

SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) PROVENIENTE DE TRES HUERTOS DE MANZANO DE LA REGIÓN DEL MAULE, CHILE

Insecticide susceptibility and enzymatic activity of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) from three apple orchards of Maule Region, Chile

Maritza Reyes^{1*}, Jean Charles Bouvier², Thomas Boivin²,
Eduardo Fuentes-Contreras¹, y Benoît Sauphanor²

ABSTRACT

Cydia pomonella L., the major pest of pome fruits and walnuts in Chile, has been controlled almost exclusively with applications of organophosphates insecticides. However, during the last few seasons, increasing levels of fruit damage at harvest have been observed. Given that this insect has evolved insecticide resistance in several countries, the susceptibility to diagnostic dosages of azinphosmethyl and tebufenozide were evaluated on diapausing larvae in populations from three apple orchards in Maule Region and one susceptible laboratory strain (S); as well as the activity of detoxifying enzymes on adults emerging from the mentioned. Both mixed function oxidases (OFM) and glutathione-S-transferases (GST) activities were evaluated by fluorometry, while esterase activity (EST) was determined by absorption. Larval mortality for azinphosmethyl was significantly lower in the populations from Molina and Teno (30 and 85.4%, respectively) than in the susceptible laboratory strain (95.3%). For tebufenozide larval mortality was significantly lower in the Molina strain (35.1%) than the S strain (88.6%). GST activity was statistically higher in two of the three analyzed orchards (13,679 fluorescence insect⁻¹ units in Teno, and 13,096 fluorescence insect⁻¹ units in Molina). Similarly, OFM activity was significantly higher in the same orchards, with values of 25.08 and 17.95 picograms (pg) of 7OH insect⁻¹ min⁻¹ in Molina and Teno, respectively. The S strain had significantly higher EST activity in relation to the other populations, which seems to be unrelated with lower susceptibility to the insecticides evaluated.

Key words: Codling moth, azinphosmethyl, tebufenozide, detoxifying enzymes, mixed function oxidases, glutathione-S-transferases.

RESUMEN

Cydia pomonella L., la principal plaga de pomáceas y nogales en Chile, ha sido controlada casi exclusivamente con aplicaciones de insecticidas órganofosforados. Sin embargo, durante las últimas temporadas se han observado crecientes niveles de frutos dañados a cosecha. Dado que esta plaga ha desarrollado resistencia a insecticidas en varios países, se evaluó la susceptibilidad a dosis diagnóstico de azinfos metil y tebufenozide de larvas diapausantes provenientes de tres huertos de manzano de la Región del Maule y una cepa susceptible de referencia (S); además de la actividad de enzimas detoxificadoras en adultos emergidos de las mismas. Tanto la actividad de oxidasas de función múltiple (OFM) como de glutathione-S-transferasas (GST) se evaluó a través de fluorimetría, mientras la de esterases (EST) se determinó por absorbancia. La mortalidad larvaria frente a azinfos metil fue significativamente menor para Molina y Teno (30 y 85,4%, respectivamente) que para la cepa S (95,3%). Para tebufenozide la mortalidad larvaria fue significativamente menor en Molina (35,31%) que en la cepa S (88,6%). La actividad de GST fue significativamente mayor en dos de los tres huertos analizados (Teno = 13.679 unidades de fluorescencia insecto⁻¹ y Molina = 13.096 unidades de fluorescencia insecto⁻¹). Similarmente, la actividad de OFM fue significativamente mayor en los mismos huertos, con valores 25,08 y 17,95 picogramos (pg) de 7OH insecto⁻¹ min⁻¹ para Molina y Teno, respectivamente. La cepa S presentó una actividad de EST significativamente mayor que la de las otras poblaciones, la cual parece no estar relacionada con la menor susceptibilidad a los insecticidas evaluados.

Palabras clave: polilla de la manzana, azinfos metil, tebufenozide, enzimas detoxificadoras, oxidasas de función múltiple, glutathione-S-transferasas.

¹ Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile. E-mail: mreyes@utalca.cl

² Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Ecologie des Invertébrés, Site Agroparc 84914, Avignon, France.

* Autor para correspondencia.

Recibido: 4 de febrero de 2003. Aceptado: 1 de julio de 2003.

