orden alfabético): Lic. Raúl ALZOGARAY, Lic. Paola GONZALEZ AUDINO, Lic. Héctor MASUH, Dr. José SIVORI y Lic. Claudia VASSENA.
- Al Dr. Axel BACHMANN por sus opiniones, consejos y por su labor como Consejero de Estudios.

- A la Lic. Estela QUIRAN un agradecimiento muy especial por el enorme y constante apoyo, confianza, estímulo y amistad que supo brindarme desde mis comienzos en la biología, siendo aún estudiante de la licenciatura.
- Al Lic. Julio VES LOSADA por su labor como director de beca y por sus consejos, críticas constructivas y estímulos constantes.
- A todos los compañeros docentes y administrativos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa que de una y otra manera colaboraron en la realización de este trabajo.
- A los Dres. Teodoro STADLER, Adriana FERRERO y Elisa ANGRISANO por sus aportes en el préstamo de material bibliográfico.
- Al Sr. Dante GIMENEZ por las fotografías en el Microscopio Electrónico de Barrido.
- A todo el personal del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) por haberme aceptado e integrado al laboratorio y por la calidez humana que me ofrecieron.
- A mi hermano y mis padres, como así también a mi esposo que siempre me alentaron y confiaron en la concretización de esta tesis.

Deseo agradecer a las siguientes instituciones:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de becas internas con las que pude realizar este trabajo.
- Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA), por el ofrecimiento de sus instalaciones para que éste fuese el lugar de trabajo de la tesis y por la colaboración desinteresada de su personal.
- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA.
- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

# **INTRODUCCION**



## **1.- RESISTENCIA**

### **1 A.- Definición**

El desarrollo y posterior empleo de insecticidas han contribuido de modo muy eficaz a combatir los avances de los insectos plaga, pero al mismo tiempo trajo aparejado dos problemas de difícil solución como son el surgimiento de cepas resistentes y la polución ambiental (Davidson 1974).

Una publicación de la WHO (Anónimo 1957), definió al fenómeno de resistencia como "la capacidad desarrollada en una cepa de insectos para tolerar dosis de tóxicos que pueden provocar la muerte a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie".

La presencia de sustancias químicas estables y persistentes constituye una influencia selectiva para matar a los individuos que no poseen las propiedades genéticas adecuadas permitiendo que los que sí las poseen sobrevivan y las transfieran a su descendencia (Davidson 1974).

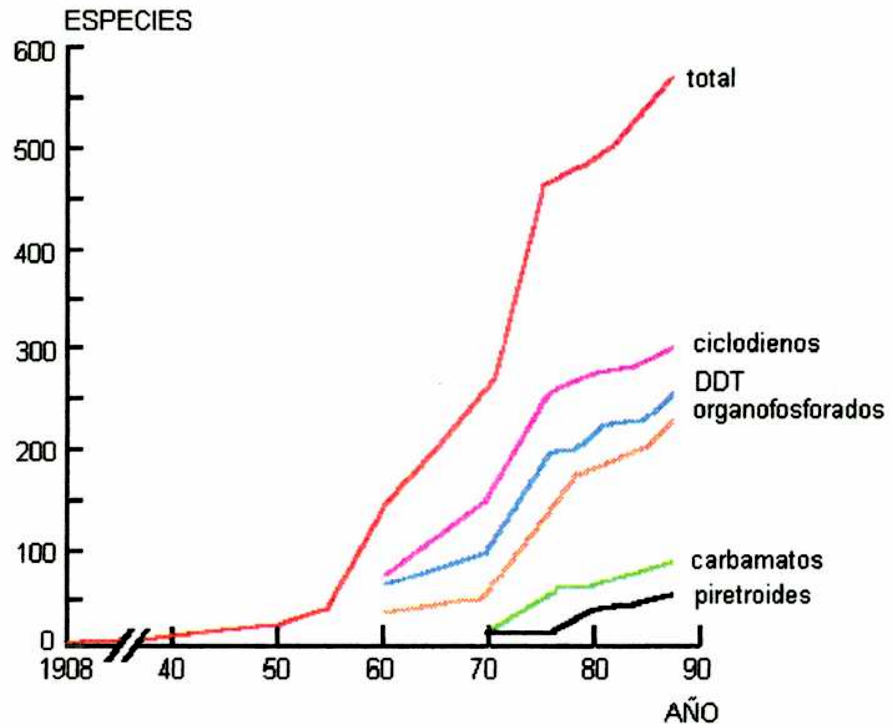
### **1 B.- Antecedentes históricos de la resistencia**

En 1908, Melander detectó el primer caso de resistencia a un pesticida, el polisulfuro de calcio, en cochinillas de San José. Aunque lo publicó recién en 1914, no fue sino hasta fines de la década del 40 cuando comienza a ser considerado un serio problema (Georghiou 1982). Desde 1946 se ha detectado este fenómeno en más de 500 especies de artrópodos; este incremento está íntimamente asociado al desarrollo y uso de los insecticidas sintéticos (Fig. 1).

Aunque la capacidad de desarrollar resistencia a sustancias químicas es universal, los compuestos usados como insecticidas han llegado más allá de las especies blanco y han desarrollado resistencia en organismos tales como bacterias y aún mamíferos (Georghiou and Mellon 1983).

El mayor número de insectos resistentes (153 especies) se encuentra en el Orden Diptera (Georghiou 1982).

La resistencia está estrechamente ligada al problema del control efectivo de estas cepas de insectos plaga; en algunos casos es posible encontrar una solución pero otras veces, ciertas cepas pueden tener éxito y desarrollar otro



**Fig. 1.** - Número total de especies de artrópodos resistentes a por lo menos un tipo de insecticida, y especies resistentes a cada una de las 5 clases principales de insecticidas (Takada, 1992).

tipo de resistencia. De esta manera, las perspectivas optimistas del control químico en sus comienzos, se han ido diluyendo, para hacer hincapié en el manejo integrado con el objeto de evitar o retardar el desarrollo de resistencia (Oppenoorth 1985).

Para implementar programas y estrategias de control existen obstáculos tales como la dificultad de predecir si se desarrollará resistencia en ciertas especies, con qué alcance y en cuánto tiempo (Oppenoorth 1985).

Con el advenimiento de los insecticidas de tercera generación, muchos entomólogos predijeron que no posibilitarían el desarrollo de resistencia. Sin embargo, Dyte en 1972 encontró que algunas cepas resistentes a insecticidas cruzaban con hormonas juveniles; y Cerf y Georghiou (1974) informaron el mismo fenómeno a mímicos de estas hormonas. Posteriormente se encontraron que varias especies de *Culex*, *Musca domestica* y *Tribolium confusum* desarrollaron resistencia después de que varias generaciones fueran presionadas con metoprene (Tabla 1).

Tabla 1.- Inducción de resistencia a metoprene en algunas especies de insectos.

ESPECIE	NUMERO GENERACIONES PRESIONADAS	FACTOR DE RESISTENCIA
<i>Culex pipiens</i>	40	86
<i>Culex tarsalis</i>	62	218
<i>Culex quinquefasciatus</i>	20	0
<i>Musca domestica</i>	62	2000
<i>Tribolium castaneum</i>	11	4

Adaptado de "Pest Resistance to Pesticides". Georghiou y Saito, 1993.

Los llamados "insecticidas biológicos" tampoco se apartan del fenómeno de resistencia. La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) produce proteínas cristalinas durante su esporulación que son tóxicos específicos sobre insectos plaga. Muchas de las cepas de Bt aisladas son utilizadas en control de estadios larvales de lepidópteros y en algunas se han obtenido altos grados de resistencia (Tabla 2).

En la actualidad las feromonas se están usando como alternativa de control, si bien su uso está circunscripto a trampas para monitoreo poblacional y a la confusión en la búsqueda sexual como táctica de control. Si bien aún no se han

detectado casos de resistencia debido a la alta especificidad y a su uso limitado, se han sugerido como potenciales mecanismos de resistencia a cambios en la composición molecular de las feromonas, el desarrollo de cepas partenogénicas o la utilización de otras claves como la localización visual (Zerba 1992).

**Tabla 2.- Resistencia de *Plutella xylostella* a las toxinas de *Bacillus thuringiensis*.**

COLONIA	CL 50 (mg/l)	FACTOR DE RESISTENCIA
LAB-P	2.3	1
NO-P	980	430
NO-Q	1900	820
NO-R	430	190

Adaptado de Tabashnik et al (1991).

### **1 C.- Base genética de la resistencia**

La resistencia a insecticidas constituye una evidencia más en favor de la teoría evolutiva postulada por Darwin, ya que los insecticidas a los que se exponen los organismos actúan como una fuerza selectiva, concentrando los factores genéticos que confieren resistencia y que están presentes en la población (Plapp y Wang 1983).

Los genes resistentes en una población de insectos son alelos mutantes de genes susceptibles normales. La población normalmente contiene dos tipos genéticos: homocigota para los alelos susceptibles (S/S) y heterocigota conteniendo ambos alelos (R/S). Una eficiente selección tendrá como consecuencia el incremento de la proporción de alelos resistentes de una población.

La velocidad del desarrollo de genotipos resistentes depende de la intensidad de selección, del número de generaciones por año y de la aislación de la población tratada con respecto de las poblaciones no tratadas.

En general los mecanismos de resistencia dependen de factores genéticos simples, pero debido a que las especies han sufrido una selección continua con una serie de insecticidas han acumulado varios genes y mecanismos de

resistencia. A este fenómeno se le dio el nombre de **resistencia múltiple** (Oppenoorth 1985).

Un gen R seleccionado a partir de la aplicación de un insecticida particular, puede conferir resistencia a otros insecticidas no relacionados químicamente, dando origen a la denominada **resistencia cruzada**. Este fenómeno es debido a similares modos de acción de los compuestos (Oppenoorth 1985).

Raramente ocurren casos de **resistencia negativamente correlacionada**, en el cual la resistencia a un insecticida se correlaciona con el aumento de la susceptibilidad a otro (Oppenoorth 1985).

### **1 D.- Mecanismos bioquímicos y fisiológicos**

En un dado ecosistema, una cierta concentración de insecticida inducirá una respuesta definida en poblaciones de algunos animales o vegetales, pero no en otros. La diferencia en respuesta entre dos especies es una medida de la selectividad de la acción insecticida. Pueden reconocerse factores tales como diferencias en la exposición o en el comportamiento, o bien diferencias en la sensibilidad fisiológica después del contacto del organismo con el insecticida; Ripper et al. (1951) definieron a las primeras como "selectividad ecológica" y a las segundas como "selectividad fisiológica".

Winteringham y Barnes (1955) indicaron que el insecticida ideal debería ser altamente tóxico para el insecto plaga pero bastante inocuo para otras formas de vida con las cuales entran en contacto, de manera que existiera una máxima selectividad fisiológica.

Un dado mecanismo de resistencia afecta a todos los insecticidas de una familia, actuando sobre una entidad bioquímica similar a pesar de las diferencias fisiológicas de las partes del sistema nervioso que es afectado. Los mecanismos bioquímicos y fisiológicos son los más frecuentes y los que confluyen mayor grado de resistencia. Los primeros se relacionan a alteraciones del sitio de acción o a detoxificación incrementada; los segundos se refieren a la velocidad de penetración del insecticida o a una mayor capacidad de almacenar y/o excretar el compuesto sin metabolizar.

El efecto final será, entonces, función de la proporción de moléculas tóxicas que lleguen al sitio de acción y esta proporción será el resultado neto de los procesos de penetración, detoxificación, activación, almacenaje inerte y excreción.

### Alteraciones del sitio de acción

En la transmisión del impulso nervioso en mamíferos e insectos es de fundamental importancia la intervención de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) cuya función es hidrolizar la acetilcolina (ACh) para interrumpir el estímulo nervioso. Los insecticidas organofosforados y carbamatos son anticolinesterásicos y ejercen su acción tóxica inhibiendo la AChE, alterando de esta manera la transmisión nerviosa normal. Las especies resistentes a causa de AChE alterada poseen menor velocidad de reacción con inhibidores demostrando la reducción de la sensibilidad de la enzima. El primer caso documentado de resistencia como consecuencia de una disminución en la sensibilidad de AChE por inhibición con organofosforados fue provista por Smissaert (1964) en *Tetranychus urticae*. Posteriormente se hallaron otras especies con las mismas características, entre otras, la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* y la chinche del arroz *Nephotettix cincticeps*.

Asimismo en dos cepas de mosquitos *Anopheles albimanus*, Ayad y Georghiou (1975) encontraron disminución de la sensibilidad inhibiendo con paraoxón y propoxur.

Debido a que el fenómeno de resistencia puede estar vinculado a otros factores tales como penetración del insecticida, degradación dentro del organismo y absorción, no debe esperarse que el grado de resistencia y la insensibilidad de la enzima sean directamente proporcionales (Ferrero 1988).

El DDT y los piretroides actúan sobre los canales iónicos de la membrana nerviosa, dejándola permanentemente excitada. Las cepas de insectos resistentes a estos insecticidas poseen un gen llamado *kdr* (knock down resistance) que hace menos vulnerable este sitio de acción y por lo tanto no alteran la función nerviosa. Asimismo, existen cepas de moscas con diferentes grados de resistencia debido al *kdr*. En una cepa danesa presionada con piretroides se encontró un factor que se comporta igual que un *kdr* (es decir, recesivo, ubicado en el cromosoma 3, con resistencia cruzada a DDT) que causó un grado de resistencia mucho mayor (Fig. 2). A este factor se le llamó *super-kdr* y es un alelo del primero (Oppenoorth 1985). Estas cepas soportan dosis de insecticidas mucho mayores o períodos de exposición más prolongados. Este mecanismo no confiere resistencia a ciclodienos, carbamatos ni fosforados.

Takada (1992) encontró en *Musca domestica* que la resistencia a piretroides con la mitad 3-fenoxibenzilalcohol estaba asociada al factor *kdr* con una contribución mayor que 100 y que la contribución a los piretroides con alcohol alifático o ciclopentenolona fue menor que 30. No ocurre lo mismo con la

mitad ácida, por lo tanto se piensa que el grado de resistencia por *kdr* es dependiente de la mitad alcohol del piretroide.

Un mecanismo similar al descrito opera en insectos resistentes a ciclodienos y  $\gamma$  - hexaclorociclohexano pero de mayor difusión entre las especies ya que se lo ha hallado en por lo menos 9 especies de mosquitos, 9 de otros artrópodos como por ejemplo en los ácaros *Boophilus microplus* y *Rhipicephalus appendiculatus*.

### **Detoxificación incrementada**

El metabolismo de xenobióticos conduce en general a compuestos menos tóxicos (metabolismo detoxificante), pero algunas veces los metabolitos producidos son más tóxicos que el compuesto que les dio origen (metabolismo activante).

La detoxificación es la capacidad que poseen los organismos para metabolizar compuestos y hacerlos más inocuos. Existen muchos casos entre los insectos con esta capacidad aumentada, la cual les confiere un mecanismo de resistencia.

Este mecanismo es muy similar entre insectos y vertebrados, pero por lo general es más activo en animales más evolucionados favoreciendo la toxicidad selectiva entre insectos y mamíferos. No obstante, los insectos pueden superar con facilidad esta capacidad de los vertebrados como resultado de una presión continua con productos químicos.

Las principales enzimas responsables del metabolismo degradante de los insecticidas neurotóxicos en insectos son: esterasas, oxidasas y transferasas.

**Esterasas:** han sido consideradas de gran importancia en el desarrollo de resistencia a insecticidas fosforados, juegan un pequeño rol en piretroides y prácticamente ninguno en carbamatos. El ataque por esterasas conduce a productos menos tóxicos y más hidrosolubles y por lo tanto más fáciles de excretar.

Según el grupo químico que hidrolizan, se pueden diferenciar dos tipos de enzimas: carboxiesterasas y fosfortriesterasas. En muchos casos de resistencia a malatión, las carboxiesterasas actúan más eficientemente sobre la molécula. Estas enzimas pueden ser bloqueadas por inhibidores como el TPP (trifenilfosfato) que en este caso actuaría como sinergista incrementando la acción tóxica del malatión.

**Oxidasas de función mixta (MFO) :** Poseen un amplio rango de sustratos y cumplen una función importante degradando casi todas las familias de insecticidas a través de un aumento en la actividad. Están asociadas a la

fracción microsomal de las células e interfieren sobre el citocromo P450 requiriendo de NADPH y oxígeno para llevar a cabo las biotransformaciones oxidativas (Ferrero 1988).

Las MFO están localizadas en intestino medio y cuerpo graso, y son fundamentalmente activas durante los estadios larvales (Georghiou 1986).

**Transferasas:** son importantes únicamente en la detoxificación de insecticidas organofosforados, pero debido a la carencia de inhibidores específicos, no se ha podido determinar el grado de resistencia causado por esta vía metabólica.

Con la intervención catalizadora de las enzimas glutatión - S - transferasas, un xenobiótico se conjuga con el glutatión reducido (GSH) con el objeto de hacerlo polar y por lo tanto hidrosoluble y fácilmente excretable. Las enzimas actúan transfiriendo el grupo arilo o alquilo del fosforado al sulfuro del glutatión reducido.

