



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

“COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE BIOENSAYO EN LA DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD DE INSECTICIDAS SINTÉTICOS EN EL GORGOJO DEL FRIJOL *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)”

ADRIAN NEGRETE NAVARRO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

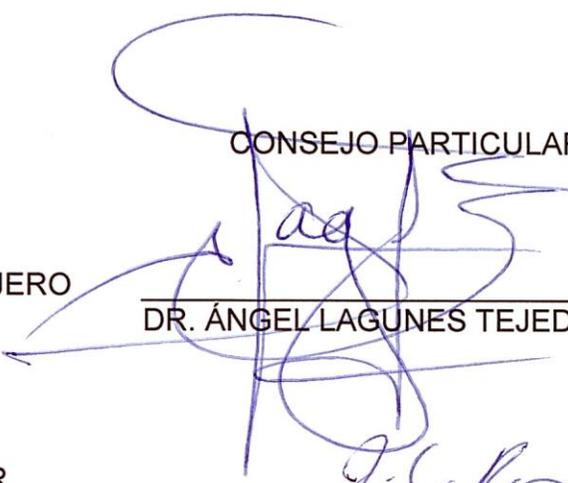
2014

La presente tesis titulada "Comparación de métodos de bioensayo en la determinación de toxicidad de insecticidas sintéticos en el gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus* Boheman (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)", realizada por el alumno Adrián Negrete Navarro 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

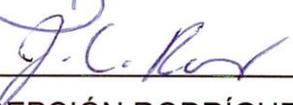
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. ÁNGEL LAGUNES TEJEDA

ASESOR



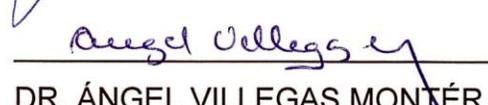
DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL

ASESOR



DR. JESÚS ROMERO NÁPOLES

ASESOR



DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTÉR

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2014.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE BIOENSAYO EN LA DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD DE INSECTICIDAS SINTÉTICOS EN EL GORGOJO DEL FRIJOL *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE)

Adrian Negrete Navarro, M.C
Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

Se realizó comparación de cuatro métodos de bioensayo para determinar la toxicidad de seis insecticidas: paratión metílico, clorpirifos etíl, malatión, metomilo, permetrina y fenvalerato contra adultos hembras y machos del gorgojo del frijol, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Los métodos empleados fueron residual (frascos de vidrio y papel filtro), aspersion y aplicación tópica. Los resultados indicaron precisión aceptable con el empleo de todos los métodos. Con el método de aspersion se obtuvieron los valores de CL₅₀ y CL₉₅ más bajos en todos los insecticidas evaluados. El insecticida más tóxico fue clorpirifos etíl, mientras que la menor toxicidad se obtuvo con permetrina. La población de *Z. subfasciatus* resultó susceptible y homogénea en cuanto a respuesta de toxicidad con los insecticidas evaluados.

PALABRAS CLAVE: Métodos de bioensayo, toxicidad y *Zabrotes*.

Comparison of bioassay methods for determining toxicity of synthetic insecticides in bean weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae)

Adrian Negrete Navarro, M.Sc.
Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

Comparison of four bioassay methods was conducted to determine the toxicity of the following synthetic insecticides: parathion methyl, chlorpyrifos ethyl, malathion, methomyl, permethrin, and fenvalerate; These were used against adult females and males bean weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). The used methods were residual (glass jars and paper filter), spray, and topical application. The results indicated acceptable precision with the use of all methods. With the spraying method were obtained the LC₅₀ and LC₉₅ with lower values in all insecticides tested. The most toxic insecticide was chlorpyrifos ethyl, while lower toxicity was obtained with permethrin. The *Z. subfasciatus* population was susceptible and homogeneous in its toxicity response to all evaluated insecticides.

KEYWORDS: Bioassay methods, insecticides toxicity and *Zabrotes*.

DEDICATORIA

Para mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional en cualquier momento de mi vida.

A mis hijos Adrián y Julián, en su incipiente aventura en el proceso de formación escolar y de preparación en la vida, quienes han sido mi inspiración para lograr esta nueva etapa profesional.

A Sara, mi esposa y compañera en la vida, por su amor y apoyo, quien me ha acompañado en la travesía para lograr este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme las facilidades y contribuir en mí proceso de formación académica, profesional y personal.

Al personal docente del Programa de Entomología y Acarología por sus valiosas enseñanzas transmitidas a través de las asignaturas académicas durante los estudios de maestría.

A mi Consejo Particular por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo, gracias por sus acertados comentarios y sugerencias.

Al Dr. Ángel Lagunes Tejeda por la asesoría en la conducción del presente trabajo y sus valiosos consejos y orientación académica.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGRAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	2
2.1. Descripción de <i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman.....	2
2.1.1. Importancia económica.....	2
2.2. Evaluación de toxicidad de insecticidas.	3
2.2.1. Linealidad dosis-probit.....	4
2.2.2. Propiedades líneas Ldp.....	4
2.2.2.1. Posición.....	4
2.2.2.2. Pendiente	5
2.3. Modo y Mecanismo de acción de insecticidas.....	5
2.3.1. Organofosforados.....	5
2.3.2. Carbamatos.	6
2.3.3. Piretroides.	7
3. MATERIALES Y METODOS.	8
3.1. Cría de los insectos tratados.	8
3.2. Insecticidas evaluados.	8
3.3. Métodos de bioensayo.	10
3.3.1. Exposición Residual en Frascos.	10
3.3.2. Aspersión con equipo tipo Torre de Potter.	10
3.3.3. Aplicación tópica.	11
3.3.4. Exposición Residual en papel filtro.	11
3.4. Tiempo y criterios de evaluación.	11
3.5. Análisis estadístico.	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12

4.1. Método de aplicación tópica.....	12
4.2. Método de aspersion.	13
4.3. Método Residual en Frascos.	20
4.4. Método Residual en Papel Filtro.	23
4.5. Comparación de la toxicidad de los insecticidas evaluados por método de bioensayo.	26
5. CONCLUSIONES.....	29
6. LITERATURA CITADA.	30

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Relación de insecticidas evaluados mediante cuatro métodos de bioensayo.	9
Cuadro 2. Toxicidad de seis insecticidas contra adultos hembras de <i>zabrotes subfasciatus</i> , obtenida por cuatro métodos de bioensayo.	14
Cuadro 3. Toxicidad de seis insecticidas contra adultos machos de <i>zabrotes subfasciatus</i> , obtenida por cuatro métodos de bioensayo.	15
Cuadro 4. Agrupación de Tukey, en la comparación de medias de CL ₅₀ y DL ₅₀ por método de bioensayo , contra adultos hembras de <i>Zabrotes subfasciatus</i> .	27
Cuadro 5. Agrupación de Tukey, en la comparación de medias de CL ₅₀ y DL ₅₀ por insecticida contra método de bioensayo , en adultos hembras de <i>Zabrotes subfasciatus</i> .	28

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos hembras de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante aplicación tópica.	16
Figura 2. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante aplicación tópica.	17
Figura 3. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos hembras de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante aspersion con equipo tipo torre de Potter.	18
Figura 4. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante aspersion con equipo tipo torre de Potter.	19
Figura 5. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos hembras de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en frascos.	21
Figura 6. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en frascos.	22
Figura 7. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos hembras de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en papel filtro.	24
Figura 8. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en papel filtro.	25

1. INTRODUCCIÓN

La familia Bruchidae, también conocidos como “gorgojos” o “escarabajos de las semillas”, son coleópteros cuyas larvas se alimentan de semillas, principalmente de leguminosas. Los adultos ovipositan en las semillas hospederas y las larvas penetran y se alimentan dentro donde ocurre la pupación, emergiendo posteriormente el adulto (Romero-Nápoles, 2002). Un miembro de esta familia, el gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), es una de las principales plagas de los granos almacenados, causando pérdidas cualitativa y cuantitativas en granos y semillas, principalmente en las regiones más cálidas del mundo (Dendy y Credland, 1991).

La evaluación de insecticidas en laboratorio es una herramienta útil en la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades insecticidas, así como en la detección y evaluación periódica de la resistencia (Rodríguez *et al.*, 2009). Lagunes y Villanueva (1994) definen al bioensayo como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de una sustancia o un material se miden en términos de la respuesta biológica que produce. Su utilidad nos permite la comparación de toxicidad de varios insecticidas contra una población de insectos, o comparar la respuesta de varias poblaciones a un insecticida.

De acuerdo a la base de datos sobre resistencia a insecticidas del IRAC (<http://www.pesticideresistance.com/search.php>), hasta noviembre del 2014, se contaban registrados ocho casos de resistencia a insecticidas dentro de la familia Bruchidae. Para *Zabrotes subfasciatus* se reportaron tres casos de resistencia a nivel mundial, todos ellos para BHC (lindano); en Uganda (Evans, 1985), Colombia y México (Tyler and Evans, 1981).

Consecuentemente, el presente trabajo tuvo como principal objetivo comparar la utilización de cuatro métodos de bioensayo en la determinación de toxicidad de seis insecticidas convencionales en adultos machos y hembras de *Z. subfasciatus*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Descripción de *Zabrotes subfasciatus* Boheman.

La especie de *Z. subfasciatus* pertenece a la familia Bruchidae del orden Coleoptera. Esta familia agrupa a insectos estructuralmente cercanos a los crisomélidos, difiriendo en cabeza proyectada hacia abajo en un pico ancho y muy corto. Los adultos miden menos de 6 mm de largo, son de color opaco, ovales y presentan dimorfismo sexual; el macho es de color café pardo, en comparación con la hembra que es negra con manchas blancas amarillentas. El fémur posterior es liso y la tibia presenta dos espinas largas color rojizo. La hembra generalmente pesa 1.5 veces más que el macho y generalmente tienen una longitud de 2 a 3 mm, siendo la hembra con frecuencia de mayor tamaño que el macho (Lindblad, 1986).

2.1.1. Importancia económica

El gorgojo del frijol, *Z. subfasciatus* es una de las plagas más importantes que afecta económicamente la producción del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) almacenado (Espinal *et al.* 2004, Cárdenas-Morales *et al.* 2008). Credland y Dendy, 1992 mencionan que las hembras llegan a depositar alrededor de 35 a 50 huevos por grano y las pérdidas ocasionadas por este insecto pueden variar entre 35-40%, de acuerdo a la región geográfica. Ospina (1979) indica que en México las pérdidas económicas causadas por el ataque de insectos en frijol almacenado son de alrededor del 20%.

