

Estudios de resistencia a tebufenocida en *Spodoptera exigua* (Hübner [1808])

G. SMAGGHE, P. MEDINA, S. SCHUYESMANS, L. TIRRY y E. VIÑUELA

Las CL₅₀ calculadas para diversas poblaciones de *Spodoptera exigua* recogidas en invernaderos de España, Holanda y Bélgica, mostraron que su susceptibilidad frente al Tebufenocida fue similar a la de la población de laboratorio usada de referencia, oscilando los factores de resistencia entre 2,1 y 5,4.

Los resultados obtenidos indican que con la finalidad de vigilar el desarrollo de resistencia en poblaciones de esta especie, se podría usar una dosis discriminatoria de 3 mg i.a./l en ensayos de toxicidad sobre dieta artificial.

La toxicidad larvaria (medida por medio de la CL₅₀) está estrechamente relacionada en las diferentes poblaciones con la actividad de las enzimas oxidasas. La regresión lineal obtenida ($R^2 = 0,89$) sugiere que la menor toxicidad del insecticida podría ser debida al incremento de la oxidación del mismo.

Basándonos en los resultados, todo parece indicar que se podría usar como nivel crítico para vigilar el desarrollo de resistencia en esta especie una dosis de 12-15 nmol/mg.proteína.min, pero es necesario comprobar ésta hipótesis en mayor número de poblaciones.

G. SMAGGHE, S. SCHUYESMANS y L.TIRRY: Laboratory of Agrozoology. Coupure Links 653. B-9000. Gent. Belgium.

P. MEDINA y E. VIÑUELA: Protección de Cultivos. E.T.S.I. Agrónomos, Ciudad Universitaria s/n. E-28040. Madrid. España.

Palabras clave: *Spodoptera exigua*, tebufenocida, resistencia, poblaciones campo.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas principales derivados del uso de insecticidas es el desarrollo de resistencia por parte de las poblaciones plaga, habiéndose manifestado este fenómeno también hacia modernos insecticidas tales como los reguladores del crecimiento de los insectos (RCI) o el biológico *Bacillus thuringiensis* Berliner (TABASHNIK y ROUSH, 1990; VIÑUELA, 1998a). Como se ha comprobado en el pasado con la mayor parte de los insecticidas, cuando un nuevo producto es introducido en el mercado mantiene su eficacia durante un cierto tiempo, pero después y como consecuencia de su uso indiscrimina-

do, ésta decae al inducirse el desarrollo de resistencia en las poblaciones tratadas.

Se plantea, por tanto, la urgente búsqueda de un nuevo, seguro y eficaz insecticida que controle estas poblaciones, lo que muchas veces se ve enormemente dificultado por la existencia de resistencia cruzada (GEORGHIOU, 1986). Además, suele ocurrir que en los cultivos donde más se necesita la introducción de un nuevo insecticida para controlar una o varias plagas, es donde hay más riesgo de aparición de resistencia. Por estas razones, la resistencia es considerada hoy día como un problema inherente al uso de insecticidas, constituyendo un factor limitante de primer orden en la protección de cultivos (DHADIA-

LLA *et al.*, 1997; URECH *et al.*, 1997; CAHILL y DENHOLM, 1998; DELHOLM *et al.*, 1998).

En el caso de *Spodoptera exigua* (Hübner), una plaga polífaga de importancia mundial en horticultura y otros cultivos (VIÑUELA *et al.*, 2000), científicos y agricultores han verificado el desarrollo de resistencia a organofosforados, carbamatos, *B. thuringiensis* (ROBB y PARELLA, 1984; CHAUFAY y FERRON, 1986; YOSHIDA y PARELLA, 1987; BREWER y TRUMBLE, 1989; MOAR *et al.*, 1994; VAN LAECKE *et al.*, 1995) o varios piretroides y RCI del tipo de las benoilfenilureas como el teflubenzurón flufenoxurón (SMAGGHE y TIRRY, 1998; VIÑUELA, 1998a,b). TORRES-VILA *et al.* (1998) encontraron igualmente que poblaciones de este insecto provenientes de campos de tomate del sur de España eran altamente resistentes al lindano (organoclorado), pero tenían, sin embargo, niveles de resistencia bajos a moderados, hacia productos de otros grupos químicos.

