

# RESISTENCIA ENZIMÁTICA A INSECTICIDAS EN LARVAS DE *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)

## ENZYMATIC RESISTANCE TO INSECTICIDES IN LARVAE OF *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Edison Valencia \*  
Cecilia Plata \*  
Carlos Corredor \*  
César Cardona \*\*

### RESUMEN

El *Heliothis virescens* (Fabricius) es un insecto plaga de importancia en varios cultivos tropicales y su control depende estrechamente del uso de insecticidas químicos. Este insecto muestra una gran capacidad para el desarrollo de resistencia, principalmente por mecanismos metabólicos. Se determinaron los niveles de resistencia fisiológica en larvas de *H. virescens* comparando una población de la Costa Atlántica (resistente) y una del Valle del Cauca (susceptible), mediante aplicaciones tópicas *in vivo* de los insecticidas y en ensayos *in vitro* de actividad enzimática (esterasas, carboxilesterasas y sistema de oxidasas de función mixta-MFOs). La aplicación se hizo sobre larvas de tercer instar. Los productos aplicados fueron: endosulfan, triazophos, metilparation, deltametrina y fenvalerato. El extracto enzimático se obtuvo a partir de larvas del quinto instar sobrevivientes a la  $DL_{90+n}$  (n=1 a 10). Para el sistema MFOs, un grupo de larvas se sometió al consumo de dieta artificial suplementada con fenobarbital sódico como inductor. La actividad del citocromo P-450, de las esterasas y de las carboxilesterasas se determinó por métodos espectrofotométricos. Los resultados para la población del Valle del Cauca mostraron: 1) Una mayor mortalidad para todos los tratamientos; 2) Una menor actividad general del sistema MFOs; 3) Un grado similar de inducibilidad del sistema MFOs para las dos poblaciones; 4) Una actividad promedio de esterasas y carboxilesterasas ligeramente inferior en comparación con la Costa y 5) Variaciones significativas en la actividad de esterasas y de carboxilesterasas según el insecticida utilizado. Lo anterior permitió concluir que: El sistema MFOs, como uno de los mecanismos de resistencia, es más eficiente en la población de la Costa y el grado de

inductibilidad fue similar en las dos poblaciones. Todo esto indica que *H. virescens* del Valle del Cauca está capacitado genéticamente para desarrollar resistencias, aún cuando esta población muestra actualmente niveles aceptables de susceptibilidad como consecuencia de un manejo racional en el empleo de insecticidas. Con respecto a las esterasas y carboxilesterasas se admite la posibilidad de que los patrones de comportamiento molecular sean el resultado del manejo y presión de selección por aplicaciones comerciales previas a la recolección del pie de cría de cada población en el campo.

**Palabras claves:** Resistencia enzimática, Resistencia a insecticidas, *Heliothis virescens*, Actividad enzimática.

### SUMMARY

*Heliothis virescens* (Fabricius) is an important pest of several tropical crops and its control depends on the use of chemical insecticides in a very narrow way. This insect shows a big capacity for the development of resistance, mainly based on metabolic mechanisms. We have determined the physiological resistance levels in larvae of *H. virescens* by comparison of two populations of the pest, one from the North Atlantic Coast (resistant) and the other from the Valle del Cauca (susceptible), using topical applications *in vivo* and test of enzymatic activity *in vitro*, (esterases, carboxylesterases and Mixed Function Oxidases System, MFOs). The application was done over third instar larvae. The products used were: endosulfan, triazophos, methyl parathion, deltametrin and fenvalerato. The enzymatic extracts were obtained from fifth instar larvae, surviving to the  $DL_{90th}$  (n=1 to 10). For the MFOs, a group of larvae was fed with artificial diet added sodic phenobarbital as enzymatic inducer. The activity of cytochrome P-450, esterases and carboxylesterases was determined by spectrophotometric methods. The results for the population from the Valle del Cauca (susceptible) show: 1) A higher mortality for all the treatments. 2) A lower general activity of the MFOs. 3) A similar grade of inducibility of the

MFOs in comparison to the resistant population. 4) A slightly lower average activity of esterases and carboxylesterases than the activity reported for *H. virescens* from the Atlantic Coast. 5) Significant variations on the activity of esterases and carboxyl esterases depending on the insecticide tested. These informations allow to conclude that: The MFOs, as one of the resistance mechanism, is more efficient in the population from the Atlantic Coast and the grade of inducibility of this system is similar for both populations. This show that *H. virescens* from the Valle del Cauca is genetically able to develop resistance, although this population has at present, a normal susceptibility as a result of a rational use of chemical insecticides. With respect to the esterases and carboxylesterases activity, it is accepted that these molecular behavior patterns could be the result of the management and selection pressure related to commercial applications, already done before the collection of the insects from field, belonging to each one of the colonies under this study.

**Key words:** Enzymatic resistance, Resistance to insecticides, *Heliothis virescens*, Enzymatic activity.

### INTRODUCCIÓN

La agricultura es la primera fuente de producción de alimentos, principalmente porque los productos de origen vegetal son casi siempre más baratos que los obtenidos de animales. Sin embargo, al lado de la agricultura ha existido un problema casi tan antiguo como la agricultura misma, se trata de los insectos que compiten con el hombre atacando los cultivos. Estos organismos han sido denominados plagas.

