

DEBEN PRIORIZARSE LAS ESTRATEGIAS DE MANEJO DE LA RESISTENCIA DE CARPOCAPSA A INSECTICIDAS

Situación actual de la resistencia de carpocapsa a insecticidas en el cultivo de manzano en Lleida

Desde 2004 hemos estudiado la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de carpocapsa, *Cydia pomonella* (L.) procedentes de fincas de manzano de Lleida con problemas de control. Por medio de la medición del incremen-

to de la actividad de enzimas y del aumento de la toxicidad con diferentes insecticidas, comparados con una población susceptible de laboratorio, hemos estimado el alcance del problema de resistencia de esta plaga en campo.

M. A. Rodríguez, D. Bosch y J. Avilla.

Centro UdL-IRTA de R+D de Lleida. Universidad de Lleida.

Nuestros resultados muestran que en todos los casos existe una relación entre los fallos de control y el aumento en la frecuencia de individuos resistentes en campo. Aunque esto no es un fenómeno generalizado en la zona, las estrategias de manejo de la resistencia a insecticidas en carpocapsa deben priorizarse con la finalidad de mantener bajas la frecuencia de individuos resistentes.

Cydia pomonella (L.), carpocapsa o agusanado de la manzana (**foto 1**) es una

de las plagas más importantes de manzanas, peras y nueces en prácticamente todas las zonas de producción de estos cultivos en el mundo. La resistencia a insecticidas en carpocapsa está ampliamente documentada para varios insecticidas de diferentes modos de acción en países como Francia, Italia y EE.UU.

Los mecanismos de resistencia a insecticidas en esta plaga se deben, principalmente, a un aumento de la actividad de tres familias de enzimas digestivas: Multifunción Oxidasas (MFO), Glutacion S-transferasas (GST) y Esterasas (EST), que actúan degradando las moléculas insecticidas antes de que éstas ejerzan su efecto tóxico sobre el

insecto. La comparación de la actividad enzimática entre una población de campo y una población susceptible, mantenida en laboratorio sin exposición a insecticidas, permite la estimación del porcentaje de individuos resistentes (RMFO, RGST y REST) por población y complejo enzimático. Esta información, sumada a la obtenida por medio de bioensayos de efectividad de distintos tipos de insecticida sobre distintos estados de desarrollo de *C. pomonella*, permite tener una idea del estado de la resistencia en poblaciones de campo y adoptar medidas de control que impidan que la frecuencia de individuos resistentes en campo aumente.

Con el objetivo de estudiar las causas de los fallos de control de carpocapsa, en la zona de producción de manzano de Lleida, nuestro grupo se planteó dos preguntas: ¿están los problemas de control de carpocapsa relacionados con el fenómeno de resistencia a insecticidas? Y si es así, ¿cuáles son los mecanismos bioquímicos del insecto que la producen?

Insectos estudiados

Para el desarrollo de los experimentos, utilizamos poblaciones de campo procedentes del área de producción frutícola de la provincia de Lleida y una población susceptible de laboratorio como referencia.

Las poblaciones de campo de carpocapsa utilizadas en este estudio fueron obtenidas de fincas comerciales con tratamiento químico convencional a excepción





Foto 1. Adultos de *C. pomonella*.

de Gimenez, que corresponde a una finca de la Estación Experimental de Lleida (IRTA), sometida al programa de control integrado de plagas, con bajo nivel de tratamientos fitosanitarios, y la finca Boldú, de producción ecológica. En todos los casos las poblaciones de campo muestreadas procedían de fincas con problemas de control de carpocapsa.

La población susceptible de laboratorio S_Lab fue obtenida de una finca abandonada de la zona frutícola de Lleida en 1992. Desde entonces ha sido mantenida con dieta semi-artificial y sin exposición a insecticidas en el laboratorio del Centro UdL-IRTA de R+D de Lleida.

Su mortalidad frente a insecticidas de diferentes grupos y modos de acción presenta valores entre el 90% y el 100%. Además, los estudios de los niveles de actividad de MFO, GST y EST muestran que sólo un 10% de los individuos de S_Lab son res-

CUADRO I.

Características y concentración diagnóstica (CL₉₀ S_Lab) aplicada sobre distintos estados de desarrollo de *C. pomonella* procedentes de poblaciones de campo y una población susceptible de laboratorio.

