



Revista Fitotecnia Mexicana

ISSN: 0187-7380

revfitotecniamex@gmail.com

Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.

México

Vera Graziano, Jorge; Méndez Ramírez, Ignacio
Propuesta de protocolos combinados para detectar resistencia de semillas de frijol al ataque de
gorgojos
Revista Fitotecnia Mexicana, vol. 27, núm. 3, julio-septiembre, 2004, pp. 279-284
Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.
Chapingo, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61027308>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

PROPUESTA DE PROTOCOLOS COMBINADOS PARA DETECTAR RESISTENCIA DE SEMILLAS DE FRIJOL AL ATAQUE DE GORGOJOS

PROPOSAL OF COMBINED PROTOCOLS TO DETECT BEAN SEEDS RESISTANCE TO WEEVILS ATTACK

Jorge Vera Graziano^{1*} e Ignacio Méndez Ramírez²

¹Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5, Carr. México-Texcoco, C.P. 56230 Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Correo electrónico: graziano@colpos.mx ²Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas (IIMAS), Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Interior. Ciudad Universitaria, Del. Álvaro Obregón. C.P. 04510 México, D. F.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

Aquí se propone un nuevo protocolo experimental para detectar resistencia de semillas de frijol (*Phaseolus* spp) al ataque de los gorgojos (Bruchidae), el cual combina elementos metodológicos y estadísticos de otros dos protocolos. Con el nuevo protocolo se adicionan parámetros demográficos y etológicos de oviposición que permiten obtener resultados confiables y verificables para diferenciar grados de resistencia o susceptibilidad de dichas semillas.

Palabras clave: Resistencia a gorgojos, semillas de frijol, métodos.

SUMMARY

In order to detect bean (*Phaseolus* spp) against seed resistance the attack of Beanweevils (Bruchidae), a new experimental protocol is proposed, which combines methodological and statistical elements of other two protocols. With this new protocol, demographic and ethological parameters of oviposition are added to obtain reliable and verifiable results to differentiate degrees of resistance or susceptibility of bean seeds.

Index words: Resistance to weevils, bean seeds, methods.

INTRODUCCIÓN

Detectar resistencia en semillas de genotipos de frijol *Phaseolus* spp al ataque de gorgojos de la familia Bruchidae, especialmente de *Acanthoscelides obtectus* (Say) y *Zabrotessubfasciatus* (Boh.), es un tema universalmente importante para la agricultura, especialmente para productores de escasos recursos. Por esto, investigadores de todo el mundo se han dado a la tarea de buscar genotipos resistentes, y a la vez obtener datos que permitan localizar las estructuras o sitios en donde se localizan las defensas en las semillas de estas leguminosas.

Al respecto, Moss y Credland (1994) propusieron un protocolo experimental, mientras que otros investigadores lo han intentado a través de la técnica demográfica de tablas de vida y fertilidad de cohorte. Sin embargo, estos métodos presentan deficiencias.

En este escrito se hace un análisis de ambos protocolos y se propone un metodología alternativa que involucra o sintetiza a los protocolos mencionados. Este nuevo protocolo permitiría obtener resultados verificables y conclusiones confiables, y además identificaría los parámetros poblacionales de los gorgojos que son más importantes en la defensas de las semillas, y aportaría suficientes elementos para calificar el grado de resistencia de los genotipos.

PROTOCOLOS ANTERIORES

Protocolo de Moss y Credland

Según Credland (1994), para que un reporte sobre resistencia de semillas de leguminosas al ataque de gorgojos (ya sea en especies silvestres, variedades tradicionales o nuevos productos derivados de ingeniería genética) sea válido y compatible, es esencial que se base en experimentos que provean información confiable y sin ambigüedad, del que se pueda extraer conclusiones seguras; es decir, los experimentos deben ser verificables, lo cual requiere contar con información precisa acerca de las condiciones físicas ambientales (temperatura, humedad relativa, luminosidad, etc.) en que se realizaron los experimentos, de los insectos y de las semillas. Sin embargo, estos requerimientos conducen a una paradoja que se presenta

frecuentemente en investigación biológica, ya que tanto los insectos como los semillas son inherentemente variables.

