

NUTRICIÓN Y SANIDAD VEGETAL

MÉTODO EN CAMPO

Monitoreo de la resistencia a insecticidas en carpocapsa

M. A. Rodríguez

D. Bosch

J. Avilla

Centro UdL-IRTA de R+D de Lleida. Universidad de Lleida.
Rovira Roure – 191, 25198 – Lleida.

marcela.rodriguez@irta.cat; dolors.bosch@irta.cat;
avilla@pvcf.udl.cat

Cydia pomonella (L.), agusanado de la manzana o carpocapsa (**Foto 1**), es una de las plagas más importantes de manzano y peral. Sus antecedentes de resistencia a insecticidas con diversos tipos de acción son conocidos en todo el mundo. En la zona de producción de manzano de Lleida se ha detectado que la resistencia a insecticidas se debe principalmente a la actividad de las enzimas multifunción oxidasas (MFO), que metabolizan el insecticida antes de que alcance su lugar de acción. Para desarrollar un método para el monitoreo de la resistencia, utilizamos adultos de campo para medir la actividad de las MFO. Los resultados obtenidos nos proveen de información que permite indicar el potencial desarrollo de resistencia a insecticidas en campo y, por lo tanto, nos permite influir en la toma de decisiones sobre la mejor estrategia para prevenirla o revertirla.



FOTO 1. Adulto de *C. pomonella*

La resistencia a insecticidas se puede producir en un tiempo corto, es reversible y repetible (Silva *et al*, 2003). La transmisión hereditaria de la resistencia se efectúa por medio de genes previamente presentes en las poblaciones y que en condiciones naturales están en frecuencias reducidas (Whitten y McKenzie, 1982). Estos genes, inicialmente raros en poblaciones naturales, (**Figura 1**) son responsables de la degradación de toxinas producidas como defensa por las plantas de las que los insectos se alimentan. Los insecticidas en los agro-ecosistemas simplemente seleccionan a los pocos individuos con estos genes (resistentes) y aumentan la frecuencia de éstos en las poblaciones naturales (Crow, 1957; Lagunes y Villanueva, 1994).

ENSAYOS REALIZADOS

A partir de 2004, nuestro grupo de investigación ha destinado esfuerzos para averiguar qué mecanismos de resistencia estaban implicados en la falta de susceptibilidad a insecticidas de poblaciones de campo de *C. pomonella* de la zona de producción frutícola de Lleida, recogidas en parcelas que presentaban problemas de control. Utilizamos bioensayos de aplicación de insecticidas sobre estas poblaciones y evaluamos al mismo tiempo la acción de tres enzimas de detoxificación (enzimas que degradan el insecticida antes de que éste ejerza su efecto tóxico sobre el insecto): multifunción oxidasas (MFO), glutathione-S-transferasas (GST) y esterasas (EST) comparándolas con una población susceptible de labora-

LA PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS

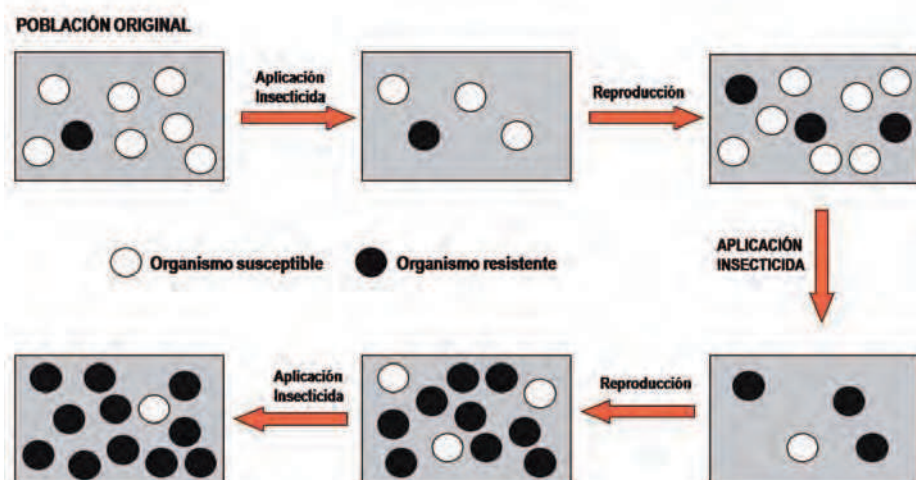
La carpocapsa (*Cydia pomonella* (L.)), es sin duda la plaga más importante de manzano y peral en prácticamente todas las zonas donde se producen estos cultivos. El desarrollo de resistencia a insecticidas de carpocapsa está muy documentado, y se han encontrado casos de resistencia a una gran diversidad de grupos de insecticidas sintéticos (organofosfora-

dos, piretroides, abamectinas, benzoylureas, benzilhidracinas, neonicotinoides) utilizados para su control, en países tan diversos como EE.UU., España, Francia, Australia, Grecia, Polonia, Italia, Suiza, Argentina y Chile.

