

Acción del tebufenocida sobre larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval). Influencia de la forma de aplicación

A. GOBBI, F. BUDIA, G. SMAGGHE y E. VIÑUELA

El tebufenocida incorporado a la dieta de cría larvaria de *Spodoptera littoralis* (Boisduval), a dosis entre 0,001 y 10.000 mg i.a./kg dieta cuando las larvas eran neónatas o de cuarto estadio (L₄), originó un 100% de mortalidad a partir de la dosis de 1 mg i.a./kg dieta al inducir una muda prematura y letal en las mismas. Hasta la dosis de 0,1 mg i.a./kg dieta los insectos lograron alcanzar el estado de pupa, pero hubo un porcentaje significativo de adultos con deformaciones. El insecticida mostró también una ligera acción por contacto residual y una pequeñísima acción tóxica sobre larvas L₃ cuando se aplicó a dosis entre 0,1 y 1.000 mg i.a./l, y los insectos sufrieron anomalías en la pupación y emergencia de adultos. En todos los ensayos se observó una reducción significativa en el peso de las larvas tratadas respecto a los controles.

A. GOBBI: Fac. Ciencias Agrarias UNR Campo Experimental J. Villarino. 2123 Zavalla (Sta. Fé) Argentina.

F. BUDIA y E. VIÑUELA: Protección de Cultivos. E.T.S.I. Agrónomos. 28040-Madrid

G. SMAGGHE: Laboratory of Agrozoology. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Coupure Links 653. B-9000 Gent (Bélgica).

Palabras clave: *Spodoptera littoralis*, tebufenocida, toxicidad, aplicación tóxica, ingestión, contacto residual, larvas.

INTRODUCCIÓN

La utilización de insecticidas clásicos de amplio espectro para controlar los insectos que causan graves daños a los cultivos, ha provocado una serie de problemas tales como residuos, contaminación del medio ambiente, eliminación de fauna útil etc., que es necesario minimizar (PIMENTEL *et al.*, 1991). Por ello, además de mejorar el uso de los insecticidas autorizados, el encontrar nuevas materias activas que sean efectivas en el control de plagas y que sean compatibles con otras técnicas de lucha, se ha convertido en objetivo prioritario de la Protección Integrada (IPM).

El interés en elegir bien la «diana», es decir, el lugar de actuación de los nuevos compuestos que se sintetizan, implica un mayor conocimiento de los mecanismos que

intervienen en la fisiología y el desarrollo de los insectos. En esta línea se están desarrollando desde hace algunos años compuestos que puedan ser empleados en programas de IPM por presentar baja toxicidad para mamíferos, alta selectividad y nuevos modos de acción, como son los compuestos aceleradores de la muda (MAC) (WING *et al.*, 1988; SMAGGHE y DEGHEELE, 1992; SMAGGHE y DEGHEELE, 1994a; ISHAAYA *et al.*, 1995).

Los MAC fueron descubiertos en 1988 por WING y colaboradores, y son un grupo de sustancias no esteroideas, que tienen sin embargo un efecto análogo a la hormona de la muda (HM) o ecdisona de los insectos, y cuya principal actividad insecticida es la de inducir mudas prematuras y letales en los insectos tratados (SMAGGHE *et al.*, 1996; SMAGGHE *et al.*, 1997).

El primer compuesto comercializado dentro del grupo anterior, ha sido el tebufenocida, que es muy selectivo frente a lepidópteros (HELLER *et al.*, 1992) y aunque actúa fundamentalmente por ingestión, también ha manifestado un efecto por contacto residual o aplicación tópica frente a algunas especies. El compuesto ha demostrado ser muy efectivo frente a especies del género *Spodoptera* (BUDIA *et al.*, 1994; SMAGGHE y DEGHEELE, 1994b; SMAGGHE *et al.*, 1996; SMAGGHE *et al.*, 1997), que son plagas importantes de muchos cultivos a nivel mundial.

El objetivo de este trabajo, ha sido determinar la toxicidad del compuesto, en la especie plaga polífaga *Spodoptera littoralis* (Boisduval), por distintos métodos de aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Las larvas del noctuido fueron criadas en el laboratorio de la Unidad sobre una dieta modificada de la propuesta por POITOUT y BUES (1974), a la que se añadía alfalfa molida según describen MARCO *et al.* (1994). Los adultos se alimentaron *ad libitum* con una solución al 10% de miel en agua.

Las condiciones de cría y realización de los ensayos fueron: 25 ± 2 °C; 75% de H.R y 16:8 (L:O).

Insecticida

En los ensayos utilizamos el preparado comercial MIMIC®, SC con una riqueza del 24% en tebufenocida {3,5-acidodimetilbenzoico 1-(1,1dimetil)-2-(4-etilbenzoil) hidracida} suministrado por Rohm & Haas (España).

Método

Para cada ensayo se realizaron tres repeticiones de 10 larvas por dosis y para el testi-

go, de una edad conocida, neonatas o L₄ según el caso. Para obtenerlas, se sembraban huevos de menos de 24 horas de edad sobre papel de filtro en cajas Petri herméticas de 9 cm de diámetro y 3 cm de altura y se observaba diariamente su eclosión.

Según emergían las larvas, las pasábamos con la ayuda de un pincel a cajas herméticas de 12 cm de diámetro y 5 cm de altura con un papel de filtro en el fondo para disminuir la humedad interior y trozos de dieta alimenticia tratada si era un ensayo con neonatas, o sin tratar hasta que llegaban a L₄. La dieta y el papel de filtro se renovaban cada dos días para evitar la aparición de hongos.

Para pupar, se pasaban las larvas maduras de último estadio a cajas de 12 cm de diámetro y 5 cm de altura, que llevaban 2 cm de vermiculita en el fondo, y se añadía un trozo de dieta para que aún pudieran alimentarse si lo deseaban.

Ensayos por Ingestión

Se siguió la técnica de BUDIA *et al.* (1994). El insecticida se disolvió en agua destilada y la cantidad correspondiente de solución insecticida se añadió a la mezcla de agar + agua, después de hervir y cuando se enfriaba a 40 °C, antes de incorporar el resto de los componentes de la dieta.

Se ensayaron una serie de soluciones entre 0,001 y 10.000 mg de ingrediente activo (i.a.)/kg dieta: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1.000 y 10.000.

Según el tipo de ensayo, las larvas se criaron continuamente con dieta tratada, o ésta se añadía cuando mudaban a L₄.