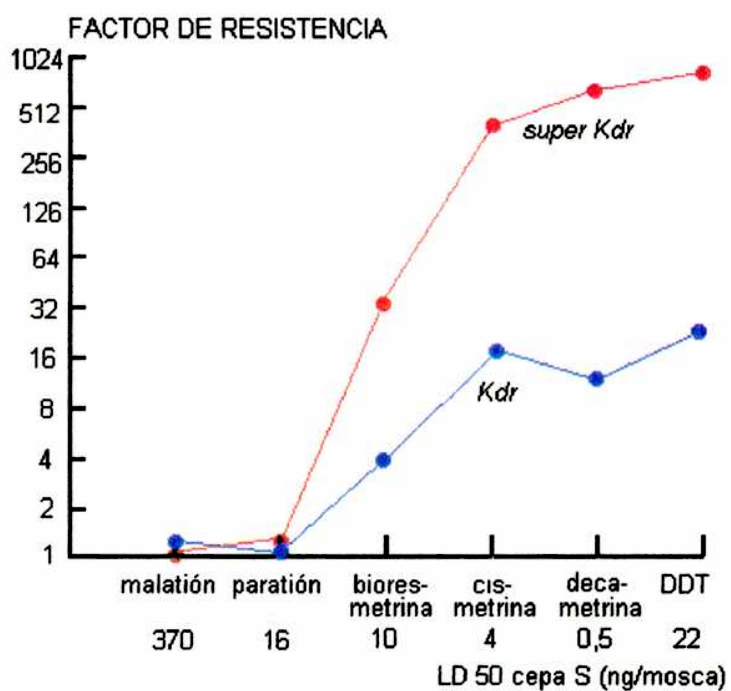
Asimismo, pueden tener un rol, aunque de menor importancia, en compuestos como lindane.

#### **Otros mecanismos de resistencia:**

Además de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos existen los denominados comportamentales; son aquellos que producen cambios en el comportamiento de los insectos alterando el contacto de los mismos con los residuos del tóxico y se relacionan también a preferencias huésped-hábitat.

En la mayoría de los casos estudiados, este tipo de resistencia se da en especies hiperactivas donde pequeños cambios en cualquiera de las etapas del comportamiento provocan cambios en la interacción entre el insecto y el insecticida. Según la familia de insecticidas, se ha detectado que el mayor porcentaje de resistencia ocurre hacia el DDT y piretroides que poseen mayor capacidad repelente o irritante (Picollo 1992).





**Fig. 2.-** Grado de resistencia a tres piretroides y al DDT en moscas con el gen *kdr* y *super-kdr*. Se muestra la correlación negativa con los organofosforados (Oppenoorth, 1985).

## **1 E.- Impacto ambiental de la resistencia**

Así como los insecticidas provocan un impacto sobre el ecosistema, el surgimiento de cepas de insectos resistentes también causa, directa o indirectamente, alteraciones en el medio ambiente. Estos cambios se manifiestan cuando comienzan a ser ineficientes las dosis del compuesto que habitualmente se emplean para controlar la plaga en el campo y por lo tanto se hace necesario aumentar las dosis o usar nuevos compuestos insecticidas (en lo posible uno con diferente modo de acción). Es factible también complementar con otras tácticas no químicas dentro del marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Si bien los insecticidas están dirigidos a las poblaciones de especies plagas, sus enemigos naturales y aquellas especies no plagas también se ven afectadas por el tóxico y van camino de adquirir resistencia.

No obstante, un cierto grado de resistencia en parasitoides y predadores es conveniente para que no se vea perjudicado su accionar contra insectos plaga cuando éstos son controlados químicamente. Este es un aspecto interesante y que debe considerarse en los proyectos de manejo integrado de plagas.

## **2.- INSECTOS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS**

Los insectos que se alimentan de los granos, harinas y otros productos almacenados, pueden ser clasificados, según el momento del ataque, en plagas de infestación primaria y de infestación secundaria. Los primeros provocan el picado del grano cuando aún está entero; los segundos atacan preferentemente a los productos molidos o a los granos dañados por los insectos de infestación primaria. Entre los coleópteros de infestación primaria se encuentran los gorgojos del maíz (*Sitophilus zeamais*), del arroz (*S.oryzae*), brucho (*Acanthoscelides obtectos*), y entre los lepidópteros, la palomita de los cereales (*Sitotroga cerealella*). Los coleópteros de infestación secundaria hallados frecuentemente son la carcoma dentada (*Oryzaephilus surinamensis*), la carcoma achatada (*Cryptolestes* sp), el carcoma (*Tribolium* sp.) (Lopez Avila 1985) y las polillas de la fruta seca (*Plodia interpunctella*) y de la harina (*Anagasta kiehniella*).

### 3.- CARCOMA DE LA HARINA , *Tribolium castaneum* (Herbst)

El adulto tiene 2.6 - 4.4 mm de largo y es de color castaño rojizo. Tiene los tres últimos segmentos de las antenas, ensanchados abruptamente y ventralmente la distancia que separa los ojos es aproximadamente igual al ancho de cada ojo. Estas son las principales características que se usan para diferenciarlo del *T. confusum*.

Tanto las larvas como los adultos generalmente permanecen enterrados en el medio de cría y ambos son negativamente fototrópicos. Asimismo ambos estadios recurren al canibalismo cuando el alimento les es insuficiente (Pajni y Virk 1982).

#### 3 A.- Sistemática

La ubicación taxonómica es la siguiente:

Orden Coleoptera

Suborden Poliphaga

Familia Tenebrionidae

Género *Tribolium*

Especie *Tribolium castaneum* (Herbst)

Tiene varios nombres vulgares según la región o país:

- "gusano rojo de la harina" - República Dominicana
- "gusano de la harina" - Sudamérica
- "escarabajo rojo de la harina" - Sudamérica
- "gorgojo castaño de la harina" - Chile
- "falso gorgojo de la harina" - Chile
- "carcoma" - Argentina
- "red flour beetle" - Países de habla inglesa

#### 3 B.- Distribución y biología

El *Tribolium castaneum* es una plaga muy importante en los inolinos harineros, pero también su aparición es frecuente en granos almacenados como plaga de infestación secundaria, después del ataque primario por parte de otros insectos como *Sitophilus* sp.

Morfológica y biológicamente es muy similar a *Tribolium confusum*. Ambas especies, por sus hábitos alimenticios, entre otras características, son

cosmopolitas, aunque el *T.confusum* es más abundante en la parte norte de EEUU, mientras que el *T.castaneum* no se encuentra más al norte del paralelo 41. La India se considera como probable lugar de origen de esta especie.

Son insectos muy activos; en condiciones naturales pasa el invierno en estado adulto y se estima que viven entre 1 y 3 años, durante cuyo tiempo la hembra puede depositar alrededor de 1000 huevos. Estos son muy pequeños, de color blanco y pegajosos por lo cual se le adhieren partículas del medio y se hace difícil la observación.

El período de incubación varía entre 5 y 12 días al cabo del cual emergen pequeñas larvas alargadas y subcilíndricas que alcanzan el desarrollo completo en un lapso que va de 1 a 4 meses, pasando por 6 estadios, hasta alcanzar 6 mm de longitud. El tiempo de desarrollo varía según la temperatura y clase de alimento que dispongan (Metcalf y Flint 1980). Se transforman en pupas blancas permaneciendo como tal 1 ó 2 semanas. En buenas condiciones, una generación completa tarda aproximadamente de 3 a 4 meses.

Estudios sobre algunas características biológicas de *T.castaneum* realizados por Pajni y Virk, (1982) determinaron que el período de preoviposición varía de 3 a 5 días, si bien los machos y hembras ya fueron capaces de copular dos días después de la emergencia, y lo hacían durante 0.5 a 2 minutos. Asimismo determinaron que el número de huevos puestos por hembra y por día varía de 1 a 12 y la longevidad de los adultos superó los 180 días, siendo la mortalidad natural de los estadios inmaduros de 20-26 % en condiciones óptimas

En laboratorio, con medio de cría artificial constituido por una mezcla de harina:levadura (12:1) y temperatura constante a 30 °C, se encontró que el máximo de emergencia de adultos ocurre entre los días 26 a 30 (Anónimo 1974).

### **3 C.- Control**

La lucha contra las principales plagas de granos y productos derivados almacenados, entre los que se incluye al *Tribolium castaneum*, debe comenzar con una limpieza que consiste en el barrido y destrucción de residuos, previo a la aplicación de productos químicos. Para un control exitoso deberían hacerse tres tipos de tratamientos:

1- Tratamientos exteriores: se realizan después de la limpieza y con anterioridad al almacenamiento; se emplean pirimifosmetilo, DDVP y piretroides. El objetivo de este tratamiento es evitar la propagación de insectos.

2- Tratamientos preventivos: se utilizan cuando el producto carece del ataque de insectos y ácaros. Los insecticidas protectores más comúnmente utilizados son malatión y el piretroide deltametrina sinergizado con butóxido de piperonilo. Deben poseer un poder residual mínimo de seis meses y no deben transmitir ni olor ni sabor desagradables a los productos.

3- Tratamientos curativos: los insecticidas más comúnmente usados son fumigantes como el bromuro de metilo y fosfina (generada por fosfuro de aluminio) y son necesarios cuando se detecta la infestación de los productos ya almacenados (Serantes y Haro 1980).

### 3 D.- Resistencia

Los primeros hallazgos de cepas resistentes, lo fueron a lindane, ya que este fue el primer insecticida sintético utilizado para el control de plagas de granos almacenados. A raíz del surgimiento de este fenómeno y debido a la restricción del uso de compuestos clorados, este insecticida comenzó a ser reemplazado por organofosforados y principalmente por malatión, por demostrar ser muy eficaz y de baja toxicidad en mamíferos. No obstante pronto comenzó a ser un problema ya que en 1961 se informaba el primer caso de resistencia a malatión en plagas de granos almacenados en Nigeria (Parkin 1965).

Los primeros monitoreos de resistencia comenzaron dos años más tarde en EEUU, encontrándose varios casos de resistencia en *Tribolium castaneum*.

Así comenzaron a hacerse estudios sobre el tipo de resistencia que poseían las cepas surgidas bajo presión con insecticidas. Se encontraron y describieron dos tipos: uno era específico para malatión y fue hallado por Parkin (1965) en una cepa nigeriana y la causa fundamental fue la actividad de las carboxiesterasas.

El segundo tipo de resistencia se encontró en una cepa australiana y era causada por alta actividad de oxidasas de función mixta y por lo tanto no específica a malatión (Noiman y Wool 1982) (Ferrero 1988).

En la actualidad, el fenómeno de resistencia en *Tribolium castaneum* se ha extendido a otros insecticidas organofosforados (Dyte y Blackman 1972), a piretroides (LLOYD y Ruczkowski 1980), a fosfina (Kem 1979).

En Pakistán, se han detectado fenómenos de resistencia a malatión en adultos y en larvas de *T. castaneum*, alcanzando grados de resistencia tan elevados como 56 veces para adultos y 40 veces en larvas de sexto estadio comparando con los parámetros obtenidos en la cepa susceptible (Saleem y Shakoori 1989).

Asimismo se encontró en laboratorio que una cepa resistente a fosforados por actividad de las MFO, también poseía alto nivel de resistencia a varios análogos de hormona juvenil (Picollo 1992; Brown et al. 1978).

#### **4.- PROPOSITOS DE ESTE TRABAJO**

Este trabajo de tesis fue realizado sobre el *Tribolium castaneum* (Herbst), que si bien es una especie cosmopolita, representa uno de los insectos plaga de mayor importancia económica de la Argentina (Dosio y Padín 1979).

El principal objetivo del trabajo se centró en obtener una mejor caracterización del fenómeno de resistencia al insecticida malatión que esta especie ha desarrollado en nuestro país y que ha sido motivo de estudios previos de nuestro laboratorio (Picollo de Villar et al. 1985), (Ferrero 1988), (Ferrero et al. 1991). Esta caracterización se ha centrado en estudios comparativos entre una cepa susceptible (S) y una resistente (R), de la biología, bioquímica, morfología y bioensayo del efecto insecticida. Los estudios biológicos comparativos incluyeron duración de los diferentes estadios, tiempo total de desarrollo (de larva a adulto), número de camadas y número de descendientes que llegan a adultos en la primera camada en colonias criadas sobre distintos tipos de alimentos.

Estos estudios se realizaron a los fines de observar posibles diferencias en el potencial biológico de la plaga entre ambas cepas (R y S) y con respecto a las fuentes alimenticias de las mismas.

Los estudios bioquímicos consistieron en la determinación comparativa de esterases con distintos sustratos en ambas cepas. Las actividades esterásicas en ambas cepas se obtuvieron como indicadores bioquímicos causales del fenómeno de resistencia y como eventuales trazadores del mismo.

Los estudios morfológicos bajo lupa y por microscopía electrónica de barrido apuntaron a establecer diferencias entre adultos y pupas de ambos sexos para normalizar el sexado previo al bioensayo de insecticidas y para intentar verificar posibles variaciones de morfología externa entre individuos S y R.

Respecto a los estudios que involucran bioensayo, los mismos tuvieron como objetivo establecer el grado de dependencia de la medición cuantitativa de resistencia con la alimentación del insecto plaga y el método de evaluación de toxicidad.

En resumen, este trabajo realiza un aporte al conocimiento del fenómeno de resistencia al malatión en *T.castaneum* y de los factores exógenos, como el medio de cultivo, y endógenos como las esterases que lo modulan.

Creemos necesario destacar que el fenómeno descrito y estudiado en este trabajo es un real problema de nuestro país, ya que el *T.castaneum* es una plaga de importancia económica que afecta la exportación de nuestros cereales y la resistencia al malatión está perjudicando seriamente su control.

# **MATERIALES Y METODOS**



## **1.- MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizaron dos cepas de *Tribolium castaneum* (Herbst), una susceptible y otra resistente a malatión y a insecticidas piretroides, denominada MD y que pertenece a una colonia criada y mantenida en el laboratorio del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN). Los insectos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 3$  °C) y humedad relativa ( $75 \pm 5\%$ ). Para la cría se utilizan recipientes de vidrio de boca ancha con tapa de malla metálica.

Larvas de sexto estadio y adultos de 3 a 4 semanas de edad provenientes de los diferentes medios de cría (ver 3 de Materiales y Métodos) fueron empleados en los ensayos de toxicidad de insecticidas .

## **2.- TECNICA DE SEXADO**

Como en la mayoría de los coleópteros, en los adultos de *T.castaneum* es difícil, sino imposible la identificación del sexo, ya que carecen de caracteres sexuales secundarios. No obstante, en el estadio pupal existen estructuras con diferencias morfológicas, observables con microscopio estereoscópico, en la parte ventral y posterior del abdomen que pueden ser utilizadas para separar machos de hembras. Adultos de ambos sexos separados durante el estadio pupal y pupas fueron observados bajo microscopio electrónico de barrido (SEM).

### **2 A.- Microscopía electrónica de barrido**

Se utilizaron ejemplares en estadio pupal y adultos de las cepas susceptible y resistente; los adultos fueron previamente separados por sexo en estado de pupa y bajo microscopio estereoscópico, y mantenidos en frascos diferentes en su medio de cría hasta que llegaran a imago.

Los insectos separados para la observación en SEM fueron preparadas de la siguiente manera: se pasaron por agua destilada para sacarles las partículas adheridas, propias del medio de cría, luego se fijaron en alcohol 70 % durante 48 horas y por último se extrajeron del líquido y una vez secos fueron montados en la platina para ser metalizados con oro-paladio.

### **3.- ESTUDIOS POBLACIONALES E INFLUENCIA DEL MEDIO DE CRÍA**

A los fines de estudiar la influencia del medio de cría sobre la evolución poblacional de las cepas susceptible y resistente de *T.castaneum*, se llevaron a cabo dos estudios paralelos en las cepas susceptible y resistente: en uno de ellos se colocaron en 7 gramos de alimento, 5 hembras y 5 machos de 5 días de edad cuyo sexo se determinó durante el estadio pupal (ver punto 2 de Materiales y Métodos). El segundo estudio consistió en colocar en 10 gramos de medio, 1 macho y 2 hembras; ambos estudios se hicieron por duplicado. En todos los casos los recipientes utilizados fueron de vidrio y de 30 ml de capacidad, tapados con tela de gasa para facilitar el intercambio gaseoso.

Los insectos fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ( $25 \pm 3$  °C y  $75 \pm 5\%$  de HR) en los siguientes medios de cultivo: trigo (*Triticum aestivum* L.), tricepiro, centeno (*Secale cereale* L.) y una dieta constituida por harina, levadura de cerveza y fécula de maíz (HLF). El tricepiro es un cereal proveniente de cruzamientos entre trigo, centeno y agropiro (*Agropyron* Gaertn.); el alimento HLF fue utilizado como medio de cultivo control y las proporciones de la mezcla fueron 10:1.5:10 (Bry y Davis 1985). La harina utilizada fue de trigo tipo 0000 y la levadura seca de cerveza de la marca Virgen (CALSA).

#### **3 A.- Seguimiento poblacional**

Para el seguimiento poblacional, los adultos padres fueron retirados del medio cada 15 - 20 días y pasados a nuevos recipientes con alimento fresco, dejando al primero como material para que completen el desarrollo los huevos y larvas dejados por ellos. El número de larvas en desarrollo de cada dieta se tomó a partir de una muestra de 1.2 gramos de medio y se les midió la longitud. Los adultos padres encontrados muertos fueron separados y guardados en alcohol 70% para determinar el sexo.

A medida que los adultos de la primera generación (F1) emergían en la muestra, se contaban y se retiraban para evitar que sigan desovando; el mismo procedimiento se siguió con los adultos surgidos de todo el medio.

## **4.- MEDICION DE TOXICIDAD**

### **4 A.- Insecticidas y drogas usados**

Una de las sustancias insecticidas utilizadas para la evaluación de toxicidad de los insectos fueron el malatión con 98.8% de pureza por CGL (identificado en el laboratorio como 4069, nº 1) provenientes de los laboratorios P.CASSARA y fenitrotión 96% de pureza (S.A.NDO S.A.I.C.I.I.F.) . Se hicieron dos tipos de soluciones; en una el solvente acetona (MERCK) se utilizó en la solución madre y en las sucesivas diluciones realizadas a partir de ésta. En la segunda, la solución madre se hizo con una mezcla en proporciones iguales de aceite de oliva calidad extra tipo I (marca TITTARELLI) y las siguientes diluciones con una mezcla de éter de petróleo (SINTORGAN) y acetona (MERCK) (3:1). La misma metodología se siguió en la preparación de las soluciones de fenitrotión.

