

## Resistencia a insecticidas en *Myzus persicae*: estado actual y mecanismos implicados

A. Belando, I. Moreno, P. Bielza

Departamento de producción vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203, España. ana.belando@upct.es

### RESUMEN

*Myzus persicae* es una plaga que afecta a una amplia gama de cultivos herbáceos, hortícolas y frutales, tanto por sus daños directos como por la capacidad de transmitir más de 100 virus. Su control se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbonatos y piretroides. En el sur de Francia sobre el año 2009 se descubrió sobre melocotoneros un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides que compromete la eficacia en campo de este grupo de insecticidas. Dadas las graves consecuencias de esta mutación para un control efectivo de las poblaciones de esta plaga, se realizó un seguimiento de su expansión geográfica. La mutación se ha ido extendiendo, y hasta la fecha se ha encontrado en Italia, Francia y España. Por todo ello es imprescindible conocer bien el estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de *M. persicae* en los diferentes cultivos en los que causa daños importantes, así como los mecanismos de resistencia implicados, con el fin de diseñar estrategias adecuadas de tratamientos para un uso sostenible de los fitosanitarios. Por tanto se pretende con esta tesis estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, y los insecticidas flonicamid, espirotetramat, pimetrocina y azadiractina.

**Palabras clave:** Flonicamid; spiroetramat; pimetrocina.

### 1. Introducción

El pulgón del melocotonero, *Myzus persicae*, es una plaga de importancia mundial de una amplia gama de cultivos herbáceos, hortícolas y frutales, por sus daños directos y por su capacidad de transmitir más de 100 virus de las plantas [1]. Excepto en cultivos hortícolas en invernaderos, su control se basa casi exclusivamente en la aplicación de insecticidas y, como resultado, esta especie ha desarrollado resistencia múltiple a muchas clases químicas, incluyendo organofosforados, carbamatos y piretroides [2]. Los mecanismos moleculares de la resistencia a los insecticidas en *M. persicae* incluyen la sobreproducción de carboxilesterasas de desintoxicación (E4 o FE4) que confiere resistencia principalmente a organofosforados, y dos formas de resistencia en el punto de acción [2]. Una de ellas es una mutación de la proteína de la acetilcolinesterasa (acetilcolinesterasa modificada, *MACE* por sus siglas en inglés) dando insensibilidad a los dimetil-carbamatos (ej.

pirimicarb) [2]. La otra es una mutación del canal de sodio dependiente de voltaje (resistencia *knockdown*, *kdr*) dando resistencia a los piretroides [2]. Los neonicotinoides tales como imidacloprid, tiametoxam, clotianidina y acetamiprid no se ven afectados por estos mecanismos, y son actualmente el principal medio de control. A pesar de dos décadas de constante aumento del uso, los neonicotinoides han demostrado ser notablemente resistentes al desarrollo de la resistencia y se han mantenido muy eficaces contra *M. persicae*. Se han encontrado poblaciones de *M. persicae* con susceptibilidad reducida a compuestos neonicotinoides (10-40 veces la resistencia) en Europa, los EE.UU. y Japón [3-5]. Sin embargo, en la actualidad los niveles de resistencia descritos tienen un significado práctico limitado, ya que son insuficientes para poner en peligro la eficacia en campo de estos insecticidas [3,5].

Recientemente, se han utilizado enfoques bioquímicos y genómicos para investigar la

resistencia a los neonicotinoides en un clon de *M. persicae* de Grecia mostrando un factor de resistencia a los neonicotinoides de ~40 [6,7]. La resistencia se asocia con múltiples duplicaciones de un solo gen P450 (CYP6CY3), con pulgones resistentes que llevan ~18 copias del gen en comparación con las dos copias se encuentran en los pulgones susceptibles. Sin embargo, los estudios de unión a ligando y de secuenciación no aportaron pruebas de que la modificación estructural del receptor de nicotínico de la acetilcolina (nAChR; el punto de acción de los neonicotinoides) contribuyera a la resistencia en este clon. Aunque los pulgones han seguido siendo efectivamente controlados por los neonicotinoides, la resistencia es un problema significativo en otras especies de insectos plaga, incluyendo *Leptinotarsa decemlineata*, *Nilaparvata lugens* y *Bemisia tabaci* [5]. Como el encontrado en *M. persicae*, la sobreexpresión de uno o más P450s parece ser el principal mecanismo de resistencia a neonicotinoides en plagas de insectos [5,8]. El único mecanismo alternativo descrito hasta la fecha, ha sido una modificación del punto de acción (nAChR) en una población seleccionada en laboratorio *N. lugens*, en el que la resistencia se asoció con una mutación puntual en dos subunidades alfa de nAChR (N1 $\alpha$ 1 y N1 $\alpha$ 3) [9]. Sin embargo, la resistencia en poblaciones de campo de *N. lugens* parece ocurrir exclusivamente a través de la desintoxicación mediada por P450 [10,11] y, hasta recientemente, ningún caso de insensibilidad en el punto de acción de los neonicotinoides se ha descrito en individuos de cualquier plaga de insectos recogidos directamente en el campo.