INTRODUCCIÓN

La polilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.) es la principal plaga de pomáceas y nogales en Chile (González, 1989), y se controla tradicionalmente con insecticidas órganofosforados. No obstante, durante las últimas temporadas, se han observado a la cosecha niveles preocupantes de frutos dañados en algunas localidades (González, 2001). Estas reducciones aparentes de eficacia en el control en el campo, podrían deberse parcialmente a la presencia incipiente de resistencia a insecticidas, la cual ha sido ampliamente descrita en otros lugares del mundo (Riedl *et al.*, 1985; Bush *et al.*, 1993; Varela *et al.*, 1993; Knight *et al.*, 1994; Sauphanor *et al.*, 1994).

En Europa y EE.UU. las poblaciones de *Cydia pomonella* L. han desarrollado resistencia a insecticidas de diversos grupos químicos, destacándose órganofosforados, piretroides, inhibidores de síntesis de quitina y reguladores de crecimiento (Moffit *et al.*, 1988; Welter *et al.*, 1991; Bush *et al.*, 1993; Knight *et al.*, 1994; Chapman y Barrett, 1997; Sauphanor *et al.*, 1998). Aún más, la presencia de resistencia múltiple y cruzada en algunas poblaciones, ha complicado la solución del problema basada en estrategias de alternancia de grupos químicos e incorporación de nuevos ingredientes activos con diferente modo de acción (Bouvier *et al.*, 1995; Sauphanor *et al.*, 1998).

La resistencia a insecticidas en *C. pomonella* es principalmente de tipo metabólico, pues se basa en la acción de enzimas detoxificadoras que degradan los insecticidas antes que éstos ejerzan su efecto tóxico sobre la plaga (Sauphanor *et al.*, 1997, 1998; Bouvier *et al.*, 2002). En poblaciones francesas resistentes a deltametrina se ha demostrado la participación de una mayor actividad de oxidasas de función múltiple y la presencia de una mutación kdr del canal de sodio, que es el sitio de acción de los piretroides (Sauphanor *et al.*, 1997, Bouvier *et al.*, 2001). La resistencia cruzada de tebufenozide con grupos de insecticidas tales como benzoilureas, apuntaría a un incremento en la metabolización enzimática más que a modificaciones en los sitios de acción (Sauphanor y Bouvier, 1995). De acuerdo a Bush *et al.* (1993),

la resistencia a paration involucraría la participación de una esterasa modificada con actividad reducida hacia sustratos no insecticidas y alta especificidad hacia órganofosforados.

Debido a que en Chile no existen antecedentes publicados sobre resistencia a insecticidas en la polilla de la manzana, en este trabajo se evaluó la susceptibilidad de algunas poblaciones de *C. pomonella* a los insecticidas azinfos metil (órganofosforado) y tebufenozide (benzidrazina), productos ampliamente utilizados en manejo de plagas de manzano en Chile. Se evaluaron, además, algunos posibles mecanismos involucrados en la resistencia, como la actividad de enzimas detoxificadoras, glutatión-S-transferasas (GST), esterases (EST) y oxidasas de función múltiple (OFM). Más que intentar estimar la prevalencia de la resistencia de la polilla de la manzana a insecticidas en la Región del Maule, el presente trabajo evaluó la presencia de algún nivel detectable de resistencia que justifique estudios posteriores más detallados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Huertos. En el estudio se utilizaron huertos de manzanos (*Malus sylvestris* var. *domestica*) ubicados en las localidades de Teno (34°53' lat. Sur), Molina (35°8' lat. Sur) y Panguilemo (35°29' lat. Sur). Estos tres huertos se seleccionaron debido a que, pese a recibir aplicaciones de insecticidas, presentaban antecedentes de daño por polilla de la manzana en frutos a cosecha de aproximadamente 3-5% en la temporada anterior. El huerto de Molina tiene manzanos variedad Royal Gala, con programas de manejo que incluían aplicaciones por calendario de órganofosforados y tebufenozide. El huerto de Teno tiene manzanos variedad Granny Smith, con aplicaciones de órganofosforados por calendario. Finalmente, el huerto de Panguilemo tiene manzanos variedad Red Chief destinados a producción de jugo, con una o dos aplicaciones de órganofosforados por temporada.

Insectos. Durante diciembre 2001 y enero de 2002 se instalaron trampas de cartón corrugado en los huertos estudiados, de las cuales se recolectaron posteriormente (marzo-abril 2002) larvas

en diapausa de *C. pomonella* (Sauphanor *et al.*, 1999; 2000; Boivin *et al.*, 2001). Las larvas se sacaron de las trampas y se reubicaron en bandas de cartón corrugado en potes plásticos, para cumplir dos meses a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperíodo L12:O12 (Sauphanor *et al.*, 2000; Boivin *et al.*, 2001). Una vez cumplido el período de frío y para inducir el término de la diapausa, las larvas se transfirieron a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperíodo largo (L16:O8). Un día después las larvas se separaron por sexo y se sometieron al bioensayo con insecticidas (Boivin *et al.*, 2001). Como cepa susceptible de referencia (S) se usaron larvas mantenidas por más de 20 años bajo crianza masiva en laboratorio.

