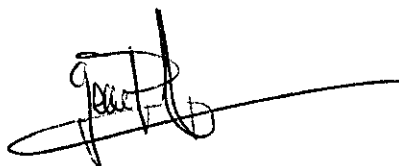


**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL I**

**Biología y control de  
*Aubeonymus mariaefranciscae* Roudier  
(Coleoptera: Curculionidae), plaga de la remolacha azucarera.**

Memoria presentada por Gema M<sup>a</sup> Pérez Farinós  
para optar al grado de Doctora



Fdo.: Gema M<sup>a</sup> Pérez Farinós



\* 5 3 0 9 8 7 9 1 1 2 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

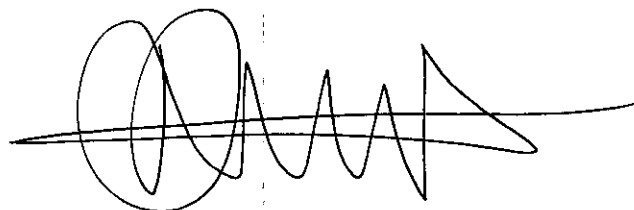
X-53-394359-X

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> del Director



Fdo.: Pedro Castañera Domínguez  
Profesor de Investigación  
Dpto. Biología de Plantas  
C.I.B., C.S.I.C., Madrid

V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> del Tutor



Fdo.: Raimundo Outerelo Domínguez  
Profesor Titular  
Dpto. Biología Animal I  
Universidad Complutense de Madrid

23698



BIBLIOTECA

# Índice

<b>ÍNDICE</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. <i>Aubeonymus mariaefranciscae</i> ROUDIER</b> .....	2
1.1.1. Origen, distribución geográfica y expansión de la plaga .....	2
1.1.2. Descripción .....	4
1.1.3. Biología .....	4
1.1.4. Huéspedes alternativos .....	6
1.1.5. Daños producidos en la remolacha y control actual de la plaga ....	7
<b>1.2. LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE INSECTOS (RCIs)</b> .....	10
1.2.1. Insecticidas que inhiben la síntesis de quitina .....	11
1.2.1.1. El tegumento de los insectos .....	11
1.2.1.2. Las benzoilfenilureas .....	13
1.2.2. Las hormonas endocrinas de los insectos y su uso como insecticidas.....	17
1.2.2.1. Análogos funcionales de la hormona juvenil .....	18
1.2.2.2. Análogos funcionales de la hormona de la muda .....	19
<b>1.3. LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS</b> .....	21
1.3.1. Las proteasas digestivas de los insectos .....	21
1.3.2. Inhibidores de proteasas y su uso en el control de plagas .....	22
<b>1.4. OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS</b> .....	24

---

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES</b> .....	26
<b>2.1. INSECTOS</b> .....	26
<b>2.2. PLANTAS</b> .....	29
<b>2.3. EQUIPOS EMPLEADOS</b> .....	30
<b>3. PUESTA A PUNTO DE UNA NUEVA DIETA ARTIFICIAL PARA LA CRÍA EN EL LABORATORIO DE <i>A. mariaefranciscæ</i></b> .....	31
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	31
<b>3.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
3.2.1. Componentes y preparación de las dietas artificiales .....	33
3.2.2. Evaluación de la calidad de las dietas .....	35
3.2.3. Desarrollo sobre la dieta seleccionada .....	37
3.2.4. Análisis estadísticos .....	37
<b>3.3. RESULTADOS</b> .....	38
3.3.1. Desarrollo de <i>A. mariaefranciscæ</i> en distintas dietas .....	38
3.3.2. Desarrollo sobre la dieta seleccionada .....	41
<b>3.4. DISCUSIÓN</b> .....	44
<b>4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL FOTOPERIODO SOBRE EL DESARROLLO LARVARIO DE <i>A. mariaefranciscæ</i></b> .....	49
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	49
<b>4.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	51
4.2.1. Procedimientos generales .....	51
4.2.2. Análisis estadísticos .....	51
<b>4.3. RESULTADOS</b> .....	51
<b>4.4. DISCUSIÓN</b> .....	56

---

<b>5. BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE <i>A. mariaefrancisca</i></b> .....	60
<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	60
<b>5.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	62
5.2.1. Procedimientos generales .....	62
5.2.2. Preferencia del sustrato de oviposición.....	63
5.2.3. Reproducción a distintos fotoperiodos .....	63
5.2.4. Influencia de la temperatura y el número de adultos por ponedero en la fecundidad .....	65
5.2.5. Oviposición de adultos capturados en distintos momentos del año .....	66
5.2.6. Análisis estadísticos .....	66
<b>5.3. RESULTADOS</b> .....	67
5.3.1. Preferencia del sustrato de oviposición .....	67
5.3.2. Reproducción a distintos fotoperiodos .....	67
5.3.3. Influencia de la temperatura y el número de adultos por ponedero en la fecundidad .....	73
5.3.4. Oviposición de adultos capturados en distintos momentos del año .....	76
<b>5.4. DISCUSIÓN</b> .....	77
5.4.1. Preferencia del sustrato de oviposición .....	77
5.4.2. Reproducción a distintos fotoperiodos .....	78
5.4.3. Influencia de la temperatura y el número de adultos por ponedero en la fecundidad .....	81
5.4.4. Oviposición de adultos capturados en distintos momentos del año .....	82
<b>6. EFECTOS DE DISTINTOS RCI<sub>s</sub> APLICADOS SOBRE ADULTOS DE <i>A. mariaefrancisca</i></b> .....	84
<b>6.1. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	85

---

6.1.1. RCIs ensayados .....	85
6.1.2. Aplicación tópica .....	86
6.1.3. Aplicación foliar .....	86
6.1.4. Efectos sobre la fecundidad, fertilidad y supervivencia de la progenie .....	87
6.1.4.1. Hexaflumurón .....	87
6.1.4.2. Halofenocida y piriproxifén .....	88
6.1.5. Efecto ovicida por contacto del hexaflumurón.....	88
6.1.6. Efecto del hexaflumurón <i>via adultos</i> en la ultraestructura del tegumento del embrión: procesamiento de las muestras para el MET.....	89
6.1.7. Efecto del halofenocida <i>via adultos</i> sobre las larvas de la siguiente generación: procesamiento de muestras para el análisis histológico.....	91
6.1.8. Estudio de la farmacocinética del hexaflumurón y el halofenocida .....	91
6.1.8.1. Aplicación tópica .....	91
6.1.8.2. Penetración y excreción de la radiactividad .....	93
6.1.8.3. Acumulación de la radiactividad en el cuerpo .....	93
<b>6.2. Efectos del hexaflumurón .....</b>	<b>94</b>
<b>6.2.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>94</b>
<b>6.2.2. RESULTADOS .....</b>	<b>96</b>
6.2.2.1. Efectos sobre la reproducción y el desarrollo de la progenie .....	96
6.2.2.2. Efecto ovicida por contacto .....	100
6.2.2.3. Efectos en la ultraestructura del tegumento del embrión ....	101
6.2.2.4. Farmacocinética del hexaflumurón en <i>A. mariaefranciscae</i>	105
<b>6.2.3. DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
6.2.3.1. Efectos sobre la reproducción y el desarrollo de la	

---

progenie .....	111
6.2.3.2. Efecto ovicida por contacto .....	113
6.2.3.3. Efectos en la ultraestructura del tegumento del embrión ....	114
6.2.3.4. Farmacocinética del hexaflumurón en <i>A. mariaefranciscæ</i>	116
<b>6.3. Efectos del piriproxifén .....</b>	<b>121</b>
<b>6.3.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>121</b>
<b>6.3.2. RESULTADOS .....</b>	<b>122</b>
<b>6.3.3. DISCUSIÓN .....</b>	<b>124</b>
<b>6.4. Efectos del halofenocida .....</b>	<b>125</b>
<b>6.4.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>125</b>
<b>6.4.2. RESULTADOS .....</b>	<b>126</b>
6.4.2.1. Efectos sobre la fecundidad, fertilidad y el desarrollo de la progenie .....	126
6.4.2.2. Farmacocinética del halofenocida en <i>A. mariaefranciscæ</i> ..	129
<b>6.4.3. DISCUSIÓN .....</b>	<b>132</b>
<b>7. EFECTOS DE INHIBIDORES DE PROTEINASAS SOBRE EL DESARROLLO LARVARIO Y SUPERVIVENCIA EN <i>A. mariaefranciscæ</i> .....</b>	<b>136</b>
<b>7.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>136</b>
<b>7.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>137</b>
<b>7.3. RESULTADOS .....</b>	<b>138</b>
<b>7.4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>140</b>
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>143</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>146</b>

# Resumen

Se ha puesto a punto una nueva dieta artificial para la cría en el laboratorio de *Aubeonymus mariaefranciscae* Roudier, con la que se desarrollan satisfactoriamente desde larvas neonatas hasta la emergencia del adulto. Se ensayaron dietas que contenían distintos agentes antimicrobianos, y los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla de 0,2% (p/p) de formaldehído y 0,08% (p/p) de metil-p-hidroxibenzoato, con un porcentaje de supervivencia del 78%. Se criaron tres generaciones consecutivas con esta dieta sin que afectara significativamente a su supervivencia, tiempo de desarrollo y capacidad reproductora.

Se han estudiado diferentes aspectos de la biología de *A. mariaefranciscae* en condiciones de laboratorio. En primer lugar se evaluó el efecto de distintas variables ambientales sobre la reproducción. Cuando se les proporcionó plantas enteras el lugar elegido para la oviposición fue la raíz, y en hojas sueltas insertadas en arena de río humedecida el 91% de los huevos fueron encontrados en la porción de peciolo por debajo de la superficie. La fertilidad de los huevos fue siempre próxima al 100%, en todas las condiciones. La fecundidad se relacionó directamente con la temperatura, y de todas las estudiadas la más adecuada para la oviposición fue 26°C. En unas condiciones de fotoperiodo de 16:8 h (L:O) *A. mariaefranciscae* exhibió un largo periodo de preoviposición de 106 días y la fecundidad fue de 39 huevos por hembra, mientras que a 9:15 este periodo se acortó a 80 días y la fecundidad se incrementó a 73 huevos. La fecundidad fue la misma independientemente del número de parejas por ponadero.

Se ha determinado el efecto de la combinación de condiciones constantes de dos temperaturas (22 y 26°C) y dos fotoperiodos (16:8 y 9:15 h (L:O)) sobre el desarrollo larvario de *A. mariaefranciscae*. De las cuatro combinaciones ensayadas, el tiempo de desarrollo más corto se obtuvo a 26° y 16:8, con un total de 52,5 días, y un porcentaje de pupación del 98%. Bajo un fotoperiodo de 9:15 el porcentaje de pupación disminuyó, y a 22° el tiempo de desarrollo se alargó. Se encontraron

interacciones entre las dos variables que afectaron fuertemente al último estadio larvario. Así, a 22° y 9:15 su desarrollo se detuvo, y no se produjo pupación. Se ha sugerido que este curculiónido podría sufrir una diapausa facultativa durante este estadio, pero serían necesarios nuevos experimentos para confirmarlo.

Se han ensayado tres reguladores del crecimiento de insectos (RCIs) con distintos modos de acción sobre adultos de *A. mariaefranciscae* en condiciones de laboratorio: hexaflumurón (inhibidor de la síntesis de quitina), piriproxifén (análogo de la hormona juvenil) y halofenocida (análogo de la hormona de la muda).

Se han evaluado los efectos del hexaflumurón aplicado en adultos sobre la fertilidad y el desarrollo de la progenie, así como su actividad por contacto sobre los huevos. La aplicación tópica o foliar con hexaflumurón sobre adultos de *A. mariaefranciscae* dio lugar a una inhibición significativa de la eclosión de los huevos. El tratamiento tópico de ambos sexos  $\approx$  50 días antes del comienzo de la oviposición inhibió la eclosión durante un 73% del periodo de oviposición, y cuando el tratamiento era foliar la inhibición se produjo durante el 43% del periodo total. La inhibición fue menor, tanto en aplicación tópica (56%) como foliar (22%) cuando los adultos se trataron al comienzo de la oviposición. El periodo de la inhibición de la eclosión tras el tratamiento tópico fue 1,5 veces mayor cuando ambos sexos eran tratados que cuando hembras tratadas se apareaban con machos sin tratar. No se observó inhibición de la eclosión cuando machos tratados se aparearon con hembras sin tratar. La mortalidad de los huevos de 0-24 horas de edad sobre papel de filtro tratado con hexaflumurón fue significativamente más alta comparada con la de los huevos de 1-6 días de edad, sugiriendo que este momento es crítico para la penetración del hexaflumurón o para la síntesis de quitina. Ambos métodos de aplicación (tópico y foliar) dieron lugar a una alta mortalidad de las larvas de la siguiente generación.

Se estudió la farmacocinética de este compuesto empleando hexaflumurón marcado con  $C^{14}$ . Su retención en el cuerpo fue alta comparado con otros insectos. Los adultos jóvenes retuvieron una cantidad más alta que los viejos. En los huevos se encontró un pequeño porcentaje que fue suficiente para producir daños en el

embrión, dando lugar a la inhibición de la eclosión. El tratamiento de *A. mariaefranciscæ* con hexaflumurón dio lugar a claros síntomas de desorganización en la ultraestructura del tegumento de los embriones. La procutícula fue la capa más afectada. La exo- y la endocutícula perdieron por completo su estructura y no mostraba la típica organización lamelada. Este efecto parece estar relacionado con la disposición irregular de las capas de quitina-proteína, que llevan al debilitamiento ya posterior muerte del embrión.

La aplicación tópica de piriproxifén sobre adultos de *A. mariaefranciscæ* no produjo ningún efecto sobre la fecundidad, fertilidad y desarrollo de la progenie, por lo que este insecticida no es una buena opción a tener en cuenta en el control de esta plaga.

La aplicación tópica de halofenocida sobre adultos de *A. mariaefranciscæ* produjo una drástica disminución de la supervivencia de la progenie. La farmacocinética se estudió usando halofenocida -C<sup>14</sup>. La retención del halofenocida en el sistema reproductor de los machos fue baja, mientras que se recuperaron altos porcentajes de radiactividad en el de las hembras (ovarios + huevos). Los daños fueron muy visibles en el desarrollo de la progenie de los adultos tratados tópicamente, muriendo más del 80% de las larvas de primer estadio debido a una muda prematura y a la inhibición de la ecdisis. Secciones transversales de estas larvas mostraron la presencia de una doble cutícula, sin que pudieran desprenderse de la vieja cutícula.

Distintos inhibidores de serín proteasas se ensayaron *in vivo* para estudiar su potencial como factores de resistencia frente a *A. mariaefranciscæ*. Las larvas alimentadas desde su emergencia hasta la pupación sobre dietas que contenían un 0,2% (p/p) de SBBI, STI, TEI o LBI mostraron bajas tasas de supervivencia, retrasos en el tiempo de desarrollo y dificultades en el momento de la pupación y emergencia del adulto. Los niveles más altos de mortalidad (≈ 90%) se encontraron en las larvas alimentadas con dietas en las que se habían combinado dos o tres inhibidores, sugiriendo un efecto sinérgico.

# Summary

It has been developed a new artificial larval diet that can be used successfully for rearing *Aubeonymus mariaefrancisciae* Roudier from neonate to adult, making easier the handling of this insect in the laboratory. Diets with different antimicrobial agents were assayed, and the best performance was obtained for those larvae fed on a diet with a mix of 0,2% (p/p) formaldehyde and 0,08% (p/p) methyl-p-hidroxibenzoate, giving a survival rate of 78%. Three consecutive generations were reared on this diet without significantly affecting their survival, developmental time and reproductive capacity.

Different aspects of the biology of *A. mariaefrancisciae* have been studied under laboratory conditions. It has been studied the effect of some environmental variables on reproduction. When whole plants were supplied, the preferred oviposition site was the root. When detached leaves, inserted in moistened sand, were supplied, 91% of the eggs were laid in the portion of the petioles below soil. Fertility of eggs was always very high, near 100% regardless the variable studied. Fecundity was directly related to temperature, and from the temperatures studied, the most suitable for oviposition was 26°C. Under 16:8 h (L:D) photoperiod conditions *A. mariaefrancisciae* showed a long preoviposition period of 106 days and the fecundity was 39 eggs per female, but under 9:15 (L:D) the preoviposition period was shortened to 80 days and fecundity increased to 73 eggs. Fecundity was the same regardless the number of pairs per oviposition pot.

It has been determined the effect of the combination of constant conditions of two temperatures (22 and 26°C) and two photoperiods (16:8 and 9:15 h (L:D)) on development of larval stages of *A. mariaefrancisciae*. Among the four treatments, the shortest time to complete the larval stage was 52,5 days at 26° and 16:8, and and these conditions 98% of larvae reached pupation. When the photoperiod was 9:15 the percentage of pupation decreased, and when temperature was 22° the developmental time was prolonged. But there were found interactions between both variables that

strongly affected the last larval instar. At 22° and 9:15 the development of last larval instar was arrested, and pupation was prevented. It has been suggested that this insect could suffer a facultative diapause during its last instar, but new experiments are needed to be confirmed.

Three insect growth regulators with different modes of action have been assayed on adults of *A. mariaefranciscae* under laboratory conditions: hexaflumuron (chitin synthesis inhibitor), piriproxifen (juvenile hormone analogue) and halofenozide (molt hormone analogue).

The effects of hexaflumuron on fertility and offspring development of *A. mariaefranciscae* after adult treatment have been evaluated, as well as the direct contact activity on eggs. Topical and foliar exposure of hexaflumuron on adults of *A. mariaefranciscae* resulted in significant inhibition of egg hatch. Both sexes topically treated  $\approx$  50 days before the start of oviposition inhibited egg hatch for  $\approx$  73% of the total oviposition period, and the percentage was 43% for adults exposed to hexaflumuron-treated sugar beet leaves. Inhibition was lower for topical (56%) and foliar (22%) applications when weevils were treated soon after onset oviposition. Period of egg hatch inhibition by topical application was 1.5 times greater when both sexes were exposed and mated together compared to exposed females mated with untreated males. No egg hatch inhibition was observed when treated males mated with untreated females. Mortality of treated eggs (0-24 h old) on hexaflumuron-treated filter paper was significantly greater compared with mortality of eggs 1-6 days old, suggesting that the age group was a critical stage for penetration of hexaflumuron or chitin synthesis. Both topical and foliar application of hexaflumuron to ovipositing weevils resulted in a large mortality of the F1-generation larvae. The pharmacokinetics was studied using hexaflumuron labeled with  $^{14}\text{C}$ . The retention in the body was high compared to other insects. Young adult weevils retained higher amounts of hexaflumuron in the reproductive system than the older ones. Moreover, the low percentage of radiolabeled hexaflumuron recovered in the eggs impaired the embryo development, leading to inhibition of egg hatch. Treatment with hexaflumuron on *A. mariaefranciscae* adults resulted in obvious

symptoms of disorganization in the integument ultrastructure of embryos. The procuticle was particularly affected as a result of low residual amounts of hexaflumurón. Both endo- and exocuticle were totally unstructured and the typical lamellated organization was absent, resulting in an amorphous structure appearance. This effect seems to be related to irregular deposition of chitin-protein layers, leading to mechanical weakness and death of the embryo later on.

Topical application of piriproxifen on adults of *A. mariaefranciscæ* did not produce any effect on fecundity, fertility or development of the progeny, so this insecticide is not a good option for the control of this pest.

Topical application of halofenozide on adults of *A. mariaefranciscæ* exhibited produced a drastic decrease of the progeny survival. Pharmacokinetics was studied using <sup>14</sup>C- halofenozide. Retention of halofenozide in the reproductive system of males was low, whereas high levels of radioactivity were recovered in females (ovaries + eggs). The development of the progeny was strongly affected, and more than 80% of first-instar larvae died after egg hatching in the first 25 days after the treatment, due to premature molting and inhibition of ecdysis. Cross sections of intoxicated first larval instars of *A. mariaefranciscæ* originating from adults that were topically treated with halofenozide showed the presence of a double cuticle and these larvae could not shed the old cuticle.

Several serine proteinase inhibitors were tested *in vivo* to establish their potential as resistance factors against *A. mariaefranciscæ*. Larvae fed from neonate to pupation on diets containing 0,2% (p/p) SBBI, STI, TEI or LBI endured lower survival rates, displayed significant delays in the developmental and presented disturbances at the time of pupation and adult emergence. Interestingly, the most significant levels of mortality (about 90%) occurred with larvae fed on diets containing a combination of two or three inhibitors, suggesting a synergistic toxicity.

# Publicaciones

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar hasta el momento de su presentación a las siguientes publicaciones científicas:

MARCO, V.; G.P. FARINÓS Y P. CASTAÑERA. 1998. Effects of hexaflumuron on transovarial, ovicidal and progeny development of *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 27: 812-816.

FARINÓS, G.P.; G. SMAGGHE; V. MARCO; L. TIRRY Y P. CASTAÑERA. 1998. Effects of topical application of hexaflumuron on adult sugar beet weevil, *Aubeonymus mariaefranciscae*, on embryonic development: pharmacokinetics in adults and embryos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 61:169-182.

ORTEGO, F; G.P. FARINÓS; M. RUIZ; V. MARCO Y P. CASTAÑERA. 1998. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. *Entomol. Exp. Appl.* 88: 265-274.

FARINÓS, G.P.; A. TABERNER; V. MARCO Y P. CASTAÑERA. 1999. Development of an artificial larval diet for a new sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae), and its oviposition behaviour. *J. Econ. Entomol.* 92: 351-356.

FARINÓS, G.P.; G. SMAGGHE; L. TIRRY Y P. CASTAÑERA. 1999. Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeonymus mariaefranciscae* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41:201-213.

Actualmente están en fase de elaboración los siguientes manuscritos:

Development of *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae) larvae at different constant conditions of temperature and photoperiod.

Oviposition biology of *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae) adults.

# Abreviaturas

$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{l}$	microlitro
BMO	Biological Material Oxidizer
BPU	benzoilfenilurea
CEOM	Chicken Egg White Ovomuroid
Ci	curie
CL	concentración letal
cm	centímetro
cpm	cuentas por minuto
D.S.	desviación estándar
E.S.	error estándar
g	gramo
h	hora
ha	hectárea
HJ	hormona juvenil
HM	hormona de la muda
HR	humedad relativa
IA	ingrediente activo
IC	intervalo de confianza
l	litro
L:O	Luz:Oscuridad
LBI	Lima Bean Inhibitor
M	molar
mCi	milicurie
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
qm	quintal métrico
RCI	regulador del crecimiento de insectos
s	segundo
SBBI	Soybean Bowman-Birk Inhibitor
STI	Soybean Trypsin Inhibitor
TEI	Turkey Egg White Inhibitor
v/v	volumen/volumen

# Introducción

La remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L., Chenopodiaceae) constituye un cultivo de gran importancia en España, tanto desde un punto de vista social como económico, al tratarse de la principal fuente de recursos de numerosas familias del agro español. En la actualidad existe en nuestro país una superficie cultivada de unas 150.000 has con un rendimiento medio de 523 qm/ha (ANÓNIMO, 1997).

La amplia variabilidad climatológica de la península hace que existan dos zonas claramente diferenciadas en el cultivo de la remolacha azucarera en España. La zona sur comprende las Comunidades Autónomas de Andalucía y Extremadura, donde la siembra es otoñal (octubre-noviembre) y la recolección es en junio-julio, y la zona centro y norte, donde la siembra es primaveral (marzo-abril) y la recolección es en noviembre.

Durante la campaña remolachera de 1979-80 se detectaron importantes daños producidos por un coleóptero de la familia Curculionidae, sobre plántulas y plantas jóvenes de remolacha azucarera en las provincias de Córdoba y Sevilla. El insecto fue descrito como nueva especie por Roudier (1981), denominándole *Aubeonymus mariaefranciscae* (Figura 1.1). El género *Aubeonymus* Jaquelin-Duval 1854 comprende cinco especies conocidas hasta el momento, cuatro de ellas presentes en España.