2.2. Evaluación de toxicidad de insecticidas.

La toxicidad de los insecticidas o de cualquier tóxico a un organismo, se expresa usualmente en términos de DL_{50} (dosis letal media); este valor representa la cantidad de toxico por unidad de peso que mata al 50% de los animales empleados en la prueba. La DL_{50} comúnmente se expresa en mg por kg^{-1} y ocasionalmente en mg por animal (Lagunes y Villanueva, 1994).

Cuando no se conoce la cantidad de toxico que entra en contacto con el insecto, pero sí se sabe cuál es la cantidad de insecticida que rodea al organismo, se usa el término CL_{50} (concentración letal media). El termino TL_{50} (tiempo letal medio) se usa cuando los organismos se exponen a una misma dosis o dosificación, pero las evaluaciones de mortalidad se realizan a diferentes tiempos.

Existen diversas formas de administrar insecticidas (tipos de bioensayo) para evaluar toxicidad. El método usualmente empleado para insectos es mediante aplicación tópica, en la cual el insecticida se disuelve en un solvente volátil como la acetona; y posteriormente se coloca en una parte conocida del insecto, usualmente en el protórax. Aunque este método brinda una indicación segura de la toxicidad relativa, no indica la cantidad exacta del tóxico que entra al cuerpo; para tal propósito se emplea el método de inyección (Lagunes y Villanueva, 1994).

El método de contacto o de exposición residual, es otra forma de dejar al insecto expuesto al insecticida. El toxico se aplica al ambiente donde se encuentra el organismo de prueba. El sustrato puede ser una hoja, una caja Petri, un vial de vidrio o un vaso con una cantidad conocida de agua, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2009). En este caso se desconoce con exactitud la cantidad de solución que se pone en contacto con el insecto, por lo que el método es menos preciso que el de aplicación tópica.

En la aplicación por aspersión, el insecticida se disuelve en agua, acetona o benceno y se aplica con un dispositivo especial conocido como Torre de Potter (Potter, 1952). Con

este dispositivo se controla la presión de salida del insecticida preparado, la cantidad de la solución liberada, el tamaño de gota y el tiempo de exposición, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.2.1. Linealidad dosis-probit.

Para expresar la susceptibilidad de cualquier población de insectos a cualquier tóxico, se grafican las unidades Probit del porcentaje de mortalidad, contra una escala logarítmica de la dosis (Lagunes y Vazquez-Navarro, 1994); pues de acuerdo con la Ley de Weber y Fechner, “El cambio en magnitud o intensidad de una respuesta biológica, es proporcional no al cambio aritmético en el estímulo, sino a su logaritmo”.

Para obtener una línea recta al construir las líneas Log dosis-Probit (Ldp), es necesario que exista una distribución normal de la respuesta al tóxico. En ocasiones, no se obtienen líneas Ldp rectas, debido a que la población es bimodal; obteniéndose líneas Ldp con escalones, lo cual significa que es posible la presencia de dos poblaciones mezcladas, una susceptible y una resistente, correspondiendo el escalón, en ese caso, a la respuesta combinada de las dos poblaciones.

2.2.2. Propiedades de líneas Ldp.

2.2.2.1. Posición.

La posición de la línea Log dosis-Probit (Ldp), indica la toxicidad del compuesto usado. Esta toxicidad usualmente se expresa en términos de la dosis, concentración o el tiempo necesario para matar el 50% de la población, es decir DL₅₀, CL₅₀ o TL₅₀, respectivamente.

En la comparación de dos líneas Ldp, la línea que se encuentre a la izquierda de la gráfica corresponde a la sustancia más tóxica debido a que se requiere de menos dosis para matar al mismo porcentaje de individuos de prueba, a reserva de que los límites

fiduciales se traslapen, pues en ese caso quiere decir que estas dos líneas no son significativamente diferentes.

2.2.2.2. Pendiente.

Se refiere a la proporción o tasa de cambio en la mortalidad, con respecto al cambio unitario en la dosis. Generalmente se representa por la letra “b” (Lagunes y Villanueva, 1994).

A mayor pendiente, la línea Ldp será más vertical; indicando también que hay menor variabilidad en la respuesta al insecticida, es decir que en un rango de concentraciones muy pequeño se encuentra el cero y el 100% de respuesta (Rodriguez *et al.*, 2009).

2.3. Modo y Mecanismo de acción de insecticidas.

2.3.1. Organofosforados.

Los insecticidas organofosforados son compuestos derivados del ácido fosfórico o del ácido fosfónico. La mayoría de ellos actúan como insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomacal, pero también se encuentran materiales de acción sistémica. Dentro de este grupo existe un intervalo muy amplio de toxicidad, lo cual permite también un amplio espectro de uso como insecticida.

La toxicidad de los organofosforados en insectos y mamíferos, está asociada con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACE). Esta esterasa cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (AC, transmisor químico sináptico) a colina y ácido acético, a gran velocidad.

2.3.2. Carbamatos.

Los insecticidas carbámicos se distinguen por su carácter de selectividad, ya que pequeñas modificaciones en su estructura hacen que el producto tenga actividad contra algunas especies de insectos. Otra característica, es la falta de correlación que existe entre la actividad tóxica sobre diversos insectos y la toxicidad en mamíferos. Esta particularidad también los distingue de los insecticidas fosfóricos, en los cuales la correlación es más estrecha.

Los carbamatos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), se comportan de manera semejante a los insecticidas fosfóricos cuando actúan en sistemas biológicos (Fukuto, 1974). La toxicidad aguda de los carbamatos, por lo general es mayor que los insecticidas organofosforados; sin embargo, en estos últimos la duración de la inhibición de la ACE es más extensa, por lo que se les considera de mayor peligro para mamíferos.

Los insecticidas carbámicos se metabolizan por medio de dos mecanismos básicos, los cuales implican la descomposición del enlace éter-carbamato; estos mecanismos comprenden un ataque de esterasas directo, o por medio de la degradación oxidativa a través de la función oxidativa mixta (FOM), la cual es la reacción más importante en el metabolismo de los carbamatos (Fukuto y Metcalf, 1969), seguida de un rompimiento hidrolítico de un intermediario inestable.

El principal mecanismo de resistencia metabólica a carbamatos, son las oxidasas de función mixta, en tanto que el no metabólico se presenta por insensibilidad de la ACE (la cual no necesariamente confiere resistencia a insecticidas fosfóricos), una penetración reducida del insecticida y una mayor excreción (Lagunes y Villanueva, 1994).

2.3.3. Piretroides.

Los piretroides afectan tanto al sistema nervioso central como al periférico de los insectos tratados, lo cual ocasiona descargas repetidas, seguidas de convulsiones. Ejercen su acción neurotóxica modificando la función normal de los canales de sodio de la membrana neuronal, los cuales son altamente sensitivos a cambios en el voltaje, que alteran la transmisión del impulso nervioso (Hassall, 1969). En las membranas neuronales existe un equilibrio de los iones de Na⁺ y de K⁺ que sirven para transmitir el impulso nervioso. Los piretroides prolongan selectivamente la conductividad del Na⁺ en tránsito, ocasionada por la activación de los canales de sodio dependientes del voltaje (Soderlund *et al.*, 1989), lo cual se traduce en un cambio en la permeabilidad de la membrana nerviosa a los iones Na⁺ y K⁺, trayendo consigo la disfunción con descargas repetitivas en la transmisión de los mensajes neuronales. La aplicación de concentraciones mayores de piretroides, da como resultado el bloqueo total de la transmisión (Lagunes y Villanueva, 1994).

Los principales mecanismos de resistencia a piretroides son por insensibilidad en el sitio de acción, también llamado kdr, penetración reducida del piretroide y debido a mayor metabolismo del insecticida por oxidasas y esterases.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cría de los insectos tratados.

La cría del gorgojo se inició con adultos de *Zabrotes subfasciatus* obtenidos de una colonia previamente establecida y libre de presión de selección a insecticidas, proveniente del Área de Ecología de Insectos del Programa de Entomología del Colegio de Postgraduados, y se mantuvo en una cámara de cría acondicionada a una temperatura de 27 ± 2 °C, humedad relativa de 50 ± 5 % y un fotoperiodo de 12:12 h de luz: oscuridad en Chapingo, México.

En un frasco de plástico de 2 L de capacidad se colocó 0.5 kg de frijol negro comercial, como sustrato de oviposición; se infestó con aproximadamente 400 adultos de *Z. subfasciatus*, en una proporción sexual 1:1. Los insectos se mantuvieron en confinamiento en el frasco y a los 30-35 días posteriores a la infestación emergió la generación F1. Se seleccionaron adultos de la primera generación para infestar otros frascos con grano de frijol. Este proceso de cría se realizó en forma periódica para incrementar la población en todos los estados biológicos y obtener adultos hembras y machos en cantidad suficiente para llevar a cabo los bioensayos. Los bioensayos se realizaron con adultos de 1 a 3 días de emergencia.

3.2. Insecticidas.

Se prepararon dosis decrecientes logarítmicamente (exploratorias) para determinar un rango de 0 a 100 % de mortalidad (ventana de respuesta biológica), definiendo con ello para cada insecticida un intervalo de cinco a ocho concentraciones intermedias a ensayar.

En el Cuadro 1 se muestra la relación de los insecticidas convencionales evaluados mediante cuatro métodos de bioensayo para determinar la toxicidad contra adultos de *Zabrotes subfasciatus*.

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

Nombre comercial	Nombre común	Concentración	Grupo químico	Formulación	Registro Sanitario
Malathion 50% CE	malation	515g de i.a. L ⁻¹	OF	Concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0143-005-009-050
Lorsban 480 EM	clorpirifos etil	480g i.a. L ⁻¹	OF	concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0115-004-009-044
Paration metílico 80%	paration metílico	800g i.a. L ⁻¹	OF	Grado tecnico	RSCO-INAC-0155-308-018-080
Lannate 90%	metomilo	900g i.a. Kg ⁻¹	CB	polvo soluble	RSCO-INAC-0146-003-003-090
Perkill 50% CE	permetrina	500g de i.a L ⁻¹	PT	Concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0156-337-009-048
Fenkill 10% CE	fenvalerato	100 g i.a. L ⁻¹	PT	Concentrado emulsionable	RSCO-INAC-0133-320-009-011

OF= organofosforado, CB= carbamato, PT=piretroide

Para diluir la solución-insecticida a las concentraciones evaluadas en los ensayos de los métodos de aplicación residual y de aplicación tópica se utilizó como solvente la acetona, y para el método de aspersión se utilizó agua destilada.

