

Estudios preliminares de los efectos del insecticida RH-5992 sobre larvas de distintas edades de *Spodoptera exigua* (Hübner)

F. BUDIA, V. MARCO y E. VIÑUELA

Se han realizado en laboratorio ensayos preliminares para determinar la efectividad del insecticida agonista de la hormona de la muda RH-5992 (3,5-acidodimetilbenzoico 1-(1,1 dimetiletil)-2-(4-etilbenzoil) hidracida) en *Spodoptera exigua*.

A larvas de primero, tercero y quinto estadio larvario se les ofreció dieta tratada, con dosis comprendidas entre 0,1 ppm y 10.000 ppm (mg. de i.a./kg. de dieta).

El compuesto resultó ser muy efectivo para el primer y tercer estadio larvario, ya que a partir de la dosis de 1 ppm se alcanzó el 100 % de mortalidad larvaria el tercer o quinto días después del tratamiento respectivamente. Para 0,1 ppm y el primer estadio larvario, se pudo obtener la TL_{50} (tiempo letal cincuenta) que resultó ser de 6,87 días. En este ensayo ninguna larva tratada consiguió alcanzar el estado de pupa. Para larvas de tercer estadio, todas las larvas llegaron a iniciar el proceso de la muda a pupa, pero este fue defectuoso en el 40 % de los casos y solo el 30 % de las pupas normales alcanzaron el estado adulto. Se observó además pérdida de peso significativa, para estas dos edades.

Para el quinto estadio larvario, se observó una reducción significativa de la pupación, para dosis mayores de 10 ppm, pero no encontramos diferencias significativas en el número de adultos emergidos.

F. BUDIA, V. MARCO y E. VIÑUELA. Unidad de Protección de Cultivos. E.T.S.I. Agrónomos. 28040 Madrid.

Palabras Clave: RH-5992, ecdisoides, *Spodoptera exigua*, muda.

INTRODUCCION

Una de las estrategias empleadas en el Manejo Integrado de Plagas (IPM), ya sea en campo o en almacén, sigue siendo el uso de insecticidas, aunque aplicados de forma más racional (GRANETT, 1987), con el fin de disminuir los efectos adversos que éstos producen a veces en el medio ambiente (contaminación, residuos, eliminación de fauna útil, etc.) (PIMENTEL *et al.*, 1991). No obstante, aparte de mejorar el uso de los insecticidas con que ya contamos, el encontrar nuevas materias activas que sean efectivas en el control de las plagas, pero que puedan ser compatibles con otras técnicas de lucha, se ha convertido en un objetivo prioritario de la Protección Integrada.

Un grupo de insecticidas prometedores para ser empleados en IPM, son los Reguladores del Crecimiento de los Insectos (RCI), que tienen una baja toxicidad para los mamíferos y una alta selectividad (MITSUI, 1985).

Recientemente WING *et al.*, (1988) descubrieron sustancias no esteroideas con efectos análogos a la hormona de la muda (HM), cuya principal actividad insecticida es inducir mudas prematuras en los insectos. Dentro de este grupo se encuentra el compuesto RH-5992, que ha resultado ser un agonista de la hormona de la muda con especial eficacia sobre distintas especies de lepidópteros.

En el presente trabajo hemos realizado una serie de estudios preliminares para comprobar la eficacia de este compuesto sobre

Spodoptera exigua (Hübner), y evaluar las posibilidades de su uso práctico.

lada. Las dosis ensayadas fueron: 0; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 10.000 ppm.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico

La población de *S. exigua* utilizada en los ensayos, procede de un cultivo de pimiento en invernadero de Almería. Las larvas de este insecto, se crían en laboratorio, sobre una dieta modificada de la propuesta por POITOUT & BUES (1974), y cuya composición es la siguiente: Agar, 18 g; Sémola de maíz, 128,4 g; Germen de trigo, 32,1 g; Levadura de cerveza, 34,3 g; ácido ascórbico, 4,5 g; ácido benzoico, 1,3 g; Nipagina, 1,1 g; Aldehído fórmico, 0,5 g; Alfalfa molida, 20 g; Agua, 759,5 g.

