

Toxicidad en aves (*Numida meleagris* L.) de insecticidas utilizados en el control de la langosta (*Docioestaurus maroccanus* Thunb.)

J. DEL MORAL, E. M. MIGUEL-LASOBRAS, I. S. ÁLVAREZ, A. MURIEL, FCO. PÉREZ-ROJAS, M. SENERO

En Extremadura, para evitar las plagas endémicas de langosta (*Docioestaurus maroccanus* Thunb.), se han utilizado procedimientos de control químico (DDT, HCH, fenitrotion, malation y diflubenzuron) y biológicos (el hongo deuteromiceto *Beauveria bassiana* Vuill., y el ave depredadora *Numida meleagris* L., conocida por "Pintada").

Los experimentos realizados para comprobar el efecto de fenitrotion, diflubenzuron y *B. bassiana* sobre la salud de las Pintadas y los ensayos de teratogeneidad sobre embriones ponen de manifiesto que para controlar las plagas de langosta no parece aconsejable hacer coincidir el empleo de fenitrotion o diflubenzuron con la utilización de aves depredadoras, mientras que éstas sí pueden compaginarse con el empleo del hongo *Beauveria bassiana* Vuill.

J. DEL MORAL, A. MURIEL, FCO. PÉREZ-ROJAS, M. SENERO: Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Avda. de Portugal s/n. 06800 Mérida (Badajoz)
jmoralv@aym.juntaex.es

E. M. MIGUEL-LASOBRAS, I. S. ÁLVAREZ: Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda. de Elvas s/n 06071 Badajoz.
ialvarez@unex.es

Palabras clave: Fenitrotion, diflubenzuron, *Beauveria bassiana*, protección integrada, teratogeneidad.

INTRODUCCIÓN

La formación de plagas de langosta es un problema secular que se desarrolla todos los años en el sur de España con más o menos intensidad, principalmente en las comarcas esteparias de La Serena (Fig. 1) y Llanos de Cáceres (Extremadura), Los Pedroches (Andalucía) y Valle de Alcudia (Castilla-La Mancha).

La lucha química ha sido y es fundamental en la eliminación de *Docioestaurus maroccanus* (Fig. 2) en los últimos años. En Extremadura, el malation ULV (ultra bajo volumen) distribuido desde avión ha sido un instrumento valioso de control desde la década de los sesenta y hasta el final del siglo XX. En las campañas terrestres, en cambio, se

han empleado distintos específicos: hasta el año 1986 se utilizó el HCH, a partir de entonces se sustituyó por el fenitrotion, y éste, a su vez, fue cambiado en la década de los noventa por el diflubenzuron aplicado sobre los rodales de puesta (ÁLVEZ-GÓMEZ *et al.*, 1989; ARIAS *et al.*, 1993; DEL MORAL, 1986; GARCÍA CONCELLÓN *et al.*, 1987, 1988, 1991; SÁNCHEZ-GARCÍA *et al.*, 1993); en el momento actual se emplea, además del diflubenzuron en el avivamiento, malation sobre adultos.

Los beneficios económicos del control de esta plaga por procedimientos químicos fueron calculados por ARIAS *et al.* (1993) en 1000 millones de pesetas de entonces, cantidad que sería escandalosa si la plaga no se controlase e invadiese áreas de las Vegas del



Figura 1: La predominancia de pizarras (Dientes de perro) en el suelo de la comarca esteparia de La Serena es una característica idónea para la formación de plagas de langosta.

Guadiana. Aunque esa razón preventiva parece ser incuestionable, la aplicación de insecticidas tiene un gravísimo inconveniente, y es que al envenenar a un elemento de la cadena trófica – la langosta– se está contaminando gran parte del agrosistema, con lo cual, la extraordinaria potencialidad comercial de estas comarcas rurales –poder presentarse ante la opinión pública con productos agrarios naturales obtenidos mediante una agricultura extensiva– es desbaratada al tener que distribuirse, sobre amplias superficies, considerables cantidades de insecticidas con capacidad de contaminar carnes, quesos, miel... y cuyos efectos como cancerígenos y teratógenos se presume y denuncia por amplios colectivos sociales.

Desde comienzos del siglo XX se han considerado diversas alternativas al empleo de insecticidas. La corriente de opinión actualmente existente en el mundo en contra del uso de insecticidas para combatir plagas está provocando el planteamiento de formas alternativas al control químico de la langosta basadas en procedimientos naturales. Una de esas formas es el empleo de entomopatógenos. Los agentes más prometedores a tal fin parecen ser los hongos deuteromicetos *Beauveria* spp y *Metarhizium* spp (PRIOR y GREATHEAD, 1989; FENG *et al*, 1994).

En España también se ha estudiado esta forma de control de la langosta, comprobándose que los aislados de *Beauveria bassiana* son los que presentan más posibilidades para ser utilizados como bioinsecticida contra la langosta mediterránea *D. maroccanus*, (HERNÁNDEZ, 1993; HERNÁNDEZ y SANTIAGO, 1997).

Pero el empleo de entomopatógenos para controlar los insectos, aún cuando se haya comprobado su eficacia y se demuestre su inocuidad, conlleva el peligro de que necesitan una temperatura y humedad precisas para actuar, y si esto no se produce, el entomopatógeno no tiene ningún valor insecticida (GARRIDO, 1994). Es por ello que basar el control de esta plaga en el uso exclusivo de entomopatógenos implica un alto riesgo, razón por la cual no se puede abandonar el control de las plagas de langosta al uso exclusivo de estos insecticidas biológicos, siendo recomendable el concurso de otros procedimientos biológicos.

Entre los procedimientos alternativos utilizados para el control biológico de las plagas de langosta aparece el empleo de animales depredadores de la misma. Las referencias que tenemos de ello en España son muy antiguas: LÓPEZ-CORDERO y APONTE (1993) extractan unas actas del Cabildo Eclesiástico de Jaén en 1670 donde se describe el proce-



Figura 2: Adultos de langosta en los que se puede apreciar su capacidad de camuflaje en el suelo de La Serena.



Figura 3: La facilidad que tiene la pintada para agregarse es una buena característica de estas aves para depredar langosta.

dimiento de combatir al parásito mediante el auxilio de cerdos. VÁZQUEZ y SANTIAGO (1993), por su parte, recogen documentos del siglo XVIII donde se cita el empleo de pavos, gallinas e incluso una especie importada de Filipinas (*Paradisea tristis* L.), con la misma finalidad. HEREDIA, en 1782, y refiriéndose a una plaga extraordinaria que hubo en Aragón, dice que fueron de gran auxilio los pavos que se llevaban al campo antes de la salida del sol.

En la bibliografía actual aparecen algunos trabajos que recogen experimentos para controlar plagas mediante la depredación con aves. En Kenia, HASSAN *et al.* (1991 y 1992) han puesto a punto un método para emplear pollos como depredadores de parásitos de ganado. GREATHEAD (1992) afirma que en el nordeste de África hay ejemplos de depredación de langosta por aves tales como "Morabon, White stork, Raven, Hornbill..." cuya capacidad de depredación es considerable.