Se realizaron cinco repeticiones y en cada repetición se incluyó un testigo sin tratar. Cuando la mortalidad en el testigo sin tratar fue $\leq 10\%$ se corrigió con la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

3.3. Métodos de bioensayo

3.3.1. Exposición Residual en Frascos.

Se utilizaron frascos viales de capacidad de 30 mL, con una superficie interna estimada de 37.76 cm². Mediante una pipeta se aplicó 1 mL de la solución insecticida-acetona de cada una de las concentraciones a ensayar, inmediatamente se mantuvieron en rotación mecánica para impregnar la superficie interna del frasco (con rotador provisto de tubos cromados, marca "Star", Modelo 30-C Medidas: 60x53x31), hasta lograr la evaporación del solvente; posteriormente se procedió a colocar por separado 20 adultos machos y 20 adultos hembras de *Z. subfasciatus* por frasco.

3.3.2. Aspersión con equipo tipo Torre de Potter.

Para este experimento, la aplicación de los insecticidas se realizó con un equipo de aspersión tipo Torre de Potter, el cual fue diseñado y adaptado por investigadores del área de Toxicología del Colegio de Postgraduados. Este equipo de aspersión de forma cilíndrica está provisto de material acrílico de 0.5 cm de grosor y tiene dimensiones de 40 cm de altura y 24.7 cm de diámetro interno, acondicionado en la parte superior con una boquilla de acero inoxidable modelo Air Atom 1/4-JSS (Spraying Systems Co.), el cual fue accionado a través de la alimentación de aire a una presión de 60 psi por medio de un compresor de aire de 24L (Marca Shinge, Modelo SGFL9131).

La alimentación del equipo de aspersión con las soluciones insecticidas se realizó con puntas plásticas de pipeta de 0.5-5 ml (Marca: Plastibrand ®), inyectando 1 mL de la solución insecticida en base agua con un tiempo de aspersión de aproximadamente 2.5 segundos.

Para la aplicación se emplearon de 20 a 25 insectos (machos y hembras de manera separada) colocados en cajas Petri (85 mm de diámetro x 10 mm de altura); concluida

la aspersión se colocó la tapa a la caja y se dispusieron en la cámara de cría durante 24 horas.

3.3.3. Aplicación tópica.

Se aplicó la cantidad de 0.2 μ l de la solución acetona-insecticida (acetona en grado analítico) por insecto con el apoyo de una jeringa Hamilton® para cromatografía de 10 μ l, acoplada a un microaplicador manual de repetición Hamilton®, la aplicación de a gota se colocó directamente en la región dorsal del tórax.

Para cada dosis se usaron por separado 20 adultos machos y 20 adultos hembras y se realizaron cinco repeticiones. Cada repetición incluyó un testigo al cual sólo se le aplicó acetona. Los gorgojos tratados se colocaron en frascos viales, sin dieta y cerrados con tapa plástica y se mantuvieron al interior de la cámara de cría durante 24 h.

3.3.4. Exposición Residual en papel filtro.

En este estudio se empleó el método propuesto por la FAO (1974), al cual se realizaron algunas modificaciones; se utilizaron círculos de papel filtro de 70 mm de diámetro marca Whatman No. 1 y fueron impregnados con 1 ml de solución de acetona-insecticida a través de una micropipeta Transferpette®, sostenidos éstos sobre tres puntas finas enclavadas sobre una plataforma. Una vez impregnado el papel filtro se dejó secar durante un minuto y luego se colocó sobre una charola de plástico, en donde se colocaron entre 20 y 30 insectos adultos machos o hembras, respectivamente, cubriéndolos con un vaso de plástico en posición invertida (70 mm de diámetro x 30 mm de altura).

3.4. Tiempo y criterios de evaluación.

En todos los casos, después de las 24 h de exposición al insecticida se determinó el porcentaje de mortalidad, considerando muerto a aquel insecto que no respondía al

estímulo de un pincel para moverse, desplazarse, o cambiar de posición cuando se ejerció movimiento sobre él (FAO, 1984).

3.5. Análisis estadístico.

Los resultados de los ensayos biológicos se analizaron mediante PROC PROBIT (SAS Institute, 1997) para obtener los valores de CL_{50} , y CL_{95} , con límites de confianza al 95 %. Para determinar diferencias significativas, tanto en hembras como en machos, en la respuesta a nivel de CL_{50} o de CL_{95} , se compararon los límites de confianza. La respuesta no fue estadísticamente diferente cuando sus límites de confianza al 95 % se traslaparon, conforme a lo referido por Robertson y Preisler (1992).

Asimismo, se realizó comparación de medias de las CL_{50} mediante pruebas de Tukey para definir diferencias estadísticamente significativas entre los insecticidas evaluados por cada método de bioensayo empleado, y de manera similar, determinar la existencia de diferencia significativa entre los métodos de bioensayo para cada insecticida evaluado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de CL_{50} y CL_{95} se calcularon con los datos de la mortalidad registrada después de 24 h de exposición para cada insecticida en cada uno de los métodos empleados, los cuales se muestran en la Cuadro 2 y Cuadro 3, para hembras y machos adultos de *Z. subfasciatus*, respectivamente.

4.1. Método de aplicación tópica.

Con respecto a la dosis letal media de los insecticidas evaluados, para los adultos hembras de *Z. subfasciatus* se presentó mayor toxicidad en los insecticidas fenvalerato y clorpirifos etil, con una DL_{50} de 0.006 y 0.008 μg i.a./insecto, respectivamente;

seguido por paration metílico con una DL_{50} de $0.017 \mu\text{g i.a./insecto}$. En tanto que para los insecticidas metomilo y malation se obtuvo una respuesta igual en toxicidad con un valor de DL_{50} de $0.032 \mu\text{g i.a./insecto}$. Con respecto al insecticida permetrina se obtuvo un valor de DL_{50} de $0.042 \mu\text{g i.a./insecto}$; lo cual correspondió a siete veces el valor de DL_{50} del insecticida con mayor toxicidad (fenvalerato) (Figura 1).

En el caso de adultos machos se obtuvo un orden similar de toxicidad de los insecticidas evaluados; siendo éste igual (en algunos casos) o ligeramente mayor con respecto al obtenido en adultos hembras. Los valores más bajos de DL_{50} se obtuvieron con los insecticidas clorpirifos etíl y fenvalerato (0.005 y $0.006 \mu\text{g i.a./insecto}$, respectivamente), mientras que permetrina siguió siendo el insecticida con menor toxicidad con una DL_{50} de $0.038 \mu\text{g i.a./insecto}$ (Figura 2).

4.2. Método de aspersión.

La mayor toxicidad en adultos hembras se presentó con paration metílico y clorpirifos etíl, con valores de CL_{50} de $0.002 \mu\text{g i.a./cm}^2$ y de $0.003 \mu\text{g i.a./cm}^2$ respectivamente, en orden decreciente de toxicidad continuó fenvalerato con un valor de CL_{50} de $0.013 \mu\text{g i.a./cm}^2$, los insecticidas malation y metomilo presentaron una toxicidad estadísticamente no diferente entre sí con valores de CL_{50} $0.033 \mu\text{g i.a./cm}^2$ y $0.037 \mu\text{g i.a./cm}^2$, mientras que permetrina fue el insecticida con menor toxicidad, con un valor de CL_{50} de $0.052 \mu\text{g i.a./cm}^2$; 26 veces el valor de la CL_{50} del insecticida con mayor toxicidad, (Figura 3).

En adultos machos la susceptibilidad a los insecticidas evaluados fue mayor que en adultos hembras y se mantuvo en el mismo orden de toxicidad, (Figura 4).

CUADRO 2. TOXICIDAD DE SEIS INSECTICIDAS CONTRA **ADULTOS HEMBRAS** DE *Zabrotes subfasciatus*, OBTENIDA POR CUATRO METODOS DE BIOENSAYO.