### **4 B.- Determinación de la toxicidad del solvente**

Para determinar el grado de toxicidad de la acetona, uno de los solventes utilizados en las diluciones, se topicaron en las superficies ventrales de los abdómenes de insectos adultos con jeringa Hamilton provista de microaplicador. Las dosis administradas estuvieron dentro del rango de 0.2 y 2.4 µl, y el registro de mortalidad se realizó durante 96 horas.

Hasta la máxima dosis de acetona ensayada no se observó ni mortalidad ni ningún tipo de síntoma de intoxicación en los insectos tratados.

### **4 C.- Determinación de CL50 por exposición a film**

Se llevaron a cabo ensayos de toxicidad de malatión y fenitrotión en larvas de último estadio y adultos de *Tribolium castaneum* de las cepas susceptible y resistente expuestos a residuos del insecticida en papel de filtro Whatman nº 1 de 7 cm de diámetro, impregnados con 0.5 ml de la solución del tóxico utilizando pipetas de ese volumen; para que la distribución sea uniforme, la aplicación se hizo con un movimiento en espiral sobre el papel (Anónimo 1974). La solución madre se realizó con una mezcla de aceite de oliva y acetona en iguales proporciones, y las restantes se hicieron con la mezcla de 3 partes de éter de petróleo y 1 parte de acetona (Rajak et al. 1973). Luego de dejar evaporar el solvente durante 24 horas, se colocaron aros de vidrio

pulimentados de 5 cm de diámetro. En estos anillos se confinaron los insectos, previamente ayunados 24 horas, para su exposición durante 20 horas. A posteriori, los insectos se pasaron a vasos plásticos descartables conteniendo 3 gramos del alimento de donde habían sido extraídos para el tratamiento; permanecieron allí hasta la finalización del mismo. La mortalidad se registró al cabo de 48 horas.

#### **4 D.- Determinación de CL50 por exposición a alimento tratado**

Los mismos alimentos en los que se desarrollaron los ejemplares de *T. castaneum*, fueron impregnados con diferentes concentraciones de malatión. Se utilizaron dos metodologías: en una se emplearon las soluciones aceitosas preparadas de igual manera que aquellas del film en papel y en la otra se prepararon soluciones acetónicas. En ambos casos se pesaron, en una caja de Petri de 3 cm de diámetro, 3 gramos del medio y se impregnaron con 1 mililitro de la solución, permaneciendo allí durante 24 horas para la evaporación de los solventes. Posteriormente se pasaron a vasos plásticos junto con los insectos, los cuales poseían 24 horas de ayuno; a las 20 horas de exposición se retiraron del alimento tratado y se colocaron en nuevos vasos con alimento no contaminado durante 24 horas más cuando se evaluó el efecto en adultos y 48 horas en el caso de larvas. La mortalidad de adultos se registró a las 48 horas y la de larvas a las 72 horas. Estos períodos de tiempo fueron suficientes para que la mortalidad se estabilice; para ambos estadios se tomó como criterio de muerte la inmovilidad aún después de una estimulación táctil en la parte posterior del cuerpo.

#### **4 E.- Procesamiento de datos**

Mediante un "soft" para computadora basado en el método de Litchfield y Wilcoxon (1949) y desarrollado en el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) se obtuvo el parámetro estadístico Concentración Letal 50 (CL50). Dicho programa requiere el ingreso de los datos de número de individuos tratados, dosis o concentraciones del tóxico utilizadas, número de individuos muertos en cada nivel de concentración y porcentaje de mortalidad en controles si lo hubiere. Los valores se expresaron en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  o  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Obtenidos los valores de CL50 de las cepas susceptible y resistente, se determinaron los factores de resistencia haciendo:

$$\text{Grado o Factor de Resistencia} = \frac{\text{CL50 Cepa Resistente}}{\text{CL50 Cepa Susceptible}}$$

Para establecer el nivel de significancia de los valores de CL50 obtenidos, se utilizó la prueba de potencia (Rano et al. 1976).

## 5.- MEDICION DE ACTIVIDAD ESTERASICA

### 5 A.- Drogas utilizadas

Los reactivos empleados en la determinación de actividad esterásica por el método cinético de Ellman fueron:

Feniltioacetato (PTA) (Aldrich) 20 mM en etanol (MERCK);

5,5' Ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (ALDRICH) en buffer 0.2M, pH 7.2;

Eserina hemisulfato  $10^{-4}$  M (SIGMA);

Los siguientes reactivos fueron utilizados en la determinación de actividad de esterases por el método fotométrico de Gomori:

$\alpha$  - Naftilacetato ( $\alpha$  - NA) (SIGMA) en acetona (MERCK);

Eserina  $10^{-4}$  M (SIGMA).

Fast Blue B (SIGMA);

Lauril sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) en buffer 0.2M, pH 7.2.

### 5 B.- Preparación de homogenatos

Para la medición de actividad esterásica por el método de Ellman se homogeneizaron 20 adultos descabezados (para que el pigmento ocular no interfiera en la medición por espectrofotometría) de 3 - 4 semanas de edad, criados en los 4 medios de cultivo (tricepiro, harina, centeno y trigo) y 10 larvas de último estadio. Los homogenatos se hicieron en un mililitro de buffer fosfato de pH 7.2 y 0.2 M en baño frío.

Los homogenatos de adultos, se filtraron con lana de vidrio para retener los restos de cutícula y se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 RPM y a 0 °C con centrífuga refrigerada Tomy Seiko modelo RS-18 III. La centrifugación del homogenato sólo se empleó para la medición de la actividad esterásica por el método de Ellman.

Para la medición de la actividad enzimática en larvas, los homogenatos se filtraron con lana de vidrio pero no fue necesario centrifugarlos debido a la baja coloración y turbidez.

Con los homogenatos crudos se prepararon diluciones de 1:100 en buffer, llegando de este modo a la proporción de 0.2 insecto/ml para adultos y 0.1 insecto/ml en los preparados de larvas.

Estos preparados se hicieron con un homogeneizador GLAS - COL modelo 099C K4424, con vástago de teflón.

### 5 C.- Medición por el método de Ellman

Los homogenatos centrifugados de adultos de 3 - 4 semanas de edad y no centrifugados de larvas de 6 mm de longitud de ambas cepas y provenientes de los diferentes medios alimenticios se utilizaron para la medición de actividad de esterasas por el método cinético de Ellman.

El reactivo de Ellman se preparó con 10 mg de DTNB en 100 ml de buffer 0.2 M y pH 7.2; como sustrato se utilizaron 30.4 mg de feniltioacetato (PTA) en 10 ml de etanol absoluto; y como inhibidor se utilizó eserina hemisulfato  $10^{-4}$  M.

La incubación (de 1.1 ml de volumen final) de la muestra y el blanco se prepararon de la siguiente manera (para muestras coloreadas):

	MUESTRA	BLANCO
DTNB	850 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Inhibidor	100 $\mu$ l	-----
Enzima	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Sustrato	50 $\mu$ l	-----

La muestra y el blanco se colocaron en sendas celdas de cuarzo de 0.5 cm de paso óptico en un espectrofotómetro UV-160 Shimadzu y se midió la absorbancia a 412 nm cada 60 segundos durante 180 segundos.

Los valores generados por el espectrofotómetro son convertidos a Unidades Enzimáticas (U.E.) y a Actividad Específica (A.E.) de la siguiente forma:

$$\text{U.E.} = \mu\text{moles de sustrato hidrolizado} / \text{minuto} \times \text{insecto}$$

$$\text{U.E.} = \frac{\Delta \text{ absorbancia / minuto} \times 1.1 \text{ ml}}{13.6 \times 1 \text{ insecto}^*}$$

\* 1 insecto cuando se utilizaron larvas; 2 cuando fueron adultos.

$$\text{A.E.} = \frac{\mu\text{moles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto} \times \text{mg de proteína}}$$

### 5 D.- Medición por el método de Gomori

El sustrato se preparó haciendo una concentración madre de  $\alpha$ -naftilacetato en acetona, de la cual se extrajo 0.1 ml y se diluyó en 19 ml de buffer fosfato pH 7.2, 0.2 M, con el agregado de 1 ml de eserina  $10^{-4}$  M. El reactivo color se preparó disolviendo 30 mg de Fast Blue B en 10 ml de SDS (lauril sulfato de sodio) 5% agitando y filtrando con papel de filtro. El homogenato se hizo en frío con 10 insectos descabezados por ml de buffer y luego se preparó una dilución de 0.1 ml del mismo (previo filtrado con lana de vidrio) en 9.9 ml de buffer

El reactivo de color y el  $\alpha$ -NA, se prepararon en el momento de usar. La muestra y el blanco se prepararon de la siguiente manera:

	MUESTRA	BLANCO
Sustrato	2.5 ml	3.0 ml
Enzima	0.5 ml	---
Incubación		
30 minutos a 30 °C		
Cromógeno	0.5 ml	0.5 ml

La lectura mediante espectrofotometría se realizó a 600 nm a tiempo 0 y 10 minutos, después de la incubación.

Los valores generados por el espectrofotómetro son convertidos a Unidades Enzimáticas (U.E.) y a Actividad Específica (A.E.) de la siguiente forma:

$$\text{U.E.} = \frac{\text{DO} \times 0.1 \mu\text{mol}}{0.559 \times 30 \text{ min} \times 0.05 \text{ ins}}$$

$$\text{A.E.} = \frac{\mu\text{moles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto} \times \text{mg de proteína}}$$

### 5 E.- Medición de proteínas

Se homogeneizaron larvas y adultos de ambas cepas y provenientes de cada uno de los medios de cultivo con el objeto de cuantificar las proteínas mediante la técnica de Lowry y expresar los valores de actividad enzimática por mg de proteína.

Esta técnica se fundamenta en la reacción de las mismas con el reactivo de Folin para dar un complejo coloreado. El color formado se debe a la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptofano presentes en las proteínas. La intensidad del color depende de la cantidad de estos aminoácidos presentes y variará con las diferentes proteínas (Plummer 1978). La medición de la absorbancia se hizo a través de un espectrofotómetro Shimadzu a una longitud de onda de 660 nm. La absorbancia medida por el equipo es traducida a concentración en  $\mu\text{g}$  de proteína por cada 100  $\mu\text{l}$  de enzima en adultos y cada 50  $\mu\text{l}$  en larvas.

Para la cuantificación de proteínas por Lowry se emplearon los siguientes reactivos:

Folin (MERCK)

Carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1N;

Sulfato de cobre 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%.



# **RESULTADOS Y DISCUSION**

## 1.- SEXADO

La literatura acerca de diferencias externas entre sexos en *Tribolium castaneum* no es muy abundante. Entre los trabajos de las dos últimas décadas, El Halfay (1972) estudió estas diferencias en *T.confusum*, incluyendo aspectos genéticos y citogenéticos. Pajni y Virk (1982) realizaron un estudio anatómico amplio y comparativo de huevos, larvas y pupas de *T.castaneum*, comprendiendo la anatomía del sistema reproductivo. Para los fines de este trabajo fue necesario establecer diferencias entre sexos, como variable de diseño de los ensayos poblacionales. La microscopía electrónica de barrido no mostró diferencias morfológicas externas en adultos como se puede apreciar en las fotos 1 (A y B). El estudio más detallado de regiones particulares del cuerpo tampoco mostró tales diferencias. A modo de ejemplo en las fotos 2 (A y B) y 3 (A y B), se muestran las cabezas y los segmentos posteriores de macho y hembra respectivamente. Solo es posible observar la genitalia de ambos sexos por presión de la parte posterior del abdomen y en algunos casos luego de la muerte de los insectos por inmersión en agua o alcohol. En las fotos 4 (A y B) se muestran ambas genitalias observables por SEM en insectos muertos por inmersión.

Cabe destacar que esta diferenciación sexual es imposible de aplicar en insectos vivos. Por tal razón fue de interés establecer tales diferencias entre sexos en el estadio pupal. En este estadio se observan diferencias morfológicas en el extremo posterior y ventral de la región abdominal correspondientes a las gonotecas (Fotos 5 A y B, 6 A y B); las mismas son originadas del séptimo esternito en el macho y del octavo en la hembra y en el adulto, se transformarán en los respectivos órganos genitales que se hacen internos y no visibles. También están presentes en las pupas otras estructuras, denominadas "cercos" por Bertrand (1972), pero que no muestran diferencias entre ambos sexos (Fotos 5 A y B, 6 A y B).



A



B

**Foto 1.-** Vista general de la faz ventral de adultos de *Tribolium castaneum*. (A) cuerpo de la hembra sin alas; (B) cuerpo del macho con alas.