Bioensayos. Para cada uno de los bioensayos se prepararon soluciones en acetona de los productos técnicos azinfos metil (93% de ingrediente activo, Bayer AG) y tebufenozide (97% de ingrediente activo, Rohm and Hass). Se estudió el efecto de dosis diagnóstico de 400 mg kg^{-1} azinfos metil y de 300 mg kg^{-1} de tebufenozide, correspondientes a la concentración letal para el 99% (LC_{99}) de la cepa susceptible de laboratorio, utilizando 40 larvas por localidad para la evaluación de cada insecticida. Se hizo una aplicación tópica de $1 \mu\text{L}$ de las soluciones insecticidas con una micropipeta repetitiva ajustable (Gilson T2, Middleton, Wisconsin, EE.UU.) en la región dorsal media de las larvas. Además, sobre un grupo de igual número de larvas de cada localidad (40 larvas), se aplicó un volumen de $1 \mu\text{L}$ de solvente puro, como tratamiento control para estimar el posible efecto tóxico de éste. Inmediatamente después del tratamiento, las larvas se transfirieron a placas Petri de 90 mm de diámetro, en cuyo interior se depositaron trozos de cartón corrugado (20 x 20 mm). Las larvas se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $40 \pm 10\%$ de HR y fotoperíodo largo (L16:O8). Las placas se observaron a diario hasta la emergencia de la última polilla, la mortalidad se anotó en términos de adultos no emergidos (Sauphanor *et al.*, 2000).

Determinación de actividad enzimática. La actividad de GST, OFM y EST se evaluó en adultos emergidos de cada huerto (Bush *et al.*, 1993). Las mediciones de actividad de GST y OFM se efectuaron mediante fluorimetría, y la de EST por

cambios de absorbancia. En ambos casos, se utilizó un lector de microplacas (Perkin Elmer, HTS 7000, Wellesley, Massachusetts, EE.UU.).

Preparación de extractos enzimáticos. Para los análisis de actividad de GST y EST, se disectaron los abdómenes de las polillas y se homogeneizaron individualmente en $150 \mu\text{L}$ de buffer Hepes 50 mM (pH 7,0) (Nauen y Stumpf, 2002). Luego, se centrifugaron por 15 min a 4°C y 15.000 g , usando el sobrenadante como fuente de enzima (Bouvier *et al.*, 2002).

Glutation-S-transferasas. La actividad de GST se determinó usando monoclorobimano (MCB) como sustrato en microplacas negras de 96 celdas, de acuerdo a Nauen y Stumpf (2002), con modificaciones en los volúmenes de extracto utilizado. En cada celda se incluyeron $30 \mu\text{L}$ de extracto enzimático (equivalente a 0,2 abdomen), $168 \mu\text{L}$ de glutatión reducido 100 mM (GSH) en buffer Hepes 50 mM y $2 \mu\text{L}$ de MCB 30 mM. Para los controles se utilizó buffer en lugar de extracto enzimático. La placa se incubó a 22°C por 20 min, luego de los cuales se midió la fluorescencia a 380 nm de excitación y 465 nm de emisión. Como el complejo GSH-bimano no está disponible comercialmente, los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia insecto⁻¹ (Nauen y Stumpf, 2002).

Esterasas. La actividad de esterasas totales se midió en microplacas, usando β -naftil acetato como sustrato (Bush *et al.*, 1993; Bouvier *et al.*, 2002). A cada celdilla con buffer fosfato 50 mM (pH 6,5) más 0,1 mM β -naftil acetato (Bouvier *et al.*, 2002), se agregaron $0,5 \mu\text{L}$ de extracto enzimático más $89,5 \mu\text{L}$ de buffer Hepes 50 mM (pH 7,0). Esta reacción se incubó a 30°C por 15 min, luego de los cuales se detuvo agregando $20 \mu\text{L}$ de una solución reactiva compuesta por 3 g L^{-1} de 1-naftillamina (Fast Garnet) y 35 g L^{-1} de sodio dodecil sulfato. Doce celdas con buffer de extracción en lugar de enzima se usaron como control. La absorbancia del complejo Naftol-Fast Garnet, se midió después de 15 min a 490 nm (Bouvier *et al.*, 1998, 2002). La concentración de proteína en las suspensiones se estimó a través del método de Bradford (1976).