Un componente esencial para el manejo de la resistencia a insecticidas/acaricidas es la evaluación de la resistencia, con el fin de lograr una temprana detección y dar espacio a la intervención oportuna que permita mitigar sus efectos sobre el cultivo. Para hacerlo, es necesario encontrar una metodología de eva-

luación de la resistencia que sea capaz de detectar tanto la frecuencia de individuos resistentes, como la de los susceptibles presentes inicialmente en el campo. Normalmente, la detección de la resistencia a insecticidas se lleva a cabo por medio de ensayos en laboratorio, y los resultados obtenidos en las poblaciones de campo son contrastados con los obtenidos en una población susceptible de laboratorio (población criada y mantenida en condiciones de laboratorio sin exposición a insecticidas por muchas generaciones).

FIGURA 1 / Secuencia de eventos en el desarrollo de la resistencia a insecticidas (Hruska *et al.*, 1997).



// LOS ESTUDIOS REVELARON QUE LA ELEVADA PRESIÓN DE SELECCIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS APLICADOS EN CAMPO INDUJO LA APARICIÓN DE RESISTENCIA POR VÍA METABÓLICA, HACIENDO QUE LA EFECTIVIDAD DE LOS INSECTICIDAS USADOS DISMINUYERA //

torio S_Lab que fue obtenida de una finca abandonada de la zona frutícola de Lleida y hace 19 años que es mantenida con dieta semi-artificial en el laboratorio del Centro UdL-IRTA de R+D de Lleida, sin exposición a insecticidas. (Avilla *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2007; Rodríguez, *et al.*, 2010, 2011a y 2011b).

Nuestros resultados mostraron que en todos los casos existe una relación entre los fallos de control y el aumento en la frecuencia de individuos resistentes (RMFO, RGST y REST) a materias activas de productos organofosforados, piretroides, neonicotinoides, benzoilhidrazinas, carbamatos y benzoilureas. También se detectaron indicios de la existencia de resistencia cruzada (cuando un mismo mecanismo de resistencia induce la resistencia a muchos insecticidas) en estas poblaciones de campo, lo que dificulta las estrategias de manejo dado que limita el efecto de acción de las materias activas de los insecticidas.

Sin embargo, lo más destacado de nuestros resultados fue que de todas las poblaciones de campo que resultaron resistentes - independientemente del estado de desarrollo de carpocapsa analizado (adulto, larva de primer estadio y larva post-diapausantes), del año (2004 a 2007) y de la procedencia - la detoxificación insecticida implicaba la acción de las MFO, sin excepción.

Considerando lo anterior, decidimos plantearnos el siguiente interrogante: ¿es viable utilizar a las multifunción oxidasas (MFO) como herramienta de detección rápida de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de carpocapsa?

ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN INTEGRADA UTILIZADAS

Para resolver esta interrogante decidimos utilizar los adultos que se capturan anualmente para estimar el vuelo de las poblaciones de carpocapsa.

La estrategia de protección integrada tiene por objetivo limitar el daño en los cultivos minimizando el uso de insecticidas químicos.

Una de las estrategias de la protección integrada de cultivos (PIC) para lograr una optimización de las aplicaciones de insecticidas se basa en la estimación del vuelo de las poblaciones de campo

por medio de trampas con atraentes, principalmente de dos tipos: 1) utilizando la feromona de la especie: difusores convencionales; y 2) el uso combinado de feromona + éster de pera (indicado para captura de machos y hembras, y útil en capturas en fincas de confusión sexual, donde los difusores convencionales no atrapan adultos).

MUESTREO DE POBLACIONES

Las poblaciones de campo utilizadas en este estudio fueron muestreadas en los años 2009 y 2010 a partir de fincas comerciales con uso de feromona más insecticida químicos, a excepción de la finca Par con tratamiento químico convencional y de Eco-AL, que corresponde a una finca de producción ecológica.

