



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS DE BIOENSAYO EN LA
DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE INSECTICIDAS EN
Sitophilus zeamais Motschulsky (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

FILEMÓN MORALES HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS DE BIOENSAYO EN LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE INSECTICIDAS EN *Sitophilus zeamais* Motschulsky (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)** realizada por el alumno: **Filemón Morales Hernández** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. ÁNGEL LAGUNES TEJEDA

ASESOR

DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL

ASESOR

DR. JESÚS ROMERO NAPOLES

ASESOR

DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre 2014

COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS DE BIOENSAYO EN LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE INSECTICIDAS EN *Sitophilus zeamais* Motschulsky (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

Morales Hernández Filemón, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

El bioensayo como método de evaluación de efectividad de insecticidas es un instrumento de apoyo en la toma de decisiones en el manejo de insecticidas. En este trabajo se comparó la actividad de paratión metílico, clorpirifos etil, malatión, metomilo, permetrina y fenvalerato en el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) con cuatro métodos de bioensayo. Los métodos comparados fueron: aplicación tópica, aspersion, exposición residual en frascos y en papel filtro. Se usaron las CL_{50} 's y las pendientes de las líneas dosis-Probit como parámetros de comparación. En el método de papel filtro se obtuvieron por lo general las CL_{50} 's más altas. En el caso de permetrina y fenvalerato, se encontraron valores mayores de las pendientes de las Líneas dosis Probit, que indican cierta heterogeneidad en la respuesta a estos insecticidas.

PALABRAS CLAVE: Efectividad de insecticidas, Línea Dosis-Probit.

COMPARISON OF FOUR BIOASSAY METHODS FOR DETERMINING TOXICITY OF INSECTICIDES ON *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)

Morales Hernández Filemón, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

The bioassay as a method to evaluate the effectiveness of insecticides is a tool to support decision-making in the management of insecticides. In this paper the activity of methyl parathion, ethyl chlorpyrifos, malathion, methomyl, permethrin and fenvalerate was compared using maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) with four methods of bioassay. The methods compared were: topical application, spray, residual exposure on vials and filter paper. The LC_{50} and slopes of the dose-probit line were used as parameters for comparison among the four methods. In the method of spraying the lower LC_{50} 's were obtained. In the case of permethrin and fenvalerate, higher value of the Dose-Probit Line slopes was found; this indicates some heterogeneity in the response to these insecticides.

KEYWORDS: Effectiveness of insecticides, Dose-Probit Linea

DEDICATORIA

A mis padres: Ma. del Carmen y Filemón, por su apoyo, cariño y confianza.

A mi esposa: Mayra, por su amor y apoyo.

A mis hermanos: Josefina y Adolfo, por su apoyo y cariño.

A mi país: México, que gracias a él he tenido la oportunidad de estudiar y lograr mis metas.

A toda mi familia y amigos, que creen en mí y me apoyan a superarme, por su comprensión, amistad, consejos y tolerancia, a mis seres queridos que sin su consentimiento les he robado su tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, quién por medio del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) me apoyaron con una beca para poder realizar mis estudios de Maestría, sin la cual no hubiera sido posible este logro.

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional y alcanzar esta meta académica.

Agradezco a los profesores integrantes de mi Consejo Particular: al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, al Dr. Jesús Romero Napoles, al Dr. Ángel Villegas Monter por sus aportaciones y críticas constructivas para el mejoramiento de este trabajo y especialmente al Dr. Ángel Lagunes Tejeda por su confianza, por su tiempo dedicado, por su paciencia, por su valioso apoyo y enseñanza brindada.

A mis compañeros y amigos por su apoyo, por escucharme, por su compañía en gratos momentos durante la carrera y por su valiosa amistad.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo general	4
2.2	Objetivos particular	4
3	REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1	El bioensayo.....	5
3.1.1	Importancia del bioensayo.....	6
3.1.2	Tipos de bioensayo	6
3.1.2.1	Bioensayos directos	6
3.1.2.2	Bioensayos indirectos	6
3.1.3	Resultados de un bioensayo	8
3.1.4	Factores que afectan a un bioensayo.....	9
3.1.5	Ventana de respuesta biológica	9
3.1.6	Líneas base de susceptibilidad.....	10
3.1.7	Líneas dosis probit (Ldp)	10
3.1.7.1	Propiedades de la línea Ldp	11
3.1.8	Criterios para un buen bioensayo.....	12
3.2	Importancia del maíz en México.....	13
3.3	Almacenamiento de granos.....	13
3.4	Plagas de granos almacenados	14
3.5	Gorgojo del maíz <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky	16
3.5.1	Origen y distribución.....	16
3.5.2	Descripción morfológica	16
3.5.3	Posición taxonómica.....	17
3.5.4	Biología y hábitos	17
3.5.5	Importancia económica.....	18
3.5.6	Manejo del gorgojo <i>Sitophilus zeamais</i>	19
3.5.6.1	Protectores minerales y vegetales	19
3.5.6.2	Control químico	20
3.6	Resistencia a insecticidas	20

4	MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1	Ubicación del experimento	21
4.2	Diseño experimental	22
4.3	Insecticidas	22
4.4	Población de insectos	24
4.5	Bioensayos.....	24
4.5.1	Método de aplicación tópica	24
4.5.2	Método de exposición residual en frascos.....	25
4.5.3	Método de aspersión	25
4.5.4	Método de exposición residual en papel filtro.....	25
4.6	Análisis estadístico.....	26
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1	Comparación de la toxicidad de los insecticidas por método de bioensayo.....	27
5.1.1	Método de aplicación tópica	27
5.1.2	Método de exposición residual en frascos.....	30
5.1.3	Método por aspersión.....	32
5.1.4	Método de exposición residual en papel filtro.....	34
5.2	Comparación de los métodos de bioensayo por insecticida.....	37
5.2.1	Paratión metílico.....	37
5.2.2	Clorpirifos etil.....	39
5.2.3	Malatión.....	41
5.2.4	Metomilo.....	43
5.2.5	Permetrina.....	45
5.2.6	Fenvalerato.....	47
6	CONCLUSIONES	49
7	LITERATURA CITADA.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Relación de insecticidas evaluados mediante cuatro métodos de bioensayo.....	23
Cuadro 2. DL₅₀ y DL₉₅ de varios insecticidas para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por el método de aplicación tópica.	28
Cuadro 3. CL₅₀ y CL₉₅ de varios insecticidas para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por el método de exposición residual en frascos.	31
Cuadro 4. CL₅₀ y CL₉₅ de varios insecticidas para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por el método de aspersión.	33
Cuadro 5. CL₅₀ y CL₉₅ de varios insecticidas para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por el método de exposición residual en papel filtro.	35
Cuadro 6. CL₅₀ y DL₅₀ de paratión metílico para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.....	37
Cuadro 7. CL₅₀ y DL₅₀ de clorpirifos etil para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.....	39
Cuadro 8. CL₅₀ y DL₅₀ de malatión para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.	41
Cuadro 9. CL₅₀ y DL₅₀ de metomilo para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.	43
Cuadro 10. CL₅₀ y DL₅₀ de permetrina para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.....	45
Cuadro 11. CL₅₀ y DL₅₀ de fenvalerato para <i>Sitophilus zeamais</i>, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Líneas dosis probit (Ldp) para paratión metílico en <i>Sitophilus zeamais</i>, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.	38
Figura 2. Líneas dosis probit (Ldp) para clorpirifos etil en <i>Sitophilus zeamais</i>, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.	40
Figura 3. Líneas dosis probit (Ldp) para malatión en <i>Sitophilus zeamais</i>, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.	42
Figura 4. Líneas dosis probit (Ldp) para metomilo en <i>Sitophilus zeamais</i>, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.	44
Figura 5. Líneas dosis probit (Ldp) para permetrina en <i>Sitophilus zeamais</i>, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.	46
Figura 6. Líneas dosis probit (Ldp) para fenvalerato en <i>Sitophilus zeamais</i>, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.	48

1 INTRODUCCIÓN

En la utilización racional de insecticidas contra una plaga en un cultivo determinado se requiere de la evaluación previa de la efectividad de los productos a emplear, pues aunque existan pruebas de efectividad realizadas para el registro y autorización oficial de los productos, la diversidad genética puede hacer que una población de la plaga responda diferente al insecticida. Esto puede disminuir el uso de productos no efectivos que encarecen la producción y contaminan el medio.

Lagunes y Villanueva (1994), definen al bioensayo como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de una sustancia o material se miden en términos de la respuesta biológica que produce. Mientras que Rodríguez *et al.* (2009) lo definen como cualquier evaluación que involucra organismos vivos. Lagunes y Vázquez (1994) señalan que el bioensayo puede ser usado para establecer la efectividad de un insecticida contra una especie y determinar, cualitativa o cuantitativamente, la resistencia a insecticidas de una muestra poblacional de cierta especie. Scharf (2008) señala que en el bioensayo, los experimentos deben ser cuidadosamente diseñados de manera que se obtenga información estadísticamente válida, estas consideraciones incluyen aleatorización de los individuos a prueba, tratamientos testigo, número de repeticiones y métodos de exposición de los insectos al tóxico, por mencionar algunos. Por otra parte, Champ y Campbell-Brown (1970) mencionan que un mejor método de bioensayo es aquel, en el que en el análisis de regresión lineal tenga menor heterogeneidad de datos, que la línea de regresión presente una pendiente pronunciada y que tenga la más baja dosis o concentración letal mediana.

Según Rodríguez *et al.* (2009), si se grafican los datos del estímulo contra la respuesta, se obtendrá una línea sigmoide asimétrica, y para obtener una línea recta, es necesario que la respuesta (mortalidad) se transforme a unidades probit y que las dosis de insecticidas se transformen a la función $\text{Log}_{10}(\text{dosis})$. Según Robertson *et al.* (2007) después de realizar las transformaciones de las dosis a logaritmos y de la mortalidad a unidades probit, se debe realizar entre estos, un ajuste de regresión lineal ($Y = a + b \cdot x$), al cual se le conoce como línea dosis probit (Ldp).

Lagunes y Villanueva (1994) indican que la linealidad de la respuesta, reproducibilidad, uso de dosis precisas, seguridad en la determinación de la respuesta, el medio ambiente constante, son criterios que se deben tomar en cuenta para un buen bioensayo. Los mismos autores señalan que para obtener una línea recta al graficar las líneas dosis-Probit (Ldp), es necesario que exista distribución normal de la respuesta al tóxico y que dos características de esta línea son la posición y la pendiente. La posición indica la toxicidad del compuesto usado y qué tan rápido llega el insecticida al sitio de acción, lo cual se observa cuando se comparan métodos de bioensayo usando el mismo insecticida. La pendiente (b) es la proporción o tasa de cambio en la mortalidad, con respecto al cambio unitario en la dosis y entre mayor sea el valor de la pendiente más vertical es la línea y con el mismo incremento de dosis hay mayor efecto, además de que la pendiente indica la homogeneidad de la población en su respuesta al tóxico, pues debido a que, a mayor pendiente, más homogeneidad.

Por otra parte, se estima que del 5 a 10 % de la producción mundial de granos se pierde a causa de los insectos plaga, lo que equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar a 130 millones de personas anualmente (Casini y Santajuliana, 2008).

En América Latina, entre 30 y 40 % de la producción de maíz se pierde durante el almacenamiento (Lagunes, 1994). De las plagas asociadas a los granos almacenados, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) se considera la que más daño puede provocar (Arienilmar *et al.* 2005) por lo que este trabajo se tomó como modelo al gorgojo del maíz *S. zeamais* que se encuentra presente en México y que es de las plagas más destructivas en granos almacenados según Pérez (1993). El mismo autor ha reportado fallas en el control de este insecto con insecticidas, posiblemente debido al desarrollo de resistencia.

En lo que se refiere a la resistencia a insecticidas, fenómeno biológico de micro evolución a nivel regional, ha sido definida como “un cambio heredable en la sensibilidad de una población de insectos que se refleja en el fracaso repetido de un producto para alcanzar el nivel esperado de control, cuando se usa de acuerdo a la recomendación de la etiqueta” (IRAC, 2014). En cuanto a los insectos plaga del orden coleóptera, al cual pertenece el género *Sitophilus*, existen 1,185 casos de resistencia reportados en The Arthropod Pesticide Resistance Database (2014) de la Universidad del Estado de Michigan de los Estados Unidos, de los cuales 249 casos pertenecen a la familia Curculionidae, 89 casos al género *Sitophilus* y 32 casos a *S. zeamais*. Los primeros casos fueron reportados en el año 1965 en Kenya, Australia y Trinidad y Tobago. Para México existe un caso reportado por Pérez (1999), en donde ratios de resistencia de 1.3 a 14.1 veces a DDT.

Este trabajo se realizó con el objetivo de comparar cuatro métodos de bioensayo: 1) aplicación tópica, 2) aspersion, 3) método residual en frascos y 4) método residual en papel filtro, para paratión metílico, clorpirifos etil, malatión, metomilo, permetrina y

fenvalerato, en una población de *S. zeamais*, además de conocer el grado de resistencia de esta población a estos seis insecticidas y determinar las líneas base para poder usarlas en trabajos posteriores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Comparar los métodos de bioensayo: aplicación tópica, aspersion, exposición residual en frascos y exposición residual en papel filtro.