En España, DEL MORAL *et al.* (1995, 1997, 1998 a y b) han elaborado una serie de trabajos con el interés de utilizar como depredador del insecto a la pintada (*Numida meleagris* L.) (Fig. 3), cuyos resultados evidencian que las aves muestran un instinto depredador muy bien definido, desarrollan su actividad en total libertad alrededor de sus refugios-corrals, y su capacidad de exploración es muy

grande. Los resultados de los experimentos y observaciones realizadas se pusieron en práctica en condiciones normales de explotación, demostrándose su viabilidad económica, procedimiento que no sólo es capaz de controlar la plaga sin el uso de insecticidas de síntesis, sino que con él se transforman las plagas de langosta en una carne de consumo humano muy demandada en la alta culinaria. –En 1998 un rebaño de 500 pintadas controló eficazmente la plaga de langosta (≈ 3 formas móviles de *D. maroccanus/m^2*) en una finca de 500 ha (DEL MORAL *et al.*, 1999 y 2001; MEJÍAS *et al.*, 1999). Parece suficientemente demostrado que en Extremadura el control de las plagas de langosta se puede hacer eficazmente con el uso de insecticidas de síntesis, así como con el uso de entomopatógenos y depredación mediante aves, pero la utilización conjunta de los tres procedimientos (Protección Integrada) –tal y como aconseja la OILB (Organización Internacional para la Lucha Biológica)–, podría tener una mayor eficacia que el de cada procedimiento usado aisladamente.

No obstante, la utilización de ese procedimiento donde coexistan el empleo de insecticidas, los entomopatógenos y las aves depredadoras conlleva un posible riesgo, ya que las aves comerían insectos vivos, pero también los muertos por el insecticida y el entomopatógeno, desconociéndose, en la actualidad, el efecto que podría tener en la salud de las aves depredadoras (*N. meleagris*) la ingestión de langostas muertas por el insecticida o el entomopatógeno.

Adicionalmente, en el control de plagas es necesario evaluar la incidencia que los compuestos químicos utilizados, o en su caso el agente biológico, tienen no sólo sobre el medio ambiente sino sobre la población general mediante la transmisión de los mismos a través de la cadena alimentaria. Un método para evaluar la toxicidad potencial de compuestos químicos es el test de embriotoxicidad (JELNIK, 1982). Este test se basa en la adición del compuesto a evaluar en el medio utilizado para cultivar embriones de pollo (*Gallus gallus*) en fase de gastrula-

ción según el procedimiento descrito por NEW (1955). Este test ha mostrado su eficacia evaluando tanto los efectos teratogénicos sobre el desarrollo embrionario, como sobre la fertilidad (NEW, 1990; NISHIGORI *et al.*, 1992). El empleo de este método de evaluación de la toxicidad ha sido muy utilizado para el estudio de compuestos tóxicos de la ingesta habitual, como es el caso del etanol (CARTWRIGHT y SMITH, 1995a, 1995b) y tiene plena vigencia para otros compuestos incluyendo los pesticidas.

Parece suficientemente probado que los procedimientos individuales (químicos y biológicos) de control de la langosta en Extremadura son eficaces, pero para el diseño de un procedimiento de Protección Integrada es necesario determinar, con precisión, la inocuidad del entomopatógeno *Beauveria bassiana* y los insecticidas de síntesis respecto a las aves depredadoras (*N. meleagris*). Éste ha sido el interés de los experimentos descritos en esta publicación.

ANTECEDENTES

Características de algunos insecticidas empleados contra *Dociotaurus maroccanus* en Extremadura

Fenitrotion

Fenitrotion es un insecticida fosforado de origen japonés y alemán que actúa por contacto e ingestión inhibiendo la acetilcolinesterasa (BOVEY, 1984). Su acción sobre las abejas e insectos auxiliares es elevada, pero su persistencia es escasa -10/15 días- razón por la que sustituyó ventajosamente al DDT al poco de su aparición en el mercado (ALFARO, 1969; BARBERÁ, 1976; BROOKS, 1979). En Extremadura se comprobó su eficacia contra *Dociotaurus maroccanus* (DEL MORAL, 1986), empleándose desde entonces y hasta 1993 para evitar las plagas de este insecto (GARCÍA CONCELLÓN *et al.*, 1993). La FAO ha recomendado su empleo contra las plagas de Langosta (WORTHING *et al.*, 1987), y en Kazahstand y Uzbekistan se emplea con dicho fin (LACHININSKII, 2000).

Las cifras dadas para su DL50 por toxicidad oral agua en ratas son variables según los autores: MARTÍN (1968), LIÑÁN (1981) y FOURNIER y BUNDERF (1983) afirman que están entre 250 y 500 mgr/kg, mientras que WORTHING y WALKER (1987) establecen un valor de 800 mgr/kg. Sobre gallinas de pintadas (*Numida meleagris* L.), JUNSHI (1969) determina que la DL50 es de 1880 mgr/kg. Respecto a teratogeneidad, BERLINSKA y SITAREX (1997) determinan que 30 mgr/kg de fenitrotion en ratas no evidencian efectos negativos.

Diflubenzuron

Los insecticidas fosforados empezaron a ser sustituidos a partir de los años sesenta por los biorracionales, llamados así por su capacidad de regular el crecimiento o el comportamiento de los insectos (BELLÉS, 1988). El diflubenzuron fue el primer inhibidor de la formación de cutícula que se sintetizó (DOMINGO, 1988), actuando preferentemente en los primeros estadios de desarrollo (GROSSCOURT, 1987).

El diflubenzuron se emplea para controlar diversas plagas de numerosas especies vegetales en el mundo: en la India contra *Schistocerca gregaria* (RAO *et al.*, 1986); en Italia se ha ensayado contra *Psylla pyri* (INSERRA, 1987); en Virginia se emplea para controlar *Lymantria dispar* (WHITMORE *et al.*, 1993). También se utiliza contra insectos parásitos de hombres y animales: contra mosquitos (MONTADA *et al.*, 1988, contra *Musca domestica* (RUB *et al.*, 1989), para eliminar moscas de cerdos (ROELOFS, 1998). En España se realizó el primer ensayo con diflubenzuron en octubre de 1975 (ROBRED, 1988), empleándose contra *Lymantria monacha* (SORIA *et al.*, 1988), y desde 1989 se emplea en Extremadura contra *Dociotaurus maroccanus* (GARCÍA CONCELLÓN *et al.*, 1993).

La toxicidad oral aguda (DL50) en rata es >4640 mgr/kg (DE LIÑÁN, 1981; WORTHING *et al.*, 1987).

La toxicidad de diflubenzuron sobre aves parece ser escasa o nula (FDZ. DE CÓRDOBA *et al.*, 1993, MARTINAT *et al.*, 1987,

MIAO *et al.*, 1988, ROBREDO, 1988, STRIBLING *et SMITH*, 1987, WHITMORE *et al.*, 1993).

