

Evaluación de estrategias de manejo de refugios asociados a cultivos de soja Bt sobre plagas blanco, no blanco y sus depredadores.

Perotti, E.¹; R. Russo¹, R. López², F. Zari³, E. Pradolini³, N. Sanmarti³, G. Maccari³, L. Boero¹, J. Gamundi¹

¹ Protección Vegetal- Entomología. EEA Oliveros-INTA; ² Monsanto Argentina; ³ Estudiantes de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Rosario.

Palabras clave: soja Bt, artrópodos, refugios, manejo.

Introducción

La primer aprobación de un organismo vegetal genéticamente modificados (OVGM), en la Argentina se efectuó en el año 1996. Desde ese momento el crecimiento del área sembrada con materiales transgénicos fue de tipo exponencial. A la fecha se registra un total de 24 millones de hectáreas para los cultivos de soja, maíz y algodón modificados para dar tolerancia a herbicidas y en el caso de los dos últimos, además resistencia a lepidópteros plaga (James, 2012).

En la última campaña agrícola se lanzó al mercado el cultivo de soja modificada genéticamente, que además de ser resistente a glifosato expresa el gen que codifica la toxina cry Ac 1. Este gen, perteneciente a una bacteria nativa del suelo *Bacillus thuringiensis*, produce una proteína insecticida que protege a la planta del ataque de larvas de los lepidópteros blanco: *Crosidosema aporema*, *Anticarsia gemmatalis*, *Rachiplusia nu*, *Pseudoplusia includens*, *Helicoverpa gelotopoeon* durante todo el ciclo del cultivo.

Las empresas que desarrollan y comercializan la tecnología Bt fundamentan su manejo en los siguientes conceptos 1)-la resistencia de carácter monogénica y recesiva, 2)-la siembra de un cultivar no Bt como refugio, que permita la supervivencia de una proporción de individuos susceptibles de las plagas blanco, 3)- la alta expresión de toxina Bt en el tejido de la planta, (concepto de alta dosis) de manera de eliminar los heterocigotos con susceptibilidad intermedia, 4)- la distancia del refugio al cultivo Bt, que permita el encuentro de adultos susceptibles con los escasos resistente que puedan sobrevivir al cultivo Bt, de

forma de evitar el apareamiento entre individuos resistentes y 5) conocimientos de las líneas base de susceptibilidad y dosis diagnóstico de la toxina Bt, previo a la aprobación comercial de los eventos transgénicos, como herramienta para el monitoreo de la susceptibilidad de las plagas blanco a lo largo del tiempo.

La amplia adopción de la soja Bt, llevaría implícita una fuerte presión de selección y la posibilidad de seleccionar individuos resistentes a las toxinas Bt, toda vez que la mencionada tecnología actúa en forma preventiva desde emergencia a madurez del cultivo. Tabashnik et al, 2013 citan 24 casos de plagas resistentes a los OVGM Bt en 8 especies de insectos. Las causales de resistencia fueron atribuida a 1.- no utilización del refugio o a su erróneo manejo, 2.- desconocimiento de la frecuencia y tipo de heredabilidad de los genes de resistencia, 3.- no expresión de la alta dosis, 4.- deficiente monitoreo de la susceptibilidad a la toxina Bt.

Varios autores han desarrollado modelos de simulación para evitar o demorar la aparición de resistencia (Gould, 1998; Bates et al., 2005; Bourguet et al., 2005; Andow, 2008; Huang et al., 2011). Estos estudios demuestran que el Manejo de la Resistencia mediante: la utilización de refugios no Bt, la alta dosis y el apilamiento de toxinas Bt, son las tácticas recomendadas en los centros de desarrollo, instituciones de investigación y organismos de control. Con respecto al refugio se recomienda la siembra de cultivares no Bt en cercanías de los cultivos transgénicos Bt, en proporciones variables entre 5 a 50% del área total sembrada, según la especie plaga, el manejo de insecticidas y la presencia de otros cultivos Bt en el área. La fundamentación teórica del refugio se sustenta en la baja frecuencia (1×10^{-3}) de los alelos resistentes a la toxina Bt en las poblaciones prístinas, lo que equivale a un



individuo resistente cada millón de susceptibles (Huang et al., 2011). A la vez el concepto de alta dosis lleva implícita la necesidad de determinar las líneas base de susceptibilidad y las dosis diagnóstico previo a la comercialización del evento, para un correcto monitoreo de la evolución de resistencia. Por último el mayor esfuerzo de las empresas productoras de organismos OVG M Bt ha sido canalizado hacia el apilamiento de toxinas con distintos sitios de acción, existiendo en el país eventos con hasta 3 toxinas (CONABIA, 2014)