Insecticida (abreviaciones)	CL ₉₀ S_Lab (mg i.a. l ⁻¹)	Grupo químico (Según IRAC, 2010)	Formulación y contenido de ingrediente activo (%)	Solvente
Adultos				
Carbaryl	3.000	Carbamato	Producto técnico 95%	Acetona
Metil-azinfos	2.000	Organofosforado	Producto técnico 93%	Acetona
Larvas de primer estadio (L1)				
Alfa-cipermetrin (A-cip)	2,5	Piretroide	Producto comercial, 10%	Agua
Metil-azinfos (M-azin)	450	Organofosfato	Producto comercial, 20%	Agua
Etil-clorpirifos (E-clr)	315	Organofosfato	Producto comercial, 10%	Agua
Flufenoxzuron (Fluf)	25	Benzoilurea	Producto comercial, 10%	Agua
Lambda-cialotrin (L-cial)	1,6	Piretroide	Producto comercial, 10%	Agua
Tiacloprid (Tia)	875	Neonicotinoide	Producto comercial, 48%	Agua
Larvas post-diapausantes (LPD)				
Metil-azinfos (M-azin)	400	Organofosfato	Producto técnico 93%	Acetona
Etil-clorpirifos (E-clr)	1.200	Organofosfato	Producto técnico 97%	Acetona
Metil-clorpirifos (M-clr)	1200	Organofosfato	Producto técnico 97,3%	Acetona
Diflubenzuron (Dif)	10.000	Benzoilurea	Producto técnico 90%	Tetrahidrofurano
Fenoxycarb (Fen)	1	Fenoxycarb	Producto técnico 98,5%	Acetona
Fosalone (Fos)	3.000	Organofosfato	Producto técnico 90%	Acetona
Tebufenozida (Teb)	300	Benzilhidracina	Producto técnico 97%	Acetona
Tiacloprid (Tia)	500	Neonicotinoide	Producto técnico 99,7%	Acetona

sistentes. Esta población por tanto, cumple con todos los requisitos para ser población de referencia.

Frecuencia de individuos resistentes

La determinación de la actividad enzimática, se realizó por medio de un método que permite cuantificar por colorimetría (cambios en la intensidad del color) el incremento de actividad enzimática (incremento de la capacidad de un individuo pa-

ra degradar una sustancia externa, en nuestro caso insecticidas). Para determinar la frecuencia de individuos resistentes en las poblaciones de campo y referencia se evaluó la actividad de las enzimas Multifunción oxidasas (MFO), Glutathion S-transferasas (GST) y Esterasas (EST). Las mediciones MFO se realizaron por fluorescencia, la actividad de EST se determinó por absorbancia, mientras que la actividad de GST se midió por absorbancia en los estadios larvales y por fluorescencia en adultos. En todos los casos se utilizó el lector de microplacas



SOLUCIONES INTEGRALES EN TRACTORES Y MAQUINARIA AGRÍCOLA, CON EL MEJOR SERVICIO.



RECAMBIOS ADAPTABLES A MASSEY-FERGUSON, EBRO-KUBOTA, LANDINI, NEW HOLLAND, SAME, JOHN DEERE, ETC.

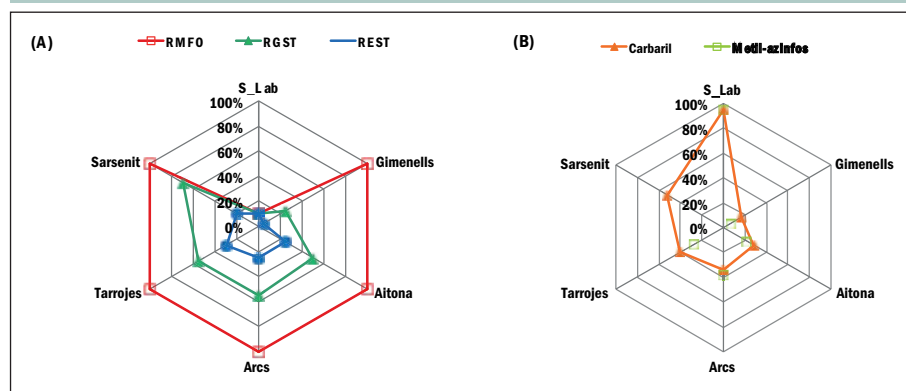
Pol. Ind. Agustinos Calle A, Nave D-13. 31013 Pamplona Navarra España. T 902 312 318 T 948 312 318 F 948 312 341 agrinava@agrinava.com



Foto 2. Bioensayos de efectividad insecticida en *Cydia pomonella*: a) adultos, b) larvas post-diapausantes y c) larvas de primer estadio.