Aplicación tópica

En este caso el insecticida se disolvió en acetona y las dosis ensayadas fueron: 10; 50; 100; 500 y 1.000 mg i.a./l. Gotas de 0,5 µl se depositaron en la región dorsal de las larvas L₄ utilizando un aplicador manual «Arnold» de la casa Burkard.

Una vez tratadas, las larvas se pasaban a cajas de cria análogas a las descritas previamente y se les daba dieta sin tratar hasta la pupación.

Contacto residual

El insecticida se disolvió en agua destilada y el rango de dosis estudiadas fue: 0,1; 1; 10; 50; 100; 500 y 1.000 mg i.a./l.

Se utilizaron cajas desmontables análogas a las descritas por VIÑUELA y JACAS (1994), consistentes en dos placas de cristal de $12 \times 12 \times 5$ mm de grosor y un anillo redondo de metacrilato de 10 cm de diámetro y 3 cm de altura, que se sujetaban con cuatro tornillos situados en los extremos de las placas. El anillo llevaba unos agujeros cubiertos con malla metálica para facilitar la aireación, uno tapado con un corcho para manipular los insectos en su caso y otro tapado con una aguja hipodérmica que se conectaba a una goma y una bomba de acuario, para suministrar un flujo continuo de aire a las cajas.

Las placas se trataron con la torre de Potter a 50kPa de presión, pulverizándose 1 ml de solución insecticida para conseguir un residuo en torno a 1,5 mg/cm². Una vez secas, se armaron las cajas y se depositaron las larvas a razón de 10 por dosis y repetición. También se puso en el centro, un cubo de 1 cm³ de dieta sin tratar como alimento.

Análisis estadístico

El efecto del insecticida se midió evaluando los porcentajes de mortalidad larvaria, los de pupas y adultos emergidos normales, los porcentajes de insectos que intentaron mudar a pupa y no lo consiguieron (larvipupas) y los porcentajes de adultos con deformaciones. Así mismo, y con el fin de conocer si el peso larvario variaba con el tratamiento, muestras de 20 larvas tomadas al azar por cada dosis se pesaron en balanza de precisión, antes del ensayo, y durante los

días siguientes al mismo hasta que alcanzaron el estado de prepupa.

Los resultados obtenidos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y cuando encontramos diferencias significativas ($P \leq 0,5$), se aplicó el test de comparación de medias LSD (MILLIKEN y JOHNSON, 1984).

La relación entre las dosis y la respuesta de los insectos en los diferentes tratamientos, se analizó (cuando se pudo) utilizando el análisis Probit del programa POLO-PC (LEORA-SOFTWARE, 1987).

RESULTADOS

Ensayos por ingestión con larvas neonatas

Mortalidad larvaria en el tiempo

El tebufenocida resultó ser un compuesto muy tóxico para las larvas neonatas a dosis iguales o superiores a 10 mg i.a./kg dieta, pues tan sólo dos días después de la aplicación se registró un 100 % de mortalidad.

El compuesto fue también muy efectivo a dosis más bajas y para 1 mg i.a./kg dieta todas las larvas habían muerto ya a los 5 días de la aplicación del insecticida. Para las dosis entre 0,001 y 0,1 mg i.a./kg dieta la mortalidad fue aumentando a lo largo del tiempo, registrándose en el día 15 diferencias significativas entre todos los tratados y los testigos (cuadro 1).

Efectos en el desarrollo

A los 20 días de comenzado el ensayo, se pasaron las larvas supervivientes a cajas de pupación, registrándose porcentajes de pupación del 93,3% en los testigos y entre el 43% y el 76,7% para las tratadas con dosis de 0,01 y 0,001 mg i.a./kg dieta respectivamente (cuadro 2). Como vemos en el cuadro, además de una reducción en la pupación, hubo también una ligera disminución de la emergencia de adultos normales, ya que en los tes-

Cuadro 1.—Mortalidad larvaria a diferentes intervalos en los tratamientos de larvas neonatas cuando el tebufenocida se incorpora a la dieta de cría

Dosis mg i.a./kg dieta	Al 5° día	Al 10° día	Al 15° día
0	6,6 ± 6,6 a	6,6 ± 6,6 a	6,6 ± 6,6 a
0,001	3,3 ± 3,3 a	3,3 ± 3,3 a	20 ± 0 b
0,01	10 ± 0 ab	13,3 ± 3,3 ab	23,3 ± 6,6 b
0,1	20 ± 5,7 b	23,3 ± 8,8 b	53,3 ± 3,3 c
1	100 ± 0 c	100 ± 0 c	100 ± 0 d

Cada dato corresponde a la media de media de 3 repeticiones ± el error típico.

Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (Anova y LSD).

Cuadro 2.—Efectos en el desarrollo producidos tras la ingestión continua de tebufenocida incorporado a la dieta de cría cuando las larvas eran neonatas

Dosis mg i.a./kg dieta	% larvas muertas	% larvipupas	% pupas	% adultos normales (1)	% adultos deformes (2)
0	6,6 ± 0 a	0 ± 0 a	93,33 ± 6,7 a	100 ± 0 a	0 ± 0 a
0,001	20 ± 0 b	3,3 ± 3,3 a	76,7 ± 3,3 a	65,4 ± 2,96 b	0 ± 0 a
0,01	23,3 ± 6,6 b	33,3 ± 3,3 b	43,3 ± 3,3 b	53,3 ± 3,3 b	15 ± 7,63 b
0,1	53,3 ± 3,3 c	3,3 ± 3,3 a	43,3 ± 6,7 b	73,3 ± 11,77 b	6,6 ± 1,66 b

Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (Anova y LSD).
Cada dato corresponde a la media de 3 repeticiones ± el error típico.

(1) (2) referido al total de pupas.

tigos la emergencia alcanzó el 100% y en los tratados osciló entre el 53,3 y el 73,3%. También se obtuvieron pequeños porcentajes de larvipupas y de adultos deformes.

Si analizamos en conjunto la mortalidad diferida a lo largo de todo el desarrollo (figura 1), vemos que el tebufenocida tuvo un efecto muy perjudicial sobre las larvas de *S. littoralis*, ya que alcanzó valores entre el 50 y el 70% para las dosis iguales o inferiores a 0,1 mg i.a./kg dieta y del 100% para las superiores (que no aparecen representadas en la figura).

Ensayos por ingestión con L₄

Mortalidad larvaria en el tiempo

La mortalidad registrada en las larvas L₄ después de alimentarse con dieta tratada 4, 6

y 8 días, está representada en el cuadro 3. Como se observa, con las dosis altas (entre 100 y 10.000 mg i.a./kg dieta) hay ya mortalidad apreciable al cuarto día (del 10 al 40%), y al sexto, están todas las larvas muertas.