Existen diversas alternativas para el manejo de los insectos plagas, entre las cuales se destaca el control químico

\* Sección Bioquímica, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia

\*\* Entomólogo. Programa de Frijol CIAT. Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia.

co como un elemento importante, debido a la rapidez y facilidad con que soluciona este tipo de problemas. Sin embargo, cuando el control químico se emplea en forma irracional e indiscriminada ocasiona problemas peores que las mismas plagas, entre los cuales se pueden mencionar: los problemas ecológicos, por la destrucción de especies inofensivas y de los enemigos naturales de las plagas; los problemas toxicológicos, por el riesgo de intoxicación aguda de las personas que manejan los plaguicidas, así como por la presencia de residuos en los alimentos; los problemas económicos, por el aumento en las poblaciones de las plagas debido a la eliminación de sus enemigos, pero principalmente por causa de fenómenos de resistencia, y en ambos casos es necesario aumentar las dosis aplicadas, incrementar la frecuencia de aplicaciones e incluso recurrir a mezclas de diferentes insecticidas, lo cual incrementa significativamente los costos de producción.

El cultivo del algodón constituye un renglón económico de gran importancia en Colombia y en América, básicamente por la gran cantidad de empleos directos e indirectos que genera. El gusano bellotero del algodonero, *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga clave que afecta drásticamente los rendimientos de este cultivo. Este insecto tiene gran capacidad para desarrollar resistencia, principalmente por los siguientes mecanismos:

- La baja penetración del insecticida en la cutícula.
- El elevado metabolismo por acción de enzimas degradativas.
- La baja sensibilidad en el sitio de acción debido a grandes modificaciones en las proteínas receptoras de la membrana de la célula nerviosa.

Dentro de las principales enzimas detoxificantes en *H. virescens* se destacan:

- Un sistema de oxidasas de función mixta (MFOs), cuya actividad es determinada a través del citocromo P-450.
- Diversos tipos de esterasas, como fosfatasa, carboxilesterasas y arilesterasas.
- Glutation-S transferasas.

En términos generales, la resistencia a insecticidas se puede diagnosticar y estudiar a través de pruebas de eficacia con rango de dosis, recurriendo a métodos como aplicaciones tópicas, discos de hoja aplicados con el ingrediente activo ("Deep Test") y exposición de los insectos adultos a tubos impregnados con el insecticida ("Adult-vial Test"). Sin embargo, cuando se quiere profundizar en las verdaderas causas de la resistencia es necesario realizar pruebas bioquímicas como son la medición de las actividades enzimáticas y los estudios electroforéticos de isoenzimas. Por esta razón, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general la comparación de los niveles de resistencia fisiológica en larvas de *H. virescens* de dos poblaciones: la línea de la Costa Atlántica (resistente) y la del Valle del Cauca (susceptible); por medio de: aplicaciones tópicas *in vivo* y ensayos de actividad enzimática *in vitro*.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y la dosis discriminante ( $DL_{90+n}$ ), para cada insecticida.
- Medir la actividad de esterasas totales.
- Medir la actividad de carboxil esterasas.
- Medir la actividad del sistema de oxidasas de función mixta (MFOs) sin inducción previa e inducido con fenobarbital.

La hipótesis de trabajo (Ho) fueron:

1. No existen diferencias significativas entre las dosis media y discri-

minante de la población de *H. virescens* del Valle del Cauca y las dosis encontradas para la población de la Costa Atlántica.

2. No hay diferencias de importancia estadística entre la actividad de esterasas totales y carboxilesterasas y *H. virescens* del Valle del Cauca y los niveles de actividad de estas enzimas para la población de la Costa.
3. No se presentan diferencias significativas en términos de la actividad del sistema de oxidasas de función mixta de *H. virescens* de la población del Valle del Cauca con respecto a la actividad encontrada para la población de la Costa Atlántica.

## MATERIALES Y METODOS

Los insecticidas aplicados y su rango de dosis fueron:

endosulfán:	25 - 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ larva
triazofos:	52 - 4,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
metilparation:	35 - 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
deltametrina:	0,6 - 0,00625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
fenalaterato:	0,6 - 0,018 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Para las aplicaciones topicales *in vivo* se utilizó un diseño completamente al azar, y en el caso de las pruebas de actividades enzimáticas se siguió un diseño de casos y controles.

Los trabajos entomológicos se realizaron en el Centro Experimental de Hoechst Colombiana S.A. en el corregimiento de Rozo, en Palmira (Valle), y los trabajos bioquímicos se llevaron a cabo en la Universidad del Valle, Facultad de Salud, Sección Bioquímica.

Para el establecimiento de las colonias de *H. virescens* se recolectaron larvas en cultivos comerciales de algodón durante el período próximo al final del cultivo. Estas larvas se criaron en rejillas con dieta artificial para obtener larvas pertenecientes a la segunda generación, sobre las cuales se hicieron las aplicaciones topicas, empleando el método estándar de la So-

ciudad Entomológica de América (ESA) que reúne las siguientes condiciones:

- Solvente: Acetona
- Microaplicador Bukard: 1 µl/larva
- Peso larval promedio: 17 ± 3 mg
- Mínimo 8 horas postmuda en larvas seleccionadas
- 100 larvas / tratamiento
- Registro de mortalidad: 48 horas después de la aplicación.