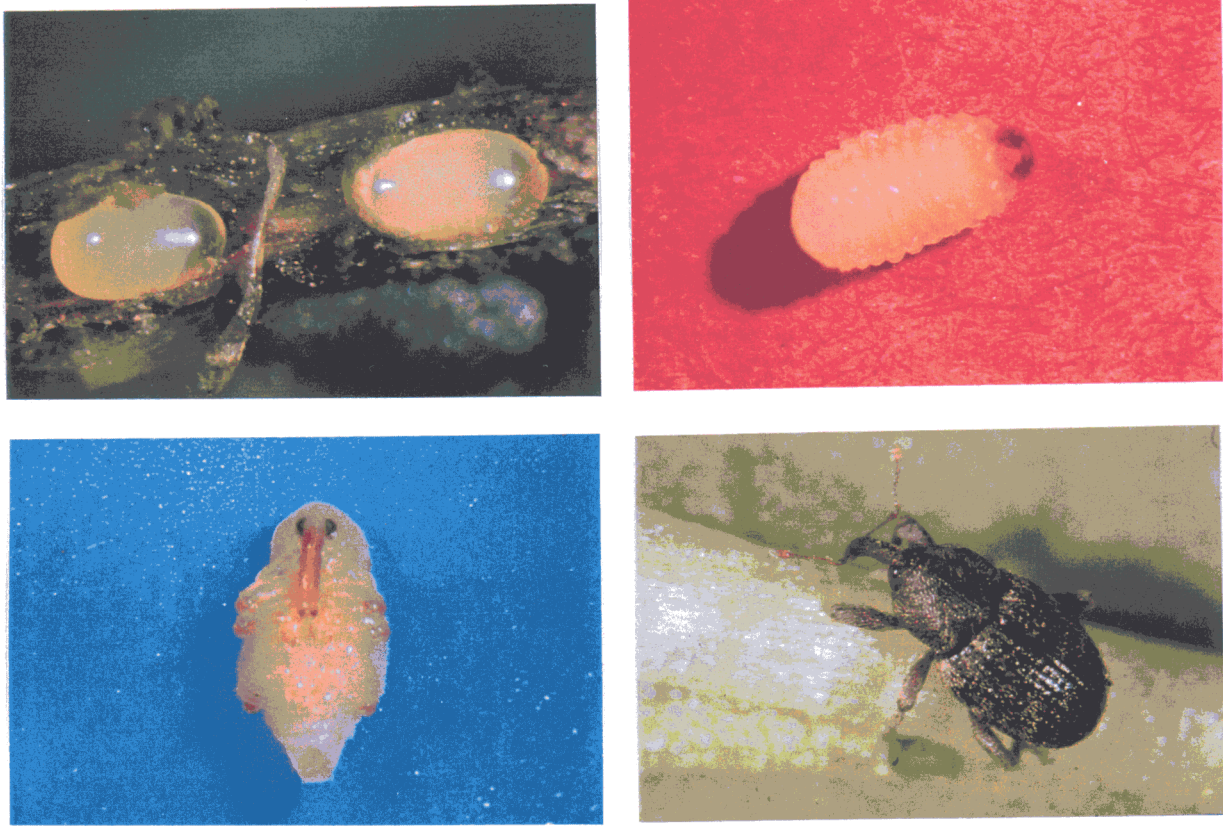


Figura 1.1. Huevos, larva, pupa y adulto de *Aubeonymus mariaefrancisciae* Roudier

## 1.1. *A. mariaefranciscae* ROUDIER

### 1.1.1. Origen, distribución geográfica y expansión de la plaga

El origen de *A. mariaefranciscae* es incierto. Podría haber estado presente en el campo antes de su localización como especie plaga, aunque TABERNER *et al.* (1997) conjeturan que podría haberse introducido recientemente desde el norte de África.

Los primeros focos de daño fueron encontrados en Montemayor (Córdoba) y Écija (Sevilla) (SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.*, 1982). A partir de los focos inicialmente detectados la plaga se ha ido extendiendo por la región, aumentando el tamaño de los primeros focos al mismo tiempo que se detectaban otros nuevos. Según GIRALDO y ALVARADO (1990b), en 1989 eran ya unas 3000 las hectáreas afectadas, lo cual supone aproximadamente un 5% del total de la zona sur.

Estudios realizados para determinar la variabilidad genética de esta especie revelaron que el árbol filogenético obtenido con individuos procedentes de los cinco focos de infestación más importantes se podía relacionar fácilmente con el patrón de dispersión observado en *A. mariaefranciscae* (TABERNER *et al.*, 1997). Así, el primer foco de daño se produjo en Écija en 1979. Inmediatamente después, en 1980, apareció en Santaella, a 21 km de Écija, seguido de otro ataque en Fernán Núñez, a 16 km de Santaella. Más tarde, en 1985, se produjo un nuevo ataque en Mengíbar y, finalmente, en 1993 en Carmona, ambas localidades bastante apartadas del foco original (a unos 100 km, aunque en direcciones distintas). Parece, por tanto, que hubo un único episodio colonizador, seguido de una expansión tras franquear las inmediaciones de los cultivos de remolacha azucarera.

Como posibles vías de dispersión se han sugerido, dentro de cada foco, el agua y aperos y también mediante la propia movilidad de los adultos, mientras que su propagación de foco a foco podría haber sido a través de corrientes de agua, maquinaria, aperos y al transportar la remolacha a la fábrica (GIRALDO Y ALVARADO, 1990b).

### 1.1.2. Descripción

Los adultos de *A. mariaefranciscae* miden, sin rostro, unos 4,30 mm de longitud y la anchura máxima es de unos 2 mm. El cuerpo es oval, robusto, negro, con las patas y las antenas ferruginosas. Presentan un revestimiento escamoso irregular de color marrón grisáceo que cubre parcialmente el tegumento, el cual posee una microrreticulación poco marcada que no modifica su aspecto brillante. Las patas son robustas, punteadas y pubescentes. La cabeza es esférica, con ojos ovales. El rostro tiene una longitud similar a la del pronoto y está ciliado por debajo, es casi cilíndrico y está regularmente curvado. Las antenas son geniculadas, alargadas y finas, con el escapo casi recto, el funículo con siete artejos y la maza oval y obtusa en la extremidad. Pronoto ligeramente transversal con los lados claramente redondeados. El canal rostral de la parte ventral del protórax está muy marcado y bien limitado lateralmente, alcanzando claramente el borde anterior de las cavidades coxales anteriores. Los élitros, que están soldados, son ovales, con los hombros medianamente salientes hacia delante. De la base de todos los puntos de los élitros nace un pelo escamoso tumbado hacia atrás (ROUDIER, 1981).

Los huevos son amarillos, ovalados, de unos 0,74 mm de longitud, con el corion liso.

Las larvas son ápodas, blancas y arqueadas, y alcanzan unos 5 mm de longitud. La cabeza es redonda y de color marrón pálido. Antenas cónicas, un poco más largas que anchas. Mandíbulas esclerotizadas con las puntas romas. Lóbulos pediales con 4 sedas.

Las pupas son libres, blancas, de unos 5 mm. En el extremo del abdomen presentan dos formaciones espiniformes que llevan en su base una fuerte seda (SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.*, 1982).

### 1.1.3. Biología

El ciclo biológico de *A. mariaefranciscae* parece ajustarse perfectamente a la fenología del cultivo de remolacha en el sur de España, donde la siembra se produce en

otoño. Los adultos comienzan su actividad en otoño con las primeras lluvias, coincidiendo con la nascencia de la remolacha. Durante el otoño y gran parte del invierno su actividad es tan solo nutricia, alimentándose de las plántulas y de las raíces de plantas más viejas. Las cavidades excavadas para alimentarse se pueden observar sobre todo en la parte enterrada cercana a la superficie, pero también hasta 25 cm de profundidad (hasta 25 cm) (SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.*, 1982). Este periodo de inactividad reproductiva pero con actividad alimenticia es lo que se ha llamado diapausa reproductiva, fenómeno común en los insectos y ampliamente extendido entre los coleópteros con una sola generación al año (MASAKI, 1980; TAUBER *et al.*, 1986).

Según SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.* (1982) la actividad reproductora empezaría entre finales de febrero y principios de marzo y se prolongaría hasta mayo, mientras que GIRALDO y ALVARADO (1990a) mantienen que comienza en enero y se prolonga hasta mayo, siendo más alta los tres primeros meses del año y disminuyendo a partir de marzo.

Los adultos depositan los huevos aislados aprovechando las cavidades producidas para alimentarse. De acuerdo con SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.* (1982), los huevos se localizan preferentemente a lo largo de toda la longitud de la raíz, y más raramente en la zona de la corona o en la base de los peciolos, pudiendo encontrarse puestas en el suelo en las proximidades de la raíz. Por el contrario, GIRALDO y ALVARADO (1990a) indicaron que las puestas se realizaban en el suelo a distintas profundidades cerca de la raíz, pero no dentro de ellas. Las hembras realizan puestas a la vez que van ovulando y al diseccionar hembras grávidas éstas presentaban de 5 a 7 huevos en su interior (GIRALDO y ALVARADO, 1990a). Sin embargo nosotros hemos diseccionado hembras con hasta 13 huevos (observación personal).

Las primeras larvas aparecen en el campo a finales de enero (GIRALDO y ALVARADO, 1990a) o a mediados de marzo (SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.*, 1982) y durante los meses de marzo, abril y mayo pueden verse simultáneamente en el campo adultos, huevos y larvas en los diferentes estadios. Las larvas viven en la raíz, y cuando completan su desarrollo fabrican en las proximidades de éstas una cámara, con tierra que aglutinan gracias a sustancias que ellas mismas segregan, en la que pupan. Estudios de laboratorio han revelado que *A. mariaefranciscae* posee cuatro estadios larvarios, cuyos

tiempos de desarrollo dependen de la temperatura. El rango de temperaturas en el que los estadios inmaduros fueron capaces de completar su desarrollo era muy estrecho (entre 20 y 30°C). El tiempo de desarrollo del cuarto estadio larvario abarcó el 50% del periodo larvario total en todas las temperaturas estudiadas, lo cual sugiere algún significado adaptativo, ya que este hecho permite a los individuos subsistir en la época final del invierno para alcanzar el estado pupal a finales de primavera, cuando la temperatura ya es más alta en la zona remolachera del sur de España (MARCO *et al.*, 1997).

Las primeras pupas aparecen a finales de abril (AYALA *et al.*, 1994). En la cámara fabricada se transforman en adultos, y entre mayo y junio ya se pueden encontrar los primeros adultos de la nueva generación, aunque otros permanecen enterrados estiviendo hasta el otoño siguiente. Así, parece que *A. mariaefranciscae* tiene una sola generación por año en Andalucía (MARCO *et al.*, 1997). En el momento de la recolección podemos encontrar larvas, pupas y adultos, siendo transportados algunos de ellos hasta las fábricas azucareras.

GIRALDO y ALVARADO (1990a) señalan que los adultos tienen una gran movilidad durante la noche. Durante el día se ocultan en lugares protegidos de la luz, principalmente bajo la costra de tierra, terrones, restos de remolacha, etc., y salen de sus refugios diurnos al oscurecer.

#### 1.1.4. Hospedadores alternativos

Los daños producidos por *A. mariaefranciscae* no se han registrado en ninguna otra planta cultivada. GIRALDO y ALVARADO (1990a) sugirieron distintos huéspedes alternativos de los cuales se alimentaban. Como plantas cultivadas indicaron la acelga (subespecie de *Beta vulgaris*, al igual que la remolacha azucarera), y como flora silvestre *Raphistrum rugosum* (L.), *Diplotaxis* spp., *Anacichus radiatus* Loisel., *Picris echioides* L. y *Malva silvestris* L.. No obstante, los datos se basan en observaciones ocasionales, y además nunca se llegaron a encontrar huevos o larvas en estas plantas.

Más recientemente se han llevado a cabo estudios de laboratorio para determinar el rango de hospedadores de este insecto (MARCO *et al.*, 1998b). Para los experimentos se emplearon plantas de remolacha y acelga, así como 19 extractos de plantas pertenecientes a 13 familias distintas, que son comunes en los alrededores de los campos de remolacha azucarera de Andalucía. Los resultados obtenidos revelaron que los adultos sólo fueron capaces de alimentarse y hacer la puesta en las dos subespecies de *B. vulgaris*: la remolacha azucarera (*B. vulgaris vulgaris*) y la acelga (*B. vulgaris cicla*). Además se encontró un efecto fagoestimulante cuando se suministraba a los adultos homogeneizados de remolacha y acelga sobre plantas de las que no se alimentan. Por el contrario, al suministrar sacarosa no se observó ningún efecto. Estos resultados sugieren que *A. mariaefranciscae* tiene un rango muy restringido de hospedadores y que la selección del hospedador viene determinada por la presencia de un compuesto fagoestimulante no determinado en la remolacha azucarera y la acelga, y no por el reconocimiento de sustancias disuasorias en las plantas no hospedadoras (MARCO *et al.*, 1998b).

#### 1.1.5. Daños producidos en la remolacha y métodos de control

Los daños causados por *A. mariaefranciscae* pueden ser muy graves, especialmente los producidos por los adultos en otoño, que atacan a las plántulas recién emergidas a las que muerden en la radícula, bordes y centro de los cotiledones y las primeras hojas verdaderas, acabando por causarles la muerte. En casos de ataques fuertes pueden destruir la práctica totalidad de las plántulas de remolacha, obligando a hacer replantaciones del cultivo, lo cual supone un retraso en el mismo y un gran gasto económico en semillas. Debido a la longevidad de los adultos los ataques se pueden suceder sobre las plantas en sus distintas fases de desarrollo, pero a partir de unas cuatro hojas no se suele producir la muerte de las plantas (GIRALDO y ALVARADO, 1990a).

Tanto los adultos como las larvas producen daños también en primavera. Los adultos se alimentan de las hojas y la raíz, mientras que las larvas excavan galerías superficiales en la raíz que dificultan su normal desarrollo (Figura 1.2). En este caso no

llegan a causar la muerte, pero sí son responsables de pérdidas en producción, habiéndose informado reducciones de hasta un 30% en peso de raíz, con 20 larvas por planta (GIRALDO y ALVARADO, 1990a).

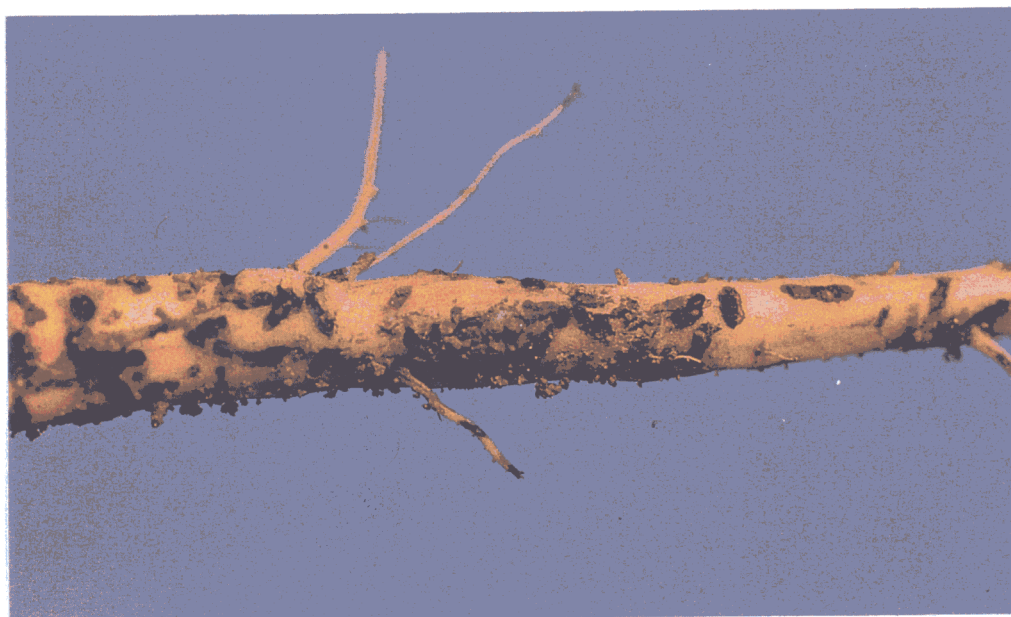


Figura 1.2. Daños producidos por las larvas de *A. mariaefrancisciae* en la raíz de la remolacha azucarera.

El control de *A. mariae franciscae* en el campo presenta numerosas dificultades debido a sus hábitos telúricos: el periodo larvario tiene lugar bajo tierra y los adultos pasan la mayor parte del día enterrados, lo que dificulta el control químico.

El hallazgo de individuos en el campo afectados por el hongo entomopatógeno identificado posteriormente como *Beauveria bassiana* (MELGAREJO, comunicación personal) hizo pensar en su utilización como método de control biológico. Sin embargo, ensayos en el laboratorio llevados a cabo para estudiar su eficacia revelaron que Naturalis-L, insecticida a base de esporas de este hongo, no era eficaz frente a los adultos de *A. mariae franciscae* (MARCO y CASTAÑERA, 1996).

Las medidas más frecuentes de control aplicadas en la actualidad se basan en las recomendaciones efectuadas por AYALA *et al.* (1994) y AIMCRA (1998):

a) Métodos culturales:

- \* Rotación de cultivos en las parcelas afectadas.
- \* Creación de barreras de protección en el cultivo mediante líneas de alta densidad de remolacha con semilla multigermen protegida con insecticidas.

b) Métodos químicos:

\* Aplicación de pildorados: imidacloprid (Gaucho), aldicarb (Temik), carbofurano + fenamifos (Curaterr Forte), oxamilo (Vidate), benfuracarb (Oncol), imidacloprid (Gaucho) + teflutrin (Force).

\* Aplicaciones mediante pulverización con insecticidas foliares (principalmente metilparatión). Más recientemente se han obtenido buenos resultados en el campo con fipronil.

Por otra parte, MARCO y CASTAÑERA (1996) estudiaron en el laboratorio la eficacia de aplicaciones foliares de nueve insecticidas para el control de *A. mariae franciscae*, y obtuvieron buenos resultados con tres organofosforados, además del metilparatión: clorpirifos, metil-clorpirifos y diazinon, con mejores características toxicológicas, aunque sería necesario verificar la eficacia de estos insecticidas en condiciones de campo.

## 1.2. LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE INSECTOS (RCIs)

En las últimas décadas se han investigado nuevos tipos de compuestos químicos más selectivos, menos persistentes y de menor toxicidad en el hombre. La selectividad de un insecticida juega un papel fundamental en el concepto actual del manejo de plagas. La selectividad de un compuesto se puede ver desde varios puntos de vista distintos. La selectividad ecológica se basa en que el único organismo que entre en contacto con el producto sea la plaga frente a la que se realiza el tratamiento. Ésto puede conseguirse manejando adecuadamente una serie de factores relativos a la formulación y la aplicación del producto y conociendo la biología y comportamiento de la especie hacia la cual se dirige el tratamiento. Por otra parte, la selectividad fisiológica se basa en el modo de acción del compuesto. Ello está relacionado con diferencias en la morfología, fisiología y bioquímica de los distintos organismos expuestos (METCALF, 1990).

Siguiendo este último concepto, se ha desarrollado una nueva generación de insecticidas que absorbidos por el insecto se incorporan a sus procesos internos de desarrollo alterándolos de forma irreversible. Son los llamados reguladores del crecimiento de insectos (RCIs), que interfieren directa y negativamente sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos y a los que se ha denominado "tercera generación de insecticidas" (CASIDA y QUISTAD, 1998). Dentro de este grupo se encuentran los compuestos:

- \* inhibidores de la síntesis de quitina
- \* análogos y antagonistas de la hormona juvenil y juvenógenos
- \* análogos y antagonistas de la hormona de la muda

## 1.2.1. Insecticidas que inhiben la síntesis de quitina

### 1.2.1.1. El tegumento de los insectos

Una de las características que comparten todos los insectos, y que también es común al resto de los artrópodos es la presencia de una cubierta quitinosa externa, el tegumento, que les confiere una gran rigidez, y que es responsable en gran medida del éxito evolutivo de este grupo. Dos de las consecuencias más importantes de la existencia de esta cubierta rígida de los insectos son la impermeabilidad que les confiere y la forma como se manifiesta el crecimiento: es necesario que el animal se desprenda de ella periódicamente, durante el proceso que denominamos ecdisis o muda. Tal proceso origina un estado de crisis durante el cual el insecto permanece inmóvil, deja de alimentarse, y la protección que le ofrece su exoesqueleto es muy limitada, puesto que durante la muda se producen cambios estructurales en la cutícula para formar otra nueva (ZACHARUK, 1976; GNATZY y ROMER, 1986). Es en este momento de vulnerabilidad cuando algunos insecticidas pueden ser más efectivos.

De acuerdo con la información aportada por diversos autores (HACKMAN, 1971, 1987; REYNOLDS, 1987; DAVIES, 1991; NEVILLE, 1986; BINNINGTON, 1993), las diferentes capas que constituyen el tegumento son, comenzando desde el interior, las siguientes:

**Membrana basal.** Está inmediatamente debajo de la epidermis. Es una capa continua, muy fina, de estructura glandular amorfa. Contiene mucopolisacáridos y a su nivel se produce un importante transporte de sustancias hacia las células epidérmicas.

**Epidermis.** Consiste en una capa celular encargada de segregar la mayor parte de la cutícula, y está encargada de disolver y absorber casi la totalidad de la vieja cutícula cuando el insecto muda. Su estructura microscópica guarda estrecha relación con sus ciclos de actividad secretora.

**Cutícula.** Es la capa más importante, puesto que contiene la quitina, compuesto que sirve de soporte a la estructura del tegumento. Las funciones que desempeña son muy

variadas. Por su situación protege y delimita la integridad anatómica del insecto, y debido a su composición y estructura interviene activamente en su fisiología del crecimiento y desarrollo. Tiene estructura laminar, con capas dispuestas en paralelo a la superficie, atravesadas por poros o canales. Consta de dos capas: la más externa o epicutícula y la interna o procutícula.

La epicutícula no contiene quitina y se divide a su vez en tres capas que son, de dentro a fuera: la epicutícula interna o proteica, sin estructura lamelada; la epicutícula externa, antes denominada cuticulina, que es una capa trilaminar y es la primera que se deposita durante la apolisis; y la capa superficial o capa de ceras, encargada de reducir la pérdida de agua a través del tegumento. Algunos autores afirman la existencia de otra capa más externa, la capa de cemento, aunque parece que no todos los insectos la poseen.

La procutícula o cutícula quitinosa es la capa más interna de la cutícula. Está formada esencialmente por una matriz proteica en la que van embebidas las fibras de quitina. Presenta una estructura lamelada, resultado de la ordenación y distribución de las microfibrillas de quitina en diferentes planos, formando finas capas. Las microfibrillas de las sucesivas capas se disponen orientadas formando diferentes ángulos, siendo el ángulo de rotación direccional constante, lo que da lugar a una disposición denominada helicoidal.

La procutícula se divide en dos capas. La más externa es la exocutícula, formada principalmente por quitina y proteínas, estabilizadas mediante compuestos fenólicos, dando como resultado un material duro, llamado esclerotina, que es el que proporciona a la cutícula su rigidez. La exocutícula falta o está reducida en las zonas más flexibles del tegumento, y los insectos de cutícula blanda y delgada pueden carecer de ella por completo. La endocutícula es normalmente la capa más gruesa, y también está formada por quitina y proteínas, pero no está endurecida.

La quitina, que como ya se ha mencionado anteriormente es el compuesto que determina las propiedades que definen el tegumento de los insectos, es un polisacárido constituido por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces  $\beta$ -1-4. Es

insoluble en la mayoría de los solventes. El polímero tiene una estructura helicoidal que es estabilizada mediante puentes de hidrógeno intramoleculares. En estado cristalino, estabilizado mediante puentes de hidrógeno de polímeros adyacentes, las cadenas de polisacárido se ensamblan para formar microfibrillas, que constituyen el componente fibroso del exoesqueleto de los insectos (HEPBURN, 1985; COHEN, 1987; HACKMAN, 1987). Este complejo es el que proporciona al tegumento la resistencia a fuerzas de tensión, flexión y compresión así como una alta relación fuerza/peso asociada a la ausencia de sales minerales. La quitina, además, es la encargada de dar flexibilidad y elasticidad no sólo a los tegumentos blandos de algunos estados inmaduros, sino también a las uniones entre escleritos y segmentos en el caso de adultos con tegumentos endurecidos, para facilitar los movimientos de los apéndices, las contracciones y distensiones asociadas con la respiración activa y el vuelo y los finos mecanismos de los oviposidores, formados por varios segmentos invaginados unos en otros (HEPBURN y JOFFE, 1976; HEPBURN, 1985).

La quitina no es un compuesto exclusivo de los artrópodos, sino que se halla ampliamente distribuido en toda la escala de los seres. Además la poseen, aunque en pequeñas proporciones, algunos protozoos, cnidarios, anélidos, moluscos y nematodos, algunas algas diatomeas, y constituye un componente determinante de la pared celular de casi todos los hongos (RUIZ-HERRERA, 1993).

El proceso de la formación de quitina implica una secuencia ordenada de complicadas transformaciones (Figura 1.3.) (COHEN, 1987). La enzima clave en la formación de quitina es la quitina-sintetasa, presente en la membrana de las células epidérmicas.

#### **1.2.1.2. Las benzoilfenilureas**

Existen diferentes compuestos inhibidores de la formación de la cutícula, siendo los más importantes las benzoilfenilureas (BPUs). El descubrimiento de las propiedades insecticidas de las BPUs representa un importante avance en el desarrollo de productos

fitosanitarios, ya que el punto de ataque de este grupo de principios activos no es el sistema nervioso, sino el tegumento de los insectos, lo cual proporciona un alto grado de selectividad hacia este grupo de organismos.