FIGURA 1.

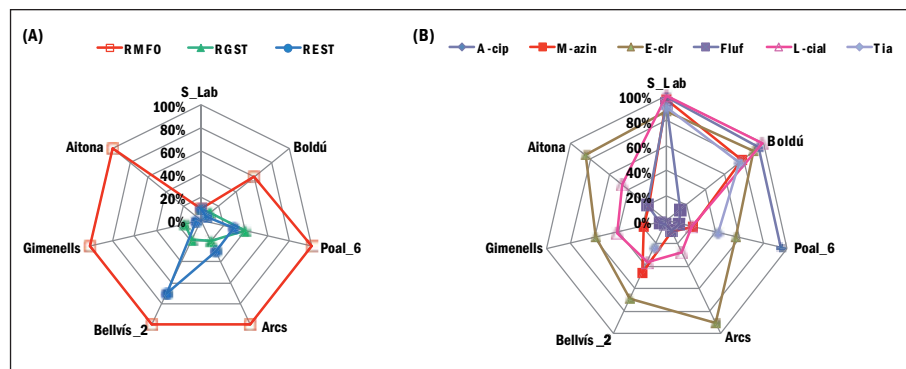
Ensayos en adultos de *Cydia pomonella*.



A) Frecuencia individuos resistentes, (B) Mortalidad por tratamiento con insecticida de poblaciones de campo comparado con la población susceptible S_Lab.

FIGURA 2.

Ensayos en larvas de primer estadio (L1) de *Cydia pomonella*.



A) Frecuencia individuos resistentes, (B) Mortalidad por tratamiento con insecticida de poblaciones de campo comparado con la población susceptible S_Lab.

Multilabel Counter Victor³, PerkinElmer, del Laboratorio de Entomología Agrícola del Centro UdL-IRTA de R+D.

Bioensayos de efectividad insecticida

Los productos utilizados, grupo químico y las concentraciones aplicadas sobre los distintos estados (adulto y larval) y estadios (larvas de primer estadio y larvas post-diapausantes) de carpocapsa se muestran en el **cuadro I**. La concentración diagnóstico de cada insecticida y estado de desarrollo fue la concentración letal 90 (CL₉₀, la concentración que mata al 90% de los individuos) de la población sensible (S_Lab). En adultos y larvas post-diapausantes (LPD) el bioensayo se realizó por la aplicación de 1 µl de la concentración diagnóstico de productos técnicos insecticidas sobre el insecto (**cuadro I**). En adultos (**foto 2a**) la mortalidad se registró pasados cuatro días después de la aplicación. Para larvas post-diapausantes (**foto 2b**), la mortalidad se registró después de la emergencia de los adultos en los controles.

En larvas primer estadio (L1) (**foto 2c**) el bioensayo se realizó por tratamiento superficial de porciones de dieta artificial de 4 cm² tratadas con 2 µl/cm² de la concentración diagnóstico sobre la cual se depositaba a la larva en condiciones que favorecían la ingestión de dieta (**cuadro I**). La mortalidad se registró pasados cuatro días de contacto de las L1 con la dieta tratada.

Para todos los bioensayos se utilizaron controles sin presencia de insecticida (insectos tratados o expuestos sólo al disolvente (**cuadro 1**) según el caso).

Ensayos en adultos

En la **figura 1** se contrastan los resultados del porcentaje de individuos resistentes (RMFO, RGST y REST) (**figura 1a**) con el porcentaje de mortalidad causada por carbaryl (carbamato) y metil-azinfos (organofosforado) (**figura 1b**) en adultos de cinco poblaciones de campo y una población susceptible S_Lab. Nuestros resultados muestran que las poblaciones de campo presentan un 100% de adultos RMFO, seguidos por adultos RGST, comparadas con la población susceptible S_Lab. Por el contrario, en las poblaciones de campo se observó un bajo porcentaje de adultos REST similar al encontrado en la población susceptible S_Lab, lo que quiere decir que las enzimas EST no estarían implicadas en la degradación de insecticidas en los adultos de carpocapsa. Los dos insecticidas resultaron muy poco efectivos cuando fueron probados sobre los adultos de las poblaciones de campo (**figura 1b**) comparados con S_Lab.