En el presente trabajo se evalúa el potencial del tebufenocida, un mimético de la hormona de la muda (SMAGGHE y DEGHEELE, 1998), para controlar *S. exigua*. Se analizan los niveles de resistencia en diversas poblaciones de campo basándonos en los métodos tradicionales (CL_{50}) y se propone una técnica rápida de evaluación de resistencia identificando una dosis discriminadora entre poblaciones susceptibles y resistentes basada en análisis bioquímicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El insecticida utilizado fue el tebufenocida, cuyo nombre comercial es Mimic® SC (líquido autosuspendible con una riqueza en ingrediente activo (i.a.) del 24%, de la casa comercial Rohm & Haas).

Los insectos de la población de laboratorio proceden de la cría del insectario del Departamento de Protección de Cultivos de la Universidad de Gante, mantenida en condiciones controladas de $23 \pm 1^\circ\text{C}$; $75 \pm 5\%$ HR.; 16:8 L:O.

Ensayos de laboratorio e invernaderos

En condiciones de laboratorio, 1 ml. de dieta artificial modificada de la de Poitou, recién preparada, se introduce en cada uno de los 24 pocillos de 2 cm³ de una placa de cultivo de tejidos, y una vez solidificada, se aplica uniformemente sobre su superficie 50 µl de una solución acuosa de tebufenocida. Se emplearon 7 dosis entre 0,01 y 10 mg i.a./l y el testigo. Larvas de *S. exigua* que acababan de mudar (0-12 h) al último estadio procedentes de distintas poblaciones de campo (Bélgica, Holanda y sur de España) y de la población de laboratorio, se colocaron de forma individualizada en cada pocillo. Se trataron 24 larvas por dosis, y se hicieron 3 repeticiones. La mortalidad se evaluó a los 6 días para determinar la CL_{50} .

En invernadero se realizaron dos tipos de ensayo. En el primero, plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. "Money-maker") de 30 cm. de altura, sembrada en macetas, fueron pulverizadas de forma manual hasta el punto de goteo con soluciones acuosas de tebufenocida a las concentraciones de 0,1 - 0,3 - 1 - 3 y 10 mg i.a./l; Teflubenzurón (Nomolt®, SC 15%) a 180 mg i.a./l y *B. thuringiensis* (Bactospeine® PM, 16 millones U.I./g) a 0,1% se usaron también como referencia. Una vez secas en una cámara de ventilación forzada, cada planta se cubrió con un cilindro de plexiglás que tenía una gasa para ventilación en la parte superior. En cada planta se introdujeron 10 larvas de *S. exigua* que acababan de mudar (0-12 h) al último, y se utilizaron 3 plantas por concentración y 3 repeticiones. Se evaluaron la mortalidad y el daño en hoja a los seis días del tratamiento.

En un segundo ensayo, plantas más grandes de tomate de la misma variedad anterior (1,5-2 m) fueron infestadas con plastrones de huevos recogidos de la cría de laboratorio. 3 días después de la eclosión, cuando los daños en hoja empezaron a ser evidentes, se pulverizaron las plantas con tebufenocida (18 y 144 mg i.a./l) de forma manual hasta goteo. Se trataron 6 plantas por dosis y testigo. Se

evaluó el porcentaje de supervivencia larvaria a los 3 y 7 días tras el tratamiento.

En el ensayo de laboratorio, se obtuvo la CL_{50} con el método Probit usando el programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1994) y en los de invernadero, los resultados fueron analizados siguiendo el test de Student-Newman-Keuls ($P = 0,05$) utilizando el programa Statgraphics (STSC, 1987).