Con las dosis más bajas sin embargo, el efecto tarda algo más en manifestarse y así hasta el octavo día no hay mortalidad en las dosis iguales o inferiores a 0,1 mg i.a./kg dieta, y ésta es además muy baja (inferior al 5%). Para las dosis intermedias (0,1 y 1 mg i.a./kg dieta) la mortalidad alcanza también valores notables al octavo día (62,5 y 87,5% respectivamente). La mortalidad del testigo fue por el contrario nula en este período.

Reducción de peso larvario

Las larvas tratadas en L₄ experimentaron una reducción significativa de peso respecto

Cuadro 3.-Mortalidad larvaria a diferentes intervalos en el tratamiento de larvas L₄ cuando el tebufenocida se incorpora a la dieta de cría

Dosis mg i.a./kg dieta	Al 4º día	Al 6º día	Al 8º día
0	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± a
0,001	0 ± 0 a	0 ± 0 a	2,5 ± 2,5 a
0,01	0 ± 0 a	0 ± 0 a	5 ± 2,9 a
0,1	0 ± 0 a	0 ± 0 a	5 ± 5 a
1	0 ± 0 a	45 ± 5 c	62,5 ± 2,5 b
10	0 ± 0 a	30 ± 7,1 b	87,5 ± 2,5 c
100	10 ± 5,8 b	100 ± 0 d	100 ± 0 d
1000	17,5 ± 2,5 c	100 ± 0 d	100 ± 0 d
10000	40 ± 0 d	100 ± 0	100 ± 0 d

Cada dato es media de cuatro repeticiones ± error típico.

Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (ANOVA y LSD).

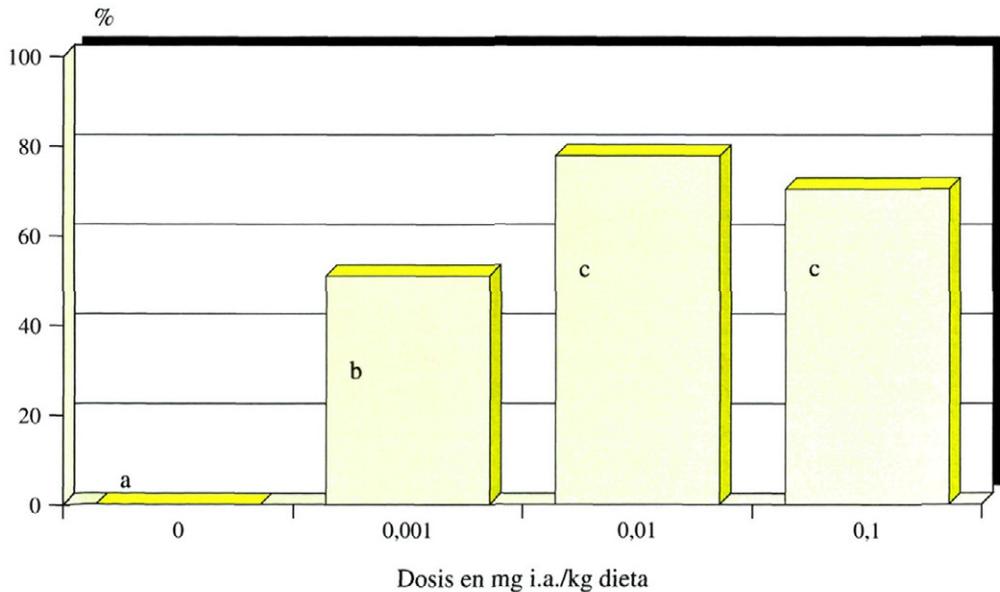


Fig. 1.-Mortalidad diferida a lo largo del desarrollo cuando las larvas neonatas se crían en dieta tratada con tebufenocida.

a los testigos, medida a los dos y seis días de ingerir la dieta tratada, que para las dosis altas llegó a ser cercana al 80% y para las intermedias del 50%, mientras que para las bajas fue inferior al 20% (Figura 2).

Efectos en el desarrollo

El porcentaje de larvas que son capaces de alcanzar el estado de pupa y el de adultos emergidos, aparece en el cuadro 4, junto con

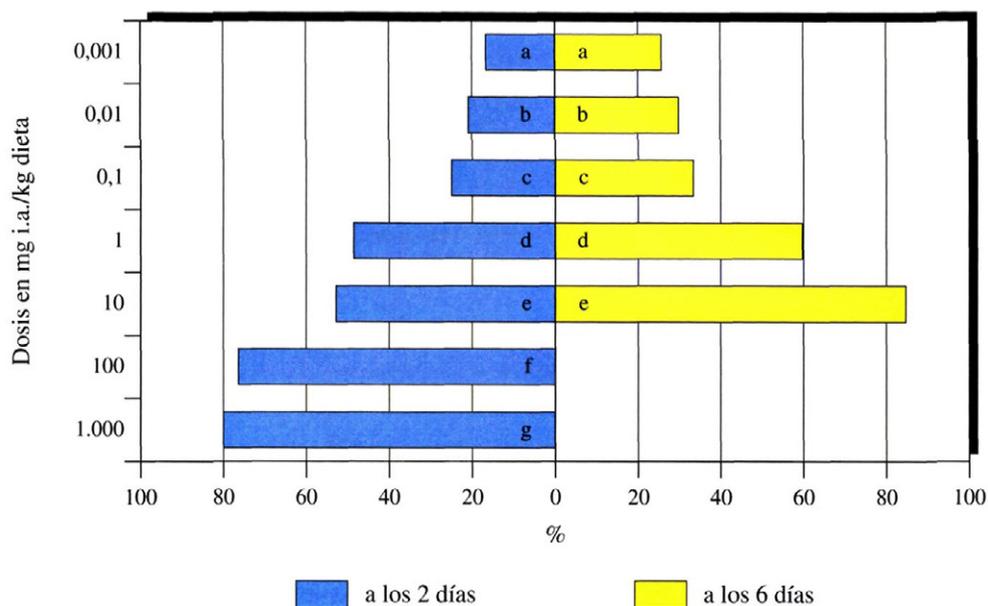


Fig. 2.—Reducción del peso larvario cuando las larvas L_4 se crían en dieta tratada con tebufenocida.