**Prueba de actividad de esterasas totales**

Para esta prueba se utilizó el método de Koren, Yawetz y Perry (1984) adaptado para las larvas de *H. virescens*. Inicialmente se tomaron, al azar, tres larvas de quinto instar entre las sobrevivientes a la DL<sub>90+n</sub> de cada producto por duplicado. Estas larvas se fijaron en cajas de petri con parafina para su disección. Posteriormente se efectuó un corte longitudinal por la línea mesal ventral, y de esta manera se logró extraer el intestino medio de cada larva en buffer de fosfatos 0,1M; pH 7,5/4 C. También fue necesario eliminar el contenido del intestino y remover los órganos internos adheridos al mismo.

Después, los intestinos se suspendieron en buffer frío, hasta el momento en que se efectuó la homogenización de los mismos en buffer de fosfatos 5mM, pH 7,4. Finalmente, 1 nl de la suspensión enzimática se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos con el fin de dar inicio al ensayo enzimático, para lo cual se tomaron 2 ml de buffer de fosfatos 0,1M y pH 7,2 para servirlos en cubetas de cuarzo; a cada cubeta se le adicionaron 50 µl de extracto enzimático sin agitación. Posteriormente se agregaron 100 µl de p-nitrofenil acetato 2,5 mM disuelto en etanol; en este momento las cubetas se agitaron por triple inversión y se determinó el incremento de absorbancia (por liberación del p-nitrofenol) a 405 nm en un espectrofotómetro Gilford Response II con un coeficiente de extinción de: 16,24 /mM.cm para el p-nitrofenol.

**Prueba de actividad de carboxylesterasas**

Para esta prueba se empleó un método similar al anterior, pero utilizando un buffer de fosfatos 0,1M y pH 8,0 durante el ensayo enzimático.

**Ensayos de actividad del sistema de oxidasas de función mixta**

Estos ensayos se llevaron a cabo empleando larvas de *H. virescens* de quinto instar sobrevivientes a la dosis discriminante. En este caso se implementaron dos modalidades: con o sin inducción por medio de 30 mg de fenobarbital sódico por kg de dieta artificial.

Para la prueba enzimática se empleó el método de Yu y Terriere: se disecaron larvas del quinto instar para extraer los intestinos medios, después se efectuó la homogenización de 5 intestinos medios en 12 ml de buffer de fosfatos 0,1M y pH 7,8 con glicerol al 20%, en un homogenizador eléctrico durante 30 segundos. El homogenizado crudo se filtró a través de gasa neutra y se realizó una primera centrifugación a 1.000 g durante 15 minutos para remover los núcleos y los residuos celulares; el sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio. Luego se realizó una centrifugación a 10.000 g por 15 min para remover las mitocondrias; este segundo sobrenadante también se filtró en lana de vidrio. Finalmente se hizo una ultracentrifugación a 105.000 g durante una hora para obtener las fracciones microsomales destinadas al ensayo enzimático. El precipitado microsomal se suspendió en buffer de fosfatos 0,1M y pH 7,5 que contenía ditiotreitól

1 mM, y glicerol al 20%. La suspensión de microsomas se utilizó inmediatamente para el montaje de ensayos.

En el ensayo enzimático, la actividad de citocromo P-450 (que indica la actividad del MFOs) se determinó a través del método de Omura y Sato: cubetas con un buffer apropiado y la suspensión microsomal se trataron con nitrógeno gaseoso (control) y CO (muestra). Por último se leyeron las diferencias de absorbancia a 450 y 490 nm, simultáneamente para ambas cubetas.

Para todas las pruebas enzimáticas, el contenido de proteínas se determinó con el método de Lowry, utilizando seroalbúmina bovina como solución patrón.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) y Dosis discriminante (DL<sub>90+n</sub>)**

Los resultados de las aplicaciones tópicas (Tabla 1) muestran diferencias significativas en términos de la DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> para las dos poblaciones estudiadas. Para todos los productos aplicados, la población de *H. virescens* de la Costa mostró valores superiores en sus DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub>. Esto último se explica por las diferencias correspondientes a las curvas de mortalidad que presenta cada producto según su particular mecanismo de acción (Burt et al. 1978). Así por ejemplo, en el caso de insecticidas fosforados (inhibidores de la enzima acetil colinesterasa), la DL<sub>90</sub> es 2-6 veces mayor que la DL<sub>50</sub>, y para los insecticidas tipo piretroide (acción sobre receptores de membrana), la DL<sub>90</sub> es 10-20 veces mayor.

**Tabla 1.** Aplicaciones tópicas. Dosis letal media y discriminante en *H. virescens*, F<sub>2</sub>

Insecticidas	<i>H. virescens</i> Costa Atlántica		<i>H. virescens</i> Valle del Cauca		Factor de resistencia R/S DL <sub>90</sub>
	DL <sub>50</sub> (µg/µl)	DL <sub>90</sub> (µg/µl)	DL <sub>50</sub> (µg/µl)	DL <sub>90</sub> (µg/µl)	
Endosulfan	3,4	12,5	1,54	8,93	1,4
Triazofos	9,5	14,2	2,77	3,84	3,7
Metilparation	4,3	15,3	1,22	3,8	4,03
Deltametrina	0,108	0,62	0,064	0,26	2,4
Fenvalerato	0,15	1,2	0,156	0,87	1,37

