

Adulto de *Ceratitís capitata*.

Estudio de la herencia y mapeo de la resistencia de *Ceratitís capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) al insecticida λ -cihalotrina

**A. Guillem-Amat,
M. González-Guzmán,
E. López-Errasquín,
P. Castañera,
P. Hernández-Crespo
y F. Ortego**

Laboratorio de interacción Planta-Insecto. Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. España.

L. Sánchez

Dinámica cromosómica en meiosis. Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid. España.

La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitís capitata* (Wiedemann, 1824), es una de las principales plagas de cítricos y otros frutales en España. Las actuales estrategias de control, basadas mayoritariamente en el uso de insecticidas, están viendo amenazada su eficacia debido a la aparición de resistencia en poblaciones de campo. Recientemente se ha descrito resistencia metabólica a lambda-cihalotrina mediada por P450s. Con el fin de estudiar el tipo de herencia de la resistencia a lambda-cihalotrina, se realizaron cruzamientos recíprocos entre una línea de laboratorio resistente a este insecticida y una línea susceptible, se obtuvieron la generación F1 y la F2 y se realizó el retrocruce de la F1 con el parental susceptible. Los resultados muestran que la herencia de la resistencia es completamente dominante y autosómica, y que no se ajusta a un modelo mendeliano monogénico. Asimismo, se está realizando un mapeo genético de la resistencia a lambda-cihalotrina a partir de los individuos ensayados en el estudio de la herencia, con el propósito de identificar marcadores moleculares que nos permitan la detección precoz y el seguimiento de la resistencia en campo, facilitando así el control de la plaga. Por último, mediante el simulacro en laboratorio de distintos escenarios de tratamiento se ha podido determinar que la rotación de lambda-cihalotrina con spinosad resulta eficaz para el manejo de la resistencia a lambda-cihalotrina.

Palabras clave: *Ceratitís capitata*, resistencia, lambda-cihalotrina, ligamiento, herencia

La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) es una de las plagas más dañinas en cítricos, aunque ataca un extenso abanico de huéspedes que incluye a más de 300 especies de frutas y hortalizas (Liquido y col., 2013). Es la causante de grandes pérdidas económicas que ocurren, de manera directa, por los daños causados en los frutos, y de manera indirecta, por los requisitos fitosanitarios y medidas de cuarentena que imponen algunos países importadores. Esta plaga es especialmente relevante para la producción de cítricos en España, ya que se trata del principal país productor de cítricos en la Unión Europea (entre 5 y 7 millones de toneladas en los últimos diez años) y el principal exportador de cítricos en fresco en el mundo (FAOSTAT, 2018).

El control de las poblaciones de *C. capitata* en cítricos recae principalmente en la utilización de insecticidas formulados con atrayentes alimenticios (tratamientos-cebo). Otras estrategias como la técnica del insecto estéril (SIT, de sus siglas en inglés) y el trampeo masivo se utilizan en algunas áreas, pero su uso se combina con la aplicación de insecticidas. Desde los años 80 hasta su retirada de la Unión Europea en 2009, malatión fue el insecticida más utilizado para el control de esta plaga en el cultivo de cítricos en nuestro país. Desde entonces, lambda-cihalotrina y spinosad han sido los insecticidas más empleados para su control. En los últimos años se ha incrementado el uso de deltametrina mediante la utilización de trampas de atracción y muerte impregnadas con este insecticida. Actualmente, también están registrados etofenprox y fosmet para su control en cítricos (MAPAMA, 2018), pero su uso es muy restringido.