Cuadro 4.—Efectos en el desarrollo cuando las larvas L_4 se crían en dieta tratada con tebufenocida

Dosis mg i.a./kg dieta	% pupas totales	% mortalidad pupal	% adultos normales (1)	% adultos deformes (2)
0	100 ± 0 a	0 ± 0 a	100 ± 0 a	0 ± 0 a
0,001	97,5 ± 2,5 a	2,5 ± 2,5 a	91,9 ± 2,6 ab	5,6 ± 3,8 a
0,01	95 ± 2,8 a	7,5 ± 4,7 a	86,8 ± 6,2 ab	5,6 ± 3,8 a
0,1	95 ± 5 a	7,5 ± 7,5 a	75,8 ± 9,2 b	16,7 ± 2,4 b

Cada dato corresponde a la media de 4 repeticiones ± el error típico.

Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (Anova y LSD).

(1) (2) Referidos a pupas totales.

los adultos deformes. Algunas larvas al mudar, expulsaron parcialmente el intestino por el ano, con lo cual tendían a pegarse a las cajas de ensayo y su movilidad se veía limitada (figura 3).

Como vemos, en las dosis en que no murieron todas las larvas (por debajo de 0,1 mg i.a./kg dieta), el número de las mismas que llegan a pupar es muy elevado, superior

al 95%. Hay sin embargo una reducción en el número de adultos que emergen de ellas (100% en testigos y entre el 75,8 y el 91,9% en los tratados) y muchos de ellos, aunque consiguen eclosionar tienen alguna malformación y acaban muriendo: no son capaces de extender las alas o no se desprenden totalmente de los restos del pupario (figura 4).



Fig. 3.-Expulsión del Intestino al exterior en los tratamientos de larvas L₄ por ingestión.



Fig. 4.-Adultos con malformaciones en los tratamientos de larvas neonatas por ingestión.

Aplicación tópica a L₄

Mortalidad larvaria en el tiempo

En el cuadro 5 se recogen los datos de mortalidad larvaria a lo largo del tiempo cuando aplicamos tópicamente el insecticida a larvas L₄.

Como se observa, el insecticida no tuvo una buena acción tópica pues a los tres días del tratamiento la mortalidad era tan sólo del 20% para la dosis más alta de las estudiadas (1.000 mg i.a./l) y a los 7 días en las dosis iguales o inferiores a 100 mg i.a./l no superó el 10,5%.

A los datos de mortalidad obtenidos a los cuatro días después de aplicado el insecticida, se ajustó una recta probit ($b = 2$; $\chi^2 = 5,69$; 3 g.l.), obteniéndose una DL₅₀ de 1.367,7 mg i.a./l (límites fiduciales 95% = 859,3; 5444,5).

Reducción del peso larvario

Analizamos también la pérdida de peso de las larvas tratadas con respecto al control a los 3 días de estar en contacto con el insecticida (figura 5), alcanzando valores entre el 34,9 % para la dosis menor y el 83% para la más alta de las aplicadas.

Cuadro 5.-Mortalidad larvaria a diferentes intervalos cuando el tebufenocida se aplica tópicamente a L₄

Dosis mg i.a./l	A los 3 días	A los 4 días	A los 5 días	A los 6 días	A los 7 días
0	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
10	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
50	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	4 ± 2,1 ab
100	0,75 ± 0,75 a	2,5 ± 1,6 ab	8,7 ± 2,8 b	8,7 ± 2,8 b	10,5 ± 3,3 b
500	5,7 ± 3,3 a	13 ± 0 b	34,7 ± 2,8 c	47,5 ± 5,5 c	68,5 ± 6,9 c
1000	20 ± 4,4 b	42 ± 8,8 c	88 ± 3,1 d	93 ± 1,7 d	100 ± 0 d

Cada dato corresponde a la media de 4 repeticiones ± el error típico. Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (Anova y LSD).

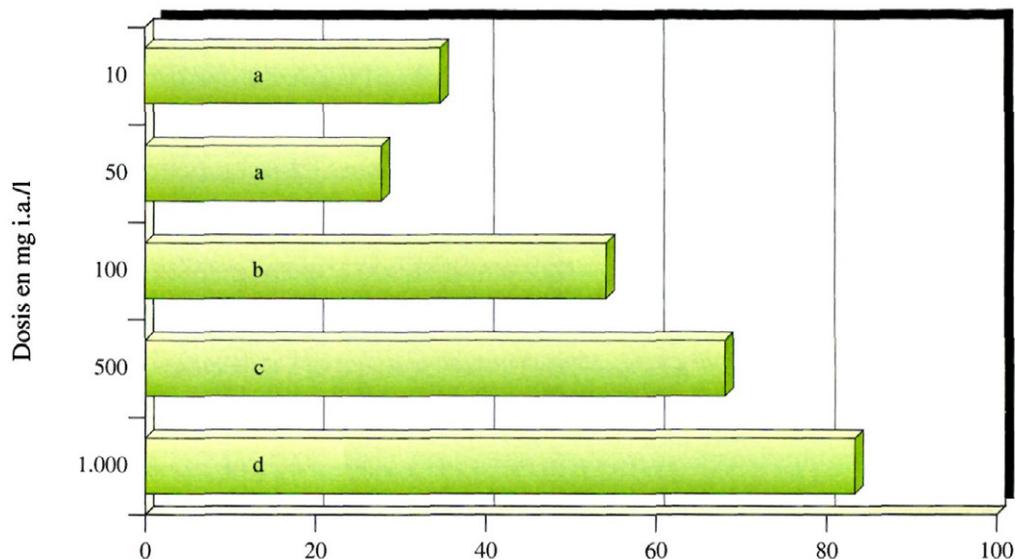


Fig. 5.—Reducción del peso en las larvas L_4 a los 3 días del tratamiento tópico con tebufenocida.

Contacto residual en L_4

Mortalidad larvaria

En el cuadro 6 se recogen los datos de mortalidad larvaria a lo largo del tiempo cuando el tebufenocida se aplicaba por contacto residual a larvas L_4 .

Las concentraciones del insecticida por debajo de 10 mg i.a./l no originaron mortalidad y a partir de 50 mg i.a./l, ésta aumentó en relación creciente con las dosis y el tiempo, alcanzándose casi el 100% para las dosis más altas (500 y 1.000 mg i.a./l), a los cinco días.