INSECTICIDA	METODO	n	b ± EE	CL ₅₀ µg i.a. cm ⁻² (IC, 95%)	CL ₉₅ en µg i.a. cm ⁻² (IC, 95%)	χ ²	Pr > χ ²
MALATION	RESIDUAL (FRASCOS)	1080	4.95 ± 0.27	0.065 (0.062-0.068)	0.140 (0.129-0.155)	2.82	0.90
	ASPERSION	685	5.56 ± 0.35	0.033 (0.031-0.034)	0.065 (0.059-0.072)	3.01	0.56
	TOPICAL*	644	5.08 ± 0.30	0.032 (0.030-0.034)	0.067 (0.061-0.075)	0.57	0.90
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	971	3.04 ± 0.16	2.85 (2.62-3.09)	9.90 (8.68-11.55)	4.70	0.70
PERMETRINA	RESIDUAL (FRASCOS)	840	3.41 ± 0.21	0.090 (0.084-0.097)	0.27 (0.24-0.32)	1.42	0.92
	ASPERSION	724	8.88 ± 0.66	0.052 (0.049-0.054)	0.079 (0.074-0.086)	0.54	0.97
	TOPICAL*	643	5.57 ± 0.35	0.042 (0.040-0.045)	0.084 (0.077-0.093)	0.53	0.97
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	774	2.41 ± 0.15	5.55 (4.98-6.17)	26.76 (22.39-33.27)	2.02	0.85
FENVALERATO	RESIDUAL (FRASCOS)	820	4.07 ± 0.24	0.064 (0.060-0.069)	0.163 (0.146-0.186)	2.55	0.77
	ASPERSION	824	3.15 ± 0.17	0.013 (0.012-0.015)	0.045 (0.039-0.052)	2.39	0.79
	TOPICAL*	739	3.59 ± 0.21	0.0061 (0.0057-0.0066)	0.018 (0.016-0.021)	1.54	0.91
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	659	3.15 ± 0.20	4.96 (4.52-5.43)	16.50 (14.26-19.76)	0.49	0.97
METOMILO	RESIDUAL (FRASCOS)	1120	2.77 ± 0.14	0.14 (0.13-0.15)	0.54 (0.47-0.65)	3.60	0.83
	ASPERSION	882	3.82 ± 0.22	0.037 (0.034-0.039)	0.099 (0.089-0.113)	2.98	0.56
	TOPICAL*	751	7.47 ± 0.45	0.031 (0.030-0.033)	0.052 (0.049-0.056)	1.42	0.84
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	676	3.14 ± 0.19	28.50 (25.88-31.45)	95.39 (80.94-116.64)	1.88	0.76
PARATION METÁLICO	RESIDUAL (FRASCOS)	981	2.57 ± 0.13	0.044 (0.040-0.048)	0.19 (0.16-0.23)	4.68	0.59
	ASPERSION	790	2.92 ± 0.17	0.0018 (0.0016-0.0020)	0.0066 (0.0057-0.0079)	2.85	0.72
	TOPICAL	644	4.57 ± 0.29	0.017 (0.016-0.018)	0.039 (0.035-0.045)	0.29	0.99
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	933	2.04 ± 0.12	0.113 (0.100-0.127)	0.72 (0.59-0.92)	2.47	0.87
CLORPIRIFOS ETÍL	RESIDUAL (FRASCOS)	607	6.72 ± 0.45	0.012 (0.011-0.013)	0.021 (0.019-0.023)	0.65	0.96
	ASPERSION	975	4.50 ± 0.24	0.0029 (0.0027-0.0031)	0.0068 (0.0062-0.0075)	8.49	0.20
	TOPICAL*	763	9.35 ± 0.60	0.0083 (0.0080-0.0085)	0.0124 (0.0118-0.0133)	4.07	0.54
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	800	2.84 ± 0.17	0.049 (0.045-0.054)	0.18 (0.16-0.22)	0.98	0.96

n: número de **adultos hembras** tratados; b: pendiente; EE: error estándar de la pendiente.

CL₅₀: Concentración letal al 50 % de la población en estudio, expresado en µg i.a. cm⁻², calculado con un límite de confianza al 95%.

CL₉₅: Concentración letal al 95 % de la población en estudio, expresado en µg i.a. cm⁻², calculado con un límite de confianza al 95%.

χ²: ji-cuadrada; Pr > χ²: Probabilidad mayor a ji-cuadrada.

(*): Valores referidos a DL₅₀ y DL₉₅; dosis letal al 50% y 95% de la población en estudio, respectivamente, expresado en µg i.a./insecto, calculado con un límite de confianza al 95%.

CUADRO 3. TOXICIDAD DE SEIS INSECTICIDAS CONTRA **ADULTOS MACHOS** DE *Zabrotes subfasciatus*, OBTENIDA POR CUATRO METODOS DE BIOENSAYO.

NSECTICIDA	METODO	n	b ± EE	CL ₅₀ µg i.a. cm ⁻² (IC, 95%)	CL ₉₅ en µg i.a. cm ⁻² (IC, 95%)	χ ²	Pr > χ ²
MALATION	RESIDUAL (FRASCOS)	960	4.97 ± 0.27	0.055 (0.052-0.058)	0.118 (0.109-0.129)	1.24	0.97
	ASPERSION	828	5.31 ± 0.32	0.027 (0.026-0.028)	0.055 (0.050-0.061)	2.45	0.78
	TOPICAL*	635	3.85 ± 0.24	0.024 (0.022-0.026)	0.063 (0.056-0.073)	0.34	0.95
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	874	2.14 ± 0.13	1.37 (1.21-1.53)	8.05 (6.64-10.20)	0.49	1.00
PERMETRINA	RESIDUAL (FRASCOS)	840	3.51 ± 0.21	0.074 (0.069-0.080)	0.22 (0.19-0.25)	0.36	1.00
	ASPERSION	672	8.27 ± 0.56	0.044 (0.043-0.046)	0.070 (0.066-0.076)	5.05	0.28
	TOPICAL*	635	4.98 ± 0.34	0.038 (0.036-0.040)	0.082 (0.074-0.092)	1.73	0.79
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	653	2.34 ± 0.14	3.18 (2.81-3.59)	16.06 (13.18-20.44)	0.18	1.00
FENVALERATO	RESIDUAL (FRASCOS)	720	4.42 ± 0.33	0.053 (0.050-0.056)	0.125 (0.112-0.144)	0.70	0.95
	ASPERSION	761	2.92 ± 0.19	0.0069 (0.0063-0.0075)	0.025 (0.022-0.031)	4.52	0.48
	TOPICAL*	657	3.53 ± 0.23	0.0058 (0.0053-0.0063)	0.017 (0.015-0.020)	1.19	0.88
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	666	2.68 ± 0.18	3.64 (3.26-4.04)	14.95 (12.70-18.31)	4.04	0.40
METOMILO	RESIDUAL (FRASCOS)	800	3.14 ± 0.17	0.064 (0.059-0.070)	0.21 (0.18-0.25)	0.96	0.97
	ASPERSION	930	4.13 ± 0.23	0.022 (0.021-0.024)	0.056 (0.051-0.063)	5.35	0.25
	TOPICAL*	651	5.65 ± 0.35	0.023 (0.022-0.024)	0.045 (0.042-0.050)	0.73	0.95
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	779	3.11 ± 0.18	24.15 (22.11-26.24)	81.50 (71.32-95.80)	0.59	0.99
PARATION METÁLICO	RESIDUAL (FRASCOS)	882	2.64 ± 0.16	0.030 (0.027-0.033)	0.12 (0.10-0.15)	1.24	0.97
	ASPERSION	799	2.90 ± 0.17	0.0014 (0.0013-0.0016)	0.0053 (0.0046-0.0063)	1.92	0.86
	TOPICAL*	625	4.60 ± 0.30	0.0119 (0.0112-0.0127)	0.027 (0.024-0.031)	1.72	0.79
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	747	1.87 ± 0.13	0.083 (0.071-0.095)	0.62 (0.50-0.83)	0.61	0.99
CLORPIRIFOS ETÍL	RESIDUAL (FRASCOS)	540	6.09 ± 0.45	0.0095 (0.0091-0.010)	0.018 (0.016-0.020)	2.64	0.45
	ASPERSION	743	4.67 ± 0.30	0.0021 (0.0019-0.0022)	0.0047 (0.0042-0.0054)	1.16	0.88
	TOPICAL*	545	9.96 ± 0.72	0.0053 (0.0051-0.0055)	0.0077 (0.0074-0.0083)	3.40	0.33
	RESIDUAL (PAPEL FILTRO)	661	3.01 ± 0.23	0.043 (0.039-0.047)	0.15 (0.13-0.18)	0.43	0.98

n: número de adultos machos tratados; b: pendiente; EE: error estándar de la pendiente

CL₅₀: Concentración letal al 50 % de la población en estudio, expresado en µg i.a. cm⁻², calculado con un límite de confianza al 95%.

CL₉₅: Concentración letal al 95 % de la población en estudio, expresado en µg i.a. cm⁻², calculado con un límite de confianza al 95%.

χ²: ji-cuadrada; Pr > χ²: Probabilidad mayor a ji-cuadrada.

(*): Valores referidos a DL₅₀ y DL₉₅; dosis letal al 50% y 95% de la población en estudio, respectivamente, expresado en µg i.a./insecto, calculado con un límite de confianza al 95%.

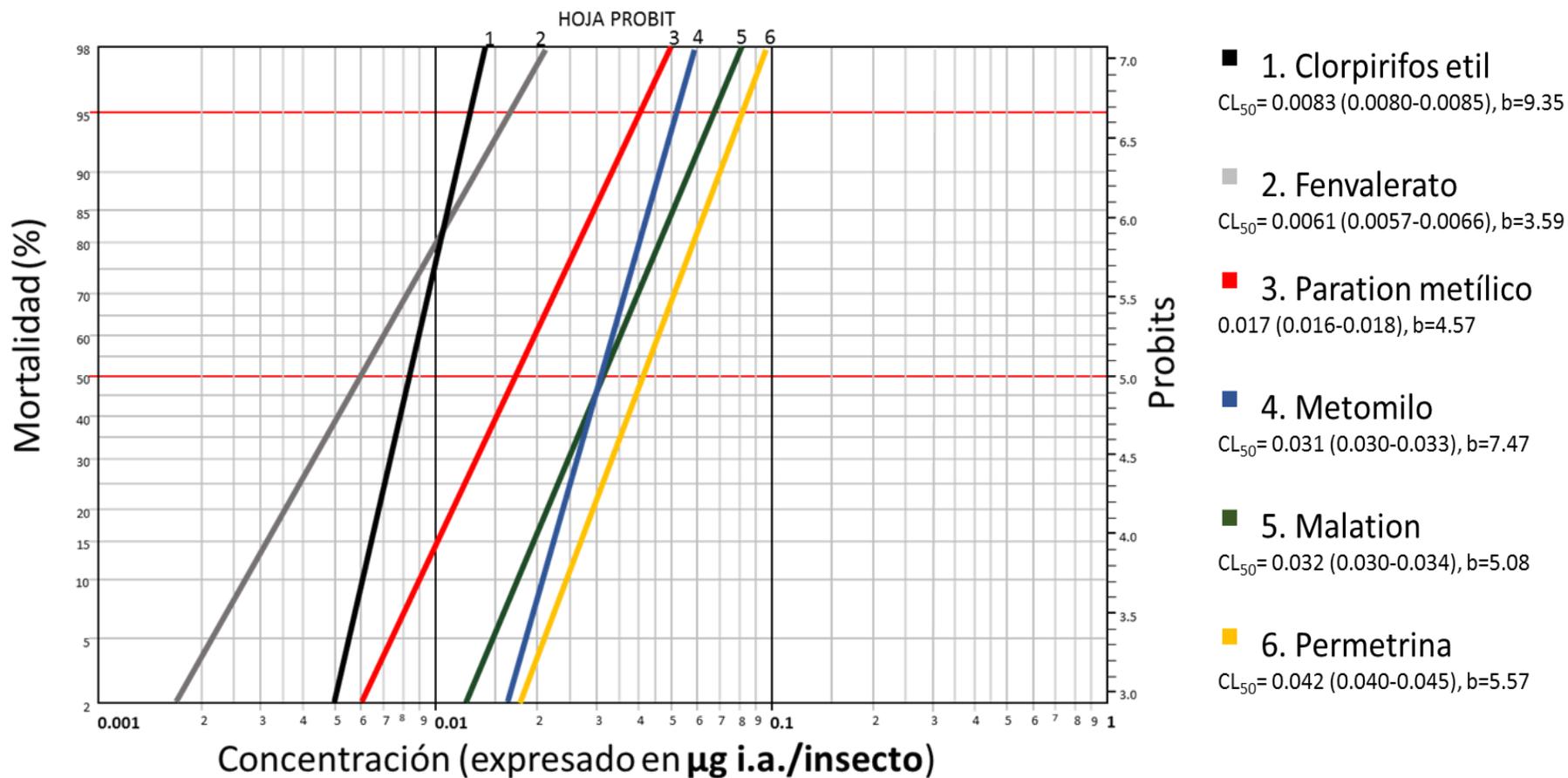


Figura 1. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultas hembras de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante aplicación tópica.

