PÓSTER TÉCNICO

Frecuencia y distribución de las resistencias a insecticidas organofosforados en las poblaciones mediterráneas de *Bactrocera oleae* (Rossi 1790) (Diptera; Tephritidae)

Esther Lantero', Beatriz Matallanas, Mª Dolores Ochando y Carmen Callejas (Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto de Genética. Madrid. *estherlantero@ucm.es). Susana Pascual' (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Protección Vegetal, Grupo de Entomología. Madrid. *pascual@inia.es).

La mosca *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790) es una de las plagas más dañinas del olivo, cuya producción constituye uno de los puntales del sistema agroalimentario español. Para minimizar las pérdidas que la mencionada plaga genera en el sector olivarero, se ha extendido el uso de insecticidas organofosforados, que conllevan una enorme inversión económica y son objeto de continuo debate por su toxicidad y acción inespecífica. Estudios recientes de algunas poblaciones europeas de *Bactrocera oleae* revelan la presencia de mutaciones en tres exones del gen de la acetilcolinesterasa que confieren a la mosca resistencia frente a estos insecticidas. Por ese motivo, hemos caracterizado en las poblaciones españolas de esta plaga la frecuencia y distribución de las variantes genéticas de este gen que otorgan resistencia a los organofosforados.

Durante los últimos cincuenta años, los intentos por controlar las poblaciones de la mosca del olivo han implicado el uso de insecticidas organofosforados (OP) (Kakani y col. 2013). La diana de estos productos es la enzima Acetilcolinesterasa, codificada por el gen *Ace*, encargada de la degradación del neurotransmisor acetilcolina en la hendidura sináptica. El insecticida se une de forma irreversible al centro activo de esta enzima, produciendo la parálisis y muerte del insecto (Vontas y col. 2002). Este gen *Ace* presenta 10 exones y 9 intrones (Figura 1) en los que se han descrito dos mutaciones puntuales (exones IV y VII) y una pequeña deleción (exón X) que confieren insensibilidad a estos productos en diferentes especies de insectos (Kakani y col. 2012). El objetivo del presente trabajo es el análisis de la presencia de estas tres variantes genéticas que confieren resistencia a los organofosforados en 12 poblaciones españolas de mosca del olivo, hasta ahora poco caracterizadas.

La primera de las mutaciones puntuales descrita se localiza en el exón IV del gen *Ace*. Esta mutación implica el cambio del aminoácido isoleucina por valina, en las proximidades del centro activo de la enzima y que dificulta la unión de los *OP*. En el presente trabajo, el exón IV fue estudiado con técnicas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y posterior secuenciación del DNA de este gen en las poblaciones españolas. El análisis de los resultados arrojó que dos de cada tres moscas pertenecientes a poblaciones españolas presentaba genotipo resistente (*RR*), el 25% resultó heterocigoto para la mutación (*RS*) y tan solo el 11% tenía un genotipo sensible (*SS*).

La segunda mutación puntual descrita en este gen se encuentra en el exón VII y provoca un cambio de aminoácido no sinónimo, glicina por serina, también en las proximidades del centro activo enzimático. Para el estudio de la frecuencia de esta segunda mutación en las poblaciones españolas se empleó la técnica

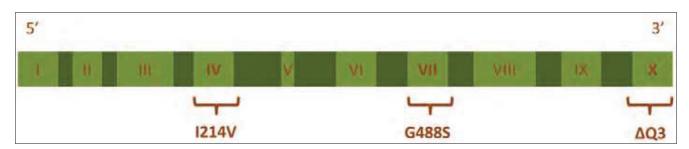


Figura 1. Esquema del gen que codifica la enzima Ace. Los exones portadores de la mutación que confiere resistencia a los OP quedan señalados en negrita. En los exones IV y VII se indica el cambio de aminoácido y la posición en la secuencia en la que se produce la mutación puntual. En el exón X se señala la pérdida de 3 aminoácidos.