Análisis bioquímicos

Se cuantificó la actividad enzimática de las mono-oxigenasas de las distintas poblaciones de campo y la de laboratorio de *S. exigua*, siguiendo la técnica espectrofotométrica con p-nitroanisol descrita por HANSEN y HODGSON (1971) y VAN LAECKE *et al.* (1993). El cuerpo de las larvas de último estadio, una vez eliminadas las partes más esclerotizadas, como la cabeza, se homogeneiza en frío con un tampón K-fosfato 0,1 M. Posteriormente, se elimina el tegumento y se centrifuga a 12.000 g y 4°C durante 15 minutos en una centrífuga Sigma 2K15. Diluciones del sobrenadante son utilizadas como fuente de enzimas. La concentración de proteína se determina usando albúmina de suero bovino como patrón de acuerdo con BRADFORD (1976). Para determinar el metabolismo oxidativo, la intensidad del color amarillo que produce el p-nitrofenol formado a partir del p-nitroanisol se cuantifica mediante un espectrofotómetro LKB a $\lambda = 400$ nm.

RESULTADOS

En general, basándonos en las CL_{50} , el tebufenocida fue casi tan activo contra larvas de último estadio de poblaciones de campo como lo fue para las susceptibles de laboratorio (Cuadro 1). Las poblaciones procedentes de Bélgica, Países Bajos y del sur de España mostraron bajos niveles de resistencia (2,1-5,4 veces la de laboratorio).

En el primer ensayo en los invernaderos (Figura 1) el tebufenocida causó el 100% de

Cuadro 1. - Toxicidad del tebufenocida en larvas L_5 de *Spodoptera exigua* de una población susceptible de laboratorio y diferentes poblaciones de campo de Bélgica, Holanda y el sur de España

Población	CL_{50} (mg i.a./l)	Factor de resistencia ¹
Laboratorio	0,6	—
Bélgica	2,1	3,5
Holanda	2,5	4,2
España-1	1,9	3,2
España-2	1,2	2,1
España-3	3,2	5,4
España-4	2,1	3,5
España-5	2,8	4,6

¹ CL_{50} campo/ CL_{50} laboratorio.

mortalidad larvaria a partir de una dosis tan baja como 1 mg i.a./l, sin que se observara daño alguno en hoja. Los compuestos de referencia como el teflubenzurón y el *B. thuringiensis* fueron ligeramente menos eficaces que el tebufenocida a las dosis tratadas, pero sí se producían daños foliares.

En el segundo ensayo (Cuadro 2), el tebufenocida realizó un control absoluto de *S. exigua* a la máxima dosis recomendada en campo. Con un octavo de la dosis máxima, sólo sobrevivían el 11% de las larvas tratadas una semana antes, pero las hojas mostraban evidencias de daños por alimentación larvaria.

Cuadro 2. - Eficacia del tebufenocida (Mimic SC, 240 gr i.a./l) contra *Spodoptera exigua* en pequeños invernaderos experimentales

Concentración (mg i.a./100 l) agua).	% Supervivencia 3 días ¹	% Supervivencia 7 días ¹
Testigo	84,0 a	38,3 a
60	59,3 b	0,8 c
7,5	43,3 b	10,5 b

¹ Datos expresados como porcentaje de las larvas supervivientes recuperadas comparado con el número total de larvas tratadas. Medias seguidas por una letra diferente (a-c) son significativamente diferentes ($P = 0,05$, Student-Newman-Keuls test).