Oxidasa de función múltiple. La actividad de OFM en tejido intacto, se determinó a través de la actividad de 7-etoxicumarina-O-desetilación (ECOD) (De Sousa *et al.*, 1995). Para ello, los abdómenes disectados de los insectos se dispusieron individualmente en celdas de microplacas negras, con 100 µL de buffer fosfato 50 mM (pH 7,2) y etoxicumarina 0,4 mM. En el caso de los controles, se agregó el mismo volumen de buffer glicerina/etanol (v/v) (10^{-4} M), para evitar la reacción. Después de 4 h de incubación a 30°C, se detuvo la reacción agregando 100 µL de buffer. En los controles se agregó el mismo volumen de buffer glicerina/etanol (v/v) (10^{-4} M), para evitar la reacción. Finalmente, se midió la fluorescencia de las muestras a 380 nm de excitación y 465 nm de emisión (Bouvier *et al.*, 1998).

Análisis de resultados. Los promedios de mortalidad total y por sexo de las larvas de cada huerto, se compararon entre sí y con la cepa de referencia a través de la prueba de G (Sokal y Rohlf, 1995). Los resultados se presentan corregidos por la mortalidad asociada a la aplicación del solvente con la fórmula de Abbott (1925). Las actividades de GST y EST se sometieron a un ANDEVA, y para detectar diferencias entre las poblaciones se realizó la prueba de separación de medias de Fisher (FPLSD) con significación del 5%. Debi-

do a que la actividad de OFM no cumplió todos los supuestos del ANDEVA, se efectuó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con significación del 5% (Sokal y Rohlf, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Eficiencia de los insecticidas. La mortalidad de las larvas de las localidades de Molina (30%) y Teno (85,4%) frente a la dosis diagnóstico de azinfos metil fue significativamente menor a la de la cepa control (95,6%), mientras para tebufenozide sólo la mortalidad de las larvas de Molina resultó estadísticamente diferente (35,1%). Las larvas de Panguilemo no presentaron diferencias significativas de mortalidad con la cepa S para azinfos metil ni tebufenozide (Cuadro 1). La menor susceptibilidad de las larvas de Molina puede deberse a que los programas de manejo de este huerto, incluyeron varias aplicaciones de tebufenozide y organofosforados durante las tres temporadas anteriores. En el huerto de Teno sólo se aplicaron organofosforados, lo que concuerda con su menor sensibilidad a azinfos metil y con su similar susceptibilidad con la cepa de laboratorio a tebufenozide. Finalmente, Panguilemo, por ser un huerto para la producción de fruta para jugo, recibió una aplicación mínima de insecticidas (normalmente sólo una o dos aplicaciones de

Cuadro 1. Susceptibilidad a concentraciones diagnósticas de insecticidas de larvas en diapausa de una cepa de laboratorio susceptible a insecticidas (S) y tres poblaciones de campo de *Cydia pomonella*.

Table 1. Susceptibility to diagnostic insecticide concentrations in diapausing larvae of an insecticide-susceptible laboratory strain (S) and three field populations of *Cydia pomonella*.

Insecticida	Población	Mortalidad corregida ¹ (%)		
		Hembra	Macho	Total
Azinfos metil	Susceptible	90,86 a	97,87 a	95,61 a
	Panguilemo	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	Teno	76,47 ab	94,15 a	85,35 b
	Molina	52,63 b	0,00 b	30,00 b
Tebufenozide	Susceptible	86,29 a	89,35 a	88,29 a
	Panguilemo	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	Teno	100,00 a	82,46 a	91,21 a
	Molina	42,11 b	25,13 a	35,14 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según prueba de G ($p < 0,05$).

¹ Mortalidad corregida por fórmula de Abbott (1925).

órganofosforados), lo que se relacionó con sus altos niveles de susceptibilidad a insecticidas detectados en los bioensayos.

Estudios previos indicaron fuertes diferencias de sensibilidad entre poblaciones de *C. pomonella* tratadas y no tratadas con insecticidas (Varela *et al.*, 1993), con una mayor susceptibilidad en polillas provenientes de huertos con programas de aplicaciones irregulares y poco frecuentes (Chapman y Barrett, 1997). Knight *et al.* (1994) encontraron una fuerte asociación entre los niveles de resistencia a azinfos metil expresados por las polillas y la presión de selección; éstos fueron claramente superiores en huertos con más de cuatro aplicaciones de organofosforados por temporada. En *C. pomonella*, Sauphanor y Bouvier (1995) describieron resistencia cruzada de tebufenozide con diflubenzuron en dos poblaciones francesas que no habían sido previamente tratadas con tebufenozide u otra benzidrazina. Adicionalmente, cepas de laboratorio resistentes a deltametrina y diflubenzuron, resultaron resistentes también a tebufenozide (Sauphanor *et al.*, 1999).