2.2 Objetivos particular

- Evaluar la susceptibilidad en adultos de *Sitophilus zeamais* de una población de Texcoco, Estado de México a paración metílico, clorpirifos etil, malatión, metomilo, permetrina y fenvalerato.
- Determinar las líneas base a estos insecticidas para poder usarlas en trabajos posteriores.

3 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 El bioensayo

En bioensayo como herramienta de la toxicología de insecticidas es definido por Lagunes y Villanueva (1994) como cualquier método por medio del cual alguna propiedad toxica de una sustancia o material se mide en términos de respuesta biológica que produce, por otra parte Finney (1971) señala a un bioensayo como ensayo biológico, definiéndolo como una medición de la potencia de un estímulo físico, químico, biológico, fisiológico o psicológico, por medio de las reacciones que éste produce sobre la materia viva. Más recientemente Rodríguez *et al.* (2009) señalan que el bioensayo es una metodología usada en la evaluación de insecticidas en laboratorio y es fundamental para la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades insecticidas, así como en la detección y evaluación periódica de la resistencia. Por su parte, Robertson *et al.* (2007) señalan que el bioensayo es un experimento en el cual un organismo vivo es usado como un sujeto prueba, en donde un estímulo es aplicado y el organismo responde y esa respuesta es medida. En resumen, el concepto de bioensayo de una manera restringida a la toxicología de insecticidas es una metodología útil para determinar la respuesta de insectos plaga a sustancias tóxicas.

Lagunes y Villanueva (1994) señalan que el bioensayo está compuesto por el estímulo y la respuesta; en donde el estímulo es el agente que produce la respuesta y la respuesta es el efecto que produce la aplicación del estímulo sobre el organismo.

3.1.1 Importancia del bioensayo

La importancia del bioensayo radica de acuerdo al objetivo del mismo, ya que según Lagunes y Villanueva (1994) los objetivos de un bioensayo pueden ser: la determinación de la eficacia de varios tóxicos contra una población de insectos, la determinación de la susceptibilidad de diferentes razas o especies de artrópodos a un tóxico o de un tóxico en un sustrato. Por otra parte Rodríguez *et al.* (2009) destacan que la importancia del bioensayo está en la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades insecticidas y en la detección y monitoreo de la resistencia, también afirma que los datos que se obtienen en laboratorio no son necesariamente una representación de lo que sucede en el campo, pero sirven de apoyo para tomar decisiones en campo.

3.1.2 Tipos de bioensayo

Lagunes y Villanueva (1994) y Rodríguez *et al.* (2009) los clasifican en bioensayos directos e indirectos.

3.1.2.1 Bioensayos directos

Se refiere a un bioensayo en donde se aplica una dosis única a un animal, buscándose generalmente una respuesta fisiológica. Estos bioensayos no hacen inferencia a una población, pues la respuesta se mide exclusivamente en el organismo de interés.

3.1.2.2 Bioensayos indirectos

Estos consisten en la aplicación de una dosis a una muestra representativa de una población, de manera de que los resultados puedan ser atribuidos a la población de donde se extrajo la muestra. En estos bioensayos se obtienen respuestas de tipo

cuantal. De acuerdo a la forma en que se realizan los bioensayos indirectos Rodríguez *et al.* (2009) mencionan tres formas de bioensayo: de aplicación tópica; que son aquellos en donde la concentración del tóxico se deposita de forma directa sobre alguna parte del cuerpo, por inyección; lo cual consiste en inyectarlo disuelto en una base salina al cuerpo del insecto y de aplicación residual; en donde el tóxico se aplica al ambiente donde se encuentra el organismo de prueba.

3.1.2.2.1 Tipos de bioensayos indirectos

Según Lagunes y Villanueva (1994) hay muchas formas de administrar insecticidas para evaluar toxicidad, pero el método más empleado para insectos, es la aplicación tópica, en donde se disuelve el insecticida en un solvente inocuo y volátil, como la acetona; después se coloca en una parte conocida del insecto, usualmente en el protórax. El método de inyección se utiliza para conocer la cantidad exacta de insecticida que entra al cuerpo del insecto y el insecticida se disuelve en glicol propileno o en aceite de cacahuete o maíz y se inyecta en la cavidad del cuerpo en el abdomen o en la región intersegmental, tratando de evitar dañar al cordón nervioso abdominal.

El método de exposición residual, es otra forma de dejar al insecto expuesto al insecticida, pues el insecticida diluido en un solvente se aplica sobre una superficie y después se ponen en contacto los insectos, el solvente se evapora y sólo queda el insecticida impregnado a la dosificación deseada (Lagunes y Villanueva, 1994).

De acuerdo al modo de vida del insecto existen formas de probar la efectividad de los insecticidas. El método de inmersión de hojas en ácaros, el de fumigación contra

plagas de granos almacenados y el de alimentación para larvas, se usan con mucha frecuencia. En todos los casos, los resultados son relativos y se comparan con los efectos conocidos de insecticidas convencionales (Lagunes y Villanueva, 1994).

3.1.3 Resultados de un bioensayo

Lagunes y Vázquez (1994) señalan que en el bioensayo se estima la cantidad de estímulo necesario para obtener respuesta en determinada porción de individuos y que por razones estadísticas se determina el estímulo necesario para obtener una respuesta de 50% de los organismos de prueba, este valor se denomina “dosis letal cincuenta” (DL_{50}) y es una expresión cuantitativa de la tolerancia de una población en particular, a una insecticida, bajo ciertas condiciones experimentales. Según Lagunes y Villanueva (1994) en los casos en que no se sabe la cantidad de tóxico que entra en contacto con el insecto, pero si se sabe cuál es la cantidad de insecticida que rodea al organismo se usa el término de CL_{50} (concentración letal cincuenta). Cuando los organismos se exponen a una misma dosis o dosificación, pero las evaluaciones de mortalidad se hacen a diferentes tiempos se considera el término TL_{50} (tiempo letal cincuenta).

Lagunes y Vázquez (1994) señalan que para expresar la respuesta de una población de insectos a un tóxico se grafican las unidades probit del porcentaje de mortalidad, contra una escala logarítmica de la dosis, ya que mencionan que se ha observado que muchos procesos bioquímicos y fisiológicos sufren incrementos iguales cuando el estímulo se incrementa logarítmicamente, lo cual se establece en la ley de Weber y Fechner, donde menciona que el cambio en magnitud o intensidad de una respuesta

biológica, no es proporcional a un cambio aritmético en el estímulo, sino a un cambio logarítmico.

3.1.4 Factores que afectan a un bioensayo

Según Champ y Dyte (1976) las respuestas de una población al estímulo en un bioensayo está en función de factores inherentes al organismo de prueba como la condición fisiológica del insecto, la edad, sexo, instar, peso y origen de los insectos, de igual manera está en función de factores inherentes al procedimiento experimental, dentro de los cuales se incluyen los factores ambientales, la alimentación de los insectos, el método de exposición al insecticida, la dosis utilizada, criterios de respuesta, tiempo de exposición, solventes y tamaño de la muestra. Dado a que la respuesta está condicionada por varios factores es necesario estandarizar todas las variables para obtener datos confiables y obtener solo la expresión del efecto de la dosis aplicada.

3.1.5 Ventana de respuesta biológica

En el proceso de elegir las dosis o dosificación a evaluar en donde según Rodríguez *et al.* (2009), dosis; se refiere a la cantidad exacta de tóxico que se aplica al insecto y dosificación; a la cantidad de tóxico que se aplica al ambiente en donde se encuentra el organismo de prueba; se debe determinar la ventana de respuesta biológica, la cual se refiere a las dosis entre las que se encuentra el cero y el 100% de mortalidad, la cual es un principio general que se debe aplicar en cualquier bioensayo. Esta se determina evaluando de 3 a 5 dosis del tóxico logarítmicamente espaciadas.

3.1.6 Líneas base de susceptibilidad

Según Lagunes *et al.* 2009. definen a la línea base como nivel de susceptibilidad base y se refiere a la respuesta natural de una población a un tóxico en ausencia de la expresión del gen de resistencia, en donde la susceptibilidad a insecticidas tiene una distribución normal y en la población algunos individuos son altamente sensibles, otros poseen una sensibilidad reducida, mientras que la mayoría tiene un valor medio. Por otra parte Rodríguez *et al.* 2009 se refieren a las líneas base como líneas de referencia y mencionan que sirven para comparar DL_{50} o DL_{95} con una población de campo y la diferencia en respuesta que exista entre la población de campo y la línea base obtenida de una población susceptible se atribuye a la resistencia.

3.1.7 Líneas dosis probit (Ldp)

Lagunes y Vázquez (1994) indican que para graficar en un plano de coordenadas el estímulo contra el efecto, se necesita transformar la respuesta, de porcentajes a unidades probit, además de expresar al estímulo en logaritmos, de esta manera se obtiene una línea recta y no una línea sigmoide; en donde cuyos valores no podrían ser fácilmente interpretados. Para obtener una línea recta debe existir necesariamente una distribución normal de la respuesta al tóxico, pero en ocasiones se obtienen líneas Ldp con escalones, lo cual indica que la respuesta de la población al tóxico es bimodal o trimodal, por lo que puede ser posible que haya dos o más poblaciones mezcladas, una más tolerante al tóxico que la otra, y por lo tanto los escalones que se forman son la mezcla de las respuestas de las poblaciones involucradas. Según Robertson *et al.* (2007) después de realizar las transformaciones de las dosis a logaritmos y de la

mortalidad a unidades probit de mortalidad, se debe realizar entre estos, un ajuste de regresión lineal ($Y = a + b \cdot x$), al cual se le conoce como línea dosis probit (Ldp).

3.1.7.1 Propiedades de la línea Ldp

3.1.7.1.1 Pendiente

Según Lagunes y Villanueva (1994) la pendiente representa la proporción de cambio en la mortalidad (Y), con respecto al cambio unitario en la dosis (X). Rodríguez *et al.* (2009) mencionan que a mayor pendiente, la línea dosis-Probit será más vertical; lo cual indica que hay menor variabilidad en la respuesta de la población al insecticida, lo que significa que en un rango estrecho de concentraciones se encuentra el cero y el 100% de respuesta.

3.1.7.1.2 Posición

De acuerdo con Lagunes y Villanueva (1994) la posición de la recta indica la toxicidad de la sustancia usada, pues en una gráfica entre más a la izquierda se encuentre la línea Ldp más tóxica es la sustancia y entre más se encuentre a la derecha es menos tóxica.

3.1.7.1.3 Forma de la líneas Ldp

De acuerdo con Rodríguez *et al.* 2009, la forma de la línea se ajusta a una línea recta cuando la respuesta de la población es de tipo normal y eso se confirma al calcular el valor de χ^2 (ji-cuadrada), el cual debe de ser menor el valor calculado que el valor tabulado. Por otra parte cuando se observan escalones o plataformas en la línea dosis probit, no se ajustan a una línea recta y se puede inferir que la respuesta de la

población es multimodal; por lo que existe una mezcla de genotipos que responde diferente al estímulo o que se tiene problemas de ejecución en el bioensayo.

3.1.8 Criterios para un buen bioensayo

Lagunes y Villanueva (1994) indican que los criterios a considerar para un buen bioensayo son:

- La respuesta de la población al toxico debe ser lineal.
- Precisión en la dosis o dosificación, pues se debe conocer la cantidad de insecticida que se está aplicando.
- En un buen bioensayo debe determinarse claramente si el insecto tratado está vivo o muerto.
- Las condiciones del bioensayo deben ser iguales o similares a las condiciones promedio donde se desarrolla naturalmente la población bajo estudio.
- Se debe corregir la mortalidad natural mediante la fórmula de Abbott (1925), aceptando como máximo un 15% de mortalidad en el testigo.
- Para no afectar la toxicidad del compuesto es necesario que el medio ambiente sea constante.
- El método debe ser sensible para que existan diferencias al cambiar las dosis.
- El método debe ser reproducible, pues las condiciones de los insectos deben ser constantes al momento de la aplicación del tóxico; como el sexo, la edad, la nutrición. Etc.

- Otros aspectos que se deben considerar son: el sitio de aplicación, realizar las repeticiones en días diferentes, realizar los bioensayos en la misma hora del día, usar siempre el mismo solvente y evitar los errores en la conducción del bioensayo.

Por otra parte Champ y Dyte (1976) mencionan que el método más adecuado es aquel que ofrezca los resultados con una menor heterogeneidad de respuesta, una pendiente de la línea log dosis-probit más pronunciada y el menor valor de CL_{50} .

3.2 Importancia del maíz en México

En México el maíz es el cultivo agrícola más importante, desde el punto de vista alimentario, social, industrial y político. Participa con el 18% del valor de producción del sector agrícola (88 mil mdp en 2012 y 78 mil en 2013) y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas). El volumen de producción de maíz en el año 2012 alcanzó 22.1 millones de toneladas y se estima que para el año 2013 se alcanzaron 22.7 millones. Mientras que la superficie de temporal ocupa el 74% de la superficie, aporta únicamente el 40% del valor generado. Todas las entidades del país presentan algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 64.5% del volumen de producción nacional. Sinaloa es el principal productor al concentrar el 16.5% del total. Le siguen en importancia Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero y Veracruz (FND, 2014).