Con el propósito de integrar la tecnología Bt al Manejo Integrado de Plagas (MIP) a través de los conocimientos locales sobre las bioecologías de las plagas blanco y no blanco, sus umbrales de daño, el complejo de enemigos naturales y los métodos de control, se realizó la presente experiencia. La misma tiene como objetivo evaluar dos estrategias de manejo de refugios sobre la dinámica poblacional de artrópodos blanco y no blanco, sus enemigos naturales y el rendimiento.

Materiales y métodos

La experiencia se condujo en el campo experimental de la EEA Oliveros, durante la campaña 2013/2014. La misma consistió en comparar el efecto de dos estrategias de control químico sobre las plagas, sus enemigos naturales, la supervivencia de adultos de lepidópteros blanco y el rendimiento. Las estrategias de control químico fueron definidas teniendo en cuenta los siguientes aspectos: eficacia, selectividad sobre enemigos naturales y persistencia. En la Estrategia 1 (E1) se propone manejar al cultivo Bt y su refugio mediante la utilización de insecticidas de baja toxicidad y selectivos para enemigos naturales: clorantropilprole (6,25 g.i.a). En la Estrategia 2 (E2) se modificó el tipo de insecticida, utilizándose productos de mayor toxicidad y poco selectivos para enemigos naturales, cipermetrina (37,5 g.i.a). En ambas estrategias los criterios de decisión para el control se basaron en la aplicación de los correspondientes insecticidas cuando se alcanzaron los umbrales de de tratamiento (Gamundi et al, 2002, Perotti & Gamundi, 2010) tanto para la plaga blanco como no blanco.

La siembra se realizó el 11 de diciembre de 2013 con un equipo experimental de siembra neumática de cinco surcos, con espaciamiento entre líneas de siembra a 52 cm. Se utilizó un cultivar de soja transgénica Bt y en el refugio un cultivar RR1 de ciclo similar al Bt (GMV). En ambos casos se utilizó una densidad de 20 semillas por metro lineal de surco. Las estrategias se aplicaron sobre macro parcelas de 20,8m x 100 m de largo para el cultivo Bt y de 4,16m x 100m de largo para el refugio, constituyendo este último el 20% de la superficie total (Bt + Refugio). Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizados con 4 repeticiones.

En los cultivos Bt y sus refugios, se muestrearon los siguientes grupos de artrópodos: lepidópteros, trips, hemípteros y agentes de control biológico (depredadores) que habitan en el canopeo del cultivo. Los muestreos se realizaron cada 7-10 días durante todo el ciclo del cultivo. Las larvas de lepidópteros, chinches y depredadores, fueron muestreados con el método del paño vertical de 1m (Gamundi et al, 1992). Se registró número de individuos discriminados en especies y categorías. Los lepidópteros se clasificaron según el tamaño en: larvas grandes, mayores a 1,5cm y larvas chicas, menores a 1,5cm. Las chinches fitófagas se agruparon en 3 categorías: ninfas chicas (menores a 0,5cm), ninfas grandes (mayores a 0,5cm) y adultos. En el caso de los depredadores se dividieron en ninfas/larvas y adultos. La evaluación de la dinámica de trips se realizó tomando muestras de foliolos del estrato superior, posteriormente en laboratorio se registró la población de larvas utilizando lupa estereoscópica.