El factor de resistencia promedio (FR=DL90 - Costa / DL90 - Valle) para todos los productos, fue igual a  $2,58 \pm 0,03$ . Los insecticidas endosulfan y fenvalerato presentaron los FR más bajos, posiblemente debido a sus características químicas (Khany y Bederka 1974), así como a su manejo en cada zona, haciendo que estas sustancias sean atípicas dentro de su correspondiente grupo. El endosulfan es un éster cíclico de ácido sulfuroso, y su degradación se efectúa principalmente a través del metabolismo secundario con la participación de enzimas conjugativas del grupo de las Glutacion-S transferasas (Gould y Hodgson 1980). Este hecho reduce ostensiblemente la probabilidad de que se dé una alta incidencia de resistencia, pues se sabe que los mecanismos metabólicos de resistencia son del tipo primario (Brattsen 1979). Por otro lado, el fenvalerato es un piretroide con pocos sitios de ataque metabólico y presenta cuatro isómeros con potencia insecticida diferencial. Esto último implica que el insecto totalmente resistente, debería estar en capacidad de tolerar los cuatro isómeros y existe una muy baja probabilidad de que esto suceda (Hoechst 1989).

Desde el punto de vista de manejo, como el endosulfan se aplica principalmente para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), la presión de selección sobre *H. virescens* es circunstancial e indirecta, y en cuanto al fenvalerato, debido a su alta especificidad sobre *H. virescens* y a su elevado costo comercial, se aplica sólo cuando el único problema es *Heliothis*, situación muy poco frecuente, ya que esta plaga aparece muchas veces en complejo con otras plagas, lo cual exige el empleo de insecticidas menos específicos.

Con respecto a la deltametrina, otro piretroide con un FR superior al reportado para el fenvalerato, cabe anotar que debido a su uso indiscriminado en

la Costa Atlántica durante 1984, la plaga se hizo resistente y que el valor moderado de resistencia en la actualidad se debe a que en la Costa su uso se ha suprimido con la consecuente dilución de la resistencia y a que la alta utilización de este insecticida para el control del gusano rosado de la India, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Valle del Cauca, ejerce una presión selectiva indirecta sobre las poblaciones de *H. virescens*. Los FR para los organofosforados triazofos y metilparation fueron los mayores en el presente estudio. El máximo FR=4,03 obtenido para metilparation se explica por su amplia utilización para el control del picudo del algodón, especialmente al final del cultivo, seleccionando las poblaciones sobrevivientes de *H. virescens*.

En segundo lugar, se tiene el FR=3,7 del triazofos. Aún cuando se trata de un insecticida de poca utilización, en la Costa se aplica contra *H. virescens* en un producto comercial formado por la mezcla de triazofos y clorpirifos para el control de *Spodoptera* sp. (Lepidoptera: Noctuidae). Además, el triazofos y el metilparation son productos que por tener azufre dentro de su radical fosfato (fosforotioatos), tie-

nen mayores probabilidades de resistencia cruzada (Koren et al. 1984). Finalmente hay que recalcar que *H. virescens* es una especie naturalmente tolerante al triazofos sin que se haya efectuado una selección previa (Attia 1980).

### Actividad de esterases totales (Figuras 1, 2, 3 y 4)

El valor promedio de la actividad de esterases totales para la población de la Costa Atlántica fue significativamente mayor (1,923 nM/min) que para el Valle del Cauca (1,529 nM/min). Esta es una consecuencia directa de las aplicaciones comerciales indiscriminadas efectuadas en la Costa.

Los valores obtenidos con la población del Valle del Cauca muestran una mayor actividad de esterases totales en las larvas seleccionadas con triazofos. Este hecho indica que el pie de cría obtenido de lotes comerciales de cultivo de algodón en esta zona presentó una alta incidencia de individuos seleccionados con este producto, y además evidencia que los insecticidas organofosforados son sustratos de diversos tipos de esterases (Brooks 1972).