3.3 Almacenamiento de granos

De acuerdo con Ribeiro (1993) la preservación y conservación de las cosechas representan hoy en día una cuestión vital y el propósito del almacenamiento es

preservar la calidad de los productos agrícolas después de su cosecha, limpieza y secado. La producción de granos es discontinua y periódica mientras que su consumo es permanente y no se interrumpe. Para conciliar estos dos aspectos es necesario almacenar la producción. El uso de técnicas adecuadas de producción, cosecha, secado, beneficio, almacenaje y manejo, minimizan el deterioro. El contenido de humedad, la temperatura, los hongos, los insectos, las impurezas presentes en los granos, los daños físicos y los roedores son factores que influyen en su conservación durante el almacenamiento.

3.4 Plagas de granos almacenados

Hernández y Carballo (2014) mencionan que durante el almacenamiento uno de los principales factores que influyen en el deterioro de granos y semillas son los insectos plaga, los cuales dañan los granos por la alimentación directa en el endospermo, causando pérdidas en peso y calidad de los mismos, otras especies plaga se alimentan del embrión, lo que causa una disminución de la viabilidad.

Casini y Santajuliana (2008) estiman que del 5 a 10 % de la producción mundial de granos se pierde a causa de los insectos plaga, lo que equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar a 130 millones de personas anualmente. Según Lagunes (1994) en América Latina, entre 30 y 40 % de la producción de maíz se pierde durante su almacenamiento. De las plagas asociadas a los granos almacenados, *Sitophilus zeamais* Motschulsky se considera la que más daño puede provocar (Arienilmar *et al.* 2005). Según Dell'Orto y Arias (1985), a nivel mundial se conocen más de 250 especies de insectos relacionadas con los granos almacenados y de éstos unos 20 tienen importancia económica, encontrándose principalmente en los órdenes

Coleoptera y Lepidoptera. De acuerdo con García *et al.* (2007) las plagas del maíz almacenado varían de acuerdo con la región, la estación del año y el sistema de almacenamiento. Se consideran plagas primarias aquellos insectos que atacan el grano sin daño previo durante el almacenamiento y pueden sobrevivir en los residuos de grano dentro de la estructura de almacenamiento y muchas veces los daños que provocan los inician desde el campo. Dentro del grupo de plagas primarias se encuentran el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motsch, el barrenador grande del grano *Prostephanus truncatus* (H) y la palomilla de los granos *Sitotroga cerealella* (Oliver). Las plagas secundarias, por otro lado, se alimentan de granos que ya han sido dañados por plagas primarias o sometidos a manejo o procesamiento. Las plagas secundarias tienen una variedad de alimentos más amplia y es posible que hagan su aparición en estados muy tempranos de almacenamiento. Sin embargo, los daños no se consideran de importancia hasta que son causados por plagas primarias. Algunas de las plagas secundarias son la polilla bandeada *Plodia interpunctella* (Hubner), el escarabajo castaño *Tribolium castaneum* (Herbst) y el barrenillo de los granos *Rhyzoperta dominica* (Fabricius) (García *et al.*, 2007).

Por lo tanto, debido al daño causado por las plagas, los granos pierden valor para el consumo, el cultivo o la comercialización. La prevención de la pérdida de calidad por los daños de insectos en granos en almacén es importante para los agricultores, procesadoras de granos y consumidores, bajo estas circunstancias, el más fácil, rápido y económico método para el control de plagas de granos almacenados, es el uso de insecticidas, por lo que los insecticidas han sido una herramienta de manejo eficaz y en muchos casos constituyen el único método factible de reducir las poblaciones de

plagas a niveles aceptables. Por esta causa en México el control de plagas en productos almacenados son casi completamente dependientes de los plaguicidas (García *et al.*, 2007).

3.5 Gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky

3.5.1 Origen y distribución

El origen de *S. zeamais* no es muy claro pero se supone que es de la India y ha sido diseminado por todo el mundo a través del movimiento comercial de grano (Metcalf y Flint, 1982). Por otra parte Champ y Dyte en 1976 señalaron que este insecto se encuentra prácticamente donde se cultiva maíz, también mencionaron que se ha encontrado en Asia Oriental, Las Indias orientales, el Norte de Australia, la Península Arábiga, en todas las zonas productoras de maíz de África, Argentina, Brasil, América Central, México y los estados del sur de los Estados Unidos de América. En 1961 fue reportada la presencia de esta plaga en México por Ramírez (1960) y aunque este insecto tiene preferencia por maíz, también ha demostrado capacidad de atacar sorgo y otros cereales.

3.5.2 Descripción morfológica

Paez (1987) describe a *S. zeamais*, señalando que los huevecillos son opacos de color blanco, de 0.7 mm de largo por 0.3 mm de ancho, en forma de pera u ovoide. La larva es apoda, de color blanco, de forma cuneiforme y raramente se observa fuera del grano. La pupa es semejante al adulto, cabeza redonda, proboscis delgada y dirigida hacia la parte inferior, con las patas dobladas hacia el cuerpo y con las alas cubriendo a estas, tienen nueve segmentos abdominales, cada uno de los cuales presentan dos

espinas prominentes. El adulto mide de 2.5 a 4.5 mm de longitud, es de color café oscuro de cuerpo cilíndrico y con la cabeza prolongada en un pico o proboscis de donde soporta un par de mandíbulas resistentes. El tórax se encuentra marcado con punturas redondas y los élitros tienen en sus ángulos exteriores cuatro manchas de color rojo anaranjado. Las antenas son acodadas y en forma de mazo. Posee alas funcionales con vuelo activo. El abdomen está formado por ocho segmentos.

3.5.3 Posición taxonómica

La especie fue descrita por Motschulsky en 1855, y Triplehorn y Johnson (2004) la clasifica de la siguiente manera Phylum: Artrópoda; Subphylum: Urinamia; Clase: Insecta; Orden: Coleoptera; Familia: Curculionidae; Subfamilia: Dryophthorinae; Genero: Sitophilus; Especie: *S. zeamais*.

3.5.4 Biología y hábitos

Sharifi y Mills (1971) mencionan que el ciclo de vida de *S. zeamais* dura en promedio 36.5 días a una temperatura de 27°C y 70% de humedad relativa, por otro lado Okelana y Osuji (1985) indican que a un temperatura de 28 a 32°C y 70% de humedad relativa la duración es de 35 días. Lagunes *et al.* (1985) describen que la hembra realiza una perforación en el grano, deposita un huevecillo y sella el orificio con una secreción gomosa que produce por el ovipositor, también indica que la incubación de los huevecillos dura aproximadamente dos semanas, después emergen las larvas y comienzan a devorar el contenido del grano, posteriormente pupan dentro del mismo y finalmente emergen del grano como adultos, los cuales son capaces de vivir de 4 a 5

meses. La hembra produce de 300 a 500 huevecillos durante toda su vida y alcanza su máxima producción de 3 a 4 semanas después de la emergencia.

Las larvas pasan por cuatro estadios en el interior del grano donde se alimentan haciendo galerías, las cuales algunas veces son visibles a través de la testa de este. En el cuarto instar las larvas mediante sus secreciones y desechos elaboran una cámara pupal; este estado pupal tiene una duración de 18.1 a 21.6 días y una vez que el adulto emerge no sale inmediatamente al exterior sino que dura de 4 a 5 días alimentándose dentro del grano (Sharifi y Mills, 1971). El adulto puede dispersarse del almacén al campo y lo hace cuando el maíz sembrado tiene entre 50 y 60% de humedad y se encuentra en estado masoso.

3.5.5 Importancia económica

Los daños y pérdidas que causa *S. zeamais* fluctúan mucho y están en función de la variedad del maíz, de la presencia de otras plagas de granos, del clima, del sistema de cosecha, de la forma de almacenamiento, del tipo de almacenes, del manejo del grano en los almacenes y del procesamiento y mercado de los mismos. En la actualidad no existe mucha información de los daños ocasionados por esta especie pero Pérez (1993) menciona que entre las plagas de granos almacenados presentes en México, el gorgojo *S. zeamais* es uno de los más destructivos al maíz y a otros cereales en almacenamiento. Este insecto se encuentra ampliamente distribuido en México y es capaz de infectar el maíz en campo antes de la cosecha.

3.5.6 Manejo del gorgojo *Sitophilus zeamais*

3.5.6.1 Protectores minerales y vegetales

La adición de polvos vegetales y minerales para el maíz almacenado como protección contra daños de insectos ha sido utilizada ampliamente, ya que la prevención de las infestaciones es la clave para proteger los granos almacenados. Las plantas con propiedades insecticidas se han usado por cientos de años pero con la aparición de los insecticidas sintéticos su uso se ha descontinuado (Silva *et al.* 2002). El uso de polvos vegetales es una técnica recuperada de la agricultura de subsistencia de países principalmente de África y América Central (Lagunes y Rodríguez, 1989). Este método de control está teniendo mayor importancia nuevamente y no se limita únicamente al uso del piretro (*Tanacetum cineraiifolium*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y rotenona (*Derris* spp.). Algunos polvos vegetales presentan propiedades deseables en el control de plagas como insecticidas de contacto, sustancias antialimentarias, repelentes o incluso atrayentes (Lagunes, 1994). Los efectos más significativos en el comportamiento de los insectos están relacionados con la selección del hospedero para alimentación y oviposición, y en cuanto a la alteración del metabolismo las consecuencias más importantes son aquellas relacionadas con la duración del ciclo del insecto, fecundidad y sobrevivencia (Rodríguez y Lagunes, 1992). La mayoría de las especies vegetales utilizadas como insecticidas no eliminan al insecto por intoxicación, sino que generalmente inhiben su desarrollo normal, al actuar como repelentes o disuasivos de la alimentación u oviposición, lo cual hace que muchas veces se sobreestimen sus efectos protectores (Silva *et al.*, 2002). El uso más sencillo de estos compuestos en la protección de granos almacenados es como polvos. Las plantas se

secan, luego se muelen, y se mezclan con el grano, lo que modifica el hábitat de las plagas presentes en los granos almacenados. Por otra parte Paez (1987) al evaluar algunos polvos vegetales sobre la mortalidad de *S. zeamais*, encontró que polvos de *Peumus boldus*, *Hippocratea* sp, *Brickella cavanillesis* al 1% tuvieron como resultado mortalidades de 100, 84.7 y 21.6 % respectivamente.

3.5.6.2 Control químico

Los insecticidas son una herramienta muy útil para el control de los insectos plaga, pero debe reconocer que el mal uso de estos puede dar lugar a serios problemas de contaminación y deterioro del ambiente. A largo plazo, los insecticidas pueden llegar a ser inefectivos debido al desarrollo de una población de insectos resistentes; sin embargo, también debe ser reconocido que presentan muchas ventajas y que si son usados correctamente pueden marcar la diferencia entre un buen cultivo o el fracaso total del mismo (Granados, 2001). En México los insecticidas que se encuentran autorizados para el control de *S. zeamais* en grano de Maíz son deltametrina (GRANBIOL y K-OBIOL C.E. 2.5), lindano de uso restringido (LINDANO 1%), malatión (CUIDADOR M, PLAGRANO, TROJE 2000, etc) y pirimifos metil como ACTELLIC 2% (SENASICA, 2011).

3.6 Resistencia a insecticidas

El desarrollo de la resistencia a insecticidas está dado por la selección de una población a través de un insecticida, en donde inicialmente en dicha población existen insectos de origen natural que están pre-adaptados con genes de resistencia para sobrevivir; los cuales transmiten el rasgo de resistencia a sus descendientes. Mediante

la aplicación continua de insecticidas con el mismo modo de acción se propicia la selección de los individuos resistentes, de modo que la proporción de insectos resistentes en la población aumenta, mientras que los individuos susceptibles se eliminan. Bajo la presión de selección permanente, insectos resistentes logran superar en número a los susceptibles y el insecticida ya no es eficaz. La velocidad con que se desarrolla la resistencia depende de varios factores, como la rapidez con que los insectos se reproducen, la migración, el rango de hospederos, la disponibilidad de poblaciones cercanas susceptibles y la persistencia y especificidad del insecticida. La resistencia aumenta más rápido en situaciones tales como invernaderos, donde los insectos o ácaros se reproducen rápidamente, hay poco o nada de inmigración de los individuos susceptibles y existe una alta frecuencia de aplicaciones IRAC (2014).

IRAC (2014) también define resistencia como un cambio hereditario en la susceptibilidad de una población de plagas, la cual se refleja en repetidas fallas de un compuesto en alcanzar el nivel esperado de control, cuando se usa de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta contra esas especies de plagas. Por otra parte Tabashnik *et al* (2014) definen la resistencia en campo como la reducción genética de la susceptibilidad de una población a un insecticida y es causada por la exposición al compuesto en el campo.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

El estudio se llevó acabo de enero de 2014 a septiembre del mismo año, en el laboratorio de Insecticidas Agrícolas del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

4.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para los cuatro métodos de bioensayo y se realizaron cinco repeticiones por cada método. En cada repetición se incluyó un testigo donde se trató con agua o acetona; de acuerdo al método.

4.3 Insecticidas

Para el presente estudio se seleccionaron seis insecticidas, los cuales aunque no están autorizados en México contra *S. zeamais* se utilizaron como representativos de los grupos toxicológicos organofosforados, carbamatos y piretroides y además para determinar líneas base a estos insecticidas. En el Cuadro 1 se muestran características principales de los insecticidas utilizados. Se utilizaron dosis logarítmicamente decrecientes para determinar la ventana de respuesta biológica (rango de 0 a 100 % de mortalidad), y se utilizaron de cinco a ocho concentraciones de insecticidas intermedias en cada bioensayo. Para las soluciones que se utilizaron en los métodos de exposición residual y de aplicación tópica se utilizó acetona (grado analítico) como solvente y para el método de aspersión se utilizó agua destilada.