Las BPUs, en general, constan de dos anillos aromáticos sustituidos unidos por un puente de acilurea. Los sustituyentes más comunes son halógenos (Cl y F), aunque los sustituyentes metilo, metoxilo, trifluormetoxilo o pentafluormetoxilo también presentan alta actividad insecticida. Es muy acusada su insolubilidad en agua y muchos solventes orgánicos (RETNAKARAN *et al.*, 1985).

Está bien establecido que las BPUs inhiben la síntesis de quitina en larvas de insectos, impidiendo la incorporación de las unidades de N-acetilglucosamina en el polímero de quitina, y mediante una acción citostática sobre la producción de quitina de las células epidérmicas (BEEMAN, 1982). Sin embargo existen diversas teorías acerca de su modo de acción. RETNAKARAN y WRIGHT (1987) señalan ocho de ellas, e indican que la más ampliamente aceptada es la que propone la inhibición de la quitina-sintetasa, enzima catalizadora de la polimerización del UDP-N-acetilglucosamina a quitina (VAN ECK, 1979), aunque también se podría dar una combinación de dos o más de las teorías citadas.

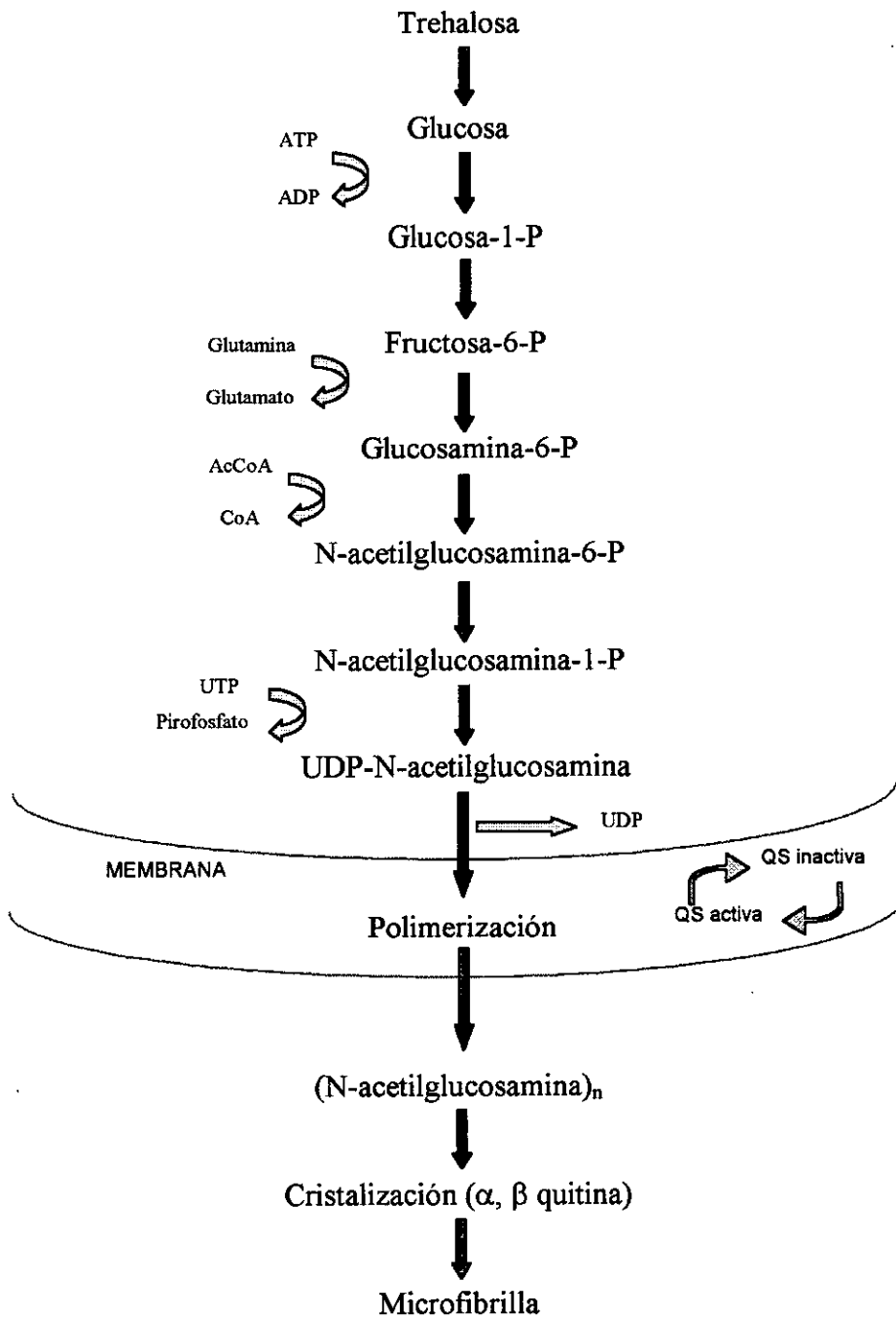


Figura 1.3. Ilustración esquemática de la síntesis de quitina (de Cohen, 1987, modificado).

QS = quitina sintetasa

La principal actividad insecticida de las BPU es la larvicida por ingestión, aunque también se ha detectado efecto larvicida por contacto en algunas especies. En general, existe una gran diversidad de síntomas producidos sobre los insectos tras su tratamiento con BPU, entre los que se encuentran (RETNAKARAN *et al.*, 1985; RETNAKARAN y WRIGHT, 1987):

- *Trastornos en la ecdisis.* El proceso de muda se inicia con la apolisis pero no se completa. La severidad de la interrupción está en relación directa con la dosis y es característica para cada compuesto y especie de insecto. La interrupción puede ser completa de forma que el insecto muere dentro de la vieja cutícula, o bien puede comenzar el desprendimiento de la exuvia sin concluirse. También afecta a la muda de larva a pupa.

- *Interrupción de la alimentación.* En algunos insectos, aunque aparentemente la muda es normal, las mandíbulas y el labro aparecen desplazados, de manera que no es capaz de alimentarse

- *Mortalidad retardada y efectos ovicidas.* Se han detectado casos de muerte de adultos en el momento de su emergencia, tras haber tratado larvas de último estadio. También se han demostrado los efectos ovicidas tras el tratamiento de adultos. En este caso, el embrión aparentemente está completamente formado, pero es incapaz de romper el corion o de desprenderse de él completamente.

- *Trastornos en la reproducción.* En algunos coleópteros el tratamiento de adultos con BPU ha ocasionado una reducción de la fecundidad y también se puede darse fallos en el apareamiento de los machos jóvenes.

Las BPU han mostrado actividad para un gran número de plagas de insectos de diversos órdenes: ortópteros, isópteros, malófagos, tisanópteros, hemípteros, lepidópteros, coleópteros, dípteros e himenópteros (RETNAKARAN *et al.*, 1985). Para que las aplicaciones tengan éxito se debe tener en cuenta no sólo su modo de acción, sino también la biología y el comportamiento de la especie a tratar. Su alta especificidad y persistencia y baja toxicidad ha hecho que el uso de BPU en los últimos años haya

aumentado considerablemente, recomendándose cada vez más en programas de control integrado (LEONARD *et al.*, 1987; HOROWITZ *et al.*, 1992; FISK *et al.*, 1993) y frente a las plagas de productos almacenados (ELEK y LONGSTAFF, 1994; OBERLANDER *et al.*, 1997).

### 1.2.2. Las hormonas endocrinas de los insectos y su uso como insecticidas

El crecimiento y el desarrollo de los insectos, que están interrumpidos por periodos de muda, están básicamente regulados por dos compuestos: la hormona esterooidal 20-hidroxiecdisona (hormona de la muda (HM) o ecdisterona) y el sesquiterpenoide hormona juvenil (HJ). Existe una información abundante sobre su implicación principalmente en el control de la metamorfosis de los insectos. Así, siguiendo el esquema clásico, su distinta concentración en el cuerpo del insecto determinaría el tipo de muda. En la actualidad se sabe que el esquema de sus funciones no es tan simple, se conoce más detalladamente su modo de acción y se han descubierto nuevos lugares de síntesis y nuevas funciones de las mismas, destacándose la implicación de ambas hormonas en la regulación de la maduración reproductora en el estado adulto (RETNAKARAN *et al.*, 1985; LOEB, 1993; DHADIALLA *et al.*, 1998).

Parece que tanto la HJ como la HM actúan uniéndose a receptores específicos, y el complejo hormona-receptor interacciona con la cromatina, que determina la transcripción (RIDDIFORD, 1985). Estos receptores son lo suficientemente versátiles como para interaccionar con otras moléculas estructuralmente relacionadas, resultando en una acción biológica idéntica. Este hecho ha permitido el desarrollo de compuestos biomiméticos de las hormonas naturales, con unas propiedades biológicas y técnicas más convenientes para su aplicación práctica como agentes insecticidas. Igualmente, la estrategia del uso de antagonistas de estas hormonas ofrece unas perspectivas prometedoras, ya que su efecto suprime, en principio, la función que debe ejercer la hormona (BELLÉS, 1988).

### 1.2.2.1. Análogos funcionales de la hormona juvenil

La HJ es sintetizada y secretada por los corpora allata, y tiene un papel primordial en la fisiología de los insectos, ya que interviene en la regulación de la metamorfosis, reproducción, diapausa, comportamiento y comunicación (BOWERS, 1982).

Los compuestos bioanálogos de la HJ o juvenoides son compuestos con efecto hormonal que provocan, cuando son administrados adecuadamente, trastornos en aquellas funciones vitales de los insectos que son controladas o influenciadas por la hormona juvenil. Tras la afirmación de WILLIAMS (1967) de que los compuestos que imitan la acción de la HJ podían ser empleados como insecticidas se han descubierto numerosos análogos. Todos los juvenoides conocidos, a pesar de su gran diversidad estructural, se derivan teóricamente de la estructura de la HJ natural (SEHNAL, 1983).

Dado que la HJ parece estar implicada en numeros procesos del desarrollo de los insectos, los juvenoides tienen distintos efectos sobre los insectos tratados: inhibición de la embriogénesis (aplicados sobre huevos y adultos), inhibición de la metamorfosis en sus diferentes etapas, efectos sobre el polimorfismo de los insectos (incluyéndose aquí los efectos sobre la diferenciación de castas de los insectos sociales y sobre la diapausa de los estados inmaduros), efectos sobre la reproducción y efectos sobre las células germinales (revisiones de SEHNAL, 1983; RETNAKARAN *et al.*, 1985).

Su eficacia en el campo depende del momento de aplicación. El producto debe llegar al insecto en el corto periodo en el que se produce el cambio de larva a pupa y de pupa a adulto (insectos holometábolos), o de ninfa a adulto (hemimetábolos), momento en que son sensibles a su actividad, lo cual es prácticamente imposible de determinar en poblaciones en desarrollo asincrónico. Hay que tener en cuenta que cuando la plaga se presenta en el estado larvario el tratamiento puede ser contraindicado, ya que podrían aparecer larvas supernumerarias viables que agravarían el problema. Además presenta elevados costes de desarrollo, y problemas técnicos debido a las características de persistencia de los mismos (alta volatilidad, liposolubilidad, degradabilidad), que se

pueden solucionar recurriendo a sistemas de aplicación adecuados (RETNAKARAN *et al.*, 1985; DOMINGO, 1988).

En los últimos años se han descubierto nuevas moléculas, como el fenoxicarb y el piriproxifén, que han mostrado muy buenos resultados en el laboratorio (HIGBEE *et al.*, 1995; KAAKEH *et al.*, 1997; PENER *et al.*, 1997; PARKMAN y FRANK, 1998). Algunos experimentos en el campo y contra insectos de las casas han probado su alta actividad y especificidad y su baja toxicidad y persistencia (REID *et al.*, 1990; LAVEISSIERE y SANE, 1994). Todos estos resultados hacen pensar en que su uso práctico tenderá a extenderse en los próximos años.

#### **1.2.2.2. Análogos funcionales de la hormona de la muda**

En los insectos, la muda está controlada por hormonas con estructuras de esteroides polihidroxilados, denominadas ecdisonas, siendo particularmente importante la ecdisona, secretada por las glándulas protorácicas durante las fases juveniles, que es hidroxilada en los tejidos periféricos, convirtiéndose en 20-hidroxiecdisona o ecdisterona, el metabolito más activo. En un principio se pensaba que esta hormona era sintetizada únicamente en las glándulas protorácicas. Sin embargo, existen ya numerosas evidencias de que los ecdisteroides en general son sintetizados en casi todos los tejidos periféricos de los insectos durante sus estados inmaduros (SLÁMA, 1998). Asimismo, también se han detectado ecdisteroides en ovarios, embriones (HAGEDORN, 1985; HOFFMANN y LAGUEUX, 1985; LOEB, 1993), y en machos adultos de determinadas especies, aunque en niveles poco significativos (LOEB *et al.*, 1982, 1987). Por tanto, además de intervenir en la regulación de la muda y metamorfosis, esta hormona tiene un importante papel en algunos insectos durante el desarrollo ovárico (BOWERS, 1982; HAGEDORN, 1985).

Los compuestos agonistas de la HM reciben el nombre de ecdisoides. Este tipo de sustancias despertaron escasa atención en un principio como potenciales

controladores de plagas, debido a su naturaleza compleja y a su difícil penetrabilidad a través de la cutícula debido a su naturaleza esteroideal (MARCO y TOMÁS, 1988).

El desarrollo de agonistas no esteroideos de la HM es muy reciente, remontándose al descubrimiento del RH-5849, precursor de las bisacilhidracinas o diacilhidracinas, ecdisoides no esteroideos (ALLER y RAMSAY, 1988; WING, 1988; WING *et al.*, 1988). Parece que actúan a nivel de los receptores de la ecdisona, teniendo por tanto una alta especificidad hacia los insectos. Este hecho unido a su baja toxicidad hace que sea un grupo de compuestos prometedores en el manejo integrado de plagas (WING y ALLER, 1990; DHADIALLA *et al.*, 1998; COWLES *et al.*, 1999).

Al igual que la hormona juvenil, la ecdisona está implicada no sólo en la metamorfosis de los insectos, sino en gran cantidad de procesos relacionados con el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. Por este motivo, el empleo de agonistas de la HM produce gran variedad de respuestas en los insectos, que dependen de la dosis, la edad fisiológica y la duración de la exposición a la hormona exógena. El conjunto de efectos y síntomas que ocurren al administrar una determinada dosis de HM exógena se ha denominado hiperecdisonismo ya que son similares a los que ocurren tras administrar un exceso de ecdisteroides (WILLIAMS, 1968), y se ha descrito en gran variedad de lepidópteros, dípteros, hemípteros y coleópteros. Fundamentalmente estos efectos son visibles a nivel de la morfología del individuo, al inducir cambios importantes en el tejido epidérmico, pero el resto del organismo parece que también resulta afectado, presentándose defectos en el crecimiento, en la maduración de los órganos sexuales y los huevos, en el cuerpo graso, aparato digestivo, sistema excretor, etc. (DHADIALLA *et al.*, 1998).

El empleo de ecdisoides en el control de plagas ha tomado durante la última década mucha importancia debido al descubrimiento de nuevas moléculas efectivas de bisacilhidracinas que confirman la baja toxicidad de estos compuestos y su alta especificidad (revisión de DHADIALLA *et al.*, 1998)

### 1.3. LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS

En la búsqueda de nuevas técnicas para el control de plagas de insectos, los avances de los últimos años en el campo de la genética molecular de plantas han permitido conferir resistencia a las plantas cultivadas incorporándolas genes de otras especies vegetales, animales, bacterias e incluso de los propios insectos (SCHULER *et al.*, 1998). Entre los genes de resistencia que están siendo objeto de estudio como candidatos para mejorar la resistencia de las plantas frente a los insectos se encuentran los que expresan inhibidores de proteasas. Estos inhibidores, ampliamente utilizados como proteínas de defensa en plantas, se unen al centro activo de las proteasas alterando la digestión proteica del insecto tras su ingestión. La expresión de los genes que codifican estos inhibidores en plantas ha resultado en un incremento de la resistencia frente a diferentes plagas en ensayos de laboratorio (HILDER *et al.*, 1987). Sin embargo, para la utilización adecuada de esta nueva herramienta de control de plagas resulta esencial el conocimiento de las funciones digestivas de la especie a controlar, así como su respuesta a la presencia de estas proteínas de defensa.

#### 1.3.1. Las proteasas digestivas de los insectos

Tras ingerir los insectos la dieta, las proteínas son hidrolizadas a oligómeros, dímeros y aminoácidos por la acción secuencial de las proteasas. Estas enzimas actúan sobre los enlaces peptídicos internos de las proteínas (endoproteasas), o bien sobre los extremos de las cadenas peptídicas ( exopeptidasas).

En insectos se han citado cuatro tipos de endoproteasas digestivas que se clasifican en función del mecanismo catalítico de su centro activo: serín-, cisteín-, aspartil- y metaloproteinasas, cada una de ellas con distintos pHs óptimos de actividad. A su vez, las exopeptidasas se clasifican de acuerdo con la especificidad de los sustratos hidrolizados, recibiendo el nombre de aminopeptidasas si hidrolizan un aminoácido del extremo N-terminal, y carboxipeptidasas si éste es del extremo C-terminal (revisiones en McDONALD y BARRET, 1986; RAWLINGS y BARRET, 1993).

En coleópteros, las actividades proteolíticas encontradas en el tubo digestivo están basadas en la presencia de numerosas endoproteasas de distintas clases, así como exopeptidasas. La mayoría de las larvas y adultos caracterizados hasta el momento poseen tubos digestivos ligeramente ácidos y la actividad proteolítica reside principalmente en cisteín endoproteasas (MURDOCK *et al.*, 1987; WOLFSON y MURDOCK, 1990). Sin embargo, en algunas especies se ha encontrado actividad de tipo aspartil con pHs óptimos muy ácidos (WOLFSON y MURDOCK, 1990) y en otras especies se han detectado serín endoproteasas digestivas con pHs óptimos alcalinos (BAKER, 1982; FERREIRA y TERRA, 1989; ORTEGO *et al.*, 1998). También se han citado en distintas especies de coleópteros la presencia de amino- y carboxipeptidasas (BAKER, 1982; CHRISTELLER *et al.*, 1989; FERREIRA y TERRA, 1989; ORTEGO *et al.*, 1998).

### 1.3.2. Inhibidores de proteasas y su uso en el control de plagas

Los inhibidores de proteasas son un grupo de proteínas con una amplia distribución en plantas (RICHARDSON, 1977; LASKOWSKI y KATO, 1980; RYAN, 1981, 1990; WHITAKER, 1997). Muchos de estos inhibidores se encuentran constitutivamente en órganos de reserva, como semillas y tubérculos, pero también pueden ser inducidos en respuesta a daños por herbívoros (RYAN, 1990). Los inhibidores de proteasas participan en los mecanismos de regulación fisiológica en la planta y están implicadas en los mecanismos de defensa frente a insectos y patógenos (RYAN, 1990; BOTELLA *et al.*, 1996; WHITAKER, 1997).

Se han ensayado numerosos inhibidores proteicos *in vitro* para evaluar su eficacia frente a insectos dañinos. Los resultados obtenidos en estos trabajos muestran cómo algunos inhibidores pueden ser efectivos como inhibidores de la actividad proteolítica de los insectos, pero mientras un inhibidor puede ser capaz de inhibir notablemente un tipo de actividad en una especie, puede carecer de efecto frente al mismo tipo de actividad en otra, lo que implica la necesidad de estudiar cada caso particular (CHRISTELLER y SHAW, 1989; HOUSEMAN *et al.*, 1989). Igualmente, existen numerosos estudios *in vivo* con inhibidores proteicos añadidos a la dieta de cría de

distintas especies (por ejemplo GATEHOUSE *et al.*, 1979; JOHNSTON *et al.*, 1993; KURODA *et al.*, 1996) o utilizando plantas con altos niveles inducidos de inhibidores que han mostrado sus efectos sobre el desarrollo y supervivencia de algunas especies (CARBONERO *et al.*, 1992; HEATH *et al.* 1997; DING *et al.*, 1998).

No obstante, es necesaria una mayor investigación para profundizar en el conocimiento del funcionamiento de la digestión en los insectos y en las respuestas de éstos a la ingestión de inhibidores que lleve a la utilización correcta de los mismos.

#### 1.4. OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS

El control de plagas lleva consigo el conocimiento de los aspectos básicos de la biología del insecto al cual se pretende hacer frente, para una aplicación más eficaz de las medidas de control existentes a nuestro alcance, con el fin de lograr un control más efectivo de la plaga en el campo.

La biología de *A. mariaefranciscae* presenta puntos oscuros, en especial en lo referente a la influencia de distintos factores ambientales en el desarrollo de su ciclo biológico. Los tres primeros objetivos de esta tesis están encaminados a la profundización en el conocimiento de la biología de este curculiónido:

1. Poner a punto una nueva dieta artificial para la cría en el laboratorio de *A. mariaefranciscae*, que facilite el manejo de los estados inmaduros para permitir el mantenimiento de las poblaciones en el laboratorio.
2. Evaluar el efecto de distintas variables ambientales en la reproducción de *A. mariaefranciscae*.
3. Determinar la influencia de la temperatura y el fotoperiodo sobre el desarrollo larvario.

A la vista de los efectos que los reguladores del crecimiento pueden tener sobre la reproducción, y con el fin de desarrollar sistemas de control menos contaminantes y que mantengan la rentabilidad del cultivo, se ha explorado el efecto de tres insecticidas pertenecientes a este grupo, pero con distintos modos de acción, sobre adultos de este curculiónido, ya que las larvas son poco accesibles. Los dos siguientes objetivos se refieren a estos ensayos:

4. Evaluar los efectos de un inhibidor de la síntesis de quitina (hexaflumurón), un agonista de la hormona de muda (halofenocida) y un agonista de la hormona juvenil (piriproxifén), aplicados sobre adultos de *A. mariaefranciscae*, sobre su fecundidad, fertilidad y desarrollo de la progenie.

5. Estudio de la farmacocinética de los compuestos que resultaron más adecuados para el control.

Por último, en la búsqueda de nuevos compuestos para el control de *A. mariaefranciscae* se ha abordado el estudio de:

6. Los efectos de inhibidores de proteasas sobre el desarrollo y la supervivencia de las larvas de *A. mariaefranciscae*.

# Material y métodos generales

### 2.1. INSECTOS

Las poblaciones de *A. mariaefranciscae* proceden de cultivos de remolacha azucarera de Écija (Sevilla) o Santaella (Córdoba). Los adultos se capturaban en otoño y invierno, durante su periodo prerreproductor, separándolos cuidadosamente de los restos de remolacha de la campaña anterior que había en el suelo. Cuando fueron necesarios adultos de edad conocida se recogieron de los mismos campos prepupas a comienzos de verano.

El sexo de los adultos fue determinado mediante la observación de la presencia (en machos) o ausencia (en hembras) de una depresión entre el tercer y cuarto terguito abdominal (CABEZUELO y SANTIAGO-ÁLVAREZ, 1981). Los adultos criados en el laboratorio se sexaron en la fase de pupa mediante la observación de la presencia (en hembras) o ausencia (en machos) de dos nódulos cuticulares en el último terguito abdominal (CABEZUELO y SANTIAGO-ÁLVAREZ, 1981).

La población de adultos se mantuvo sobre plantas enteras de remolacha azucarera dispuestas en macetas de 21 cm de diámetro x 16 cm de altura, con arena de río humedecida. Para confinar a los adultos se acoplaba a las macetas un cilindro de plástico transparente de 20 cm de diámetro x 33 cm de altura que se tapaba

mediante tela de visillo para su aireación (Figura 2.1.). La población se mantenía en una cámara a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).



**Figura 2.1.**  
**Recipientes empleados para**  
**el mantenimiento de la**  
**población de**  
***A. mariaefranciscae***

Los ponaderos consistían en un vaso de plástico de 7 cm de diámetro x 7 cm de profundidad con arena de río humedecida, en donde se insertaba una hoja o una pequeña planta de remolacha azucarera con dos o tres hojas que les servía para alimentarse y como sustrato de oviposición. Los adultos se confinaban mediante recipientes de plástico transparente de 6 cm de diámetro por 15,5 cm de altura (Figura 2.2.).