El monitoreo de las poblaciones fue con Trampas Delta, (Foto 2). Se dispusieron dos trampas delta de cada difusor por finca (2 Combo: Combo® (Suterra), 3 mg de feromona + 3 mg de cai-



FOTO 2. Trampa Delta con atrayente para monitoreo de vuelo de *C. pomonella*

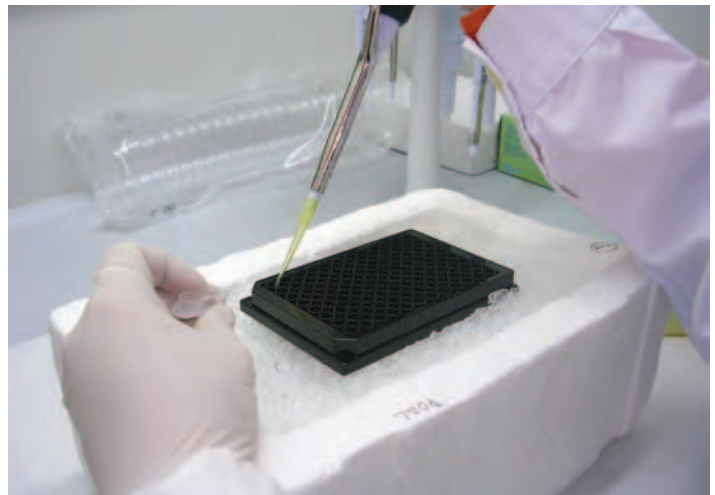
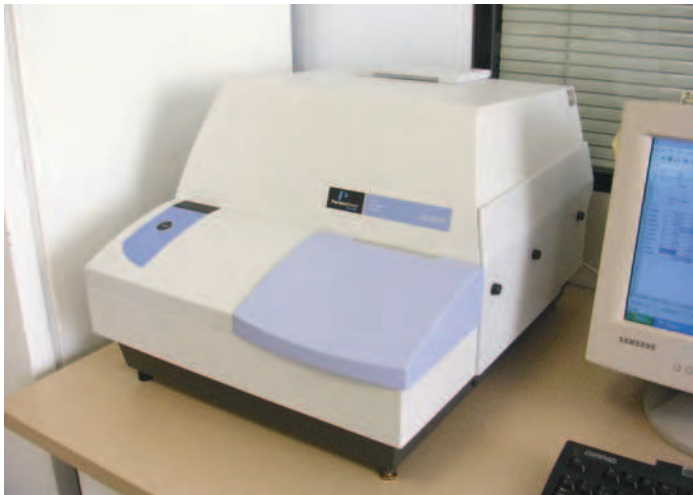


FOTO 3. Microplacas, medio de incubación (sustrato) y lector de microplacas Victor3, PerkinElmer, utilizados en la medición de la actividad enzimática de las MFO en adultos vivos de *C. pomonella*

romona (éster de pera) y 2 Bio-lure: Biolure® (Shinetsu), 10 mg de feromona). Las capturas fueron recogidas 2 veces por semana, con la finalidad de que los adultos estuviesen vivos para el análisis de la actividad de MFOs.

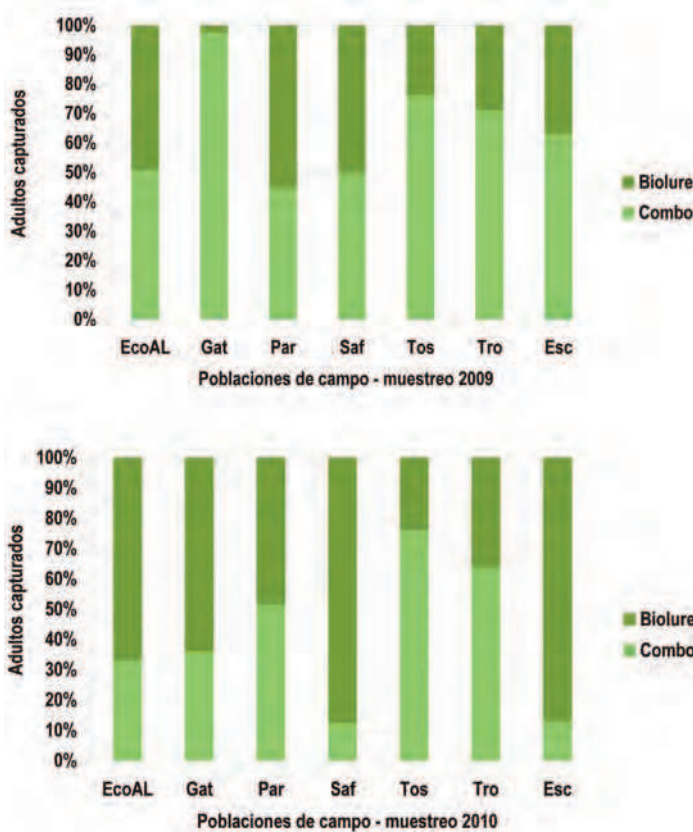
La medición de la actividad de las enzimas MFO, se lleva a cabo utilizando el abdomen de los adultos capturados vivos. Los abdómenes se introdujeron en una microplaca de 96 pocillos + un sustrato específico de las enzimas MFO. Pasadas 4 horas, se