El agar se disuelve en agua, y se calienta hasta ebullición, para después dejarlo enfriar hasta 40° C, antes de añadir los demás componentes. Posteriormente, se mezclan todos en una batidora.

Las condiciones ambientales de cría, así como de los tratamientos y de los periodos de postratamiento fueron: 25 ± 2° C de temperatura, 75% ± 5 HR y fotoperíodo 16:8 (L:O).

Con el fin de evitar disminuciones en las tasas de fecundidad y fertilidad, que se producen cuando el insecto se cría de manera continua en laboratorio, cada 8-10 generaciones introducíamos nuevas poblaciones de campo.

Insecticida

El insecticida utilizado fue el compuesto experimental RH-5992 de la casa ROHM & HAAS aún no registrado en España, y que pertenece al grupo químico de las Benzoil-hidracidas (Rhom & Haas comunicación personal), y cuyo nombre químico es: (3,5-acidodimetilbenzoico 1-(1,1 dimetiletil)-2-(4-etilbenzoil) hidracida).

Para la realización de los ensayos se prepararon diluciones del mismo en agua desti-

Método de Ensayo

El insecticida se les ofreció a: larvas neonatas, de tercer estadio y de quinto estadio, incorporando el mismo a la dieta de cría. La incorporación se realizaba añadiendo y mezclando la correspondiente cantidad de solución insecticida al agar + agua a 40° C, antes de añadir el resto de componentes de la dieta.

Con el fin de evitar la aparición de hongos en las cajas donde colocábamos los insectos, cada tres días sustituíamos la dieta así como el papel de filtro.

Las larvas se individualizaron antes de aplicar el producto con el fin de asegurarnos que todas tomaban el alimento, y trabajamos con dos lotes de cinco larvas por dosis.

Ensayos con larvas neonatas

Las larvas neonatas de *S. exigua*, se colocaban de manera individual en cajas cilíndricas de plástico de 9 cm de Ø y 3 cm de altura, que contenían papel de filtro blanco sobre el que depositábamos dieta tratada con las dosis anteriores. Diariamente observábamos y anotábamos la mortalidad de las larvas, también al cabo de siete días de ingerir dieta tratada, se pesaron de manera individual larvas del testigo y de la dosis más baja (única en la que había supervivientes)

Ensayos con larvas de tercer estadio

Hasta que las larvas alcanzaban el 3.º estadio, se criaban en dieta sin insecticida según el método de cría descrito anteriormente. Posteriormente, se aislaban de una en una, en cajas idénticas a las utilizadas para las larvas neonatas, que contenían dieta tratada la cual colocábamos también sobre papel de filtro con el fin de evitar un exceso

de humedad. Cada dos días contabilizamos: la mortalidad larvaria, el porcentaje de pupas deformes (inviabiles en el desarrollo posterior), pupas normales, adultos deformes y adultos normales. Al cabo de cuatro días de ingerir dieta medimos la pérdida de peso de las larvas en las distintas dosis.

Ensayos con larvas de quinto estadio

Como en el caso anterior, hasta alcanzar el 5.º estadio se criaron en dieta sin insecticida según el método descrito anteriormente. Una vez alcanzado el mismo se aislaron, junto con la dieta tratada, en botes cilíndricos de cristal de 3 cm de Ø y 3,5 cm de altura que contenían vermiculita hasta 2,5 cm de altura con el fin de facilitar la pupación. Los botes se cerraron con parafilm agujereado.

Cinco días después (periodo suficiente en el cual larvas no tratadas alcanzan el estado de pupa) contamos: número de larvas muertas, número de individuos con caracteres intermedios entre larva y pupa (larva-pupa) y pupas normales. El porcentaje de adultos normales se contabilizó diez días después del conteo anterior, una vez que lo habían hecho todos los testigos.