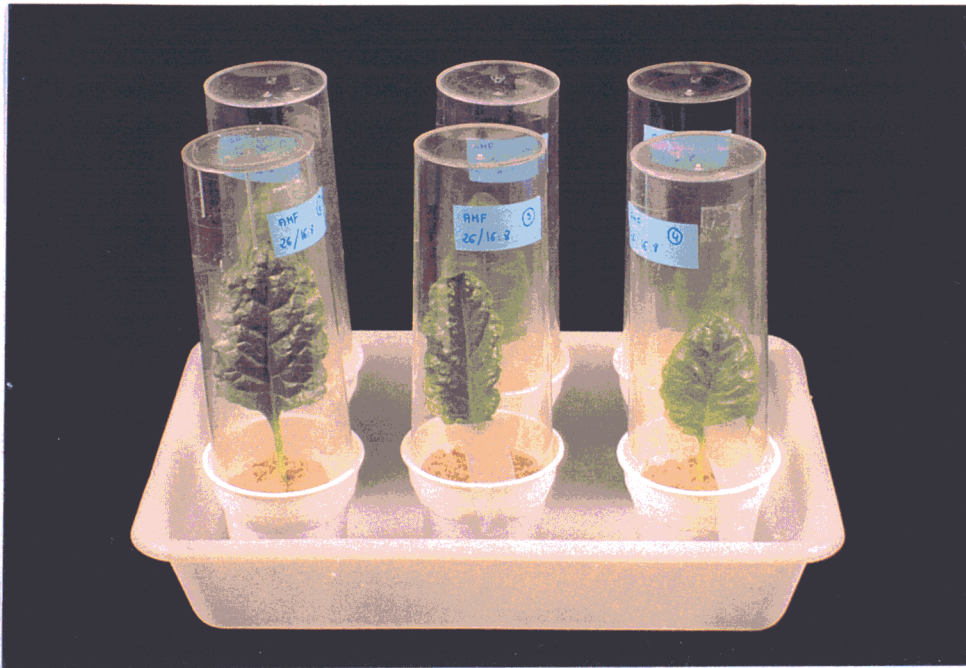


Figura 2.2. Ponederos de *A. mariaefranciscæ*

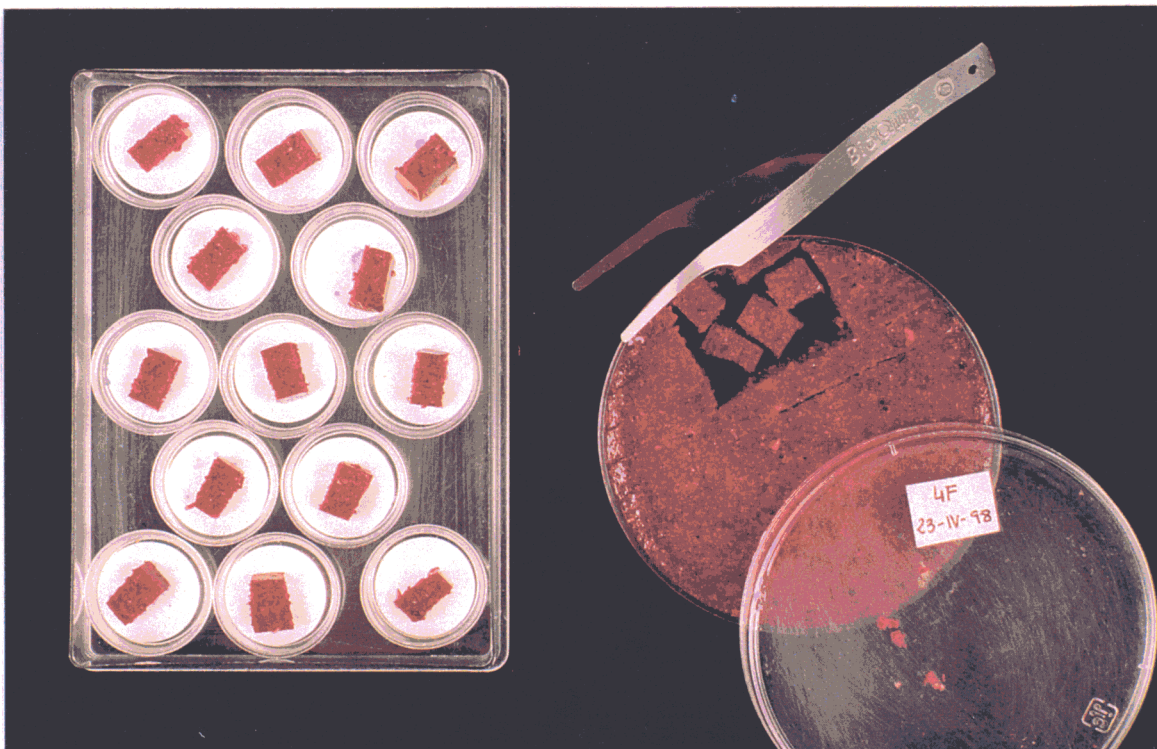


Figura 2.3. Dieta artificial de *A. mariaefranciscæ* y cajas empleadas para la cría individualizada de las larvas

Para extraer las puestas se separaba con unas pinzas de punta fina la epidermis de las hojas o bien de las raíces, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y con una fuente de luz fría para no exponerlos al calor. Los huevos se sacaban con un pincel y se trasladaban a cajitas de plástico (1,5 x 3,5 x 5,5 cm), con un papel de filtro humedecido en el fondo y selladas con Parafilm® para mantener una humedad superior al 80%, óptima para la eclosión de los huevos, donde se mantenían hasta el momento en que eclosionaban.

Las larvas neonatas se recogían con un pincel de pelo de marta y se depositaban individualmente sobre la dieta artificial desarrollada a este fin (ver capítulo 3) para evitar canibalismo. Se utilizaban cajitas de plástico transparente (2,5 cm de diámetro x 1,5 cm de altura), en cada una de las cuales se introducía un trocito de dieta (de unos 0,5 g) sobre un trocito de papel de filtro seco (Figura 2.3.). El paso de un estadio larvario a otro se determinó por el tamaño de las cápsulas cefálicas en cada cambio de dieta.

Las pupas se mantenían en cajitas de plástico idénticas, sin dieta, en las que el papel de filtro se humedecía ligeramente, hasta la emergencia del adulto.

## 2.2. PLANTAS

Las plantas enteras de remolacha azucarera, cultivar "Eva", se mantuvieron con una iluminación de  $675 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  al nivel de la planta, usando lámparas fluorescentes e incandescentes, a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O). Estas plantas se utilizaron para alimentar al grueso de la población de adultos de campo y para el suministro de hojas para las larvas.

### 2.3. EQUIPOS EMPLEADOS

- Cámaras de cría Sanyo (MLR-350H, Sanyo, Japón) para la realización de los distintos ensayos.
- Cámaras Conviron (Conviron S10H, Controlled Environments, Winnipeg, Canadá) para los ensayos y el mantenimiento de las plantas y de la población de *A. mariaefranciscae*.
- Microscopio estereoscópico (Leica MS5, Leica Microscopy and Scientific Instruments, Suiza).
- Batidora eléctrica (Taurus SR2, Taurus SA, Lleida, España)
- Balanza de precisión (Mettler AM100, Mettler-Toledo, Suiza).
- Torre de Potter de precisión (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Reino Unido)
- Compresor de aire Burkard 0523-703 Q-R32X
- Oxidador de Material Biológico (BMO, Packard Biological Material Oxidizer; Harvey Instruments Co., EEUU).
- Contador líquido de centelleo (Kontron, LKB, Bélgica).
- Microaplicador Burkard 900-x (Burkard Scientific Ltd, Reino Unido).
- Microaplicador Hamilton (Hamilton, Bonaduz, Suiza).
- Microtomo (LKB Historange Microtome, LKB-produkter AB, Bromma, Suecia).
- Microscopio electrónico de transmisión (Philips EM 420, Holanda).

La descripción y procedencia del resto de equipos y de los reactivos se detalla en el apartado correspondiente.

# Desarrollo de una nueva dieta artificial para la cría en el laboratorio de *A. mariaefranciscae*

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El uso de dietas artificiales para el mantenimiento de poblaciones de insectos en el laboratorio es una práctica necesaria cuando se requiere un gran número de ejemplares para la investigación. Las dietas artificiales confieren una ventaja fundamental con respecto a la alimentación natural, y es su independencia de recursos estacionales, lo cual permite una cría continuada del insecto con el fin de ser utilizados para ensayos en el laboratorio con distintos insecticidas o bien para el estudio de su ecología, fisiología y comportamiento (SINGH, 1983).

Uno de los grandes problemas a la hora de conseguir una dieta para una cría adecuada de un insecto en el laboratorio es su contaminación por microorganismos. Los contaminantes microbianos más usuales encontrados en las dietas artificiales son levaduras, bacterias y mohos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Penicillium*, y en una misma dieta pueden encontrarse muchas especies. Para combatirlos se usan agentes antimicrobianos, entre los que se encuentran el formaldehído, metil p-hidroxibenzoato, benzoato sódico, sorbato potásico, ácido sórbico y algunos antibióticos como la

estreptomomicina, penicilina y aureomicina (SINGH, 1977).

Los efectos de estos agentes no son siempre inocuos para los insectos, ya que pueden tener una toxicidad directa sobre el insecto, pueden afectar a los microorganismos simbioses de su interior (DUNKEL *et al.*, 1982), e incluso poseer propiedades ovicidas (BASS y BARNES, 1969; BURKHOLDER *et al.*, 1973). El nivel de seguridad de un compuesto puede definirse como la concentración que no reduce la obtención de pupas y adultos y no prolonga el periodo de desarrollo larvario más de un 25% comparado con el control (SINGH y HOUSE, 1970b). Por encima del nivel de seguridad los agentes antimicrobianos producen efectos nocivos en proporción a la concentración usada, siendo los más frecuentes la reducción del tamaño del insecto, la prolongación del periodo larvario y el aumento de la mortalidad de los estados larvario y pupal (por ejemplo, BASS y BARNES, 1969; SINGH y HOUSE, 1970a; DUNKEL y READ, 1991). El aditivo antimicrobiano ideal es aquél que suprime una amplia variedad de microorganismos a una concentración segura para el insecto.

La necesidad de criar en el laboratorio a *A. mariaefranciscae* para el estudio de su biología y su ciclo vital llevó al desarrollo de una dieta artificial, que denominamos dieta B. Esta dieta permitió determinar el número de estadios larvarios de este curculiónido y la duración de su ciclo vital a diferentes temperaturas. No obstante, presentaba el problema de que se estropeaba fácilmente al contaminarse con microorganismos, lo cual dificultaba el normal desarrollo de las larvas, especialmente el de los estadios larvarios más pequeños, llegando incluso a causarles la muerte. La única forma de evitar esta contaminación era el cambio de la dieta cada 2 días, lo cual unido a la cría individualizada requerida por esta larva, hacían muy laborioso el mantenimiento de este curculiónido en el laboratorio. Además aumentaba la mortalidad de las larvas debido a la constante manipulación.

Este estudio está encaminado a la obtención de una dieta artificial nueva para la cría de *A. mariaefranciscae* en el laboratorio que, además de adecuarse a los requerimientos nutricionales para un correcto metabolismo y desarrollo del insecto, facilite el manejo de los estadios larvarios. Con este fin, se han efectuado cambios en el agente antimicrobiano, variando su proporción o bien sustituyéndolo por otro. En la

dieta B se utilizaban el metil p-hidroxibenzoato y el ácido sórbico, ambos en una proporción de 0,08% (p/p). En las tres nuevas dietas ensayadas se ha probado una dosis doble de ácido sórbico (0,16%), y dos dosis de formaldehído, 0,05% y 0,2% (p/p), manteniendo la dosis anterior de metil p-hidroxibenzoato.

## 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1. Componentes y preparación de las dietas artificiales

El desarrollo de una nueva dieta artificial se ha producido mediante modificaciones de la dieta empleada anteriormente, dieta B (ver apartado 3.1.), que hemos considerado como testigo al medir el tiempo de desarrollo de los estados inmaduros y su supervivencia.

La composición de las cuatro dietas, B, C, D1 y D2, está detallada en la Tabla 3.1. La base de todas las dietas probadas es el agar. El ácido ascórbico es un componente frecuentemente empleado, ya que constituye un factor de crecimiento necesario para un desarrollo adecuado de los insectos fitófagos (CHIPPENDALE y BECK, 1964). El carbohidrato empleado ha sido la sacarosa, azúcar considerado el principal fagoestimulante de los insectos fitófagos (SINGH, 1977), y muy importante para algunas especies de curculiónidos (SHANKS y DOSS, 1987; KAYS *et al.*, 1993). Es conveniente añadir también como fagoestimulante algún extracto o parte de la planta hospedadora natural (HSIAO y HSIAO, 1974b; NECIBI y LINIT, 1997). Por este motivo se suplementó un concentrado de remolacha de mesa así como un homogeneizado de raíces de remolacha azucarera, para su contribución como estimulantes de la alimentación y como factores promotores del crecimiento. La fracción vitamínica aportada era una mezcla acuosa de ácido nicotínico (10 mg), riboflavina (5 mg), tiamina (2,3 mg), piridoxina (2,3 mg), pantotenato cálcico (10 mg), ácido fólico (0,2 mg) y biotina (0,2 mg). Esta mezcla se disolvía en 10 ml del total de agua destilada empleada en la preparación de la dieta.

**Tabla 3.1. Composición de las distintas dietas artificiales ensayadas para la cría en el laboratorio de *A. mariaefrancisca***

<b>Componentes</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Dieta B</b>	<b>Dieta C</b>	<b>Dieta D1</b>	<b>Dieta D2</b>
Agua destilada	-	800 ml	800 ml	800 ml	800 ml
Agar	Panreac Química SA, Barcelona	45 g	45 g	45 g	45 g
Mezcla de sales minerales Wesson	Sigma, St. Louis, MO, EEUU	6 g	6 g	6 g	6 g
Ácido sórbico	Sigma, St. Louis, MO, EEUU	1 g	2 g	-	-
Formaldehído	Sigma, St. Louis, MO, EEUU	-	-	0,625 ml	2,5 ml
Ácido ascórbico	Panreac Química SA, Barcelona	5 g	5 g	5 g	5 g
Sacarosa	Merck, Darmstad, Alemania	60 g	60 g	60 g	60 g
Salvado de trigo	Santiveri SA, Barcelona	20 g	20 g	20 g	20 g
Levadura de cerveza	Santiveri SA, Barcelona	15 g	15 g	15 g	15 g
Concentrado de remolacha de mesa	Bioforce AG, Roggwil, Suiza	48 ml	48 ml	48 ml	48 ml
Homogeneizado de raíz de remolacha azucarera	-	240 ml	240 ml	240 ml	240 ml
Nipagin® (metil p-hidroxibenzoato)	Central Ibérica de Drogas SA, Madrid	1 g	1 g	1 g	1 g
Mezcla de vitaminas <sup>a</sup>	Sigma, St. Louis, MO	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg

<sup>a</sup> La mezcla de vitaminas se componía de ácido nicotínico (10 mg), riboflavina (5 mg), tiamina (2,3 mg), piridoxina (2,3 mg), pantotenato cálcico (10 mg), ácido fólico (0,2 mg) y biotina (0,2 mg).

El aporte de minerales se hizo mediante la mezcla de sales Wesson's y el salvado de trigo, siendo también éste último una fuente de celulosa. La levadura de cerveza es un factor nutricional de suma importancia, ya que es fuente de micro- y macronutrientes necesarios para algunas especies de insectos (TSITSIPIS, 1989).

Tanto el metil p-hidroxibenzoato como el ácido sórbico (dietas B y C) o el formaldehído (dietas D1 y D2) se incorporaron con el fin de inhibir el crecimiento de levaduras, bacterias y hongos filamentosos en las dietas.

Para preparar el homogeneizado de raíces de remolacha azucarera las raíces se lavaban minuciosamente y se cortaban en trozos pequeños; a continuación se trituraban con una batidora eléctrica, añadiendo 1,2 ml de agua destilada por cada gramo de remolacha. Esta mezcla se distribuía en recipientes de plástico y se congelaba a  $-22^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizado.

El procedimiento seguido para preparar la dieta era el siguiente: se disolvía el agar en agua destilada hirviendo y se dejaba enfriar hasta  $45-50^{\circ}\text{C}$ . En ese momento se añadían todos los ingredientes poco a poco, mezclándolos bien con una batidora eléctrica durante 1-2 min. Finalmente, la dieta se distribuía en placas Petri y se dejaba solidificar a temperatura ambiente. Cada una se cerraba y sellaba con Parafilm® y se guardaba a  $-22^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.2.2. Evaluación de la calidad de las dietas

Existen una serie de parámetros que nos indican la adecuación de una dieta determinada para la cría de un insecto. Para detectar si las nuevas dietas (C, D1 y D2) eran nutricionalmente adecuadas para la cría en laboratorio de *A. mariaefranciscae* éstas se evaluaron teniendo en cuenta los siguientes aspectos (CHAMBERS, 1977; SINGH, 1977, 1983; MOORE *et al.*, 1985):

1. Proliferación de microorganismos en su superficie (a las condiciones ambientales empleadas en la cría) que puedan interferir en el desarrollo de las larvas, o bien que

supongan un manejo más laborioso de las mismas.

2. Tiempo de desarrollo empleado por los estados/estadios inmaduros (huevo, larva y pupa) así como su mortalidad en cada una de las dietas.
3. Vigor (medido en fecundidad, fertilidad y peso) y proporción de obtención de adultos obtenidos a partir de larvas criadas en dieta artificial. se consideraron nutricionalmente adecuadas aquellas dietas con una viabilidad total (desde larva neonata hasta adulto) superior al 75%.
4. Presencia de anomalías morfológicas en cualquiera de las fases del ciclo. La aparición de pupas y/o adultos con deformidades indica generalmente la falta de algún nutriente esencial para que se lleven a cabo correctamente los procesos de pupación y emergencia.

La periodicidad de los cambios de cada dieta se determinó mediante un ensayo preliminar para determinar visualmente el grado de contaminación de la dieta por microorganismos. Utilizando las mismas condiciones de la cría (ver en el siguiente apartado) se mantuvieron en las cámaras de cría trozos de las distintas dietas y se observó su evolución diariamente. Mediante este ensayo pudimos establecer una periodicidad de cambio de dieta de 2-3 días para las dietas B, C y D1 para evitar contaminación microbiana que ponga en peligro la supervivencia de las larvas, mientras que ese periodo se incrementó a 7 días para la dieta D2.

Para la evaluación de cada dieta se empleaban un mínimo de 75 larvas recién eclosionadas. Éstas se criaban de la forma explicada en el apartado 2.1.

Cuando el adulto estaba totalmente melanizado se pesaba. Para determinar su fecundidad y fertilidad, los adultos se disponían en ponederos con una hoja de remolacha. Para cada dieta se emplearon 6 ponederos con 3 parejas de adultos cada una, para asegurar la obtención de un número elevado de huevos. Una vez por semana esta hoja se cambiaba, y de la anterior se extraían los huevos puestos, que se examinaban diariamente para registrar el día de su eclosión y la tasa de supervivencia.

Una vez evaluadas las dietas se eligió la más adecuada en función de los parámetros mencionados y se procedió a la cría consecutiva de tres generaciones de larvas con la misma, para conocer la posible pérdida de vigor. Las condiciones empleadas para todo el ciclo fueron  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).

### **3.2.3. Desarrollo sobre la dieta seleccionada**

Una vez escogida la dieta D2 como la mejor de las ensayadas, se criaron dos generaciones consecutivas más (F1 y F2) de larvas sobre ella. Para cada generación se utilizaron 75 larvas neonatas procedentes de adultos obtenidos a partir de las larvas criadas con la dieta D2. Del mismo modo, se estudiaron las variables peso, fecundidad y fertilidad de los adultos procedentes de las dos primeras generaciones de estas larvas, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

### **3.2.4. Análisis estadísticos**

Los valores de fecundidad y fertilidad de las generaciones F0 y F1 de los adultos procedentes de larvas criadas con la dieta D2 se compararon mediante la prueba t de Student. El resto de variables medidas fueron comparadas mediante análisis de la varianza (ANOVA). Previamente, todos los valores expresados como porcentajes se transformaron al arcoseno. Cuando la prueba de la F detectaba diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), las diferencias significativas entre las medias se evaluaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Desarrollo de *A. mariaefranciscæ* en distintas dietas

Toda las dietas ensayadas fueron aceptadas en principio por las larvas neonatas de *A. mariaefranciscæ*, lo cual indica que se consiguieron unas características aceptables en cuanto propiedades como textura, consistencia y contenido en agua.

La mortalidad total (desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto) en la dieta C, en la que se había incrementado la cantidad de ácido sórbico a 0,16% resultó significativamente más alta que en las otras dietas, sobreviviendo tan sólo un 18,1% de las que comenzaron el ensayo (Tabla 3.2). Todas las larvas que murieron lo hicieron durante los estadios L1 y L2, pero una vez superados éstos no hubo mortalidad en L3, L4 ni en las pupas. Fue en estos tres estadios en los únicos que no se obtuvieron diferencias significativas entre las distintas dietas. Por otra parte, tampoco superó las expectativas en cuanto al número de días que la dieta podía mantenerse sin cambios, ya que la aparición de microorganismos comenzó a los 2 días de disponerse un trozo nuevo.

Entre las otras tres dietas ensayadas no hubo diferencias significativas de porcentaje de supervivencia en ninguna de las etapas del desarrollo ni en el total. No obstante, con la dieta B, utilizada hasta el momento en el laboratorio, se obtuvo un porcentaje de supervivencia algo menor (69,3%) que el obtenido con las dos dietas que utilizaban como agente antimicrobiano el formaldehído en distintas dosis (85,3% en la D1 y 77,8% en la D2), y por debajo del límite que nos habíamos establecido del 75%.

El tiempo de desarrollo empleado por los estadios larvarios L2, L3 y L4 así como el de la pupa no se vio afectado por el uso de distintas dietas (Tabla 3.3). Sin embargo, el primer estadio larvario, al igual que en el caso de la mortalidad, pareció ser más sensible al aumento de ácido sórbico (dieta C). De esta forma, la duración del estadio L1 fue significativamente mayor en la dieta C que en el resto, dando lugar así a un incremento de la duración total (L1-adulto), que mostró diferencias significativas con la dieta D1, aunque no con las demás. Entre el resto de las dietas no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los distintos estados o estadios ni en la duración total,

oscilando ésta entre 60,1 días en la dieta D1 y 64,0 días en la dieta D2.

**Tabla 3.2. Tasa de supervivencia de los estadios inmaduros de *A. mariaefranciscæ* criados en distintas dietas.**

Dieta	Estado del desarrollo					
	L1	L2	L3	L4	Pupa	L1-adulto
B	81,3 ± 5,3a	94,7 ± 5,3a	100 ± 0a	96,5 ± 1,9a	92,3 ± 2,8a	69,3 ± 9,3a
C	35,6 ± 5,9b	47,8 ± 7,8b	100 ± 0a	100 ± 0a	100 ± 0a	18,1 ± 5,3b
D1	90,7 ± 7,4a	98,6 ± 1,4a	100 ± 0a	96,5 ± 3,5a	98,6 ± 1,4a	85,3 ± 9,3a
D2	86,8 ± 2,5a	98,4 ± 1,6a	98,2 ± 1,8a	96,4 ± 1,8a	96,2 ± 1,9a	77,8 ± 4,6a

Los valores representan los porcentajes medios de la población ± E.S. que sobrevivieron en cada estado/estadio (al comienzo de cada uno de ellos se considera un 100%). La última columna representa la duración desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto.

Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

**Tabla 3.3. Duración del desarrollo de los estadios inmaduros de *A. mariaefranciscæ* criados en distintas dietas.**

Dieta	Estado del desarrollo					
	L1	L2	L3	L4	Pupa	L1-adulto
B	7,5 ± 0,1a	6,4 ± 0,4a	7,3 ± 1,2a	31,2 ± 0,3a	11,6 ± 0,4a	62,8 ± 1,9ab
C	11,3 ± 1,5b	6,7 ± 0,9a	6,4 ± 0,7a	31,2 ± 2,5a	12,1 ± 1,0a	68,3 ± 4,5b
D1	6,9 ± 0,4a	5,4 ± 0,2a	6,3 ± 0,3a	30,0 ± 0,8a	12,3 ± 0,1a	60,1 ± 1,2a
D2	8,2 ± 0,1a	6,0 ± 0,3a	6,3 ± 0,3a	31,9 ± 1,0a	11,3 ± 0,1a	64,0 ± 1,0ab

Los valores representan el nº medio de días ± E.S. que dura cada estado/estadio. La última columna representa la duración desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto.

Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

El peso de los adultos que se obtuvieron a partir de larvas criadas con distintas dietas no difirió significativamente en ninguno de los casos, fluctuando entre 5,8 mg en la dieta D2 y 6,2 mg en la dieta B (Tabla 3.4). Sin embargo, los adultos procedentes del campo y en este caso sí se ha visto que éstos últimos pesan significativamente más que los obtenidos en el laboratorio.

La fecundidad y fertilidad no se estudiaron en los adultos de la dieta C debido a la alta mortalidad que hubo durante el estado larvario, dando lugar a un número muy bajo de adultos que hizo inviable un ensayo con ellos. Entre las otras tres dietas no se encontraron diferencias significativas del número de huevos puestos por hembra durante todo su periodo de oviposición. Aunque aparentemente los valores de fecundidad son bastante distintos, este parámetro presenta una gran variabilidad en *A. mariaefranciscae* y los rangos en los que fluctúa son muy amplios, como se puede observar en la Tabla 3.4. Igualmente, hemos comparado los datos de fecundidad con la de adultos recogidos del campo en su periodo de preoviposición, y hemos comprobado que la variabilidad en este grupo también era muy alta, no apareciendo tampoco diferencias significativas con los otros.