Por esto se requiere que en los protocolos de investigación las condiciones físicas de los experimentos se definan y controlen cuidadosamente; que los organismos se describan en forma precisa, es decir, se debe especificar el "biotipo problema" del insecto, ya que una población local no representa la diversidad total de la especie. Con respecto a las semillas se debe especificar su tamaño, forma, madurez, contenido de humedad, textura de la testa, así como el lugar de colecta y las condiciones del suelo donde se obtienen las muestras de semillas, para evitar posibles sesgos por diferencias en la textura y fertilidad del suelo.

La complejidad del fenómeno puede ser ilustrado con el trabajo de Moss y Credland (1994), quienes investigaron la resistencia de ocho accesiones silvestres de *Phaseolus vulgaris* L. al ataque de *Acanthoscelides obtectus* (Say). Estos autores propusieron dos experimentos para detectar la resistencia de las semillas en todos los posibles estadios del ciclo biológico del insecto: uno para la fase de oviposición, y otro para la fase de penetración, desarrollo larval y aptitud (fitness) de los adultos para reproducirse. El primer experimento se diseñó para saber si el insecto "acepta" la forma y tamaño de las semillas para ovipositar; en cada accesión colocaron tres semillas de frijol y una pareja de gorgojos en un recipiente de cristal, y anotaron el número total de huevecillos depositados hasta que los adultos tenían 10 d de edad. Usaron 20 repeticiones para un total de 60 semillas por accesión, cantidad factible para accesiones silvestres o muestras de nuevos cultivares con pocas semillas disponibles para experimentación. Como testigo usaron el genotipo *Red Kidney Bean* clasificado previamente como susceptible. A este procedimiento se le conoce como "experimento sin libertad de selección o confinamiento". El experimento fue realizado en una cámara climática a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 70 % de humedad relativa y 14 h diarias de iluminación.

El segundo experimento consistió en tomar una semilla, de cada accesión, la cual se colocó en un recipiente especial al que se le introdujo un huevo de 5 d de edad; 3 d después se verificó si la larva había emergido y penetrado la semilla, de lo contrario se ponía otro huevo (hasta en tres ocasiones si era necesario). Este procedimiento fue repetido 20 veces por accesión. Los adultos que emergieron de esos huevecillos se separaron por sexo y se pesaron. Cada hembra se colocó en un tubo de cristal con tres semillas del genotipo que se empleó como testigo susceptible, y se introdujo un macho recién emergido de una colonia previamente establecida; se sumó el número total de huevos hasta que la hembra cumplió 10 d de edad, ya que después de ese tiempo la oviposición no es significativa. Se

midió el tiempo de desarrollo de cada espécimen, desde la penetración de la larva hasta la muerte del adulto. Este experimento se realizó en las mismas condiciones ambientales controladas de temperatura, humedad relativa y luminosidad arriba señaladas.

Los criterios que Moss y Credland (1994) fijaron para determinar la resistencia fueron: 1) Resistencia a la penetración de larvas. Una semilla es resistente si la penetración de larvas ocurría en 25 % o menos de las repeticiones; más de 25 y menos de 50 %, corresponde a resistencia intermedia; si la penetración es de 50 % o mayor, la semilla se clasifica como susceptible. 2) Desarrollo de larvas. Si el número de adultos emergidos de las semillas de cualquier accesión es 25 % o menos respecto al número de larvas que penetraron, la semilla se considera resistente; con 50 % o más de emergencia de adultos se clasifica como susceptible; más de 25 a menos de 50 %, la semilla posee resistencia intermedia. 3) Aptitud de adultos. En todas aquellas accesiones con más de cinco adultos emergidos se compara estadísticamente el tiempo de desarrollo (de la emergencia de las larvas hasta la muerte del último espécimen), el peso de los adultos y la oviposición total; así, se clasifican como resistentes aquellas accesiones en donde el tiempo de desarrollo es más prolongado, con hembras de menor peso y una baja fecundidad. En este caso se considera que la aptitud de los adultos ha sido afectada, al menos en cierto grado, por factores de resistencia ubicados dentro de la semilla.

Los datos de ambos experimentos se sometieron a análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar, y la comparación de medias mediante la prueba de Student-Newman-Keuls.

Así, el protocolo de Moss y Credland permite separar las diferentes fuentes de error, pero también presenta las siguientes deficiencias:

1. Desde el punto de vista metodológico, el haber colocado una pareja de adultos en tres semillas de frijol en un recipiente en el primer experimento y una semilla con una sola larva en el segundo, hace que la unidad experimental no represente respectivamente las condiciones de oviposición y ataque del insecto en un granero. Además, 20 repeticiones por accesión es una muestra limitada porque durante el ciclo biológico no todos los especímenes llegan al estado adulto; tal cifra reduce su representatividad para hacer inferencias estadísticas sobre su aptitud, como más adelante se indica.