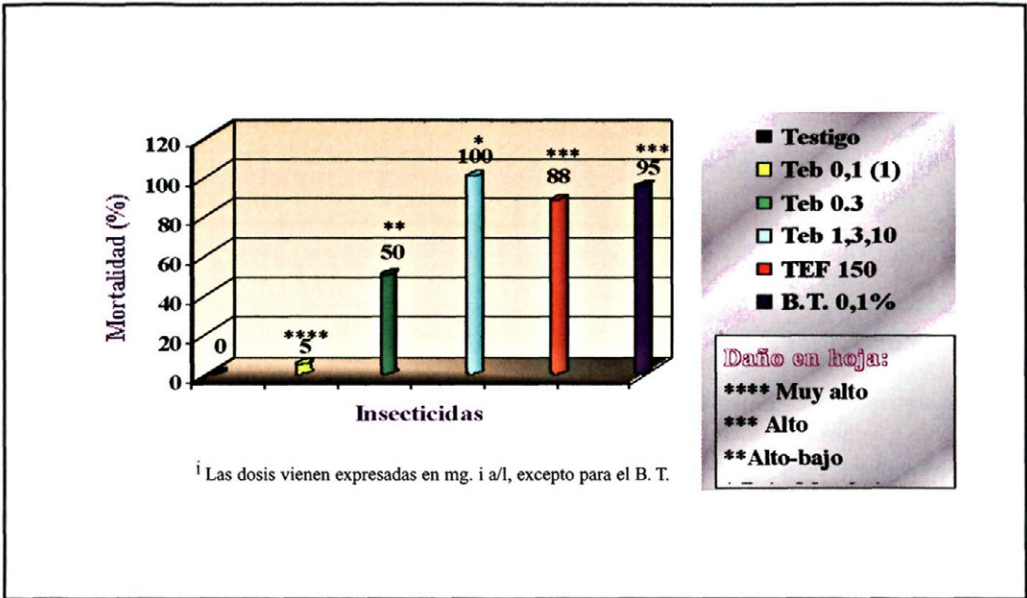


Fig. 1. - Eficacia del tebufenocida (Mimic SC 240 gr i.a./l) contra larvas de último estadio de *Spodoptera exigua*. (Teb: Tebufenocida; TEF: Teflubenzurón; B.T.: *Bacillus thuringiensis*).

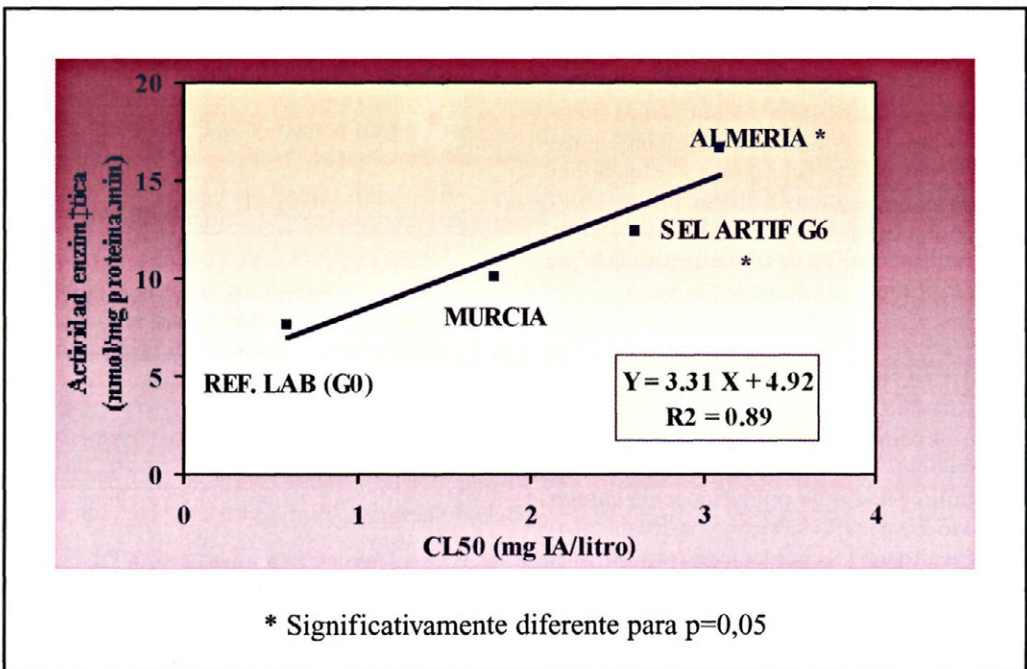


Fig. 2. - Correlación entre toxicidad (CL_{50}) y el metabolismo oxidativo en diferentes poblaciones de *Spodoptera exigua*.

Los resultados de actividad enzimática de la población susceptible de laboratorio, las de campo y una población resistente seleccionada en el laboratorio muestran un elevado grado de correlación ($R^2 = 0,89$) con la toxicidad larvaria medida como CL_{50} . (Figura 2).