**Tabla 3.4. Peso y porcentajes de fecundidad y fertilidad de los adultos de *A. mariaefranciscae* procedentes de larvas criadas en distintas dietas y de campo.**

Dieta	Peso (mg)	Fecundidad <sup>a</sup>	(rango)	Fertilidad <sup>b</sup>
B	6,2 ± 0,4a	68,4 ± 14,4a	(28,8-112,7)	96,3 ± 0,7a
C	6,0 ± 0,3a	-	-	-
D1	6,0 ± 0,1a	61,4 ± 10,9a	(18,7-91,3)	95,5 ± 1,0a
D2	5,8 ± 0,2a	51,8 ± 9,5a	(40,7-72,7)	97,7 ± 0,4a
Campo	7,2 ± 0,4b	52,5 ± 4,4a	(30,7-95,6)	95,6 ± 0,8a

<sup>a</sup> N° medio de huevos puestos por hembra durante toda su vida ± E.S.

<sup>b</sup> Porcentaje medio de eclosión de los huevos puestos ± E.S.

Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

Los porcentajes de eclosión de huevos fueron muy altos en todos los casos, tanto en los puestos por adultos procedentes de distintas dietas como en los puestos por adultos de campo. La fertilidad siempre fue superior al 95%, y tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

A la vista de todos los resultados, la dieta que nos pareció más apropiada para la cría continuada de *A. mariaefranciscae* en el laboratorio fue la D2, ya que la supervivencia desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto fue superior al 75%; la duración de cada uno de los estadios larvarios y la duración total no se diferenciaron significativamente de la duración en otras dietas; el peso, la fecundidad y la fertilidad tampoco fueron significativamente distintos, y el manejo de la dieta era más sencillo al tener que cambiar la dieta tan solo una vez por semana.

### **3.3.2. Desarrollo sobre la dieta seleccionada**

Una vez elegida la dieta D2, a la que consideramos la más adecuada sumando todos los resultados, se procedió a la cría de tres generaciones consecutivas de larvas sobre esta dieta. El porcentaje de supervivencia total (desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto) en todas las generaciones fue siempre superior al 75% y no hubo diferencias significativas entre ellas (Tabla 3.5). Tampoco las hubo en ninguno de los distintos estadios larvarios o pupas entre generaciones.

La duración media total (L1-adulto) de las tres generaciones criadas en la dieta D2 osciló entre 64,3 días en la primera generación (F0) y 68,1 en la tercera (F2) (Tabla 3.6). A pesar de que se ve una ligera tendencia a aumentar en el tiempo no se observaron diferencias significativas ni en la duración total ni en la de los diferentes estadios larvarios o pupas entre generaciones.

**Tabla 3.5. Tasa de supervivencia de los estadios inmaduros de *A. mariae franciscae* criados con la dieta D2 durante tres generaciones consecutivas.**

Generación	Estado del desarrollo					
	L1	L2	L3	L4	Pupa	Total
F0	86,8 ± 2,5	98,4 ± 1,6	98,2 ± 1,8	96,4 ± 3,5	96,2 ± 1,9	77,8 ± 4,6
F1	94,7 ± 1,3	95,8 ± 0,0	95,7 ± 2,5	90,7 ± 2,8	96,5 ± 1,7	76,0 ± 4,0
F2	86,7 ± 1,3	96,8 ± 3,2	96,7 ± 1,6	95,1 ± 2,7	91,6 ± 3,0	76,0 ± 2,3

Los valores representan los porcentajes medios de la población ± E.S. que sobrevivieron en cada estado/estadio (al comienzo de cada uno de ellos se considera un 100%). La última columna representa la duración desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto.

No se encontraron diferencias significativas en ningún caso entre generaciones.

**Tabla 3.6. Duración del desarrollo de los estadios inmaduros de *A. mariae franciscae* criados con la dieta D2 durante tres generaciones consecutivas.**

Generación	Estado del desarrollo					
	L1	L2	L3	L4	Pupa	L1-adulto
F0	8,2 ± 0,4	6,1 ± 0,4	6,4 ± 0,4	32,3 ± 0,8	11,4 ± 0,2	64,3 ± 1,2
F1	8,7 ± 0,5	7,0 ± 0,4	7,1 ± 0,4	32,8 ± 1,0	11,1 ± 0,5	66,5 ± 1,0
F2	9,5 ± 0,5	6,9 ± 0,3	7,3 ± 0,4	33,0 ± 1,1	12,1 ± 0,4	68,1 ± 1,2

L1-L4 son los estadios larvarios. Los valores representan el nº medio de días ± E.S. que dura cada estado/estadio en las diferentes generaciones. La última columna representa la duración desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto.

No se encontraron diferencias significativas en ningún caso entre generaciones.

A partir de las tres generaciones consecutivas de larvas criadas con dieta D2, obtuvimos tres generaciones de adultos en las que se midieron los valores de fecundidad

y fertilidad en las dos generaciones de adultos intermedias.

Los pesos de los adultos obtenidos en las tres generaciones no mostraron diferencias significativas, oscilando entre 5,4 y 5,8 mg, valores similares a los obtenidos también anteriormente con el resto de las dietas (Tabla 3.7).

El número medio de huevos puestos tampoco varió significativamente entre las hembras de las dos generaciones estudiadas, y lo mismo sucedió con los valores de fertilidad, que no mostraron diferencias significativas y los valores fueron tan altos como los obtenidos con las otras dietas y con los adultos de campo.

**Tabla 3.7. Peso y porcentajes de fecundidad y fertilidad de los adultos de *A. mariaefranciscae* procedentes de larvas criadas con la dieta D2 durante tres generaciones.**

Generación	Peso (mg)	Fecundidad <sup>a</sup>	Fertilidad <sup>b</sup>
F0	5,8 ± 0,2	51,8 ± 9,5	97,7 ± 0,4
F1	5,4 ± 0,1	54,9 ± 10,9	94,0 ± 2,0
F2	5,6 ± 0,2	-	-

<sup>a</sup> N° medio de huevos puestos por hembra en toda su vida ± E.S.

<sup>b</sup> Porcentaje medio de eclosión de los huevos puestos ± E.S.

No se encontraron diferencias significativas en ningún caso entre generaciones

### 3.4. DISCUSIÓN

De las cuatro dietas ensayadas (incluyendo la B, dieta empleada hasta el momento en el laboratorio) para la cría en el laboratorio de las larvas de *A. mariaefranciscae*, la D2 resultó ser la más adecuada a la vista de los distintos resultados obtenidos. Si bien en algunas de las variables no se encontraron diferencias entre las dietas, la aparición de microorganismos dejó de ser un problema ya que, o bien su aparición se retrasaba hasta los 7-8 días, o bien las porciones de dieta se endurecían antes de su aparición, lo cual facilitaba en gran medida el manejo de esta plaga en el laboratorio.

Nuestros datos se acercan a los obtenidos por BASS y BARNES (1969). Estos autores comprobaron que dosis bajas de ácido sórbico + metil p-hidroxibenzoato (0,5 y 0,4% (p/v), respectivamente), provocaban la mortalidad del 78% de las larvas de primer estadio de *Graphognathus* spp. (Coleoptera: Curculionidae), y además no se apreciaba la inhibición del crecimiento de mohos. Con 0,05% de formaldehído sobrevivía el 95% de las larvas, aunque si se añadía metil p-hidroxibenzoato la supervivencia era tan sólo del 2%, pero se inhibía durante 15 días el crecimiento microbiano. En otros trabajos también ha quedado patente la dificultad de encontrar un necesario punto de equilibrio entre la eficacia del agente antimicrobiano y la inocuidad para el insecto (SINGH y HOUSE, 1970b; BURKHOLDER *et al.*, 1973; KARILUOTO, 1978), especialmente si el margen de tolerancia del compuesto en la especie es estrecho.

Los porcentajes de supervivencia de las dietas B, D1 y D2 ( $\approx$  69, 85 y 78%, respectivamente) fueron significativamente más altos que los de la dieta C, aunque sin diferencias entre ellos. Estos resultados sugieren que el ácido sórbico utilizado en las dietas B y C es más nocivo que el formaldehído de las dietas D1 y D2 para las larvas de *A. mariaefranciscae*. Los resultados que hemos obtenido respecto al porcentaje de supervivencia son muy favorables en comparación con los obtenidos anteriormente por otros autores para distintas especies de curculiónidos. Se han indicado tasas de supervivencia de entre 44-69% para *Anthonomus eugenii* Cano (TOBA *et al.*, 1969), 58% para *Conotrachelus nemuphar* Herbst (YONCE *et al.*, 1971), 72% para *Hypera postica*

Gyllenhal (HSIAO y HSIAO, 1974a), y 48-63% y 58-81% para *Hylobius radicis* Buchanan y *H. pales* Herbst, respectivamente (HUNT *et al.*, 1992). Sólo las dietas D1 y D2 superaron el límite de supervivencia del 75% que nos habíamos propuesto en los objetivos de este trabajo.

Las dietas B y C fueron preparadas con los mismos ingredientes, variando tan solo la proporción de ácido sórbico en relación al peso total de la dieta. El hecho de que la dieta C ocasionara una alta mortalidad larvaria (82%), teniendo en cuenta que su composición es la misma, nos hace pensar que la dosis empleada hasta el momento en la dieta estaba próxima al límite de toxicidad de este componente antimicrobiano tolerado por las larvas de *A. mariaefranciscae*. Estudios realizados por DUNKEL y READ (1991) apuntaron que el rango de dosis de ácido sórbico usado en dietas de insectos (0,05-0,5% en peso), solapa con el rango de sus propiedades insecticidas, lo cual explica el resultado obtenido, y en este mismo estudio se apuntó que algunas especies de curculiónidos, entre las que se encuentran *Sitophilus zeamais* Motschulsky y *S. oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), son muy sensibles al ácido sórbico, el cual es utilizado en algunos casos para el control de plagas de coleópteros de almacén debido a sus propiedades insecticidas además de fungicidas (BAKER y MABIE, 1973; DUNKEL *et al.*, 1982; DUNKEL y READ, 1986). Por el contrario, los niveles de formaldehído ensayados no mostraron ningún efecto negativo sobre la tasa de desarrollo y la supervivencia de las larvas. Por otra parte, la alta mortalidad de las larvas ocasionada al utilizar la dieta C sólo se dio en L1 y L2. Este hecho podría indicar que, o bien los primeros estadios larvarios son más sensibles a este componente, o bien el ácido sórbico tiene un efecto negativo relacionado directamente con el peso del insecto, lo cual nos parece más probable. En este caso, el menor peso de los estadios más pequeños daría lugar a la presencia de una mayor proporción relativa de agente antimicrobiano con el consecuente aumento de mortalidad.

Atendiendo a la duración de los distintos estados del desarrollo, de nuevo la dieta menos favorable fue la C, con 2 g de ácido sórbico (0,16% p/p), ya que la duración del estadio L1 fue significativamente más larga que en el resto, y también se detectaron diferencias significativas entre la duración total (L1-adulto) de las dietas C y D1 (68,3 y 60,1 días, respectivamente). Del mismo modo, OUYE (1962) observó que la adición de

ácido sórbico con metil p-hidroxibenzoato en la dieta de *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) produjo una duración significativamente más larga de los estados larvario y pupal que la adición de formaldehído y metil p-hidroxibenzoato. DUNKEL y READ (1991) indicaron que cambios muy pequeños en la concentración de ácido sórbico pueden dar lugar a grandes diferencias en su actividad insecticida. Estos resultados nos llevaron a rechazar desde este momento el incremento de ácido sórbico en la dieta (dieta C) para el control de los microorganismos.

Los pesos de los adultos obtenidos a partir de las larvas criadas en las distintas dietas no reflejaron diferencias entre ellos, como se ha observado en algunos insectos al emplear agentes antimicrobianos en su dieta (SINGH y HOUSE, 1970a), y lo mismo sucedió con los valores de fecundidad y fertilidad, lo cual nos indica que los individuos que sobrevivieron los estadios más sensibles a la dieta (que resultaron ser L1 y L2) continuaron su desarrollo sin problemas, no viéndose afectadas ni la reproducción de los adultos ni la viabilidad de los huevos puestos. La reducción de peso de los adultos criados con dieta en el laboratorio respecto al peso de los adultos de campo sugiere que su crecimiento en alguna fase de su desarrollo no es tan eficaz como en condiciones naturales. Sin embargo, tanto los valores de fecundidad como los de fertilidad fueron similares.

En algunos trabajos se habían citado casos de deformidades en alguna de las fases del ciclo al variar algún componente de las dietas. HUNT *et al.* (1992) encontraron que el cambio de uno de los ingredientes de la dieta provocó la formación de élitros retorcidos y deformes en *Hylobius radialis* Buchanan (Coleoptera: Curculionidae). Igualmente, THOMAS (1969) observó un incremento del número de adultos de *Hylobius pales* Herbst deformes a causa del cambio de uno de los ingredientes de su dieta habitual. Sin embargo, en ninguno de los estados o estadios de *A. mariaefranciscae* criados con distintas dietas pudo apreciarse anomalía morfológica alguna, indicando que las dietas contenían todos los nutrientes esenciales para el correcto desarrollo del insecto.

A la vista de los resultados referentes a la supervivencia, tiempo de desarrollo, peso de los adultos, fecundidad y fertilidad, y teniendo en cuenta el tiempo que necesitan

los microorganismos para desarrollarse sobre la dieta e interferir en el normal desarrollo de la cría, se eligió la dieta D2 para la cría continuada en el laboratorio de *A. mariaefranciscae* ya que, pese a no presentar diferencias significativas con otras dietas (B y D1) en los parámetros estudiados, los cambios de dieta se pueden realizar cada 7-8 días, haciendo el manejo más sencillo.

Algunos estudios habían puesto de manifiesto previamente que, aunque la primera generación de larvas criadas con una determinada dieta o los adultos resultantes no sufrieran ningún tipo de anomalía o irregularidad en su desarrollo, las siguientes generaciones sí podían verse afectadas por alguno de sus componentes. En este sentido, BOUSH *et al* (1968) detectaron una alta mortalidad del primer estadio larvario de la segunda generación en *Attagenus megatoma* (F.) y *Trogoderma variabile* Ballion (= *parabile* Beal) (Coleoptera: Dermestidae) alimentadas con una dieta que contenía ácido sórbico, a pesar de que en la primera generación no se observaron efectos negativos. Igualmente, al tratar adultos de distintas especies de coleópteros con ácido sórbico se observó una alta mortalidad de la generación F1 de larvas (DUNKEL *et al.*, 1982). Por este motivo se procedió a la cría de tres generaciones consecutivas de larvas con la mejor de las dietas ensayadas, es decir, la D2.

Los resultados revelaron que en el transcurso de las generaciones no se producía una reducción del porcentaje de supervivencia, ni en los distintos estados o estadios ni en el total (L1-adulto), superando en todos los casos el 75% de supervivencia desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto, lo cual nos indica que esta dosis de formaldehído en la dieta no supera los límites de peligro para la supervivencia de esta especie.

La cría de *A. mariaefranciscae* con la dieta D2 durante tres generaciones consecutivas no ocasionó un alargamiento del tiempo de desarrollo de larvas y pupas, sino que la duración de cada estado o estadio se mantuvo constante. En la duración total (L1-adulto) se puede intuir una ligera tendencia a aumentar a lo largo de las generaciones, pero estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas. Por otra parte, el periodo larvario total no ha aumentado más de un 25% en relación al testigo (en este caso, la primera generación F0), no superando por tanto el nivel de seguridad del

agente antimicrobiano que nos llevaría a rechazarlo, tal como se indica anteriormente (ver apartado 3.1.).

Igualmente, el peso de los adultos no disminuyó en las generaciones F1 y F2, lo cual hubiera sido un indicio de que la dieta no se adecuaba a las necesidades del insecto (MOORE *et al.*, 1985). En las dos generaciones intermedias obtenidas el número de huevos puestos por hembra y su porcentaje de eclosión tampoco se diferenciaron, y no se registraron anomalías morfológicas en ningún momento del desarrollo, con lo cual se demuestra que en estas generaciones no ha habido una pérdida de vigor de la población.

Los resultados obtenidos en la cría de tres generaciones consecutivas de larvas con la dieta D2 nos han demostrado que esta dieta cumple los requerimientos nutricionales que necesita este curculiónido para su correcto desarrollo y reproducción. Además de sus características nutricionales, la ventaja más significativa de esta dieta fue su capacidad de mantenerse libre de microorganismos durante más de una semana manteniendo la textura y consistencia adecuada, lo cual disminuyó la mortalidad debida al exceso de manejo con el consiguiente ahorro de tiempo. Todas estas ventajas nos han llevado a aceptarla para el mantenimiento de *A. mariaefranciscae* en el laboratorio.

# Efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre el desarrollo larvario de *A. mariaefranciscae*

### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones físicas y biológicas adecuadas para el desarrollo y reproducción de los insectos generalmente se dan sólo durante periodos concretos del año. Como consecuencia, los insectos, condicionados en gran medida por factores ambientales tales como la temperatura, el fotoperiodo, la humedad y la disponibilidad de alimento, deben ajustar sus ciclos a los momentos más favorables para la realización de sus funciones, y por este motivo muchas especies experimentan la detención de algún estado de desarrollo o diapausa (*sensu lato*) (TAUBER y TAUBER, 1976).

La adaptabilidad fisiológica y de comportamiento de los insectos a las condiciones ambientales que cambian estacionalmente, es decir, que se repiten todos los años en las mismas fechas, se explica en gran medida gracias a una variable ambiental que influye decisivamente sobre muchas especies de insectos: el fotoperiodo. Este factor tiene especial importancia como indicador de la estación y es utilizado por muchos insectos como "factor clave" para el comienzo de su diapausa debido a su predecibilidad

(TAUBER *et al.*, 1986). El fotoperiodo actúa no sólo sobre las adaptaciones estacionales de los insectos, (BECK, 1983; TAUBER *et al.*, 1986) sino también sobre su tiempo de desarrollo (FANTINOU *et al.*, 1996; MCGREGOR, 1997).

Por otra parte, numerosos estudios han reflejado que la temperatura es uno de los factores que más afectan al desarrollo larvario y a la supervivencia de los insectos (ROE *et al.*, 1985; SMITH y WARD, 1995; CHECHLACZ, 1998). La relación entre desarrollo y temperatura está bien establecida, y uno de los hechos más probados en la fisiología de insectos es que, normalmente, al aumentar la temperatura aumenta el metabolismo y la tasa de crecimiento de las larvas. No obstante, la temperatura, al igual que el resto de variables abióticas, no actúa aisladamente, sino que sus efectos sobre la biología del insecto se relacionan directamente con la influencia que ejercen el resto de factores ambientales, y pueden verse modificados por éstos. Además se ha comprobado que en algunas especies los efectos del fotoperiodo y la temperatura pueden interaccionar entre ellos, provocando interferencias o un efecto sinérgico en la respuesta del insecto a dichas variables (CHIPPENDALE y REDDY, 1973; BELL y BOWLEY, 1980; FANTINOU *et al.*, 1995).

Estudios de modelización llevados a cabo con *A. mariaefrancisca* sobre su tasa de desarrollo en función de la temperatura han mostrado que el rango de temperaturas en el que los estadios inmaduros pueden completar su desarrollo es muy estrecho (entre 20 y 30°C) (MARCO *et al.*, 1997). En *A. mariaefrancisca* no existen datos acerca de la influencia que tiene el fotoperiodo sobre su desarrollo, ni tampoco si ambos factores, la temperatura y el fotoperiodo, interaccionan de alguna forma sobre la adaptación de las larvas al ambiente. Con el fin de aumentar la información disponible de esta especie hemos abordado los siguientes objetivos:

- 1) Determinar cómo varía la supervivencia, el tiempo de desarrollo larvario y el porcentaje de pupación de *A. mariaefrancisca* en condiciones constantes de fotoperiodo y temperatura.
- 2) Comprobar si existen interacciones entre el fotoperiodo y la temperatura que puedan afectar al desarrollo de la larva.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1. Procedimientos generales

Con el fin de determinar la influencia de cada variable sobre el desarrollo larvario, todos los estadios larvarios (de L1 a L4) se expusieron a dos condiciones constantes distintas de fotoperiodo y de temperatura, dando así lugar a cuatro combinaciones. Las temperaturas usadas fueron  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , temperatura cercana al óptimo para la cría de las larvas, y una temperatura subóptima,  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (MARCO *et al.*, 1997), ambas combinadas con un fotoperiodo de día largo (16:8 h = DL) o de día corto (9:15 h = DC) (Luz:Oscuridad) hasta que se produjo la pupación. De esta forma, el experimento se realizó simultáneamente en cuatro cámaras de cría a las siguientes condiciones:  $26^\circ/16:8$  (26DL),  $26^\circ/9:15$  (26DC),  $22^\circ/16:8$  (22DL) y  $22^\circ/9:15$  (22DC), todos a  $80 \pm 10\%$  HR. Para cada tratamiento se emplearon un mínimo de 50 larvas.

### 4.2.2. Análisis estadísticos

Los tiempos de desarrollo de cada estadio larvario y el total en cada una de las combinaciones de temperatura y fotoperiodo se compararon mediante ANOVAs simples. Para estudiar las interacciones entre la temperatura y el fotoperiodo sobre el tiempo de desarrollo se realizaron ANOVAs de dos vías para cada estadio en los cuatro tratamientos distintos que resultaron de la combinación de estas condiciones (SOKAL y ROHLF, 1979).

## 4.3. RESULTADOS

La evolución de la población de larvas siguió patrones distintos dependiendo de las condiciones a las que se llevó a cabo el experimento (Figura 4.1). Los porcentajes de mortalidad en L1, L2 y L3 (no representados en la figura) para cada uno de los regímenes oscilaron entre el 3 y el 7%.

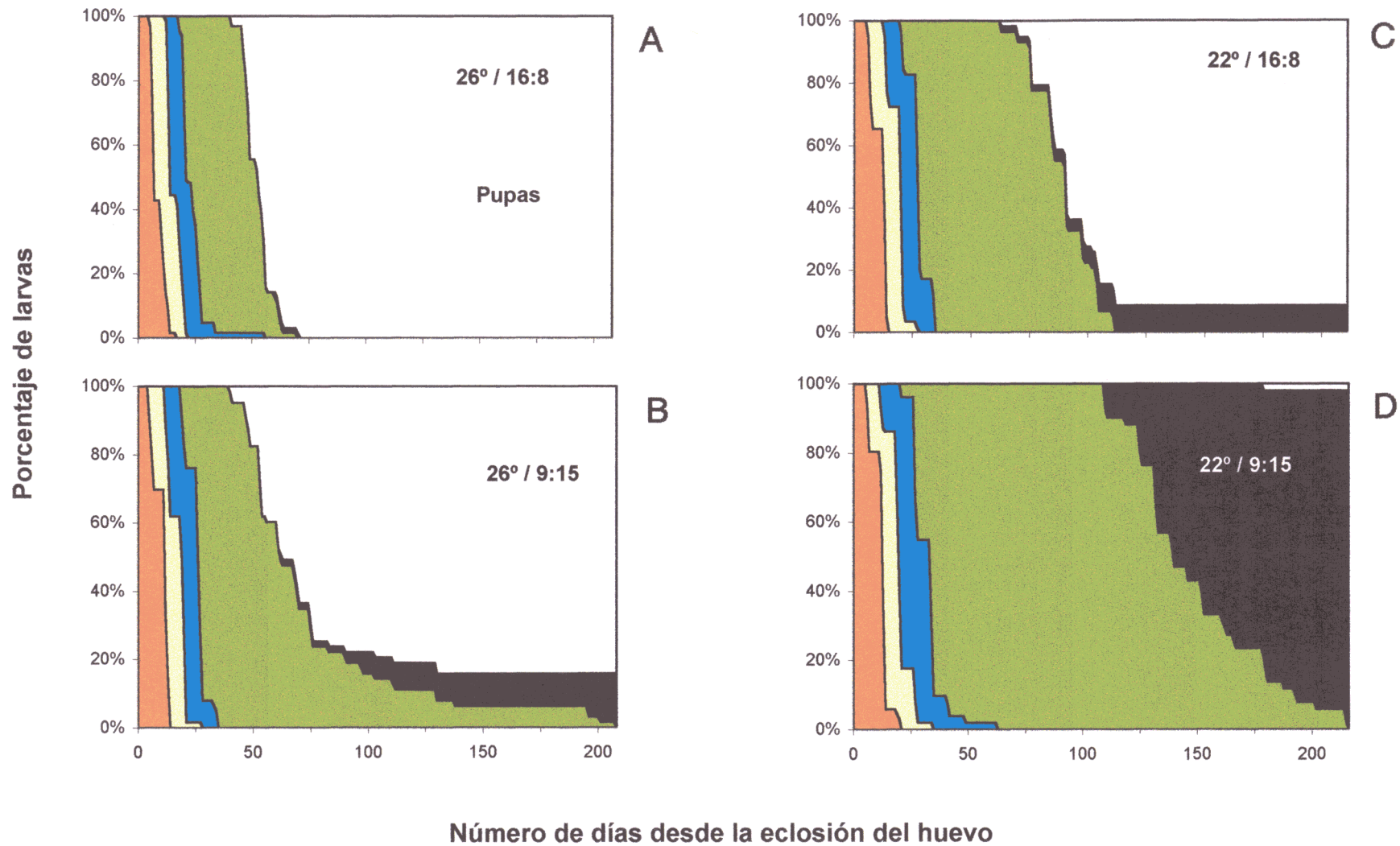


Figura 4.1. Evolución diaria de las poblaciones de larvas recién emergidas de *A. mariaefranciscoe* criadas bajo distintas condiciones de temperatura y fotoperiodo. El color negro representa el número de larvas L4 muertas.