En 2009, se descubrió sobre melocotoneros en el sur de Francia un clon de *M. persicae* con resistencia extremadamente potente a los neonicotinoides que compromete la eficacia en campo de los miembros de esta clase de insecticidas [12]. La resistencia es conferida tanto por la desintoxicación mediada por P450s y por la insensibilidad del punto de acción de los neonicotinoides. Este es el primer ejemplo de la resistencia a los neonicotinoides en el punto de acción encontrada en poblaciones de campo. La comparación de la secuencia de nucleótidos de seis genes de subunidades del nAChR (M $\alpha$ 1-5 y M $\beta$ 1) de clones de pulgones resistentes y susceptibles, reveló un único punto de mutación en la región D del bucle de la subunidad  $\beta$ 1 del nAChR del clon resistente, causando una sustitución de arginina a treonina (R81T) [12].

Dadas las graves consecuencias de esta mutación para un control efectivo de las poblaciones de esta plaga, se realizó un seguimiento de su expansión geográfica. La mutación se ha ido extendiendo, y hasta la fecha se ha encontrado en Italia, Francia y España [13]. Dentro de España, se ha encontrado en plantaciones de frutales de hueso de Cataluña, Aragón, Murcia y Extremadura.

La gravedad de la situación ha motivado que se haya desarrollado una estrategia de manejo de la resistencia en pulgones de los frutales de hueso, limitando el uso de neonicotinoides a una sola aplicación por campaña, y así reducir al máximo la presión de selección sobre esta nueva mutación y, por tanto, impedir su diseminación.

Además, la limitación del uso de neonicotinoides ha llevado a un mayor uso, y a veces sobreuso y abuso, de otros insecticidas como el flonicamid, espirotetramat, pimetrocina y azadiractin. Debido a este sobreuso ya se han observado algunos casos de fallos de control en campo con alguno de estos productos.

Por otra parte, existe una profunda preocupación de que esta mutación que confiere resistencia extrema a los neonicotinoides se pase a las poblaciones de hortícolas, lo que agravaría enormemente el problema.

En España no se ha realizado nunca un estudio del estado de la resistencia a insecticidas en una plaga agrícola tan importante como *M. persicae*. Obviamente tampoco se conoce la prevalencia en las poblaciones españolas de los mecanismos de resistencia conocidos (a carbamatos, fosforados y piretroides) ni de los nuevos (a neonicotinoides), ni si pudieran presentarse algunos nuevos.

Para diseñar una estrategia eficaz de manejo de la resistencia, como demanda la Directiva Europea de Uso Sostenible de Fitosanitarios, es necesario conocer bien qué insecticidas se pueden rotar al no tener resistencia cruzadas, es decir, al no estar afectados por el mismo mecanismo de resistencia. Por tanto, no basta rotar insecticidas con distinto modo de acción (pertenecientes a distintos grupos químicos), ya que los mecanismos metabólicos de detoxificación pueden afectar a compuestos de distintas familias químicas, con distintos modos de acción [14]. Consecuentemente, es necesario conocer los mecanismos implicados en la resistencia a cada insecticida, para a partir de esa base científica, diseñar estrategias de control efectivas y sostenibles en el tiempo.

Por todo ello es imprescindible conocer bien el estado de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de *M. persicae* en los diferentes cultivos en los que causa daños importantes, así como los mecanismos de resistencia implicados, con el fin de diseñar estrategias adecuadas de tratamientos para un uso sostenible de los fitosanitarios. Por tanto en este trabajo de tesis se pretende estudiar el desarrollo potencial de la resistencia a los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, y los insecticidas flonicamid, espirotetramat, pimetrocina y azadiractina, en poblaciones de *M. persicae* de cultivos frutales y hortícolas de la Región de Murcia y otras regiones españolas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Poblaciones

Se recogerán 10-15 poblaciones de *M. persicae* de cultivos frutales de las principales zonas productoras (Lérida, Zaragoza y Murcia), abarcando diferentes escenarios de presión insecticida. Las poblaciones se criarán sobre plantas de pimiento en jaulas.