La resistencia a insecticidas constituye un obstáculo para el control sostenible de *C. capitata*

La aparición de resistencia en poblaciones de campo se detectó por primera vez en España frente a malatión en 2004-2005 (Magaña y col., 2007), asociada al uso intensivo que se hacía de este producto, y poste-



Figura 1. Esquema para el manejo de la resistencia de *Ceratitis capitata* a insecticidas.

riormente en 2009-2010 frente a lambda-cihalotrina (Arouri y col., 2015). En ambos casos, la resistencia se encontró en poblaciones de diferentes áreas geográficas, lo que hace pensar que la alta tasa de flujo génico existente entre poblaciones españolas de *C. capitata* (Beroiz y col., 2012) podría haber favorecido la propagación de la resistencia desde áreas con alta presión de selección hasta zonas menos tratadas. Además, se ha visto que la resistencia a malatión y lambda-cihalotrina confieren resistencia cruzada a otros insecticidas organofosforados y piretroides, respectivamente (Couso-Ferrer y col., 2011; Arouri y col., 2015). Hasta la fecha, las poblaciones de campo analizadas siguen siendo altamente susceptibles a la concentración de spinosad aplicada en campo, aunque se ha seleccionado una población altamente resistente a este insecticida en laboratorio (Ureña y col., manuscrito enviado para su publicación).

La aparición de resistencia junto con el reducido número de insecticidas aprobados para el control de *C. capitata* hacen que el repertorio de insecticidas efectivos contra esta plaga sea muy limitado. En este contexto, la elucidación de los mecanismos de resistencia y el desarrollo de herramientas de diagnóstico útiles para un monitoreo rápido y precoz, permitirían implementar estrategias proactivas de manejo de la resistencia (Figura 1) que permitan mantener la efectividad de estos insecticidas (Vontas y col., 2011).

Bases moleculares de la resistencia a insecticidas en *C. capitata* y diagnóstico de alelos de resistencia en poblaciones de campo

Para estudiar los mecanismos moleculares de resistencia hemos seleccionado, a partir de individuos recogidos en poblaciones de campo, líneas de laboratorio resistentes

a malatión (W-4Km), lambda-cihalotrina (W-1Kλ) y spinosad (JW-100s). La resistencia a malatión es semi-dominante y está asociada a (i) la mutación G328A en el gen de la acetilcolinesterasa, (ii) una duplicación de este gen (con una de las copias portando la mutación G328A y la otra copia no mutada), y a (iii) resistencia metabólica mediada por aliesterasas (Magaña y col., 2008, Couso-Ferrer, 2012). La resistencia a lambda-cihalotrina es un proceso metabólico mediado por enzimas de detoxificación citocromo P450 (CYP450), habiéndose determinado la sobreexpresión del gen CYP6A51 en la línea W-1Kλ como una posible causa de la resistencia (Arouri y col., 2015). No obstante, la resistencia a lambda-cihalotrina aún encierra muchos interrogantes sobre otros genes CYP implicados y el modo en que se regula su expresión. La resistencia a spinosad es monogénica recesiva y está vinculada a mutaciones puntuales que originan codones de terminación prematuros en el gen de la subunidad α6 del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR α6) (Ureña y col., manuscrito enviado para su publicación).

El conocimiento de los mecanismos de resistencia es de gran relevancia para el desarrollo de marcadores moleculares de diagnóstico que faciliten el seguimiento de la frecuencia de alelos de resistencia en poblaciones de campo, optimizando de este modo su manejo. Se han desarrollado marcadores de resistencia a malatión (Couso-Ferrer, 2012) que permiten monitorizar la presencia de la mutación G328A y de la duplicación en poblaciones de campo. De este modo hemos podido determinar que los alelos de resistencia estaban ampliamente distribuidos por toda España durante el período 2004-2009 en que malatión fue utilizado (Couso-Ferrer, 2012) y que, aunque su frecuencia se ha reducido considerablemente desde su retirada en 2009, en la actualidad se siguen encontrando en campo individuos portadores de alelos de resistencia (Arouri, 2013; datos no publicados). En este escenario en el que los genotipos de resistencia permanecen en el campo a frecuencias moderadas, la resistencia podría seleccionarse de nuevo rápidamente si malatión

