

Cerna Chávez, Ernesto; Ochoa Fuentes, Yisa M.; Pérez Ocampo, Santiago; Landeros Flores, Jerónimo
CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS DE RESISTENCIA EN DIFERENTES POBLACIONES DE *Tribolium
castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)
Interciencia, vol. 39, núm. 10, octubre, 2014, pp. 751-756
Asociación Interciencia
Caracas, Venezuela

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932433013>



Interciencia,
ISSN (Versión impresa): 0378-1844
interciencia@ivic.ve
Asociación Interciencia
Venezuela

CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS DE RESISTENCIA EN DIFERENTES POBLACIONES DE *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Ernesto Cerna Chávez, Yisa M. Ochoa Fuentes, Santiago Pérez Ocampo y Jerónimo Landeros Flores

RESUMEN

El gorgojo de las harinas *Tribolium castaneum* está catalogado como la plaga principal de granos y productos almacenados. Su control se basa en el uso de insecticidas y fumigantes, causando problemas de resistencia. Se realizaron pruebas bioquímicas de α y β esterasas, oxidasas, glutatión s-transferasas, acetil colinesterasa y acetil colinesterasa insensible, para determinar y cuantificar los mecanismos enzimáticos de resistencia de cuatro poblaciones de *T. castaneum* provenientes

de harineras de Norte Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Aguascalientes, México, utilizando una línea susceptible de *T. castaneum* como referencia. Los resultados obtenidos muestran que las α y β esterasas, así como las oxidasas, son las enzimas con mayor presencia en las poblaciones en estudio. Los resultados sugieren que las α y β esterasas y las oxidasas están involucradas en la resistencia a insecticidas de las poblaciones de *T. castaneum*.

Introducción

En México se registran 55 especies de insectos asociados con el daño a granos y productos almacenados; entre ellas se encuentran las especies del género *Tribolium* (Tenebrionidae), las cuales se alimentan de granos partidos o lesionados, harinas, cereales y derivados amiláceos (Gutiérrez, 1999). La especie *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) o gorgojo de las harinas está catalogada como la principal plaga de granos y productos almacenados (Howe, 1965). Las pérdidas en granos causadas por este insecto se estiman en 10-25% de la producción mundial (Weifen *et al.*, 2003) y entre 34 y 40% en

harinas y cereales (Ajayi y Rahman, 2006). El control de *T. castaneum* se basa principalmente en el uso de insecticidas y fumigantes. Sin embargo, su uso generalizado ha causado problemas tales como residuos tóxicos en los productos almacenados, toxicidad para los consumidores y la resistencia a insecticidas (Ribeiro *et al.*, 2003), donde la resistencia de tipo fisiológico es la más importante, por los sistemas enzimáticos (Lagunes y Villanueva, 1994).

Los principales sistemas enzimáticos responsables del metabolismo e inhibición de insecticidas son las oxidasas (Wilkinson, 1983), esterasas y carboxiesterasas (Yasutomi, 1983), glutatión s-transferasas (Dauterman, 1983) y acetil

colinesterasa (Hama, 1983). Al respecto, Abdul (2000) menciona valores elevados de esterasas y oxidasas, en poblaciones resistentes de *T. castaneum* a productos fosforados. Reidy *et al.* (1990) reportan una correlación elevada entre glutatión s-transferasa y resistencia a piretroides en esta misma especie. Así mismo, Haubruge *et al.* (2002) mencionan un incremento en 44 veces de la actividad de carboxiesterasas en una línea resistente de *T. castaneum* en relación a una línea susceptible. Por lo anterior, el monitoreo y detección de la resistencia es esencial en el manejo de insecticidas (Dennehy y Granett, 1984). La forma convencional de la detección de la resistencia se basa en pruebas de susceptibilidad en términos

de concentración letal media (CL_{50}) o dosis de diagnóstico (Brown, 1976), requiriendo numerosos organismos que permitan cuantificar el nivel de resistencia, pero sin detectar los mecanismos. Por otro lado tenemos los perfiles de ADN que muestran a los genes responsables, sin detectar los mecanismos y niveles de resistencia (Keiding, 1986) y, finalmente, las pruebas bioquímicas, que son una herramienta efectiva para conocer los mecanismos y cantidad de enzimas responsables de este fenómeno (Hemingway, 1986). Además, se puede conocer los fenotipos multirresistentes mediante ensayos replicados (Chan, 1985) y es posible detectar las etapas iniciales de resistencia en una población (Brown y Brogdon,

PALABRAS CLAVE / Absorbancia / Coleóptera / Colorimetría / Enzimas Detoxificativas / Gorgojo de las Harinas / *Tribolium castaneum* /

Recibido: 12/06/2013. Modificado: 29/09/2014. Aceptado: 01/10/2014.