Métodos Estadísticos

Los resultados que obtuvimos se sometieron a dos métodos de análisis estadístico:

Análisis de Varianza, para estudiar la existencia o no de diferencias significativas entre medias de los tratamientos (haciendo el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$, cuando se trataba de porcentajes). Posteriormente aplicamos el test de comparaciones múltiples

LSD cuando encontramos diferencias significativas (MILLIKEN & JOHSON, 1984).

Análisis Probit, para evaluar el tiempo que tardan en morir las larvas neonatas de *S. exigua* desde que se les ofrece el insecticida; se utilizó el tiempo de respuesta, es decir, el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo (tratamiento) y la respuesta del insecto (muerte) (FINNEY, 1971).

RESULTADOS

Ensayos con larvas neonatas

El compuesto RH-5992 resultó ser muy eficaz para las larvas neonatas. Así, a partir de 1 ppm se produjo una importante mortalidad ya al día siguiente del tratamiento, siendo del 40 % para la dosis de 1 ppm y llegando al 80 % para la dosis más alta ensayada (10.000 ppm). En el Cuadro 1 queda reflejada la efectividad del compuesto, medida como el porcentaje de larvas muertas un día después de ingerir dieta tratada.

Analizada la mortalidad mediante test de ANOVA, encontramos diferencias entre las dosis que resultaron ser significativas al 5 %. A continuación se realizó el test LSD de comparaciones múltiples, con el fin de buscar qué concentraciones de insecticida afectaban por igual a las larvas neonatas. En el Cuadro 1 se recogen a su vez, los resultados de estos tests.

Siete días después de alimentarse *ad libitum* con dieta tratada, se pesaron de manera individual 7 larvas del control y 7 de la dosis más baja de las utilizadas (0,1 ppm), ya que eran las únicas donde quedaban individuos vivos, comprobando después de analizar las medias de peso, que existían dife-

Cuadro 1.—Mortalidad larvaria un día después de ingerir dieta tratada las larvas neonatas.

Dosis (ppm)	0	0,1	1	10	100	1.000	10.000
Mortalidad (%)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	40 ± 0 ^b	40 ± 5,31 ^b	40 ± 0 ^b	50 ± 3,76 ^b	80 ± 0 ^c

Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente al 5 % (ANOVA y LSD).

Cuadro 2.—Parámetros de la recta de regresión ponderada PROBIT para la mortalidad en el tiempo de larvas neonatas de *S. exigua* tratadas por ingestión con RH-5992 (0,1 ppm.)

$b \pm S.E.$	a	TL50 (días)	Límites fiduciales 95 %	TL90 (días)	Límites fiduciales 95 %
4,66 \pm 0,9	1,10	6,87	5,39; 8,24	12,95	10,56; 18,45

rencias significativas al 5 % entre los controles (0,063 g/larva) y las que habían ingerido el insecticida (0,023 g/larva).

La mortalidad en el tiempo de las larvas neonatas para la dosis de 0,1 ppm (la única que pudimos analizar ya que para las sucesivas dosis habían muerto todas prácticamente al 2.º día después de ingerir la dieta tratada), la analizamos mediante el cálculo de una recta probit, previa corrección de la mortalidad con el testigo ya que éste presentó mortalidad superior al 10 %, los datos se recogen en el Cuadro 2 y una representación gráfica de dicho ajuste, en la Figura 1. Además ninguna larva consiguió alcanzar el estado de pupa en esta dosis.