La supervivencia de *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis* sobre el cultivar Bt y los refugios, se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$Sa = (A/L) * 100$$

donde Sa = % de supervivencia de adultos, A = número de adultos por m² emergidos de pupas colectadas a campo y L = número de larvas por m² en el momento en que ocurre el máximo poblacional de larvas de cada especie. En *R. nu*, la supervivencia de adultos se estimó sobre muestras de pupas colectadas en 30 plantas al azar por parcela (0.8 m²). En *A. gemmatalis* se muestreo, dos franjas de 0,25 x 2m, a ambos lados de la línea de siembra, totalizando 2m² de suelo por muestra, con una profundidad de 4cm. En ambas especies las pupas se colectaron 15 días después del máximo poblacional de larvas. Las pupas viables de ambas especies se trasladaron y mantuvieron en condiciones de laboratorio (24±2°C) hasta la emergencia del adulto o el registro de alguna causa de mortalidad en el estado pupal. La cosecha se realizó en forma mecánica con equipo experimental autopropulsado. Se tomaron 2 muestras de 2 surcos x 10m de largo por parcela. Se registró peso de la muestra, número de granos y peso de mil granos. El rendimiento se estimó como el promedio ponderado expresado en kg/ ha resultante de tomar como unidad al lote de producción (Bt+refugio) y afectarlo por las proporciones 0.8 y 0.2 respectivamente, que corresponden a la relación de cultivo Bt y refugio, sembrados en ambas estrategias.

Las variables número de artrópodos, rendimiento y sus componentes se analizaron por el procedimiento del análisis de la varianza (ANAVA). Las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey, con el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al 2014).



Resultados

En las parcelas Bt de ambas estrategias no se aplicaron insecticidas. En los refugios, solo superaron el umbral de tratamiento los lepidópteros defoliadores: *Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis* y fueron las únicas plagas que decidieron las estrategias de control químico a aplicar. Los lepidópteros plagas registrados durante el ciclo del cultivo fueron *R. nu*, *A. gemmatalis*, *Helicoverpa gelotopoeon*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera cosmoide*. Las tres últimas especies manifestaron bajas densidades, menos de 1 larva por metro de surco. La abundancia poblacional de *S. frugiperda* y *S. cosmoide*, fue similar entre los materiales Bt y no Bt.

En el cultivar Bt, se observó un eficaz control de larvas chicas y grandes de ambos lepidópteros blanco (Figura 1).

En este cultivar no se registraron larvas grandes, solo un mínimo nivel poblacional de larvas chicas, correspondientes a larvas neonatas registradas al momento del muestreo (28 de enero).

En los refugios, el patrón de la dinámica y abundancia poblacional de las larvas de lepidópteros blanco fue afectado por las estrategias de manejo. Los máximos poblacionales ocurrieron en distintos momentos según especie. El primer momento fue representado principalmente por la especie *R. nu*, 21 de enero y el segundo por *A. gemmatalis*, 11 de febrero (Figuras 2 y 3). La especie de lepidóptero blanco predominante sobre el total de larvas, durante la etapa vegetativa del cultivo, 7 de enero-28 de enero, fue *R. nu* (63%), mientras que en la etapa reproductiva, 4 de febrero-18 de marzo, fue *A. gemmatalis* (88%) (Figuras 2 y 3).

Figura 1. Evolución de la población de larvas de lepidópteros defoliadores (*R.nu* + *A. gemmatalis*), discriminadas en categorías de larvas chicas (<1,5 cm) y grandes (>1,5 cm) promedio de cultivar de soja transgénico Bt en ambos manejos. Campaña 2013-14. Oliveros