Ernesto Cerna Chávez. Doctor en Parasitología, Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), México. Profesor Investigador, UAAAN, México. Asesor, Berni Labs S.A de C.V, México.

Yisa María Ochoa Fuentes. Doctora en Parasitología Agrícola, UAAAN, México. Profesora Investigadora, UAAAN, México. Dirección: Departamento de Parasitología, UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

C.P. 25315. e-mail: yisa8a@yahoo.com

Santiago Pérez Ocampo. Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola, UAAAN, México. Alumno del postgrado en Parasitología Agrícola, UAAAN, México.

Jerónimo Landeros Flores. Doctor en Doctor en Ciencias, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, México. Profesor Investigador, UAAAN, México.

QUANTIFICATION OF RESISTANCE ENZYMES IN DIFFERENT POPULATIONS OF *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Ernesto Cerna Chávez, Yisa M. Ochoa Fuentes, Santiago Pérez Ocampo and Jerónimo Landeros Flores

SUMMARY

The red flour beetle *Tribolium castaneum* is the main pest in stored grains and foods. Its control is based on the use of insecticides and fumigants, causing resistance problems. In order to determine and quantify the enzymatic mechanisms involved in resistance, biochemical tests for α and β esterases, oxidases, glutathione *S*-transferases, acetylcholinesterase and insensitive acetylcholinesterase were performed in four *Tribolium castaneum* populations collected

from flour mills in Northern Mexico (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas and Aguascalientes), using a susceptible line of *T. castaneum* as a reference. Results showed that α and β esterases, as well as oxidases, are the enzymes with the greater presence within the studied populations. These findings suggest that α and β esterases, and oxidases, are involved in the resistance to insecticides of the populations of *T. castaneum* under study.

QUANTIFICAÇÃO DE ENZIMAS DE RESISTÊNCIA EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Tribolium castaneum* (HERBST) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Ernesto Cerna Chávez, Yisa M. Ochoa Fuentes, Santiago Pérez Ocampo e Jerónimo Landeros Flores

RESUMO

O caruncho das farinhas *Tribolium castaneum* está catalogado como a praga principal de grãos e produtos armazenados. Seu controle se baseia no uso de inseticidas e fumigantes, causando problemas de resistência. Realizaram-se provas bioquímicas de α e β esterase, oxidase, glutathione-*S*-transferase, acetilcolinesterase e acetilcolinesterase insensível, para determinar e quantificar os mecanismos enzimáticos de resistência de quatro populações de *T. castaneum*

provenientes de farinheiras de Norte Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas e Aguascalientes, México, utilizando uma linha suscetível de *T. castaneum* como referência. Os resultados obtidos mostram que as α e β esterase, assim como as oxidase, são as enzimas com maior presença nas populações em estudo. Os resultados sugerem que as α e β esterase e as oxidase estão envolvidas na resistência a inseticidas das populações de *T. castaneum*.

1987). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue generar información sobre los mecanismos enzimáticos de resistencia en las diferentes líneas de *T. castaneum* del Norte de México y su cuantificación mediante pruebas bioquímicas.

Materiales y Métodos

Líneas de *T. castaneum*

Se usaron cinco líneas de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Una línea susceptible (T-s), facilitada por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), mantenida desde el año 2002 sin presión de selección por insecticidas, alimentada con harina de trigo comercial en cámaras bioclimáticas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 40-50% HR y 12:12 L:O. Las otras cuatro líneas fueron recolectadas en dos almacenes de harineras del estado de Coahuila (C1), de un almacén del estado de Nuevo León (NL1),

otro de Tamaulipas (T1) y la última de un almacén del estado de Aguascalientes (A1).