EL OLIVAR: RETOS DE LA SANIDAD VEGETAL E O INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

PCR- RFLP con la enzima *BssHII*. El análisis del patrón de bandas de DNA reflejó unas frecuencias muy similares a las obtenidas para el exón IV. El 60% de los individuos presentaba un genotipo *RR*, que confiere resistencia a los *OP*, mientras que los heterocigotos representaban un 27% de las moscas estudiadas y tan solo el 12% resultó ser *SS*.

La presencia de una de estas dos mutaciones puntuales en el gen *Ace* conlleva una importante disminución de la eficacia biológica del insecto que las porta, pues la enzima tiene una actividad del 40% (Hawkes 2005). En la mayoría de las moscas estudiadas, la mutación en el exón IV iba acompañada de la mutación en el exón VII. Este evento confiere, por un lado, una mayor resistencia a los insecticidas respecto de cuando solo presenta una mutación. Y por otro, que la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa sea prácticamente del 80% (Nardi y col. 2005; Kakani y col. 2013).

La tercera mutación identificada y caracterizada que aporta resistencia a los OP se localiza en el exón X. En este caso se trata de una deleción de 9 pb en el extremo 3' del gen. La pérdida de un pequeño fragmento no afecta al centro activo enzimático sino a su afinidad por el fosfatidil inositol de las membranas

celulares, forzando el anclaje permanente de la enzima en la brecha sináptica. Como consecuencia, se produce un exceso de actividad colinérgica que afecta a la viabilidad del individuo (Dogaç y col. 2014). Hemos observado que ninguna de las 115 moscas del olivo estudiadas en el presente trabajo portaba la deleción en homocigosis. Tan solo el 2% resultó ser heterocigota y el 98 % restante homocigota silvestre. Esta baja incidencia de la mutación apunta a que hay un mayor efecto deletéreo de la deleción frente a las dos mutaciones puntuales, reflejando un elevado coste- beneficio para sus portadores (Kakani 2013).

Por tanto, el análisis de los tres exones del gen *Ace* (IV, VII y X) en las doce poblaciones españolas ha reflejado unas frecuencias de alelos resistentes a los OP muy elevadas en comparación con las registradas en estudios previos realizados con pequeñas muestras peninsulares (Nardi y col. 2005; Pereira-Castro y col. 2015). Teniendo en cuenta estos resultados, es necesario revisar las medidas de los programas de control de la plaga y buscar soluciones de gestión ambientalmente solidarias que reduzcan el empleo de estos productos dado el impacto de *B. oleae* en los olivares españoles.

BIBLIOGRAFÍA

- Dogaç E., Kandemir I., Taskin V. (2014) Geographical distribution and frequencies of organophosphate- resistant *Ace* alleles and morphometric variations in olive fruit fly populations. Pest Management Science. doi 10.1002/ps.3958.
- Hawkes N., Janes R., Hemingway J., Vontas J. (2005) Detection of resistance- assocoated point mutations of organophosphate- insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). Pestidice Biochemistry and Physiology. Doi 10.1016 /j.pestbp.2004.11.003
- Kakani E., Trakala M., Drosopoulou E., Mavragani-Tsipidou P., Mathiopoulos K.D. (2013). Genomic structure, organization and localization of the acetylcholinesterase locus of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. Bulletin of Entomological Research. Doi 10.1017/S007485312000478.
- Kakani E., Sagri E., Omirou M., Ioannides M., Mathiopoulos K.D. (2013) DEtection and geographical distribution of the organophosphate resistance associated 3Q ace mutation in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. Pest Management Science. Doi 10.10027ps.3564.
- Pereira-Castro I., Van Asch B. Trinidade F., Teixeira L. (2015) *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephitidae) organophosphate resistance alleles in Iberia. Recent expansion and variable frequencies. European Journal of Entomology. Doi 10.14411/eje.2015.019
- Vontas J., Hejazi M.J., Hawkes N., Loukas M., Hemingway J. (2002) Resistance associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Molecular Biology. Doi 10.1046/j.1365-2583.2002.00343.x