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en laboratorio y en invernadero indican que el tebufenocida es un insecticida prometedor en el control de larvas de *S. exigua*. Estos datos concuerdan con experimentos anteriores que muestran que este insecticida es altamente tóxico contra otros lepidópteros tanto por ingestión como por aplicaciones tópicas (SMAGGHE y DEGHEELE, 1994, 1997). Debido a su nuevo modo de acción, el tebufenocida debería ser usado en el control de lepidópteros que sean resistentes a otras clases de insecticidas.

Los datos de toxicidad de poblaciones de campo y laboratorio obtenidos son similares a los hallados en *Spodoptera littoralis* (Boisduval). Una población de campo israelí que se había mostrado 100 veces más resistente a organofosforados y piretroides que las de laboratorio, sólo fue 3 veces más resistente a tebufenocida y otros insecticidas de la misma estructura (ISHAYA *et al.*, 1995). SMAGGHE y DEGHEELE (1997) demostraron que en *S. littoralis* de campos egipcios los factores de resistencia alcanzados para el clorpirifós y los carbamatos eran de 30 y 200 respectivamente, mientras que para el tebufenocida sólo era de 4. SAUPHANOR y BOUVIER (1995) investigaron la resistencia a benzoilfenilureas y tebufenocida y la resistencia cruzada entre éstos componentes en poblaciones multi-resistentes de *Cydia pomonella* L. del sur francés. Estos estudios revelaron una resistencia 370 veces mayor para el diflubenzurón, mientras que para el tebufenocida fue solo de 26. El factor de resistencia para el tebufenocida de la F1 de un cruce entre poblaciones resistentes y susceptibles fue de 13. Por otra parte, a pesar de los altos niveles de resistencia a organofosforados, ben-

zoilfenilureas y fenoxicarb en *Platynota idaeusalis* Walker, no se ha constatado resistencia al tebufenocida (BIDDINGER *et al.*, 1996).

Aunque hasta ahora los niveles de resistencia al tebufenocida son bajos, es necesario desarrollar técnicas que nos permitan de una forma rápida, barata y eficaz determinar los niveles de resistencia de las poblaciones de campo, para tomar las medidas oportunas. Una técnica consiste en establecer una dosis discriminatoria para distinguir poblaciones resistentes de las susceptibles. Se obtuvieron las relaciones toxicidad-dosis de un experimento que seleccionaba una población de laboratorio de *S. exigua* durante 12 generaciones consecutivas con dosis subletales (CL_{25}) de tebufenocida (SMAGGHE *et al.*, 1998a). Después de 6 generaciones de continua selección, se observó un aumento en el nivel de resistencia de 3,6. Este nivel se corresponde con los bajos niveles de resistencia al tebufenocida observados en poblaciones de campo de distintas partes de Europa (Cuadro 1). Basándonos en éstos datos, se sugiere que la dosis discriminatoria podría ser de 3 mg i.a./l. Con esta concentración se podría averiguar si hay un aumento de los niveles de resistencia en las nuevas poblaciones recogidas en campo. No obstante, deberían analizarse más poblaciones de campo antes de implementar este tipo de ensayos para monitorizar de la resistencia.

Otra técnica a emplear son los estudios bioquímicos. Investigaciones anteriores indican que las enzimas oxidativas del insecto juegan un papel importante en el metabolismo del tebufenocida. (SMAGGHE *et al.*, 1998a,b). La correlación lineal entre la actividad enzimática y la CL_{50} (Figura 2) sugiere que una menor toxicidad está relacionada con el incremento en la ruptura oxidativa de la molécula del tebufenocida. Todo ello concuerda con la conclusión de Smagghe *et al.* (1998a,b) de que la principal ruta de metabolización del tebufenocida es a través de la oxidación de los sustituyentes alquílicos de los dos anillos benzoicos. Basándonos en estos resultados, consideramos que 12-15 nmol/mg.proteína.min podría ser usado como umbral crítico para la actividad enzimática oxidativa.