Cría de las colonias de *T. castaneum*

Para obtener individuos de la misma edad cronológica para las pruebas bioquímicas, las poblaciones de *T. castaneum* recolectadas fueron colocadas en recipientes de vidrio, utilizando harina de trigo comercial como sustrato. La harina fue previamente esterilizada al colocarla por tres días a -20°C , con la finalidad de evitar contaminación por otras especies de insectos. Los recipientes fueron tapados con tela de tul y asegurados con ligas para evitar la salida de los insectos, y mantenidos en una cámara de cría a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 40-50% HR y 12:12 L:O por 72h, con la finalidad de que los adultos recolectados ovipositaran. Los adultos fueron luego retirados y los huevos observados hasta

llegar a su etapa adulta (F1), para ser utilizados en las pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas para estimar niveles de enzimas

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

Los reactivos utilizados fueron: tampón fosfato de potasio 0,05M y pH 7.2 (BFP), α o β -naftil acetato (α o β NAF), o-dianisidina (OD), albúmina sérica bovina (ASB), homogeneizado de gorgojos (HM), dihidrocloruro de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBZ), metanol

(ME), acetato de sodio (ACE) 0,25M, pH 5, peróxido de hidrógeno 3% (PER), glutatión reducido (GR), 1-cloro-2,4' dinitrobenzenu (CDNB), yoduro de acetilcolina (ATCH), y 5,5'-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB).

Determinación de proteína
La determinación y cuantificación de proteína contenida en tejidos y fluidos es la base para la realización de las pruebas bioquímicas, por lo que se determinó la cantidad de gorgojos por muestra tomando como referencia la proteína por mosquito, usándose el método de Bradford (1976) modificado por Brogdon (1984), con el Kit-II de Bio-Rad y ASB como proteína de referencia. Se usaron hembras adultas de 3 días de edad en cinco concentraciones diferentes en relación al número de gorgojos (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0), cada una con 30 repeticiones.

Preparación de los homogenatos

Una vez determinada la cantidad de muestra en relación a la proteína (0,5 gorgojos= 100µg de proteína/ml), se homogenizó en 100µl de BFP y se diluyó a 1ml (Brogdon, 1984). Se prepararon 90 muestras para cada una de las líneas.

Determinación de los niveles enzimáticos

Para determinar los niveles de α -esterasas (α EST), β -esterasas (β EST), oxidasas (Ox), glutatión s-transferasas (GST), acetilcolinesterasa (ACE) y acetilcolinesterasa insensible (ACE in), se utilizaron las metodologías descritas por Brogdon (Brogdon *et al.*, 1997). Para determinar los niveles enzimáticos; para las α y el β -esterasas, se colocaron 100µl del HM a cada pocillo de la microplaca y 100µl de α o β NAF acetato (mMezcla de 56mg de α ó β NAF en 20ml de acetona y aforada a 100ml con BFP) y se dejó reaccionar 15min. Se adicionaron 100µl de OD y se tomó la lectura usando el filtro de 545nm. Para las GST, se colocaron 100µl del HD más 100µl de GR y 100µl de CDNB (mezcla de 20mg de CDNB diluida en 10ml y aforada con 90ml de BFP). Se tomó la lectura a T_0 con filtro de 340nm. Se dejó reaccionar por 10min y se tomó la lectura con el mismo filtro. La diferencia de lecturas se usó para el análisis de los resultados. Para las oxidasas,

se colocaron 100µl del HM más 200µl de TMBZ (mezcla de 50mg de TMBZ, diluida con 25ml de ME y aforada con 75ml de ACE y 25µl de PER). Se dejó reaccionar por 10min y se tomó la lectura con el filtro de 630nm. Finalmente, para la ACH y ACH in, se colocaron 100µl del HM más 100µl de ATCH (mezcla de 75mg de ATCH/100ml de BFP) y 100µl de DTNB (mezcla de 13mg de DTNB/100ml de BFP). Se tomó la lectura a T_0 con filtro de 405nm, se dejó reaccionar por 15min y se tomó la lectura con el mismo filtro. La diferencia de lecturas se empleó para el análisis de los resultados. Para determinar los niveles de ACH in, la metodología fue similar a la anterior, a diferencia que en la solución de ATCH se agregaron 25mg de Naled como inhibidor.

Análisis de los resultados

Con las absorbancias de cada enzima se realizó una distribución de frecuencias, donde la absorbancia fue la variable y la frecuencia el número de muestras de gorgojos. Se estableció el umbral de resistencia, con los valores máximos obtenidos de la línea T-s y se determinó la proporción de resistencia. Por último, se realizó un ANVA de clasificación simple y una prueba de separación de medias Tukey ($P=0,05$), utilizando el programa SAS system for Windows ver 9.0 (SAS, 2002), para determinar las diferencias en la actividad enzimática de las poblaciones. Así mismo se calculó la

frecuencia de individuos resistentes en cada población utilizando la ecuación de Hardy-Weinberg, asumiendo que la población estaba en equilibrio genético.