Los adultos procedentes de la finca experimental Gimennells, con historial de pocos tratamientos con insecticida, no se diferenciaron de los recolectados de las fincas comerciales. No obstante, la finca Gimennells está rodeada por fincas comerciales expues-

Los problemas de control de carpocapsa en las poblaciones de campo estudiadas se deben a la presencia de individuos resistentes

tas a tratamiento químico convencional, por lo que la migración de adultos de carpocapsa entre éstas, podría ser la explicación de los resultados de baja susceptibilidad encontrados. Aunque metil-azinfos y carbaryl actualmente no están autorizados en el cultivo, ambos han sido citados en la literatura especializada como responsables de la selección de resistencia a insecticidas en carpocapsa, por lo cual, la respuesta de poblaciones de campo al tratamiento es importante. La falta de efectividad de los dos insecticidas en campo es posiblemente resultado del intensivo historial de aplicaciones de metil-azinfos contra carpocapsa, y de carbaryl para aclareo químico en la zona de Lleida y está relacionada con el aumento de individuos resistentes (RMFO y RGST) encontrado.

Ensayos en larvas de primer estadio

En larvas de primer estadio (L1) de carpocapsa (**figura 2**) se observa la misma tendencia que en adultos. En L1 se encontró un elevado porcentaje de individuos RMFO en

todas las poblaciones de campo estudiadas. En cambio, solo las L1 recolectadas en la población Poal_6 presentaron mayor porcentaje de individuos RGST y las L1 recolectadas en Bellvís_2, mayor porcentaje de REST cuando fueron comparadas con la población S_Lab (**figura 2a**).

Las L1 son el blanco principal de los tratamientos insecticidas dado que se pretenden controlar antes de que éstas dañen el fruto. Los seis larvicidas que probamos con las L1 son de cuatro diferentes grupos insecticidas (organofosforados, piretroides, benzoinureas y neonicotinoides). Cuando las L1 fueron expuestas a dieta tratada con insecticida la susceptibilidad varió según el producto y la población de campo analizada (**figura 2b**).

Al igual que en el caso de los adultos, la finca experimental Gimennells se comportó como una finca comercial. El producto que resultó más efectivo en las poblaciones de campo procedentes de fincas comerciales con tratamiento químico convencional fue etil-clorpirifos, con los cinco insecticidas restantes se obtuvieron valores bajos de mortalidad respecto de la población susceptible de laboratorio S_Lab.

Por el contrario, la finca ecológica de Boldú, resultó ser tan susceptible como la población de referencia S_Lab. La finca ecológica de Boldú está alejada de fincas de producción convencional, por lo que la migración entre poblaciones de carpocapsa es menor. La baja presión de selección con insecticidas

EQUIPOS DE FERTIRRIGACIÓN



ELECTROFERTIC

Bomba dosificadora eléctrica de gran capacidad de inyección, alta presión y regulación electrónica

CONTROLADORES

Controladores de Fertirrigación. Regulación de pH y EC. Dosificación proporcional

HIDRÁULICA PROPORCIONAL

Bombas dosificadoras volumétricas proporcionales

FERTIC

inyector hidráulico para la incorporación de abonos líquidos o solubles en la red de riego

AGITADOR DE TURBINA

Agitación por turbina direccional

MULTIFERTIC

Bomba dosificadora eléctrica modular de inyección independiente



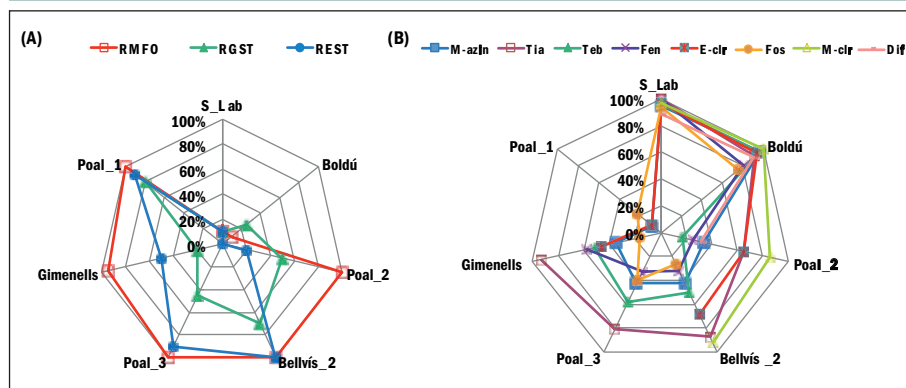
Mar Adriàtic, 4
Pol. Ind. Torre del Rector
P.O. Box 60
Tel (+34) 93 544 30 40
Fax (+34) 93 544 31 61

Fresno, CA 93729
7991 USA
P.O. Box 27991

Tel 1 800 555 8013
Fax 1 559 261 4026

itc@itc.es
www.itc.es

FIGURA 3.