Efecto del sexo en la susceptibilidad a insecticidas. En algunas localidades se observaron diferencias en la susceptibilidad de las larvas dependiendo del sexo del individuo tratado, pero éstas no fueron estadísticamente significativas. En las larvas de Molina, la susceptibilidad frente a azinfos metil y tebufenozide fue menor para los machos, al igual que para las larvas de Teno frente a tebufenozide. Sin embargo, la mortalidad registrada frente a azinfos metil por larvas de esta localidad y de la cepa de referencia frente a ambos insecticidas fue menor en las hembras (Cuadro 1). La mortalidad de cada sexo presentó diferencias significativas similares a la mortalidad del total de las larvas evaluadas, con las excepciones de los machos de Teno frente a azinfos metil y de Molina frente a tebufenozide.

Al analizar individuos adultos mediante la aplicación tópica de azinfos metil, Varela *et al.* (1993) detectaron LC_{50} 1,3 veces mayores para las hembras. Si bien esa diferencia no fue significativa, los autores propusieron que esta tendencia a una

menor susceptibilidad de las hembras podría deberse a su mayor tamaño corporal en relación con los machos. En forma concordante, Sauphanor *et al.* (2000) observaron una menor emergencia de adultos machos luego de su tratamiento con concentraciones diagnóstico ($LC_{99} = 10 \text{ mg L}^{-1}$) de deltametrina.

Actividad de enzimas detoxificadoras

Glutation-S-transferasas. La actividad de GST encontrada en las poblaciones de polilla de Molina y Teno fue significativamente superior a la de la cepa S ($F_{(3,193)} = 8,09$, $p < 0,0001$) (Cuadro 2), con promedios de 1,55 y 1,62 veces la actividad de la cepa de referencia, respectivamente. Por el contrario, los individuos de Panguilemo presentaron una actividad similar a la de la cepa de referencia (Cuadro 2). No hubo diferencias de actividad de GST entre machos y hembras ($p \geq 0,05$).

Estos resultados sugirieron que las enzimas GST podrían estar asociadas a la reducción de susceptibilidad frente a azinfos metil en las larvas de Molina y Teno, así como frente a tebufenozide en las larvas de Molina (Cuadro 1). Estas enzimas participan normalmente en la metabolización de compuestos endógenos, pero se ha descrito que también pueden detoxificar varios grupos químicos de insecticidas (McKenzie, 1996; Souderlund, 1997; Nauen y Stumpf, 2002). Previamente, Sauphanor *et al.* (1997) y Bouvier *et al.* (2002) detectaron un significativo incremento en la actividad de GST en poblaciones de polilla de la manzana resistentes a diflubenzuron y deltametrina, en comparación con una población susceptible.

Esterasas. El ANDEVA indicó que la actividad de EST en los adultos de todas las localidades fue estadísticamente inferior a la expresada por la población de referencia ($F_{(3,193)} = 3,42$, $p < 0,0183$) (Cuadro 2). No hubo diferencias de actividad de EST entre machos y hembras ($p \geq 0,05$).

Al comparar la actividad de EST en larvas de segundo estadio de cepas resistentes a deltametrina y diflubenzuron, con la misma cepa S utilizada en este estudio, Bouvier *et al.* (2002), obtuvieron resultados similares con razones de resistencia/

susceptibilidad (R/S) de 0,49 y 0,57, respectivamente. Para los demás estadios, no observaron variación, situación ya observada por Sauphanor *et al.* (1997, 1999) al analizar larvas de último estadio. Bush *et al.* (1993) encontraron una correlación negativa entre sobrevivencia a paration y actividad de EST, sugiriendo que la resistencia a este organofosforado involucraría la participación de una esterasa modificada. Sin embargo, al usar un inhibidor de estas enzimas (S,S,S-tributil fosforotritioato), Sauphanor *et al.* (1997) observaron incrementos en la toxicidad frente a deltametrina tanto en la cepa susceptible como en la resistente. Este sinergismo en larvas de ambas cepas indicaría que si bien las EST se encuentran implicadas en la metabolización de ciertas moléculas, no serían responsables de la resistencia a los insecticidas evaluados.