L1  
  L2  
  L3  
  L4  
  Pupas

El patrón de desarrollo de los tres primeros estadios larvarios fue similar en las cuatro condiciones. Por el contrario la forma de L4 varió dependiendo de las condiciones. En condiciones de día largo (Figuras 4.1 A y C) el patrón seguido es el mismo que el de los tres primeros estadios, aunque a 22° se produjo un retraso en el tiempo de desarrollo como podía esperarse de una temperatura inferior. Sin embargo, bajo un fotoperiodo de día corto (Figura 4.1 B y D) siguieron una tendencia distinta. A 26° sufrió una elongación de una pequeña porción de la población en relación al fotoperiodo de día largo, y este grupo (un 20% del total) sobrevivió durante mucho tiempo, aunque no fueron capaces de pupar y fueron muriendo progresivamente. A 22° las diferencias se acentuaron, y un alto porcentaje de la población de L4 experimentó un acusado alargamiento del tiempo de desarrollo.

Los porcentajes de la población que llegaron a pupar fueron altos a 26°C (98 y 84% para 26DL y 26DC, respectivamente) y a 22DL (91%). Sin embargo, a 22DC tan solo pupó un 2% de la población.

El tiempo de desarrollo larvario de *A. mariaefranciscae* en cada una de las cuatro combinaciones distintas de temperatura y fotoperiodo empleadas en este estudio se muestra en la Tabla 4.1. Las larvas criadas en distintas condiciones ambientales mostraron notables diferencias en sus tiempos de desarrollo. Entre los cuatro tratamientos, la duración más breve para completar el estado larvario se consiguió a 26°/16:8, con un total de 52,5 días. Si tomamos estas condiciones como referencia, el tiempo de desarrollo larvario aumentó un 23% a 26°/9:15 y un 71% a 22°/16:8, debido básicamente al incremento de la duración del estadio L4 en ambos casos. Las duraciones medias de los estadios L1, L2 y L3 en las condiciones 26DL, 26DC y 22DL tuvieron valores muy próximos, existiendo sólo diferencias significativas en el primer estadio, en que a 26DL la duración fue menor.

A 22DC los tiempos de desarrollo se prolongaron en los tres primeros estadios, pero donde se observó la mayor diferencia fue en L4. Si en condiciones 22DL estas larvas necesitaron una media de 61,9 días para completar este estadio y toda la etapa

larvaria duró 89,7 días, a 22DC las larvas de último estadio sobrevivieron una media de 112,8 días, muriendo finalmente casi todas.

**Tabla 4.1. Tiempo de desarrollo de los estadios larvarios de *A. mariaefranciscae* criados a dos temperaturas y fotoperiodos**

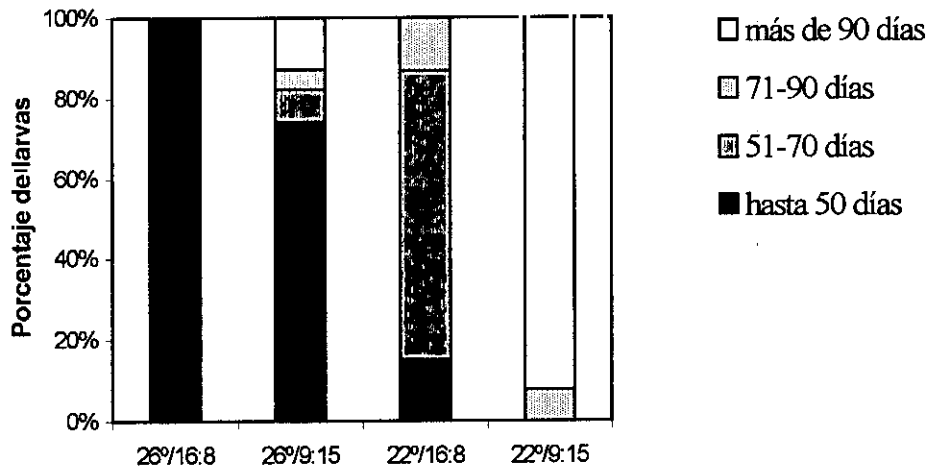
Tª(°C)	Fotoperiodo	n	L1	L2	L3	L4	L1-L4
26	16:8	63	8.8 ± 0.4a	7.3 ± 0.3ab	7.1 ± 0.2a	28.8 ± 0.8a	52.5 ± 0.8a
26	9:15	63	10.6 ± 0.4b	7.0 ± 0.3a	8.2 ± 0.4a	39.2 ± 2.6b	64.3 ± 2.7b
22	16:8	58	11.4 ± 0.4b	7.7 ± 0.3ab	7.5 ± 0.3a	61.9 ± 1.5c	89.7 ± 1.6c
22	9:15	52	11.9 ± 0.4b	8.1 ± 0.4b	10.5 ± 0.5b	*112.8 ± 3.7d	*144.7 ± 3.9d

Los datos representan el número medio de días ± E.S.

Los valores medios dentro de la misma columna seguidos por letras diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

\* Los valores de L4 a 22° de temperatura y 9:15 h de fotoperiodo se refieren al número de días que las larvas subsistieron, ya que sólo un 2% puparon.

La Figura 4.2 muestra el tiempo que emplearon las larvas L4 para pupar, a excepción de las larvas en condiciones 22DC. En este caso el porcentaje de pupación fue tan solo de un 2%, y los valores que se muestran se refieren al número de días que las larvas subsistieron en el estadio L4 antes de morir. A 26DL la duración de las larvas L4 fue siempre menor de 50 días. A 26DC el 74% de las larvas L4 puparon en menos de 50 días, y el 15% superaron los 90 días. A 22DL el tiempo de desarrollo de las larvas L4 fue superior a 50 días en el 85% de la población, pero en ningún caso superaron los 90 días.



**Figura 4.2. Duración del cuarto estadio larvario de *A. mariae franciscae* en distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo**

Teniendo en cuenta las cuatro combinaciones de condiciones constantes de temperatura y fotoperíodo pudimos comprobar que existía una interacción significativa entre ambas variables en L3 y L4 ( $F = 8,6$  y  $F = 82,5$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ), aunque fue en L4 donde esta interacción se hizo más clara, afectando fuertemente al desarrollo.

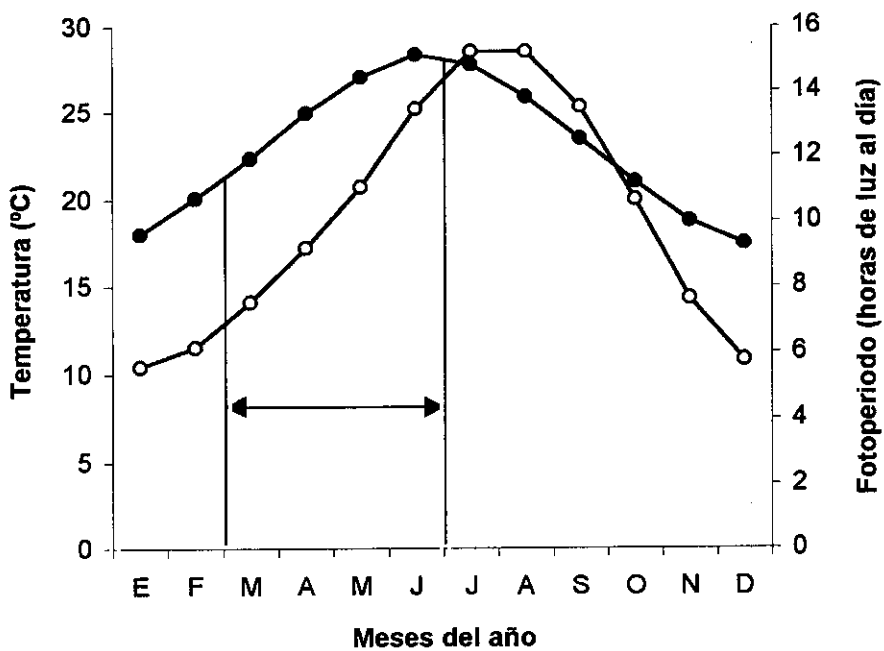
#### 4.4. DISCUSIÓN

Los patrones de la evolución de las distintas poblaciones larvarias fueron muy distintos en función de las condiciones de temperatura y fotoperiodo ensayadas.

Las razones por las que se produjo la alta mortalidad observada en L4 en condiciones de fotoperiodo de día corto son desconocidas. Algunas de estas larvas parecían tener daños en el tegumento. Sin embargo, no se observaron mudas supernumerarias como sucede en otros insectos (FANTINO *et al.*, 1996), que las hubiera podido proteger el tegumento contra las infecciones (ZACHARUK, 1973).

Los resultados obtenidos sugieren que la capacidad para pupar depende mayormente de las condiciones de fotoperiodo a las que tiene lugar el desarrollo larvario (bien en su totalidad, o bien en un supuesto estado sensible), aunque el tiempo de desarrollo en L4 pareció depender fundamentalmente de la temperatura y, en menor medida, del fotoperiodo. Experimentos previos han demostrado que la temperatura base que precisa el estadio L4 de *A. mariaefranciscae* para completar su desarrollo fue de 16,1°C. Las condiciones de temperatura y fotoperiodo en el sur de España se muestran en la Figura 4.3, en la que se ha señalado el periodo aproximado de tiempo que transcurre, según los datos de campo, entre la emergencia de las primeras larvas hasta el comienzo de la pupación (AYALA *et al.*, 1994). El último estadio larvario se encuentra en el campo a lo largo de mayo y junio, coincidiendo con el mayor número de horas al día del año (unas 15 horas aproximadamente, desde la salida hasta la puesta del sol), mientras que los estadios más jóvenes aparecen cuando la temperatura media del día es inferior a 15°C, y hay unas 12 horas de luz al día. De esta forma, podríamos esperar que la duración del estado larvario en el campo fuera similar a la que se produce a las condiciones 26DL, ya que los tres primeros estadios larvarios permitieron un amplio rango de variabilidad en las condiciones de temperatura y fotoperiodo. El estrecho margen de variación de estos dos factores tolerado por las larvas L4 para crecer y pupar, unido al largo periodo de preoviposición que necesitan los adultos para comenzar a poner huevos, nunca inferior a 60 días (ver capítulo anterior), hacen muy difícil que se produzca más de una generación de esta plaga por año.

La mayor parte de la variabilidad encontrada en el tiempo de desarrollo de las larvas de *A. mariaefranciscae* criadas bajo distintas condiciones de luz puede ser atribuida a la prolongación del estadio L4, en el cual el fotoperiodo de día corto produjo un importante retraso en la pupación o la detención del desarrollo. De hecho, se cree que el fotoperiodo es el principal factor indicador utilizado por la mayoría de los insectos para adaptarse con antelación a los cambios ambientales estacionales, debido a su predecibilidad (TAUBER *et al*, 1986).



**Figura 4.3.** Horas de luz al día (○) y temperatura media (●) a lo largo del año en Écija (Sevilla). Cada mes es el valor medio durante 28 años. La flecha señala el periodo del año en el que se encuentra la mayor parte de las larvas en el campo (Ayala, 1994)

Existen numerosas evidencias de que algunos insectos pueden prolongar su período larvario para sobrevivir en periodos del año con condiciones ambientales adversas. Como ejemplo en coleópteros, *Graphognathus leucoloma* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) fue capaz de mantenerse durante largos periodos de tiempo en condiciones desfavorable sin alimento alargando el primer estadio larvario (GOUGH y BROWN, 1991). Igualmente ELLSBURY (1991) encontró en *Languria mozardi* Latreille (Coleoptera: Languriidae) que el último estadio fue significativamente más largo que los demás. En este caso el autor sugirió que este hecho podría estar relacionado con una adaptación que permitiría al insecto subsistir en condiciones adversas y sincronizar su ciclo vital con el de la planta hospedadora para una mejor adaptación al ambiente. Otros estudios han demostrado que las larvas pueden reaccionar de distintos modos frente a fotoperiodos de día corto. En la mayoría de las regiones templadas, la exposición a fotoperiodos de día corto es el factor que induce la diapausa en los insectos (WIGGLESWORTH, 1972). En *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae) se indujo una diapausa facultativa que se caracterizó por un alargamiento del período larvario (EIZAGUIRRE *et al.*, 1994; FANTINOU *et al.*, 1995), y en *Phyllonorycter mespilella* (Hübner) (Lepidoptera: Gracillariidae) el fotoperiodo de día corto prolongó el período de alimentación, probablemente para acumular una mayor cantidad de reservas (MCGREGOR, 1997). En nuestro estudio las larvas L4 que detuvieron su desarrollo en condiciones de fotoperiodo de día corto permanecieron inmóviles, sin alimentarse, a partir de los 50 días aproximadamente, lo cual se podría considerar una adaptación a condiciones ambientales adversas. No obstante, serían necesarios nuevos experimentos en condiciones de fotoperiodo cambiantes para poder confirmar la existencia de algún tipo de adaptación estacional en el último estadio larvario de *A. mariaefranciscae*.

Se detectó una interacción significativa entre la temperatura y el fotoperiodo en L3 y L4. Otros autores (CHIPPENDALE Y REDDY, 1973; GANGAVALLI Y ALINIAZEE, 1985; TAUBER *et al.*, 1986; HODEK y HODKOVÁ, 1988; BROWN y PHILLIPS, 1990, 1991) han indicado que las interacciones entre ambas variables pueden afectar al tiempo de desarrollo de muchas especies de insectos, así como al desarrollo de la diapausa si ésta. En nuestro estudio esta interacción entre fotoperiodo y temperatura es muy clara a 22°C

---

en condiciones de fotoperiodo de día corto, ya que se detuvo el desarrollo en el último estadio larvario, aunque probablemente si se hubieran revertido las condiciones de luz o de temperatura las larvas hubieran sido capaces de pupar.

Como conclusión podemos decir que tanto la temperatura como el fotoperiodo influyen en el tiempo del desarrollo larvario de *A. mariaefranciae*. El largo periodo de desarrollo de las larvas en el último estadio parece estar influenciado sobre todo por la temperatura y, en menor medida, por el fotoperiodo, mientras que el porcentaje de pupación fue determinado en primer lugar por el fotoperiodo y modificado por la temperatura. Existen interacciones entre ambas variables, que afectan principalmente al último estadio larvario. Sería necesario llevar a cabo nuevas investigaciones con condiciones cambiantes de temperatura y fotoperiodo para poder aclarar e interpretar el papel de las fluctuaciones de estas dos variables en la respuesta del insecto, y para determinar la causa que provoca la detención del desarrollo, que puede ser debido bien al efecto de las condiciones adversas sobre los procesos metabólicos, o a cambios en el sistema neuroendocrino que conducen a una diapausa facultativa.

# Biología de la reproducción de *A. mariaefranciscae*

### 5.1. INTRODUCCIÓN

La capacidad reproductora de una determinada especie no es fácil de determinar. Observaciones de la puesta total de las hembras raramente dan una visión real del potencial reproductor de una especie, ya que existe un gran número de factores, tanto internos como externos, que influyen en la producción total de huevos. El factor más importante es la nutrición, seguida de factores ambientales como la luz, la temperatura y la humedad, que actúan de forma directa y también indirecta, a través de sus efectos sobre la alimentación y el apareamiento.

La oviposición, además, implica una serie de respuestas por parte de la hembra que resulta en la selección de un sustrato y lugar adecuado para la puesta. El comportamiento de oviposición de las hembras de los insectos está influenciado por una gran diversidad de estímulos, e igualmente existen determinadas características del hospedador que modifican negativamente su conducta. Un ejemplo lo podemos encontrar en *Anthonomus grandis*, en el que la utilización de una determinada variedad de algodón resultó en una reducción en un 40% de su puesta (KOGAN, 1975).

La temperatura es uno de los factores abióticos con más influencia sobre los organismos vivos, afectando en los insectos a parámetros tales como el tiempo de desarrollo y la longevidad (REICHENBACH y STAIRS, 1984; MASON y MACK, 1984; LEATHER, 1994), pero también a parámetros relacionados con la reproducción, como la duración del periodo prerreproductor, la fecundidad y la fertilidad (MOSCARDI *et al.*, 1981; LEFEVERE y DE KORT, 1989; LEATHER, 1994). El fotoperiodo también cumple un importante papel en la reproducción de los insectos, ya que en muchos casos es el principal factor desencadenante de los mecanismos que inducen una diapausa reproductiva, fenómeno extendido entre distintos órdenes de insectos, que ajusta la reproducción al momento con las mejores condiciones para que ésta se produzca (TAUBER *et al.*, 1986; VOSS *et al.*, 1988; LENG y HUIGNARD, 1992; SUMMY *et al.*, 1993; TAYLOR *et al.*, 1995).

*A. mariaefranciscae* puede considerarse una especie con un rango de hospedadores muy restringido a raíz de los resultados obtenidos por MARCO *et al.* (1998b), quienes observaron que esta especie sólo se alimentaba y hacía su puesta sobre la remolacha azucarera y en menor medida sobre la acelga, ambas subespecies de *Beta vulgaris* L. Sin embargo, existen pocos datos sobre los parámetros reproductores de este curculiónido, que serían de destacado interés para el control de la plaga. Este estudio persigue cuatro objetivos principales:

- 1) Analizar qué parte de la remolacha azucarera es la que seleccionan las hembras de *A. mariaefranciscae* como sustrato de oviposición.
- 2) Estudiar todo el período reproductor de los adultos en dos condiciones distintas de fotoperiodo.
- 3) Explorar el efecto de distintas variables sobre la fecundidad y fertilidad de *A. mariaefranciscae*.
- 4) Determinar la distribución de la puesta en el tiempo.

Con la realización de todos estos objetivos, en condiciones de laboratorio, se pretende conocer más detalladamente la biología de la reproducción de este curculiónido, así como aumentar la eficiencia de la producción de insectos en el laboratorio.

## 5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1. Procedimientos generales

Para este estudio se emplearon poblaciones distintas de *A. mariaefranciscae*:

- para estudiar la preferencia de sustrato de oviposición se utilizaron adultos de una población de 500 individuos recogidos en su periodo prerreproductor (población P1).

- para estudiar la biología de la oviposición en distintos fotoperiodos y cómo influyen diferentes factores en la fecundidad y fertilidad de la especie se capturaron unas 1.000 prepupas (población P2).

- por último, unos 1.000 adultos fueron capturados en cinco fechas distintas del año (capturas C1, C2, C3, C4 y C5) en un cultivo de remolacha azucarera de Santaella (Córdoba) para determinar el número de huevos que ponen en función del momento del ciclo en el que se encuentran.

Las prepupas de la población P2 se mantuvieron en dieta artificial a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O) hasta su pupación. Las pupas se mantuvieron en las mismas condiciones hasta la emergencia del adulto.

Los adultos (1 o 3 parejas, dependiendo del experimento) se disponían en ponederos a las condiciones de temperatura y fotoperiodo requeridas en cada caso. Una vez por semana se extraían los huevos puestos en la planta o la hoja de remolacha y se traspasaban a cajitas de plástico donde se mantenían a las condiciones requeridas por cada experimento, hasta el momento en que eclosionaban.

La "fecundidad" se ha considerado como el número de huevos puestos por cada hembra durante toda su vida, y la "fertilidad" como el porcentaje de huevos puestos por hembra que eclosionaban.

### 5.2.2. Preferencia del sustrato de oviposición

Con el fin de conocer qué parte de la remolacha era preferida por los adultos de *A. mariaefranciscae* para poner los huevos, se realizaron ensayos de no-preferencia en ponederos. En los ponederos se insertaban bien una hoja suelta de remolacha, o bien una pequeña planta de remolacha con tres hojas, y también se estudiaba la distribución de los huevos en las diferentes partes de cada sustrato, de acuerdo al siguiente esquema:

Hoja	Sobre la superficie del suelo
	Bajo la superficie del suelo
Planta	Raíz (excluyendo la corona)
	Corona
	Hoja

La distribución de los huevos en cada una de estas partes se observó semanalmente hasta el final del periodo de oviposición ( $\approx 90$  días).

Para la realización de este ensayo, en cada ponedero se disponían tres parejas de adultos de la población P1, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  HR y a fotoperiodo 16:8 h (L:O), y se hicieron un total de seis réplicas para cada uno de los sustratos. La Tabla 5.1 muestra las condiciones ambientales en que se realizaron los distintos experimentos.

### 5.2.3. Biología de la oviposición a distintos fotoperiodos

Para estudiar la oviposición de *A. mariaefranciscae* en dos condiciones de fotoperiodo distintas se dispusieron 20 parejas de adultos de la población P1 individualizadas en ponederos en dos cámaras de cría a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  HR y a dos fotoperiodos distintos cada una: 16:8 y 9:15 h (L:O), respectivamente, con una hoja suelta de remolacha azucarera que se cambiaba cada semana. Para determinar si el peso de la hembra se relacionaba con su fecundidad, las hembras de *A. mariaefranciscae* se pesaban una semana después de su emergencia.

**Tabla 5.1. Condiciones en las que se llevaron a cabo los diferentes experimentos para estudiar el efecto de distintas variables sobre la fecundidad y fertilidad de *A. mariaefranciscae***

Variable estudiada	Niveles de la variable	Condiciones de los bioensayos						
		Población	HR(%)	Sustrato	Fotoperiodo (L:O)	Temperatura (°C)	N° de parejas por ponedero	n
<b>Sustrato</b>	Hoja suelta	P1	75 ± 10%	-	16:8	26	3	6
	Planta entera						3	6
<b>Fotoperiodo (L:O)</b>	16:8	P2	75 ± 10%	Hoja suelta	-	26	1	20
	9:15						1	20
<b>Temperatura (°C)</b>	10	C2	75 ± 10%	Hoja suelta	16:8	-	3	6
	15						3	6
	20						3	6
	26						3	6
<b>N° de parejas por ponedero</b>	1	P1	75 ± 10%	Hoja suelta	16:8	26	-	20
	3						6	
<b>Captura en distintas fechas</b>	noviembre	C1	75 ± 10%	Hoja suelta	16:8	26	3	6
	diciembre	C2					3	6
	febrero	C3					3	6
	abril	C4					3	6
	junio	C5					3	6

Para evaluar la duración de las distintas fases reproductoras se dividió la etapa adulta en tres periodos: a) periodo de preoviposición, que comprende el intervalo de tiempo que pasa hasta que los adultos comienzan a poner huevos, y durante el cual los adultos se alimentan y están activos; b) periodo de oviposición, que es el intervalo de tiempo en el que ponen huevos, y c) periodo de postoviposición, que se prolonga desde que termina la oviposición hasta la muerte del individuo.

Este experimento se realizó con la población P2 procedente del campo (capturados como prepupas), para saber con exactitud la duración del periodo de preoviposición, así como la longevidad de los adultos. Igualmente, se estudió la supervivencia de los machos y hembras adultos a lo largo del tiempo, comparándose la misma entre los dos fotoperiodos.

#### **5.2.4. Influencia de la temperatura y la densidad en la fecundidad**

Para estudiar cómo influye la temperatura en la fecundidad de *A. mariaefranciscae*, se dispusieron parejas de adultos de la población C2, los cuales no habían comenzado su periodo de oviposición. Se dispusieron tres parejas por ponedero, con una hoja de remolacha, en cuatro cámaras de cría a  $75 \pm 10\%$  HR, fotoperiodo 16:8 h (L:O), y 10, 15, 20 y  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura, respectivamente. Para cada temperatura se hicieron seis repeticiones (Tabla 5.1).

Por otra parte, para el estudio de la influencia de la densidad en la fecundidad se distribuyeron 1 o 3 parejas de adultos de la población P2 en ponederos con una hoja de remolacha, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  HR, y fotoperiodo 16:8 h (L:O). El número de repeticiones fue de 20 y 6 cuando para 1 y 3 parejas, respectivamente (Tabla 5.1).

### 5.2.5. Oviposición de adultos capturados en distintos momentos del año

Para llevar a cabo este estudio se capturaron adultos en cinco fechas distintas del año: noviembre (captura C1), diciembre (C2), febrero (C3), abril (C4) y junio (C5). Para cada una de las fechas se pusieron 3 parejas de adultos por ponedero, con una hoja de remolacha que se cambiaba cada semana, a  $26 \pm 1$  °C,  $75 \pm 10\%$  HR, y fotoperiodo 16:8 h (L:O), y se hicieron 6 repeticiones (Tabla 5.1).