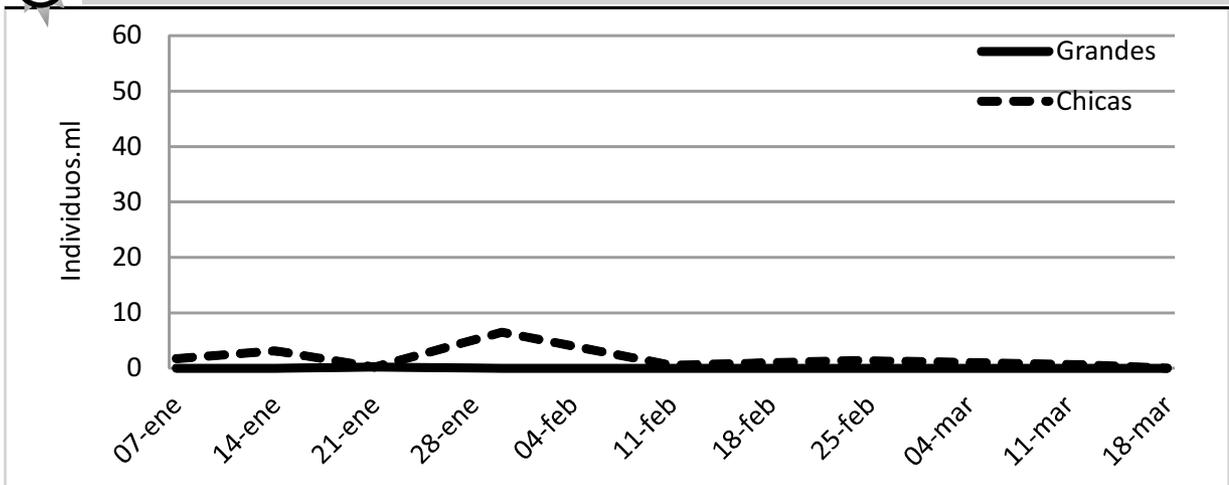


Figura 2. Evolución de la población de larvas de lepidópteros defoliadores (*R.nu* + *A. gemmatalis*), discriminadas en categorías de larvas chicas (<1,5 cm) y grandes (>1,5 cm) en el refugio no Bt (DM5.9) con control de lepidópteros mediante el uso de clorraniliprole (E1). Campaña 2013-14. Oliveros

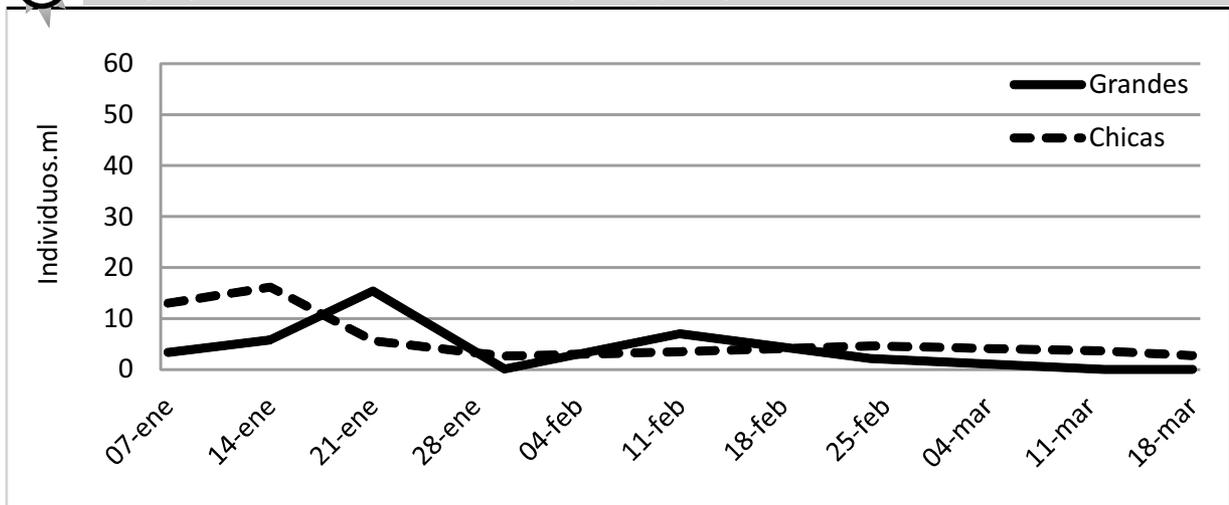


Figura 3. Evolución de la población de larvas de lepidópteros defoliadores (*R.nu* + *A. gemmatalis*), discriminadas en categorías de larvas chicas (<1,5 cm) y grandes (>1,5 cm) en el refugio no Bt (DM5.9) con control de lepidópteros mediante el uso de cipermetrina (E2). Campaña 2013-14. Oliveros