Oxidasas de función múltiple. Los adultos de Teno y Molina presentaron una actividad de OFM significativamente mayor que los de Panguilemo y la cepa susceptible de referencia ($H_{(3,299)} = 17,34, p < 0,0006$) (Cuadro 3).

Los rangos de actividad observados en este estudio fluctuaron entre 0 y 192,5 picogramos (pg) 7OH insecto⁻¹ min⁻¹ (Cuadro 3). Sauphanor *et al.* (1997) observaron que el valor máximo expresado por larvas de una cepa susceptible de referencia fue 100 pg 7OH insecto⁻¹ min⁻¹, mientras que en una población natural de adultos susceptibles, éste sólo alcanzó 68 pg 7OH insecto⁻¹ min⁻¹ (Boivin, T. 2002. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Francia. Comunicación personal). Los valores de actividad de OFM presentados por larvas de poblaciones europeas re-

Cuadro 2. Actividad *in vitro* de enzimas glutation-S-transferasas (GST) y esterases (EST) en adultos de una cepa de laboratorio susceptible a insecticidas y tres poblaciones de campo de *Cydia pomonella*.

Table 2. *In vitro* activity of the enzymes glutation-S-transferase (GST) y esterase (EST) in adults of an insecticide-susceptible laboratory strain and three field populations of *Cydia pomonella*.

Población	Glutation-S-transferasas		Esterasas	
	Unidades de fluorescencia insecto ⁻¹		nmol β naftol mg ⁻¹ proteína min ⁻¹	
	Media	Error estándar	Media	Error estándar
Susceptible	8.463,8 a	775,14	419,8 a	23,7
Panguilemo	7.034,5 a	1.476,10	305,9 b	74,2
Molina	13.096,1 b	1.046,06	354,7 b	19,2
Teno	13.679,4 b	1.003,61	333,6 b	19,0

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas según prueba de Fisher ($p < 0,05$).

Cuadro 3. Actividad *in vivo* de enzimas oxidasas de función múltiple (OFM) en adultos de una cepa de laboratorio susceptible a insecticidas y tres poblaciones de campo de *Cydia pomonella*.

Table 3. *In vivo* mixed-function oxidase (OFM) enzyme activity in adults of an insecticide-susceptible laboratory strain and three field populations of *Cydia pomonella*.

Población	pg ¹ de 7OH insecto ⁻¹ min ⁻¹		
	Actividad media total	Rango de actividad	R/S ²
Susceptible	11,13 a	0- 44,29	n.c. ³
Panguilemo	12,02 a	0- 89,75	1,08
Teno	17,95 b	0- 61,11	1,61
Molina	25,08 b	0-192,5	2,25

Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

¹ pg: picogramos.

² R/S (resistencia/susceptibilidad): Tasa de actividad de población analizada y población susceptible.

³ No corresponde calcular relación.

sistentes a diflubenzuron, tebufenozide y deltametrina, fueron siempre superiores a los encontrados en las susceptibles, con tasas R/S que varían entre 3,8 y 65,07 (Bouvier *et al.*, 1998, 2002; Sauphanor *et al.*, 1998, 1999; Boivin *et al.*, 2003). La actividad media de OFM de las polillas de las localidades estudiadas no superó el máximo señalado para adultos de la población europea susceptible de campo. Sin embargo, algunos de los individuos analizados superaron este valor de referencia (Figura 1), lo que sugeriría que estas enzimas podrían constituir un mecanismo de resistencia emergente en poblaciones chilenas de *C. pomonella*.

Se observaron diferencias significativas en la actividad de OFM entre sexos, que fue mayor para las hembras de Molina, Teno y Panguilemo ($H_{(3,182)} = 12,43$, $p < 0,0061$) (Cuadro 4). Al comparar las poblaciones por sexo, no se observaron diferencias significativas en el caso de los ma-

chos ($H_{(3,120)} = 5,22$, $p = 0,1563$) (Cuadro 4), pero sí para las hembras ($H_{(3,182)} = 12,43$, $p = 0,0061$), lo que corrobora los resultados presentados para el total de las polillas estudiadas (Cuadro 3).