Con los datos de mortalidad a los tres días, se ajustó una recta de regresión probit

Cuadro 6.—Mortalidad larvaria a lo largo del tiempo cuando el tebufenocida se aplica por contacto residual a larvas L_4

Dosis mg i.a./l	A las 24 h.	A los 2 días	A los 3 días	A los 4 días	A los 5 días
0,1	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
1	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
10	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
50	0 ± 0 a	0 ± 0 a	3,3 ± 1,6 a	5 ± 2,8 a	10 ± 2,8 b
100	0 ± 0 a	5 ± 0 b	10 ± 2,8 b	23,3 ± 6 b	45 ± 8,6 c
500	8,3 ± 1,6 b	21,6 ± 1,6 c	53,3 ± 1,6 c	80 ± 0 c	98,3 ± 1,6 d
1000	21,6 ± 1,6 b	51,6 ± 1,6 d	71,6 ± 1,6 d	100 ± 0 d	100 ± 0 d

Cada dato corresponde a la media de 3 repeticiones ± el error típico.

Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (Anova y LSD).

($b = 1,88$; $\chi^2 = 0,16$; 5 g.l.), obteniéndose una DL_{50} de 474,31 mg i.a./l (límites fiduciales 374,39; 618,93).

También, y para la dosis de 100 mg i.a./l se pudo ajustar otra recta probit ($b = 5,59$; $\chi^2 = 9,02$; 7 g.l.) y se calculó una TL_{50} de 4,99 días (límites fiduciales 4,60; 5,40).

Reducción del peso larvario

En la figura 6 tenemos los datos correspondientes a la reducción del peso, dos días después de estar en contacto con el insecticida. Como vemos las larvas tratadas pierden peso significativamente respecto a los controles, prácticamente para todas las dosis, alcanzando la reducción un 71% para la dosis de 1.000 mg i.a./l.

Efectos diferidos

El simple contacto con el tóxico afecta de tal manera a las larvas que además de pro-

vocar una mortalidad directa en éstas, ocasiona la aparición de diversas malfomaciones en las mudas al estado pupal y adulto como larvipupas (figura 7), adultos con restos del pupario adherido, o con las alas sin extender (figura 8).

La mortalidad producida en diferentes momentos a lo largo del desarrollo la tenemos representada en el cuadro 7. Como vemos, el tebufenocida aplicado por contacto residual tuvo un efecto ligero en la pupación y los porcentajes obtenidos a los seis días después de estar en contacto con el insecticida, fueron semejantes a los de los testigos para las dosis bajas, habiendo una ligera disminución únicamente en 1.000 mg i.a./l. El insecticida también tuvo un efecto en la muda a adulto, aunque una vez más ligero, y sólo hubo reducciones importantes en la emergencia para la dosis más alta (1.000 mg i.a./l).

La mortalidad diferida total a lo largo del desarrollo, se representa en figura 9, donde vemos que para las dosis inferiores a 10 mg i.a./l fue muy baja, mientras que para 50 mg i.a./l alcanzó casi el 60%.

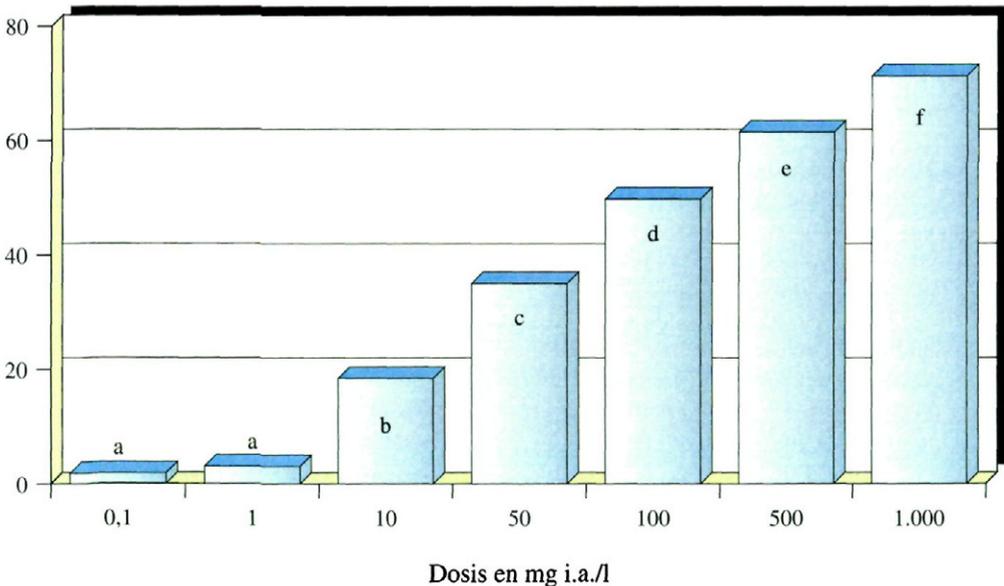


Fig. 6.-Reducción del peso en las larvas L_4 a los 3 días del tratamiento por contacto residual con tebufenocida.



Fig. 7.—Larvipupa en el tratamiento de L₄ por contacto residual con tebufenocida.

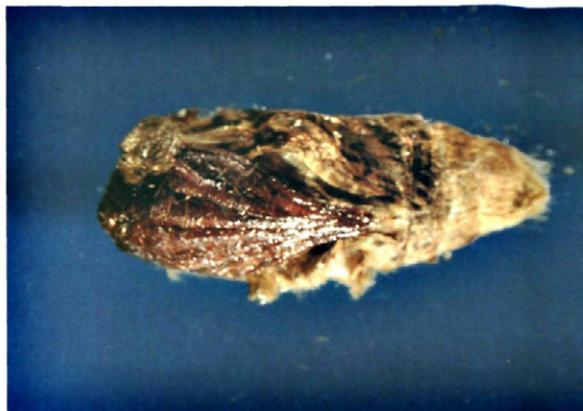


Fig. 8.—Adultos con restos de pupario en el tratamiento de L₄ por contacto residual con tebufenocida.

Cuadro 7.—Efectos en el desarrollo cuando el tebufenocida se aplica por contacto residual a larvas L₄

Dosis mg i.a./l	% larvipupas	% pupas	% mortalidad pupal	% adultos normales (1)	% adultos deformes (2)
0	0 ± 0 a	100 ± 0 a	0 ± 0 a	100 ± 0 a	0 ± 0 a
0,1	0 ± 0 a	100 ± 0 a	0 ± 0 a	90 ± 2,9 ab	10 ± 2,9 b
1	1,7 ± 1,7 a	98,3 ± 1,6 a	0 ± 0 a	86,7 ± 1,7 ab	11,7 ± 1,7 b
10	11,7 ± 1,7 b	88,3 ± 1,6 b	0 ± 0 a	80 ± 2,9 b	8,3 ± 1,7 b
50	18,3 ± 4,4 b	71,7 ± 6,7 c	31,7 ± 7,3 b	40 ± 13,2 c	0 ± 0 a

Dentro de cada columna los valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente al 5% (Anova y LSD). Cada dato corresponde a la media de 3 repeticiones ± el error típico.