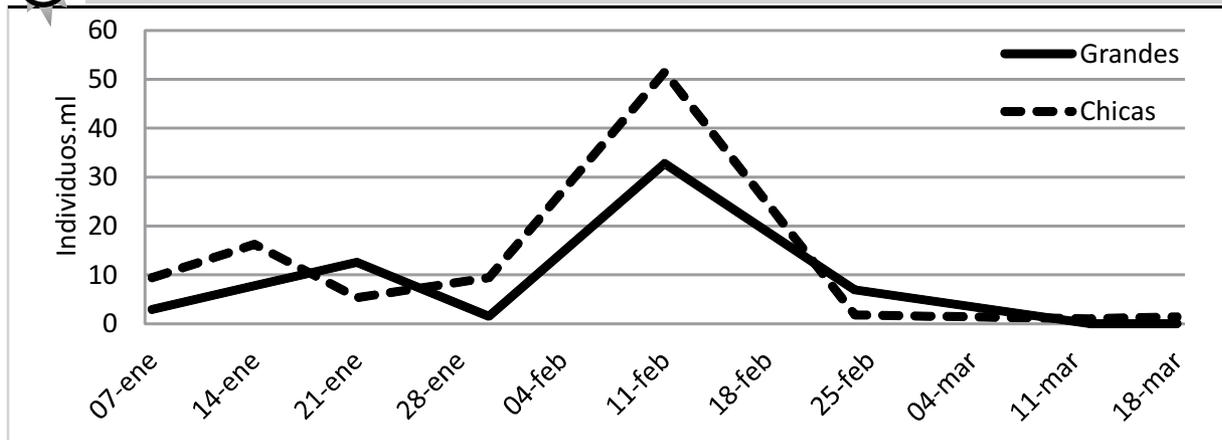
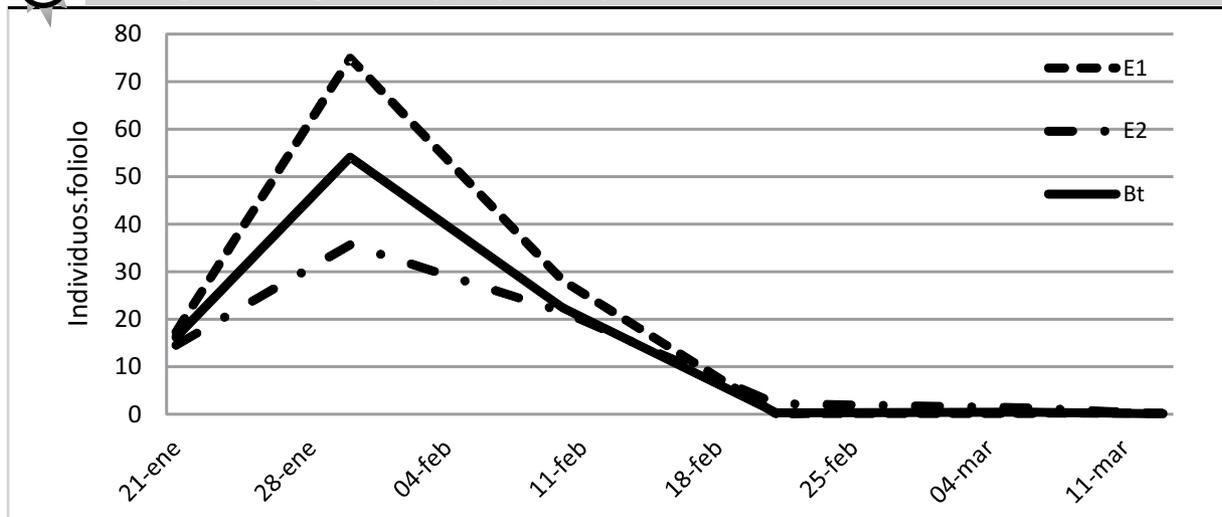


Figura 4. Evolución de la población de larvas de *Caliothrips phaseoli* por foliolo, en cultivos Bt y los refugios no Bt según la estrategia de manejo (E1 y E2). Campaña 2013-14. Oliveros .