midió el producto de la reacción enzimática [enzima (MFO) + sustrato (7-etoxycoumarin) = producto (7-OH-Hidroxycoumarin)] de cada individuo por fluorescencia comparándolo con la población susceptible S_Lab (a mayor cantidad de producto formado, mayor actividad de MFO), (Foto 3).

azar, observamos en los dos años de muestreo una frecuencia relativa de individuos resistentes RMFO alta y generalizada en las poblaciones muestreadas, con la excepción de los adultos procedentes de la finca EcoAl, de producción orgánica (Figura 3). Además, en 5 de las 7 poblaciones de campo se observó una disminución de la frecuencia de individuos resistentes en las capturas del año 2010, respecto de las observadas en 2009.

Esta metodología para la evaluación de la resistencia es viable. Consideramos las multifunción oxidasas (MFO) como una herramienta eficiente de detección de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de carpocapsa. Las lecturas de actividad de MFO pueden ser realizadas en cada uno de los vuelos, o anualmente, con lo cual se pueden modificar las estrategias para no favorecer a los individuos resistentes que hay en campo.

FIGURA 2 / Capturas por atrayente Adultos de poblaciones de campo de *C. pomonella*. Superior: muestreo 2009. Inferior: muestreo 2010.



EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA

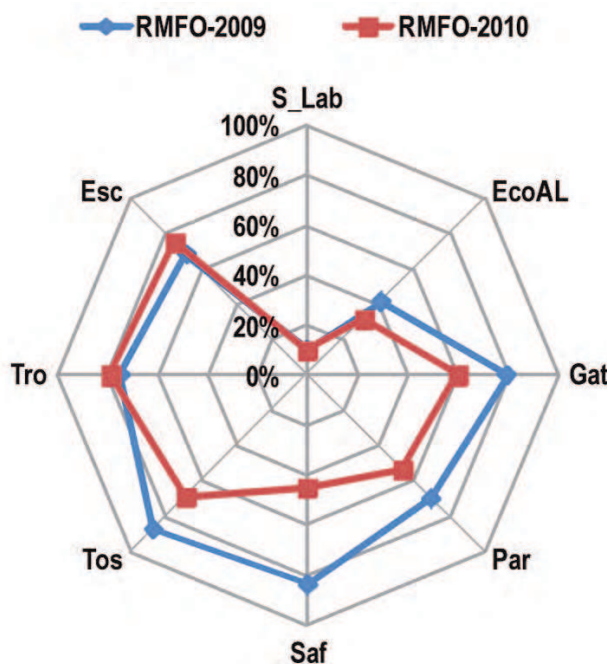
Los adultos capturados en trampas delta durante el monitoreo de las poblaciones de campo, tanto con atrayente de feromona como con el combinado de feromona + éster de pera (Figura 2) llegaban vivos al laboratorio, condición indispensable para medir la actividad enzimática de las MFO, razón por la cual, la utilización de este método de capturas es adecuado para el seguimiento de la resistencia en campo.

Considerando que los muestreos con trampas delta son al

// CONOCER LA COMPOSICIÓN DE LAS POBLACIONES NATURALES DE *C. POMONELLA* EN TÉRMINOS DE RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD, ES FUNDAMENTAL A LA HORA DE TOMAR MEDIDAS DE CONTROL EN CAMPO //

Otra ventaja que presenta éste método es que nos permite saber la condición inicial de una población, mostrando tanto los fenotipos resistentes, como los que son susceptibles. Si comparamos la actividad enzimática de MFO de la finca de producción orgánica EcoAl, la finca convencional + feromona Tos, con la población susceptible S_Lab (Figura 4), se puede observar cómo la mayor cantidad de adultos *C. pomonella* procedentes de S_Lab y EcoAl están en el rango de actividad de MFO 8-16, y que a partir del rango 16-32, comienzan a disminuir, tanto en los muestreos de 2009 como en el de 2010. Al contrario, la población Tos comienza aumentando el número de individuos con actividades MFO entre el rango 16-32, llegando a su número máximo de adultos en el rango MFO de

FIGURA 3 / Frecuencia de adultos resistentes (RMFO), en poblaciones de campo de *C. pomonella*, años 2009 y 2010.