Cuadro 1. Relación de insecticidas evaluados mediante cuatro métodos de bioensayo.

Nombre comercial	Nombre común	Concentración	Empresa	Grupo químico	Formulación	Registro Sanitario en México ¹	Número de registro CAS ²
Malathion 50% CE	malatión	515 g de i.a. L ⁻¹	Agricultura Nacional S.A. de C.V.	organofosforado	Concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0143-005-009-050	121-75-5
Lorsban 480 EM	clorpirifos etil	480 g de i.a. L ⁻¹	Dow AgroSciences de México S.A. de C.V.	organofosforado	concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0115-004-009-044	2921-88-2
Paration metílico 80%	paratión metílico	800 g de i.a. L ⁻¹	Quimix S.A. de C.V.	organofosforado	Grado técnico	RSCO-INAC-0155-308-018-080	298-00-0
Lannate 90%	metomilo	900 g de i.a. Kg ⁻¹	Dupont México S.A. de C.V.	carbamato	polvo soluble	RSCO-INAC-0146-003-003-090	16752-77-5
Perkill 50% CE	permetrina	500 g de i.a. L ⁻¹	United Phosphorus de México S.A. de C.V.	piretroide	Concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0156-337-009-048	52645-53-1
Fenkill 10% CE	fenvalerato	100 g de i.a. L ⁻¹	United Phosphorus de México S.A. de C.V.	piretroide	Concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0133-320-009-011	51630-58-1

¹COFEPRIS (2014)

²INECC (2004)

4.4 Población de insectos

Se recolectaron adultos de gorgojo del maíz (*S. zeamais*) en Texcoco, Estado de México en 2013, este insecto pertenece al orden Coleoptera y a la familia Curculionidae. La población fue criada en condiciones de laboratorio a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 5\%$ H.R y con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, en frascos de plástico de 2 L de capacidad; con ventanas de aireación en las tapas, acondicionadas con tela que no permitiera el escape de los insectos. Se mantuvieron mediante una dieta de granos de maíz CP-HS2 (variedad del Colegio de Postgraduados). Se utilizaron en cada repetición de 20 a 25 insectos adultos, de acuerdo a la disponibilidad de estos, sin diferenciar sexo, de 2 a 5 días de emergidos del grano. Los gorgojos tratados se mantuvieron sin dieta, en las mismas condiciones ambientales de la cámara de cría, se registró mortalidad a las 24 h de la aplicación y se consideró un insecto muerto aquel que no contaba con la capacidad de desplazarse o cambiar de posición cuando se ejercía movimiento con una aguja de disección.

4.5 Bioensayos

4.5.1 Método de aplicación tópica

En este método, los insectos se anestesiaron previamente con CO_2 a una presión de 10 lb por 2.5 min en un frasco de vidrio de un litro de capacidad y se utilizó 0.2 μl de solución insecticida para ser aplicada en el tórax del insecto con una jeringa Hamilton® para cromatografía de 10 μl , acoplada a un microaplicador manual de repetición Hamilton®. Los gorgojos tratados se colocaron en cajas Petri (85 mm de diámetro x 10 mm de altura).

4.5.2 Método de exposición residual en frascos

Para este ensayo se utilizaron frascos de vidrio de 30 ml de capacidad y con 37.76 cm² de superficie interna. Se colocó un ml de solución acetona-insecticida dentro de ellos y colocados en posición horizontal se mantuvieron girando sobre una máquina con rodillos giratorios (Star MFG International Inc.) con ventilador para favorecer el secado. Después se colocaron los insectos en los frascos (Ribeiro *et al.* 2003).

4.5.3 Método de aspersión

El método de aspersión se realizó con una torre de aspersión, la cual se fabricó en el área de toxicología del Colegio de Postgraduados con acrílico de 0.5 cm de grosor. La torre de forma cilíndrica y con dimensiones de 40 cm de altura, 24.7 cm de diámetro interno, acondicionada en la parte superior con una boquilla de acero inoxidable modelo Air Atom 1/4-JSS (Spraying Systems Co.). Para la alimentación del aire se utilizó un compresor de aire de 24 L (Marca Shimge, Modelo: SGFL9131) y la alimentación de la torre con las soluciones insecticidas se realizó con una micropipeta Transferpette® con puntas de 0.5-5 ml (marca Plastibrand ®). En esta evaluación los insectos se asperjaron sobre cajas Petri (85 mm de diámetro x 10 mm de altura) con un ml de la solución insecticida que tardaba 2.5 seg en asperjarse con presión de salida de 60 PSI, lo suficiente para cubrir los gorgojos con la solución. Después de la aspersión se les colocó la tapa a las cajas Petri.

4.5.4 Método de exposición residual en papel filtro

Para esta prueba se utilizó el método propuesto por la FAO (1974), con algunas modificaciones por la disponibilidad de materiales y por algunas recomendaciones

realizadas por IRAC (2009). Se utilizaron círculos de papel filtro de 90 mm de diámetro marca Whatman No. 1, en lugar de círculos de papel filtro de 70 mm de diámetro de la misma marca, se usaron fondos de cajas Petri (85 mm de diámetro x 10 mm de altura), en lugar de anillos de cristal, se utilizó una mezcla de petrolato puro (Vaselina, Racel S.A. de C.V.) y aceite mineral (Mennen, Colgate Palmolive S.A. de C.V.) en relación 1:1, en lugar de Fluon (repelente de insectos). Los círculos de papel filtro se impregnaron con un ml de solución de acetona-insecticida, la cual se añadió con una micropipeta Transferpette® en movimientos circulares progresivamente decrecientes, mientras el papel se encontraba sostenido sobre tres puntas finas de metal. Posteriormente se dejó secar el papel impregnado por 10 minutos y se colocó sobre una charola de plástico y se colocaron los insectos, los cuales se distribuyeron de modo aleatorio sobre el papel filtro y se cubrieron los gorgojos con el fondo de una caja Petri; impregnada en las paredes con una película de mezcla de petrolato puro y aceite mineral en relación 1:1 que sirvió para evitar que los insectos ascendieran por las paredes de la caja Petri y escaparan de la exposición al insecticida.

4.6 Análisis estadístico

Los datos de mortalidad se analizaron con análisis probit (SAS Institute, 2002). Las DL_{50} y CL_{50} se sometieron a comparación de medias con la prueba de Tukey, aunque no se compararon DL_{50} contra CL_{50} por no tener las mismas unidades, las pendientes se compararon de acuerdo con lo establecido por Infante y Zárate (1990) por lo que se determinó que no existía diferencia significativa en aquellas que existiera traslape entre sus límites de confianza al 95%. El máximo nivel de mortalidad aceptable para el testigo absoluto fue 10 % y la mortalidad en los tratamientos se corrigió con la ecuación

de Abbott (Abbott, 1925). Para el método de aplicación tópica los resultados se expresaron como μg de i.a./insecto, para los métodos de exposición residual (frascos y papel filtro) se expresaron en μg de i.a. cm^{-2} , de igual forma para el método de aspersión; pues para este último método se calcularon los μg 's de i.a. cm^{-2} por diferencia de masas de una superficie antes y después de asperjada.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comparación de la toxicidad de los insecticidas por método de bioensayo

5.1.1 Método de aplicación tópica

En el Cuadro 2 se muestran los resultados del análisis estadístico (PROC PROBIT, SAS) de las mortalidades obtenidas por este método. Con respecto a la dosis letal media de los insecticidas evaluados, *S. zeamais* presentó mayor susceptibilidad a los productos organofosforados, y de acuerdo al agrupamiento Tukey no existe diferencia significativa entre estos, al igual que con metomilo. Aunque para obtener el mismo nivel de mortalidad con el carbamato metomilo se requirió una dosis hasta 15 veces más altas con respecto a paratión metílico. Los piretroides resultaron ser menos tóxicos contra *S. zeamais*, dado que se requirieron 0.36 y 0.72 μg i.a./insecto para permetrina y fenvalerato, respectivamente, que corresponden a una dosis 30 veces más alta para permetrina y 60 veces para fenvalerato; para alcanzar la misma mortalidad que con paratión metílico. En este método se obtuvieron para los insecticidas organofosforados valores de ji-cuadrada (χ^2) menores a 5.75, para el insecticida metomilo con valor de χ^2 de 5.2 y valores de $\text{Pr} > \chi^2$ mayores a 0.05, lo que indica que se ajustan al modelo probit, no así para permetrina y fenvalerato que tuvieron valores de χ^2 de 24.3 y 12.9 respectivamente y valores de $\text{Pr} > \chi^2$ menores a 0.05.

Cuadro 2. DL₅₀ y DL₉₅ de varios insecticidas para *Sitophilus zeamais*, calculadas por el método de aplicación tópica.

Método	Insecticida	n	b ±EE	DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamiento DL ₅₀ Tukey*	DL ₉₅ (95% LC) µg de i. a./insecto	χ ²	Pr>χ ²
Topical	fenvalerato	1200	2.12 ± 0.18	0.72 (0.57 - 0.9)	A	4.33 (3.03 - 7.19)	12.96	0.043
	permetrina	1200	1.07 ± 0.1	0.36 (0.23 - 0.52)	B	12.13 (6.44 - 31.32)	24.35	0.002
	metomilo	1000	2.83 ± 0.21	0.18 (0.16 - 0.2)	B C	0.69 (0.56 - 0.89)	5.29	0.25
	malatión	900	3.51 ± 0.26	0.084 (0.076 - 0.091)	C	0.247 (0.216 - 0.294)	2.77	0.59
	clorpirifos etil	1300	5.56 ± 0.37	0.027 (0.025 - 0.029)	C	0.054 (0.049 - 0.061)	3.52	0.47
	paratión metílico	800	3.07 ± 0.21	0.012 (0.011 - 0.013)	C	0.042 (0.036 - 0.053)	5.75	0.33

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, DL₅₀ (DL₉₅) (dosis letal que mata al 50%

(95%) de la población), 95% LC: límites de confianza al 95%. χ²: ji-cuadrada, Pr> χ²: probabilidad mayor a χ²

* DL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

Pérez (1999) realizó bioensayos en *S. zeamais* mediante aplicación tópica con 0.42 µl de solución acetona-insecticida, aplicados en el tórax con micro aplicador manual y determinó mortalidad a las 24 h después del tratamiento, y obtuvo las DL₅₀'s de malatión y permetrina para varias poblaciones de *S. zeamais* de México en donde la dosis más baja que registró y que tomó como línea base fue de 0.008 µg i.a./insecto para malatión y 0.03 µg i.a./insecto para permetrina en una población de *S. zeamais* de Celaya, Guanajuato, México; al comparar esta información con los datos de esta investigación, para malatión (0.084 µg i.a./insecto) y permetrina (0.36 µg i.a./insecto) se obtienen radios de resistencia (RR) para la población evaluada de 10.5x para malatión y de 12x para permetrina; sin embargo, el mismo autor también determinó la DL₅₀ para una población de Chapingo, Texcoco, Estado de México (malatión: 0.029 µg i.a./insecto, permetrina: 0.11 µg i.a./insecto) y tomando en cuenta que la población que utilizamos en esta investigación es de esta misma localidad los resultados indican diferencia dado que nosotros obtuvimos una DL₅₀ 2.8 veces más alta para malatión y 3.2 veces más alta para permetrina que las obtenidas por Pérez (1999), estos resultados apuntan a que después de 16 años, esta población no ha incrementado su tolerancia a estos insecticidas. Por otra parte Pérez *et al.* (1990) reportaron DL₅₀'s de metomilo y paratión metílico, para varias poblaciones de *S. zeamais*, con lo cual obtuvieron como línea base 0.09 µg i.a./insecto para metomilo y 0.001 µg i.a./insecto para paratión metílico; al comparar esa información con los datos que se obtuvieron en este trabajo para metomilo (0.18 µg i.a./insecto) y para paratión metílico (0.012 µg i.a./insecto), se obtienen diferencias de 2x para metomilo y de 12x para paratión metílico.

5.1.2 Método de exposición residual en frascos

Con este método (Cuadro 3) se obtuvo que los insecticidas más tóxicos, que presentaron DI_{50} 's más bajas, fueron los organofosforados y que de acuerdo con el agrupamiento Tukey, no existe diferencia significativa entre ellos y con metomilo, por otra parte los piretroides resultaron ser los menos tóxicos pues para alcanzar la misma mortalidad se requieren dosificaciones hasta 220 veces más altas con respecto a paratión metílico. De la misma forma que en el método de aplicación tópica el análisis de los datos obtenidos para los insecticidas organofosforados y metomilo indica que se ajustan al modelo Probit con $Pr > \chi^2$ mayores a 0.05.

Ribeiro *et al.* (2003) realizaron bioensayos en este insecto utilizando frascos de 20 ml, donde aplicó 1 ml de solución de acetona-insecticida e impregnó las paredes internas del frasco con la solución y luego eliminó la acetona rodando manualmente los frascos frente a un ventilador, después colocó 20 insectos, sin diferenciar sexo, por frasco, determinó mortalidad a las 24 h y obtuvo los $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ de la superficie del frasco para varios insecticidas, entre ellos para permetrina y malatión, obtuvieron y utilizaron como líneas base la CL_{50} de $0.49 \mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ para permetrina y $0.031 \mu\text{g i.a. cm}^{-2}$ para malatión de una población estándar susceptible de esta plaga. Comparando esos valores con los obtenidos en esta investigación (Cuadro 3), se determina que existe una diferencia de 1.8x para malatión y 2.2x para permetrina con la población que se evaluó.