En ambas estrategias, las parcelas Bt, no recibieron tratamiento para el control de artrópodos plagas. En las dos estrategias de manejo de refugios la primera intervención de control químico, tuvo como destinataria a *R. nu* y se realizó el 21 de enero, para la cual se aplicó clorantropilprole (6,25 g.i.a) y cipermetrina (37,5 g.i.a) para E1 y E2, respectivamente. En la etapa reproductiva del cultivo se observaron diferencias significativas en la dinámica y abundancia poblacional de *A. gemmatalis* entre ambas estrategias de manejo (Figuras 2 y 3). En E1, *A. gemmatalis* no superó el umbral de daño, razón por la cual no fue necesario controlarla. En cambio en E2 además de la primera intervención para el control de *R. nu* fueron necesarias dos aplicaciones adicionales de cipermetrina (13 y 25 de febrero), a la misma dosis que el primer control, para mantener a *A. gemmatalis* por debajo del nivel de daño (Figura 3).

En relación a los niveles de infestación del trips del poroto, *Caliothrips phaseoli* y chinches fitófagas, los mismos no alcanzaron niveles que requirieran control químico. La población de larvas de trips logró su máximo poblacional el día 30 de enero, registrándose diferencias significativas entre tratamientos, 36, 54 y 75 larvas de trips por foliolo para E2, cultivo Bt y E1, respectivamente (Figura 4). En fechas posteriores se observó un brusco descenso del número de larvas de trips. Esta disminución fue consecuencia de la epizootia provocada por el hongo entomopatógeno *Entomophthora tripidium*, favorecido por las condiciones ambientales del mes de febrero (3 precipitaciones = 160mm, 86%HR media y 21°C). La población de chinches se mantuvo en bajos niveles, predominando ninfas chicas, principalmente a fines del ciclo del cultivo para las estrategias evaluadas.

El complejo de depredadores registrados durante el ciclo del cultivo se agrupó en cuatro categorías: hemípteros



Figura 5. Supervivencia de *R. nu* y *A. gemmatalis*, en dos estrategias de manejo del refugio de soja E1: una aplicación de clorantraniliprole (21 de enero) y E2: tres aplicaciones de cipermetrina (21 de enero, 13 y 25 de febrero), expresado como proporción de adultos emergentes sobre el máximo poblacional de larvas de cada especie respectivamente. Campaña 2013-14. Oliveros.

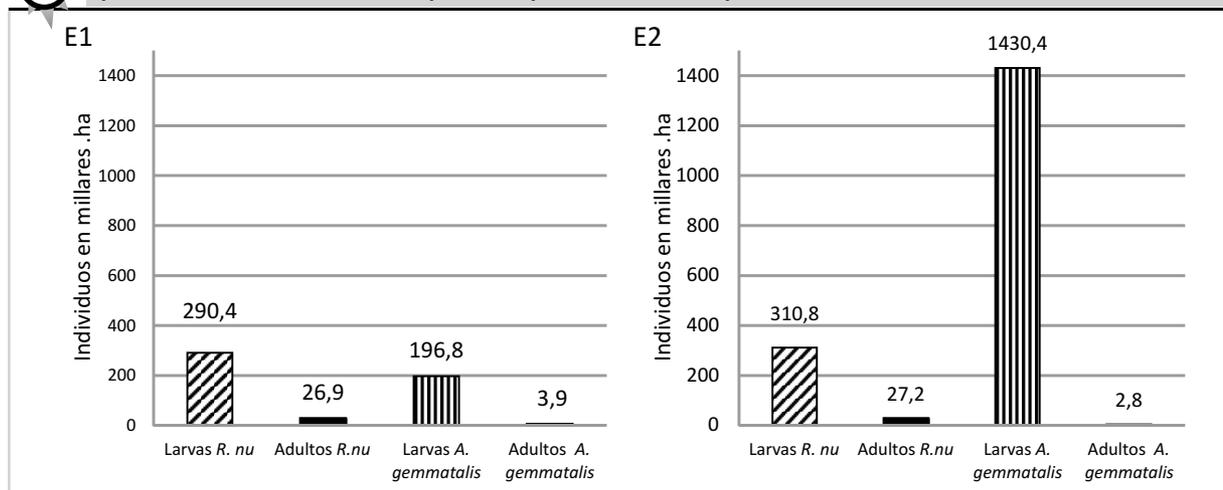


Tabla 1. Abundancia de depredadores que habitan el follaje en cultivo Bt y sus refugios según estrategia de manejo (E1 y E2). Campaña 2013-14. Oliveros