Sobre diversas especies de abejas su toxicidad es muy baja, lo que le hace ser recomendable para incluirlo en los programas de Protección Integrada (USHA y KANDASAMY, 1986)

En tejidos de hígado, riñones, cerebro y musculares de humanos, se ha comprobado que el diflubenzuron actúa inhibiendo las proteinasas (SALEEM *et al.*, 1995).

Su persistencia sobre los vegetales es alta—En acículas de pino manifestó toxicidad para *Graellsia isabelle* dos años después de su aplicación—. En vacas y ovejas se produce absorción gastrointestinal, siendo metabolizado y excretado, pero una parte del producto no metabolizado pasa a la leche.

El diflubenzuron es usado en programas de Control integrado (KANDASAMY, 1987), siendo recomendado por la OILB para dicho fin sobre plagas forestales (ROBREDO, 1988).

Actualmente, en España el fenitrotion y el diflubenzuron son productos autorizados para ser aplicados en pastizales contra langosta (DE LIÑÁN, 2003).

Beauveria bassiana

La utilización de hongos en el control biológico de insectos presenta ventajas importantes frente a otros métodos de control al ser inocuos frente a los animales y las plantas, y específicos, en algunos casos, para los insectos. Su persistencia en el medio ambiente está relacionada con factores ecológicos y climáticos (COREMANS, 1994).

B. bassiana ha demostrado su poder patógeno (Fig. 4) sobre más de 700 especies de artrópodos pertenecientes a distintos ordenes (BALAZY *et al.*, 1987; DESEOKOVACS & ROVESTI, 1992; IGNOFFO, 1988; SAMISH *et REHACEK*, 1999). El gobierno chino, por ejemplo, trata anualmente con un preparado de *Beauveria bassiana* producido en fermentadores distribuidos a lo largo de todo el país, de 0,8 a 1,3 millones de ha. para controlar los problemas de plagas (FENG *et al.*, 1994).



Figura 4: El poder patógeno de *Beauveria bassiana* se puede medir por su capacidad de infectar y desarrollarse sobre orugas de *Galleria mellonella*. En la figura una oruga totalmente cubierta por micelio del hongo.

En España, las especies reconocidas que atacan a los estados postembrionarios de la langosta mediterránea (*Dociostaurus maroccanus*) son: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, (HERNÁNDEZ y SANTIAGO, 1997; JIMÉNEZ MEDINA *et al.*, 1995). Respecto a *B. bassiana*, JIMÉNEZ MEDINA *et al.* (1997) determinaron que $4,5 \times 10^5$ esporas/insecto eran suficientes para matar más del 50% de una muestra de langosta.

En Extremadura, desde el comienzo de la década de los noventa se ha evaluado de forma preliminar la posible utilización de este producto en campo, profundizando en las diferencias que presentan los distintos métodos de aplicación, y comparando aislados de esta especie entre sí y con otros pertenecientes a especies foráneas utilizadas contra langostas (JIMÉNEZ MEDINA *et al.*, 1995).

Los estudios llevados a cabo por PARKER *et al.* (1997) para evaluar el impacto de la utilización de este hongo sobre la fauna indiferente determinan la no aparición de efectos negativos significativos sobre la misma. En ensayos sobre plagas de algodón no se ha observado acción tóxica sobre fauna auxiliar, aves, peces ni humanos (HINZ *et WRIGHT*, 1997)

Combinación de insecticidas con otros procedimientos biológicos para el control de *Dociostaurus maroccanus*

Fenitrotion y diflubenzuron son dos específicos autorizados para combatir la langosta sobre pastizales en España (DE LIÑÁN, 2003), mientras que los formulados de *Beauveria bassiana* registrados actualmente (Botanigard y Naturalis-1), a pesar de los numerosos experimentos que prueban la eficacia de dicho hongo para controlar las plagas de langosta, carecen de autorización para ser aplicados contra la misma.

La depredación de langosta con pollos de pintada en condiciones naturales ha demostrado ser un método eficaz para el control de plagas de este insecto, habiéndose determinado que un ave de diez semanas de edad es capaz de capturar e ingerir 85 gramos de langosta en una hora de depredación, cantidad que colma la capacidad del buche del ave y que suele saciar a las pintadas durante medio día (DEL MORAL *et al.*, 1995, 1998a, 1998b, 1999, 2001).

La combinación de insecticidas junto a la depredación con aves para el diseño de un Programa de Protección Integrada de las plagas de langosta exige la compatibilidad de los insecticidas entre sí y la inocuidad de los mismos para el ave depredadora. Respecto a esta cuestión, hay autores (ALMEIDA y DINIZ, 1998) que afirman haber encontrado una incompatibilidad de *Beauveria bassiana* con deltametrin, ya que éste afecta al desarrollo, y consecuentemente a la eficacia, del hongo; pero no parecen existir trabajos sobre la compatibilidad o incompatibilidad entre fenitrotion, diflubenzuron, *B. bassiana* y pintadas (*N. meleagris*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Determinación en aves de la toxicidad de los insecticidas fenitrotion, diflubenzuron y el hongo *Beauveria bassiana* ingeridos junto al pienso

El experimento está definido por las siguientes características:

- * Se dispone de 5 lotes homogéneos de pintadas adultas —4 para estudiar el efecto de cada insecticida y 1 testigo—, constituidos cada uno por 8 hembras y 8 machos. Todas las aves permanecen en jaulas individuales (Fig. 5), aunque agrupadas las jaulas de cada lote.
- * Cada ave recibe una ración diaria de 100 gr. de pienso para gallinas reproductoras que consume “ad libitum” a lo largo del día.
- * Al pienso de cada uno de los 4 lotes de aves se le añaden, diariamente, los siguientes insecticidas comerciales: fenitrotion del 50%, diflubenzuron del 25% y *Beauveria bassiana* en medio líquido con una concentración de 4×10^6 propágulos/ml —La *B. bassiana* utilizada corresponde a una cepa aislada en la comarca de La Serena y virulenta sobre *D. maroccanus*—. La dosis añadida a cada uno de los insecticidas está calculada suponiendo que cada ave puede ingerir diariamente 150 gr. de langostas muertas por los insecticidas, usando la DL50 correspondiente a cada uno de ellos. Dichos valores están recogidos en el Cuadro 1.

Las aves son observadas diariamente, registrándose las bajas o síntomas que presentan.



Figura 5: La estableción de los reproductores de pintada facilita el control de la fecundación de huevos para el estudio de embriones.

Cuadro 1. Forma de utilización de distintos insecticidas sobre aves o los embriones de sus huevos, al objeto de analizar su toxicidad o teratogenicidad.