Cuadro 3. CL₅₀ y CL₉₅ de varios insecticidas para *Sitophilus zeamais*, calculadas por el método de exposición residual en frascos.

Método	Insecticida	n	b ±EE	CL ₅₀ (95% LC) µg i.a. cm ⁻²	Agrupamiento CL ₅₀ Tukey*	CL ₉₅ (95% LC) µg i.a. cm ⁻²	χ ²	Pr>χ ²
Residual (frascos)	fenvalerato	1320	1.63 ± 0.33	1.17 (0.6 - 2.39)	A	11.94 (4.65 - 148.12)	58.81	< 0.0001
	permetrina	960	1.73 ± 0.24	1.12 (0.64 - 2.06)	A	9.97 (4.5 - 50.89)	16.98	0.0019
	metomilo	960	4.81 ± 0.26	0.099 (0.093 - 0.1)	B	0.21 (0.19 - 0.24)	3.54	0.61
	malatión	840	3.79 ± 0.24	0.058 (0.054 - 0.063)	B	0.15 (0.14 - 0.18)	7.34	0.11
	clorpirifos etil	1400	3.31 ± 0.16	0.039 (0.035 - 0.042)	B	0.12 (0.1 - 0.14)	5.22	0.51
	paratión metílico	840	4.31 ± 0.3	0.0051 (0.0047 - 0.0055)	B	0.012 (0.011 - 0.014)	2.05	0.56

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀ (CL₉₅) (concentración letal que mata al 50% (95%) de la población), 95% LC: límites de confianza al 95%. χ²: ji-cuadrada, Pr> χ²: probabilidad mayor a χ²

*CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

5.1.3 Método por aspersión

Con el método de aspersión y de acuerdo con el agrupamiento Tukey los organofosforados son los más tóxicos junto con metomilo, seguidos por los piretroides (Cuadro 4). La proporción de toxicidad de fenvalerato en relación con paratión metílico es de 187.5 veces menos tóxico. Reiteradamente los resultados en el análisis estadístico indican que paratión metílico, clorpirifos etil, malatión y metomilo se ajustan al modelo probit, aunque en este método fenvalerato también se ajusta al modelo probit a comparación de permetrina, que al igual que en los métodos de aplicación tópica y residual en frascos no se ajusta al modelo probit.

No existen investigaciones donde se haya utilizado este método en *S. zeamais* para poder comparar resultados, pero este método cumple con una de las características deseables que debe tener un método de bioensayo según Champ y Campbell-Brown (1970) y Champ y Dyte (1976), lo cual se refiere a que presenta generalmente las concentraciones letales 50% más bajas.

Cuadro 4. CL₅₀ y CL₉₅ de varios insecticidas para *Sitophilus zeamais*, calculadas por el método de aspersión.

Método	Insecticida	n	b ±EE	CL ₅₀ (95% LC) µg i.a. cm ⁻²	Agrupamiento CL ₅₀ Tukey*	CL ₉₅ (95% LC) µg i.a. cm ⁻²	χ ²	Pr>χ ²
	fenvalerato	1119	1.84 ± 0.1	0.45 (0.39 - 0.51)	A	3.5 (2.77 - 4.65)	14.05	0.12
	permetrina	1242	1.63 ± 0.11	0.37 (0.3 - 0.47)	A	3.8 (2.52 - 6.62)	16.06	0.04
	metomilo	1055	2.89 ± 0.22	0.068 (0.062 - 0.076)	B	0.25 (0.2 - 0.33)	3.84	0.48
Aspersión	malatión	973	2.34 ± 0.15	0.042 (0.038 - 0.047)	B	0.21 (0.17 - 0.28)	3.55	0.61
	clorpirifos etil	1000	4.62 ± 0.24	0.028 (0.026 - 0.03)	B	0.064 (0.058 - 0.072)	6.83	0.23
	paratión metílico	1050	2.38 ± 0.12	0.0024 (0.0022 - 0.0027)	B	0.012 (0.01 - 0.015)	4.84	0.67

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀ (CL₉₅) (concentración letal que mata al 50% (95%) de la población), 95% LC: límites de confianza al 95%. χ²: ji-cuadrada, pr> χ²: probabilidad mayor a χ²

* CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

5.1.4 Método de exposición residual en papel filtro

En este método se obtuvo mortalidades mayores al 5% en el testigo; 6, 7 y 8% de mortalidad para malatión, paratión metílico y fenvalerato, respectivamente, además se obtuvieron resultados diferentes en cuanto al orden de toxicidad de los insecticidas que se había obtenido en los otros tres métodos (Cuadro 5), aunque los insecticidas organofosforados de nuevo mostraron mayor toxicidad, el piretroide fenvalerato se muestra con mayor toxicidad sin tener diferencia significativa con los fosforados y metomilo, de acuerdo con el agrupamiento Tukey.

Champ y Cribb (1965) realizaron bioensayos mediante este método impregnando papel filtro Whatman No. 1 con 0.5 ml de solución de acetona-insecticida, en donde colocaron de 25 a 40 insectos y taparon con recipientes de vidrio impregnados con “Fluon GPL”; repelente para evitar la fuga de los insectos o la adhesión de los mismos a las paredes del recipiente para evaluar resistencia a lindano. Evans (1985) realizó bioensayos para evaluar la efectividad de malatión y lindano contra *S. zeamais* y utilizó el método No 16 propuesto por la FAO (1974), el cual es parecido al que utilizan Champ y Cribb (1965), método ya descrito anteriormente, por el cual determinó resistencia a lindano.

Cuadro 5. CL₅₀ y CL₉₅ de varios insecticidas para *Sitophilus zeamais*, calculadas por el método de exposición residual en papel filtro.

Método	Insecticida	n	b ±EE	CL ₅₀ (95% LC) µg i.a. cm ⁻²	Agrupamiento CL ₅₀ Tukey*	CL ₉₅ (95% lc) µg i.a. cm ⁻²	χ ²	Pr>χ ²
Papel filtro	permetrina	1898	1.11 ± 0.08	417.9 (321.6 - 545.3)	A	12653 (7315 - 26546)	24.32	0.0038
	metomilo	1025	5.58 ± 0.66	102.08 (96.21 - 107.9)	B	201.2 (176.14 - 247.93)	0.21	0.64
	fenvalerato	1399	2.7 ± 0.34	59.71 (43.11 - 80.29)	B C	242.54 (158.35 - 546.64)	22.21	0.0002
	malatión	1303	2.88 ± 0.16	5.07 (4.69 - 5.49)	C	18.9 (16.24 - 22.71)	9.39	0.094
	clorpirifos etil	1020	4.96 ± 0.46	0.63 (0.59 - 0.68)	C	1.36 (1.21 - 1.61)	0.1	0.74
	paratión metílico	921	7.97 ± 0.7	0.23 (0.22 - 0.24)	C	0.37 (0.35 - 0.41)	0.68	0.4

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, ee: error estándar de la pendiente, CL₅₀ (CL₉₅) (concentración letal que mata al 50% (95%) de la población), 95% CL: límites de confianza al 95%. χ²: ji-cuadrada, Pr> χ²: probabilidad mayor a χ²

* CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

Segura *et al.* (1994) en un estudio de susceptibilidad en *S. zeamais* determinaron CL_{50} 's mediante este método, aunque con algunas modificaciones en el solvente que utilizaron y en el tiempo que dejaron para la toma de datos, por lo cual no es posible hacer comparación estricta entre los valores propuestos y los que se obtuvieron en el presente trabajo por las diferencias en los métodos. Sin embargo, la FAO (1974) reporta una CL_{50} de una población susceptible para malatión de 0.355 % y estos autores en su trabajo obtienen de una población susceptible la CL_{50} de 0.565 %, comparándolo con esta investigación y transformando los datos a porcentaje, se obtuvo en este método una CL_{50} de 0.032 % para malatión; y esta diferencia podría estar dada por los tiempo de exposición que se utilizaron, puesto que Segura *et al.* (1994) registraron mortalidad a las 6 h de exposición y en el presente trabajo a las 24 h.

En cuanto a los insecticidas permetrina y fenvalerato el estadístico ji-cuadrada indicó en los cuatro métodos, un desajuste a una línea recta, lo cual según Rodríguez *et al.* (2009) podrían existir fallas en la realización de los bioensayos o existe una mezcla de fenotipos con respuesta diferente al tóxico, en este caso se descartaría errores en la realización de los bioensayos, puesto que el ajuste lineal en los otros cuatro insecticidas, indica que el desajuste lineal de permetrina y fenvalerato se deba a que existe una mezcla de fenotipos con respuesta diferente al tóxico, lo cual se confirma con las pendientes más bajas obtenidas para estos dos insecticidas en los cuatro métodos de bioensayo, por lo que esta población de *S. zeamais* es más heterogénea en su respuesta a estos dos insecticidas.

5.2 Comparación de los métodos de bioensayo por insecticida

5.2.1 Paratión metílico

De acuerdo a los datos del Cuadro 6 para paratión metílico, indican que en el método de exposición residual en papel filtro se obtuvo la pendiente más alta en comparación con los otros tres métodos y de igual manera se obtuvo la CL₅₀ más alta, por lo cual la Ldp obtenida (Figura 1) por este método se encuentra desplazada más hacia la derecha, lo que quiere decir que se necesita mayor concentración de este insecticida para obtener la misma respuesta de mortalidad en comparación con los otros tres métodos.

Cuadro 6. CL₅₀ y DL₅₀ de paratión metílico para *Sitophilus zeamais*, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.

Insecticida	Método	n	b ±EE	95% Límite de confianza de b	Agrupación *	CL ₅₀ (95% LC) (µg i.a. cm ⁻²) **DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamie nto de CL ₅₀ Tukey***
Paratión metílico	residual (papel filtro)	921	7.97 ± 0.7	6.58 - 9.35	A	0.23 (0.22 - 0.24)	A
	residual (frascos)	840	4.31 ± 0.3	3.72 - 4.90	B	0.0051 (0.0047 - 0.0055)	B
	aspersión	1050	2.38 ± 0.12	2.12 - 2.63	C	0.0024 (0.0022 - 0.0027)	B
	topical **	800	3.07 ± 0.21	2.66 - 3.49	D	0.012 (0.011 - 0.013)	-----

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀(CL₉₅): concentración letal que elimina al 50% (95%) de los individuos tratados, 95% LC: límites de confianza al 95%, µg i.a. cm⁻²: microgramos de ingrediente activo por centímetro cuadrado.

*b con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

**Valores que se refieren a DL₅₀ (DL₉₅) (Dosis letal que mata al 50% (95%) de la población) y que se expresa en µg de i. a./insecto, χ²: ji-cuadrada, Pr> χ²: Probabilidad mayor a χ².

***CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

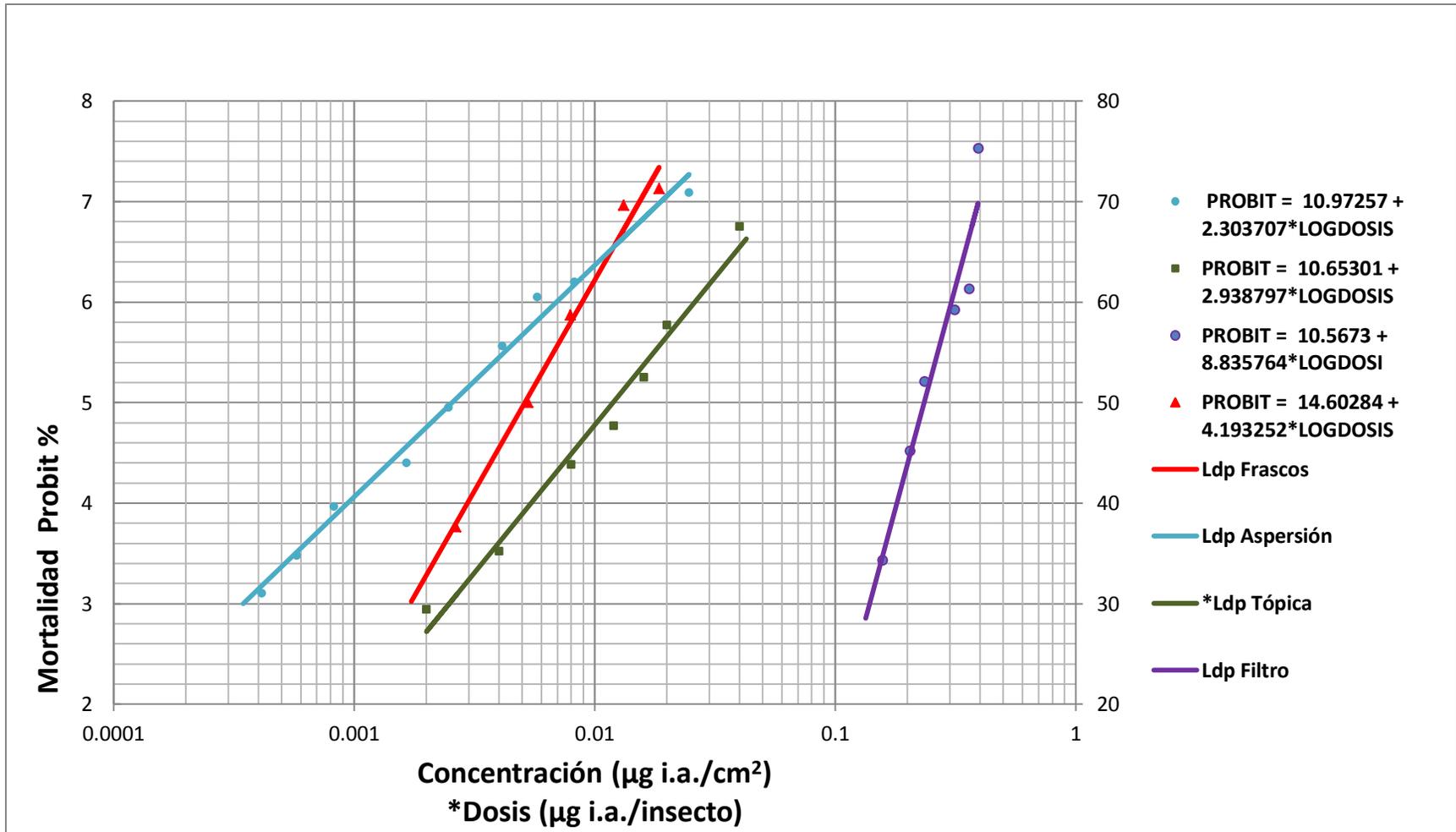


Figura 1. Líneas dosis probit (Ldp) para paratión metílico en *Sitophilus zeamais*, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.