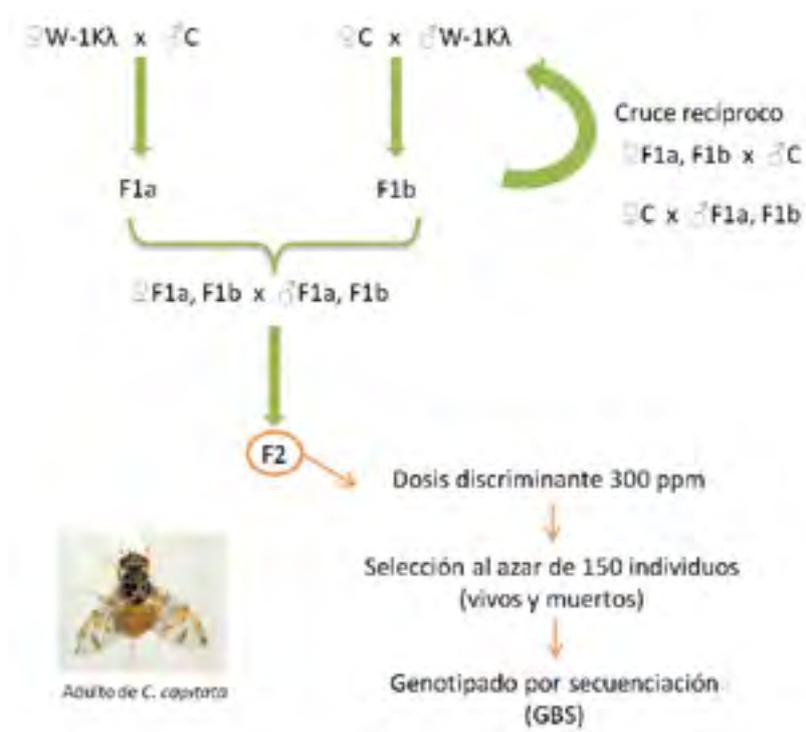


Figura 2. Diseño para el estudio de la herencia y mapeo genético de la resistencia de *Ceratitis capitata* a lambda-cihalotrina, utilizando las líneas W-1Kλ (resistente) y C (susceptible).



Figura 3. Simulación en laboratorio de cuatro estrategias (T1-T4) de manejo de la resistencia de *Ceratitis capitata*.

u otros insecticidas con los que presente resistencia cruzada, como fosmet (Couso-Ferrer y col., 2011), se utilizaran sin una estrategia apropiada de manejo. También se han diseñado marcadores para la detección de las mutaciones asociadas a la resistencia a spinosad y, hasta la fecha, ninguna de ellas ha sido hallada en las poblaciones de campo analizadas (Ureña y col., manuscrito enviado para su publicación).

Detección y manejo de la resistencia a lambda-cihalotrina

En lo que respecta a la resistencia a lambda-cihalotrina, actualmente estamos trabajando en el estudio de su tipo de herencia y en el desarrollo de un marcador eficaz y fiable que permita su seguimiento en poblaciones de campo. Asimismo, mediante simulaciones en laboratorio estamos ensayando distintos escenarios de

tratamientos con este insecticida para determinar cuál resultaría más eficaz para el manejo de la resistencia. El objetivo de estos estudios es generar conocimientos y herramientas que permitan el seguimiento y manejo de la resistencia en campo, facilitando así el control de la plaga.