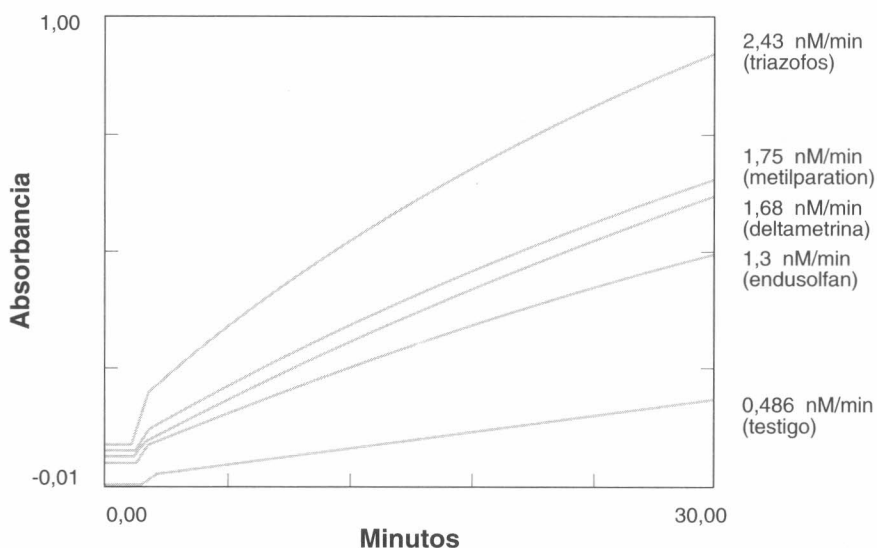
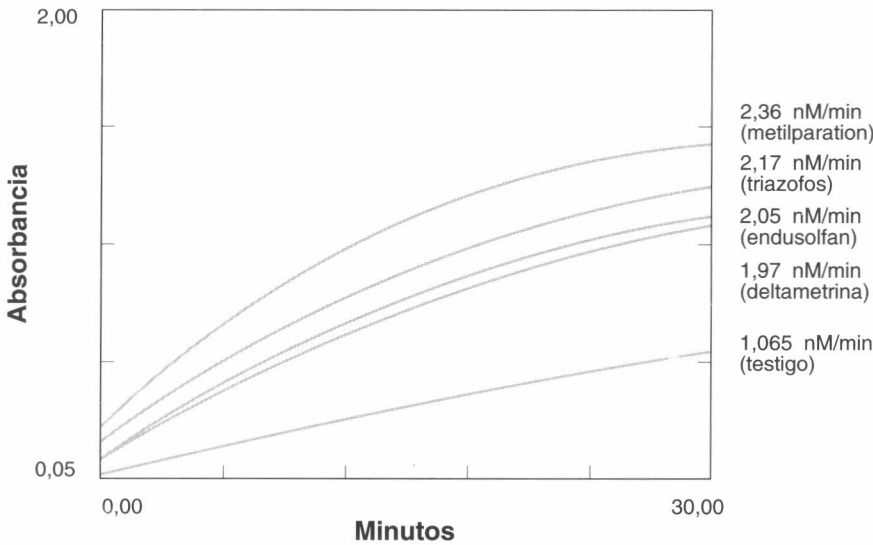
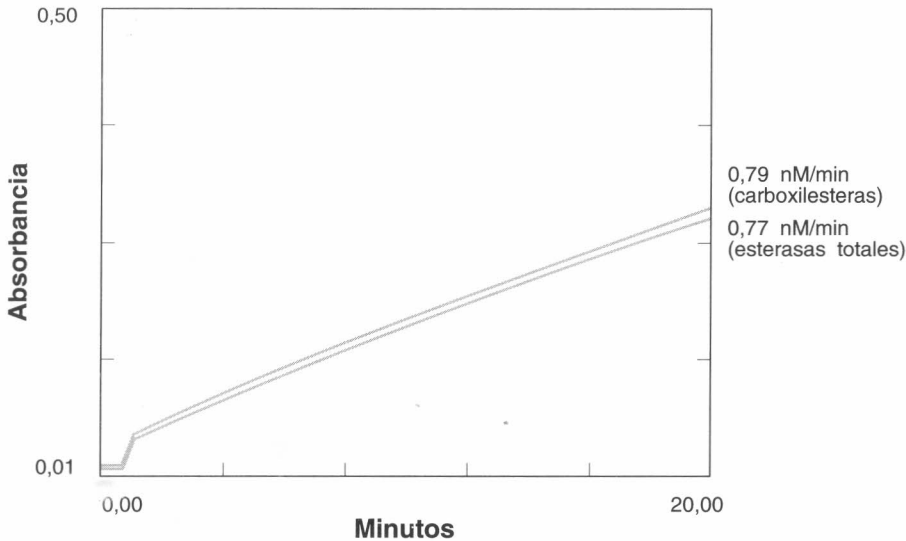


Figura 1. Actividad de esterases totales. *H. virescens* - Valle del Cauca. F<sub>2</sub>. Análisis = ; Muestras=1,2,3,4





**Figura 2.** Actividad de estererasas totales. *H. virescens* - Costa Atlántica. F<sub>2</sub>. Análisis=1; Muestras=1,2,3,4,5



**Figura 3.** Actividad de carboxilesterasas y estererasas totales DL<sub>90</sub> de fenvalerato. *H. virescens* - Valle del Cauca. F<sub>2</sub>. Análisis= ; Muestras=1,2

El segundo producto con niveles importantes de actividad de estererasas totales fue el metilparation, el cual, a pesar de tener poca utilización en el Valle del Cauca por la ausencia del picudo, presenta un alto riesgo de resistencia cruzada con el triazofos.

El valor de la actividad de estererasas totales encontrado para la deltametrina que puede considerarse intermedio para el Valle del Cauca, confirma el hecho de que el empleo de este producto al final de temporada para el

control del gusano rosado de la India, está seleccionando las poblaciones de *H. virescens* que aparecen simultáneamente con ese insecto.

En relación con el endosulfan, se observa una actividad de estererasas totales inferior al promedio debido, seguramente, al empleo mínimo de este producto en los cultivos de algodón del Valle del Cauca. En segundo lugar, sus características moleculares descritas (Valencia 1988) sugieren dificultades estéricas para la acción de las estererasas (Hana 1987).

Los bajos niveles de actividad de estererasas totales para fenvalerato (Fig. 5) están directamente relacionados con los altos valores de eficacia reportados para este insecticida en algunas localidades del país. Dos características de su estructura química pueden estar reduciendo su sensibilidad a ataques enzimáticos: una es la presencia del grupo alfa-ciano (-CN) en posición CIS con el oxígeno del grupo carboxílico. En segundo lugar, existe un grupo metil butilato también en posición CIS al otro lado del grupo carbonilo que impide el acceso al sitio catalítico de la enzima e incrementa su afinidad por los receptores presentes en la membrana de la célula nerviosa como ha sido reportado para diferentes especies (Oppenorth y Welling 1976).