(1) (2) Referidos a larvas tratadas.

El tebufenocida tuvo mejor acción por contacto residual que cuando se aplicaba tópicamente a las larvas, como podemos ver en la figura 10 donde se representa la mortalidad obtenida en ambos tratamientos a los tres días, para las diferentes dosis. Esto queda también patente en la figura 11 donde aparecen las mortalidades registradas a diferentes intervalos (3, 4 y 5 días) para la dosis de 500 mg i.a./l en ambos tratamientos.

DISCUSIÓN

El tebufenocida resultó ser muy eficaz contra *S. littoralis* por ingestión, mientras

que aplicado tópicamente o por contacto residual, sólo tuvo un ligero efecto que fue algo más importante en el último caso. Esto contrasta con los resultados obtenidos en larvas de tercer estadio de *Spodoptera exigua* (Hübner) por SMAGGHE *et al.* (1994c), porque en esta especie el insecticida tuvo una acción similar por ingestión o aplicado tópicamente, y sólo por contacto residual fue menos activo.

Cuando las larvas ingirieron el tebufenocida en la dieta, dosis bajas bastaron para dar porcentajes de mortalidad importantes, y cuanto mayores eran las larvas más cantidad de insecticida había que aplicar para tener igual efecto. Esto está de acuerdo con lo ob-

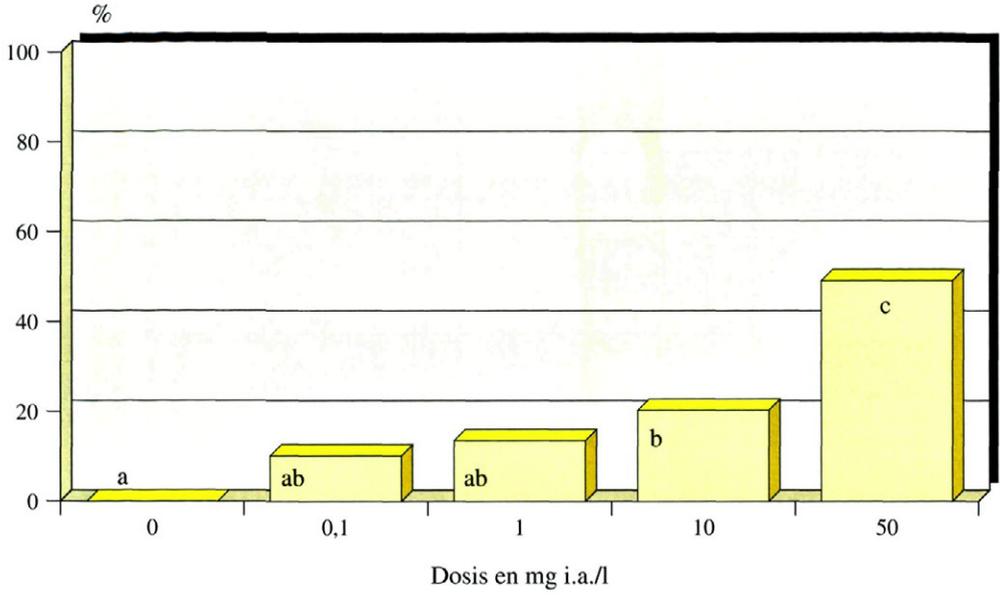


Fig. 9.-Mortalidad diferida en el tratamiento de larvas L₄ por contacto residual

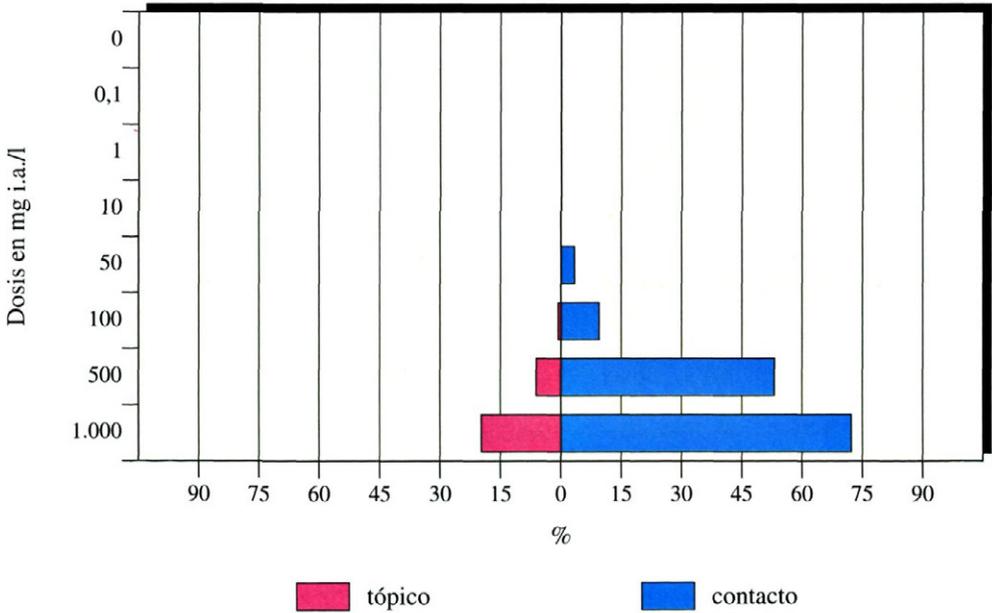


Fig. 10.-Comparación de la mortalidad a los 3 días en los tratamientos de larvas L₄ por aplicación tópica y contacto residual