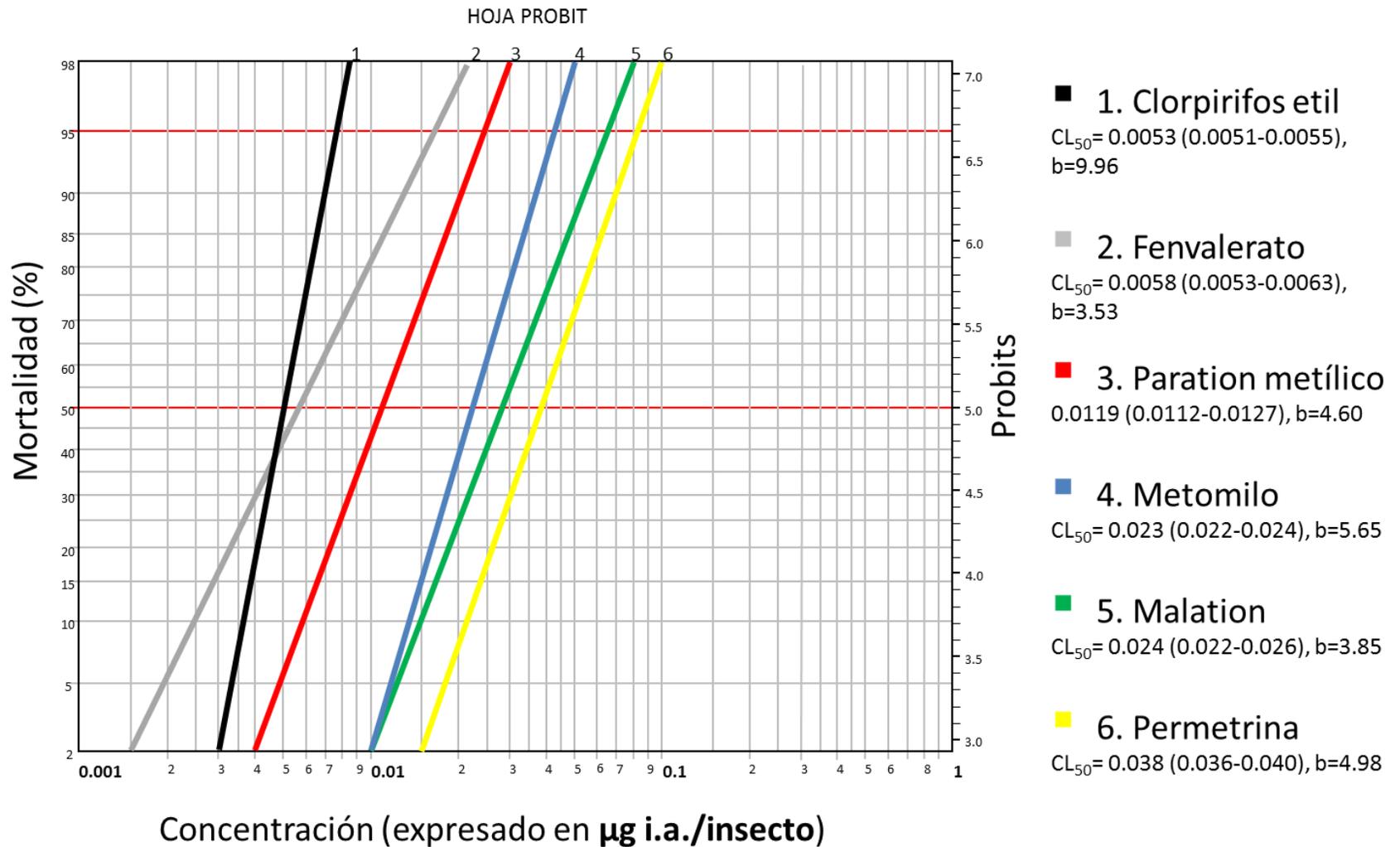


Figura 2. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante aplicación tópica.

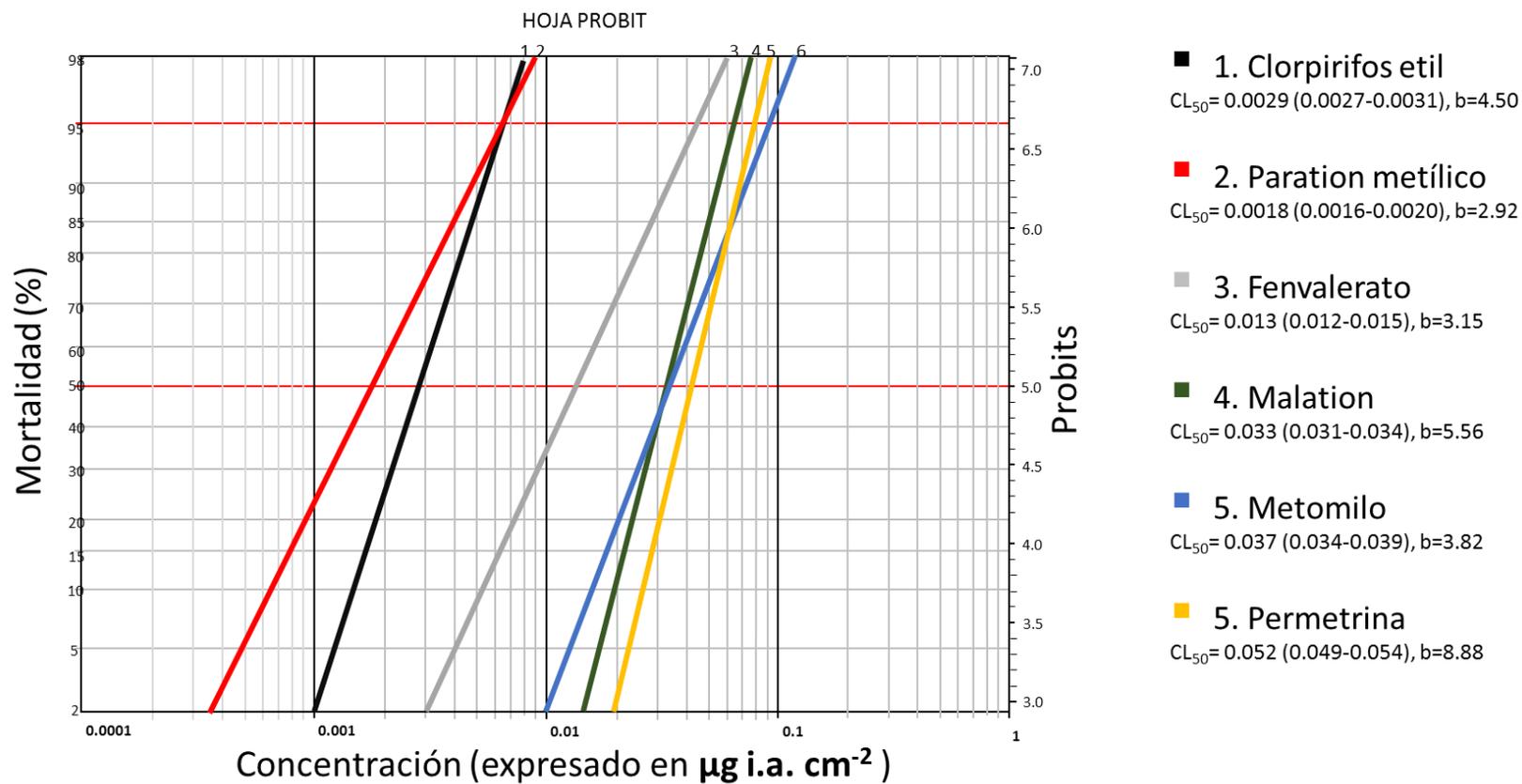


Figura 3. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultas hembras de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante aspersion con equipo tipo torre de Potter.