5.2.2 Clorpirifos etil

En el Cuadro 7 y Figura 2, se observan los datos y las líneas Ldp de clorpirifos etil obtenidas con los cuatro métodos; la Ldp del método de exposición residual en papel filtro tiene la pendiente más alta en comparación con los otros tres métodos, aunque de acuerdo a la agrupación de pendientes no hay diferencia significativa entre el método topical, aspersión y residual. Por otra parte el método de exposición residual en papel filtro muestra la CL₅₀ más alta.

Cuadro 7. CL₅₀ y DL₅₀ de clorpirifos etil para *Sitophilus zeamais*, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.

Insecticida	Método	n	b ±EE	95% Límite de confianza de b	Agrupación *	CL ₅₀ (95% LC) (µg i.a. cm ⁻²) **DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamien to de CL ₅₀ Tukey***
Clorpirifos etil	topical **	1300	5.56 ± 0.37	4.84 - 6.29	A	0.027 (0.025 - 0.029)	-----
	aspersión	1000	4.62 ± 0.24	4.14 - 5.10	A	0.028 (0.026 - 0.03)	B
	residual (papel filtro)	1020	4.96 ± 0.46	4.05 - 5.87	A	0.63 (0.59 - 0.68)	A
	residual (frascos)	1400	3.31 ± 0.16	2.99 - 3.62	B	0.039 (0.035 - 0.042)	B

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀(CL₉₅): concentración letal que elimina al 50% (95%) de los individuos tratados, 95% LC: límites de confianza al 95%, µg i.a. cm⁻²: microgramos de ingrediente activo por centímetro cuadrado.

*b con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

**Valores que se refieren a DL₅₀ (DL₉₅) (Dosis letal que mata al 50% (95%) de la población) y que se expresa en µg de i. a./insecto, χ²: ji-cuadrada, Pr > χ²: Probabilidad mayor a χ².

***CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

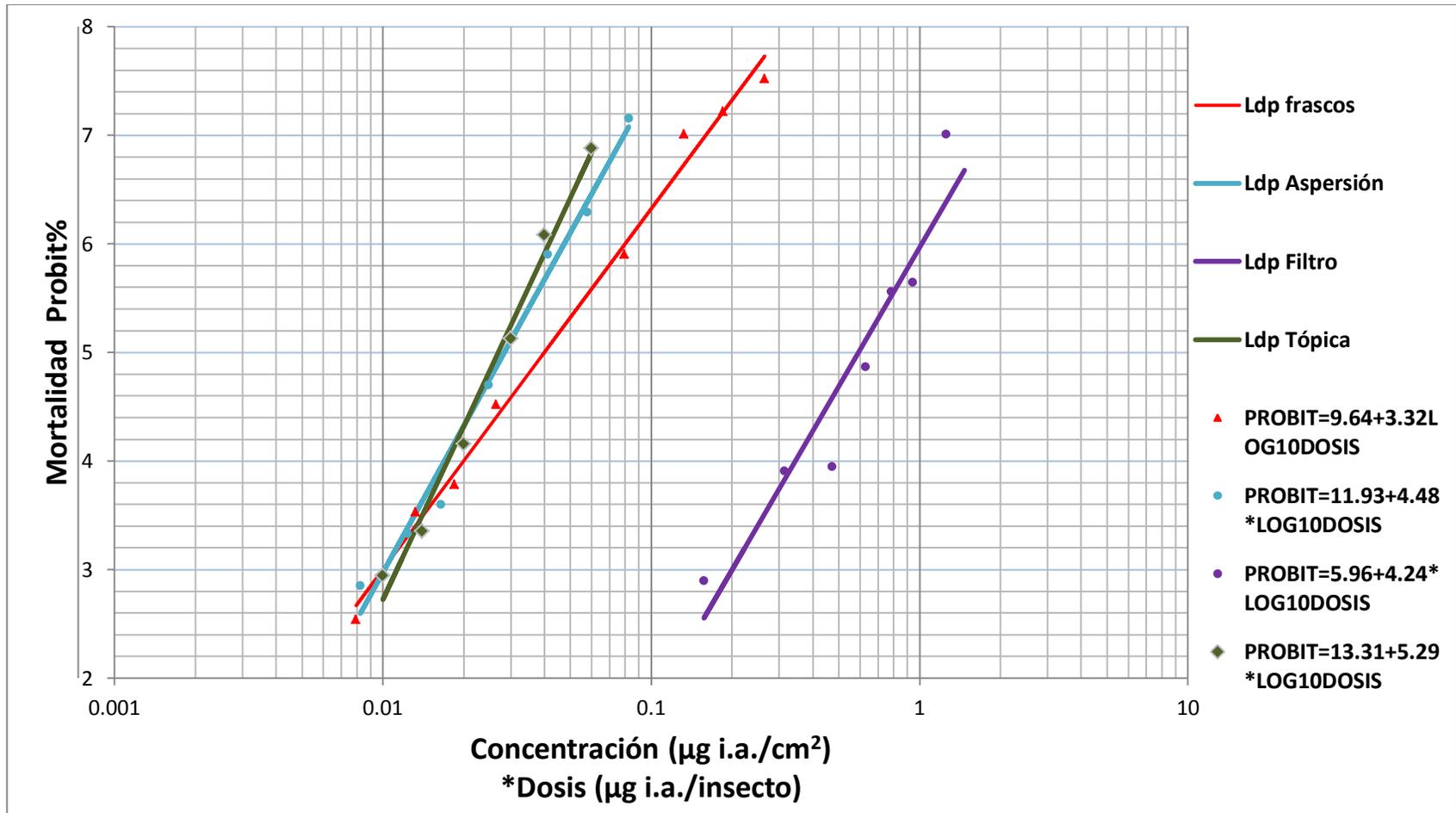


Figura 2. Líneas dosis probit (Ldp) para clorpirifos etil en *Sitophilus zeamais*, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.

5.2.3 Malatión

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico se muestra en el Cuadro 8 los resultados obtenidos para malatión por los cuatro métodos y en la Figura 3 se observa que la Ldp del método de exposición residual en papel filtro tiene la pendiente más alta en comparación con los otros tres métodos, aunque de acuerdo a la agrupación de las pendientes, el método de exposición residual en frascos no tiene diferencia significativa con el método de aplicación tópica.

Cuadro 8. CL₅₀ y DL₅₀ de malatión para *Sitophilus zeamais*, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.

Insecticida	Método	n	b ±EE	95% Límite de confianza de b	Agrupación *	CL ₅₀ (95% LC) (µg i.a. cm ⁻²) **DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamiento de CL ₅₀ Tukey***
Malatión	residual (frascos)	840	3.79 ± 0.24	3.31 - 4.26	A	0.058 (0.054 - 0.063)	B
	topical **	900	3.51 ± 0.26	3.00 - 4.03	A B	0.084 (0.076 - 0.091)	-----
	residual (papel filtro)	1303	2.88 ± 0.16	2.56 - 3.19	BC	5.07 (4.69 - 5.49)	A
	aspersión	973	2.34 ± 0.15	2.03 - 2.64	C	0.042 (0.038 - 0.047)	B

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀(CL₉₅): concentración letal que elimina al 50% (95%) de los individuos tratados, 95% LC: límites de confianza al 95%, µg i.a. cm⁻²: microgramos de ingrediente activo por centímetro cuadrado.

*b con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

**Valores que se refieren a DL₅₀ (DL₉₅) (Dosis letal que mata al 50% (95%) de la población) y que se expresa en µg de i. a./insecto, χ²: ji-cuadrada, Pr > χ²: Probabilidad mayor a χ².

***CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

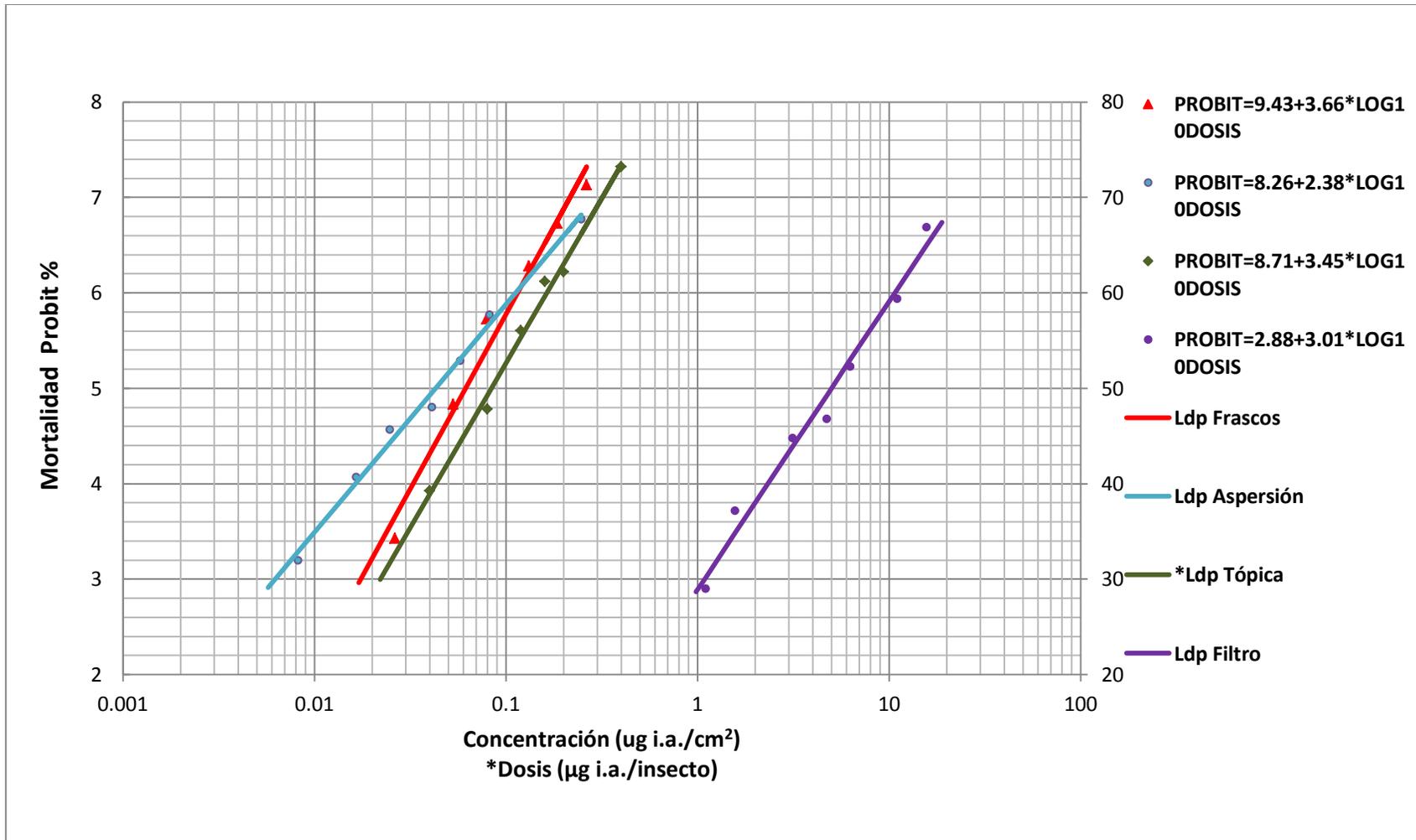


Figura 3. Líneas dosis probit (Ldp) para malatión en *Sitophilus zeamais*, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.

5.2.4 Metomilo

En el Cuadro 9 se muestra que con el método de exposición residual en papel filtro se obtuvo la pendiente más alta en su recta de regresión en comparación con los otros tres métodos, aunque el agrupamiento de pendientes señala que no tiene diferencia significativa con el de exposición residual en frascos. Por otra parte en la Figura 4 las líneas Ldp de metomilo calculadas por los cuatro métodos de bioensayo, indican que en este mismo método se obtuvo la DL₅₀ más alta, por lo cual la recta se encuentra desplazada hacia la derecha.

Cuadro 9. CL₅₀ y DL₅₀ de metomilo para *Sitophilus zeamais*, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.