La mayor actividad de OFM en las polillas provenientes de Molina coincidió con la baja susceptibilidad de sus larvas frente a azinfos metil y tebufenozide. La menor susceptibilidad a azinfos metil, pero no a tebufenozide de las larvas de Teno, podría también estar relacionada con la actividad de OFM. Esta actividad fue, por lo general, mayor en las hembras que en los machos, lo que también coincidió con la menor susceptibilidad observada generalmente en las hembras. Por lo tanto, sería posible que la acción de estas enzimas contribuya a la degradación de estos insecticidas en las poblaciones mencionadas, lo que podría resultar en individuos resistentes a la acción de estos productos (Sauphanor *et al.*, 1998).

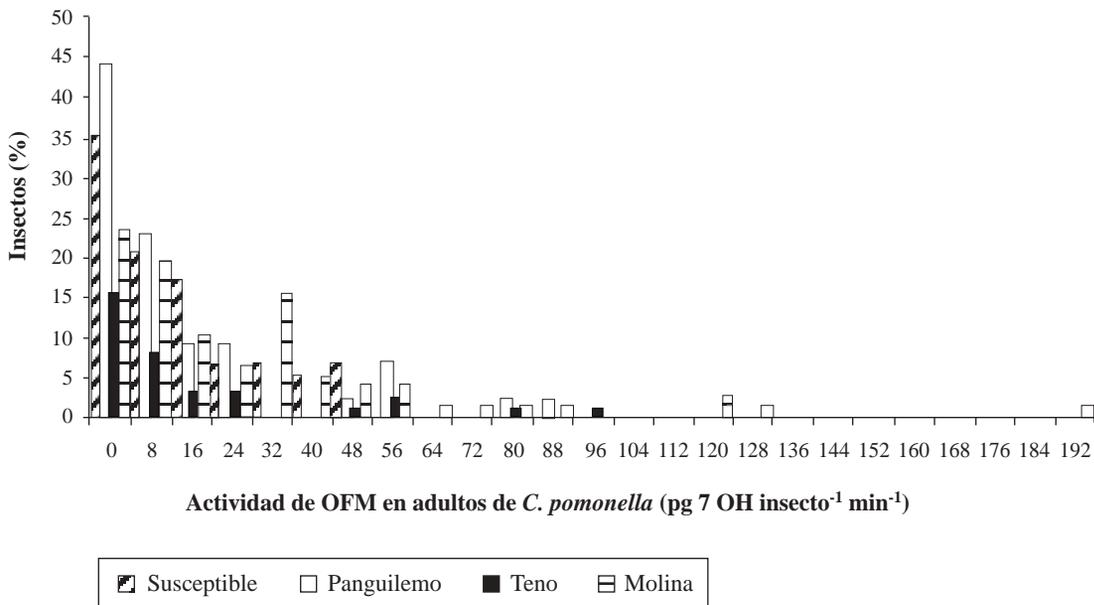


Figura 1. Distribución de la actividad *in vivo* de oxidasas de función múltiple (OFM) entre adultos de una cepa de laboratorio susceptible a insecticidas y tres poblaciones de *Cydia pomonella* colectadas en el campo.

Figure 1. Distribution of the *in vivo* mixed-function oxidase (OFM) activity among adults of an insecticide-susceptible laboratory strain and three field population of *Cydia pomonella*.

Cuadro 4. Actividades *in vivo* de oxidasas de función múltiple (OFM) tanto para hembras y machos adultos de una cepa de laboratorio susceptible a insecticidas y tres poblaciones de campo de *Cydia pomonella*.
Table 4. *In vivo* mixed-function oxidase (OFM) activity in both female and male adults of an insecticide-susceptible laboratory strain and three field populations of *Cydia pomonella*.

Población	pg ¹ de 7OH insecto ⁻¹ min ⁻¹ ²		Valor H ³	Valor p ³
	Hembra	Macho		
Susceptible	18,07 aB	13,55 aA	1,751	0,1857
Panguilemo	17,86 aB	2,59 bA	7,048	0,0079
Teno	23,24 aA	7,39 bA	28,72	0,0001
Molina	33,82 aA	13,04 bA	17,41	0,0001

Letras minúsculas distintas en la misma fila y mayúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas según prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

¹ picogramos.

² Valores promedio de actividad de OFM.

³ Resultados de Kruskal Wallis para cada población.

CONCLUSIONES

Larvas en diapausa de polilla de la manzana recolectadas en Molina y Teno, presentaron baja susceptibilidad a azinfos metil y tebufenozide, lo que sugeriría la presencia de niveles detectables de resistencia a insecticidas en algunos huertos de la Región del Maule.