Insecticida	Análisis de toxicidad en aves y teratogenicidad en embriones(1), por ingestión por las aves reproductoras de pienso contaminado		Análisis de teratogenicidad por contacto con embriones
	Cantidad de pienso/día/ave	Insecticida/100 gr de pienso	Insecticida/medio de cultivo de embriones
Fenitrotion 50% [EC] P/V	100 gr	240 mgr.(2)	
Fenitrotion 50% [EC] P/V	100 gr	120 mgr (3)	
Diflubenzuron 25% 0.1 WP	100 gr	30 mgr	0,1 mgr/ml
Suspensión de <i>Beauveria bassiana</i>	100 gr	67,5 x 10 ⁶ propágulos	Cultivo invadido por el hongo
Testigo	100 gr	-	-

1. El análisis de teratogenicidad es sólo para diflubenzuron y *Beauveria bassiana*
2. Cantidad necesaria de insecticida para matar a 150 gr. de langosta según la DL50 de cada producto (WORTHING et WALKER, 1987)
3. Mitad de DL50

Determinación en embriones de aves del efecto del insecticida diflubenzuron y el hongo *Beauveria bassiana* ingeridos por los reproductores junto al pienso.

De las aves alimentadas con pienso contaminado por diflubenzuron y *B. bassiana* a la concentración especificada en el Cuadro 1 e inseminadas artificialmente por sus respectivos machos, se obtienen 500 huevos/trata-



Figura 6: La extracción de semen de los machos de pintada permite realizar una inseminación artificial de las hembras y controlar la obtención de embriones.

miento a lo largo de 25 semanas. El semen se extrae a los machos (Fig. 6) una vez a la semana, mediante la técnica de BURROWS y QUINN (1935) y seguidamente se procede a inseminar a las hembras de su mismo lote por medio de una micropipeta graduada.

La recogida de huevos se efectúa diariamente, colocándose en cartones de celulosa con el polo agudo hacia abajo y almacenándose en una cámara frigorífica hasta su análisis. Este análisis consiste en abrir los huevos y anotar en cada caso si existe o no embrión (fecundados/no fecundados) y en caso de la presencia de embrión, anotar si éste está muerto, presenta alteraciones mayores del desarrollo, o bien es normal. Las alteraciones se determinan mediante la extracción del embrión del huevo y su observación detallada se hace en un estereomicroscopio binocular. Por alteraciones mayores se entienden aquellas que afectan a la formación del sistema nervioso, las extremidades y el corazón y que son observables sin una disección adicional del embrión.

Determinación del efecto de la teratogenicidad del diflubenzuron y de la Beau-

vería mediante contacto directo con embriones de aves en cultivo.

Para evaluar la toxicidad como teratógeno del insectida diflubenzuron, se incuban 120 huevos de pintada por un periodo de 12 a 16 horas en una incubadora con 95% de humedad y a temperatura de 38.5° C. Una vez extraído el embrión, éste se coloca sobre un medio de cultivo que consiste básicamente en una mezcla de albumen y agar en proporciones iguales, y que soporta el crecimiento "in vitro" del embrión (NEW, 1955). Este medio es utilizado como control, y 20 de los embriones se dejan crecer por un periodo de 24 h sobre el mismo para confirmar el desarrollo normal hasta que se completa la fase de neurulación (24 horas en cultivo). Con otros 20 embriones, se utilizan distintas concentraciones de diflubenzuron en el medio de cultivo (desde 1mg/ml hasta 0.01 mg/ml), hasta llegar a una concentración de estudio de 0.1mg/ml (Cuadro 1) en la cual se observa el efecto teratogénico. Con esta concentración de estudio se analizan un total de 80 embriones, anotándose en cada caso las alteraciones producidas en el desarrollo. En el caso de la *Beauveria*, es añadido un extracto de la misma al medio de cultivo para alcanzar después del periodo de cultivo una invasión completa del medio por este hongo. El método de cultivo y las observaciones a realizar sobre las modificaciones que se producen en el desarrollo embrionario son las descritas por el grupo de Alvarez (SCHOENWOLF

y ALVAREZ, 1989; RODRÍGUEZ-GALLARDO *et al.*, 1997; LLAMAS-CHICOTE, 2000).

Algunos embriones, tanto controles como tratados con la concentración de estudio de diflubenzuron, son procesados para el análisis de la muerte celular programada o apoptosis mediante la técnica de TUNEL (Terminal UTP Nick End Labeling). Este procedimiento consiste básicamente en fijar los embriones con paraformaldehído 4% toda la noche para después ser incubados durante 2h con nucleótidos unidos a fluoresceína y con la enzima dexosi-nucleotidil transferasa terminal (TdT), que añade estos nucleótidos a los extremos libres producidos por la fragmentación del ADN que se produce durante la apoptosis. Las células que se encuentran en proceso de apoptosis son detectadas posteriormente mediante una reacción inmunocitoquímica por unión de un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa y su posterior revelado con diaminobenzidina (DAB). La técnica de TUNEL seguida para embriones de pollo en cultivo es la descrita por MIGUEL-LASOBRAS (2002).

RESULTADOS

Efecto en las aves de los insecticidas ingeridos por las mismas

Los resultados obtenidos para valorar el efecto sobre las aves de 3 insecticidas ingeridos junto al pienso están recogidos en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Resultado de alimentar a distintos lotes de aves con diferentes insecticidas más un testigo a lo largo de 41 semanas de observación.

Insecticida	Dosis insecticida/ave/día	Nº aves del experimento	Nº aves muertas	Tiempo durante el cual se mueren las aves a partir del comienzo del experimento
Fenitrotion 50% [EC] P/V	240 mgr	16	8	2 días
Fenitrotion 50% [EC] P/V	120 mgr	16	4	21 días
Diflubenzuron 25% WP	30 mgr	16	0	0
<i>Beauveria bassiana</i> en medio líquido	67,5 x 10 ⁶ propágulos	16	0	0
Testigo	-	16	2	41 semanas

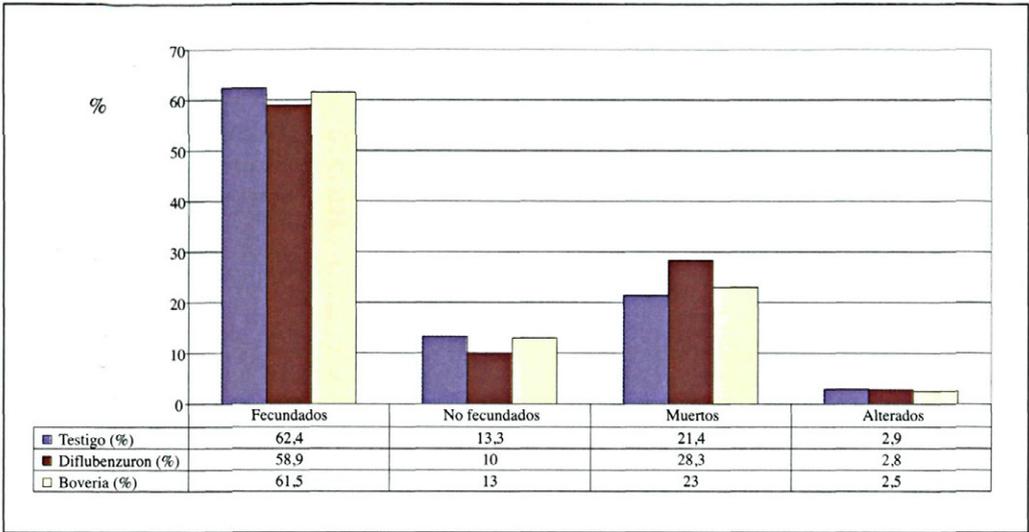


Figura 7: Resultados de los análisis de teratogenicidad de diflubenzuron y *B. bassiana* en embriones de aves cuando éstas son alimentadas con pienso contaminado con los insecticidas.