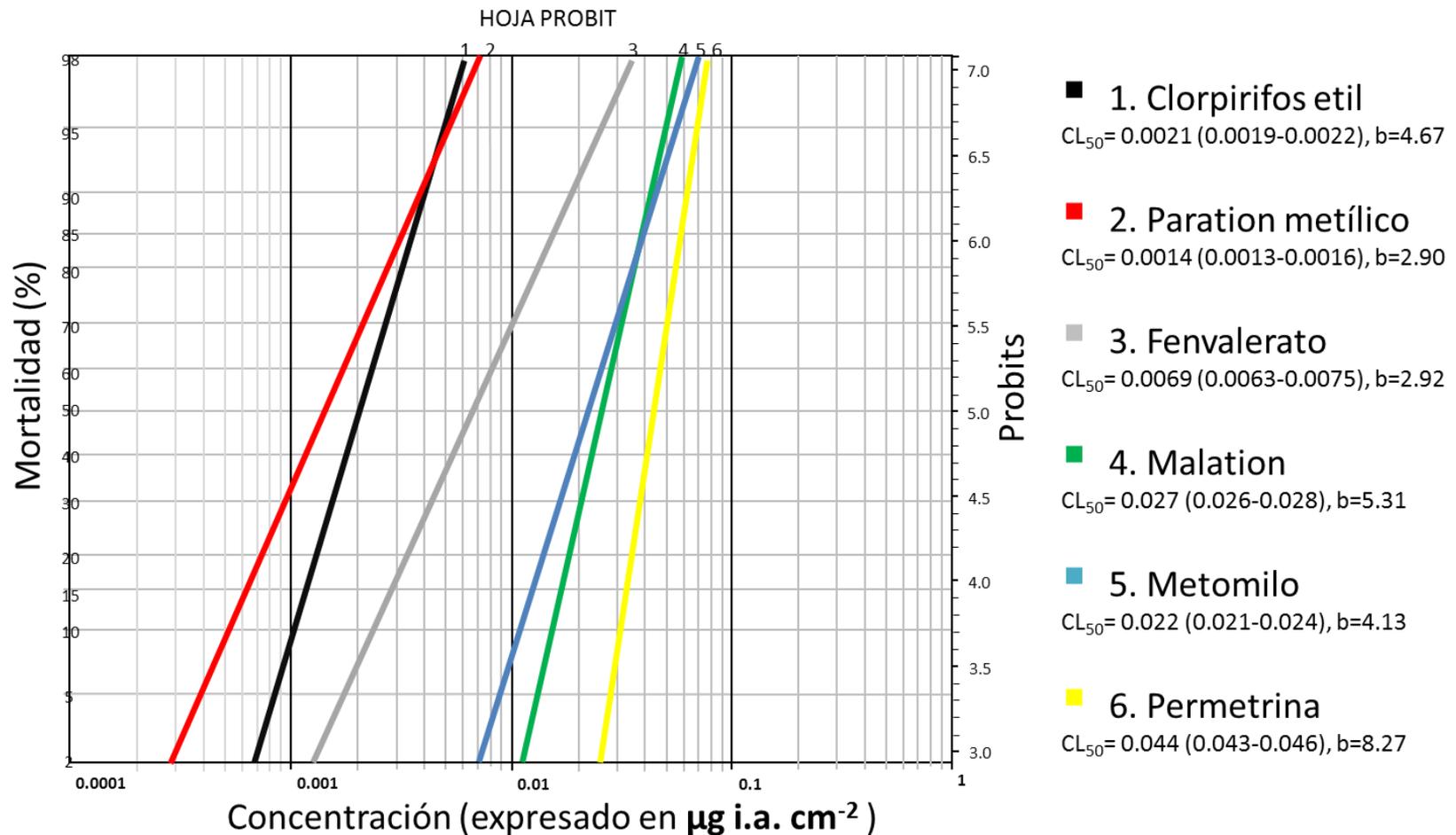


Figure 4. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemán), obtenidas mediante aspersion con equipo tipo torre de Potter.

4.3. Método Residual en Frascos.

Mediante este método se obtuvo una mayor toxicidad contra adultos hembras con los insecticidas clorpirifos etíl y paratión metílico, con valores de concentración letal media de $CL_{50}=0.012$ y $CL_{50}=0.044$ $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$, respectivamente; seguidos por fenvalerato y malation con valores estadísticamente iguales de CL_{50} de 0.06 y 0.064 $\mu\text{g i.a./cm}^2$. Con permetrina se obtuvo un valor de CL_{50} de 0.09 $\mu\text{g i.a./cm}^2$ que representó 7.5 veces el valor de la CL_{50} del insecticida más tóxico (clorpirifos etíl), en tanto el metomilo fue el insecticida con el valor más alto de CL_{50} (0.14 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$), 11.6 veces el valor de la CL_{50} de clorpirifos etíl, lo cual significó que la tolerancia del insecto a este insecticida fue mayor, (Figura 5).

La susceptibilidad de adultos machos fue mayor con respecto a adultos hembras para cada uno de los insecticidas evaluados, el valor más bajo de CL_{50} se obtuvo con clorpirifos etíl (0.010 $\mu\text{g i.a. cm}^{-2}$) en tanto que el insecticida con menor toxicidad fue permetrina con un valor de la CL_{50} de 0.055 $\mu\text{g de i.a./cm}^2$ (Figura 6).

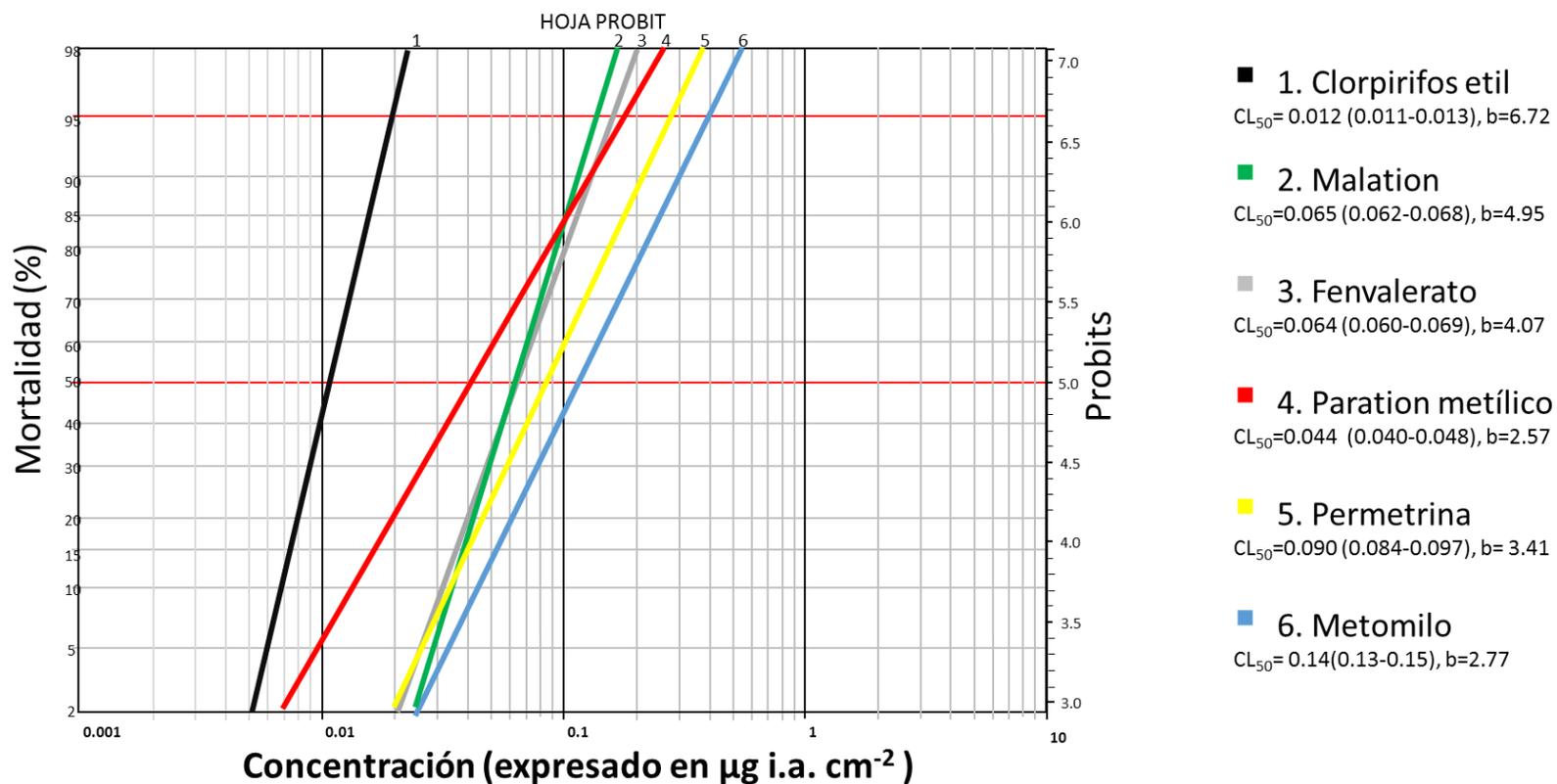


Figura 5. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultas hembras de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en frascos.

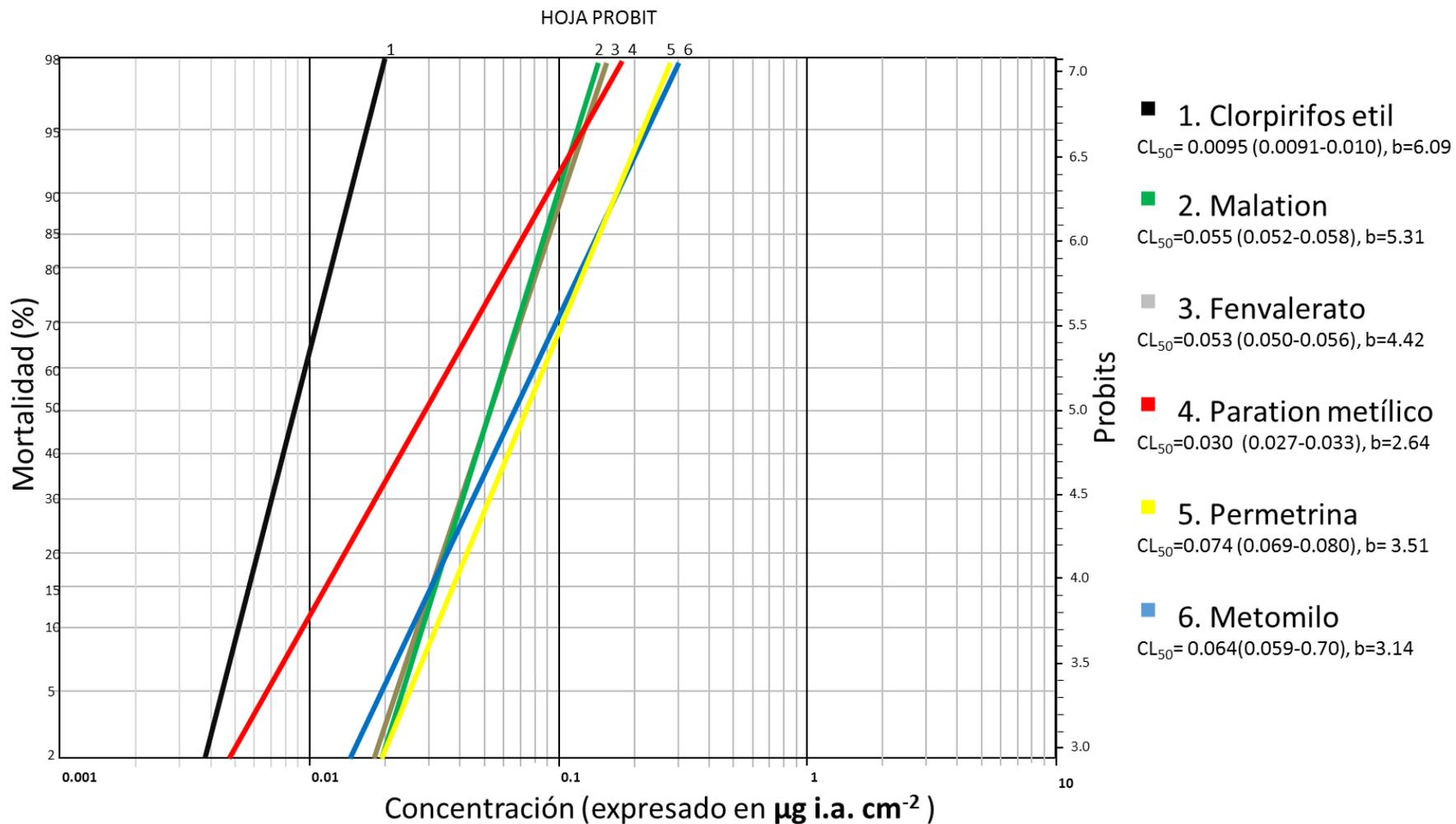


Figura 6. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en frascos.