### 2.2 Insecticidas

Se utilizarán flonicamid, spirotetramat, imidacloprid, tiametoxam, pimetrozina y azadiractina.

### 2.3 Bioensayos

Para los ensayos completos se utilizan 4-5 concentraciones y un control para cada insecticida y población, tres repeticiones por concentración, y 30 individuos por repetición. Las dosis para cada insecticida se tomarán para un rango de 0 – 100 % de mortalidad.

En hojas de pimiento se realizaran discos (37 mm diámetro) que serán sumergidos durante 10 segundos en la solución acuosa del insecticida a ensayar. Los discos son secados al aire y puestos sobre agar (2%) con el envés hacia arriba en la base de cajas de polipropileno (Fig.1). Las cajas son tapadas con su tapa, en la que se han efectuado agujeros de ventilación y otro mayor para introducir los pulgones. Las placas son mantenidas a 25 °C y fotoperíodo de 16:8 h (luz:oscuridad). La mortalidad se estimará a las 24, 48 y 72 horas para ajustar el mejor periodo para cada insecticida. Se realizarán los bioensayos con ninfas de 3-4 días (spirotetramat) y adultos ápteros (resto insecticidas).

### 2.4 Bioensayos de sinergistas

Este tipo de bioensayos se realizan para poder determinar que posibles mecanismos están implicados en la resistencia a insecticidas. Se basan en añadir un producto que por sí sólo no tiene efecto plaguicida, pero sin embargo cuando se le añade a los insecticidas, éstos incrementan su actividad. Los sinergistas utilizados en este estudio serán el butóxido de piperonilo (PBO) y el S,S,S tributil fosforotritioato (DEF). El PBO es un inhibidor del citocromo P450 y el DEF inhibe las esterasas.

La metodología de estos bioensayos es similar a los descritos anteriormente. Se diferencian en que dos horas antes de ser tratadas las hojas con el insecticida se realiza un tratamiento con el sinergista. Todas las hojas son tratadas con una única dosis subletal y se deja un control para asegurarnos que realmente el sinergista por sí sólo no tiene efecto sobre *M. persicae*. El resto del bioensayo sigue los pasos de un bioensayo normal.

## 3. Resultados

Se espera obtener una estimación del estado de la resistencia a los principales insecticidas utilizados para el control de *M. persicae*. Esto junto con la información suministrada por los mecanismos de resistencia implicados, nos ayudará a entender las resistencias cruzadas y, por tanto, diseñar estrategias eficaces de manejo de la resistencia.

## 4. Agradecimientos

Este trabajo está siendo financiado por IRAC España.

## 5. Referencias bibliográficas

- [1] Blackman RL, Eastop VF: Aphids on the world's crops, an identification and information guide. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd; 2000.
- [2]. Devonshire AL, Field LM, Foster SP, Moores GD, Williamson MS, Blackman RL: The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1998, 353:1677-1684.
- [3]. Foster SP, Cox D, Oliphant L, Mitchinson S, Denholm I: Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-

potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag Sci* 2008, 64:1111-1114

[4]. Margaritopoulos JT, Skouras PJ, Nikolaidou P, Manolikaki J, Maritsa K, Tsamandani K, Kanavaki OM, Bacandritsos N, Zarpas KD, Tsitsipis JA: Insecticide resistance status of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from peach and tobacco in mainland Greece. *Pest Manag Sci* 2007, 63:821-829.

[5]. Nauen R, Denholm I: Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol* 2005, 58:200-215.

6. Philippou D, Field LM, Moores GD: Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece. *Pest Manag Sci* 2009, 66:390-395.

[7]. Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C: Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet* 2010, 6:e1000999.

[8]. Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S: Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 2008, 38:634-644.

[9]. Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS: A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:8420-8425.

[10]. Puinean AM, Denholm I, Millar NS, Nauen R, Williamson MS: Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Biochem Physiol* 2010, 97:129-132.

[11]. Wen Y, Liu Z, Bao H, Han Z: Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål in China. *Pest Biochem Physiol* 2009, 94:36-42.

[12] Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., ... & Slater, R. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to

neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC neuroscience*, 12(1), 51.

[13] Slater, R., Paul, V. L., Andrews, M., Garbay, M., & Camblin, P. (2012). Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest management science*, 68(4), 634-638.

[14] Bielza, P. (2008). Insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest management science*, 64(11), 1131-1138.



Figura 1. Bioensayo