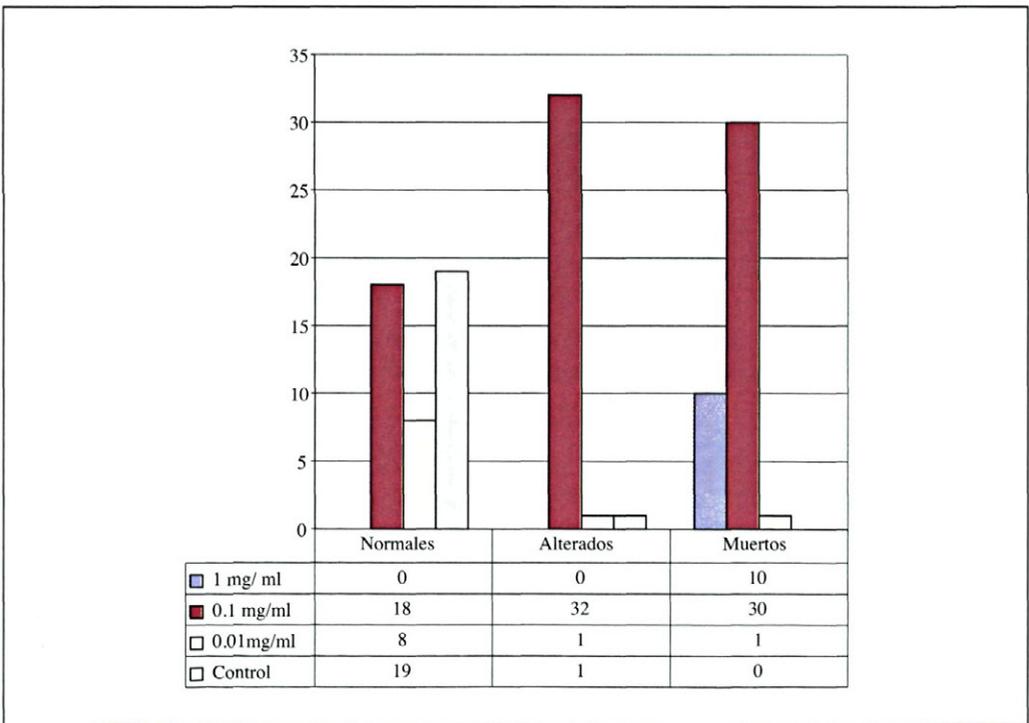


Figura 8: Resultados de los análisis de teratogenicidad de diflubenzuron en embriones de aves cuando los embriones son puestos en contacto con distintas concentraciones del insecticida.

Teratogeneidad de los insecticidas en el desarrollo embrionario de las aves

- Fase 1. Análisis del tratamiento en la alimentación.
Los resultados generales obtenidos en este estudio se muestran en la Figura 7. Cuando los insecticidas son incorporados directamente a la alimentación de las pintadas, la mayoría de los huevos presentan tasas de fecundación similares a las pintadas con alimentación control.
- Fase 2. Análisis de la teratogeneidad de los insecticidas por contacto con embriones

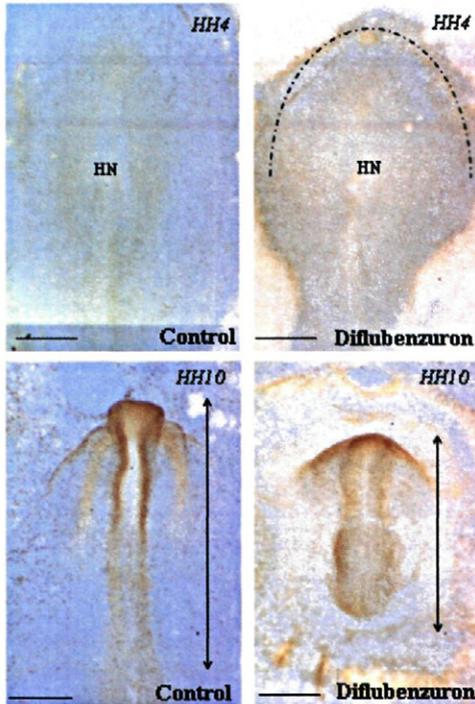


Figura 9: Análisis de la muerte celular tanto en embriones control como en embriones tratados con diflubenzuron. Después de 4 horas en cultivo (HH4) puede observarse cómo la muerte celular programada se ve incrementada en los embriones con diflubenzuron como se indica por la línea marcada con puntos. Después de 24 horas de cultivo (HH10), los embriones tratados además de tener incrementada la muerte celular con respecto al control, presentan una reducción considerable de tamaño (vease las flechas indicativas) y ausencia de formación del tubo neural. Las barras indican 0.5 mm.

Para este estudio se utilizó el compuesto diflubenzuron como representativo de un insecticida de amplio uso y que había denotado una tendencia a la teratogeneidad en la fase 1. El hongo *Beauveria bassiana* se utilizó para poder comparar si el test de embriotoxicidad era útil comprobando dos tratamientos. En el caso del diflubenzuron, y para un tamaño muestral de 80 embriones se obtiene aproximadamente un 40% de embriones que fracasan en el desarrollo, un 40% de embriones con alteraciones severas y un 20% de embriones normales para una concentración de 0.1% (peso/volumen). Los resultados completos de los efectos obtenidos para las distintas concentraciones, así como en los embriones control se muestran en la Figura 8.

El análisis detallado de las alteraciones producidas pone de manifiesto que el efecto más significativo del diflubenzuron se produce sobre el crecimiento inicial del embrión durante la fase de gastrulación, con un retardo significativo del crecimiento y fallo en la formación del tubo neural. El análisis de la muerte celular programada o apoptosis mediante la técnica de TUNEL pone de manifiesto que ésta se incrementa de manera considerable respecto a los embriones control, y por lo tanto el diflubenzuron produce una degeneración de las células embrionarias. Ejemplos de los resultados obtenidos con diflubenzuron se presentan en la Figura 9.