64-128 en 2009, y 32-64 en 2010. Los distintos sistemas de manejo de las fincas influyen en la cantidad de individuos resistentes encontrados, lo que quiere decir, que con esta información previa, un cambio en las estrategias de manejo de las fincas, tendría que verse reflejada en una disminución y/o mantención de niveles bajos de individuos resistentes en poblaciones de campo.

Conocer la composición de las poblaciones naturales de *C. pomonella* en términos de resistencia-susceptibilidad, es fundamental a la hora de tomar medidas de control en campo, debido a lo cual las variaciones y relaciones que existan entre la frecuencia de los individuos resistentes y la baja susceptibilidad a insecticidas que se traducen en problemas de control es muy importante.



INNOVAMOS EN EL SECTOR AGRÍCOLA CRECEMOS CONTIGO

- ✓ Desarrollo Científico
- ✓ Eventos Académicos
- ✓ Medio Ambiente
- ✓ Sostenibilidad Rural
- ✓ Biodiversidad Agrícola

PATROCINADOR PRINCIPAL

XIX REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FISIOLÓGIA VEGETAL (SEFV)



Agricultura avanzada en constante evolución.

CODIAGRO Pol. Ind. Caseta Blanca - 12194
Vall d'Alba - Castellón (+34) 964.28.01.26
codiagro@codiagro.com

visitanos en :

WWW.FUNDACIONCODIAGRO.ES

CONCLUSIONES

Los estudios previos que nuestro equipo de investigación realizó sobre la detección de resistencia a insecticidas en la zona frutícola de Lleida revelaron que la elevada presión de selección de productos químicos aplicados en campo indujo la aparición de resistencia por vía metabólica (MFO, GST y EST), haciendo que la efectividad de los insecticidas usados disminuyera.

Del trabajo actual podemos concluir, que la resistencia a insecticidas en campo puede ser detectada tempranamente, con el método que empleamos y esta ventaja debe aprovecharse para modificar las estrategias de control de *C. pomonella* en esta zona, en favor de disminuir los individuos de fenotipos resistentes presentes en las poblaciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