Ensayos con larvas de tercer estadio

Para larvas de tercer estadio, se alcanzó el 100 % de mortalidad larvaria (antes de alcanzar el estado de pupa) a partir de 1 ppm, a los cinco días del tratamiento, como se observa en el Cuadro 3. En este caso y también para la dosis más pequeña (0,1 ppm), todas las larvas llegaron a iniciar el proceso de la muda a pupa, pero este fue defectuoso en el 40 % de los casos, dando lugar a individuos intermedios larva-pupa. De las pupas normales sólo alcanzaron el estado adulto el 33,3 %, mientras que el 16,7 % murió en estado de pupa y el 50 % restante

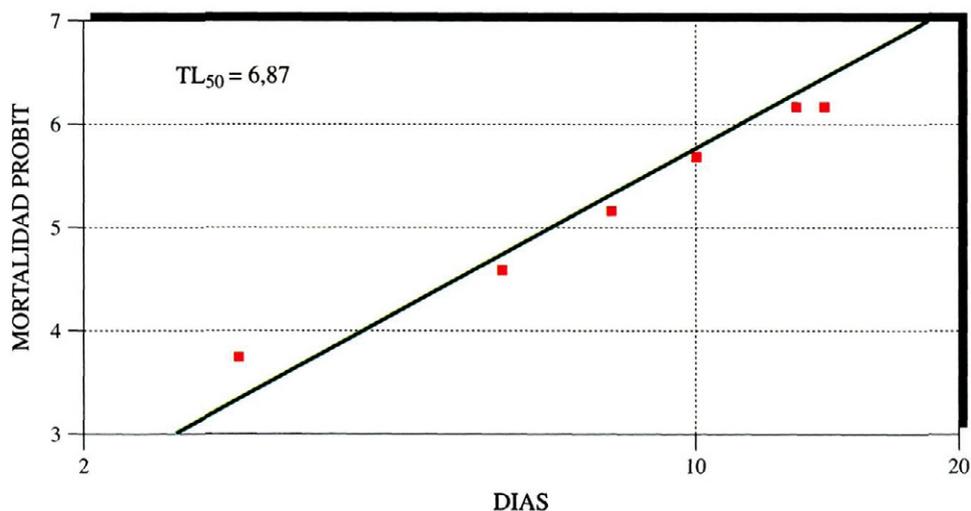


Fig. 1.—Recta probit para la mortalidad en el tiempo de larvas neonatas, a la dosis de 0,1 ppm.

Cuadro 3.-Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera exigua* cuando se exponen larvas de tercer estadio al insecticida RH-5992.

Concentración	N	% de Mortalidad después del tratamiento		
		1 día después	4 días después	5 días después
10.000 ppm	10	90	100	100
1.000 ppm	10	80	80	100
100 ppm	10	60	90	100
10 ppm	10	20	70	100
1 ppm	10	10	60	100
0,1 ppm	10	0	0	0
Control	10	0	0	0

murió tras la emergencia, al dar lugar a adultos inviables (Figura 2).

En cuanto al peso larvario medido cuatro días después de ingerir dieta tratada, encontramos pérdida de peso significativa a partir de 1 ppm. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre la dosis más pequeña y el control, ni entre el resto de las dosis entre sí (Figura 3).

Ensayos con larvas de quinto estadio

Para larvas tratadas en el quinto estadio, necesitamos dosis superiores a 10 ppm, para que la pupación se redujese de forma significativa, (Figura 4) y en la dosis más alta de las ensayadas (10.000 ppm) sólo un 20 % de las larvas puparon con normalidad.