La cepa de *Beauveria bassiana* utilizada no produce modificaciones significativas del desarrollo embrionario con respecto a los embriones control a pesar de la invasión total por parte del hongo del medio de cultivo.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos respecto a la toxicidad de fenitrotion sobre las pintadas, cuando éstas son alimentadas con un pienso contaminado por el insecticida, confirman su peligrosidad para aquellas, incluso a una DL50 mucho más baja que la señalada por JUNSHI, (1969). Estos resultados parecen ser útiles para el diseño de un Programa de Pro-

tección Integrada contra la langosta en el cual se quiera incluir el fenitrotion y las pintadas, ya que si un ave comiese en un día 150 gr. de langostas muertas por el insecticida –cantidad habitual de langostas depredadas por las aves– tendría muchas probabilidades de morir también.

El diflubenzuron añadido a la alimentación de las aves provoca alteraciones en embriones procedentes de éstas, aunque dichos resultados no parecen diferir significativamente con respecto a los embriones controles. No obstante, cuando se analiza el comportamiento por contacto del insecticida con los embriones, el resultado evidencia una teratogeneidad del mismo con efecto directo sobre el desarrollo embrionario a

concentraciones equiparables a las usadas en los tratamientos de campo.

La suspensión de *Beauveria bassiana*, a la concentración ensayada, no produce toxicidad sobre las aves ni teratogenicidad alguna.

Con los resultados obtenidos no parece que sea aconsejable el uso simultáneo de fenitrotion y diflubenzuron junto a las pintadas depredadoras en un Programa de Protección Integrada.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos presentados en este artículo se han financiado con fondos del proyecto IFD97-1509 del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABSTRACT

DEL MORAL J., E. M. MIGUEL-LASOBRAS, I.S. ÁLVAREZ, A. MURIEL, FCO. PÉREZ-ROJAS, M. SENERO. 2004. Toxicity in birds (*Numida meleagris* L.) of insecticides used for the control of the locust (*Doclostaurus maroccanus* Thunb.) plague. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 635-648.

In Extremadura, several chemical (DDT, HCH, fenitrotion, malation y diflubenzuron) and biological (the fungus deuteromiceto *Beauveria bassiana* Vuill., and the predator bird *Numida meleagris* L., known as "Pintada") procedures have been used to avoid the incidence of the plagues produced by the locust (*Doclostaurus maroccanus* Thunb.). Our experiments with fenitrotion, diflubenzuron and *B. bassiana* about their toxicity and teratogenicity on the "Pintadas" allow us to conclude that, within a program of integral protection against the locust's plagues, it is not desirable the use of fenitron and diflubenzuron together with predator birds. By the contrary, there is not incompatibility in the use of birds and the application of *B. bassiana*.

Key words: Fenitrotion, diflubenzuron, *Beauveria bassiana*, integral protection, teratogenicity.

REFERENCIAS

- ALFARO, A. 1969 Plaguicidas agrícolas. Ed. M° de Agricultura. INIA, 560 pp
- ALMEIDA, RP., M.SB. DINIZ. 1998. Efeito toxico de inseticidas on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Pesquisa em Andamento Embrapa Algodao n° 94, 3 pp
- ÁLVAREZ, I.S., M. ARAUJO, A. NIETO. 1998. Neural induction in Whole chick embryo cultures by FGF. *Developmental Biology*, 199:42-54.
- ÁLVAREZ-GÓMEZ, C., F. GARCÍA CONCELLÓN, A. PRIETO, D. MARTÍNEZ DE VELASCO, R. SANTOS. 1989. Ensayo comparativo de eficacia en el control de langosta (*Doclostaurus maroccanus* Thunb.) entre malation ULV y el diflubenzuron en aplicaciones aéreas. Memoria del Servicio de Protección de los Vegetales: 285-293.
- ARIAS, A., C. ALVEZ, F. GARCIA CONCELLÓN, D. MARTINEZ DE VELASCO, J. OLIVERA, A. PRIETO, R. SANTOS. 1993. La lucha contra la langosta marroquí (*Doclostaurus maroccanus* Thnb) en Extremadura durante el decenio 1983-1992. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19:425-453
- BALAZY, S., J. WISNIEWSKI, S. KACZMAREK. 1987. Some noteworthy fungi occurring on mites. *Bulletin of the*

- Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 35:7-9, 199-224
- BARBERA, C. 1976. Pesticidas agrícolas. Ed. Omega, 569 pp
- BELLÉS, X. 1988. Insecticidas biorracionales. CSIC, 405 pp
- BERLINSKA, J., K. SITAREK. 1997. Disturbances of prenatal development of rats exposed to fenitrothion. *Roczniki-Panstwowego-Zakladu-Higieny* 48:3, 217-228
- BOVEY, R. 1984. La defensa de las plantas cultivadas. Ed. Omega. 897 pp
- BROOKS, G.T. 1979. Chlorinated insecticides Ed. CRC Press, Inc. vol I, 249 pp
- BURROWS, QUINN, 1935 (En: Saveur, B; M. Reviere. 1983. Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA. Paris)
- CARTWRIGHT, M.M., S.M. Smith. 1995a. Increased cell death and reduced neural crest numbers in ethanol-exposed embryos: Partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19: 378-389.
- CARTWRIGHT, M.M., S.M. SMITH. 1995b. Stage-dependent effect of ethanol on cranial neural crest cell development: Partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19: 1454-1462.
- COREMANS_PELSENEER, J. 1994. Laboratory test on the entomopathogenic fungus *Beauveria*. *Bulletin OILB srop*, vol. 17(10): 147-155.
- DE LIÑÁN Y VICENTE, C. 1981. Farmacología vegetal. Ed. ETSIA. Madrid, 530 pp
- DE LIÑÁN, C. 2003. Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ed Agrotécnicas, 672 pp
- DEL MORAL, J. 1986. Discusión sobre la situación actual de la plaga de langosta (*Locusta migratoria* Thunb) en Badajoz y resultados de un ensayo de insecticidas para su control. *Bol. San. Veg. Plagas*, 12: 221-235
- DEL MORAL, J., A. MEJÍAS, F. LOPEZ-GALLEGO, M. CANCHO, A. BOSCH, A. MURIEL, J.SOLANA, J. JIMÉNEZ. 1995. Estudios previos para valorar la depredación de langosta (*Locusta migratoria* Thunb.) por aves en Badajoz. V. Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada. Sevilla.
- DEL MORAL, J., A. MEJÍAS, M. CANCHO, A. BOSCH, A. MURIEL, J. JIMÉNEZ, J. SOLANA, F. LÓPEZ. 1997. Las plagas de langosta (*Locusta migratoria* Thunb.) en Extremadura. Primeros resultados de su control mediante pollos de gallina. *Phytoma -España*, 86: 45-50.
- DEL MORAL, J., A. MEJÍAS, J. JIMÉNEZ, M. CANCHO, N. GARCÍA, D. CORRALES. 1998 a. La gallina Azul Extremeña y la guinea. Primeros resultados de unos experimentos realizados con estas dos aves para comprobar su poder depredador de langosta en el sudoeste español. *Agricultura LXVII*, 796: 920-922.
- DEL MORAL, J., A. MEJÍAS, J. JIMÉNEZ, M. CANCHO, N. GARCÍA. 1998 b. De la plaga de la langosta a la gallina Azul Extremeña y la Pintada. *Selecciones Avícolas*, XL, 5: 263-272.
- DEL MORAL, J., A. MEJÍAS, J. JIMÉNEZ. 1999. Eficacia de la pintada (*Numida meleagris* L.) como ave depredadora de langosta (*Locusta migratoria* Thunb.) Congreso Nacional de Entomología Aplicada. VII Jornadas Científicas. Almería
- DEL MORAL, J, P. DEL ESTAL, J. JIMÉNEZ, F. PÉREZ ROJAS, M. MERINO, M. SENERO, L. CAMPOS. 2001. Observación de la depredación de langosta (*Locusta migratoria* Thunb.) por aves pintadas (*Numida meleagris* L.) a lo largo de los años 2000 y 2001 en la comarca de La Serena (Extremadura) II Congreso Nacional de Entomología Aplicada. VIII Jornadas Científicas. Pamplona
- DESEO-KOVACS, K.V. & ROVESTI, L. 1992. Lotta microbiologica contro i fitofagi. Edagricole. Italia. 296 pp.
- Domingo, P. 1988. Actualidad y perspectivas de desarrollo comercial de los insecticidas biorracionales (En: Insecticidas biorracionales. X. Bellés Ed. CSIC) : 379-405
- FENG, M.G., T.J., POPRAWSKI, G.G. KHACHATOURIANS. 1994. Production, formulation and application of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4 (1994): 3-34.
- FERNÁNDEZ DE CORDOBA, J., P. Cabezuelo. 1993. Efecto de varios plaguicidas utilizados en la encina sobre la fauna avícola terrestre. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19:4, 687-705
- FOURNIER E, J. BONDERF. 1983. Les produits antiparasitaires à usage agricole Ed. Technique & Documentation Lavoisier, 334 pp
- GARCÍA-CONCELLÓN, F., C. ÁLVEZ-GÓMEZ. 1987. Sensibilidad de la langosta marroquí (*Locusta migratoria* Thunb) al diflubenzuron en aplicaciones aéreas. Memoria del Servicio de Protección de los Vegetales. Junta de Extremadura: 68-80.
- GARCÍA-CONCELLÓN, F., C. ÁLVEZ-GÓMEZ, J. OLIVERA, A. PRIETO. 1988. Valoración de la eficacia del diflubenzuron en aplicaciones aéreas contra langosta marroquí (*Locusta migratoria* Thunb) . Memoria del Servicio de Protección de los Vegetales. Junta de Extremadura: 45-50.
- GARCÍA-CONCELLÓN, F., C. ÁLVEZ-GÓMEZ, A. PRIETO, J. OLIVERA. 1991. Valoración de la eficacia de la cipermetrina en aplicaciones en espolvoreo en el control de langosta (*Locusta migratoria* Thunb.). Memoria del Servicio de Protección de los Vegetales. Junta de Extremadura: 163-169.
- GARCÍA-CONCELLÓN, F., C. ÁLVEZ-GÓMEZ, A. PRIETO, J. OLIVERA, J. D. DEL POZO, J. R. TOVAR 1993. Control de "La Langosta" (*Locusta migratoria* Thunb.) en la provincia de Badajoz mediante tratamientos terrestres en espolvoreo y aéreos en pulverizaciones ULV. Memoria del Servicio de Protección de los Vegetales. Junta de Extremadura: 73-94
- GARCÍA-CONCELLÓN, F., C. ÁLVEZ-GÓMEZ, J. OLIVERA, A. PRIETO, J. D. DEL POZO, 1993. Valoración de la eficacia del diflubenzuron oleoso en una campaña convencional para el control de langosta (*Locusta migratoria* Thunb.) Memoria del Servicio de Protección de los Vegetales. Junta de Extremadura.
- GARRIDO, A., 1994. Agricultura y naturaleza. *Phytoma España*, 60: 25-31
- GREATHEAD, D.J., 1992. Natural enemies of typical locust and grasshoppers: their impact and potential as biological control agents. (En: Biological control of Locust and grasshoppers. Ed. Lower and Prior: 105-121).