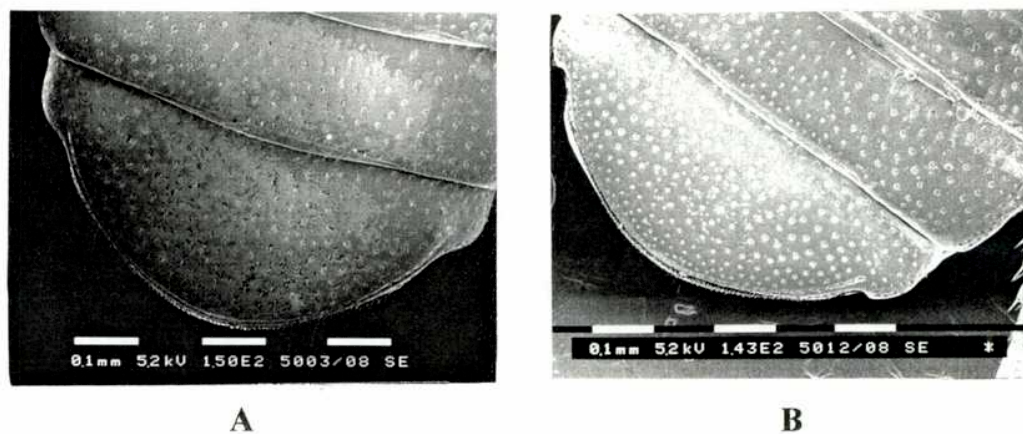


A

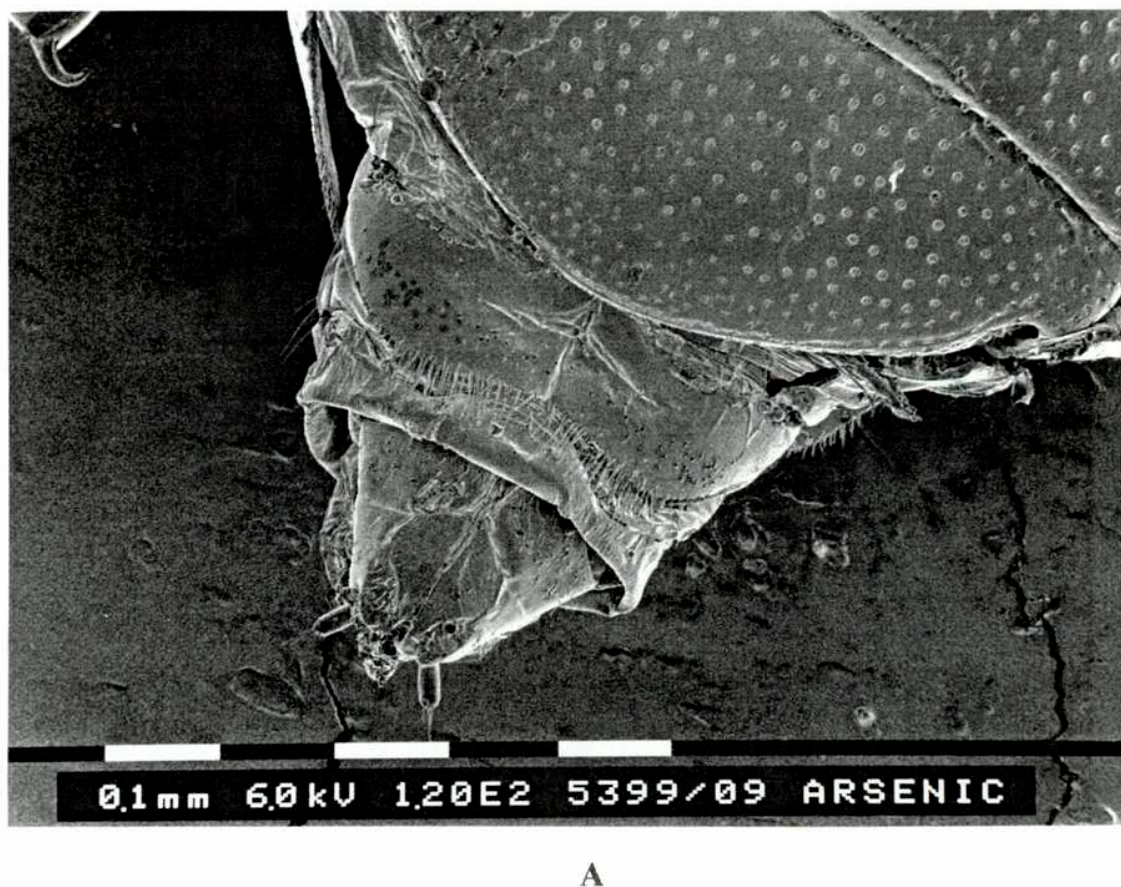


B

**Foto 2.-** Cabeza de adultos de *T. castaneum* en vista ventral. (A) hembra; (B) macho.

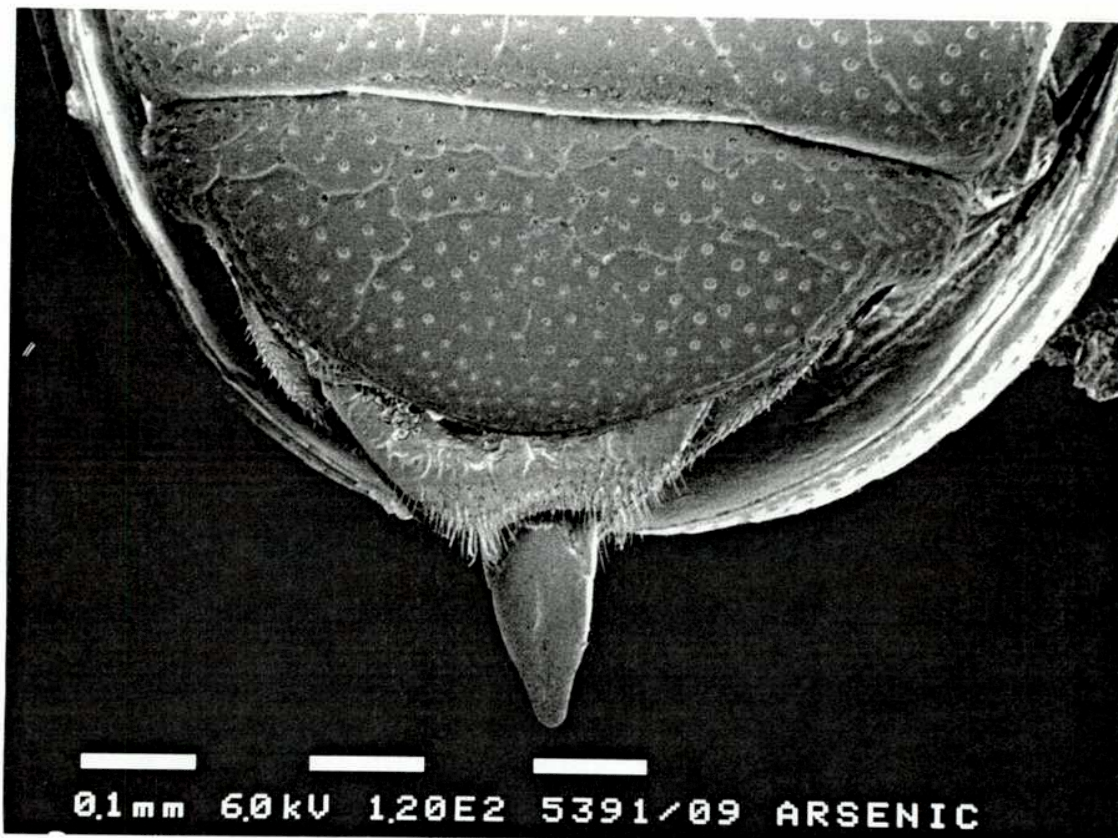


**Foto 3.-** Vista ventral del extremo posterior del abdomen de ejemplares adultos. (A) hembra; (B) macho.



**Foto 4.-** Vista ventral del extremo posterior del abdomen de ejemplares adultos con la genitalia visible. (A) hembra; (B) macho.





B

Foto 4.- (B)

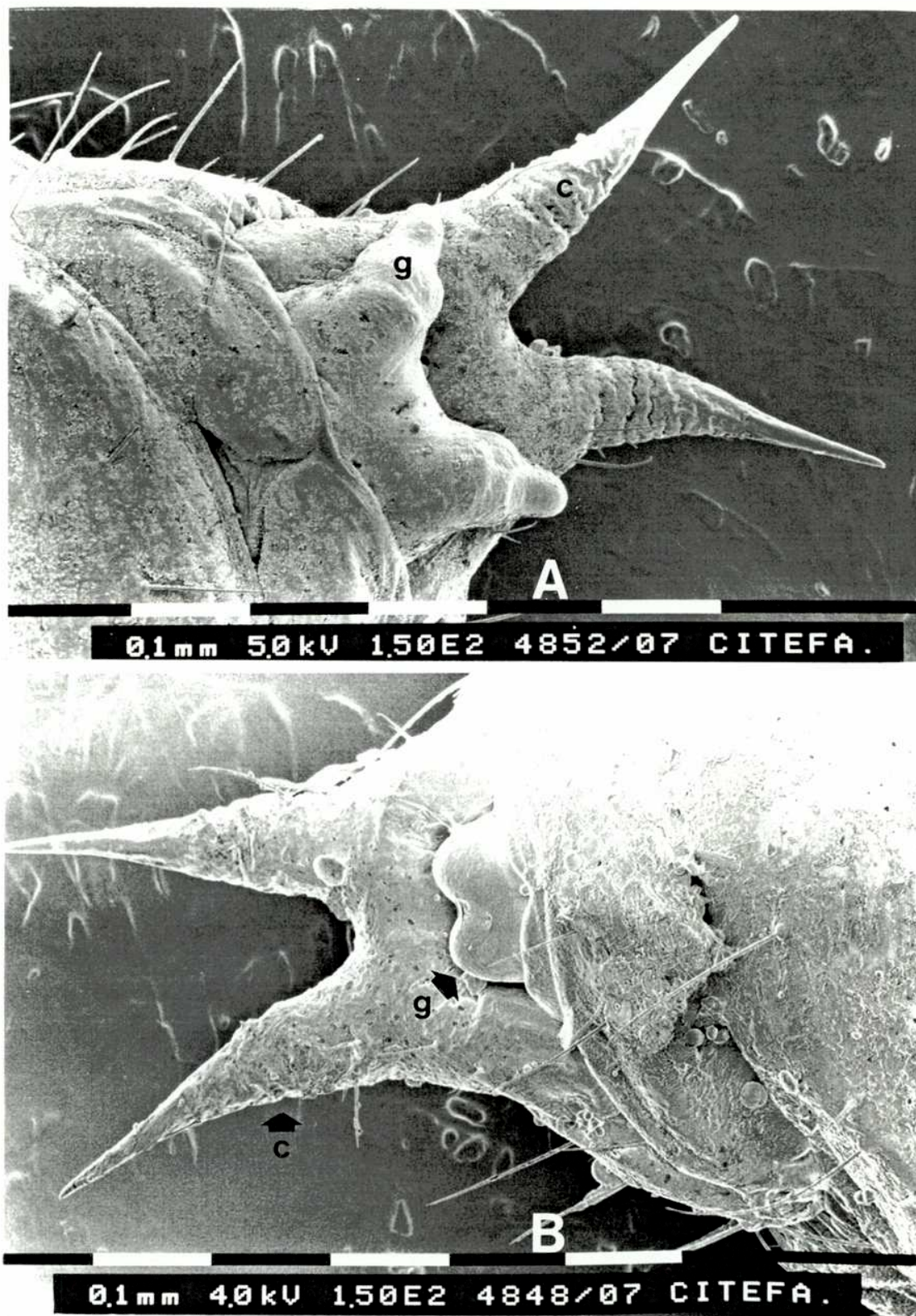


A



B

Foto 5.- Vista general de la faz ventral del estadio de pupa. (A) hembra; (B) macho; las flechas señalan a las gonotecas.



**Foto 6.-** Aproximación distal de la faz ventral del abdomen donde se aprecian los "cercos" (c) y las gonotecas (g) de la pupa hembra (A) y de la pupa macho (B).



## 2.- ESTUDIOS POBLACIONALES E INFLUENCIA DEL MEDIO DE CRIA

Estudios de Chon et al. (1991) indicaron que en *T. castaneum* criados en trigo, maíz o arroz integral, la duración de los estadios de huevo y pupa fueron similares, mientras que la duración total de la larva es mayor en arroz que en trigo; asimismo la mortalidad es mayor en arroz integral, sugiriendo que éste constituye una dieta pobre en requerimientos nutricionales. Los límites superior e inferior de temperatura entre los cuales se pueden desarrollar perfectamente todos los estadios de desarrollo ha sido estimada en 40.2 y 20.0 °C.

Estudios poblacionales realizados por Hagra (1986) demostraron que la longevidad promedio y la expectativa de vida media de hembras alimentadas con harina de trigo fueron mayores que las criadas sobre harina de maíz, a 31°C.

Según la cantidad de alimento suministrado al inicio de un estudio poblacional, la competencia por el mismo puede llegar a ser bastante severa, siendo los efectos resultantes la variación del período de desarrollo medio (de huevo a adulto), peso medio de adultos y mortalidad de los estados inmaduros; estos cambios no necesariamente ocurren simultáneamente. Cuando la cantidad de alimento suministrado inicialmente es baja, la población mantiene una alta tasa de supervivencia hasta un cierto nivel de alimento, sacrificando peso del cuerpo, retardando el proceso de muda y por tanto demorando la emergencia de los adultos (Fujii 1975).

Williamns (1989), hizo estudios comparativos entre una cepa susceptible y otra resistente sobre el desarrollo embrionario y viabilidad de los huevos a varias temperaturas y humedades relativas, obteniendo en todos los casos que en la segunda cepa los huevos maduraron antes que en la primera y que los límites de temperatura para ambas cepas considerando estas características fueron 20 y 40 °C. La temperatura influyó en el desarrollo de las larvas susceptibles y resistentes, en tanto que las pupas no se vieron afectadas por ninguna de las temperaturas ni humedades a las que fueron sometidas.

Según los estudios de Abdelsamad y colaboradores (1988), la duración media larval fue menor a 35 °C y mayor a 25 °C, y en estas temperaturas encontró que la mayoría de las larvas poseían 7 estadios, a diferencia de los 6 estadios alcanzados a 30 °C.

Koura et al. (1971) estudiaron el efecto del tipo de alimento ( trigo, maíz, arroz, harina de trigo y paja de trigo) sobre la longevidad de varias especies de insectos plaga de granos almacenados y encontraron que en harina los adultos

de *T.castaneum* sobrevivieron durante un período mayor que en los restantes alimentos (220 días), asimismo prefirieron los granos de trigo (también los de maíz y arroz) molidos antes que los enteros o en mezcla; pero mucho mayor fue la preferencia hacia la harina. Antecedentes similares pueden encontrarse en estudios sobre otros insectos plaga de granos almacenados (Schwartz y Burkholder 1991; Arbogast 1989; Teotia y Singh 1968; Stadler 1988; Sharma 1985).

Asimismo, Hagstrum y Leach (1973) hallaron diferencias en el tiempo de desarrollo cuando ejemplares de la misma especie fueron sometidos a temperaturas fluctuante y constante, siendo menor en la primera. Con respecto a la fecundidad, determinaron que fue mayor en la temperatura fluctuante que en la constante. Estudios similares llevados a cabo por Lhaloui et al. (1988) y Hagstrum y Milliken (1988) sobre el *Tribolium castaneum* llevaron a iguales conclusiones.

La capacidad reproductiva de hembras de *T.castaneum* fue mayor en aquellas criadas sobre harina que sobre sémola y permaneció inalterada cuando se colocaron parejas solitarias o grupos de cinco parejas (Singh y Krishna 1982).

La harina de trigo constituyó un medio pobre para el desarrollo de *T.freemani* ya que los adultos emergidos de este alimento resultaron infértiles, en cambio cuando la harina era suplementada con levadura pasó a ser el segundo mejor medio de cría de 23 medios de origen animal y vegetal, a 30 °C y 70 % de HR, alcanzando las larvas el menor tiempo de desarrollo (28.9 días). Los hábitos alimenticios de *T.freemani* y *T.castaneum* indicaron que estas especies son omnívoras (Imura 1991).

Estudios similares sobre la influencia que ejerce el tipo de alimento en el desarrollo y supervivencia de *T.castaneum* se hicieron considerando el grado de daño presente en el grano. En este trabajo, Li y Arbogast (1991) llegaron a la conclusión de que si bien el daño en los granos no es absolutamente necesario para la supervivencia de las jóvenes larvas ni para la puesta de huevos, en el grano no dañado, la fecundidad se redujo a un mínimo, la supervivencia fue muy baja y el desarrollo fue retardado. Resultados similares arrojaron los estudios realizados por Singh y Krishna (1985) en granos de trigo enteros y partidos.

Por otra parte, las proteinasas son esenciales para el crecimiento y desarrollo de insectos. Particularmente durante la digestión y la muda, los inhibidores de proteinasas pueden tener efectos contrarios cuando ellos están presentes en la dieta. Un estudio que ejemplifica lo dicho anteriormente es aquel que hicieron Oppert et al. (1993) agregando al medio de cría un inhibidor de proteinasa de



serina, donde obtuvieron un crecimiento más retardado en *T.castaneum*. Cuando suministraron inhibidor de proteínasa de cisteína a la dieta, redujeron las tasas de crecimiento y aumentaron la mortalidad. Pero usando una combinación de ambos tipos de inhibidores, demostraron que la mezcla poseía mayor efectividad en el retardo del crecimiento y desarrollo de la misma especie que las dietas con un solo tipo de inhibidor.

Otro estudio interesante sobre las proteinasas fue llevado a cabo por Baker (1986) quien determinó las relaciones de amilasa/proteínas presentes en el intestino medio de larvas de insectos plaga de granos almacenados.

Para el buen desarrollo de las larvas de *T.castaneum*, se requiere de un complejo vitamínico constituido por vitaminas tales como tiamina, riboflavina, ácido nicotínico y ácido pantoténico mientras que la ausencia de inositol reduce el porcentaje de emergencia de hembras (Subba 1976).

A los fines de establecer la eficiencia de cría a través de la evolución poblacional, las colonias de *T.castaneum* utilizadas en nuestro trabajo fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad descriptos en el punto 3 de Materiales y Métodos.

## **2 A.- Estudios en la cepa susceptible**

Esta cepa se utilizó para estudiar la **distribución de los diferentes estadios** de desarrollo en las dos primeras camadas provenientes de 5 machos y 5 hembras de 5 días de edad a los 50 (35 en la segunda camada), 60 y 70 días del inicio del ensayo en los 4 medios de cría bajo estudio.

Si se compara la **primera camada** de cada uno de los medios, se observa un comportamiento similar en Centeno (Fig. 3), Trigo (Fig. 4), y Tricepiro (Fig. 5), donde el total de individuos encontrados a los 50 días corresponde al estadio larval. En cambio en el alimento constituido por la mezcla de harina, levadura y fécula (en adelante HLF), ya a los 50 días hay una importante proporción de pupas (Fig. 6).

A los 60 días, en centeno comienzan a aparecer las primeras pupas (aproximadamente 20 %); en el trigo las proporciones de larvas y pupas se igualan (50%); mientras que en los medios con tricepiro y HLF, las pupas constituyen el estadio más numeroso (60 - 70 %).

A los 70 días, en tricepiro y HLF, los adultos formaban casi el total de individuos; en trigo alcanzan al 90%; en centeno, en cambio, los adultos constituyen un 40 %, porcentaje similar al que posee el estadio pupal.

### DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 1; CENTENO

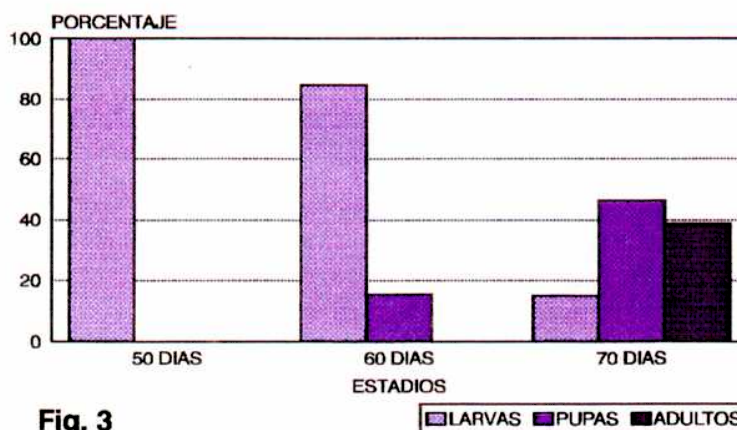


Fig. 3

### DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 1; TRIGO

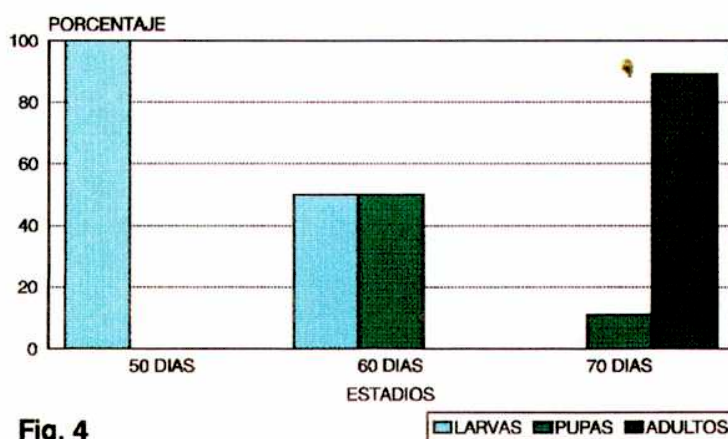


Fig. 4

### DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 1; TRICEPIRO

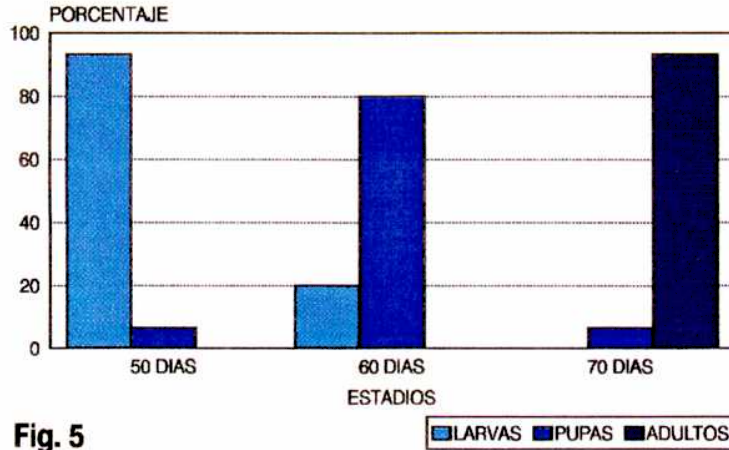


Fig. 5

### DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 1; H - L - F

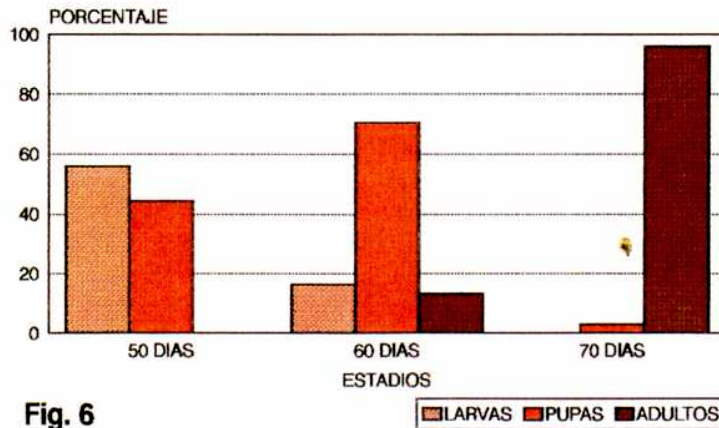


Fig. 6

A los 60 días de la **segunda camada**, en tricepiro (Fig. 9) y en HLF (Fig. 10) se hallan principalmente pupas y adultos; en trigo (Fig. 8) las larvas ocupan, numéricamente, el segundo lugar después de las pupas; mientras que en el centeno (Fig. 7) el 60 % de los individuos corresponden a larvas, el 30 % a pupas y el resto a adultos.