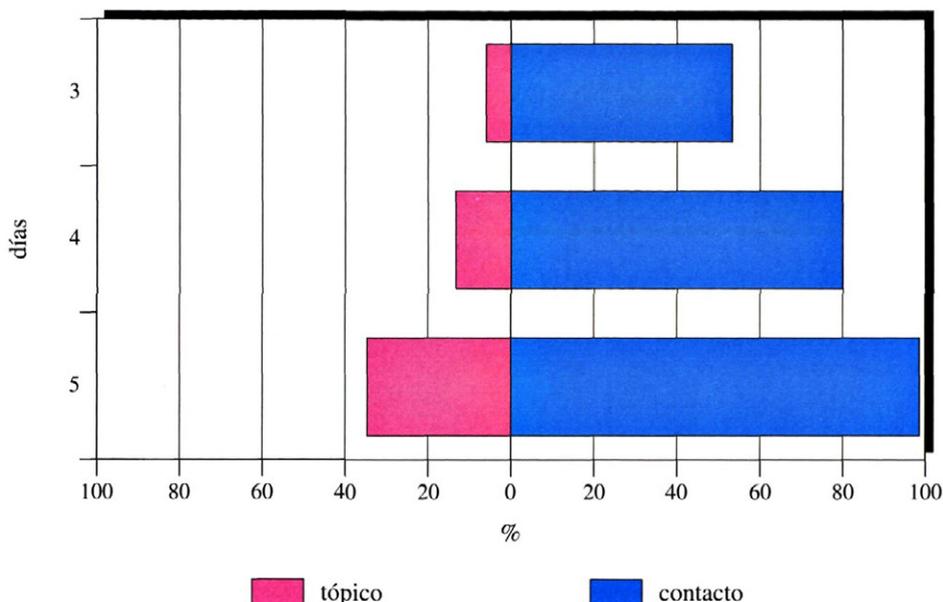


Fig. 11.—Comparación de la mortalidad a los 3, 4 y 5 días, para la dosis de 500 mg i.a./l, en los tratamientos de L₄ por contacto residual y tópico

servado en otras especies del género por varios autores: en *S. exigua* por BUDIA *et al.* (1994) y en esa especie y en *S. exempta* (Walker) por SMAGGHE (1995).

Un efecto muy notable en los tratamientos de ingestión, fue la gran pérdida de peso que experimentaron las larvas tratadas respecto a los controles. Esto podría ser debido a un efecto antiapetitivo primario, pero el insecticida no parece tener un efecto disuasorio de la alimentación, ya que en ensayos de elección con discos de *Taraxacum dens-leonis* Desf., las larvas se alimentaban por igual de los testigos y de los tratados con tebufenocida (BUDIA, comunicación personal).

Por tanto, la pérdida de peso observada, parece deberse en nuestros ensayos a efectos antiapetitivos secundarios. El tebufenocida es un agonista de la hormona de la muda, y el efecto inmediato que produce en las larvas tratadas es una parada de la alimentación porque éstas se preparan para mudar, habiendo una apólisis prematura y una sobreactivación de las células epidérmicas,

lo que da como resultado la formación de una nueva cutícula en los insectos sin que se haya desprendido totalmente la vieja (SMAGGHE, 1995).

En este estudio con *S. littoralis*, no hemos hecho observaciones al microscopio electrónico, pero se ha comprobado que el tebufenocida produce diversas alteraciones internas en las larvas tanto de *S. exigua* como de *Chrysodeixis chalcites* Esper (SMAGGHE *et al.* 1996, 1997) cuando se alimentan de dieta tratada con el insecticida, tales como degeneración mitocondrial, hipertrofia del aparato de Golgi, o aumento de las vacuolas en las células epidérmicas. Igualmente bajo el microscopio electrónico de barrido y en *Cydia pomonella* Linnaeus tratada con tebufenocida, hemos visto otras alteraciones que también habría que tener en cuenta, como son la incapacidad de las larvas para desprenderse de la cápsula cefálica, o la alteración en la orientación de las mandíbulas (VIÑUELA *et al.*, 1996). Además en *S. littoralis* lo que si vimos bajo el microscopio

óptico, fue diversas malformaciones en algunas de las larvas tratadas que podrían haber contribuido a la falta de alimentación: prolapso del intestino, pérdida de fluidos corporales y menor movilidad.

Algunos de los daños observados en las larvas de *S.littoralis* han sido descritos para otras especies, pero no sólo tras la aplicación del tebufenocida o del anterior ecdisteroide experimental RH-4859, sino también tras la aplicación de fitoecdisteroides. Así QUACK *et al.* (1995) observan la expulsión del intestino por el ano en *Chironomus tentans* Fabricius tratado con los dos ecdisteroides citados antes, pero VOGT *et al.* (1998) también lo observan cuando las larvas del depredador polífago *Chrysoperla carnea* Stephens eran tratadas con azadiractina, un antiecdisoide aislado del árbol del neem. Igualmente, MONDY *et al.* (1997) vieron que las larvas de *Lobesia botrana* (Den. Schiff.) tratadas con extractos de la compuesta *Serratula tinctoria* también perdían fluidos corporales.

La reducción de peso se ha observado también en los ensayos tópicos y de contacto residual, y aquí los insectos pierden peso aunque se alimentan de dieta no tratada, luego la única razón parecen ser el efecto antiapetitivo secundario quizás como consecuencia también de las alteraciones internas causadas por el insecticida. Según estos resultados, todo parece indicar que el insecticida es capaz de penetrar a través del tegumento de las larvas y de provocares daños, que aunque no son tan importantes como para dar una elevada mortalidad, si se manifiestan en la pérdida de peso y en una dismi-

nución del número de pupas y adultos obtenidos. Efectos similares se han observado en *C. carnea* cuando la azadiractina se aplicaba por contacto residual a las larvas jóvenes y bajo el microscopio electrónico se vieron alteraciones en el tegumento y músculos (VOGT *et al.*, 1998).

La aplicación del tóxico por contacto residual resulto ser algo más eficaz que la tópica, para larvas de la misma edad y una de las razones podría ser el mayor periodo de tiempo que pasan los insectos en contacto con el tebufenocida en el primer caso. Mientras que en los tratamientos tópicos, las larvas sólo están en contacto con el insecticida en el momento de la aplicación, en los de contacto residual lo están durante todo el desarrollo larvario.

Otro de los efectos observados fue la incapacidad de los insectos de superar la ecdisis, tanto de larva a pupa como de pupa a adulto, según los casos, apareciendo formas intermedias entre los dos estados. Estos efectos son comunes a los descritos en muchas otras especies tras la aplicación tanto del tebufenocida (BUDIA *et al.* 1994; SMAGGHE *et al.*, 1994a, b, c; SMAGGHE, 1995) como del ecdisteroide experimental RH-5849 (WING *et al.*, 1988; SMAGGHE y DEGHEELE, 1992).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Rohm & Haas España, el suministro del insecticida para los ensayos. Este trabajo fué financiado en parte, por el proyecto de la CAICYT AGF93-1174.

ABSTRACT

GOBBI, A.; BUDIA, F.; SMAGGHE, G.; VIÑUELA, E., 1998: Effects of tebufenozide on *Spodoptera littoralis* (Boisduval) larvae. Influence of different application techniques. *Bol. San. Veg. Plagas*, **24**(1): 41-56.