Resultados

En la Tabla I se puede observar que las muestras de 1 a 3 gorgojos presentan cantidad de proteína elevada, que sobrepasan el intervalo de proteína requerido (60 a 140µg). La muestra de tres gorgojos, muestra valores que sobrepasan el rango lineal del método. Las muestras con 0,2 a 0,5 gorgojos son las que presentan valores dentro del intervalo apropiado, por lo que se seleccionaron 0,5 gorgojos para trabajar por muestra, ya que presenta valores de proteína más altos, estables y evita la variabilidad de resultados.

En la Tabla II se presentan los valores máximos de absorbancia obtenidos para cada una de las poblaciones, así como el número de muestras que superaron el umbral de tolerancia.

Como puede observarse, los valores máximos de absorbancia para la línea susceptible (L-s) fueron de 0,0437; 0,5421; 1,1377; 2,6433; 0,0457 y 0,2527 para las enzimas ACE, ACE-in, α ET, β EST, GST y Ox, respectivamente, valores que se toman para establecer los umbrales de resistencia. Para la línea A1 las enzimas que superaron el umbral de resistencia fueron α ET, β EST y Ox con 30, 48 y 36 muestras respectivamente (Tabla II). Así mismo la frecuencia génica mostró valores de 0,18; 0,31 y 0,22 (Tabla III) para estas mismas enzimas. Para la línea NLI, las enzimas α ET y β EST superaron el umbral de resistencia con 12 y 24 muestras (Tabla II); además, obtuvieron frecuencia génica de 0,06 y 0,14 (Tabla III). Para la línea C1 12, 6, 18 y 12 muestras superaron el umbral de resistencia de las enzimas ACE, α ET, β EST y Ox, respectivamente (Tabla II), con frecuencias de 0,06; 0,03; 0,10 y 0,06 para dichas enzimas. Finalmente, para la línea T1 los valores máximos de

TABLA I
ABSORBANCIAS Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN HOMOGENATOS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM* EN DILUYENTE BUFFER DE FOSFATO (PH: 7.2)

Concentración	Absorbancia	mg/ml de proteína	µg de proteína
0,1	0,659 ±0,015	-0,100 *	-
0,2	0,789 ±0,018	0,030	68,640
0,3	0,832 ±0,020	0,080	99,816
0,4	0,857 ±0,022	0,093	115,039
0,5	0,889 ±0,034	0,106	140,113
1,0	0,992 ±0,37	0,380	215,800
2,0	1,126 ±0,031	0,402	312,937
3,0	1,330 ±0,043	0,528*	-

Intervalo lineal: 0,050-0,500 (*Valor no confiable, fuera del intervalo lineal). Tukey ($P=0,05$).

TABLA II
NIVELES MÁXIMOS DE ABSORBANCIA (\pm DESV. EST.) PARA CADA ENZIMA DE LAS POBLACIONES DE *TRIBOLIUM CASTANEUM* DE AGUASCALIENTES (A1 NUEVO LEÓN (NLI) COAHUILA (C1) Y TAMAULIPAS (T1), Y NÚMERO DE MUESTRAS QUE SUPERAN EL UMBRAL DE TOLERANCIA

Enzima	Absorbancia								
	Línea susceptible	Línea A1	N	Línea NLI	N	Línea C1	N	Línea T1	N
Acetilcolinesterasa	0,0437 ^{&} ±0,0012	0,0754 ±0,0126	18 ⁺	0,0443 ±0,0016	0	0,0531 ±0,0028	12 ⁺	0,0583 ±0,0083	18 ⁺
Acetilcolinesterasa insensible	0,5421 ^{&} ±0,0076	0,0690 ±0,0135	6 ⁺	0,0560 ±0,0121	0	0,0556 ±0,061	0	0,0539 ±0,023	0
α -esterasa	1,1377 ^{&} ±0,0849	1,4753 ±0,0191	30 ⁺	1,2347 ±0,081	12 ⁺	1,2473 ±0,0719	6 ⁺	1,2254 ±0,0264	12 ⁺
β -esterasa	2,6433 ^{&} ±0,1048	3,5104 ±0,1324	48 ⁺	3,341 ±0,0824	24 ⁺	3,341 ±0,0824	18 ⁺	3,2573 ±0,0424	36 ⁺
Glutacion S-transferasa	0,0457 ^{&} ±0,0051	0,0475 ±0,0066	18 ⁺	0,0460 ±0,0086	6 ⁺	0,0460 ±0,0086	0	0,0458 ±0,0076	0
Oxidasa	0,2527 ^{&} ±0,0132	0,3103 ±0,0649	36 ⁺	0,2544 ±0,0649	0	0,2783 ±0,0837	12 ⁺	0,3063 ±0,0467	30 ⁺