2. No es del todo correcta la aseveración de que la oviposición de hembras mayores de 10 d no es significativa, pues en México la oviposición de *A. obtectus* es

frecuentemente más alta en hembras mayores de esa edad, especialmente en genotipos de frijol susceptibles al ataque de este gorgojo. Por ejemplo, en condiciones ambientales muy similares a las fijadas por Moss y Credland (1994), Camargo *et al.* (1997) reportaron que hembras de este insecto produjeron 29 % de sus huevos de los 11 a los 15 d de edad ; Bravo *et al.* (1991) detectaron 23 % de los 11 a los 19 d ; y Ortega *et al.* (1989) registraron 41 % de los 11 a los 22 d. Sólo en pocos casos, de genotipos nativos resistentes, se observó que las hembras ovipositán por un lapso igual o menor de 10 d (Bolaños y Vera, 1997).

3. Al contabilizar el total de los huevos que las hembras pusieron durante 10 d, no se tomó en cuenta la edad de éstas al momento de ir ovipositando, por lo que se corre el riesgo de subestimar o sobreestimar la fecundidad entendida como el número total de huevos depositados por hembra según su edad. Desde un punto de vista demográfico, no es lo mismo que se depositen cierto número huevos cuando las hembras tienen 3 ó 4 d de edad que si lo hacen cuando tienen 9 ó 10 d. Existen al menos tres pruebas estadísticas para comparar la fecundidad tomando en cuenta la edad de las hembras : Traslado de Intervalos (Vera y Sotres, 1991), Jackknife y Bootstrap (Meyer *et al.*, 1986), de las que se hará mención puntual más adelante.

4. Al escoger un experimento sin libertad de selección para la oviposición, Moss y Credland aducen que las hembras de los gorgojos con frecuencia se enfrentan a una sola especie o variedad de hospedante en condiciones de almacenamiento. El argumento no es muy convincente debido a que, por un lado, se podría estar obligando a los insectos a ovipositar en un hospedante que naturalmente pudiera ser rechazado por su tamaño, textura de testa, dureza, etc.; por otro lado, en algunas regiones de Latinoamérica los agricultores, por lo general de escasos recursos, siembran varios tipos de frijol con hábitos diferentes de crecimiento en el mismo ciclo agrícola: en monocultivo y asociado con maíz (*Zea mays* L.) o calabaza (*Cucurbita pepo* L.), y con frecuencia los almacenan revueltos.

5. Al tomar 20 larvas por colecta para conocer la aptitud de los adultos sucedió que únicamente en cuatro de las ocho accesiones que se probaron (y en el testigo) emergieron más de 5 adultos (7,17,17 y 20), y en dos de ellas solamente hubo tres hembras. Con estas bajas cantidades se estimó el tiempo de desarrollo del gorgojo, el peso de los adultos y la fecundidad de las hembras, de modo que es baja la representatividad de los resultados, lo que puede involucrar un serio problema de heterogeneidad de varianzas y de normalidad de los datos para someterlos a análisis de varianza, salvo que se haga una transformación, como la de potencia de Box y Cox (1964).

Protocolo de tablas de vida y fertilidad

Este protocolo consta también de dos experimentos: uno para oviposición y otro para estimar las estadísticas poblacionales de los gorgojos en los diferentes tratamientos (accesiones).

El primero consiste en usar un dispositivo comúnmente llamado olfactómetro, que le permite a los insectos ovipositar libremente sobre (o cerca de) las semillas de las accesiones que se someten a prueba; es decir, se trata de un experimento de "libre elección" para determinar si hay resistencia por antixenosis (llamada anteriormente no-preferencia) (Rentería *et al.*, 1997), y también permite la observación del comportamiento de búsqueda de grano y oviposición.