### 5.2.6. Análisis estadísticos

Los patrones temporales de supervivencia de los adultos a los dos fotoperiodos estudiados se resumieron mediante el ajuste a una distribución de frecuencias Weibull (PINDER *et al.*, 1978), que expresa la probabilidad de sobrevivir a una determinada edad  $t$ , cuya ecuación es:

$$S(t) = e^{-(t/b)^c}$$

donde  $S$  es el número de supervivientes (fracción del total) a cada tiempo  $t$ , y  $b$  y  $c$  son constantes. La calidad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación de la curva,  $R^2$ , dado por el programa TableCurve 2D (JANDEL CO., 1994).

Para comparar los valores medios de peso de las hembras, fertilidad, longevidad y duración de los periodos reproductores a dos fotoperiodos distintos se usó la prueba  $t$  de Student. Para estimar la dependencia de la fecundidad en relación al peso de las hembras en cada una de las condiciones de fotoperiodo se hicieron análisis de regresión lineal simples. Para examinar la intensidad de la asociación entre las variables duración de los periodos de preoviposición, oviposición y fecundidad se calcularon los coeficientes de correlación  $r$  no paramétricos de Spearman. Los valores medios de fecundidad de los adultos expuestos a diferentes fotoperiodos y densidad (número de parejas por ponedero) se compararon mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para comparar el número de huevos puestos por adultos expuestos a cuatro temperaturas diferentes se realizaron ANOVAs, y cuando había diferencias significativas (test de la  $F$ ;

$P < 0,05$ ) las diferencias significativas entre medias se establecieron mediante el test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (STATGRAPHICS, 1997).

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Preferencia del sustrato de oviposición

Por lo general los huevos de *A. mariaefranciscae* eran depositados por la hembra individualmente en el interior de los agujeros realizados con el rostro para alimentarse, que posteriormente obturaban mediante secreciones. La distribución de los huevos en las distintas partes de la planta y la hoja suelta de remolacha azucarera se muestra en la Figura 5.1. En total pusieron un mayor número medio de huevos en la planta entera ( $69,6 \pm 5,2$ ) que en la hoja suelta ( $52,5 \pm 4,4$ ). En el caso de la planta entera más de un 97% de los huevos se hallaban en la raíz (un 57,5% de los huevos estaban en la parte de la raíz por debajo de la corona y el 40% en la corona) y tan sólo un 4,3% en la hoja, incluyendo el peciolo y el limbo. Igualmente, en el caso de una hoja separada como sustrato la mayor parte de los huevos (91%) se encontraron en la porción del peciolo por debajo de la arena, y sólo un 9% fueron depositados en la parte aérea del peciolo (muy pocos en el limbo). En todos los casos los huevos se hallaban protegidos por tejido vegetal.

#### 5.3.2. Reproducción a distintos fotoperiodos

Los valores de supervivencia de los adultos a los dos fotoperiodos estudiados se ajustaron a una función Weibull (Figura 5.2). En todos los casos el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), considerado en este caso como una medida de la adecuación entre los valores observados y esperados, fue superior al 96% (hembras:  $R^2 = 0,99$  a ambos fotoperiodos; machos:  $R^2 = 0,98$  a 16:8 y  $R^2 = 0,96$  a 9:15). Los valores de  $b$  y  $c$  son los parámetros que representan la "escala" y "forma", respectivamente, de la curva, y el

parámetro  $c$  controla la tasa de cambio de la mortalidad dependiente de la edad y, por tanto, la forma general de la curva de supervivencia (Figura 5.2) (PINDER *et al.*, 1978).

Los porcentajes de supervivencia hasta el día 100 fueron muy altos, por encima del 80%, decreciendo luego progresivamente con el tiempo. De acuerdo con las curvas obtenidas las hembras en los dos fotoperíodos y los machos en el fotoperíodo 16:8 siguieron patrones de supervivencia similares, y todos ellos habían muerto a los  $\approx 300$  días de su emergencia. Sin embargo, la curva de los machos en el fotoperíodo 9:15 difiere de las otras debido a que el 20% de los machos llegó a vivir hasta 350 días (Figura 5.2 B).

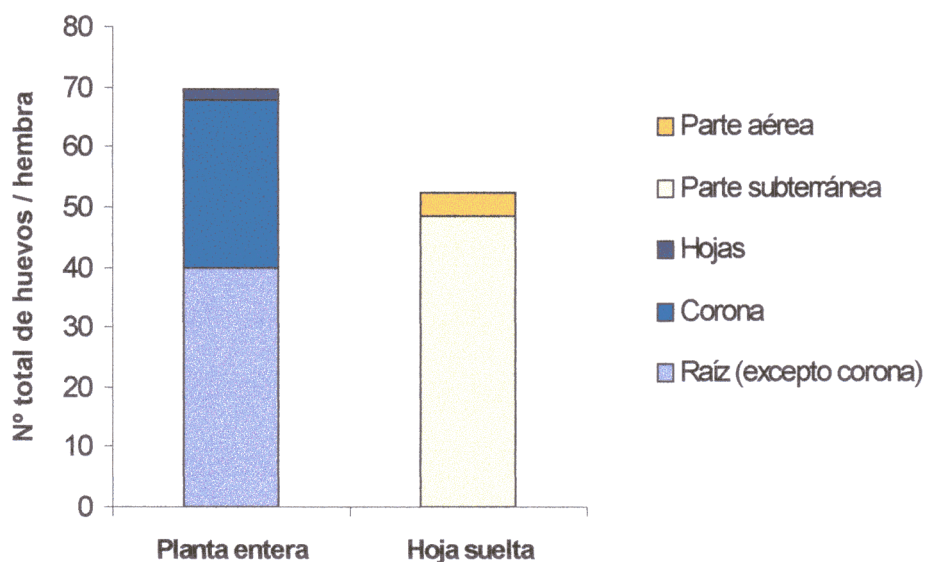


Figura 5.1. Número medio de huevos puestos por las hembras de *A. mariaefranciscae* y su distribución en las distintas partes de las plantas enteras o de las hojas sueltas de remolacha azucarera.

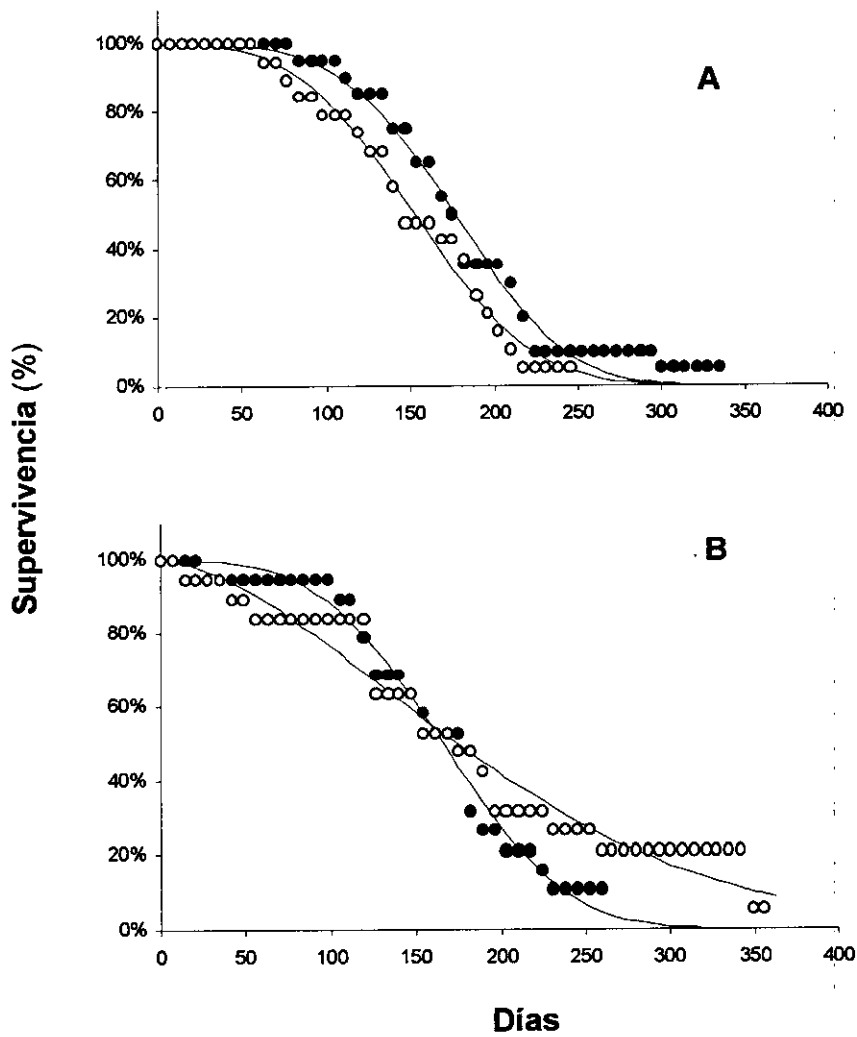


Figura 5.2. Porcentaje de supervivencia de hembras (A) y machos (B) adultos de *A. mariaefrancisciae* en condiciones de fotoperiodo de 16:8h (●) y 9:15 h (○) (L:O)

Los valores de los parámetros para la función Weibull son:

A) 16:8	b = 194,3	c = 3,8
9:15	b = 171,2	c = 3,2
B) 16:8	b = 184,7	c = 3,3
9:15	b = 214,8	c = 1,7

La longevidad media de los adultos (desde su emergencia hasta su muerte) fue siempre mayor de 150 días (Tabla 5.2). No se encontraron diferencias significativas entre los distintos fotoperiodos ni en hembras ( $t = 1,6$ ;  $P > 0,05$ ) ni en machos ( $t = -0,8$ ;  $P > 0,05$ ).

**Tabla 5.2. Fecundidad, fertilidad, duración del periodo reproductor y longevidad de los adultos de *A. mariaefranciscæ* criados en dos condiciones distintas de fotoperiodo**

Fotoperiodo (L:O)	Fecundidad (n° huevos /hembra)	Fertilidad (%)	Duración periodo reproductor (días)		Longevidad (días)	
			Preoviposición	Oviposición	Hembras	Machos
16:8	39,0 ± 12,0a	97,1 ± 0,7a	106,1 ± 6,7a	40,6 ± 7,8a	182,8 ± 13,4a	166,6 ± 13,3a
9:15	73,4 ± 17,8a	96,9 ± 0,9a	80,2 ± 5,0b	65,2 ± 12,1a	153,6 ± 11,8a	187,4 ± 23,8a

Los valores dentro de la misma columna seguidos por letras distintas presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Las curvas de fecundidad acumulada de las dos poblaciones de *A. mariaefranciscæ* mostraron un patrón similar (Figura 5.3 B). El número total de huevos puestos por hembra a fotoperiodo 9:15 es cerca del doble que a 16:8 (73,4 y 39,0, respectivamente, Tabla 5.2). Sin embargo, se registró una alta variabilidad intrínseca del número de huevos puestos por hembra, lo que da lugar a una ausencia de diferencias significativas ( $W = 243$ ;  $P > 0,05$ ). El porcentaje de eclosión de los huevos fue superior al 96% durante todo el periodo de oviposición en las dos condiciones de fotoperiodo estudiadas (Tabla 5.2).

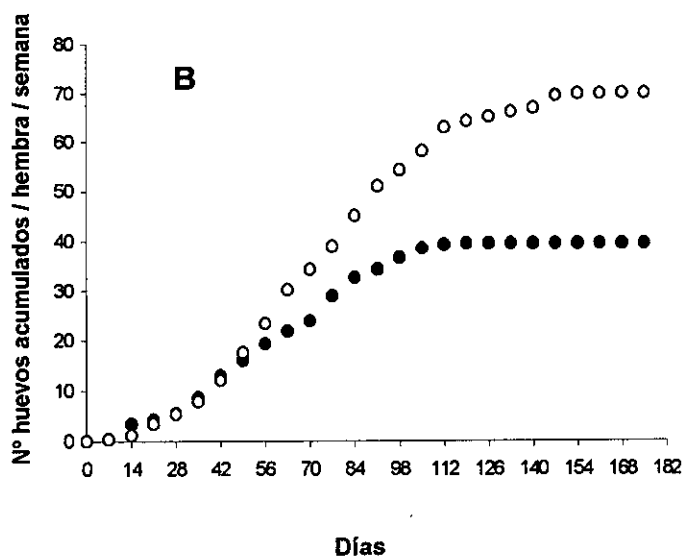
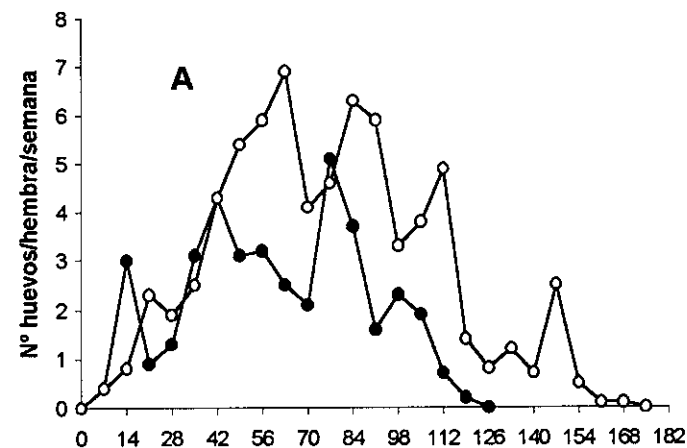


Figura 5.3. Número medio de huevos puestos por hembra (A) y número medio acumulado de huevos por hembra (B) de *A. mariaefrancisciae* en condiciones de fotoperiodo de de 16:8h (●) y 9:15 h (○) (L:O)

El peso de las hembras de fotoperiodo de día largo osciló entre 5,0 y 10,9 mg (media = 8,4; E.S. = 0,4) y en las hembras de fotoperiodo de día corto osciló entre 5,4 y 10,7 mg (media = 8,1; E.S. = 0,4). Entre ambos no se encontraron diferencias significativas ( $t = 0,05$ ;  $P > 0,05$ ). Los análisis de regresión llevados a cabo con la fecundidad y el peso de las hembras indicaron que entre estas dos variables no existía ninguna asociación ( $R^2 = 0,14$  y  $R^2 = 0,00$  para los fotoperiodos 16:8 y 9:15, respectivamente).

Cuando el fotoperiodo era 16:8 el periodo de preoviposición se prolongó durante 106,1 días, y la duración media del periodo de oviposición fue de 40,6 días. Teniendo en cuenta a todas las hembras la puesta tuvo lugar durante 18 semanas (Figura 5.3 A). El patrón de puesta por semana fue bastante errático e irregular durante este tiempo, con picos de puesta de diferente tamaño, siendo el mayor el observado en la semana 11, a partir del cual la tasa de oviposición (nº de huevos/día/hembra) empieza a decrecer.

Cuando el fotoperiodo era 9:15 el periodo de preoviposición fue significativamente menor (80,2 días) que a 16:8 ( $t = 3,1$ ;  $P < 0,05$ ). El periodo de oviposición se prolongó durante 65,2 días, no mostrando diferencias significativas con el obtenido con el fotoperiodo anterior ( $t = -1,6$ ;  $P > 0,05$ ). En total, considerando a todas las hembras, la puesta duró 25 semanas. De nuevo el número de huevos puestos por hembra a lo largo del tiempo fue muy irregular. El mayor pico se alcanzó en la novena semana, y a partir de ese momento empezó a disminuir.

En los dos casos algunas de las hembras dejaron de poner cuando el macho murió, aunque otras pusieron huevos hasta el final de su vida, aunque el macho hubiera muerto con anterioridad.

Se pudo observar una fuerte correlación positiva entre la fecundidad y la duración del periodo de oviposición en las dos condiciones de fotoperiodo ( $r = 0,9$ ;  $P < 0,01$  en ambos casos), y una correlación negativa moderada entre la duración de los periodos de preoviposición y oviposición ( $r = -0,7$  y  $r = -0,6$  en condiciones de día largo y corto, respectivamente;  $P < 0,05$ ) (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3. Coeficientes de correlación de Spearman (valores de P entre paréntesis) entre la fecundidad, duración del periodo de oviposición y duración del periodo de preoviposición**

	Fecundidad	Duración periodo oviposición	Duración periodo preoviposición
Fecundidad	-	0,9** (0,00)	-0,6* (0,02)
Duración periodo oviposición	0,9** (0,00)	-	-0,6* (0,02)
Duración periodo preoviposición	-0,4 (0,16)	-0,7* (0,02)	-

Las correlaciones para el fotoperiodo 16:8 están representadas a la izquierda de la diagonal, y para el fotoperiodo 9:15 están representadas a la derecha de la diagonal

\* P < 0,05

\*\* P < 0,01

### 5.3.3. Influencia de la temperatura y el número de adultos por ponadero en la fecundidad

La temperatura afectó fuertemente a la fecundidad de *A. mariaefranciscae* (Figura 5.4). De las cuatro temperaturas estudiadas, la más favorable para la puesta fue 26°C, con un valor medio de 52,3 huevos puestos por hembra a lo largo de su periodo de oviposición (Tabla 5.4). A 20 y 15°C pusieron aproximadamente la mitad (25,4 y 27,0 huevos, respectivamente), y en el otro extremo, a 10°C las hembras tan solo pusieron una media de 1,7 huevos a lo largo de su vida. Los valores de fecundidad presentaron diferencias significativas entre las temperaturas estudiadas ( $F = 11,6$ ;  $P < 0,05$ ). A 26, 20 y 15°C la fertilidad fue muy alta, por encima del 93%. Por el contrario, a 10°C ninguno de los huevos eclosionó, aunque el número tan bajo de huevos puestos nos llevó a excluirlos de cualquier tipo de análisis estadístico.

**Tabla 5.4. Efecto de la temperatura y el número de parejas por ponedero sobre la fecundidad y fertilidad de *A. mariaefranciscæ*.**

Variable	Niveles de la variable	Fecundidad (n° huevos/hembra)		Fertilidad (%)
		Media ± E.S.	Rango	
Temperatura (°C)	10	1,7 ± 0,8a	0,3-3,7	*
	15	27,0 ± 9,5b	5,7-52	93,5 ± 2,3a
	20	25,4 ± 3,3b	17,0-33,0	93,8 ± 2,2a
	26	52,3 ± 7,1c	35,5-66,3	97,4 ± 1,3a
N° de parejas por ponedero	1	39,0 ± 12,0a	0-206	97,1 ± 0,7a
	3	35,1 ± 5,1a	15-51	96,6 ± 2,0a

Los valores de cada variable dentro de la misma columna seguidos por letras distintas presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

\* Los huevos a 10°C no se han incluido en el análisis debido al bajo número muestral

El número de parejas de *A. mariaefranciscæ* que se incluían en cada ponedero no influyó en la fecundidad de las hembras ( $W = 70$ ;  $P > 0,05$ ) (Tabla 5.4), y en ambos casos la fertilidad fue igualmente muy alta, por encima del 96%.

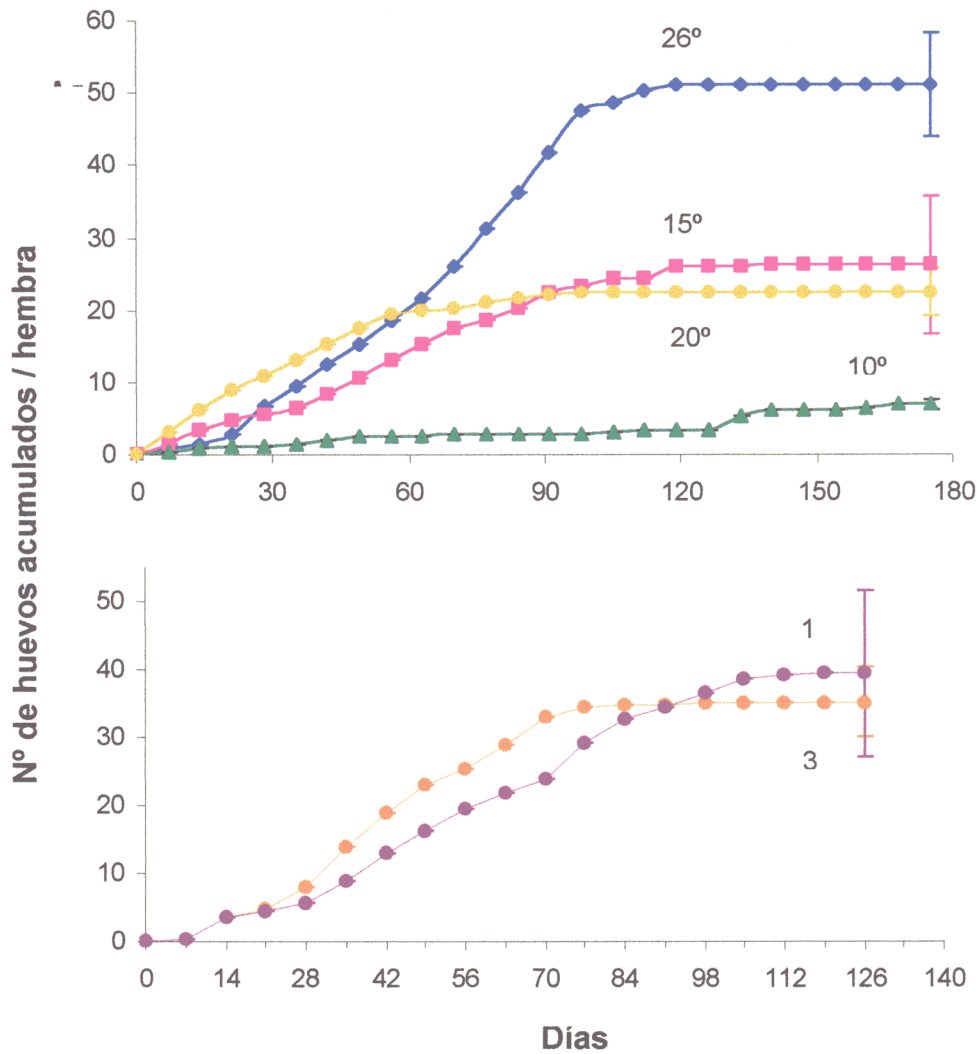


Figura 5.4. Fecundidad media acumulada de las hembras de *A. mariaefranciscae* variando la temperatura (A) y el número de parejas por ponedero (B). Las barras muestran el E.S. del valor medio final

### 5.3.4. Oviposición de adultos capturados en distintos momentos del año

Las hembras adultas de *A. mariaefranciscae* capturadas en el campo en noviembre pusieron una media de 33,0 huevos. El número de huevos aumentó hasta 52,3 en la captura del mes siguiente, y a partir de ese momento en general se puede apreciar una tendencia a la reducción de la fecundidad a medida que avanza el año. No se detectaron diferencias significativas en las capturas de noviembre, diciembre, febrero y abril, pero sí entre éstos y la captura de junio ( $F = 7,3$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 5.5). Ninguna de las hembras capturadas en junio puso huevos.

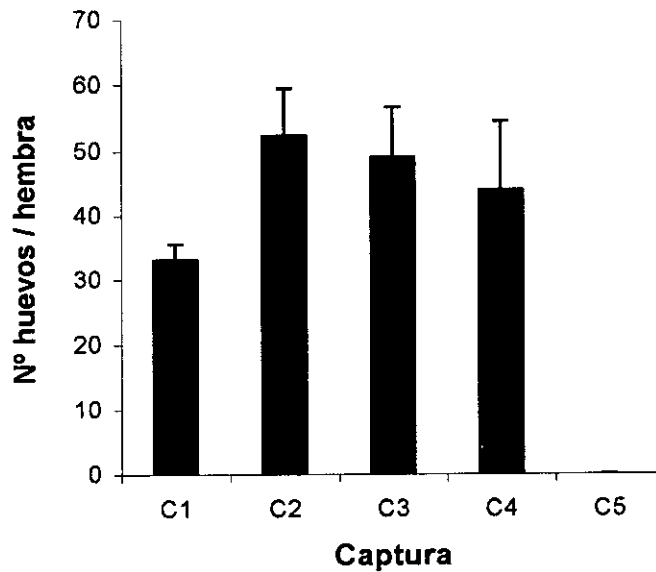


Figura 5.5. Número medio de huevos ( $\pm$  E.S.) puestos por las hembras de *A. mariaefranciscae* en distintas fechas del año

C1 = noviembre; C2 = diciembre; C3 = febrero; C4 = abril; C5 = junio

## 5.4. DISCUSIÓN

El número de huevos puestos por las hembras de *A. mariaefranciscae* estaba dentro del mismo rango que otros curculiónidos que igualmente constituyen una plaga en diferentes cultivos, tales como *Brachicerus algirus* F., *Conorrynchus mendicus* Gyll., *Ceuthorrhynchus napi* Gyll., *Baris granulipennis* Tourn., *Balaninus nucum* L., o *Anthonomus pomorum* L. Sin embargo, había diferencias con otras especies como *Larinus cynarae* F. y *Tychius quinquepunctatus* L., que pusieron un número de huevos bastante menor, y con *Otiorrhynchus ligustici* L., *Sitona lineatus* L., *Lixus junci* Boh., *Hypera variabilis* Herbst o *Listroderes costirostris* Gyll., cuya fecundidad es mayor (BALACHOWSKY, 1963). No obstante, los resultados obtenidos en el laboratorio respecto al número de huevos puestos por hembra no deben ser tomados como un reflejo exacto de lo que sucede en el campo. Por ejemplo, en algunas especies, tales como *C. napi* y *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), se detectó una fecundidad significativamente mayor en las hembras criadas en el laboratorio que en las procedentes del campo (BALACHOWSKY, 1963; MOSCARDI *et al.*, 1981), al contrario de lo que sucede con otras especies como *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Heteroptera: Miridae), cuyas hembras capturadas en el campo pusieron el doble de huevos que las de laboratorio (GERBER, 1995).