⁺ Número de muestras que superaron el umbral de tolerancia.
[&] Umbral de tolerancia para cada enzima.

TABLA III
VALOR DE FRECUENCIA GÉNICA PARA LOS MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE LAS DIFERENTES POBLACIONES DE *TRIBOLIUM CASTANEUM*

Enzima	Población			
	A1	NL1	C1	T1
Acetilcolinesterasa	0,10	0	0,06	0,10
Acetilcolinesterasa insensible	0,03	0	0	0
α -esterasa	0,18	0,06	0,03	0,06
β -esterasa	0,31	0,14	0,10	0,22
Glutation S-transferasa	0,10	0,03	0	0
Oxidasa	0,22	0	0,06	0,18

absorbancia oscilaron entre 0,0458 y 3,2573, superando el umbral de resistencia las enzimas ACE, α ET, β EST y Ox con 18, 12, 36 y 30 muestras (Tabla II) y frecuencias de 0,10; 0,06; 0,22 y 0,18.

En la línea A1 las enzimas que presentaron los mayores valores fueron α ET, β EST y Ox, con un 33,3; 53 y 40% de la población que superan el umbral de resistencia (Figura 1). Para la línea NL1 (Figura 2) la enzima que presentó el mayor porcentaje de la población que

superó el umbral de resistencia fue la β EST con un 26,6%. En relación a la línea C1 (Figura 3) fue la β EST con un 20% y, finalmente, para la línea T1 (Figura 4) fueron las enzimas ACE, β EST y Ox con 20; 40 y 33,3% de la población que superó el umbral de resistencia.

Discusión

En relación al contenido de proteína las muestras de 1 a 3 gorgojos presentaron un elevado contenido de proteína,

sobrepasando el intervalo de proteína requerido, por lo que fueron descartadas para el estudio. Al respecto, Bradford (1976) menciona que valores fuera del intervalo no son confiables para la cuantificación de proteína en tejidos y fluidos. De este modo, las muestras con 0,2 a 0,5 gorgojos fueron las que presentaron los valores dentro del intervalo apropiado, por lo que se seleccionó 0,5 gorgojos para trabajar por muestra en este estudio. Al respecto, Dary *et al.* (1990) mencionan que existe estrecha relación entre tamaño de muestra y cantidad de proteína, por lo que se pueden presentar diferencias en los resultados obtenidos y la cantidad de proteína es utilizada para corregir la actividad enzimática en base al tamaño y etapa de desarrollo de los organismos de prueba.

La enzima más frecuente en las cuatro poblaciones de campo fue β EST, con 53; 26,6; 20 y 40% de las poblaciones A1, NL1, C1 y T1 superando el umbral de resistencia. Al

respecto, Lagunes y Villanueva (1994) mencionan que los insecticidas usados convencionalmente en el control de plagas de granos almacenados son insecticidas organofosforados, carbámicos y piretroides, los cuales son altamente susceptibles al ataque de enzimas esterases, provocando en las poblaciones de insectos el incremento de esterases como mecanismo detoxicativo de los plaguicidas.

El segundo grupo de enzimas que presentó los valores más altos fueron las Ox, con valores de 40 y 33,3% de las poblaciones A1 y T1, que superaron el umbral de resistencia. Pimentel *et al.* (2008) mencionan que las oxidasas juegan un papel fundamental en la detoxificación de diversos compuestos de plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados (Benhalima *et al.*, 2004). Varios autores reportan a las