El segundo experimento se basa en una técnica demográfica bien conocida para detectar fuentes de resistencia de vegetales a insectos, ya que posibilita detectar a qué edad y con qué intensidad afectan ciertos factores a sus poblaciones (Rabinovich, 1980), y es el método que utilizaron Rentería *et al.* (1997). Inicia con muestras aleatorias de semillas (de graneros rústicos, mercados populares, almacenes, etc.) de varios genotipos de frijol en la región de interés, y de ese mismo lugar se colectan gorgojos adultos de la especie que causa daño y que sirven para formar la colonia del "biotipo local". Posteriormente, en una cámara bioclimática a 27 ± 3 °C, 70 % de HR y 12 h luz, se colocan 100 semillas por genotipo en un frasco con tapa que contiene una malla metálica que permite la ventilación. Cuando hay información previa, se usan dos testigos: uno resistente y otro susceptible. Para cada genotipo se coloca una cohorte de 100 huevos, de forma que la relación insecto-semilla sea de 1 : 1, para evitar la competencia intraespecífica por alimento.

En el caso de *A. obtectus* se procura que los granos estén lo suficientemente juntos para que las larvas tengan puntos de apoyo y puedan penetrar los granos adyacentes (Quentin *et al.*, 1991). Diariamente se anota el número de huevos eclosionados y de larvas muertas que no lograron penetrar a los granos. A medida que van emergiendo los adultos, se traspasan a una caja de petri que contiene granos del correspondiente genotipo y se registra diariamente la fecundidad de las hembras hasta que muere el último adulto. Los granos en los que se observó penetración de larvas pero no hubo emergencia de adultos, se disecan cuidadosamente y se anota el lugar en donde murieron las larvas (testa o cotiledones) y se identifican los ínstaques en que se encontraban éstas al momento de su muerte, con base en las dimensiones de sus cápsulas cefálicas (Rodríguez *et al.*, 2000; El-Achkar *et al.*, 1991); asimismo, se

hace un recuento de los especímenes que murieron en estado de pupa.

Con esta información, para cada genotipo de frijol se estiman los siguientes parámetros poblacionales (cohorte) del insecto: Curvas de supervivencia, tasas de supervivencia (L_x), esperanza media de vida (e_x), estructura de edades de la población (C_x), tasa de reproducción neta (R_0), tiempo medio de generación (T) y tasa intrínseca de incremento *per capita* (r_m). Las curvas de supervivencia de las cohortes se comparan con la prueba de Logrank (Méndez *et al.*, 2000) y el porcentaje de mortalidad larval con una prueba de z aplicada a una distribución binomial (Infante y Zárate, 1997); las r_m se comparan con la prueba de Traslapo de Intervalos, Jackknife o Bootstrap, como se indicó anteriormente.

Con dichas comparaciones y con la información sobre la esperanza media de vida, la estructura de edades y los tiempos medios de generación, se concluye acerca de los genotipos que son más resistentes o susceptibles que los testigos.

Los inconvenientes que se han detectado con este protocolo son:

1. No se logra un buen control sobre la penetración de las larvas en el caso de *A. obtectus*; esto es, aunque la relación larva-grano es 1 : 1, se corre el riesgo de que dos o más larvas penetren un sólo grano, aunque esto raramente se ha observado.

2. En ocasiones es difícil establecer si las larvas pequeñas murieron en la testa o en los cotiledones, ya que éstas con frecuencia se encuentran en el límite de dichas estructuras.

3. No se tiene un control sobre la variabilidad inherente de las semillas (o los tratamientos), como lo expuso Credland (1994); es decir, para iniciar los experimentos se toman al azar, de cada accesión, 100 semillas. Esto frecuentemente ha dado lugar a discrepancias en ciertos parámetros (en R_0 y r_m , principalmente) cuando el experimento se repite.

4. Los adultos que emergen de cada cohorte no se pesan ni se miden, por lo que la única estadística para medir la aptitud de éstos es su tasa intrínseca de incremento *per capita* (r_m). Sin embargo, es pertinente enfatizar que cuando esta tasa es igual o menor de 0.02, los adultos que emergen son pocos (menos de 10 % del número de larvas que penetraron) y las hembras ovipositan por un lapso igual o menor a 10 d.

PROTOCOLO COMBINADO

En este protocolo que aquí se propone se involucran los dos protocolos anteriores, con el propósito de obtener mayor información acerca de las estadísticas poblacionales de los gorgojos que permitan hacer conclusiones más confiables sobre los sitios de resistencia (o susceptibilidad) de las semillas de frijol. A continuación se describe el procedimiento combinado:

1. Colecta de semillas. Se debe hacer como lo indican Moss y Credland (1994), es decir, en plantas cultivadas o silvestres lo más cercanas posible en el terreno. Si el número de semillas por colecta es reducido, se recomienda sembrarlas en condiciones controladas de invernadero y homogéneas en cuanto a tipo y fertilidad de suelo, hasta obtener un mínimo de 250 a 300 semillas por accesión, para con ellas proceder con los experimentos de oviposición, penetración de larvas y aptitud de adultos.