A los 70 días esta demora es aún evidente pero los adultos, constituyen la mayor parte, como ocurre en los otros alimentos.

**DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS**

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 2; CENTENO

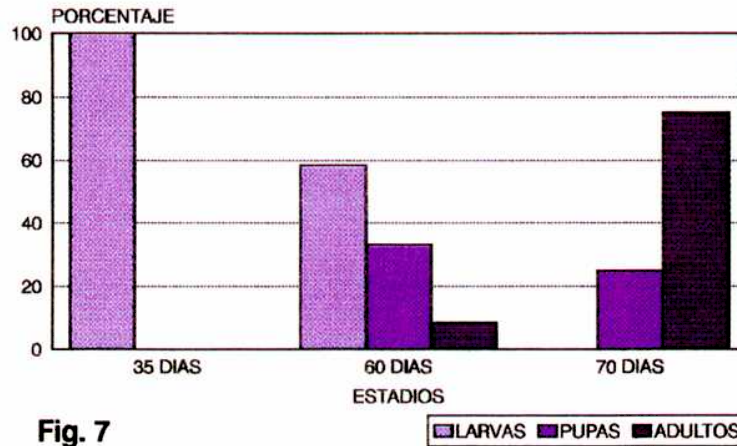


Fig. 7

**DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS**

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 2 ; TRIGO

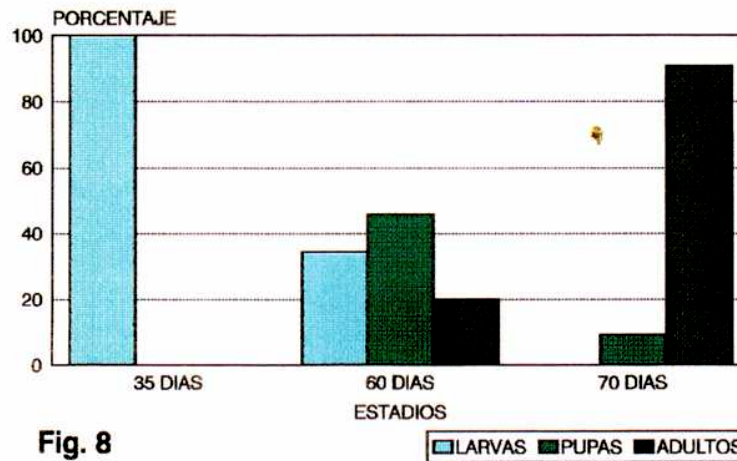


Fig. 8

Se puede generalizar, según lo evidenciado en las camadas siguientes, que aproximadamente a los 35 días hay alrededor de un 100 % de larvas, cualquiera sea el medio alimenticio en el que se desarrollen. A los 70 días, estas larvas completaron su desarrollo llegando a la adultez.



## DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 2; TRICEPIRO

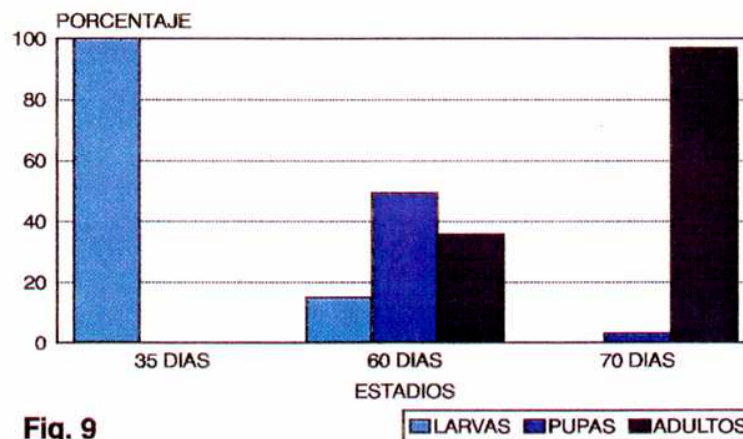


Fig. 9

## DISTRIBUCION DE DIFERENTES ESTADIOS

CEPA SUSCEPTIBLE; CAMADA 2; H - L - F

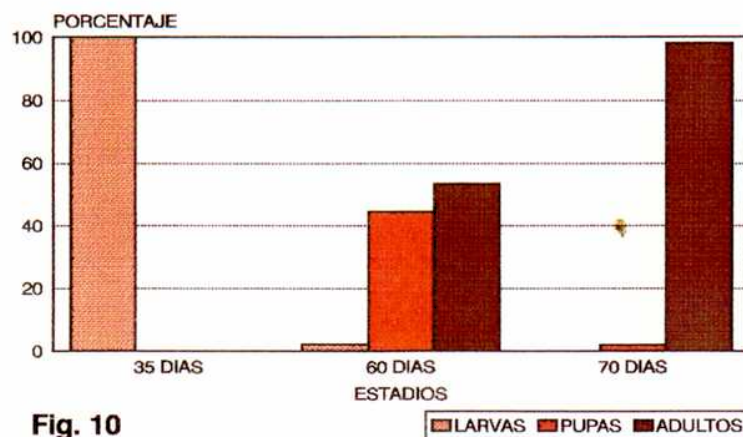


Fig. 10

En la misma cepa se contabilizó el **número total de camadas** obtenidas en cada medio de cultivo en un lapso de 8 meses. De esta manera, en la mezcla de harinas, los adultos (padres) llegaron a oviponer en 12 oportunidades (camadas) (Fig. 11); en el tricepiro (Fig.12), se desarrollaron 8 camadas, en el centeno 5 (Fig. 13) y en trigo se produjeron 7 camadas (Fig 14).

Al considerar el **número de individuos por camada**, en HLF (Fig. 11) se observan entre 150 y 200 ejemplares en las dos primeras camadas, con una leve baja a los 70 días; a partir de la tercera y hasta la cuarta, hay una disminución, que se acentúa en esta última, coincidiendo este hecho con las cuartas camadas en los otros alimentos. En la quinta y sexta hay un nuevo incremento del número de individuos tanto a los 45 como a los 70 días. De la séptima a la novena, se hallaron entre 50 y 100 individuos, y en la décima vuelve a incrementarse, superando los 100 individuos, para luego descender en las camadas siguientes hasta la muerte de los padres.

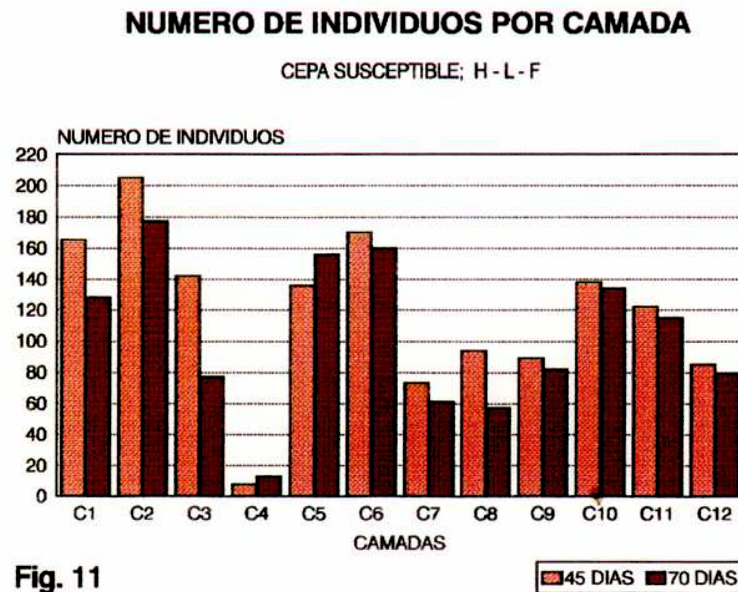


Fig. 11

### NUMERO DE INDIVIDUOS POR CAMADA

CEPA SUSCEPTIBLE; TRICEPIRO

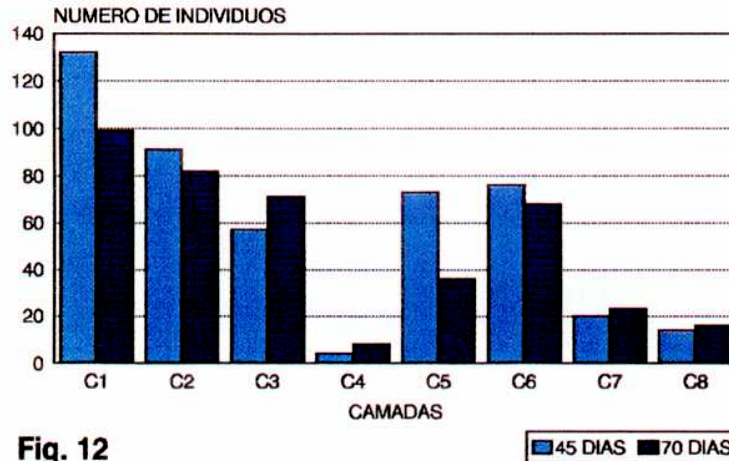


Fig. 12

En la primera camada del **tricepiro** (Fig. 12) se hallaron aproximadamente 130 individuos a los 45 días. A partir de ésta, hay una disminución paulatina hasta la cuarta, donde el número es inferior a 20 y posteriormente se evidencia un relativamente brusco incremento en la quinta y sexta, para luego volver a disminuir en las dos camadas siguientes.

### NUMERO DE INDIVIDUOS POR CAMADA

CEPA SUSCEPTIBLE; CENTENO

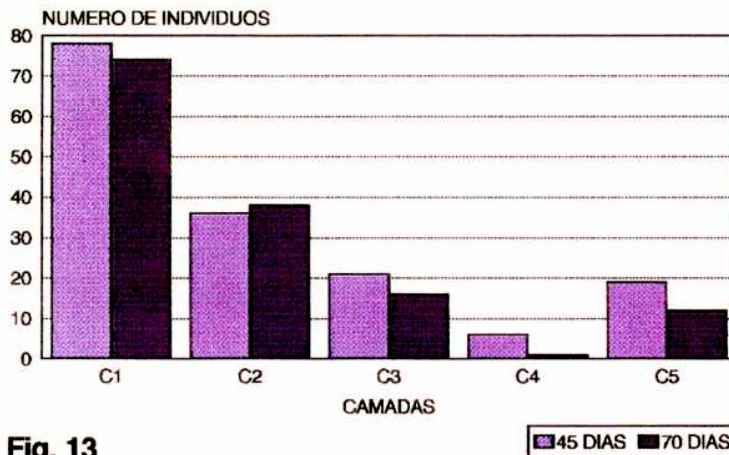


Fig. 13



### NUMERO DE INDIVIDUOS POR CAMADA

CEPA SUSCEPTIBLE; TRIGO

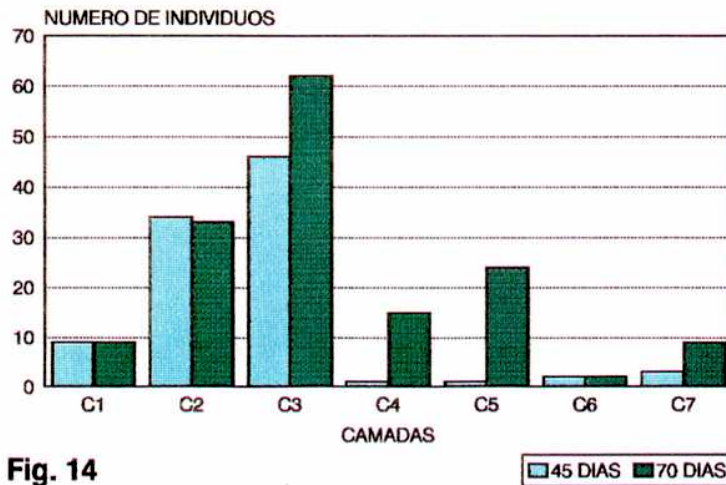


Fig. 14

En **centeno** (Fig. 13) ocurre algo similar, donde la primera camada tiene alrededor de 80 individuos, y va disminuyendo hasta la cuarta camada con algo menos de 10; posteriormente se ve un leve incremento en la quinta pero ésta fue la última puesta dejada por los padres, ya que los adultos se extinguieron.

El caso contrario ocurre en el **trigo** (Fig. 14), donde la primera camada tiene pocos individuos, aumenta hasta la tercera llegando a encontrarse 60 individuos, y luego una brusca disminución en la cuarta, alcanzando los valores iniciales. En la quinta hay un leve aumento, pero en las dos siguientes el número de ejemplares hallados se hace mínimo hasta que los adultos padres terminan por extinguirse.

Si se hace una comparación del **número de individuos que completaron el desarrollo** en los cuatro medios de cultivo donde se introdujeron un macho y dos hembras, y contando sólo dos camadas a los 70 días, se hace evidente un marcado rendimiento del alimento constituido por harina, fécula y levadura, seguido numéricamente por el tricepiro (Fig. 16). La tendencia se mantiene si se analizan las tres primeras camadas cuando se introdujeron 10 adultos padres (Fig. 15).



**NUMERO DE ADULTOS POR MEDIO DE CRIA**

CEPA SUSCEPTIBLE; CONTEO DE 3 CAMADAS; 5 H, 5 M

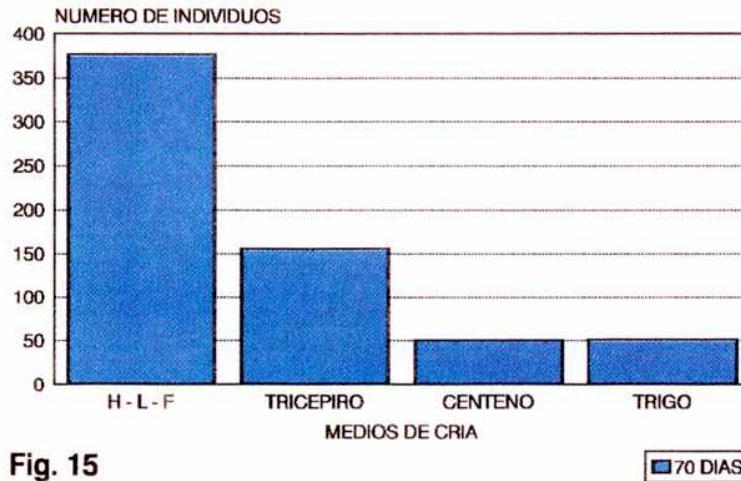


Fig. 15

**NUMERO DE ADULTOS POR MEDIO DE CRIA**

CEPA SUSCEPTIBLE; CONTEO DE 2 CAMADAS; 2 H, 1 M

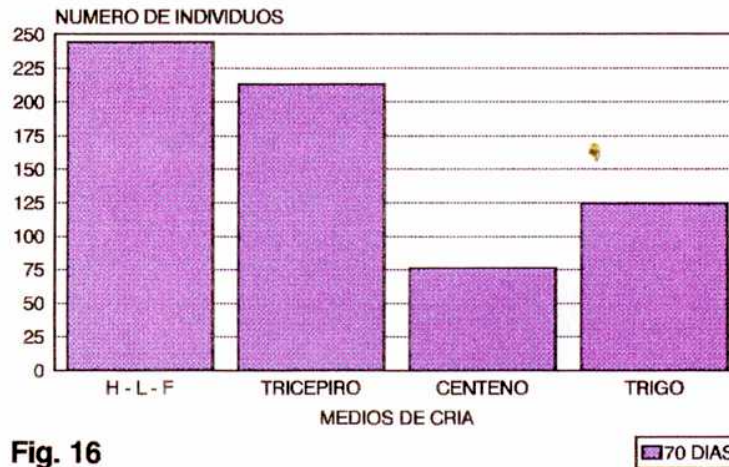


Fig. 16

**2 B.- Estudios en la cepa resistente**

En esta cepa se analizó el **número de individuos que completaron el desarrollo** en las experiencias con 5 machos y 5 hembras (Fig. 17) o con 1 macho y 2 hembras (Fig. 18). Los resultados indican un similar perfil de

evolución poblacional de ambas cepas en los distintos alimentos. El alimento constituido por harina, levadura y fécula es donde mejor se desarrollan, en segundo lugar está el tricepiro por último el trigo y el centeno, con aproximadamente igual número de adultos de la filial uno (F1).