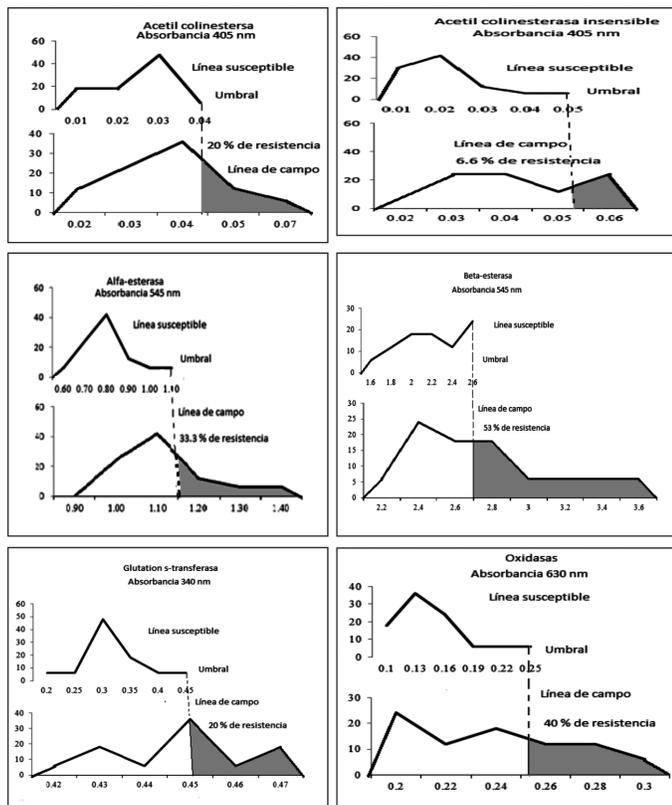


Figura 1. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Aguascalientes (A1) de *Tribolium castaneum*.

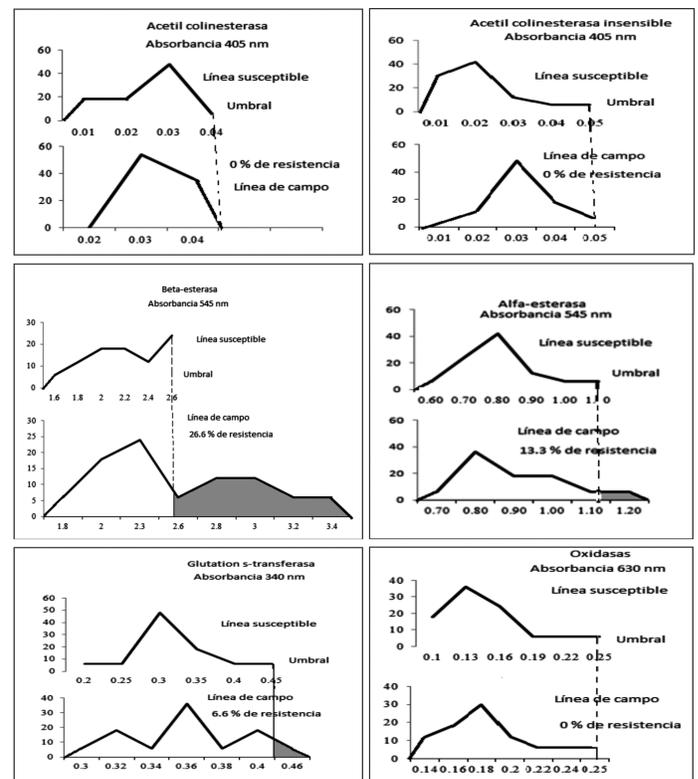


Figura 2. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Nuevo León (NL1) de *Tribolium castaneum*.