2. Oviposición. Se recomiendan dos experimentos simultáneos. Uno, como lo indican Moss y Credland (1994), y el otro con el procedimiento de "libre elección". De esta forma se podría verificar si los resultados del primero concuerdan con los del segundo; además, con el segundo se tendría la oportunidad de observar el libre comportamiento de oviposición ante una diversidad de semillas de accesiones de diferente tipo, forma, tamaño, textura, etc., especialmente de frijoles cultivados o silvestres de buena parte de la región Neotropical (México, Centroamérica y Colombia, principalmente). Obviamente esto requiere más de 20 semillas por accesión.

3. Penetración y desarrollo larval. Para que la unidad experimental represente las condiciones de ataque del gorgojo en un granero, se deben colocar cuando menos 100 larvas recién emergidas con igual número de granos por colecta, que incluyan al testigo susceptible, en frascos con ventilación. Este número de larvas considera la cohorte inicial de una tabla de vida. De acuerdo con el porcentaje de penetración de larvas a los granos, las accesiones se califican con los criterios establecidos por Moss y Credland (1994): 25 % o menos, resistente; más de 25 y menos de 50 %, resistencia intermedia; 50 % o más, susceptible. Dado que tales criterios para determinar resistencia son amplios, estos porcentajes de penetración se pueden comparar con la prueba de z , lo que permitiría conocer la resistencia de la testa y hacer una discriminación dentro de cada criterio de resistencia; por ejemplo, si en una accesión penetraron 20 % de larvas y en otra 15 %, y la prueba detecta diferencias entre estos porcentajes, se puede decir que la segunda es más resistente que la primera.

Después se espera la emergencia de los adultos y se distan todos los granos en los que no hubo emergencia; así se detecta en qué estadio y porcentaje murieron los inmaduros (larvas y pupas) para dar continuidad a las tablas de vida. A esta información se aplica la prueba de z y, si hay diferencias con el testigo susceptible, la mortalidad se puede atribuir al efecto de la resistencia inherente a los cotiledones de las semillas.

De acuerdo con el porcentaje de adultos emergidos en relación con el número de larvas que penetraron en los granos de cada accesión, se aplica el criterio de resistencia de Moss y Credland (1994).

4. Aptitud de adultos. En todas aquellas accesiones en donde hay más de 25 % de emergencia de adultos, las cuales serían catalogadas como susceptibles a la penetración y desarrollo de larvas, se mide el peso y tamaño de hembras y machos; se registra el número de huevos depositados por las hembras según la edad de éstas, para iniciar las tablas de fecundidad, y también se registra la viabilidad de los huevos; las observaciones se siguen realizando hasta la muerte del último espécimen en cada accesión. En esta fase queda al criterio del investigador si se deja a las hembras copular con machos que emergieron de la misma accesión de donde ellas emergieron (como cuando se están probando genotipos mejorados destinados al almacenaje y posterior consumo), o con machos aptos previamente escogidos de una colonia en una variedad susceptible (si se están probando accesiones silvestres, en donde las hembras en condiciones naturales tienen mayor probabilidad de aparearse con machos que no provienen de los mismos granos de donde salieron las hembras).

Con estos datos se estiman las estadísticas poblacionales de todas las cohortes del insecto en cuestión: Tasas de supervivencia (L_x), esperanza media de vida (e_x), tasa neta de reproducción (R_0), tiempo medio de generación (T), tasa intrínseca de incremento *per capita* (r_m) y distribución de edades (Cx).

Luego se comparan las curvas de supervivencia con la prueba de Logrank; las tasas intrínsecas de incremento *per capita* con la prueba de Traslapo de Intervalos o las pruebas de Jackknife o de Bootstrap; el peso y tamaño de los adultos se comparan con una prueba no-paramétrica, por ejemplo la de Kruskal y Wallis (Infante y Zárate, 1997). Con estos resultados se infiere si la resistencia en los cotiledones se manifestó en la capacidad de los adultos para reproducirse y producir descendencia fértil.