Insecticida	Método	n	b ±EE	95% Límite de confianza de b	Agrupación *	CL ₅₀ (95% LC) (µg i.a. cm ⁻²) **DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamiento de CL ₅₀ Tukey** *
Metomilo	residual (papel filtro)	1025	5.58 ± 0.66	4.26 - 6.89	A	102.0 (96.2 - 107.9)	A
	residual (frascos)	960	4.81 ± 0.26	4.29 - 5.33	A	0.099 (0.093 - 0.1)	B
	aspersión	1055	2.89 ± 0.22	2.45 - 3.32	B	0.068 (0.062 - 0.076)	B
	topical **	1000	2.83 ± 0.21	2.42 - 3.25	B	0.18 (0.16 - 0.2)	-----

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀(CL₉₅): concentración letal que elimina al 50% (95%) de los individuos tratados, 95% LC: límites de confianza al 95%, µg i.a. cm⁻²: microgramos de ingrediente activo por centímetro cuadrado.

*b con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

**Valores que se refieren a DL₅₀ (DL₉₅) (Dosis letal que mata al 50% (95%) de la población) y que se expresa en µg de i. a./insecto, χ²: ji-cuadrada, Pr> χ²: Probabilidad mayor a χ².

***CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

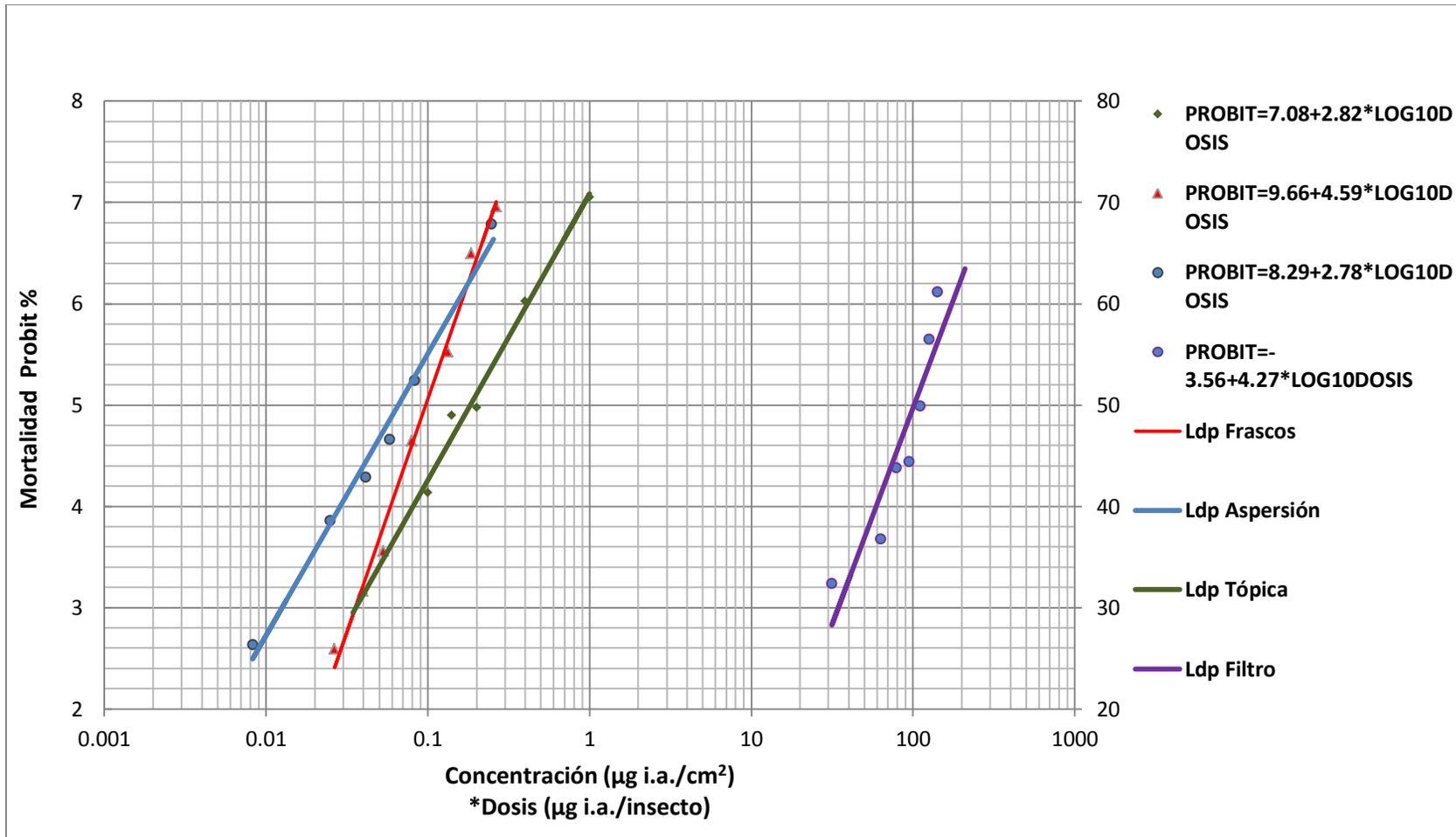


Figura 4. Líneas dosis probit (Ldp) para metomilo en *Sitophilus zeamais*, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.

5.2.5 Permetrina

En el Cuadro 10 se observan los datos obtenidos del análisis Probit para permetrina por los cuatro métodos evaluados y se tiene que las pendientes más altas se obtuvieron con exposición residual en papel filtro y frascos. En la Figura 5, las líneas Ldp de permetrina calculadas por los cuatro métodos, indican que con exposición residual en papel filtro se obtuvo la DL₅₀ más alta, por lo cual la Ldp se encuentra desplazada hacia la derecha. Además se observa que en comparación con los otros insecticidas, permetrina muestra Líneas dosis Probit con pendientes más bajas, por lo que la ventana de respuesta biológica abarca un mayor rango de dosis (ciclos logarítmicos).

Cuadro 10. CL₅₀ y DL₅₀ de permetrina para *Sitophilus zeamais*, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.

Insecticida	Método	n	b ±EE	95% Límite de confianza de b	Agrupación *	CL ₅₀ (95% LC) (µg i.a. cm ⁻²) **DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamiento de CL ₅₀ Tukey***
Permetrina	aspersión	1242	1.63 ± 0.11	1.40 - 1.86	A	0.37 (0.3 - 0.47)	B
	residual (frascos)	960	1.73 ± 0.24	1.25 - 2.22	AB	1.12 (0.64 - 2.06)	B
	residual (papel filtro)	1898	1.11 ± 0.08	0.95 - 1.26	B	417.9 (321.6 - 545.3)	A
	topical **	1200	1.07 ± 0.1	0.87 - 1.28	B	0.36 (0.23 - 0.52)	-----

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀(CL₉₅): concentración letal que elimina al 50% (95%) de los individuos tratados, 95% LC: límites de confianza al 95%, µg i.a. cm⁻²: microgramos de ingrediente activo por centímetro cuadrado.

*b con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

**Valores que se refieren a DL₅₀ (DL₉₅) (Dosis letal que mata al 50% (95%) de la población) y que se expresa en µg de i. a./insecto, χ²: ji-cuadrada, Pr > χ²: Probabilidad mayor a χ².

***CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

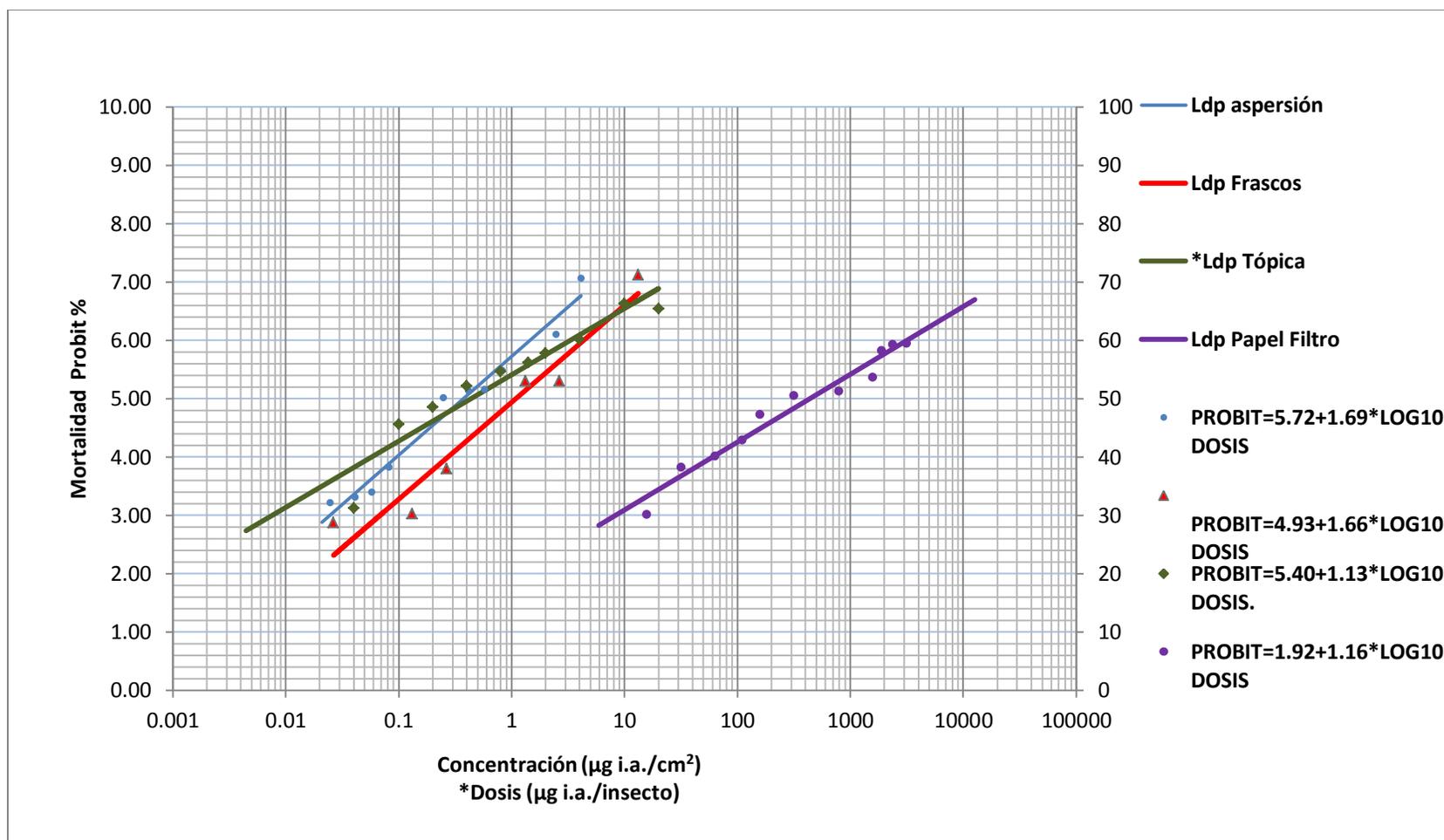


Figura 5. Líneas dosis probit (Ldp) para permetrina en *Sitophilus zeamais*, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.

5.2.6 Fenvalerato

De acuerdo a los datos del Cuadro 11 en el método de exposición residual en papel filtro se obtuvo la pendiente más alta en comparación con los otros tres métodos y en la Figura 6, la línea Ldp de fenvalerato obtenida se encuentra desplazada hacia la derecha. En cuanto a las pendientes, en este insecticida, no tienen diferencias significativas entre ellas. Aunque al igual que permetrina las pendientes que se obtienen para fenvalerato, por los cuatro métodos evaluados, son bajas, por lo que las líneas Ldp abarcan rangos amplios de concentraciones.

Cuadro 11. CL₅₀ y DL₅₀ de fenvalerato para *Sitophilus zeamais*, calculadas por cuatro métodos de bioensayo.

Insecticida	Método	n	b ±EE	95% Límite de confianza de b	Agrupación *	CL ₅₀ (95% LC) (µg i.a. cm ⁻²) **DL ₅₀ (95% LC) µg de i. a./insecto	Agrupamiento de CL ₅₀ Tukey***
Fenvalerato	residual (papel filtro)	1399	2.7 ± 0.34	2.01 - 3.38	A	59.71 (43.11 - 80.29)	A
	topical **	1200	2.12 ± 0.18	1.76 - 2.47	A	0.72 (0.57 - 0.9)	-----
	aspersión	1119	1.84 ± 0.1	1.65 - 2.04	A	0.45 (0.39 - 0.51)	B
	residual (frascos)	1320	1.63 ± 0.33	0.98 - 2.27	A	1.17 (0.6 - 2.39)	B

n: número total de individuos tratados, b: pendiente, EE: error estándar de la pendiente, CL₅₀(CL₉₅): concentración letal que elimina al 50% (95%) de los individuos tratados, 95% LC: límites de confianza al 95%, ug i.a. cm⁻²: microgramos de ingrediente activo por centímetro cuadrado

*b con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

**Valores que se refieren a DL₅₀ (DL₉₅) (Dosis letal que mata al 50% (95%) de la población) y que se expresa en µg de i. a./insecto, χ²: ji-cuadrada, Pr> χ²: Probabilidad mayor a χ².