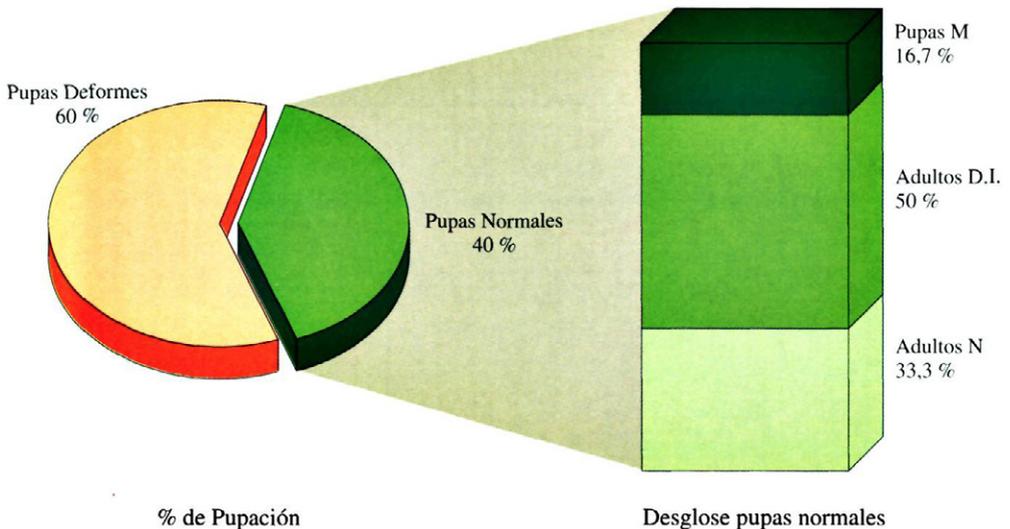


Fig. 2.-Evolución de las pupas normales formadas a partir de larvas de tercer estadio, tratadas a la dosis de 0,1 ppm.

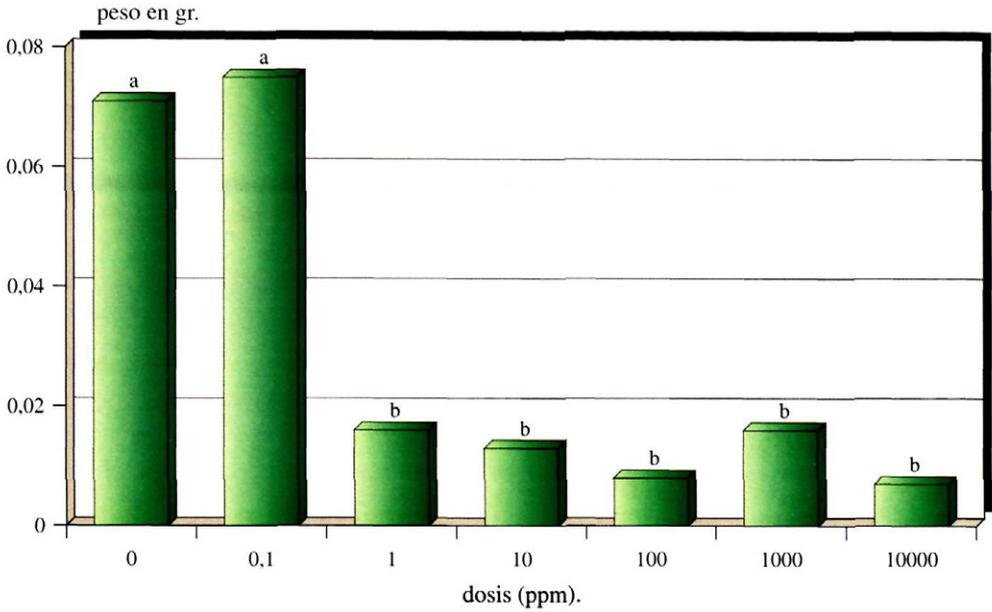


Fig. 3.-Peso de larvas tratadas en tercer estadio, a los cuatro días del tratamiento.