Depredadores	Bt1	E1	E2
Hemípteros	22.6a	22.3a	7.8b
Coleópteros	0.4a	0.3a	0.8a
Crisopas	0.3a	0.1a	0.2a
Arañas	13.9a	14.4a	12.8a

Medias seguidas de letras diferentes dentro de líneas indican diferencias significativas. Test Tukey ($p < 0,05$)

Tabla 2. Rendimiento ponderado de cada estrategia de control químico del refugio (80% cultivo Bt + 20% refugio). Campaña 2013-14. Oliveros

Estrategia	Rendimiento 20% Refugio + 80% Bt kg/ha
E1	3278ns
E2	3212

Medias seguidas de letras diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas. Test Tukey ($p < 0,05$) ns = no significativo

ros, coleópteros, crisopidos y arañas (Tabla 1). El cultivar Bt y la E1 no mostraron diferencias significativas tanto en la composición específica (categorías) como en la abundancia poblacional del complejo de depredadores. En E2 se observó una disminución significativa de la abundancia de los hemípteros depredadores principalmente Orius spp.

La supervivencia de adultos de *R. nu* fue similar en ambas estrategias de manejo de refugio, en cambio *A. gemmatalis* fue afectada significativamente por el tipo de

Tabla 3. Efecto de dos estrategias de manejo de refugios (E1 y E2) en cultivos Bt sobre el peso de mil semillas y número de granos. Campaña 2013-14. Oliveros

Estrategia	Peso de 1000 semillas (gramos)	Número de granos
Bt	178.9 ns	1795.5 ns
E1	166.9	2127.8
E2	152.6	2113.5

Medias seguidas de letras diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas. Test Tukey ($p < 0,05$) ns = no significativo

plaguicida utilizado, 2 y 0,2 % para clorantraniliprole (1 aplicación) y cipermetrina (3 aplicaciones), respectivamente (Figura 5).

La comparación del efecto de ambas estrategias de manejo sobre el rendimiento (kg/ha) incluye para su cálculo las proporciones de cultivo Bt y refugio que para ambas fue 80%Bt +20% Refugio. El rendimiento ponderado expresado en las proporciones citadas no se diferencia significativamente entre ambas estrategias de manejo (Tabla2) Los componentes de rendimiento peso y numero de granos no se diferenciaron significativamente entre estrategias y cultivo Bt (Tabla3)

Un análisis comparativo de ambas estrategias, muestra que la E1 fue más eficaz para el control de las plagas blanco, aunque esto no se refleja en un aumento del rendimiento del cultivo. El rendimiento del cultivar Bt no puede compararse directamente con los obtenidos en cada refugio pues estos no constituyen la isolínea del material transgénico.



Si agregamos otros parámetros al análisis como la mayor selectividad hacia los hemípteros depredadores y la mayor supervivencia de adultos de *A. gemmatalis*, el clorantraniliprole se perfila como la mejor estrategia para integrar los cultivos transgénicos Bt al MIP. Como se mencionara anteriormente, el ciclo agrícola 2013-2014, fue atípico en cuanto al nivel de infestación/permanencia sobre el cultivo de dos importantes y frecuentes plagas no blanco de la tecnología Bt, como son los trips y las chinches. Cada una de estas plagas generalmente necesita al menos una intervenciones con insecticidas de diferente modo de acción: inhibidores del crecimiento, fosforados + inhibidores de crecimiento, avermectinas + diamidas, piretroides + inhibidores de crecimiento, inhibidores de crecimiento + spinosinas en el caso de los trips y fosforados y mezclas de piretroides + neonicotinoides para chinches fitofagas. La mayor intervención en forma simultánea con insecticidas o mezclas de ellos para el control de estas plagas necesariamente va a tener un mayor impacto sobre las plagas blanco, comprometiendo más aun la escasa supervivencia de adultos registrada en ambas estrategias, 2 y 0,2 % para clorantraniliprole y cipermetrina respectivamente. Teniendo en cuenta las consideraciones efectuadas precedentemente, los resultados de este estudio **no pueden generalizarse ni extrapolarse** para la diversidad de escenarios de plagas y ambientes de toda el área sojera del país. Por este motivo estudios de estas características deben ser repetidos para los distintos agro-ecosistemas del país.