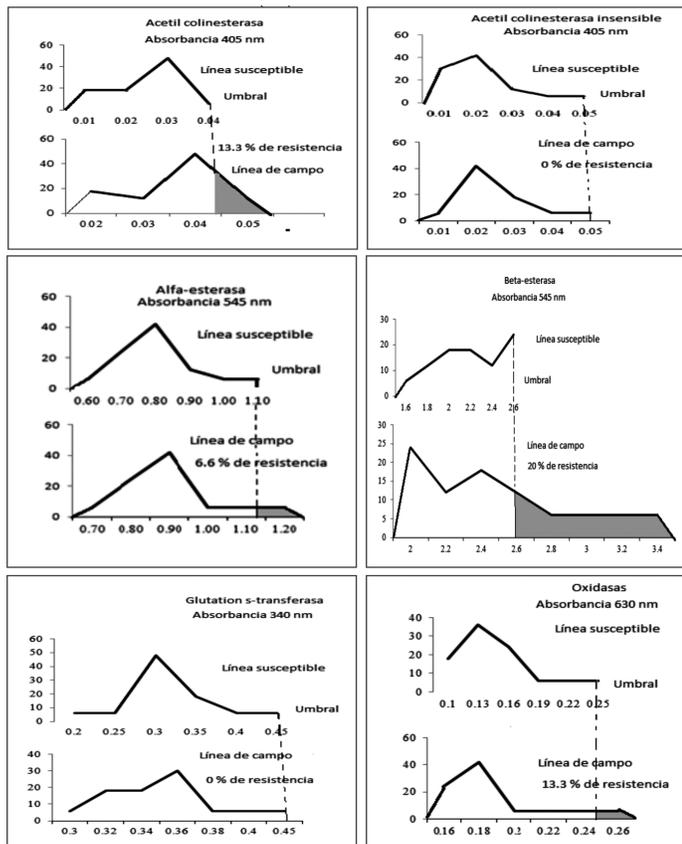


Figura 3. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Coahuila (C1) de *Tribolium castaneum*.

enzimas GST, ACE y ACE-in como causa de resistencia en especies de insectos (Dauterman, 1983). Sin embargo, en el presente estudio estos sistemas fueron los menos relevantes. Finalmente cabe mencionar que esta técnica es una herramienta muy eficaz para estudios de resistencia a plaguicidas, al proporcionarnos el mecanismo responsable y la frecuencia de la resistencia en la población. Al respecto, Reidy *et al.* (1990) reportan una alta correlación de niveles elevados de enzimas con la resistencia a plaguicidas.

Conclusión

La línea de campo A1 fue la que presentó los niveles, frecuencias y porcentajes más altos en todas las enzimas detoxificativas. Los sistemas enzimáticos responsables de la generación de la resistencia en la mayoría de las poblaciones en estudio fueron las esterasas y oxidadasas.

REFERENCIAS

Abdul MK (2000) *Studies on Insecticide Resistance in Tribolium castaneum (Herbst)*. Tesis. University of Punjab. Pakistan. 258 pp.

Ajayi FA, Rahman SA (2006) Susceptibility of some staple processed meals to red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:Tenebrionidae). *Pak. J. Biol. Sci.* 9: 1744-1748.

Benhalima H, Chaudhry MQ, Mills KA, Price NR (2004) Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *J. Stor. Prod. Res.* 40: 241-249.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brogdon WG (1984) Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 457-459.

Brogdon WG, Barber A (1987) Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single mosquitoes homogenates. *Pest. Biochem. Physiol.* 29: 252-259.

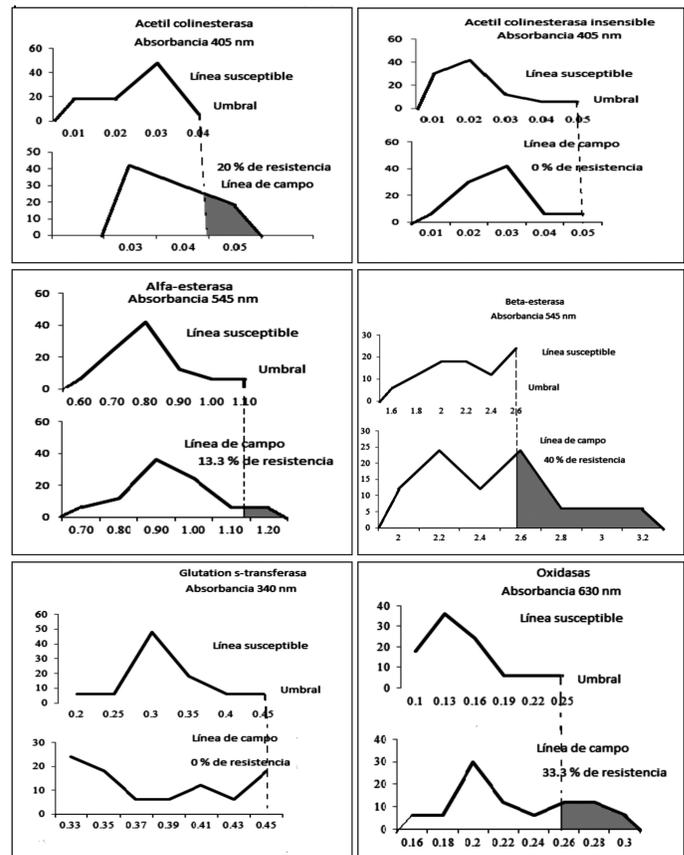


Figura 4. Distribución de frecuencias y umbral de resistencia de los niveles enzimáticos de la población del Estado de Tamaulipas (T1) de *Tribolium castaneum*.