Herencia de la resistencia

Determinar el grado de dominancia de los alelos de resistencia es importante para predecir el modo en el que evolucionarán las poblaciones de una plaga en presencia o ausencia de presión de selección (Sayyed y col., 2005), lo cual permitirá adoptar estrategias efectivas para el manejo de la resistencia. Para conocer el modo en el que se hereda la resistencia a lambda-cihalotrina se utilizaron como parentales adultos de la línea resistente W-1Kλ y la susceptible de laboratorio C (Figura 2). Se realizaron cruces recíprocos (hembra W-1Kλ x macho C y hembra C x macho W-1Kλ) para obtener las correspondientes generaciones F1a y F1b, y la progenie de ambos cruces se mantuvo sin presión de selección y se cruzaron entre sí para producir la generación F2. La F1, a su vez, se retrocruzó con el parental susceptible (C). Para determinar la susceptibilidad a lambda-cihalotrina se llevaron a cabo bioensayos de ingestión en todas las generaciones utilizando distintas concentraciones de insecticida en la dieta con cuatro réplicas biológicas de 15 individuos por cada concentración, siguiendo la metodología estándar (Arouri y col., 2015). La mortalidad fue evaluada a las 48 horas y los valores obtenidos se analizaron mediante análisis Probit para el cálculo de las concentraciones letales. Los resultados obtenidos indicaron que la resistencia a lambda-cihalotrina presenta un tipo de herencia completamente dominante y autosómica y que no se ajusta a un modelo mendeliano monogénico.

Mapeo genético de la resistencia para la búsqueda de marcadores

En estudios anteriores pudimos asociar la resistencia a lambda-cihalotrina con la sobreexpresión del gen CYP6A51 en la cepa resistente W-1Kλ (Arouri y col., 2015). Sin embargo, recientemente hemos podido determinar



Ceratitís capitata sobre placa de pruebas.

/ La rotación de lambda-cihalotrina con spinosad podría ayudar en gran medida al manejo de la resistencia /

que existe una enorme variabilidad en la expresión de éste y otros genes CYP450, tanto en la cepa resistente como en la susceptible, lo que sugiere que otros de estos genes pudieran estar también implicados. Esta variabilidad nos ha hecho descartar la posibilidad de utilizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) sobre este gen como marcador de la resistencia a lambda-cihalotrina, y por ello hemos emprendido un nuevo camino hacia la obtención de un método de detección más robusto.

Se ha iniciado un mapeo genético de la resistencia a partir de individuos F2 del cruce entre la línea resistente W-1Kλ y la susceptible C (Figura 2). Para ello, estos individuos se sometieron a una dosis discriminante de 300 ppm de lambda-cihalotrina durante 48 horas y, transcurrido este tiempo, se seleccionaron 150 al azar

entre los supervivientes al insecticida y los muertos. Se realizó la extracción de ADN de estos individuos y actualmente está en curso un genotipado por secuenciación (GBS, de sus siglas en inglés) que esperamos nos proporcione marcadores moleculares ligados al fenotipo de resistencia. El GBS se está realizando en el Centro Nacional de Análisis Genómico, CNAG (Barcelona), y el análisis bioinformático de las secuencias se realizará en colaboración con el Dr. Joaquín Cañizares (Universitat Politècnica de València).

Simulación en laboratorio de estrategias de manejo de la resistencia

Con el fin último de optimizar el manejo de la resistencia, se están llevando a cabo simulaciones en laboratorio de los diferentes escenarios que podrían ocurrir en campo. En primer lugar se generó una línea multirresistente a lambda-cihalotrina y a spinosad mediante cruces recíprocos de individuos de las líneas de laboratorio resistentes W-1Kλ y JW-100s, ya que no existe resistencia cruzada entre ellos y son los más utilizados actualmente para el control de *C. capitata*. Una vez obtenida, la línea multirresistente se dividió en cuatro grupos que siguieron distintos tratamientos durante las siguientes 10 generaciones. La línea T1 se sometió en cada generación a 100 ppm de spinosad, T2 alternó tres generaciones consecutivas de 100 ppm de

spinosad con una generación de 125 ppm de lambda-cihalotrina, T3 combinó dos generaciones de 100 ppm de spinosad con dos generaciones de 125 ppm de lambda-cihalotrina, y T4 no recibió ningún tratamiento insecticida (Figura 3). El estudio de la evolución de los niveles de resistencia en las cuatro líneas se realizó mediante bioensayos de ingestión con lambda-cihalotrina cada dos generaciones, utilizando la metodología descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos mostraron cómo la resistencia a lambda-cihalotrina desciende a niveles basales después de tres generaciones sin estar expuesta a ningún insecticida (línea T4) o cuando se trata todas las generaciones con spinosad (línea T1). En cambio, la susceptibilidad