Effects of tebufenozide (3,5-acidodimetilbenzoico 1-(1,1 dimetiletil)-2-(4-etilbenzoil) hidracida), on neonate and L₄ larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) have been evaluated in laboratory with different application techniques: residual contact, topical application and ingestion via treated diet. The range of concentrations studied varied between 0.001 and 10,000 mg a.i./kg. diet in ingestion studies and between 0.1 and 1,000 mg a.i./l in topical and residual contact ones. Tebufenozide was very effective by ingestion in the two larval instars and a 100% mortality was scored from 1 mg a.i./kg.diet onwards. Up to 0.1 mg a.i./kg. diet, insects reached the pupal stage, but a significant percentage of adults exhibited some malformations. Tebufenozide also had a slight residual contact action and a minor topical action on L₄ larvae and several abnormalities during the moult in to pupal and adult stage were observed. A significant inhibition of larval weight gain was also observed in every test.

Key words: *Spodoptera littoralis*, tebufenozide, toxicity, ingestion, residual contact, topical application, larvae.

REFERENCIAS

- BUDIA, F.; MARCO, V. y VIÑUELA, E., 1994: Estudios preliminares de los efectos del insecticida RH-5992 sobre larvas de distintas edades de *Spodoptera exigua* (Hübner). *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**: 401-408.
- CARLSON, G.R.; DHADIALLA, T. S.; THOMPSON, C.; RAMSAY, R.; THIRUGNAMAM, M.; JAMES, W. y SLAWECKUI, R., 1994: Insect toxicity, metabolism and receptor binding characteristics of the non-steroidal ecdysone agonist, RH-5992. *Proc. XIth Ecdysone Workshop*. Ceske Budejovice, 43.
- HELLER, J. J.; MATTIODA, H.; KLEIN, E. y SAGENMÜLLER, A., 1992: Field evaluation of RH-5992 on lepidopterous pests in Europe. *Proc. Brighthon Crop Prot. Conf. Pests Dis.*, **1**: 59-66.
- ISHAAYA, I.; YABLONSKI, S. y HOROWITZ, A. R., 1995: Comparative toxicity of two ecdysteroid agonist, RH-2845 and RH-5992, on susceptible and pyrethroid-resistant strains of the egyptian cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis*. *Phytoparasitica*, **23**(2): 139-145.
- JACAS, J. y VIÑUELA, E., 1994: Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor*, a parasitoid of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Biocontrol Sci. Technol* **4**: 147-154.
- LEORA-SOFTWARE, 1987: POLO-PC, user's guide to probit or logit analysis, pp. 1-13, LeOra Software Inc., Berkeley, CA.
- MARCO, V.; DEL ESTAL, P.; BUDIA, F.; ADÁN, A.; JACAS, J. y VIÑUELA, E., 1994: Efectos del RCI Hexaflumuron sobre larvas de último estadio de *Spodoptera exigua*. Comparación de la actividad por contacto e ingestión. *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**: 389-399.
- MILLIKEN, G. A. y JOHNSON, D. E., 1984: *Analys of messy data*. Vol I: Designed of experiments 473 pp. Van Nostrand Reinhold. New York. U.S.A.
- MONDY, N.; CAÏSSA, C.; PITOIZET, N.; DELBECQUE, J. P. y CORIO-COSTET, M. F., 1997: Effects of the ingestion of *Serratula tinctoria* extracts, a plant containing phytoecdysteroids, on the development of the vineyard pest *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Archives of insect Biochemistry and Physiology*. **35**: 227-235.
- PIMENTEL, D.; MCLAUGHLIN, L.; ZEPP, A.; LAKITAN, B.; KRAUS, T.; KLEIMAN, P.; VANCINI, F.; ROADS, W. J.; GRAAP, E.; KEETO, S. y SELIG, G., 1991: Environmental and economic effects of reducing pesticide use. *BioScience* **41**: 402-409.
- POTOUT, S. y BUES, R., 1974: Elevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **6** (3): 341-411.
- QUACK, S.; FRETZ, A.; SPINDLER-BARTH, M. y SPINDLER, K., 1995: Receptor affinities and biological responses of nonsteroidal ecdysoid agonist on the epithelial cell line from *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Eur. J. Entomol.*, **92**: 341-347.
- SMAGGHE, G., 1995: Nonsteroidal ecdysteroid agonist: Biological activity and insect specificity. *Tesis Doctoral*. 119 pp. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Gent (Bélgica).
- SMAGGHE, G. y DEGHELE, D., 1992: Effects of RH-5849, the first nonsteroidal ecdysteroid agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **21**: 119-128.
- SMAGGHE, G. y DEGHEELE, D., 1994a: Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pestic. Sci.* **42**: 85-92.
- SMAGGHE, G. y DEGHELE, D., 1994b: The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biologi-

- cal activity of RH-5992 (tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **49**: 224-234.
- SMAGGHE, G.; DEGHEELE, D.; VIÑUELA, E. y BUDIA, F., 1994: Potency and ultrastructural effects of Tebufenozide on *Spodoptera exigua*. *Proc. Brighthon Crop Prot. Conf. Pests Dis.* **2**: 339-340.
- SMAGGHE, G.; VIÑUELA, E.; BUDIA, F. y DEGHEELE, D., 1996: In vivo and in vitro effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist Tebufenozide on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: An ultrastructural approach. *Archives of insects Biochemistry and Physiology*, **32**: 121-134.
- SMAGGHE, G.; VIÑUELA, E.; BUDIA, F. y DEGHEELE, D., 1997: Effects of the non-steroidal ecdysteroid Mimic Tebufenozide on tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae): An ultrastructural analysis. *Archives of insects Biochemistry and Physiology* **35**: 179-190.
- VIÑUELA, E.; SMAGGHE, G.; BUDIA, F.; AVILLA, J. y DEGHEELE, D., 1996: Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide in *Cydia pomonella* larvae is related to premature moulting and arrest of feeding: an ultrastructural analysis. *In Proceedings of XX International Congress of Entomology.* **19-022**. Firenze, Italy.
- VOGT, H.; GONZÁLEZ, M.; ADÁN, A.; SMAGGHE, G. y VIÑUELA, E., 1998: Efectos secundarios de la azadiractina, via contacto residual, en larvas jóvenes del depredador *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae). *Bol. San. Veg. Plagas* (en prensa).
- WING, K. D.; SLAWECKI, R. y CARLSON, G. R., 1988: RH-5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval Lepidoptera. *Science.* **241**: 470-472.

(Recepción: 20 enero 1998)

(Aceptación: 20 febrero 1998)