El análisis global de la información preliminar obtenida en la presente experiencia, permite acotar las siguientes inferencias: 1.-El manejo de los refugios con insecticidas selectivos y de alta persistencia (clorantraniliprole) permitió disminuir el número de aplicaciones, lograr mayor supervivencia de los hemípteros depredadores y los adultos de las plagas blanco; 2.-La supervivencia de adultos en ambas estrategias es considerablemente baja, aun cuando en la E1 se realizó una única aplicación con un insecticida selectivo. 3.- La baja supervivencia de adultos refuerza la necesidad imperiosa de sembrar refugios no Bt de acuerdo a las recomendaciones de organismos autorizados (ASA Programa MRI, 2014) e integrar la tecnología Bt al MIP. 4.- La aplicación de los Umbrales de Tratamiento en los cultivos Bt y en los refugios evitó las pérdidas de rendimiento y 5.-Las tácticas de control químico de las plagas no blanco de ataque simultáneo a los lepidópteros blanco debe ser cuidadosamente seleccionada para no disminuir la escasa supervivencia de los adultos de los lepidópteros blanco. Las deducciones citadas precedentemente son acotadas a las condiciones ambientales y ocurrencia de plagas registradas en la campaña 2013-14, que fue atípica para trips y chinches.

Bibliografía

- Andow, D. A. 2008. The Risk of Resistance Evolution in Insects to Transgenic Insecticidal Crops. *Collection of Biosafety Reviews* 4:-, 142-199.
- Bates S. L., Jian-Zhou Zhao, Roush R. & Shelton A. 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature Biotechnology* 23: 57 – 62.
- Bourguet, D., Desquilbet, M., & Lemarié, S. 2005. Regulating insect resistance management: the case of non-Bt corn refuges in the US. *Journal of environmental management* 76(3): 210-20. doi:10.1016/j.jenvman.2005.01.019
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Gamundi, J. C. 1997. Evaluación de técnicas de muestreo de insectos plaga y depredadores en cultivos de soja con diferentes sistemas de siembra y labranza. En: *Para Mejorar la Producción 5. Soja* pág. 71-76. EEA Oliveros INTA.
- Gamundi J. C., M. Andrian, D. Bacigaluppo, M. Lago, L. Lenzi, P. Randazzo, M. Bodrero. 2003. Incidencia del complejo de chinches en el cultivo de soja con diferentes espaciamientos entre líneas. En: *Para mejorar la Producción INTA EEA Oliveros*. 24:79-86.
- Gamundi, J.C., Perotti E y Lago M. 2010. Evaluación del daño conjunto de tres adversidades biológicas de la soja: *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), *Piezodorus guildinii* (Westwood) y *Cercospora soijina* Hara según estrategia de manejo del cultivo. XXIII Congreso Brasileiro de Entomología, Natal, RN 26-30 de septiembre.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 701-26
- Huang, F., Andow, D.A. and Buschman, L.L. 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 140: 1-16.
- James C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2012. Executive summary. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Onstad, D.W. and Guse, C.A. 2008. Concepts and complexities of population genetics. In: *Insect resistance management: biology, economics and predictions* (Ed. D.W. Onstad). Elsevier, USA. 69-88 pp.
- Perotti, E. & Gamundi J.C. 2010. Evaluación del daño de lepidópteros defoliadores en soja en base a parámetros ecofisiológicos bajo distintas estrategias de manejo del cultivo. XXIII Congreso Brasileiro de Entomología, Natal, RN 26-30 de septiembre.
- Perotti, E., Gamundi J.C. y M Lago. 2011 Evaluación del daño multiple de tres adversidades biológicas: *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER), *Caliothrips phaseoli* (HOOD) y *Cercospora soijina* HARA, en soja. V Congreso de la soja del Mercosur, 14-16 de setiembre.
- Tabashnik B., T. Brévault & Y Carrière 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature biotechnology* vol.31