fluctúa cuando lambda-cihalotrina se usa alternándose con spinosad en función del tratamiento recibido en cada ocasión: aumentando tras cada tratamiento de selección con lambda-cihalotrina, y volviendo a bajar al tratar con spinosad (líneas T2 y T3). La dinámica observada es compatible con la herencia de tipo dominante determinada para la resistencia a lambda-cihalotrina, pues en presencia del insecticida los individuos heterocigotos resistentes sobrevivirían y se reproducirían, transmitiendo rápidamente la resistencia a la descendencia, mientras que en ausencia de insecticida los heterocigotos al cruzarse generarían individuos susceptibles. Estos resultados sugieren que la rotación de lambda-cihalotrina con spinosad podría ayudar en gran

medida al manejo de la resistencia a lambda-cihalotrina, ya que reduce la presión de selección a lo largo de las generaciones y con ello disminuye la probabilidad de fijar alelos de resistencia.

Bibliografía

- ! Aroui, R. 2013. Resistance to malathion and lambda-cyhalothrin in *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. pp.141.
- Aroui, R., Le Goff, G., Hemden, H., Navarro-Llopis, V., M'saad, M., Castañera, P., Feyereisen, R., Hernández-Crespo, P. y Ortego, F. 2015. Resistance to lambda-cyhalothrin in Spanish field populations of *Ceratitis capitata* and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. *Pest Manag Sci*, 71: 1281-1291.
- Beroiz, B., Ortego, F., Callejas, C., Hernández-Crespo, P., Castañera, P. y Ochando, M.D. 2012. Genetic structure of Spanish populations of *Ceratitis capitata* revealed by RAPD and ISSR markers: implications for resistance management. *Span J Agric Res*, 10: 815-825.
- Couso-Ferrer, F. 2012. Bases moleculares de la resistencia a insecticidas en la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. pp. 224.
- Couso-Ferrer, F., Aroui, R., Beroiz, B., Perera, N., Cervera, A., Navarro-Llopis, V., Castañera, P., Hernández-Crespo, P. y Ortego, F. 2011. Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol*, 104: 1349-1356.
- FAOSTAT [Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division] 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acceso marzo 2018.
- Liquido, N.J., McQuate, G.T., Suiter y K.A. 2013. MEDHOST: An encyclopedic bibliography of the host plants of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), Version 1.1. United States Department of Agriculture, Center for Plant Health Science and Technology, Raleigh, N.C. http://gcmd.nasa.gov/records/GCMD_USDA0083.html. Acceso en marzo 2018.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. y Castañera, P. 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. *J Econ Entomol*, 100: 1836-1843.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Brun-Barale, A., Couso-Ferrer, F., Bride, J.M., Castañera, P., Feyereisen, R. y Ortego, F. 2008. Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 756-762.
- MAPAMA [Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente] <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/fitos.asp>. Acceso marzo 2018.
- Sayed, A.H., Attique, M.N.R., Khaliq, A. y Wright, D.J. 2005. Inheritance of resistance to deltamethrin in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. *Pest Manag Sci*, 61: 636-642.
- Ureña, E., Guillem-Amat, A., Couso-Ferrer, F., Beroiz, B., Perera, N., López-Errasquín, E., Castañera, P., Ortego, F. y Hernández-Crespo, P. Multiple mutations in the nicotinic acetylcholine receptor Ccα6 gene associated with resistance to spinosad in medfly. Manuscrito enviado para su publicación.
- Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J.T., Ortego, F., Feng, H.T., Mathiopoulos, K.D. y Hsu, J. 2011. Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pestic Biochem Physiol*, 100: 199-205.