La optimización de la técnica espectrofotométrica como herramienta para el monitoreo de resistencia se hace necesario para ahorrar tiempo y abaratar costes. Nuestro objetivo es desarrollar un ensayo para medir la resistencia por medio del incremento en el metabolismo oxidativo. Para la estandarización de éste método, todos los estados de desarrollo y edades están siendo estudiados en el laboratorio para conocer las posibles variaciones enzimáticas dependiendo del estadio en que se encuentren las *S. exigua* procedentes del campo. Del mismo modo, hay que destacar que es necesario estudiar un mayor rango de poblaciones de campo antes de dar conclusiones definitivas. Creemos que el diseño de estos ensayos bioquímicos, conjuntamente con los bioensayos sobre die-

ta artificial, podrían facilitar la obtención de resultados repetibles y ayudarían a predecir la evolución del desarrollo de la resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con los proyectos del Ministerio de Educación y Cultura AGF98-0715 y AGF99-1135 a E. Viñuela. Dr. Smagghe es becario posdoctoral de la Fundación Belga para la Investigación (FWO, Bruselas). M^a. P. Medina es becaria FPI de la CAM.

BIDDINGER, D. J.; HULL, L. A., y McPHERON, B. A., 1996: Cross-resistance and synergism in azinphosmethyl resistant and susceptible strains of tufted apple bud moth (Lep. Tortricidae) to various insect growth regulators and abamectin. *J. Econ. Entomol.* **89**: 274-287.

ABSTRACT

G. SMAGGHE, P. MEDINA, S. SCHUYESMANS, L. TIRRY, y E. VIÑUELA, 2000: Insecticide resistant monitoring of Tebufenozide for managing *Spodoptera exigua* (Hübner [1808]).

CL₅₀'s were calculated from several field strains of *Spodoptera exigua* collected on greenhouses from Spain, Belgium and the Netherlands. The susceptibility of field populations towards tebufenozide was similar to that of the laboratory strain, and resistance values ranged between 2.1 and 5.4.

Data obtained so far suggest the possibility of developing a test-kit for monitoring resistance in this species, based on artificial diet treatment with a discriminating dose of about 3 mg a.i./l

A close correlation ($R^2 = 0.89$) between larval toxicity of tebufenozide expressed by LC₅₀ and the oxidative enzyme activity in different strains was observed. The linear regression obtained suggests that the lower toxicity is result of an increase in oxidative breakdown of the molecule. Based on this results, we consider that 12-15 nmol/mg. protein.min can be used as a critical threshold level for oxidative enzyme activity. It should be noted that further evaluation with a wider range of field strains is required before drawing firm conclusions.

Key words: *Spodoptera exigua*, tebufenozide, resistance, field populations.