4.4. Método Residual en Papel Filtro.

Con este método de evaluación se obtuvieron valores más altos de CL_{50} con respecto a los otros métodos, pero conservando en general la tendencia en el orden de toxicidad. La toxicidad mayor en adultos hembras de *Z. subfasciatus* se obtuvo con clorpirifos etil con una CL_{50} de $0.05 \mu\text{g i.a./cm}^2$, seguido de paratión metílico con valor de $CL_{50}=0.113 \mu\text{g i.a./ cm}^2$, mientras que para malatión se obtuvo un valor de $CL_{50}=2.849$, esto es 57 veces el valor de clorpirifos etil que fue el insecticida más toxico. Con los insecticidas piretroides fenvalerato y permetrina se obtuvo una respuesta de toxicidad similar entre sí con valores de CL_{50} de 4.96 y $5.55 \mu\text{g i.a./ cm}^2$, respectivamente; más de 99 veces el valor de la CL_{50} del insecticida más toxico. Para metomilo se obtuvo una CL_{50} de $28.50 \mu\text{g i.a./cm}^2$ por lo que la tolerancia a este insecticida fue mayor, (Figura 7).

El orden en la respuesta de toxicidad de los insecticidas evaluados obtenida en los adultos machos (Figura 8) es similar a la de adultos hembras, sin embargo comparativamente la susceptibilidad sigue siendo mayor; en este caso clorpirifos etil es el insecticida más toxico, con un valor de CL_{50} de $0.043 \mu\text{g i.a./ cm}^2$, y metomilo el insecticida menos toxico con un valor de CL_{50} de $24.150 \mu\text{g i.a./ cm}^2$, (560 veces menos con respecto al insecticida más toxico).

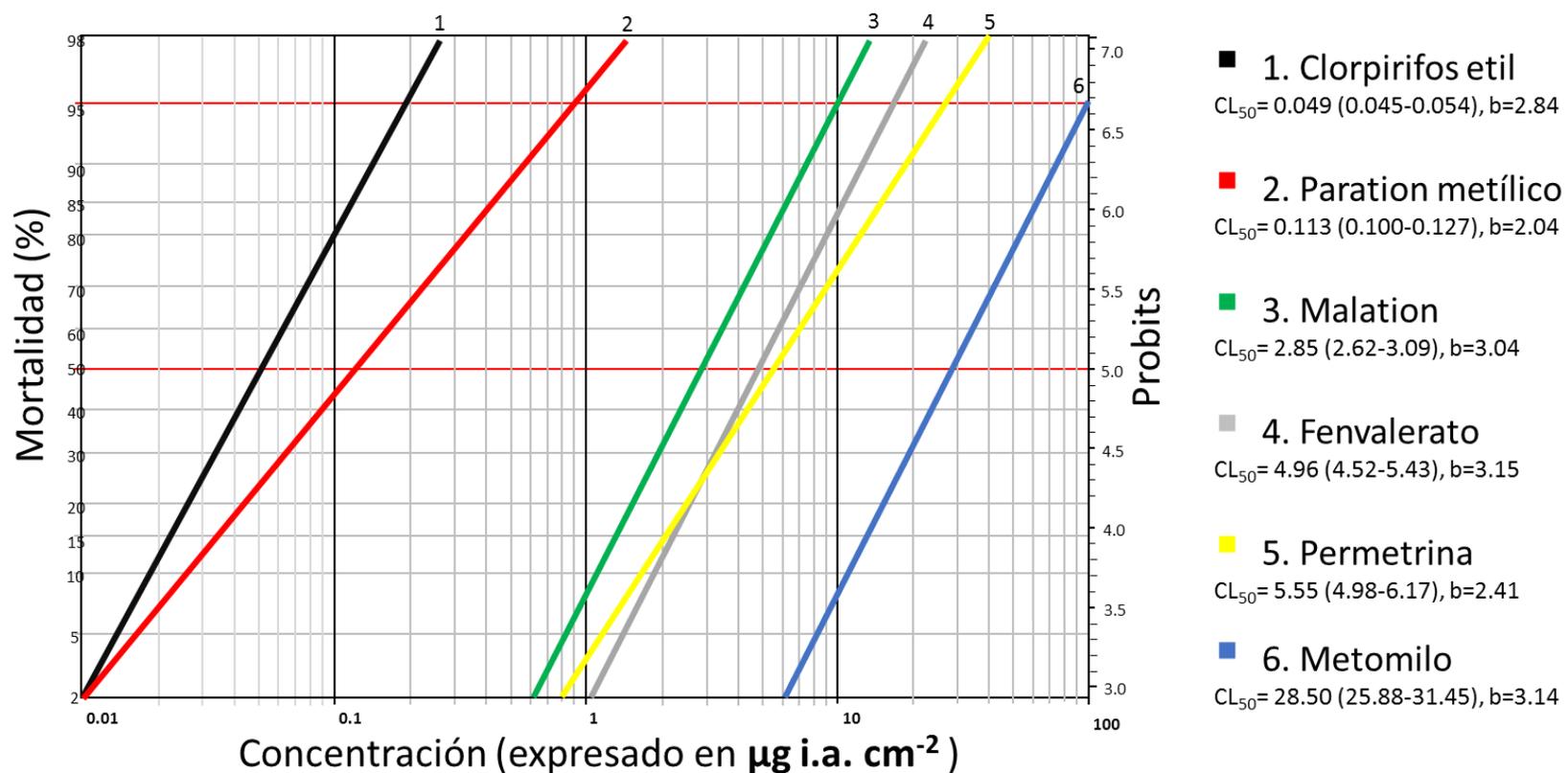


Figura 7. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos hembras de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en papel filtro.

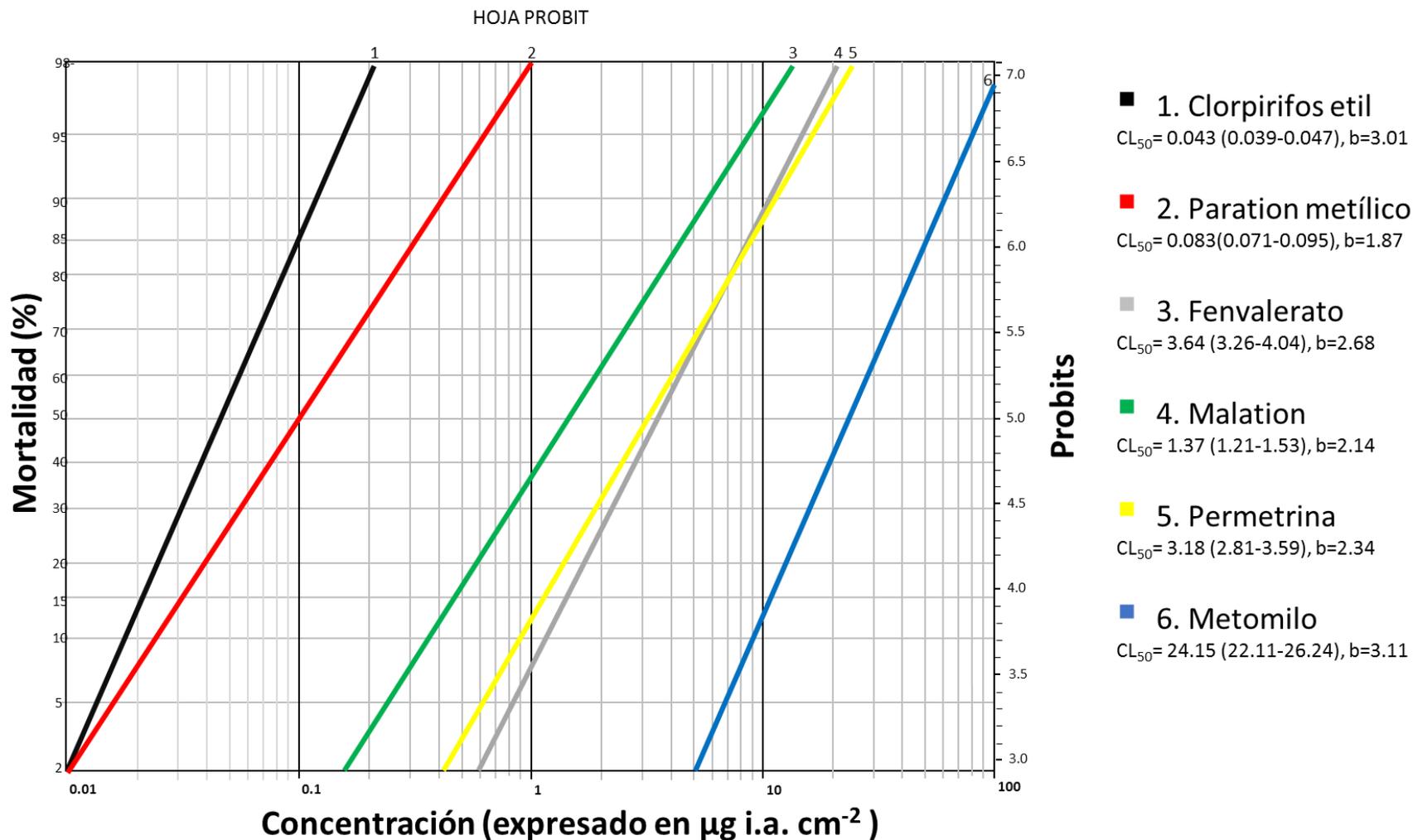


Figura 8. Líneas de respuesta dosis-mortalidad de seis insecticidas en adultos machos de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), obtenidas mediante exposición residual en papel filtro.