Adicionalmente, si la comparación de las estadísticas anteriores no permite detectar una diferencia clara entre dos (o más) accesiones en la aptitud de los adultos, y se

quisieran tener más elementos para discriminar entre ellas, se recomienda hacer uso de la información que proporcionan las estadísticas ex , T y Cx .

CONCLUSIONES

El protocolo combinado que se propone, basado en dos protocolos experimentales para detectar resistencia de frijol (*Phaseolus spp.*) al ataque de gorgojos (Bruchidae), contribuye a que disminuya la variabilidad inherente en las semillas (genotipos) que se colecten para determinar sus efectos sobre los insectos; a que las unidades experimentales sean representativas de las condiciones de oviposición y ataque de estos brúquidos; a que se identifiquen las estructuras que le confieren resistencia a dichas semillas; ya que se conozca cuáles estados biológicos y parámetros poblacionales de los gorgojos son los más afectados por las defensas de estas leguminosas. Con lo anterior se llegará a conclusiones más confiables, apoyadas con pruebas estadísticas acordes con los procedimientos experimentales del protocolo combinado aquí propuesto.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores del Colegio de Postgraduados, Gabriel Otero Colina (Instituto de Fitosanidad), José Antonio Santizo Rincón y Said Infante Gil (Instituto de Sociología, Estadística e Informática) por sus observaciones y sugerencias al presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolaños G M, J Vera G (1997) Resistencia de genotipos de frijol criollo *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae) al ataque de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Folia Entomol. Mex.* 100:23-33.
- Box G E P, D R Cox (1964) An analysis of transformations. *J. Roy. Statist. Soc. B* 26:211-252.
- Bravo M E, J Vera G, J L Carrillo S, H Bravo M (1991) Tasas de supervivencia y reproducción de *Acanthoscelides obtectus* (Say), parámetros para evaluar la resistencia de genotipos de frijol. Avances de Investigación del Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Vol. 1:23-25.
- Camargo L M F, J Vera G, B Domínguez R (1997) Preferencia, mortalidad y fertilidad de *Acanthoscelides obtectus* (Say) en seis líneas de frijol y la variedad Jamapa. *Agrociencia* 31:253-257.
- Credland P F (1994) Bioassays with bruchid beetles: problems and (some) solutions. Pro. 6 th International Working Conf. on Stored-product Protection. Vol. 1:509-516.
- El-Achkar H M N, B Domínguez R, J Vera G, R Garza G (1991) Respuesta de cuatro líneas de frijol *Phaseolus vulgaris* L. a *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). *Agrociencia S. Prot. Veg.* 2:25-135.
- Infante G S, G Zárate de L (1997) Métodos Estadísticos. Un Enfoque Interdisciplinario. 4a Reimpresión. Ed. Trillas. 643 p.
- Méndez R I, D Namihira G, L Moreno A, C Sosa M (2000) El Protocolo de Investigación: Lineamientos para Elaboración y Análisis. Trillas, 6a Reimpresión, México. pp:179-187.

- Meyer J G, C G Ingresoll, L L McDonald, M S Boyce (1986)** Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology* 67 (5):1156-1166.
- Moss C J, P F Credland (1994)** The measurement of resistance to *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. Pro. 6 th International Working Con. on Stored-product Protection. Vol. 1:545-552.
- Ortega M L, J Vera G, H Bravo M, A Equihua M (1989)** Tasas de supervivencia y reproducción de *Acanthoscelides obtectus* (Say) en diferentes variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* L. *Agrociencia* 76:183-195.
- Quentin M E, J L Spencer, J R Miller (1991)** Bean tumbling as a control measure for the common bean weevil, *Acanthoscelides obtectus*. *Entom. Exp. App.* 60:105-109.
- Rabinovich J E (1980)** Introducción a la Ecología de Poblaciones Animales. C.E.C.S.A., México. pp:105- 124.
- Rentería L L, J Vera G y B Domínguez R (1997)** Preferencia y tasas de fertilidad de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). *Agrociencia* 31:349-352.
- Rodríguez Q M, J Valdez C, J Vera G, A Castillo M (2000)** Identificación de ínstaras larvales de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleóptera: Bruchidae) mediante las dimensiones de sus cápsulas céfálicas. *Agrociencia* 34:83-90.
- Vera G J, D Sotres R (1991)** Prueba de Traslapo de Intervalos para comparar tasas instantáneas de desarrollo poblacional. *Agrociencia S. Protec. Veg.* 2 (2):7-13.