REFERENCIAS

- BRADFORD, M. M., 1976: A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-257.
- BREWER, M. J., y TRUMBLE, J. T., 1989: Field monitoring for insecticide resistance in beet armyworm (Lep. Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **82**: 1520-1526.
- CAHILL, M., y DENHOLM, I., 1998: Pesticide resistance in protected agriculture- Emphasis on Bemisia. En: *Pesticide resistance in horticultural crops*: 45-53. CUADRADO, I. M.^a, y VIÑUELA, E., eds., Almería, España.
- CHAUFAUX, J., y FERRON, P., 1986: Sensibilité différente de deux populations de *Spodoptera exigua* Hüb. (Lep., Noctuidae) aux baculovirus et aux pyrèthroides de synthèse. *Agronomie* **6**: 99-104.
- DENHOLM, I.; HOROWITZ, A. R.; CAHILL, M., y ISHAAYA, I., 1998: Management of resistance to novel insecticides. En: *Insecticides with novel mode of action. Mechanism and application*: 260-282. ISHAAYA, I., y DEGHEELE, D., eds. Springer, Berlin, Germany.
- DHADIALLA, T. S.; CARLSON, G. R., y LE, D. P., 1997: New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Ann. Rev. Entomol.* **43**: 545-569.
- GEORGHIOU, G. P., 1986: The magnitude of the resistance problem. En: *Pesticide resistance. Strategies and tactics for management*: 14-44. NAS Press. Washington.
- HANSON, L. G., y HODGSON, E., 1971: Biochemical characteristics of insect microsomes (N- and O-demethylation). *Biochem. Pharmacol.* **20**: 1569-1578.
- ISHAAYA, I.; YABLONSKY, S., y HOROWITZ, A. R., 1995: Comparative toxicity of two ecdysteroid agonists, RH-2485 and RH-5992, on susceptible and pyrethroid-resistant strains of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Phytoparasitica* **23**: 139-145.
- LEORA SOFTWARE, POLO-PC, 1994: User's guide to probit or logit analysis. LeOra software Inc., Berkeley, CA, USA.
- MOAR, W.; PUTSZTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K., y ADANG, M. J., 1994: Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep. Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2086-2092.
- ROBB, K. L., y PARELLA, M. P., 1984: Controlling beet armyworm. *Flor. Rev.* **22**: 22-25.
- SAUPHANOR, B., y BOUVIER, J. C., 1995: Cross-resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pestic. Sci.* **45**: 85-92.
- SMAGGHE, G., y DEGHEELE, D., 1994: Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pestic. Sci.* **42**: 85-92.
- SMAGGHE, G., y DEGHEELE, D., 1997: Comparative toxicity and tolerance for the ecdysteroid mimic tebufenozide in a laboratory and field strain of the cotton leafworm. *J. Econ. Entomol.* **90**: 278-282.
- SMAGGHE, G.; DHADIALLA, T. S.; DERYCKE, S.; TIRRY, L., y DEGHEELE, D., 1998a: Action of the ecdysteroid agonist tebufenozide in susceptible and artificially selected beet armyworm. *Pestic. Sci.* **54**: 27-34.
- SMAGGHE, G., y TIRRY, L., 1998: Inventory of resistance in insects and mites in Belgium. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **63**: 571-574.
- SMAGGHE, G.; WESEMAEL, W.; CARTON, B., y TIRRY, L., 1998b: Tebufenozide and methoxyfenozide against the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Proc. Brighton Crop Protect. Conf.- Pests and Diseases* **1**: 311-312.
- STSC, 1987: Statgraphics user's guide, version 5.0. Graphic software system, STSC, Rockville, MD, USA.
- TABASHNIK, B. E., y ROUSH, R. T. (eds.), 1990: *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall. London.
- TORRES-VILLA, L. M.; RODRIGUEZ-MOLINA, M. C.; LACASA, A.; MEJÍAS, M.; GUERRERO, M., 1998: Susceptibilidad a 20 insecticidas de *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera exigua* en las Vegas del Guadiana (Extremadura). *Bol. San. Veg. Plagas* **24**: 353-362.
- URECH, P. A.; STAUB, T., y VOSS, G., 1997: Resistance: as a concomitant of modern protection. *Pestic. Sci.* **51**: 227-234.
- VAN LAECKE, K.; SMAGGHE, G., y DEGHEELE, D., 1993: Detoxifying enzymes in greenhouse and laboratory strain of beet armyworm (Lep. Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **88**: 777-781.
- VIÑUELA, E., 1998a: La resistencia a insecticidas en España. *Bol. San. Veg. Plagas* **24**: 487-496.
- VIÑUELA, E., 1998b: Insecticide resistance in horticultural pests in Spain. En: *Pesticide resistance in horticultural crops*: 19-29. CUADRADO, I. M.^a y Viñuela, E., eds. Almería. Spain.
- VIÑUELA, E.; ADÁN, A.; SMAGGHE, G.; GONZÁLEZ, M.; MEDINA, M.^a P.; BUDIA, F.; VOGT, H. & DEL ESTAL, P., 2000: Laboratory effects of ingestion of azadirachtin by two pests (*Ceratitis capitata* and *spodoptera exigua*) and three natural enemies (*Chrysoperla carnea*, *Opius concolor* and *Podisus maculiventris*). *Biocontrol Sci. & Technol.* **10**: 165-177.
- YOSHIDA, H. A., y PARELLA, M. P. 1987: The beet armyworm in floricultural crops. *Calif. Agric.* **41**: 13-15.

(Recepción: 21 febrero 2000)

(Aceptación: 19 julio 2000)