La actividad de las estererasas totales para la población de la Costa Atlántica mostró no solamente un promedio general mayor, sino que la posición de la jerarquía de algunos insecticidas cambió sustancialmente. Las larvas seleccionadas con metilparation presentaron los mayores valores de actividad y significativamente superiores a los valores del Valle del Cauca.

El siguiente producto en importancia fue el triazofos cuya actividad enzimática en las larvas de la Costa fue realmente menor que en las larvas del Valle, donde el empleo de este insecticida es más frecuente.

Lo contrario sucedió en el caso del endosulfan, cuyos valores de actividad de estererasas fueron mayores para la población de la Costa, donde el producto se aplica sólo contra *A. grandis* y en mezcla con otros insecticidas contra *H. virescens* (Sparts 1981).

En el cuarto lugar de importancia se tiene la población seleccionada con deltametrina, pero es de anotar que si bien los valores de actividad están en el promedio, siguen siendo mayores que los encontrados para *H. virescens* del Valle del Cauca. Esto se explica por la gran presión de selección ejer-

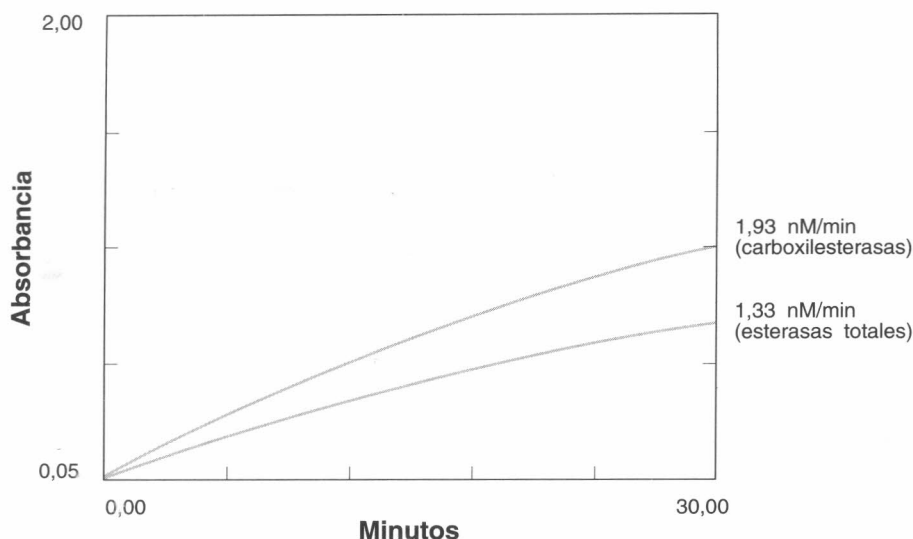


Figura 4. Actividad de carboxilesterasas y esterases totales DL<sub>90</sub> de fenvalerato. *H. virescens* - Costa Atlántica. F<sub>2</sub>. Análisis=2 ; Muestras=1,2

cida sobre este insecto por muchos piretroides similares a la deltametrina en la Costa Atlántica.

Los valores para el fenvalerato fueron nuevamente los más bajos, pero mayores que los hallados para la población del Valle del Cauca.

Finalmente fué interesante comprobar que la actividad esterases totales de los testigos absolutos (controles sin aplicación), fue la menor para las dos poblaciones y que la actividad basal para el testigo de la costa fue 2,19 veces mayor que la registrada para la población del Valle. Este hecho indica que a lo largo de dos generaciones de cría en el laboratorio, persisten las diferencias entre las dos poblaciones debidas a la presión selectiva y al manejo del *H. virescens* en cada zona.

**Actividad de carboxilesterasas (Fig. 3-6)**

Para la población de la Costa Atlántica (Fig. 6) se observan valores de actividad de carboxilesterasas significativamente mayores.

En la población del Valle del Cauca (Fig. 5), la deltametrina presentó el valor más alto, lo cuál resulta lógico si se considera que los piretroides son

particularmente sensibles al ataque de las carboxilesterasas, por tener en su grupo central un ester carboxílico (Brattsen 1979). En esta zona, el triazofos ocupó el segundo lugar como consecuencia de la alta actividad fosfatásica reportada para las carboxilesterasas.

Las posiciones intermedias de metilparation y el endosulfan son consecuencia de su poca utilización en el

Valle, y para el fenvalerato los valores fueron los más bajos y no diferentes de los hallados para las esterases totales (Fig. 3).

Los resultados para la población de la Costa (Fig. 6) muestran drásticos cambios de posición en la jerarquía de actividad de estas enzimas: El metilparation ocupó el primer lugar, seguido por la deltametrina y el endosulfan, en tanto que la actividad encontrada para las larvas seleccionadas con triazofos fue la más baja del grupo. En relación con el fenvalerato (Fig. 4 y 5) se observa un incremento de la actividad con respecto al *H. virescens* del Valle del Cauca y diferencias significativas con la actividad de las esterases totales. Cabe destacar que no hubo diferencias con respecto a los testigos absolutos de ambas poblaciones, lo cual indica la posibilidad de inducción enzimática (Síntesis de novo) ya demostrada en otras especies de insectos (Burt et al. 1978).

Estos resultados son consecuencia directa del empleo indiscriminado de los piretroides contra el *H. virescens*, debido a los altos niveles de población de este insecto en la Costa Atlántica.