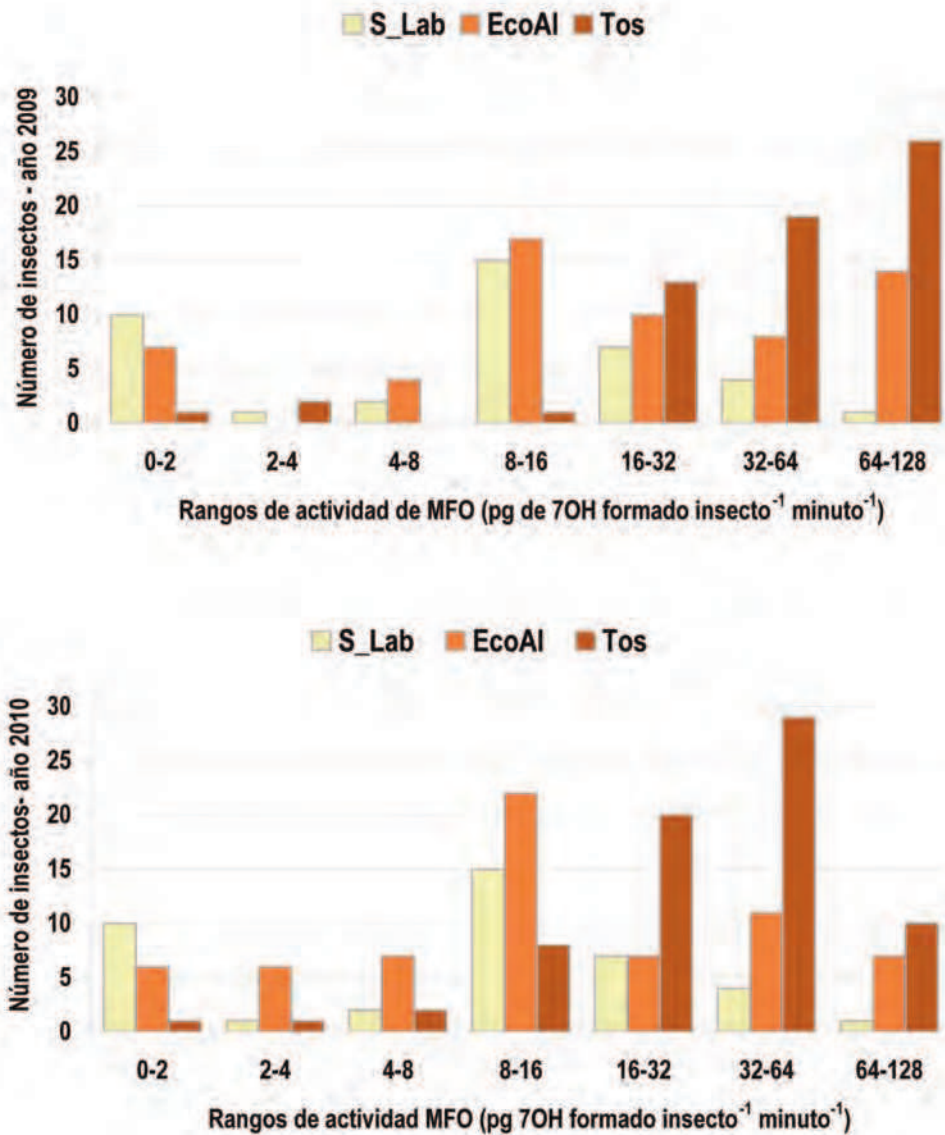
Los autores agradecemos a los técnicos de las Agrupaciones de Defensa Vegetal de Las Tierras de Lleida su colaboración en la identificación de parcelas, en la recolección de poblaciones de carpocapsa y su interés por nuestro trabajo. Éste ha sido parcialmente financiado por los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2004-05812/AGR y AGL2007-62366/AGR.

BIBLIOGRAFÍA

Avilla J., X. Miernau, M. A. Rodríguez, D. Bosch, M. Artigues y M. J. Sarasúa. 2005. Resistencia de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) y de *Cacopsylla pyri* (L.) (Homoptera: Psyllidae) a insecticidas. *PHYTOMA* (173): 79 - 84.

Bosch, D; M. A. Rodríguez y J. Avilla. 2007. A new bioassay to test insecticide resistance of *Cydia pomonella* (L.) first instar larvae: results from some field populations of Lleida (Spain). *IOBC/wprs Bulletin* Vol. 30(4): 195-199.

FIGURA 4 / Comparación de actividad enzimática de MFO de los adultos de *C. pomonella* procedentes de una población susceptible (S_Lab), una de producción ecológica (EcoAl) y una de producción convencional + feromona (Tos). Superior: 2009; Inferior: 2010.



Crow, J. F. 1957. Genetic of insect resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.* 2: 227-246.

Hruska, A., H. Venegas y C. Perez. 1997. La resistencia de plagas agrícolas a insecticidas en Nicaragua: causas, situación actual y manejo. Publicación DPV N° 657. 21 p.

Lagunes, A. y J. Villanueva. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de postgraduados en Ciencias Agrícolas. Monotecillo. Texcoco. México. 264 p.

Rodríguez, M. A., D. Bosch, B. Sauphanor, y J. Avilla. 2010. Sus-

ceptibility to organophosphate insecticide and activity of detoxifying enzymes in Spanish population of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 103 (2): 482-491.

Rodríguez, M. A., D. Bosch, y J. Avilla. 2011a. Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) Pesticide Biochemistry and Physiology 100: 151-159.

Rodríguez, M. A., D. Bosch, y J. Avilla. 2011b. Resistance of Spanish codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae)

populations to insecticides and activity of detoxifying enzymatic systems. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 138: 184-192.

Silva, G., J. C. Rodríguez, y D. Pizarro. 2003. Evaluación de insecticidas en laboratorio, pp 15 - 173. In Bases para el manejo racional de insecticidas. Silva, G., y R. Hepp [Eds]. 310 p.

Whitten, J. y J. A. McKenzie. 1982. The genetic basis of pesticide resistance. Proc. 3rd Australian Conf. Grassl. Invert. Ecol., Adelaide (K. E. Lee, Ed) p 1-17