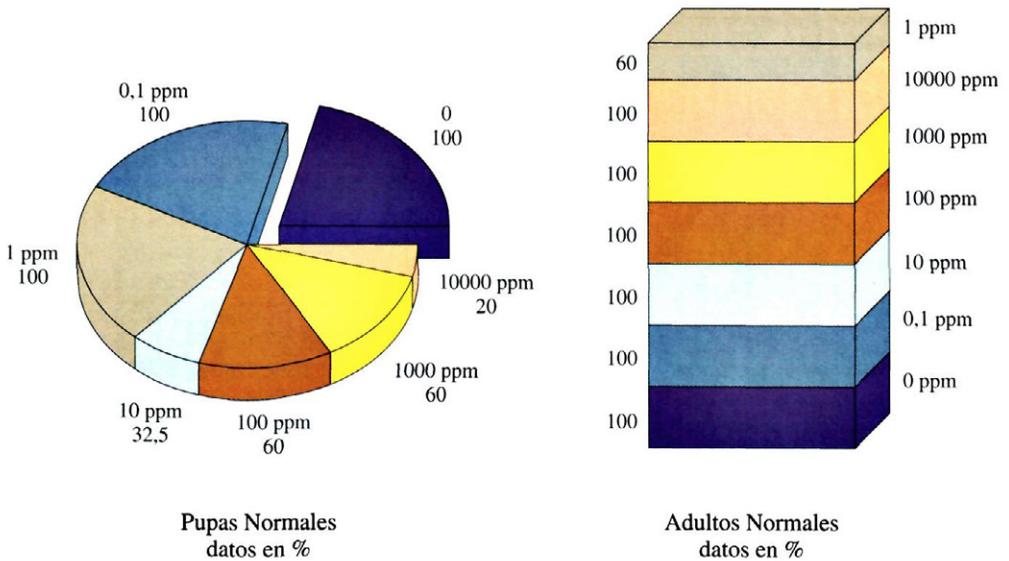


Fig. 4.-Pupas y Adultos normales respecto de larvas tratadas en quinto estadio.

Un efecto a destacar fue la aparición de formas intermedias larva-pupa (que no llegaron a completar la muda) a partir de la dosis de 1.000 ppm. (Figura 5)

Analizado posteriormente el porcentaje de adultos emergidos respecto del total de pupas normales, no encontramos diferencias significativas entre las distintas dosis (excepto 1 ppm) ya que prácticamente todas las pupas formadas dieron lugar a adultos normales con la excepción de la dosis de 1 ppm donde hubo una reducción del 40 %.

DISCUSION

El ecdisoide no esteroide RH-5992 resultó ser muy eficaz contra *Spodoptera exigua*, especialmente cuando se aplicó por ingestión a larvas neonatas, para las cuales se produjeron mortalidades significativas a partir de la dosis de 1 ppm, un día después de tratar, y la mortalidad de todas ellas a los dos días. Esta acción es más efectiva que la observada por CHANDLER, *et al.*, (1992) sobre otros dos noctuidos como son *Helicoverpa zea* (Boddie) y *Spodoptera frugiperda* (Smith). En ambas especies fue necesario alcanzar las 10 ppm para obtener mortalidades significativas al siguiente día del tratamiento y la mortalidad total se produjo a los 3 días, sólo a partir de 1.000 ppm. Estos autores consideran que la concentración de 0,001 % (10 ppm) es factible económicamente para la aplicación en campo.

Por otra parte, la dosis de 0,1 ppm es muy interesante, ya que para ella la TL_{50} es de casi siete días, y se observa una importante pérdida de peso en las larvas, debido a que los insectos cesan de alimentarse (ROHM & HAAS, 1992), lo cual hace que aunque las larvas no estén muertas los daños producidos por ellas se reduzcan de forma significativa.

En el caso de nuestro insecto, a medida que aumenta la edad de las larvas en el mo-



Fig. 5.—Larva tratada en 5.º estadio con 1.000 ppm de RH-5992 que le ha sido incapaz de completar la muda.

mento de tratar, nos encontramos que necesitan dosis más altas y mayor número de días para conseguir iguales niveles de mortalidad. Así, vemos que en las larvas de tercer estadio ocurre un 100% de mortalidad cuando toman la dieta durante cinco días a la dosis de 1 ppm. Para la dosis de 0,1 ppm y también en larvas de 3.º estadio, se observó que parte de las larvas que mudaban a pupa, lo hacían defectuosamente, efecto también citado por SMAAGHE & DEGHELE (1992) con el otro ecdisteroide no esteroide RH-5849, sobre *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Además, tanto en nuestro caso, como en el de estos autores se vuelve a constatar una pérdida de peso en las larvas supervivientes.