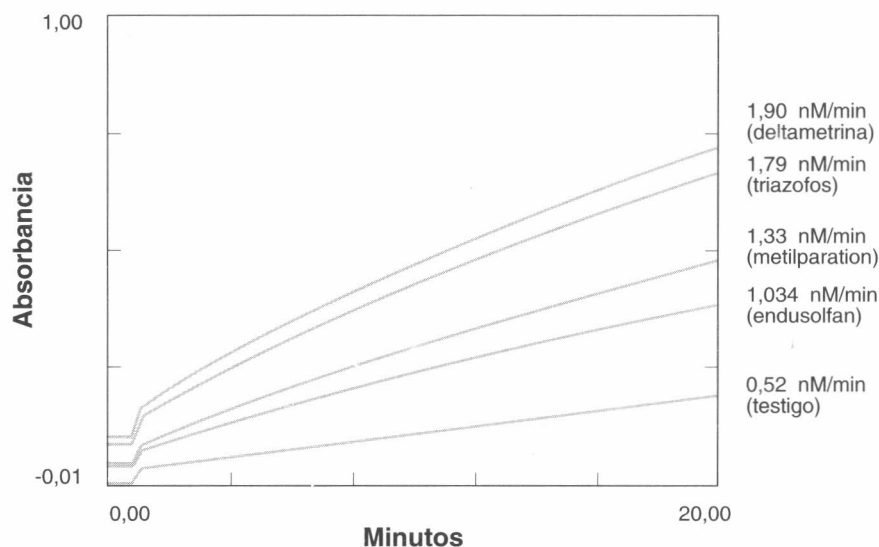


Figura 5. Actividad de carboxilesterasas *H. virescens* - Valle del Cauca. F<sub>2</sub>. Análisis= ; Muestras=1,2,3,4,5

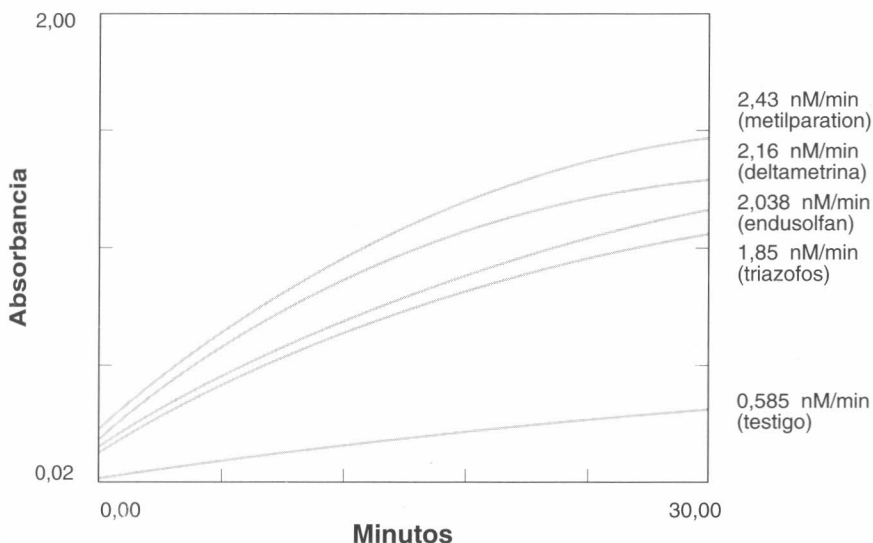


Figura 6. Actividad de carboxilesterasas *H. virescens* - Costa Atlántica. F<sub>2</sub>. Análisis=2; Muestras=1,2,3,4,5

Tabla 2. Resultados del sistema de oxidasas de función mixta. Actividad del citocromo P-450. Línea: Valle del Cauca.

Insecticida (DL <sub>90+n</sub> )	Actividad enzimática						Grado de Inducib.
	Sin inducción			Con inducción			
	AAbs CO-N	Cont. proteínas mg/ml	Actividad espec. nM/mg Prot.	AAbs CO-N	Cont. proteínas mg/ml	Actividad espec. nM/mg Prot.	
Testigo absoluto	0,070	13,80	0,056	0,163	14,3	0,125	2,23
Endosulfan	0,124	16,20	0,085	0,381	16,4	0,256	3,01
Triazofos	0,205	14,60	0,154	0,854	15,6	0,600	3,89
Metilparation	0,211	15,70	0,148	0,430	15,9	0,297	2,00
Deltametrina	0,146	14,80	0,108	0,262	15,4	0,187	1,73
Fenvalerato	0,112	12,24	0,100	0,202	12,6	0,175	1,75

Tabla 3. Resultados del sistema de oxidasas de función mixta. Actividad del citocromo P-450. Línea: Costa Atlántica.

Insecticida (DL <sub>90+n</sub> )	Actividad enzimática						Grado de Inducib.
	Sin inducción			Con inducción			
	AAbs CO-N	Cont. proteínas mg/ml	Actividad espec. nM/mg Prot.	AAbs CO-N	Cont. proteínas mg/ml	Actividad espec. nM/mg Prot.	
Testigo absoluto	0,103	10,30	0,110	0,223	9,6	0,261	2,37
Endosulfan	0,145	10,14	0,157	0,419	10,2	0,451	2,87
Triazofos	0,300	11,60	0,284	0,946	10,8	0,970	3,42
Metilparation	0,329	10,70	0,338	0,769	10,5	0,805	2,38
Deltametrina	0,164	9,56	0,189	0,253	8,7	0,321	1,70
Fenvalerato	0,138	9,21	0,165	0,213	8,3	0,284	1,72

**Sistema de oxidasas de función mixta (MFOs) (Tablas 2, 3 y 4)**

La actividad de MFOs sin previa inducción con fenobarbital fue significativamente más alta en las larvas aplicadas con insecticidas organofosforados para ambas poblaciones de

*H. virescens*. El mayor valor dependió de la frecuencia de utilización de cada producto en cada zona, siendo superiores los datos encontrados para la población de la Costa.