### NUMERO DE ADULTOS POR MEDIO DE CRIA

CEPA RESISTENTE; CONTEO DE 3 CAMADAS; 5 H, 5 M

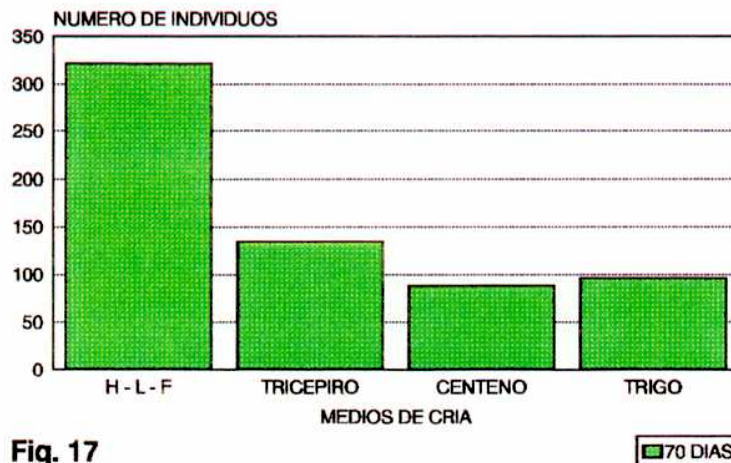


Fig. 17

### NUMERO DE ADULTOS POR MEDIO DE CRIA

CEPA RESISTENTE; CONTEO DE 2 CAMADAS; 2 H, 1 M

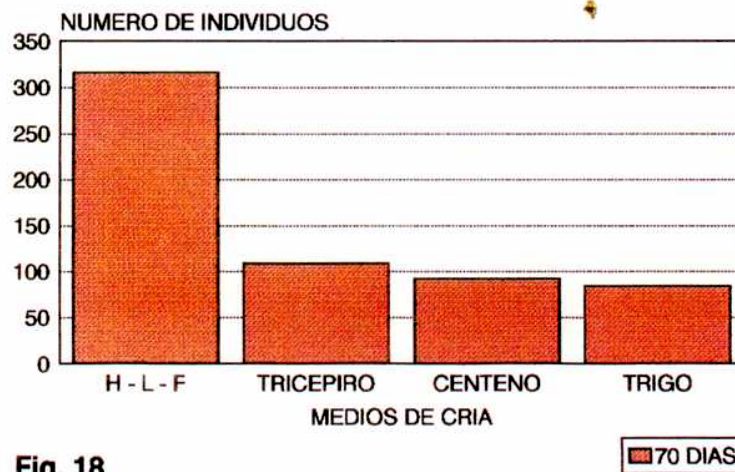


Fig. 18

### 3.- TOXICIDAD Y RESISTENCIA

Actualmente se está dando especial atención a las variables ecológicas, ya sean ambientales (temperatura, humedad, dieta) o poblacionales (edad, sexo), en la influencia que puedan ejercer sobre el desarrollo de resistencia a insecticidas en insectos. En *Drosophila melanogaster*, la densidad de la población tiene efectos sobre la susceptibilidad a insecticidas en los diferentes estadios del desarrollo. También, la época del año influye sobre el efecto tóxico del DDT y Lindano en moscas, aunque en este caso seguramente la causa de las diferencias de susceptibilidad sea la temperatura. El estado fenológico de las plantas afecta la toxicidad del DDT y Toxafeno en la chinche *Lygus hespersus*, como pudieron detectar Bacon et al. (1964). Asimismo, la resistencia se ve influida por variables como los medios de cría, el estado de desarrollo, el sexo y la edad. Cichy, (1971) analizó cómo algunas de estas variables contribuyeron en la aparición de resistencia sobre *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum*. Estos estudios se llevaron a cabo a lo largo de 15 o 20 generaciones tratando a los insectos con insecticidas que representaron a tres familias: un organofosforado (Metasystox), un clorado (Azotox), y un piretroide (Pybuthrin).

#### 3 A.- Influencia de la alimentación

El tipo de alimentación es indudablemente una variable fundamental que determina el efecto tóxico como así también el grado de resistencia. Observaciones en este sentido han sido informadas desde hace mucho tiempo. Una muy buena recopilación de estos resultados fue realizada por Busvine (1971). A modo de ejemplo se puede mencionar que en *Drosophila melanogaster* alimentada sobre puré de papas con levadura, se observó que la tolerancia de las larvas a nicotina aumenta significativamente con la cantidad de levadura. En la misma especie, Rivera y Steinhauer (1962) vieron que la susceptibilidad a DDT dependió directamente del contenido de nitrógeno del alimento.

Otro ejemplo interesante es el de *Oncopeltus fasciatus*, que alimentado sobre tres dietas de diferente valor nutritivo resultó con una susceptibilidad al DDT proporcional al valor nutritivo de las mismas. En otras palabras los especímenes mejor nutridos resultaron más susceptibles al DDT (Busvine 1971).

En *Tribolium* sp también se ha observado que la dieta influye sobre la susceptibilidad a insecticidas. En larvas de *T.confusum* criadas sobre 8 dietas

diferentes, se midió la susceptibilidad a vapores de sulfuro de carbono y se observaron diferencias significativas. Estas diferencias fueron explicadas teniendo en cuenta la proporcionalidad directa entre peso corporal y tolerancia. Esta correlación entre dieta, peso corporal y susceptibilidad al fumigante fue observada también en adultos (Yun 1947).

Cichy en 1969 estudió el efecto de diferentes clases de alimentos sobre la susceptibilidad a Pybutrin en *Tribolium castaneum* y encontró, que en efecto, las diferentes dietas influyeron en la susceptibilidad al insecticida, mientras que el efecto de las dietas sobre el desarrollo de resistencia en *Sitophilus oryzae* a Azotox, Metasystox y Pybuthrin dependen del insecticida usado (Cichy 1971).

En nuestros estudios sobre *Tribolium castaneum* observamos una significativa variabilidad en la susceptibilidad a malatión de los larvas y adultos susceptibles y resistentes criados en las dietas descritas en el punto 3 de Materiales y Métodos (Tablas 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

Tabla 3.- CL50 (mg/cm<sup>2</sup>) en papeles de filtro impregnados con soluciones de malatión de larvas susceptibles y resistentes criadas en cuatro diferentes medios.

MEDIO DE CRIA	LARVAS SUSCEPTIBLES	LARVAS RESISTENTES
HAR-LEV-FEC	0.59 (0.26 -1.38)	1.46 a (1.18 -1.80)
TRICEPIRO	0.29 a (0.18 - 0.47)	0.61 (0.21-1.79)
CENTENO	0.46 (0.27 - 0.82)	0.73 a (0.42 - 1.27)
TRIGO	0.82 a (0.5-1.36)	2.10 (0.75 - 5.91)

Los valores seguidos de la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Rano et al. 1976). Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

Tabla 4.- CL50 (mg/cm<sup>2</sup>) en papeles de filtro impregnados con soluciones de malatión de adultos susceptibles y resistentes criadas en cuatro diferentes medios.

MEDIO DE CRIA	ADULTOS SUSCEPTIBLES	ADULTOS RESISTENTES
HAR-LEV-FEC	0.11 ab (0.09 - 0.15)	0.36 abc (0.3 - 0.45)
TRICEPIRO	0.08 cd (0.06 - 0.11)	0.26 ad (0.23 - 0.29)
CENTENO	0.17 ace (0.16 - 0.23)	0.27 be (0.23 - 0.31)
TRIGO	0.03 bde (0.02 - 0.04)	0.17 cde (0.14 - 0.2)

Los valores seguidos de la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Rano et al. 1976). Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

En términos generales nuestros estudios de toxicidad al malatión de larvas y adultos susceptibles y resistentes indican que existe una mayor tolerancia en los individuos criados sobre el medio HLF (Tablas 4, 5, 6, 7 y 8). La única excepción se observó en las CL50 sobre film en papel, determinadas para larvas susceptibles y resistentes, donde si bien los individuos criados sobre HLF mostraron una tolerancia al malatión mayor que los criados en otras dietas (tricepiro y centeno), fueron menos tolerantes al insecticida que los alimentados con trigo (Tabla 3).

Como se informara en el punto 2 de este capítulo, el medio HLF es el más eficiente para la cría de este insecto. Si bien no es posible explicar la mayor tolerancia al malatión de *T.castaneum* en base al peso corporal de larvas y adultos criados en el medio mas eficiente (Tablas 9 y 10), la interpretación del mismo podría intentarse a través del estado fisiológico de los individuos criados en distintos medios. En efecto, la toxicidad de un compuesto químico a cualquier organismo vivo es inversamente proporcional a la calidad de su estado fisiológico. Cualquier variable ecológica o patología que afecte al organismo disminuirá su tolerancia a los tóxicos. En nuestro caso las dietas diferentes a HLF al tener una menor eficiencia de cría y por ende un menor valor nutricional para esta especie reducen la tolerancia de *T.castaneum* al malatión.

Tabla 5.- CL50 (mg/g) en alimento tratado con soluciones aceitosas de malatión de larvas susceptibles y resistentes criadas en cuatro diferentes medios.

MEDIO DE CRIA	LARVAS SUSCEPTIBLES	LARVAS RESISTENTES
HAR-LEV-FEC	2.84 a (1.12 - 7.10)	6.34 abc (4.06 - 10)
TRICEPIRO	0.46 ab (0.3 - 0.79)	2.81 ad (1.82 - 4.39)
CENTENO	1.55 b (0.99 - 2.41)	1.88 b (1.29 - 2.77)
TRIGO	0.9 (0.58 - 1.41)	1.14 cd (0.76 - 1.73)

Los valores seguidos de la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Rano et al. 1976). Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

Estos conceptos y resultados parecen contraponerse con las observaciones ya citadas sobre *Oncopeltus fasciatus* (Busvine 1971). Sin embargo un análisis más profundo de los resultados obtenidos con esta chinche nos indica que los individuos más tolerantes criados en la dieta menos eficiente tienen: A.- Peso corporal notablemente menor. B.- Tasa de mortalidad significativamente mayor. Por lo tanto teniendo en cuenta que la toxicidad se informó sobre peso corporal y que la alta mortalidad de la dieta menos eficiente representa una selección de individuos más tolerantes a variables abióticas, es explicable el fenómeno observado en *Oncopeltus fasciatus* (mayor susceptibilidad en insectos mejor nutridos).

En nuestras experiencias el peso corporal de larvas y adultos, en las diferentes dietas, no fue significativamente diferente (Tablas 9 y 10).

Tabla 6.- CL50 (mg/g) en alimento tratado con soluciones aceitosas de malatión de adultos susceptibles y resistentes criadas en cuatro diferentes medios.

MEDIO DE CRIA	ADULTOS SUSCEPTIBLES	ADULTOS RESISTENTES
HAR-LEV-FEC	3.7 abc (2.6-5.3)	6.86 abc (4.29 - 11.02)
TRICEPIRO	0.76 ad (0.53 - 1.09)	3.86 ad (2.84 - 5.07)
CENTENO	1.55 bde (0.99 - 2.15)	2.9 bc (2.21- 3.76)
TRIGO	0.53 ce (0.36 - 0.76)	1.95 cde (1.39 - 2.67)

Los valores seguidos de la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Rano et al. 1976)  
Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

Tabla 7.- CL50 (mg/g) en alimento tratado con soluciones acetónicas de malatión de larvas susceptibles y resistentes criadas en cuatro diferentes medios.

MEDIO DE CRIA	LARVAS SUSCEPTIBLES	LARVAS RESISTENTES
HAR-LEV-FEC	2.51 (0.43 - 14.19)	14 abc (7.36 - 26.57)
TRICEPIRO	1.82 (0.33 - 9.87)	3.10 a (1.42 - 6.6)
CENTENO	2.24 a (1.49 - 3.37)	2.84 bd (1.68 - 4.79)
TRIGO	1.09 a (0.73 - 1.68)	5.61 cd (3.76 - 8.42)

Los valores seguidos de la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Rano et al. 1976).  
Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

**Tabla 8.- CL50 (mg/g) en alimento tratado con soluciones acetónicas de malatión de adultos susceptibles y resistentes criadas en cuatro diferentes medios.**

MEDIO DE CRIA	ADULTOS SUSCEPTIBLES	ADULTOS RESISTENTES
HAR-LEV-FEC	1.02 a (0.5 - 2.05)	2.81 a (2.24 - 3.47)
TRICEPIRO	0.89 b (0.56 - 1.35)	2.24 (1.82 - 2.74)
CENTENO	2.54 abc (1.91 - 3.37)	1.82 a (1.29 - 2.51)
TRIGO	0.89 c (0.46 - 1.42)	2.28 (1.78 - 2.94)

Los valores seguidos de la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Rano et al. 1976).

Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

**Tabla 9.- Peso (mg) y longitud (mm) de larvas de sexto estadio susceptibles y resistentes criadas en diferentes medios alimenticios.**

MEDIOS DE CRIA	PESO LARVA SUSCEPTIBLE	PESO LARVA RESISTENTE	LONGITUD LARVA SUSCEPTIBLE	LONGITUD LARVA RESISTENTE
HAR-LEV-FEC	2.8 ( $\pm 0.3$ )	2.9 ( $\pm 0.4$ )	6.1 ( $\pm 0.4$ )	6.2 ( $\pm 0.3$ )
TRICEPIRO	2.7 ( $\pm 0.4$ )	2.6 ( $\pm 0.3$ )	6.0 ( $\pm 0.5$ )	6.1 ( $\pm 0.3$ )
CENTENO	2.4 ( $\pm 0.4$ )	2.3 ( $\pm 0.3$ )	5.8 ( $\pm 0.3$ )	6.0 ( $\pm 0.2$ )
TRIGO	2.2 ( $\pm 0.4$ )	2.3 ( $\pm 0.2$ )	5.7 ( $\pm 0.4$ )	6.0 ( $\pm 0.4$ )

Los valores son el promedio de 10 mediciones  $\pm$  desviación estándar.



**Tabla 10 .-** Peso (mg) de adultos susceptibles y resistentes criados en cuatro diferentes medios alimenticios.

MEDIO DE CRIA	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
HAR-LEV-FEC	2.3 ( ± 0.3)	2.2 ( ± 0.3)
TRIGO	2.3 ( ± 0.4)	2.0 ( ± 0.5)
TRICEPIRO	1.9 ( ± 0.4)	1.9 ( ± 0.2)
CENTENO	1.8 ( ± 0.3)	1.8 ( ± 0.3)

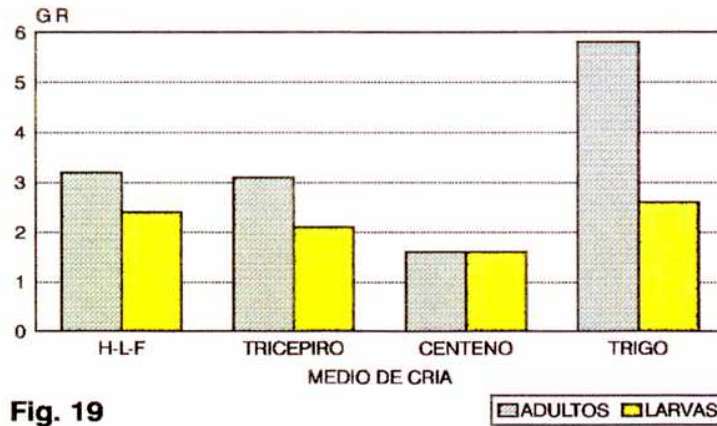
Los valores son el promedio de 10 mediciones ± desviación estándar.

Los valores de Grado de Resistencia (GR) también se vieron influenciados por las dietas. Si bien es difícil encontrar un perfil general sobre la dieta que mostró los mayores valores de GR, se observa que en las mediciones de CL50 sobre papel, los mayores GR se establecieron cuando ambas cepas se criaron sobre trigo (Fig. 19). Cuando las mediciones se hicieron sobre alimentos tratados con incorporación de aceite, tricepiro y HLF generaron los mayores valores de GR (Fig. 20). Para las mediciones realizadas con alimento tratado sin aceite no es posible definir un medio de cría que de mayores valores de GR en adultos, aunque las larvas criadas sobre HLF y trigo mostraron los valores más altos de GR (Fig. 21).

En cambio si analizamos los medios de cría respecto a menores valores de GR, el análisis es claro. En efecto, es muy evidente la influencia del centeno, que no sólo da lugar a los menores valores de grado de resistencia medidos sino que en muchos casos revierte el fenómeno de resistencia (Fig. 19, 20 y 21) ya que los grados de resistencia no son significativamente diferentes.