Ensayos en larvas post-diapausantes (LPD) de *Cydia pomonella*.

A) Frecuencia individuos resistentes, (B) Mortalidad por tratamiento con insecticida de poblaciones de campo comparado con la población susceptible S_Lab.

Con estrategias de control de la resistencia como el uso combinado de confusión sexual, granulovirus e insecticidas, se puede controlar a carpocapsa manteniendo la frecuencia de individuos resistentes en niveles aceptables

en esta finca ecológica y su aislamiento hacen que la frecuencia de individuos resistentes disminuya en el tiempo. En resumen, de este experimento podemos concluir que la baja susceptibilidad encontrada en las L1 procedentes de campo, se debe principalmente, a la acción de degradación de las enzimas MFO, ya que en las L1 procedentes de fincas comerciales y de Gimenells, existe un elevado porcentaje de individuos RMFO.

Ensayos en larvas post-diapausantes

En larvas post-diapausantes (LPD), utilizamos seis poblaciones de campo y ocho productos insecticidas. Aunque las LPD no son el blanco de las aplicaciones insecticidas para el control de carpocapsa, el estudio de resistencia a insecticidas en este estadio de desarrollo es actualmente uno de los principales indicadores para la temprana detección de resistencia, debido a que el número de larvas de campo obtenidas en diapausa es siempre mayor y más homogéneo (todas las larvas recogidas están en el mismo estadio de desarrollo) lo que hace posible evaluar más productos insecticidas y tener una imagen más real de lo que puede ocurrir en campo.

Además, el bioensayo de aplicación tópicamente estandarizado, lo que quiere decir que los resultados obtenidos a partir de LPD de carpocapsa en la zona de producción de frutales de Lleida, pueden ser comparados con los mismos en otras poblaciones del mundo. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en LPD muestran que, con la excepción de la finca ecológica de Boldú, todas las poblaciones restantes, incluida la finca experimental Gimenells, presentan un elevado porcentaje de individuos resistentes, tanto RMFO, como RGS y REST (figura 3a).

Los bioensayos de aplicación de insecticidas variaron según el producto aplicado y la población analizada (figura 3b). Los productos más eficaces resultaron ser los organofosforados metil-clorpirifos y etil-clorpirifos, y en algunos casos el neonicotinoide tiacloprid, sin embargo, la mayoría de los productos mostraron poca eficacia. Al igual que en los casos anteriores, la falta de efectividad insecticida está asociada a un incremento en el porcentaje de individuos resistentes, que degradan las moléculas insecticidas, en muchos casos, por las tres vías enzimáticas estudiadas.

Consideraciones finales

De nuestros resultados se desprenden las respuestas a nuestras dos preguntas, que son:

- 1) Sí, los problemas de control de carpocapsa en las poblaciones de campo estudiadas se deben a la presencia de individuos resistentes.
- 2) Los mecanismos bioquímicos implicados en la degradación de los insecticidas y por tanto en la resistencia a insecticidas en carpocapsa son, en primer lugar, las enzimas del complejo MFO, seguidas por las GST y en los estadios larvales también participan las EST.

Por otra parte, nuestros resultados muestran otras implicaciones que están directamente relacionadas con las estrategias de control de *C. pomonella*, debido a los posibles casos de resistencia cruzada (protección del insecto contra varios insecticidas debido a la expresión de un solo mecanismo de resistencia). El que por medio del mismo mecanismo bioquímico de resistencia los individuos resistentes de carpocapsa puedan degradar varios insecticidas, hace que la rotación de insecticidas como herramienta de prevención de resistencia tenga que ser más estudiada. Considerando los antecedentes de mecanismos de resistencia existentes, y los modos de acción de los insecticidas con baja susceptibilidad en campo, se puede lograr la disminución de aplicaciones y que los insecticidas aplicados (ya sea los que están en uso, o las nuevas moléculas insecticidas que aparezcan en el mercado) sean más efectivos y tengan una vida útil más larga.

El problema de la resistencia no está generalizado en la zona, sin embargo, cuando hay problemas de control, son individuos resistentes los causantes. Con estrategias de control de la resistencia como el uso combinado de confusión sexual, granulovirus e insecticidas, se puede controlar a carpocapsa manteniendo la frecuencia de individuos resistentes en niveles aceptables. ●

Agradecimientos

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