***CL₅₀ con la asignación de la misma letra no son significativamente diferentes.

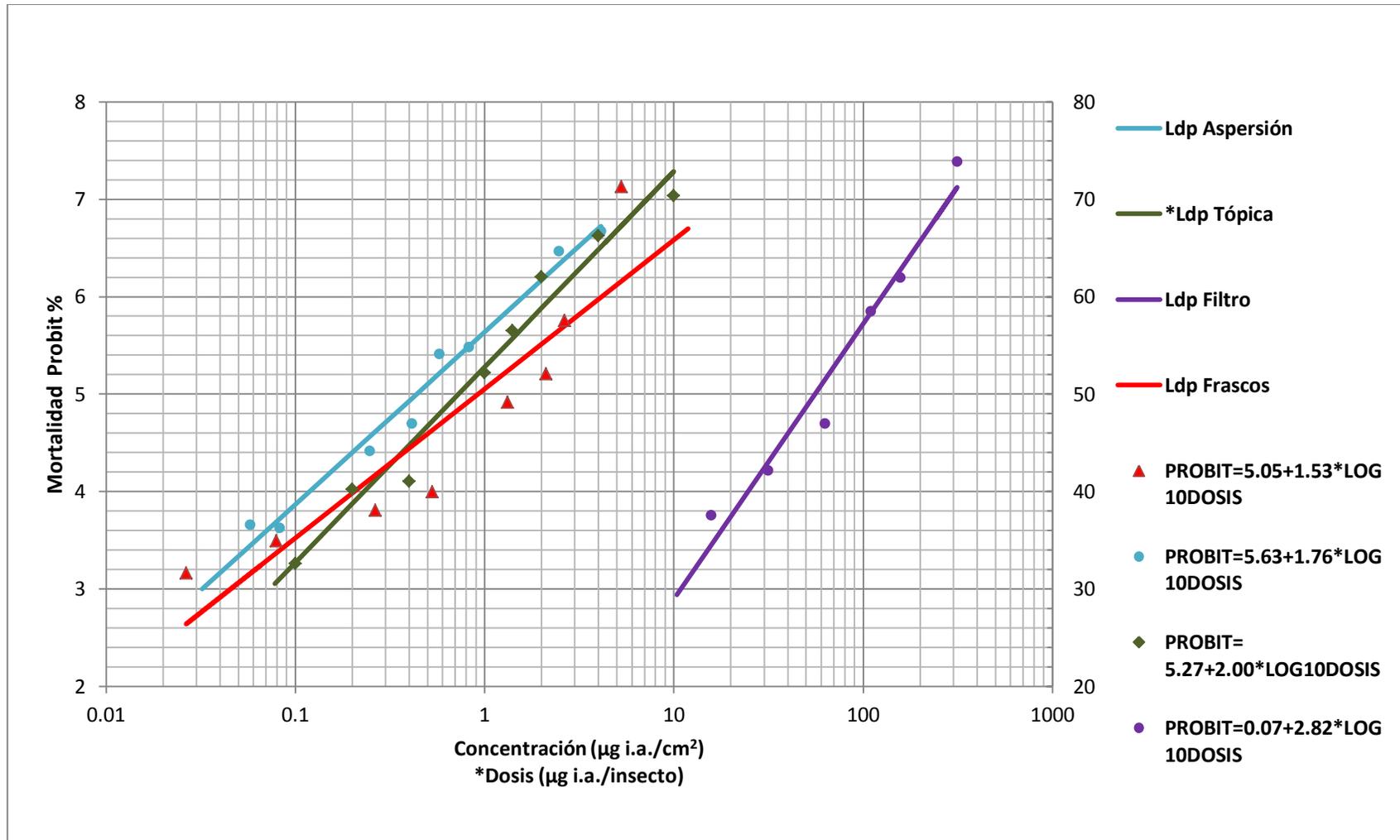


Figura 6. Líneas dosis probit (Ldp) para fenvalerato en *Sitophilus zeamais*, obtenidas por cuatro métodos de bioensayo.

6 CONCLUSIONES

Los cuatro métodos de bioensayo utilizados mostraron precisión en los resultados para paratión metílico, clorpirifos etil, malatión y metomilo, basándose en que el estadístico ji-cuadrada indicó en los cuatro métodos, el ajuste a una línea recta, lo que indica que la respuesta a estos insecticidas es de tipo normal.

En cuanto a los insecticidas permetrina y fenvalerato el estadístico ji-cuadrada indicó en los cuatro métodos, un desajuste a una línea recta, porque en esta población de *S. zeamais* existe una mezcla de fenotipos con respuesta diferente a estos dos tóxicos. En general el método de aspersion y el de exposición residual en frascos presentaron las DL_{50} más bajas y el método residual en papel filtro presentó las DL_{50} más altas para los seis insecticidas evaluados, por lo cual el método de aspersion y el de exposición residual serían los más aceptables, de acuerdo a este criterio.

Se comparó la susceptibilidad de la población de *Sitophilus zeamais* utilizada en esta investigación, con líneas base determinadas por otros investigadores, aunque no se encontraron precedentes para las cuatro metodologías utilizadas, se encontraron radios de resistencia de 10x, 12x y 12x para malation, permetrina y paratión metílico, respectivamente, por el método de aplicación tópica.

Además se obtuvieron líneas base de susceptibilidad para fenvalerato y clorpirifos etil por el método de aplicación tópica con DL_{50} -s de 0.72 y 0.027 μg de i. a./insecto, respectivamente, también para fenvalerato, metomilo, clorpirifos etil y paration metílico por el método de exposición residual en frascos con CL_{50} -s de 1.17, 1.12, 0.039 y 0.0051 μg i.a. cm^{-2} , respectivamente, de igual forma para fenvalerato, permetrina,

metomilo, maldión, clorpirifos y paration metílico por el método de aspersión con CL_{50} -s de 0.45, 0.37, 0.068, 0.042, 0.028 y 0.0024 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$, respectivamente y así mismo para permetrina, metomilo, fenvalerato, maldión, clorpirifos y paration metílico por el método de exposición residual en papel filtro con CL_{50} -s de 417.9, 102.08, 59.71, 5.07, 0.63 y 0.23 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$, que pueden ser utilizadas en trabajos posteriores de detección y medición de resistencia.

7 LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267. (consulta: 10/07/2014). Disponible: <http://citebank.org/node/102510>
- Tabashnik, B.E., D. Mota S., M.E. Whalon, R.M. Hollingworth, y Y. Carrière. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt Crops and pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 107 (2): 496-507.
- Casini, C. y Santajuliana M. 2008. Control de plagas en granos almacenados. (Consulta: 01/02/08). Disponible: <http://www.Cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp>
- Champ, B.R. y Cribb, J.N. 1965. Lindane resistance in *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) in Queensland. *Journal of Stored Products Research*, 1: 9-24
- Champ, B.R. y Campbell-Brown, M.J. 1970. Insecticide resistance in Australian *Tribolium castaneum* (Herbst)-I. A test method for detecting insecticide resistance. *Journal of Stored Products Research*, 6: 53-70.
- Champ, B.R. y C.E. Dyte. 1976. Informe de la prospección mundial de la FAO sobre la Susceptibilidad a los Insecticidas de las plagas de granos almacenados. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal. No. 5. México.
- Dell'Orto, T. H. y C.J. Arias V. 1985. Insectos que dañan granos y productos almacenados. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 146 p.
- Evans, N.J. (1985). The effectiveness of various insecticides on some resistant beetle pests of stored produce from Uganda. *Journal of Stored Products Research*, 21(2): 105-109.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 1974. Métodos provisionales para gorgojos adultos importantes en cereales almacenados, con malatión y lindano. In: Métodos recomendados para la detección y medición de la resistencia de plagas agrícolas a los plaguicidas. FAO, Boletín fitosanitario. Roma, 22 (5/6): 127-137.
- Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (FND). 2014. Panorama del maíz. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de la Información. Secretaria de Hacienda y Crédito Público. [www.financierarural.gob.mx/.../Panorama%20Maíz%20\(may%202014\)](http://www.financierarural.gob.mx/.../Panorama%20Maíz%20(may%202014))
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd. Edition. Cambridge University. Press. Great Britain. 333 p.
- García-Lara, C. Espinosa Carrillo y D.J. Bergvinson. 2007. Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. CIMMYT. México.

- Granados, G. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y Producción. In: Manejo Integrado de plagas. FAO. Roma (Italia).
- Hernández G., A. y A. Carballo C. 2014. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Subsecretaría de Desarrollo Rural. Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural. Colegio de Postgraduados. (Consulta: 05/05/2014) Disponible: www.sagarpa.gob.mx/.../Almacenamiento%20de%20semillas.pdf
- Infante G., S. y G.P. Zárate D. L. 1990. Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario. 2ª ed. Trillas. México. 643 p.
- Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). 2009. Beetles damaging stored products. Method No. 6. Susceptibility test methods series. (Consulta: 15/05/2014). Disponible: http://www.irc-online.org/content/uploads/Method_006_v3_june09.pdf
- Insecticide Resistance Action Committee. (IRAC). 2014. Resistance Definition. (consulta: 15/06/14). Disponible: <http://www.irc-online.org/about/resistance/>
- Lagunes T., A. 1994. Extractos, polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia. Memoria. Colegio de Postgraduados USAID-CONACYT-BORUCONSA. México. pp: 32.
- Lagunes, T.A., Dominguez R. y Rodriguez J.C. 1985. Plagas del maíz. Documento de trabajo. Universidad Autónoma Chapingo. pp 100
- Lagunes T., A, y J.C. Rodríguez M. 1989. Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. Memoria. CONACYT-Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. 150 p.
- Lagunes T., A., C. Rodríguez M. y J.C. De Loera B. 2009. Susceptibility to insecticides in populations of mexican arthropods. *Agrociencia*, 43: 173-196.
- Lagunes T., A. y M. Vázquez N. 1994. El bioensayo en el Manejo de insecticidas. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco. México. 159 p.
- Lagunes T., A. y J.A. Villanueva J. 1994. Toxicología y Manejo de Insecticidas. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco. México. 166 p.
- Metcalf, C.L. y Flint, W.P. 1982. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. Trad. de la 4ª ed. En ingles. Ed. CECSA, México. 1208 p.
- Okelana, F.A. y Osuji, F.N.C. 1985. Influence of relative humidity at 30°C on the oviposition, development and mortality of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) in maize kernels. *Journal of Stored Products Research*, 21: 13-19.
- Paez L., A. 1987. El uso de polvos vegetales e inertes minerales como una alternativa para el combate del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) en maíz almacenado. Colegio de Postgraduados. Tesis de maestría. 108 p.
- Pérez M., J., A. Lagunes T., J.C. Rodríguez M. y A. Sánchez H. 1990. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones del picudo del maíz *Sitophilus zeamais* (Coleóptera:

- Curculionidae) de varias localidades de México. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal*, 1: 53-73.
- Pérez M., J. 1993. El Uso de Insecticidas en el Combate de Insectos de Almacén. *Insectos de Granos Almacenados: Biología, Daños, Detección y Combate*. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). INIFAP, Celaya, Guanajuato, México. pp: 171-217.
- Pérez M., J. 1999. Survey of Insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 35: 107-115.
- Ramiez G., M. 1960. Infestación de campo por insectos de granos almacenados. Observaciones en maíz de la mesa central y del trópico en 1959. *Agricultura Técnica en México*, 10: 32-36.
- Ribeiro M., P.A.L. 1993. Almacenamiento de granos en propiedades rurales. In: *Manual de manejo poscosecha de granos a nivel mundial*. FAO. Santiago. Chile.
- Ribeiro, B.M., Guedes R.N.C., Oliveira E.E. y Santos J.P. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 39: 21-31
- Robertson, J.L., Rusell, R.M., Preisler, H.K. y Savin, N.E. 2007. *Bioassays with arthropods*, Segunda Edición, CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 193 p.
- Rodríguez, M.J., Silva, A.G. y Guzmán, P. 2009. El Bioensayo con Plaguicidas en Artrópodos. In: *Tópicos Selectos de Estadística Aplicados a la Fitosanidad*. Primera Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo. Texcoco. México, pp: 129-158.
- Rodríguez H., C. y A. Lagunes T. 1992. Plantas con propiedades insecticidas. Resultados de pruebas preliminares en laboratorio, campo y granos almacenados. *Agroproductividad*, 1:17-25.
- SAS Institute. 2002. SAS/Stat®. Language Guide for Personal Computers release 9.0 Edition. SAS Institute. Cary N.C. USA.
- Scharf, M.E. 2008. Bioassays with arthropods. *Florida Entomologist*, 91(3): 510-511.
- Segura L., O.L., J.Cibrián T., A. Lagunes T., D. Mota S. y H. Sánchez A. 1994. Susceptibilidad de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) a malatión, pirimifós metil y deltametrina. *Agrociencia, Serie Protección Vegetal* 5: 75- 90.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2011. Listado de plaguicidas de uso agrícola. Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera.
- Sharifi, S., y Mills, R. B. 1971. Radiographic studies of *Sitophilus zeamais* Mots, in wheat kernels. *Journal of Stored Products Research*, 7: 195–206.
- Silva, G., A. Lagunes T., J.C. Rodríguez M. y D. Rodríguez. 2002. Insecticidas vegetales; una vieja y nueva alternativa en el manejo de insectos. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, Costa Rica. 66:4-12.

The Arthropod Pesticide Resistance Database. 2014. Michigan State University.
(consulta: 15/07/2014) Disponible: <http://www.pesticideresistance.com/index.php>.

Triplehorn, C.A. y Johnson, N.F. 2004. Borror and Delong's introduction to the study of insects. 7a edition, pp: 367-459