- GROSSCOURT, 1987. Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and evaluation of its practical possibilities. *Pestic. Sci.* **9**: 373-386
- HASSAN, S.M., O.O. DIPELOU, A.O. AMOO, T.R. ODMIAMBO. 1991. Preparation on livestock ticks by chickens. *Veterinary parasitology*, **38**: 199-204
- HASSAN, S.M., O.O. DIPELOU, D.M. MUNYINYI. 1992. Influence of exposure period and management methods on the effectiveness of chickens as predators of ticks infesting cattle. *Veterinary parasitology*, **43**: 301-309
- HEREDIA, V. 1782. Sobre remedios para libro de las langostas. (En: Memoria del Consejo Provincial de Fomento de Zaragoza. 1914-1924: 10)
- HERNÁNDEZ, P. 1993. La langosta mediterránea (*Doclostaurus maroccanus* Thunberg), sus enemigos naturales autóctonos y el posible control de sus plagas por medio de microorganismos patógenos. Tesis dirigida por el Catedrático Dr. Cándido Santiago Alvarez. ETSIA Córdoba. (sin publicar)
- HERNÁNDEZ, P., C. SANTIAGO. 1997. Entomopathogenic fungi associated with natural populations of the maroccan locust *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg) (Orthoptera: Gomphocerinae) and other Acridoidea in Spain. *Biocontrol Science and Technology*, **7**: 357-363
- IGNOFFO, C.M. (Ed.) 1988. CRC Handbook of Natural Pesticides. Volume V Microbial Insecticides part A Entomogenous Protozoa and Fungi. CRC Press. Florida. 243 pp.
- HINZ, SE., JE. WRIGHT. 1997. Naturalis-L: a biological product (*Beauveria bassiana* JW-1) for the control of cotton pests. Proceedings Beltwide Cotton Conferences, New Orleans. 2: 1300-1302
- INSERRA, S. 1987. La deltametrina e i suoi effetti nella difesa del perete dagli attacchi di *Psylla pyri* L. in provincia di Catania. *Tecnica Agrícola*, **39**: 1, 21-34
- JELNIK, R. 1982. Use of chick embryo in screening for embryotoxicity. *Teratology Carcinogenesis and Mutagenesis*, **2**: 2255-2261.
- JIMÉNEZ MEDINA, J., P. HERNANDEZ CRESPO, C. SANTIAGO ALVAREZ. 1995. Aplicación en campo del hongo *Beauveria bassiana* para el control de las poblaciones de *Doclostaurus maroccanus*. V Jornadas científicas de la sociedad española de entomología aplicada.
- JIMÉNEZ MEDINA, J., H. K. ALDEBIS, C. SANTIAGO ALVAREZ. 1997. Valoración insecticida de diversos aislados de hongos hifomicetos para el control de la langosta mediterránea *Doclostaurus maroccanus* (Thunberg). VI Jornadas científicas de la sociedad española de entomología aplicada.
- JUNSHI MIYAMOTO, 1969. Mechanism of low toxicity of sumithion toward mammals. *Residue reviews*, vol **25**: 251-264
- KANDASAMY, C. 1987. Dimilin an insecticide interfering with chitin deposition. *Pesticides*, **21**: 4, 9-10
- LACHININSKII, AV. 2000. New preparations for control of harmful locusts. *Zashchita i Karantin Rastenii*, **4**: 9-11
- LÓPEZ CORDERO, J. A., A. Aponte. 1993. Un terror sobre Jaén. Las plagas de Langosta XVI-XX. Ed. Ayuntamiento de Jaén.
- LLAMAS-CHICOTE, M. 2000. Modificaciones inducidas por la administración de tóxicos durante el desarrollo inicial de embriones cultivados "in vitro". Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- MARTÍN, H. 1968. Pesticide Manual. Ed. Brithis Crop Protection Council.
- MARTINAT, P.J., V. CHRISTMAN, R.J. COOPER, K.M. DODGE, R.C. WHITMORE, G. BOOTH, G. SEIDEL. 1987. Environmental fate of Dimilin 25-W in a central Appalachian forest. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**: 1, 142-149.
- MEJÍAS, A., J. DEL MORAL, J. JIMÉNEZ. 1999. Discusión sobre la viabilidad práctica y económica del empleo de pintadas (*Numida meleagris* L.) para controlar las plagas de langosta. Congreso Nacional de Entomología Aplicada. VII Jornadas Científicas. Almería
- MIAO, J.C., ZH. WANG, C.C. GAO, C.Z. GAO, Z.X. ZHANG. 1988. Study on the security of suspenoid Dimilin to poultry. *Journal of North East Forestry University, China*, **16**:4, 21-25
- MIGUEL-LASOBRAS, E.M. 2002. Muerte celular y proliferación durante las etapas iniciales del desarrollo del embrión de pollo y su control por moléculas señalizadoras. Trabajo de grado. Universidad de Extremadura.
- MONTADA DORTA, D., R. TANG CHIONG, A. NAVARRO ORTEGA, M. FRESNEDA VIDAL. 1988. *Revista cubana de medicina tropical*, **40**:1, 38-45
- NEW, D.A.T. 1955. A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *Journal of Embryology en Experimental Morphology*, **3**: 326-331.
- NEW, D.A.T. 1990. Whole embryo culture, teratogenesis, and the estimation of teratologic risk. *Teratology*, **42**: 635-642.
- NISHIGORI, H., M. MIZUMURA, M. IWATISURU. 1992. The hen's fertile egg screening test (hest): a comparison between the acute toxicity for chick embryos and rodent of 20 drugs. *Cell Biology and Toxicology*, **8**: 255-265.
- PARKER, B.L.; M. SKINNER, V. GOULI, & M. BROWNBRIDGE. 1997. Impact of soil applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea* sp. on non target forest arthropods. *Biological Control*, **8**(3):203-206.
- PRIOR, C., D. J. GREATHEAD. 1989. Biological control of locust: the potential for exploitation of pathogens. *FAO Plant Protection Bulletin*, **37**: 37-48.
- RAO, PA., KN. MEHROTRA. 1986. Toxicity of diflubenzuron to *Schistocerca gregaria* Forskal. *Indian Journal of Entomology*, **48**: 4, 474-477
- ROBREDO, F. 1988. Estudios sobre los tratamientos forestales con diflubenzuron y su incidencia sobre la fauna. Ed. ICONA, 149 pp
- RODRÍGUEZ-GALLARDO, L.; V. CLIMENT, V. GARCÍA-MARTÍNEZ, G. C. SCHOENWOLF, I. S. ALVAREZ. 1997. Targeted over-expression of FGF in chick embryos induces formation of ectopic neural cells. *International Journal of developmental Biology*, **41**: 715-723.
- ROELOFS, PFMN., JJW. NIJSKENS, PC. VESSEUR, JG. PLAGGE. 1998. Vliegenbestrijding in varkensstallen. Proefverslag -Varkensproefbedrijf- "Zuid en West Nederland" n° P1.208, 64 pp
- RUB, A., SNH. NAQVI, S. SHAFI. 1989. Toxicity of dimilin against *Musca domestica* (P.C.S.I.R. strain) lar-

- vae. *Proceeding of the entomological Society of Karaki*, n.º: **14/15**: 143-148
- SALEEM, MA., AR. SHAKOORI, G. FALKOUS, RM. WILKINS, D. MANTLE. 1995. In vitro inhibition of proteolytic enzymes of human liver, kidney, brain and muscle tissues due to insecticides. *Pakistan Journal of Zoology*, **27**: 2, 95-103
- SAMISH, M, J. REHACEK. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potencial in biological control. *Annual Review of Entomology* **44**: 159-182
- SÁNCHEZ GARCÍA, FCO., J, JIMÉNEZ VIÑUELAS y A. ARIAS GIRALDA, 1993. Ensayos de eficacia de insecticidas organosfosforados, piretroides e inhibidores de la síntesis de quitina sobre estados larvarios de *Dociosaurus maroccanus* Thunb. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19**: 259-271.
- SCHOENWOLF G.C., I. S. ALVAREZ. 1989. Roles of neuroepithelial cell rearrangement and division in shaping of the avian neural plate. *Development*, **106**: 427-439.
- SORIA, S., C. HERRANZ, F. SÁNCHEZ-HERRERA, E. OBAMA. 1988. Ensayo de eficacia con productos antiquitinizantes, biológicos y piretroides contra *Lymantria monacha* L.) (Lep. Lymantriidae), peligroso defoliador del *Pinus silvestris* L. *Bol. San. Veg. Plagas*, **14**: 1, 149-155
- STRIBLING, HL., HR. SMITH. 1987. Effects of Dimilin on diversity and abundance of forest birds. *Northern Journal of Applied Forestry* **4**:1, 37-38
- USHA, K., C. KANDASAMY. 1986. Comparative toxicity of certain pesticides to the honeybee *Apis indica* F. *Pest management*, **1**: 32-35
- VAZQUEZ, R., C. SANTIAGO. 1993. Las plagas de langosta en Córdoba. Ed. Caja Sur.
- WHITMORE, RC., R.J. COOPER, B.E. SAMPLE. 1993. Bird fat reductions in forest treated with Dimilin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**: 11, 2059-2064
- WORTHING, CH.R., S.B. WALKER. 1987. The Pesticide Manual. Ed. The British Crop Protection Council, 1081 pp

(Recepción: 6 febrero 2004)

(Aceptación: 7 mayo 2004)