**GRADO DE RESISTENCIA EN LARVAS Y ADULTOS DE DIFERENTES MEDIOS DE CRIA**

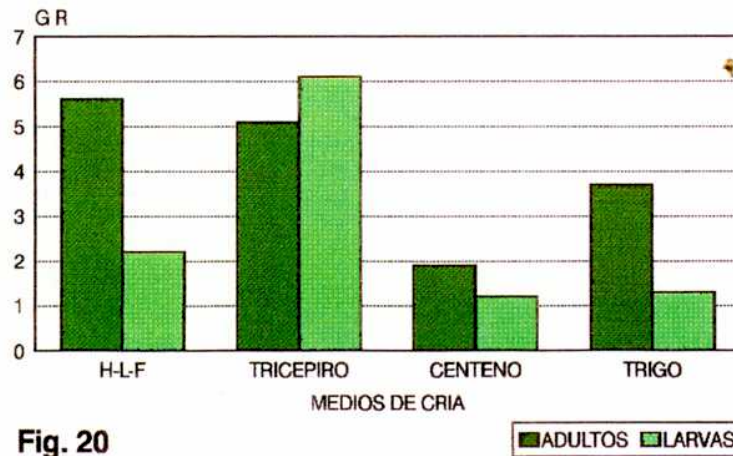
EXPOSICION A PAPELES DE FILTRO IMPREGNADOS CON MALATION



**Fig. 19**

**GRADO DE RESISTENCIA EN LARVAS Y ADULTOS DE DIFERENTES MEDIOS DE CRIA**

EXPOSICION A ALIMENTO TRATADO CON SOLUCION ACEITOSA DE MALATION



**Fig. 20**

### GRADO DE RESISTENCIA EN LARVAS Y ADULTOS DE DIFERENTES MEDIOS DE CRIA

EXPOSICION A ALIMENTO TRATADO CON SOLUCION ACETONICA DE MALATION

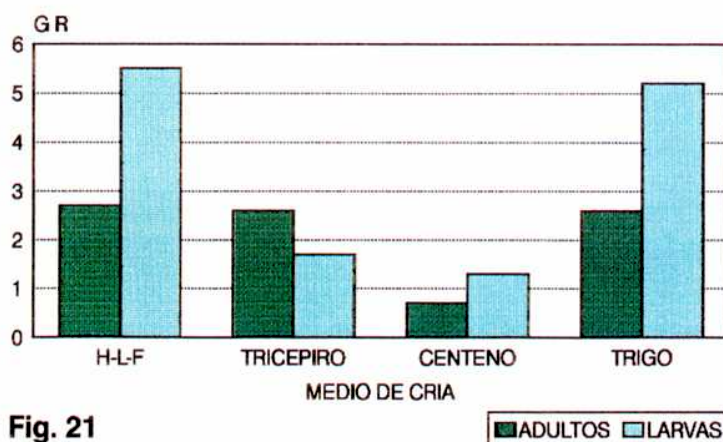


Fig. 21

### 3 B.- Influencia del estadio y del método de bioensayo

La susceptibilidad a insecticidas también se ve afectada por factores intrínsecos como la edad del insecto, incluyendo los diferentes estadios por los que atraviesa durante su desarrollo. Esta respuesta diferencial frente a los tóxicos se debe a cambios en su anatomía, fisiología y también al cambio de hábito alimenticio que ocurren en algunas especies, cuando pasan del estado larval al estado adulto. Estas diferencias de susceptibilidad son más marcadas en insectos holometábolos (coleópteros, lepidópteros) que en aquellas especies hemimetábolos (hemípteros). Busvine (1971) menciona varios casos que ejemplifican la influencia del estadio en la tolerancia a insecticidas. Las cucarachas adultas y las ninfas maduras poseen el mismo orden de susceptibilidad a piretrinas. En cambio en *Popillia japonica* y en *Musca domestica* tratadas con DDT mostraron diferencias de tolerancia que siguieron el siguiente orden: pupa > larva > adulto.

El estado de huevo puede ser el más tolerante o el más susceptible según el insecticida usado. Así por ejemplo los huevos de *T.confusum* fueron más tolerantes al disulfuro de carbono y cloropicrin, y resultaron más susceptibles al ácido cianhídrico, bromuro de metilo y óxido de etileno. La tolerancia de los

otros estadios a los dos primeros insecticidas fumigantes fue disminuyendo en el siguiente orden: huevo > pupa > adulto > larva (Busvine 1971).

Saleem y Shakoori (1990) estudiaron en larvas y adultos de *T.castaneum* la toxicidad de ocho insecticidas pertenecientes a las familias de piretroides, organoclorados, organofosforados, a inhibidores de quitina y a la toxina del *Bacillus thuringiensis*. En todos los casos, los adultos resultaron más susceptibles al tratamiento con insecticida que el sexto estadio larval.

Respecto a variaciones en el Grado de Resistencia con el estadio o la edad de los insectos, la bibliografía no es muy abundante en ejemplos. Wool y Kamin-Belsky (1983), demostraron que la resistencia al malatión de la polilla *Ephestia cautella* está inversamente relacionada con la edad del adulto.

En *T.castaneum*, se estudió comparativamente la toxicidad del malatión solo y sinergizado con trifenilfosfato (TPP) en adultos y larvas de dos cepas resistentes y una susceptible. En todas las cepas las larvas mostraron una mayor tolerancia al malatión que los adultos. La comparación de la resistencia a malatión en las distintas cepas indicó que el grado de resistencia para larvas fue mayor que para adultos. Cabe aclarar que el TPP revirtió el fenómeno de resistencia en larvas y adultos de ambas cepas (Binns 1986).

Nuestras determinaciones de GR con distintos métodos en adultos y larvas indicaron diferencias de susceptibilidad y GR a malatión entre estadios, variable según el método usado.

Mediante exposición a film de malatión sobre papel se observó claramente una mayor susceptibilidad (Tablas 3 y 4) y también un mayor GR en adultos (Fig. 19). Cuando se utilizó el método de alimento tratado no sólo se observaron diferencias con respecto al método de papel impregnado, sino también con el agregado de aceite al medio. La única tendencia observable fue la mayor tolerancia de adultos con respecto a larvas en alimento tratado con insecticida más aceite (Tablas 5 y 6). Los GR obtenidos por exposición a papel y a medios de cría con o sin aceite, no sólo fueron muy variables en lo cuantitativo sino también en lo cualitativo al comparar larvas y adultos (Figs. 19, 20 y 21). Estas diferencias entre el método de papel impregnado y el alimento tratado, pueden ser explicables teniendo en cuenta la vía de absorción del insecticida. En el caso de papel impregnado existe una sola vía relevante, que es la penetración por integumento. En cambio, en el alimento tratado además de esta vía se debe considerar como relevante la ingestión.

Asimismo, otro factor importante que puede influir sobre la diferencia entre estadios de acuerdo con la metodología es el mayor consumo de alimento de la

larva con respecto al adulto y por lo tanto la mayor contribución en la incorporación del insecticida por ingesta en este estadio.

Con respecto a las diferencias observadas cuando se aplicó el método de alimento tratado con y sin aceite (Figs. 20 y 21), las mismas pueden ser explicadas al cambio que introduce el vehículo oleoso en la absorción del insecticida como ya fuera establecido en otras especies de insectos (Fontán y Zerba 1987; Licastro et al. 1983).

### **3 C.- Resistencia cruzada a fenitrotión**

El malatión fue el insecticida fosforado más intensamente usado para el control de plagas de granos almacenados, incluyendo *T.castaneum* (Georghiou y Saito 1983). La aparición de resistencia a este insecticida en este insecto, motivó en muchos países, incluida la Argentina, la sustitución por otro organofosforado, el fenitrotión (Kashi 1972). Por tal razón ha sido relevante la búsqueda de posible resistencia cruzada al fenitrotión en cepas de *T.castaneum* resistentes al malatión (Picollo de Villar et al. 1985).

En la República Argentina han sido detectadas cepas de esta plaga resistentes a malatión pero susceptibles a fenitrotión. La explicación de este fenómeno se ha basado en que el mecanismo de resistencia en esas cepas es una mayor eficiencia degradativa por carboxiesterasas, detoxificación específica para malatión (Picollo de Villar et al. 1985). Asimismo ha sido descripta otra cepa de *T.castaneum* en la Argentina resistente a malatión con resistencia cruzada al fenitrotión (Picollo de Villar et al. 1992).

En la cepa motivo de este estudio se ha verificado en larvas, no sólo que la resistencia a malatión es cruzada con el fenitrotión sino que el factor de resistencia es más alto para este insecticida, sugiriendo que habría algún otro mecanismo involucrado en el fenómeno, diferente al de la detoxificación más eficiente por carboxiesterasas (Tabla 11).

Sorprendentemente la medición de resistencia al fenitrotión en esta etapa mostró un muy bajo GR (Tabla 11) en adultos. Este resultado podría interpretarse a través de los siguientes supuestos: a) el mecanismo predominante de resistencia a fenitrotión es diferente al de malatión; b) este mecanismo es específico de larvas.

**Tabla 11.- CL50 (mg/cm<sup>2</sup>) en larvas y adultos de las cepas susceptibles y resistentes alimentados con trigo obtenidas de la exposición a papel de filtro impregnado con soluciones acetónicas de fenitrotión.**

ESTADIO	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE	GRADO DE RESISTENCIA
LARVAS	0.0003 (0.0002-0.0005)	0.0068 (0.0039-0.0117)	22.7
ADULTOS	0.0005 (0.0004-0.0006)	0.00075 (0.0007-0.0008)	1.5

Los datos entre paréntesis representan los límites del intervalo de confianza.

#### 4.- ACTIVIDAD ESTERASICA

La bibliografía respecto a cepas resistentes al malatión describe un perfil diferente de actividad de carboxiesterasas frente a  $\alpha$ -NA y butirato de metilo con respecto a cepas susceptibles. Este fenómeno que ha sido denominado "teoría de la aliesterasa mutada", consiste en que los homogenatos de cepas resistentes poseen una menor capacidad degradativa frente al  $\alpha$ -NA como sustrato (Beeman y Schmidt 1982). Este hecho es difícil de justificar teniendo en cuenta que estas cepas poseen una mayor actividad de carboxiesterasas que degradan malatión y malaoxón.

La teoría antes citada propone que en las cepas resistentes habría mayor número de individuos con alto título de actividad de carboxiesterasas especializadas en la degradación del malatión y bajo título de actividad carboxiesterásica salvaje de alta especificidad hacia  $\alpha$ -NA y butirato de metilo (van Asperen y Oppenoorth 1959; van Asperen 1962).

Debido a la importancia de las carboxiesterasas de *Tribolium castaneum*, en la degradación del malatión, fue de nuestro interés estudiar la actividad "in vitro" frente a distintos sustratos de estas enzimas.

Las esterasas son enzimas cuya función es hidrolizar ésteres para dar ácidos y alcoholes o fenoles menos tóxicos y fácilmente excretables. En los insectos estas enzimas, así como las glutatión S transferasas, son de importancia ya que son causa frecuente del desarrollo de resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides.

Kandil et al. (1985), encontraron mayores niveles de actividad colinesterásica en las larvas de *Tribolium confusum* que en los otros estadios estudiados (huevos, pupas y adultos).

Cohen et al. (1977), halló dos esterasas no específicas en dos cepas de *T. castaneum* asociadas con el canal alimenticio y mostraron cambios de actividad durante el desarrollo ontogenético. Su actividad fue muy baja en huevos, se incrementó en las larvas y declinó drásticamente en el estadio pupal; si bien en este último se evidenció muy baja actividad, incrementó gradualmente a través de este período, aumentando rápidamente al llegar a imago. Estas enzimas hidrolizaron  $\alpha$  y  $\beta$  naftilacetato con igual capacidad en larvas y adultos de ambas cepas, mostraron insensibilidad a la inhibición de arilesterasas y colinesterasas y fueron inhibidas por un organofosforado, por lo cual podrían clasificarse como carboxiesterasas.

La resistencia a malatión en *Tribolium castaneum* ha sido frecuentemente informada como debida al incremento de la actividad de las carboxiesterasas sobre los grupos carboxiésteres del insecticida (Picollo de Villar et al. 1985). Esta actividad frente al PTA como sustrato puede determinarse cinéticamente mediante la técnica descrita por Ellman (1961).

Otra forma de medir actividad de carboxiesterasas es utilizando  $\alpha$  y  $\beta$  naftilacetato como sustrato. En este caso se determina fotométricamente a través del  $\alpha$  o  $\beta$  naftol generado por hidrólisis de los ésteres de naftilo según la técnica de Gomori (1952).

#### 4 A.- PTA-Esterasas

Cuando se midió la actividad esterásica utilizando feniltioacetato como sustrato, se observó que adultos de la cepa resistente criados con diferentes medios alimenticios, poseían mayor actividad que aquellos de la cepa susceptible, sugiriendo que mayor actividad de carboxiesterasas pudiera ser causa de resistencia y que existiera cierta similitud entre PTA y malatión. No ocurrió lo mismo en el estudio realizado en los estadios larvales, ya que en las larvas susceptibles se midió mayor actividad enzimática frente al feniltioacetato que en las larvas resistentes, cualquiera haya sido el medio nutricio del que provenían (Tabla 12). En este caso los resultados sugieren que las PTA-carboxiesterasas de larvas susceptibles y resistentes encuadrarían dentro de la teoría de la aliesterasa mutada (Oppenoorth 1965) suponiendo que estas enzimas contribuyen al fenómeno de resistencia.

**Tabla 12.-** Actividad esterásica de homogenatos de adultos y larvas susceptibles y resistentes, utilizando PTA (feniltioacetato) como sustrato de la reacción.

MEDIO DE CRIA	ACTIVIDAD ( $10^{-2}$ nM sustrato hidrolizado/ins x min x $\mu$ g proteína)			
	ADULTOS R	ADULTOS S	LARVAS R	LARVAS S
CENTENO	0.416 ( $\pm 0.032$ )	0.242 ( $\pm 0.009$ )	5.6 ( $\pm 0.47$ )	8.1 ( $\pm 0.47$ )
HAR-LEV-FEC	0.385 ( $\pm 0.017$ )	0.303 ( $\pm 0.055$ )	5.1 ( $\pm 1.05$ )	8.9 ( $\pm 0.35$ )
TRICEPIRO	0.239 ( $\pm 0.013$ )	0.257 ( $\pm 0.004$ )	8.6 ( $\pm 1.19$ )	10.2 ( $\pm 2.72$ )
TRIGO	0.57 ( $\pm 0.17$ )	0.218 ( $\pm 0.007$ )	3.9 ( $\pm 0.39$ )	13.3 ( $\pm 0.85$ )

Los resultados son el promedio de 4 determinaciones independientes  $\pm$  desviación estándar.

#### 4 B.- $\alpha$ - NA Esterasas

Frente al  $\alpha$  - naftilacetato, la actividad de las esterasas de adultos y larvas comparando ambas cepas, no mostraron diferencias significativas; mientras que al comparar la actividad enzimática de los diferentes estadios, independientemente de la cepa, sí se hallaron diferencias significativas. Estas observaciones fueron similares en los insectos provenientes de cualquiera de los medios de cría (Tabla 13). Este resultado fue inesperado ya que en otra cepa argentina de *T. castaneum* resistente al malatión se verificó que la actividad de carboxiesterasas frente a  $\alpha$  - NA es menor que similar actividad medida en una cepa susceptible, fenómeno explicable por la teoría de la aliesterasa mutada (Ferrero et al. 1991).



**Tabla 13.-** Actividad esterásica de homogenatos de adultos y larvas susceptibles y resistentes, utilizando  $\alpha$ -NA como sustrato de la reacción.

MEDIO DE CRIA	ACTIVIDAD ( $10^{-2}$ nM sustrato hidrolizado/ins x min x $\mu$ g proteína)			
	ADULTOS R	ADULTOS S	LARVAS R	LARVAS S
HAR-LEV-FEC	3.9 ( $\pm 0.75$ )	4.6 ( $\pm 0.99$ )	13.9 ( $\pm 2.75$ )	13.2 ( $\pm 0.48$ )
TRICEPIRO	4.2 ( $\pm 0.9$ )	3.8 ( $\pm 0.55$ )	24.0 ( $\pm 1.7$ )	15.8 ( $\pm 0.97$ )
CENTENO	5.9 ( $\pm 3.9$ )	4.3 ( $\pm 0.93$ )	19.5 ( $\pm 0.99$ )	17.7 ( $\pm 1.02$ )
TRIGO	4.3 ( $\pm 0.4$ )	2.9 ( $\pm 0.17$ )	15.4 ( $\pm 1.29$ )	20.1 ( $\pm 1.90$ )

Los resultados son el promedio de 6 determinaciones independientes  $\pm$  desviación estándar.

# **RESUMEN Y CONCLUSIONES**

### **1.- Estudios morfológicos**

**1 A .-** No se hallaron diferencias morfológicas entre los sexos de adultos de *Tribolium castaneum*, aún bajo microscopía electrónica de barrido.

**1 B .-** En el estadio pupal hay estructuras que posibilitan diferenciar los sexos. Estas estructuras que representan a las gonotecas, son observables en microscopio estereoscópico y están presentes ventralmente en el extremo posterior del abdomen.

### **2.- Estudios poblacionales**

**2 A .-** Se compararon como diferentes medios de cría centeno, trigo, tricepiro y la mezcla de harina, levadura y fécula. En la primera camada de la cepa susceptible a los 50 días, en el alimento HLF una importante proporción de larvas completaron su desarrollo, mientras que no ocurre lo mismo en los otros alimentos.

En la segunda camada, a los 60 días en el HLF el mayor porcentaje de individuos correspondió a adultos. Según lo observado se puede concluir que en el alimento HLF los individuos completan su desarrollo más rápidamente.

**2 B .-** Respecto al número de camadas y de individuos por camada dejados por los adultos padres (5 hembras y 5 machos), el HLF fue el alimento más eficiente. En él se contabilizaron 12 camadas y un total de más de 1400 individuos (conteo a los 45 días de cada camada). EL trigo resultó ser el alimento menos eficiente en número de individuos con menos de 100 en 7 camadas.

**2 C .-** El número de individuos que llegaron a adultos también fue mayor en el HLF cuando se introdujeron 2 hembras y 1 macho al inicio del estudio.

**2 D .-** En la cepa resistente los resultados muestran similar evolución poblacional que en la cepa susceptible en los diferentes medios.

### **3.- Estudios toxicológicos**

**3 A .-** La mayor eficiencia poblacional de los insectos criados en HLF, debido al mejor valor nutricional del alimento, se correlaciona positivamente (salvo

algunas excepciones) con la tolerancia al malatión, cualquiera sea la metodología de bioensayo utilizada.

Respecto a los grados de resistencia, en los insectos criados sobre centeno se obtuvieron los menores valores de GR en cualquiera de los métodos y estadios estudiados. No obstante no se puede establecer un perfil general de la dieta que permita medir los mayores valores de GR.

**3 B .-** Se compararon como métodos de medir toxicidad, exposición sobre papel de filtro tratado con malatión, y exposición a granos tratados con y sin aceite de oliva como coadyuvante.

En papel impregnado, los adultos mostraron mayor susceptibilidad que las larvas y mayor GR.

En alimento tratado con solución aceitosa de malatión se observó mayor tolerancia en adultos que en larvas; mientras que en los tratamientos con solución acetónica del insecticida, en términos generales, las larvas resultaron más tolerantes que los adultos.