Para los insectos de las dos localidades fue consistente que endosulfan,

deltametrina y fenalverato presentaron los valores más bajos.

Estos resultados sugieren que el sistema MFOs tiene poca participación como mecanismo principal de resistencia a este tipo de productos, o que forma parte de un complejo de respuestas metabólicas en el cual las esterasas (en el caso de los piretroides) y las glutation-S transferasas (para endosulfan) serían las más importantes (Goult y Hodgson 1980).

Lo más interesante, con respecto al MFOs, es la demostración por primera vez de que el grado de inducibilidad de este sistema enzimático es similar para las dos poblaciones. En efecto, para el *H. virescens* del Valle del Cauca y de la Costa, los coeficientes de inducibilidad no fueron estadísticamente diferentes. Esto indica que ambas poblaciones están capacitadas genéticamente para responder a la presión selectiva ejercida por los insecticidas y que un manejo irracional de estos productos podría inducir el sistema MFOs en ambas zonas.

**CONCLUSIONES**

1. Las DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> fueron siempre menores para la población de *H. virescens* del Valle del Cauca.
2. La actividad promedio de las esterasas y de las carboxilesterasas fue ligeramente mayor para la población de la Costa Atlántica.
3. Existen variaciones significativas en la actividad de esterasas totales y las carboxilesterasas para ambas poblaciones, según el insecticida aplicado.
4. El *H. virescens* de la Costa Atlántica mostró una actividad del sistema MFOs significativamente mayor con respecto a todos los insecticidas.
5. Ambas poblaciones de *H. virescens* presentaron un grado similar de inducibilidad del sistema MFOs.

**Tabla 4.** Comparación de la actividad del MFOs *Heliothis* Costa Atlántica vs. *Heliothis* Valle del Cauca.

Insecticida (DL <sub>90+N</sub> )	Actividad enzimática nMoles/mg prot.						Razón de
	H. virescens-Valle			H. virescens-Costa			Actividad
	Actividad específica		Grado	Actividad específica		Grado	R/S
	No inducida	Inducida	Inducib.	No inducida	Inducida	Inducib.	Sin induc.
Testigo absoluto	0,056	0,125	2,23	0,110	0,261	2,37	1,96
Endosulfan	0,085	0,256	3,01	0,157	0,451	2,87	1,85
Triazofos	0,154	0,600	3,89	0,284	0,970	3,42	1,84
Metilparation	0,148	0,297	2,00	0,338	0,805	2,38	5,44
Deltametrina	0,108	0,187	1,73	0,189	0,321	1,70	2,97
Fenvaltaro	0,100	0,175	1,75	0,165	0,284	1,72	2,84

6. Existe corelación entre la mortalidad y la actividad enzimática de cada población según el manejo del insecto en cada zona.

**BIBLIOGRAFÍA**

ATTIA, F.I.G. 1980. Synergism studies with organo phosphorus resistant strains of the Indian meal moth. *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) v. 73, p. 184-185.

BRATTSSEN, L.B. 1979. Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. *In: Herbivores their interactions with secondary plants.*

BROOKS, G.T. 1972. Pathways of enzymatic degradation of pesticides. *In: F. Coulston and F. Korte* (Eds.). *Environmental quality and safety.* Academic Press, New York. p. 106-164.

BURT, M.E.; KUHR, R.J.; BOWERS, W.S. 1978. Metabolism of precocene II in the cabbage looper and European corn borer. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Estados Unidos) v. 9, p. 300-303.

GOULD, F.; HODGSON, E. 1980. Mixed-function oxidase and glutathione transferase activity in last instar *Heliothis virescens* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Estados Unidos) v. 11, p.

HANA, E.M. 1987. Spectrophotometric method for the evaluation of total esterase activity in aphids. *Journal of Insect Physiology* (Estados Unidos) v. 32, p. 128-134.

HOECHST. 1989. Technical Information, Thiodan insecticide Acaricide. 25p.

KHAN, M.A.; BEDERKA, J.P., Jr. 1974. Survival in toxic environments. Academic Press, New York. 553p.

KOREN, B.; YAWETZ, A.; PERRY, S. 1984. Biochemical properties characterizing the development of tolerance to malathion in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* (Estados Unidos) v. 77, p. 864-867.

OPPENORTH, F.J.; WELLING, W. 1976. Biochemistry and physiology of resistance. *In: C.F. Wilkinson* (Ed.). Plenum Press, New York. p. 507-511.

SPARKS, T.C. 1981. Development of insecticide resistance in *Heliothis* spp. in the Americas. *Bulletin of the Entomological Society of America* (Estados Unidos) v. 27, p.

VALENCIA, E. 1988. Insecticidas selectivos como alternativas para el manejo integrado de plagas. Hoechst Colombiana S.A. División Agropecuaria, Centro Experimental Hoecol, Cali, Colombia. (Publicación Internacional).