Brogdon WG, Barber A (1990) Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. *Comp. Biochem. Physiol.* 96: 339-342.

Brogdon WG, Dickinson CM (1983) A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Anal. Biochem.* 131: 499-503.

Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J (1997) Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 13: 233-237.

Brown AWA (1976) How have entomologists dealt with resistance? *Am. Phytopathol. Soc.* 3: 67-74.

Brown TM, Brogdon WG (1987) Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 145-162.

Carvalho G, Nariko R, Barry D, Kambhampati S (1996) Resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and Malathion in Brazilian and U.S. populations

of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 27-32.

Chan KL (1985) Singapore's Dengue Hemorrhagic Fever Control Program. A Case Study on the Successful Control of *Aedes aegypti* and *Aedes lipoictus* Using Mainly Environmental Measures as a Part of Integrated Vector Control. Southeast Asian Medical Information Center. Tokio, Japón. 114 pp.

Dary O, Georgiou GP, Parsons E, Pasteur N (1990) Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *J. Econ. Entomol.* 83: 2187-2192.

Dauterman WC (1983) Role of hydrolases and glutathione s-transferases in insecticides resistance. En Georgiou GP, Saito T (Eds.) *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. Nueva York, EEUU. pp. 229-247.

Dennehy TJ, Granett J (1984) Spider mite resistance to dicofol in San Joaquin Valley cotton: Inter and intraspecific variability in susceptibility of three species of *Tetranychus*. *J. Econ. Entomol.* 77: 1381-1385.

- Dennehy TJ, Grafton-Cardwell EE, Granett J, Barbour K (1987) Practitioner assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 998-1103.
- Gutiérrez DLJ (1999) Insectos asociados a granos y productos almacenados. En *Catálogo de Insectos y Ácaros Plaga de los Cultivos Agrícolas de México*. Public. Esp. N° 1. Sociedad Mexicana de Entomología. México. pp. 107-124.
- Hama H (1983) Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. En Georghiou GP, Saito T (Eds.) *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. Nueva York, EEUU. pp. 299-331.
- Haubruge E, Amichot M, Cuany A, Berge JB, Arnaud L (2002) Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1181-1190.
- Hemingway J, Smith C, Jayawardena KJI, Heath PRJ (1986) Field and laboratory of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 76: 559-565.
- Howe RW (1965) Losses caused by insects and mites in stored foods and foodstuffs. *Nutr. Abst. Rev.* 35: 285-302.
- Keiding J (1986) Prediction or resistance risk assessment. En *Pesticide Resistance*. National Academy Press. Washington, DC, EEUU. pp. 279-297.
- Lagunes TA, Villanueva JJA (1994) *Toxicología y Manejo de Insecticidas*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 265 pp.
- Matthews GA (1993). Insecticide application in stores. En Matthews GA, Hislop EC (Eds.) *Application Technology for Crop Protection*. CABI. Wallingford, RU. Pp. 305-315.
- Pimentel MAG, Antonino FLR, Duarte BM, Humberto S (2008) Resistance of stored-product insects to phosphine. *Pesq. Agropec. Bras.* 43: 1671-1676.
- Reidy GF, Rose HA, Visetson S, Murray M (1990) Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pest. Biochem. Physiol.* 36: 269-76.
- Riebeiro BM, Guedes RNC, Oliveira EE, Santos JP (2003) Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 39: 21-31.
- SAS (2002) *Guide for Personal Computers*. SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU.
- Subrayanman B, Hagstrum DW (1995) *Integrated Management of Insects in Stored Products*. Decker. Nueva York, EEUU. pp. 331-397.
- Weifen Q, Jin ZX, Credland PF, Armitage DM, Bell CH, Cogan PM, Highley H (2003) Advances in stored product protection. *Proc. 8th Int. Working Conf. on Stored Product Protection* (22-26/07/2003). York, RU. pp. 26-39.
- Wilkinson CF (1983) Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. En Georghiou GP, Saito T (Eds.) *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. Nueva York, EEUU. pp. 175-205.
- Yasutomi K (1983) Role of detoxication esterases in insecticide resistance. En Georghiou GP, Saito T (Eds.) *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press. Nueva York, EEUU. pp. 249-263.