En cambio no fue posible observar ninguna correlación entre GR y las variables metodológicas. En efecto, los GR fueron muy variables considerando tanto el medio de cría, como el estadio y la metodología.


**3 C .-** Se estudió la toxicidad del fenitrotión en larvas y adultos de ambas cepas de *T. castaneum* alimentadas con trigo y se verificó que en larvas la resistencia a malatión cruza con este otro organofosforado. Asimismo el GR es mayor para este insecticida; estos resultados sugieren la intervención de algún otro mecanismo de resistencia diferente al de detoxificación por carboxiesterasas, pero exclusivo de larvas, ya que en adultos el GR fue muy bajo.

#### **4 .- Estudios bioquímicos**

**4 A .-** Los adultos resistentes poseen mayor actividad de carboxiesterasas frente al feniltioacetato, que los adultos de la cepa susceptible criados en diferentes medios. En cambio en larvas susceptibles, la actividad enzimática fue mayor que en las resistentes, no existiendo diferencias significativas en los insectos criados en distintos medios.

**4 B .-** Utilizando  $\alpha$  - Naftilacetato como sustrato en la medición de esterasas en larvas y adultos de ambas cepas, no se registraron diferencias significativas aún en los provenientes de diferentes medios nutritivos. Pero al comparar los

estadios (larvas versus adultos), independientemente de la cepa, se observó que las larvas poseyeron actividad esterásica singificativamente mayor.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'L. J. J.' or similar, written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. J.' or similar, written in a cursive style.

# **BIBLIOGRAFIA**

1. ABDELSAMAD, R. M., ELHAG, E. A., ELTAYEB, Y.M., 1988. Studies on the phenology of *Tribolium castaneum* Herbst, Coleoptera, Tenebrionidae in the Sudan Gezira. J. Stored Prod. Res. 24 (2):101-106.
2. ANONIMO, 1957. World Health Expert Committee on Insecticides, 7<sup>th</sup> Report. WHO Technical Rep. Ser. Nº 125.
3. ANONIMO, 1970. Métodos recomendados para la detección y medición de la resistencia de plagas agrícolas a los plaguicidas. Método provicional para adultos del gorgojo de la harina y del afrecho, *Tribolium castaneum* (Herbst). Método Nº 6 de la FAO. Boln. fitosan. 18:107-113.
4. ANONIMO, 1974. Métodos recomendados para la detección y medición de la resistencia de plagas agrícolas a los plaguicidas. Método provicional para gorgojos adultos importantes en cereales almacenados, con malatión o lindano. Método Nº 15 de la FAO. Boln. fitosan. 22:127-137.
5. ANONIMO, 1975. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some mayor pest species of stored cereals, with methylbromide and phosphine. FAO Nº 16, 23 (1):12-25.
6. ARBOGAST, R. T., 1989. Detritus as a factor influencing population growth rates of three tenebrionid beetles in stored corn. J. Entomol.Sci. 24 (4) : 454-459.
7. ASPEREN, K. van, 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Ins. Physiol. 8:401-416.
8. ASPEREN, K. van, OPPENOORTH, F.J., 1959. Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. Ent. exp. appl. 2:48-57.
9. AYAD, A., GEORGHIOU, G.P., 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensivity of acetylcholinesterase. J. Econ. Ent. 68: 295-297.

10. BACON, O.G., RELEY, W.D., ZWEIG, G., 1964. The influence of certain biological and environmental factors on insecticide tolerance of the *Lygus* bug *Lygus hespersus*. J. Econ. Entomol. 57: 225-230.
11. BAKER, J.E., 1986. Amylase/proteinase ratios in larval midguts of ten stored-product insects. Entomol. Exp. Appl., 40:41-46.
12. BEEMAN, R.W., SCHMIDT, B.A., 1982. Biochemical and genetics aspects of malathion-specific resistance in the Indianmeal moth (Lepidoptera:Pyralidae). Journ. Econ. Entom. 75:945-949.
13. BERTRAND, H.P., 1972. Larves et nymphes des Coleoperes Aquatiques du globe. 804 pág.
14. BINNS, T.J., 1986. The comparative toxicity of malathion, with and without the addition of triphenyl phosphate, to adults and larvae of a susceptible and two resistente strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : Tenebrionidae). J. stored Prod. Res. 22(2):97-101.
15. BROWN, T.M., DE VRIES, D.H. and BROWN, A.W.A., 1978. "Induction of resistance to insect growth regulators". Journal of Econ. Entom., 71(2):223-229.
16. BRY, R., DAVIS, R., 1985. *Tribolium confusum* y *Tribolium castaneum*. In Handbook of insect rearing. Vol. 1, Sing, P. y Moore, R.F. Eds.
17. BUSVINE, J. R., 1971. A critical review of the Techniques for testing insecticides. London, Commonwealth Agricultural Buraux, 345 pág.
18. CERF, D.C. , GEORGHIOU, G.P., 1974. Cross-resistance to an inhibitor of chitin synthesis, TH 60-40, in insecticide-resistant strains of the housefly. J. Ag.Food Chem., 22:1145-1146.
19. CHON, W.K., HONG, Y. S., RYOO, M. I., 1991. A note on the development of *Tribolium castaneum*, Coleoptera, Tenebrionidae on brown rice *Oryza sativa* L. Korean J. Appl. Entomol. 30 (2):130-136.



20. CICHY, D., 1969. The influence of some ecological factors on the susceptibility of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Col. Tenebrionidae) to Pybuthrin. Journ. Stored Prod. Res., 2:211-228.
21. CICHY, D., 1971. The role of some ecological factors in the development of pesticide resistance in *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* Herbst. Ekologia Polska, 19 (36) : 563-616.
22. COHEN, E., SVERDLOV, E., WOOL, D., 1977. Expression of esterases during ontogenesis of the flour beetle *Tribolium castaneum*, Tenebrionidae, Coleoptera. Biochem. Genet. 15, (3-4):253-264.
23. DAVIDSON, G., 1974. Genetic control of insect pests. Academic Press, 158 pág.
24. DOSIO, L., PADIN, S., 1979. Informe no publicado de la Cátedra de Terapéutica Vegetal de la Fac. de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.
25. DYTE, C.E., BLACKMAN, D.G., 1972. Laboratory evaluation of organophosphorus insecticides against susceptible and malathion resistant strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae) Journ. Stored Prod. Research. 8 (2): 103-109.
26. DYTE, C.E., 1972. Resistance to synthetic juvenile hormone in a strain of the flour beetle *Tribolium castaneum*. Nature (London) 238:48
27. EL HALFAWY, M., 1972. Differentiation of sexes in *Tribolium confusum*. Agric. Res.Rev. (Cairo) 50 (1):65-66.
28. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSONE, R.H., 1961. A new and rapid colorimetric determinations of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmac., 7:88-95.
29. FERRERO, A., 1988. Determinación de los factores de resistencia a malatión en una cepa de *Tribolium castaneum*. Tesis doctoral.

30. FERRERO, A., WOOD, E., PICOLLO de VILLAR, M.I., REALE, C., ZERBA, E., 1991. Relación entre la actividad de esterasas y la resistencia a malatión en una cepa de *Tribolium castaneum*. Acta Bioq. clín. Latinoam. 25 (4): 435-442.
31. FONTAN, A., ZERBA, E., 1987. Mode of entry of insecticides in *Triatoma infestans*. Arch.of insect biochem. and physiol. 4 : 313-323.
32. FUJII, K., 1975. A general simulation model for laboratory insect populations . Part 1. From cohort of eggs to adult emergences. Res. Popul. Ecol. (Kyoto) 17,(1):85-133.
33. GEORGHIOU, G.P., 1982. The surveillance of pest resistance to insecticides in agriculture. In Resistance to Insecticides used in Public Health and Agriculture. Proceedings of an international workshop.
34. GEORGHIOU, G.P., 1986. 2nd International Symposium. Colymbari, Crete, Greece. Ed. por A.P. Economopoulos. Distr. por Elsevier Science Publ.
35. GEORGHIOU, G.P., MELLON, R.B. ,1983. Pesticide resistance in time and space. In In Pest Resistance to pesticides. Ed G.P. Georghiou and T. Saito. Plenum Press, 809 pág.
36. GEORGHIOU, G.P., SAITO, T., 1983. Pest resistance to pesticides. Plenum Press, 809 pág.
37. GOMORI, G., 1952. Microscopic histochemistry. Principles and practice. Universidad de Chicago Press, Chicago.
38. HAGRAS, A. E., 1986. Effect of diet space and temperature on longevity of female rust-red flour beetle *Tribolium castaneum*. Ann.Agric. Sci., (Cairo) 31,(2):1417-1426.
39. HAGSTRUM, D. W., MILLIKEN, G. A., 1988. Quantitative Analysis of temperature, moisture and diet factors affecting insect development. Ann. Entom. Soc. Am. 81 (4) : 539-546.

40. HAGSTRUM, D. W., MILLIKEN, G. A., 1991. Modeling differences in insect developmental times between constant and fluctuating temperatures. *J. Econ. Ent.* 84 (4):369-379.
41. HAGSTRUM, D.W., LEACH, C.E., 1973. Role of constant and fluctuating temperatures in determining development time and fecundity of three species of stored-products Coleoptera. *Annals Entom. Soc. Am.* 66 (2):407-410.
42. IMURA, O., 1991. A comparative study of the feeding habits of *Tribolium freemani* Hinton and *Tribolium castaneum* (Herbst), Coleoptera, Tenebrionidae. *Appl. Entomol. Zool.* 26 (2): 173-182.
43. KANDIL, M.A., FAHMY, H.S.M., BARAKAT, A.A., BADAWY, H.M.A., 1985. Cholinesterase levels in the life stages of the confused flour beetle *Tribolium confusum*. *Bull. Soc. Entomol. Egypte.* 0 (64):145-148.
44. KASHI, K.P., 1972. Appraisal of fenitrothion as a mising grain-protectant. *International Pest Control*, Jan-Feb pp 20-22.
45. KEM, T.R., 1979. *Journal of Entomol. Research* 3 (1):38-41.
46. KOURA, A., RISK, S., EL HALFAWY, M., ALY, F.D., 1971. Type of food as a factor influencing the longevity of some stored products insects. *Agr. Res. Rev.* 49:30-33.
47. LHALOUI, S., HAGSTRUM, D.W., KEITH, D.L., HOLTZER, T.O., BALL, H.J., 1988. Combined influence of temperature and moisture on reproduction on whole grain wheat. *J. Econ. Entom.* 81 (2):488-489.
48. LI, L.; ARBOGAST, R. T., 1991. The effect of grain breakage on fecundity development survival and population increase in maize of *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 27(2):87-94.
49. LICASTRO, S.A.de, ZERBA, E., CASABE, N., 1983. The relation between viscosity and penetration of some Diethyl p-substituted phenyl phosphorothionates and oil carriers into the cuticle of *Triatoma infestans*. *Pest Biochem. and Physiol.* 19:53-59.

50. LITCHFIELD, J.T., WILCOXON, E., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J.Exptl.Therap.* 96:99.
51. LLOYD, C.J., RUCZKOWSKY, G.E., 1980. The cross-resistance to pyrethrins and eight synthetic pyrethroids, of an organophosphorus-resistant strain of the rust-red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pestic.Sci.* 11:331-340.
52. LOPEZ AVILA, A., 1985. Biological aspects of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Rev. Colomb. Entomol.* 11 (1):28-31.
53. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193:265-275.
54. MELANDER, A., 1914. Can insects become resistant to spray? *Jour. Econ. Entom.* 7:167-172.
55. METCALF, C.L., FLINT, W.P., 1980. Insectos destructivos e insectos útiles. Sus costumbres y su control. C.E.C.S.A. 1206 pág.
56. NOIMAN, S., WOOL, D., 1982. Genetic and ecological properties of malathion resistance in a "field" strain of the flour beetle, *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Z. Ang. Ent.* 93: 496-503.
57. OPPENOORTH, F.J. , 1985. "Biochemistry and genetics of insecticide resistance", in "Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, vol 12, ed G. KERKUT and L.GILBERT, Pergamon Press.
58. OPPENOORTH, F.J., 1965. Biochemical genetics of insecticide resistance. *Ann. Rev. Ent.* 10:185-206.
59. OPPERT, B., MORGAN, T.D., CULBERTSON, C., KRAMER, K.J., 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. and Physiol.* 105 C (3):379-385.

60. PAJNI, H.R.; VIRK, N., 1982. Observations on some aspects of the biology of *Tribolium castaneum* Coleoptera, Tenebrionidae. Res. Bull. Panjab Univ. Sci. 33(1-2):155-159.
61. PARKIN, E.A., 1965. The onset of insecticide resistance among field populations of stored products insects. Journ. Stored Prod. Res. 1:3-8
62. PICOLLO de VILLAR, M., FERRERO, A., SECACCINI, E., ZERBA, E., 1992. Perfil de toxicidad de insecticidas en cepas susceptibles y resistentes al malatión en *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 51 (1-4):71-78.
63. PICOLLO, M.I., 1992. Mecanismos bioquímicos y fisiológicos de resistencia. Conferencia dictada en el Taller: "Resistencia a Insecticidas: un problema ecotoxicológico". Fac. Cs. Ex. y Nat., Univ. Nac. de La Pampa.
64. PICOLLO, M.I., SECACCINI, E., ZERBA, E., 1985. Resistencia a malatión en insectos plaga de grano almacenado de la República Argentina. IDIA, Set.-Dic. 59-63.
65. PLAPP, F.W.; WANG, T.C., 1983. Genetic origins of insecticide resistance. In Pest Resistance to pesticides. Ed G.P. Georghiou and T. Saito. Plenum Press, 809 pág.
66. PLUMMER, D.T., 1978. An introduction to practical biochemistry. McGraw-Hill, 362 pág.
67. RAJAK, R. L., GHATE, M., KRISHNAMURTHY, K., 1973. Bioassay technique for resistance to malathion of stored product insects. International Pest Control, Nov-Dic.
68. RANO, M.L., GREEMBERG, A.E., TRAAS, M.J., Eds., 1976. Standar methods for the examination of water and waste waters. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.
69. RIPPER, N., GREENSLADE, R., HARTLEY, G., 1951. Selective insecticides and biological control. J. Econ. Ent., 44:448-459.

70. RIVERA, S.T., STEINHAEUER, A.L., 1962. DDT susceptibility of *Drosophila melanogaster* in relation to dietary aminonitrogen. J.Econ. Entom. 55: 393-395.
71. SALEEM, M. A.; SHAKOORI, A. R., 1989. Toxicity of malathion, permethrin and cypermethrin against resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* Herbst. Pak. J. Zool. 21(4) : 347-360.
72. SALEEM, M.A., SHAKOORI, A.R., 1990. The toxicity of eight insecticides to sixth instar larvae and adult beetles of *Tribolium castaneum* (Herbst.). Pakistan J. Zool., 22(3):207-216.
73. SCHWARTZ, B. E., BURKHOLDER, W. E., 1991. Development of the granary weevil (Coleoptera: Curculionidae) on barley, corn, oats, rice, and wheat. J. Economic. Entomol. 84 (3): 1047-52.
74. SERANTES, H. , HARO, A., 1980. Insectos y ácaros del grano almacenado. Biología, daños, control. 35 pág.
75. SHARMA, V.H., 1985. Optimal ovipositional period in relation to number of eggs laid by *Sitophilus oryzae* (Linn.) in different wheat varieties. J. Ent. Res., 9 (2):160-164.
76. SINGH, R N.; KRISHNA, S. S., 1982. Effects of certain dietary regimes and exteroceptive factors associated with the developing pupa of *Tribolium castaneum* on the insect reproductive programming. Mitt. Zool. Mus. Berl. 57(1) : 5-10.
77. SINGH, R. N.; KRISHNA, S. S., 1985. Effect of particle size of adult food on the reproductive capacity of *Tribolium castaneum* Coleoptera, Tenebrionidae. Anz. Schaedlingskd pflanzenschutz umweltschutz 58(1): 17-18.
78. SMISSAERT, H.R., 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. Science 143:129-131.

79. STADLER, T., 1988. Standarización de las variables ecofisiológicas durante el desarrollo de *Sitophilus oryzae* (L) (Coleoptera: Curculionidae). Bol. San. Veg. Plagas , 14:541-552.
80. SUBBA, J. R., 1976. Studies on qualitative 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). Entomologists Newsletter 6:22.
81. TABASHNIK, B.E., FINSON, N. JOHNSON, M., 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 84 (1): 49-55.
82. TAKADA, Y., 1992. Can a new pyrethroide kill *kdr*- type houseflies? Sumitomo Pyrethroid 19: 12-15.
83. TEOTIA, T.P.S., SINGH, V.S., 1968. On the oviposition behaviour and development of *Sitophilus oryzae* in various natural foods. Indian J. Ent., 30 (2):119-124.
84. WILLIAMS, J. O., 1989. Influence of temperature and humidity on the biology of insecticide-resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* Herbst. Coleoptera, Tenebrionidae. Insect Sci. Appl. 10 (5) : 607-616.
85. WINTERINGHAM, F., BARNES, J.M., 1955. Comparative response of insects and mammals to certain halogenated hydrocarbons used as insecticides. Physiol. Rev. 35: 701-739.
86. WOOL, D., KAMIN-BELSKY, N., 1983. Age dependent resistance to malathion in adult almond moths, *Ephesia cautella* (Walker). Z. ang. Ent. 96:386-391.
87. YUN, Y.P., 1947. Toxicity of fumigants: *Tribolium*. Tech. Bull. Minn. agric. Exp. Sta., nº 177, 104pág.

88. ZERBA, E.N., 1992. Resistencia a insecticidas. Evolución del problema y perspectivas futuras. Conferencia dictada en el Taller: "Resistencia a Insecticidas: un problema ecotoxicológico". Fac. Cs. Ex. y Nat., Univ. Nac. de La Pampa.