Considerando los resultados de actividad de enzimas detoxificadoras, las glutation-S-transferasas y oxidasas de función múltiple podrían estar involucradas en los niveles de resistencia a azinfos metil y tebufenozide observados.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- Boivin, T., J. Bouvier, C. Chadoeuf, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2003. Constraints on adaptive mutations in the codling moth *Cydia pomonella* (L.): measuring fitness trade-offs and natural selection effects. *Heredity* 90:107-113.
- Boivin, T., C. Chabert, J. Bouvier, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2001. Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 99:381-386.
- Bouvier, J., T. Boivin, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2002. Age-dependent response to insecticide and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51:55-66.
- Bouvier, J., V. Brosse, and B. Sauphanor. 1995. La résistance du carpocapse. *L'Arboriculture Fruitière* 479:21-22.
- Bouvier, J., R. Buès, T. Boivin, L. Boudinhon, D. Beslay, and B. Sauphanor. 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87:456-462.
- Bouvier, J., A. Cuany, C. Monier, V. Brosse, and B. Sauphanor. 1998. Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 39:55-64.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bush, M., Y. Abdel-Aal, and G. Rock. 1993. Parathion resistance and esterase activity in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from North Carolina. *J. Econ. Entomol.* 86:660-666.

- Chapman, K., and B. Barrett. 1997. Susceptibility of male codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) to azinphosmethyl in Missouri. *J. Agric. Entomol.* 14:441-447.
- De Sousa, G., A. Cuany, A. Brun, M. Amichot, R. Rahmani, and J. Berge. 1995. A microfluorometric method for measuring Ethoxycoumarin-O-Deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Anal. Biochem.* 229:86-91.
- González, R. 1989. Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. 310 p. Editorial Ograma, Santiago, Chile.
- González, R. 2001. Antecedentes biológicos de la polilla de la manzana, *Cydia pomonella* (L.), en huertos de pomáceas. *Revista Frutícola* 21(1):11-26.
- Knight, A., J. Brunner, and D. Alston. 1994. Survey of azinphosmethyl resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Washington and Utah. *J. Econ. Entomol.* 87:285-292.
- McKenzie, J. 1996. The biochemical and molecular bases of resistance: Application to ecological and evolutionary questions. p. 123-147. *In* McKenzie, J. (ed.) *Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance*. Academic Press, Texas, USA.
- Moffitt, H., P. Westigard, K. Mantey, and H. Van de Baan. 1988. Resistance to diflubenzuron in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 81:1511-1515.
- Nauen, R., and N. Stumpf. 2002. Fluorometric microplate assay to measure glutathione-S transferase activity in insects and mites using monoclobimane. *Anal. Biochem.* 303:194-198.
- Riedl, H., A. Seaman, and F. Henrie. 1985. Monitoring susceptibility to azinphosmethyl in field populations of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with pheromone traps. *J. Econ. Entomol.* 78:692-699.
- Sauphanor, B., and J. Bouvier. 1995. Cross-resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pestic. Sci.* 45:369-375.
- Sauphanor, B., J. Bouvier, and V. Brosse. 1998. Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in Southeastern France. *J. Econ. Entomol.* 91:1225-1231.
- Sauphanor, B., J. Bouvier, and V. Brosse, V. 1999. Effect of an ecdysteroid agonist, tebufenozide, on the completion of diapause in susceptible and resistant strains of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 90:157-165.
- Sauphanor, B., J. Bouvier, G. Perron, F. Malezieux, et J. Fremont. 1994. Un cas de résistance de carpocapse des pommes au diflubenzuron dans le sud-est de la France. *Phytoma* 458:46-49.
- Sauphanor, B., V. Brosse, J. Bouvier, P. Speich, A. Micoud, and C. Martinet. 2000. Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). *Pest Manage. Sci.* 56:74-82.
- Sauphanor, B., A. Cuany, J. Bouvier, V. Brosse, M. Amichot, and J. Bergé. 1997. Mechanism of resistance to deltamethrin in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 58:19-117.
- Sokal, R., and F. Rohlf. 1995. *Biometry*. 887 p. 3rd ed. W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Souderlund, D. 1997. Molecular mechanism of insecticide resistance. p. 21-56. *In* Ebing, W. (ed.) *Molecular mechanism of resistance to agrochemicals*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Varela, L., S. Welter, V. Jones, J. Brunner, and A. Riedl. 1993. Monitoring and characterization of insecticide resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four Western States. *J. Econ. Entomol.* 86:1-10.
- Welter, S., L. Varela, and R. Freeman. 1991. Codling moth resistance to azinphosmethyl in California. *Resist. Pest Manage. Newsl.* 3:12.