4.5. Comparación de la toxicidad de los insecticidas evaluados por método de bioensayo.

En general, los valores más altos de DL_{50} y CL_{50} para todos los métodos de bioensayo se obtuvieron con los insecticidas metomilo y permetrina, por lo que su toxicidad contra hembras y machos de *Z. subfasciatus* fue menor que el resto de los insecticidas evaluados. Evans (1985), mediante metodología diferente de evaluación de efectividad de insecticidas en laboratorio obtuvo que permetrina no fue efectivo en el control de *Z. subfasciatus*.

Otros investigadores han mostrado que los insecticidas organofosforados son mucho más efectivos que permetrina contra la mayoría de las plagas de granos almacenados (Evans, 1985); lo cual es congruente con la respuesta obtenida en el estudio, siendo clorpirifos etíl y paratión metílico los insecticidas más tóxicos mediante exposición residual; en tanto que con el método de aplicación tópica fenvalerato y clorpirifos resultaron ser los más tóxicos.

Por otro lado, Busvine (1971), señala que los machos de la mayoría de las especies de insectos son menos tolerantes al contacto con insecticidas que las hembras, situación que se corrobora con el presente estudio.

En cuanto a comparación de los métodos residuales de bioensayo, con el método de aspersión se obtuvieron las CL_{50} más bajas (en el Cuadro 4 se muestra la comparación de medias de CL_{50} y DL_{50} obtenidas en adultos hembras en cada uno de los métodos de bioensayo empleados); al respecto Champ y Campbell-Brown (1970), señalan que un método satisfactorio es aquel donde a partir de un análisis de regresión de datos se obtienen los valores más bajos de CL_{50} y DL_{50} , además de la mayor homogeneidad de la población.

En un análisis similar de comparación de medias de CL₅₀ y DL₅₀ de cada insecticida en relación con los métodos de bioensayo empleados, obtenidas en adultos hembras, (Cuadro 5), se muestra que para los seis insecticidas, con el método residual en exposición a través de papel filtro se obtuvieron los valores de CL₅₀ mas altos y significativamente diferentes en comparación al resto. Este método sin embargo (Método No. 06), es el recomendado por el Insecticide Resistance Action Committee para prueba de susceptibilidad a insecticidas en adultos de coleóptera considerados plaga de granos almacenados; basado en el Método No. 015 recomendado por la FAO.

Cuadro 4. Agrupación de Tukey, en la comparación de medias de CL₅₀ y DL₅₀ por método de bioensayo, contra adultos hembras de *Zabrotes subfasciatus*.

Método	Insecticida	Media CL ₅₀ µg i.a. cm ⁻²	Agrupamiento Tukey*
Aspersión	Permetrina	0.052	A
	Metomilo	0.038	B
	Malation	0.033	C
	Fenvalerato	0.013	D
	Clorpirifos etil	0.0029	E
	Paration metilico	0.0018	E
Residual en frascos	Metomilo	0.13	A
	Permetrina	0.086	B
	Malation	0.065	C
	Fenvalerato	0.065	C D
	Paration metilico	0.045	D
	Clorpirifos etil	0.012	E
Residual en papel filtro	Metomilo	28.58	A
	Permetrina	5.533	B
	Fenvalerato	5.074	B C
	Malation	2.869	C
	Paration metilico	0.115	D
	Clorpirifos etil	0.050	D
		Media DL ₅₀	
Topical	Permetrina	0.042	A
	Malation	0.033	B
	Metomilo	0.032	B
	Paration metilico	0.017	C
	Clorpirifos etil	0.0083	D
	Fenvalerato	0.0062	D

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

Cuadro 5. Agrupación de Tukey, en la comparación de medias de CL₅₀ y DL₅₀ por insecticida contra método de bioensayo, en adultos hembras de *Zabrotes subfasciatus*.

Insecticida	Método	Media CL ₅₀ µg i.a. cm ⁻²	Agrupamiento Tukey*
Clorpirifos etil	Residual en papel filtro	0.049	A
	Residual en frascos	0.011	B
	Topical**	0.0083	B
	Aspersión	0.0029	C
Paration metilico	Residual en papel filtro	0.11	A
	Residual en frascos	0.045	B
	Topical**	0.017	C
	Aspersión	0.0018	C
Metomilo	Residual en papel filtro	28.58	A
	Residual en frascos	0.13	B
	Aspersión	0.038	B
	Topical**	0.031	B
Malation	Residual en papel filtro	5.074	A
	Residual en frascos	0.063	B
	Aspersión	0.013	B
	Topical**	0.0062	B
Fenvalerato	Residual en papel filtro	5.53	A
	Residual en frascos	0.090	B
	aspersión	0.051	B
	Topical**	0.042	B
Permetrina	Residual en papel filtro	2.87	A
	Residual en frascos	0.066	B
	Aspersión	0.033	B
	Topical**	0.032	B

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

** Topical, valores corresponden a DL₅₀, dosis letal media, expresado en µg de i.a./insecto.

5. CONCLUSIONES

Con los cuatro métodos de bioensayo utilizados se obtuvo precisión en los resultados, los cuales se ajustaron a una línea recta derivado de análisis de regresión.

Con el método de aspersión se obtuvieron las CL_{50} y CL_{95} más bajas; característica deseable que debe tener un método de bioensayo según Champ y Campbell-Brown (1970).

La necesidad de metodologías simples, precisas y rápidas, que nos permitan evaluar la efectividad de los insecticidas contra *Z. subfasciatus* hace recomendable, además del método de aspersión y por su practicidad, el método residual en frascos..

De acuerdo con los valores de las pendientes y de ji-cuadradas obtenidas en los cuatro métodos de bioensayo utilizados, se confirma que la población de *Z. subfasciatus* es muy homogénea en cuanto a respuesta de toxicidad de los insecticidas evaluados y que los adultos machos son menos tolerantes que las hembras.

6. LITERATURA CITADA

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.

Busvine, J.R., 1971. *A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides*, second ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK. 345 pages.

Cárdenas-Morales, M., R. Valdés-Herrera, y E. Pozo-Velázquez. 2008. Preferencia de *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera; Bruchidae) por granos almacenados. *Centro Agrícola* 35: 35-40.

Champ, B. R. and Campbell-Brownm, J. (1970). Insecticide Resistance in Australian *Tribolium castaneum* Herbst. I. A test method for detecting insecticide resistance. *Journal of Stored Products. Res.* 6: 53-70.

Credland, P., and J. Dendy. 1992. Comparison of seed consumption and the practical use of insect weight in determining effects of host seed on the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). *J. Stored Prod. Res.* 28: 225-234.

Dendy, J. and P.F. Credland. 1991. Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59: 9-17.

Espinal, R., R. Higgins, and V. F. Wright. 2004. Economic losses associated with *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) infestations of stored dry red beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *CEIBA* 45: 107-119.

Evans. N. J. 1985. The effectiveness of various insecticides on some resistant beetle pests of stored products from Uganda. *Journal of Stored Products. Res.* 21(2): 105-109.

FAO. 1984. Recommended Methods for the Detection and Measurement of Resistance of Agricultural Pests to Pesticides. 32: 25-27. Roma.

FAO, 1994. Grain storage techniques. Evolution and trends in developing countries. FAO Agricultural Services Bulletin. 277 Pages.

FAO. 1974. Métodos provisionales para gorgojos adultos importantes en cereales almacenados, con malatión y lindano. En: 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.

Fukuto, T.R., 1974. Effect of Structure on the Interaction of Organophosphorus and Carbamate Esters with Acetylcholinesterase. In: Narahashi, T. (ed.). Neurotoxicology of Insecticides and Pheromones. Plenum Press. EUA. Páginas. 277-295.

Fukuto, T.R. and R.L. Metcalf. 1969. Metabolism of Insecticides in Plants and Animals. Annals of N.Y. Academy of Sciences. 160(1):97-111.

Hassall, K.A. 1969. World Crop Protection: Pesticides. Vol. 2. Iliffe Books Lts., Londres. 138 pages.

Lagunes, T.A. y M. Vazquez. 1994. El Bioensayo en el Manejo de Insecticidas. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco. México.

Lagunes, T. A. y Villanueva. 1994. Toxicología y Manejo de Insecticidas. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco. México. 159 Páginas.

Ospina O., H.F. 1979. Principales insectos que atacan el grano de frijol almacenado y su control. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 32 Páginas.

Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. Appl. Biol.* 39: 1-29.

Robertson, J. L. and H. K. Preisler. 1992. *Pesticides bioassays with arthropods*. CRC. Boca Raton, Fl. 127 pages.

Rodríguez, M. J. C., Silva A. G. y Guzmán P. 2009. *Tópicos Selectos de Estadística Aplicados a la Fitosanidad. El Bioensayo con Plaguicidas en Artrópodos*. Primera Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo. Texcoco. México. Páginas 128-158.

Romero-Nápoles, J. 2002. Los Bruchidae de México (Insecta: Coleoptera). *In: L*Lorente, J.B. y J.J. Morrone (Eds.). 2002. *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento*. Vol. III. Fac. Ciencias, UNAM. 710 páginas.

Soderlund, D.M., J.R. Bloomquist. F. Wong, L.L. Payne and D.C. Knipple. 1989. *Molecular Neurobiology: Implications for Insecticide Action and Resistance*. *Pestic. Sci.* 26:359-374.

Tyler, P. S. and N. J. Evans. 1981. A tentative method for detecting resistance to gamma-hch in three bruchid beetles. *Journal of Stored Products. Res.* 17: 131-135.