En larvas de 5.º estadio, son ya necesarias dosis superiores a 10 ppm, para conseguir una reducción significativa en la pupación. Para dosis más altas (≥ 1.000 ppm) aparecieron individuos intermedios larva-pupa, característicos en tratamientos con otro grupo de RCI: las Benzoilfenil ureas (RETNAKARAN & WRIGHT, 1987).

Otro de los efectos que hemos observado fue también comprobado por WING, *et al.*, (1992) con el ecdisoide no esteroide RH-5849 en *Manduca sexta* y es la incapacidad

para desprenderse de la vieja cutícula, produciéndose una hemorragia y saliendo la hemolinfa al exterior del cuerpo del insecto, emigrando el fluido de la muda a otro lugar y muriendo las larvas antes de completar la muda.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la DGICYT (proyecto AGF93-1174) la financiación del mismo, y a la Compañía Rohm and Haas el suministro del producto.

ABSTRACT

BUDIA, F., MARCO, V. y VIÑUELA, E., 1994. Preliminary studies on effects of RH-5992 on larvae of different age-classes of *Spodoptera exigua* (Hübner). *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**(2): 401-408.

Preliminary studies were carried out in laboratory, to assess the effectiveness of the ecdysone hormone agonist RH-5992 in *Spodoptera exigua* (Hübner). First, third and fifth-instar larvae were exposed to treated medium with a range of doses between 0.1 and 10.000 mg/kg of diet. The insecticide was highly effective against first- and third-instar larvae and a 100 % mortality was observed from 1 ppm onwards three or five days after the treatment respectively. For 0.1 ppm and first-instar larvae, the LT50 was 6.87 days, while for third-instar ones, a 40 % decrease in pupation was recorded and only the 30% of normal pupae gave normal adults. A significant larval loss of weight was observed for these two age-classes. For fifth-instar larvae a significant decrease of pupation was only recorded for doses higher than 10 ppm, although adult emergence was normal.

Key Words: RH-5992, ecdysoids, *Spodoptera exigua*, moulting.

REFERENCIAS

- CHANDLER, L. D.; PAIR, S. D. y HARRISON, W. E., 1992. RH-5992. A new insect growth regulator active against corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, **85**(4): 1.099-1.103.
- FINNEY, D. J., 1971: *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, 3.^a Ed.: 333 pp.
- GRANETT, J., 1987: Potential of benzoylphenyl ureas in integrated pest management. En *Chitin and Benzoylphenylureas*: 283-302. Wright, J. E. & Retnakaran, A. (Eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Netherlands.
- MILLIKEN, G. A.; & JOHNSON, D. E., 1984: *Analysis of messy data*. Volume I: Designed of experiments: 473 pp. Van Nostrand Reinhold. New York.
- MITSUI, T.; 1985. Chitin Synthesis Inhibitors: Benzoylurea Insecticides. *Japan Pesticide Information*: **45**: 3-7.
- PIMENTEL, D., 1981: Introduction. En: *Handbook of pest management in agriculture*. Vol. I" 3-11. Pimentel ed. CTC Press. Florida.
- POITOUT, S. y; BUES, R.; 1974. Elevage de chenilles de vingt-huit espèces de Lépidoptères Noctuidae. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **6**(3): 341-441
- ROHM & HAAS. *Technical Bulletin*. 1992.
- SMAGGHE, G. y DEGHELE, D., 1992: Effects of RH-5849, the first nonsteroidal ecdysteroid agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **21**: 119-128.
- WING, K. D.; SLAWECKI, R. A. y CARLSON, G. R., 1988: RH-5849, A nonsteroidal ecdysone agonist: effects on Larval lepidoptera. *Science*, **241**: 470-472.