La fertilidad de los huevos no se vio afectada por ninguna de las variables estudiadas, y en todos los ensayos realizados fue superior al 90%.

### 5.4.1. Preferencia de sustrato de oviposición

El comportamiento de oviposición mostrado por *A. mariaefranciscae* (huevos individualizados en los agujeros de alimentación y taponamiento posterior) se asemeja al descrito previamente en otras especies de curculiónidos (HUNT *et al.*, 1992). En estudios previos se pudo observar que las hembras de *A. mariaefranciscae* ponían los huevos en el suelo cerca de la raíz de la remolacha azucarera (GIRALDO y ALVARADO, 1990a). Sin embargo, nosotros no pudimos encontrar huevos en el suelo, todos se hallaban en el

interior del tejido vegetal. Nuestros resultados se acercan más a los obtenidos por SANTIAGO-ÁLVAREZ *et al.* (1982), quienes indicaron que los huevos eran puestos por la hembra a lo largo de la raíz, en su interior, y no en sus proximidades. Esta estrategia de puesta proporciona una buena cubierta protectora que evita la desecación de los huevos y además protege de potenciales predadores, lo cual sugiere que los enemigos naturales durante este periodo no tienen un gran impacto sobre las poblaciones de este insecto.

El hecho de que en las hojas sueltas de remolacha la puesta sea un 33% menor que en la planta completa sugiere que la raíz posee algún nutriente esencial o alguna característica fisicoquímica de la que carece la hoja, y que tiene un importante efecto en el rendimiento de la oviposición de las hembras.

#### 5.4.2. Biología de la oviposición a distintos fotoperiodos

La función Weibull se ha revelado un buen modelo descriptor de los patrones de supervivencia de los organismos vertebrados (PINDER III *et al.*, 1978), y posteriormente se ha demostrado que es útil también para describir la supervivencia de los insectos (SMITH, 1986; NOWIERSKY *et al.*, 1995). El fotoperiodo no alteró de forma sustancial a la supervivencia, ya que las curvas que muestran los porcentajes de supervivencia de machos y hembras de *A. mariaefranciscae* apenas se vieron modificadas. Solamente en el caso de condiciones de día corto se prolongó la vida de algunos machos, modificándose así los parámetros de la curva. No encontramos ninguna explicación evidente para este resultado, pero el valor medio de longevidad no fue significativamente distinto al obtenido en condiciones de día largo. Del mismo modo, la longevidad de machos y hembras tampoco se vio afectada por el fotoperiodo. En relación a otros curculiónidos los valores de longevidad de *A. mariaefranciscae* fueron altos (JANSSON y HUNSBERGER, 1991; SOBHIAN y FORNASARI, 1994), lo que hace que la puesta se suceda sobre las plantas en distintos momentos del año, atacándolas en sus diferentes fases del desarrollo.

La variabilidad encontrada entre los valores de fecundidad de las hembras fue muy alta, lo cual hizo que no hubiera diferencias significativas entre los dos fotoperiodos a pesar de los distintos valores obtenidos.

En muchos especies de insectos, mayormente lepidópteros, se ha registrado una relación positiva entre el peso de la pupa o del adulto y la fecundidad (MARSHALL, 1990; DAUMAL y BOINEL, 1994; BRABY y JONES, 1995; KAMATA e IGARASHI, 1995). En el coleóptero *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) se encontró una correlación débil entre ambas variables (JIKUMARU *et al.*, 1994). Por el contrario, nuestros resultados con el peso de la hembra adulta y la fecundidad en *A. mariaefranciscae* no mostraron ninguna correlación. Este hecho puede deberse a varias razones: a su largo periodo de oviposición, a que sólo puede haber un número limitado de huevos completamente formados en el ovario a lo largo del periodo de oviposición (GIRALDO y ALVARADO, 1990a), y debido a que se alimentan ininterrumpidamente a lo largo de su vida, evitando una disminución progresiva de peso.

La diapausa en los insectos adultos puede tener lugar bien durante el periodo prerreproductor o bien poco después del comienzo de la reproducción. Ambas soluciones están bien representadas en diversos órdenes de insectos, entre los que se incluyen los coleópteros (SAUNDERS, 1982; TAYLOR y SPALDING, 1988). En otras especies de curculiónidos, entre las que parece estar *A. mariaefranciscae*, se ha detectado también un largo periodo de preoviposición durante el cual los adultos se alimentan pero no se reproducen, por lo que se ha llamado diapausa reproductiva, y es un fenómeno ampliamente extendido entre las especies de coleópteros (BLAND, 1971; MADUBUNYI, 1978; MASAKI, 1980; LENG y HUIGNARD, 1992; SUMMY *et al.*, 1993; ISHIHARA y SHIMADA, 1994; TAUBER *et al.*, 1996). Esta larga etapa tiene importantes implicaciones a la hora de precisar el voltinismo de este insecto. Dada la duración total del ciclo vital de *A. mariaefranciscae* y su acoplamiento al ciclo de la remolacha en el campo, parece muy difícil que se pueda producir más de una generación por año. Por otra parte, el momento del año en el que tiene lugar el periodo de preoviposición se corresponde aproximadamente con el fotoperiodo 9:15, lo cual sugiere que éste es el periodo mínimo que necesitan las hembras para la maduración de su aparato

reproductor. Además este ajuste implica la coincidencia del período de oviposición con el momento en el que las remolachas en el sur de España tienen las hojas más frondosa, aportando mayor cantidad de alimento para los adultos, y las exigencias térmicas tan restringidas de los estadios larvarios coinciden con el que la temperatura ambiental es más óptima para ellos. (MARCO *et al.*, 1997). No obstante, sería necesario estudiar las diferentes etapas de maduración del aparato reproductor en relación a las condiciones ambientales para confirmar la presencia de este tipo de diapausa. Este resultado también es importante desde el punto de vista del mantenimiento de la plaga en el laboratorio, puesto que se acorta un mes con respecto al fotoperiodo de día largo.

Hubo una cierta variabilidad en la duración del período de preoviposición, lo que hizo que la puesta no tuviera lugar de forma sincronizada entre las hembras. Este hecho se ha sido observado, por ejemplo, en *Larinus latus* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) (BRIESE, 1996), y se considera una buena estrategia para evitar una excesiva mortalidad de la progenie debida a factores ambientales imprevisibles o estacionales, como la sequía. Estas razones deben ser consideradas a la hora de desarrollar estrategias del manejo de la plaga en los cultivos de remolacha azucarera.

En los dos casos los patrones de puesta a lo largo del tiempo fueron muy irregulares, mostrando picos de máximo número de huevos puestos por hembra y por semana, que progresivamente van disminuyendo en tamaño (Figura 4.2), lo cual se ha observado en otras especies de curculiónidos (WALSH y LINIT, 1985; JANSSON y HUNSBERGER, 1991) y es otro factor que puede dificultar considerablemente el control de la plaga en el campo.

La fuerte correlación positiva encontrada entre la fecundidad y la duración del período de oviposición sugiere que durante todo este período las hembras ponen huevos con aproximadamente el mismo vigor. Se destaca el hecho de que el acortamiento del período de preoviposición llevó al alargamiento del de oviposición, dando así lugar a una mayor fecundidad. La obtención de este resultado supone un importante avance en la cría de esta especie en el laboratorio.

### 5.4.3. Influencia de la temperatura y el número de parejas por ponedero en la fecundidad

La temperatura fue un factor que influyó fuertemente en el número de huevos puestos por *A. mariaefranciscae*. La fecundidad normalmente se incrementa de forma lineal entre dos umbrales de temperatura hasta llegar a un punto óptimo (LEATHER, 1994), a partir del cual decrece de nuevo, ajustándose a una función curvilínea. En nuestro caso, a medida que aumenta la temperatura lo hace también la fecundidad, lo cual indica que todavía nos hallamos en la parte ascendente de la curva, y harían falta nuevos ensayos a temperaturas más elevadas para conocer el umbral máximo de temperatura de oviposición. ANDREWARTHA y BIRCH (1984) señalaron que la fecundidad de los insectos tiende hacia un máximo a una temperatura moderadamente alta, que incluso puede ser relativamente cercana al límite superior del rango favorable, y los mismos autores comprobaron que los rangos de temperatura favorables para la formación de los huevos y para la oviposición son normalmente del mismo orden que los más favorables para el desarrollo de los estadios inmaduros. El rango de temperatura más favorable para el desarrollo de *A. mariaefranciscae* fluctúa entre los 23 y los 26°C (MARCO *et al.*, 1997), lo cual se corresponde con la fecundidad más alta registrada a 26°C. Normalmente cuando se emplean temperaturas próximas a los límites superior e inferior del rango favorable la fecundidad decrece bruscamente. En este estudio a 10°C la oviposición fue esporádica e irregular, sugiriendo que esta temperatura está cerca del límite inferior de oviposición de esta especie.

El número medio de huevos puestos cuando había tres parejas por ponedero no se redujo, como se ha detectado en insectos como *Bactra verutana* Zeller (Lepidoptera: Tortricidae) (FRICK y WILSON, 1982) al aumentar la densidad de adultos en las cajas de cría. Igualmente, THRONE (1994) observó en *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) que la progenie se reducía al aumentar la densidad, aunque en este caso el autor no pudo detectar si se debió a una reducción de la fecundidad o a diferencias en la supervivencia de las larvas. Nuestro resultado es interesante desde el punto de vista del mantenimiento de la plaga en el laboratorio y a la hora de hacer ensayos, ya que se puede evaluar la influencia de un determinado factor (por ejemplo, un

insecticida) sobre la reproducción de *A. mariaefranciscae* usando parejas individualizadas sin que haya peligro de una reducción significativa de la fecundidad.

#### 5.4.4. Oviposición de adultos capturados en distintos momentos del año

El período de oviposición de *A. mariaefranciscae* en el campo comienza aproximadamente en diciembre, siempre dependiendo de las condiciones meteorológicas de cada año, y termina a comienzos de verano, coincidiendo con las máximas temperaturas del año (GIRALDO y ALVARADO, 1990a). Sin embargo, el número de huevos puestos por las hembras capturadas en noviembre (C1) fue menor de lo que hubiera cabido esperar (fue anormalmente más bajo que en la captura de diciembre). Este hecho puede ser debido a que en la primera captura también se hallaba incluido un número indeterminado de adultos del año anterior que estuvieron tras su período de oviposición. Al igual que en el caso de otros curculiónidos que viven en climas cálidos (ver por ejemplo SMITH y WARD, 1995), *A. mariaefranciscae* tiene una fase de inactividad como adulto, coincidiendo con el período más caluroso del año. Atendiendo a la clasificación hecha por MASAKI (1980), en *A. mariaefranciscae* esta fase se correspondería con un tipo de diapausa de verano mediante la cual los adultos retrasan el período reproductor hasta el otoño o invierno. En *A. mariaefranciscae* esta respuesta podría ser facultativa, ya que los adultos criados en el laboratorio no mostraron este estado de inactividad. Por tanto, podríamos hablar de una estivación como adaptación a los veranos secos y calurosos de las regiones mediterráneas. Estas hembras adultas no pondrían huevos después del período de estivación, o bien contribuirían con una cantidad insignificante, y morirían poco después. Este hecho se ha podido observar en otras especies como *Mythimna convecta* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) (SMITH, 1986). De acuerdo con esta interpretación, la fecundidad media fue decreciendo desde la captura realizada en diciembre (C2) hasta la de abril (C4) como cabía esperar, ya que parte de los huevos habían sido puestos por las hembras en el campo antes de su captura y en junio (C5) ya no pusieron ningún huevo. Los resultados indican que una pequeña parte del total de los huevos los pusieron antes de abril (C4), y la mayor proporción de huevos la pusieron entre abril y junio (C5), lo cual se corresponde con las exigencias

térmicas observadas por MARCO *et al.* (1997) para el estadio larvario L4 y el estado pupal, cuyos umbrales mínimos de desarrollo son temperaturas relativamente altas (6,1 y 15,2°C, respectivamente).

En definitiva, se ha demostrado que el hecho de que la fecundidad de *A. mariaefranciscae* no fuera muy elevada no supone una limitación a su potencial como plaga. Esto es, en parte, debido a que la fertilidad de los huevos fue muy alta, próxima al 100% en todos los casos ensayados, a la elección del sustrato de puesta, preferentemente bajo tierra, y con los huevos siempre protegido por tejido vegetal, al largo período de oviposición, a la falta de sincronización entre las hembras y a la alta longevidad. Estos dos últimos factores facilitan la distribución de la puesta en diferentes fechas.

Los datos procedentes de este estudio pueden ser útiles en distintos ámbitos:

- a) Para evaluar el potencial de *A. mariaefranciscae* como plaga. Este curculiónido pone un número de huevos similar o mayor que otros curculiónidos que también son plagas clave de otros cultivos. Aunque la fecundidad no es muy alta, la estrategia de puesta en el interior del tejido vegetal, los altos valores de fertilidad superiores siempre al 95% y la buena adaptación al régimen de temperaturas del sur de la Península aseguran el mantenimiento de *A. mariaefranciscae* como plaga de la remolacha azucarera.
- b) Para desarrollar estrategias del manejo de la plaga en los cultivos de remolacha azucarera. En este punto cabe destacar el larga duración del periodo de oviposición.
- c) Para la mejora de los métodos de cría de esta especie en el laboratorio.

# Efectos de distintos RCIs aplicados sobre adultos de *A. mariaefranciscae*

En la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas que incrementen su selectividad, los RCIs se han revelado un grupo muy prometedor ya que, además de esta característica debida a su modo de acción distinto al de los insecticidas tradicionales, han mostrado propiedades muy favorables respecto a su toxicidad y a su acumulación en el medio. Los descubrimientos acerca de su efecto sobre la reproducción de los insectos al ser aplicados sobre adultos nos ha llevado a estudiar la efectividad de algunos de ellos sobre *A. mariaefranciscae*, insecto que por sus hábitos de vida es difícil de controlar durante el estadio larvario.

Los compuestos ensayados han sido tres, cada uno de los cuales tiene un modo diferente de acción: el hexaflumurón (inhibidor de la síntesis de quitina), piriproxifén (análogo de la hormona juvenil), y halofenocida (análogo de la hormona de la muda).

Los materiales y métodos empleados para los tres insecticidas ensayados tienen muchos puntos en común, y por ello se han agrupado en un solo apartado, estudiándose a continuación cada compuesto individualmente.

## 6.1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1.1. RCIs ensayados

#### Hexaflumurón

Su nombre químico es 1-[3,5-dicloro-4-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi)-fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil) urea. Para estudiar sus efectos sobre la reproducción y el desarrollo de la progenie de *A. mariae franciscae* se empleó en su fórmula comercial (Consult 10EC, concentrado emulsionable, 100 g IA/litro), que fue proporcionado por Dow-Elanco España.

#### Hexaflumurón-C<sup>14</sup>

Para el estudio de la penetración, distribución y excreción del hexaflumurón en adultos de *A. mariae franciscae* se utilizó hexaflumurón marcado uniformemente con C<sup>14</sup> en el anillo anilina, con una actividad específica de 22,2 mCi/mmol, que fue facilitado por Dow-Elanco (Reino Unido).

#### Halofenocida

Su nombre químico es N-*tert*-butyl-N'-(4-clorobenzoil) benzohidracida. Para estudiar el efecto del halofenocida sobre la reproducción y el desarrollo de la progenie de *A. mariae franciscae* se empleó el producto técnico, proporcionado por Rohm & Haas Co. (Spring House, PA, EEUU).

#### Halofenocida-C<sup>14</sup>

Para el estudio de la farmacocinética se empleó un radioisótopo de halofenocida marcado radiactivamente con C<sup>14</sup> en el grupo t-butil, con una actividad específica de 24.0 mCi/g, que fue igualmente proporcionado por Rohm & Haas Co.

#### Piriproxifén

Su nombre químico es 4-fenoxi-fenil (RS)-2-(2-piridiloxi)propileter. Para estudiar el efecto del piriproxifén aplicado sobre adultos de *A. mariae franciscae* se

empleó un concentrado emulsionable al 10%, proporcionado por Sumitomo Chemical Co., (Osaka, Japón).

### 6.1.2. Aplicación tópica

El hexaflumurón y piriproxifén (en su forma comercial) y halofenocida se diluyeron en acetona. Machos y hembras adultos de *A. mariae/franciscae* fueron tópicamente tratados con un microaplicador Burkard. A cada individuo se le aplicaron 0,5 µl de la mezcla sobre el pronoto. A los testigos se les aplicaba 0,5 µl de acetona.

Las dosis empleadas fueron:

- Hexaflumurón: 0,03 µg IA/adulto.
- Halofenocida: 2 µg IA/adulto.
- Piriproxifén: 10 µg IA/adulto.

Las dosis empleadas se calcularon a partir de las usadas en otros estudios para distintas especies de coleópteros, corrigiendo el factor peso. Se hicieron un total de 15 repeticiones (15 parejas tratadas y 15 parejas testigo). Los tratamientos se llevaron a cabo una semana después del comienzo de la oviposición.

### 6.1.3. Aplicación foliar

Para las aplicaciones foliares del hexaflumurón se usó una torre de Potter de precisión y un compresor de aire (50 kPa de presión). Cada ponedero se trató con 3,17 ml de hexaflumurón, lo que se correspondía con 8,92 µg IA/ml (31 µg IA/ponedero), que es una dosis de insecticida equivalente a 400 l/ha (25 g IA/ha). Los testigos fueron tratados con agua destilada. Las parejas de adultos (macho y hembra) se introducían en el ponedero tres horas después del tratamiento, y allí permanecían alimentándose durante una semana. Transcurrido este tiempo se pasaban a nuevos ponederos con una hoja de remolacha sin tratar. Se trataron 15 parejas y otras tantas se utilizaron como

testigos. Todos los ensayos se realizaron en cámaras de cría a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $85 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O).

#### 6.1.4. Efectos sobre la fecundidad, fertilidad y supervivencia de la progenie

##### 6.1.4.1. Hexaflumurón

Machos y hembras adultos de *A. mariaefranciscae* fueron tratados con hexaflumurón en dos momentos fisiológicos distintos. La semana siguiente de ser recogidos en el campo, 50 parejas se trataron de forma tópica o foliar. De ellas, se separaron 15 parejas por tratamiento que comenzaron a poner huevos  $\approx 50$  días después de la aplicación, y a este grupo se le denominó F-50. Por otra parte, unas 200 parejas individualizadas en ponederos se revisaban semanalmente para controlar el momento en el que empezaba la oviposición. 15 de estas parejas fueron igualmente tratadas de forma tópica y foliar una semana después del comienzo de la oviposición, llamándose a este grupo F-0. Los huevos depositados en las hojas se recogían cada semana y se incubaban hasta su eclosión.

Con el fin de estudiar el papel de cada sexo en la transmisión del hexaflumurón a la progenie se realizó una aplicación tópica sobre parejas del grupo F-0, distribuyéndolas en cuatro grupos de cruzamientos distintos: machos no tratados (U) x hembras U (grupo testigo), machos tratados (T) x hembras U, machos U x hembras T y machos T x Hembras T. Los huevos puestos eran recogidos cada semana e incubados hasta su eclosión.

Para estudiar el efecto del tratamiento de adultos de *A. mariaefranciscae* con hexaflumurón sobre el desarrollo de la progenie se trataron machos y hembras de forma tópica y foliar como se ha descrito previamente. En cada ponedero se depositaban cinco machos y cinco hembras en su periodo de oviposición, y se hicieron cinco repeticiones por tratamiento y otras cinco para los testigos. Los huevos se recogían semanalmente. Las primeras 25 larvas que emergían de cada tratamiento se criaban sobre dieta artificial

y en cada cambio de dieta se registraba el estadio en el que se encontraban y la mortalidad.

#### **6.1.4.2. Halofenocida y piriproxifén**

Tras el tratamiento tópico cada pareja de adultos tratada (macho y hembra) se puso en un ponedero. Cada cinco días se extraían los huevos depositados en las hojas y se ponía otra hoja nueva. Los huevos se contaban para obtener la fecundidad, y se incubaban para calcular su porcentaje de eclosión. Las larvas neonatas que emergían se dividieron en grupos dependiendo del tiempo que había pasado desde el tratamiento a los adultos hasta la recogida de los huevos (5, 10, 15, etc. días), y eran criadas individualmente con dieta artificial (un mínimo de 10 larvas por grupo). La mortalidad y estado del desarrollo en que se encontraban se registraba en cada cambio de dieta (cada 4 o 5 días). Al final del experimento el número total de huevos puestos por los adultos tratados con halofenocida o piriproxifén y los controles se comparó por medio del test no paramétrico de Mann-Whitney.

#### **6.1.5. Efecto ovicida por contacto del hexaflumurón**

Los huevos empleados en este estudio se obtuvieron a partir de 200 parejas de adultos agrupadas de 5 en 5 en ponederos.

Para estimar la concentración letal (CL), se dispusieron huevos de menos de 24 horas sobre papel de filtro tratado con 0,4 ml de cinco concentraciones diferentes de Consult 10EC comprendidas entre 4,5 y 40,5  $\mu\text{g IA/ml}$  disuelto en agua destilada. Para los testigos se utilizó agua destilada. Los huevos se mantenían en cajitas de plástico a una humedad superior al 80%. Para cada concentración y para el testigo se hicieron cinco repeticiones de 10 huevos cada una. La eclosión de los huevos fue revisada durante los diez días siguientes al tratamiento (tiempo medio de eclosión en los testigos  $\approx 7$  días).

Se estudió también la actividad ovicida de contacto del hexaflumurón en función de la edad de los huevos. Para ello se hicieron diferentes grupos: 0-24 horas, 1-2 días, 2-3 días, 3-4 días, 4-5 días y 5-6 días de edad. La concentración empleada para los tratamientos fue 20 µg IA/ml, que representa la CL<sub>75</sub> para los huevos de menos de 24 horas. Para cada grupo de edad se hicieron cinco repeticiones de diez huevos cada una, y el mismo número para los testigos, a las condiciones citadas anteriormente. Igualmente, la eclosión de los huevos fue revisada durante los diez días siguientes al tratamiento.

Los valores de CL del hexaflumurón para los huevos de menos de 24 horas así como los límites fiduciales al 95% se estimaron por medio de análisis probit usando el programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Los datos de porcentajes de eclosión de los huevos fueron previamente modificados mediante la transformación del arcoseno. Los valores medios de eclosión fueron comparados mediante un ANOVA para detectar diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ).

#### **6.1.6. Efecto de hexaflumurón *via adultos* en la ultraestructura del tegumento del embrión**

Para estudiar cómo afectaba el tratamiento con hexaflumurón de adultos de *A. mariae-franciscæ* en la ultraestructura del tegumento de los embriones formados, se trataron tópicamente, cuatro repeticiones de 10 adultos cada una (cinco machos y cinco hembras) con el producto comercial disuelto en acetona, para dar lugar a una solución de 62,5 mg IA/ml. Se aplicó una gota de 0,5 µl de esta solución sobre el pronoto de cada adulto, equivalente a 0,03 µg IA/adulto (el peso medio de cada adulto era  $\approx 6$  mg). Los adultos testigo se trataron con 0,5 µl de acetona. Cada una de las réplicas y los testigos se dispusieron en ponederos a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O). Los huevos eran diariamente sacados de las hojas de remolacha azucarera, e incubados a las mismas condiciones. Cuando el embrión estaba completamente formado (se le podía ver moviéndose a través del corion), los huevos se congelaban hasta el momento de ser preparados para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

El embrión procedente de adultos tratados con hexaflumurón era cuidadosamente extraído presionando suavemente sobre el corion con un pincel, y cortado en secciones transversales. Para hacer las preparaciones se siguió el procesamiento convencional de muestras para microscopía electrónica (GONZÁLEZ-MELENDI *et al.*, 1995). Una vez que los embriones se habían incrustado en agar al 2%, se utilizó como fijador primario la solución de Karnovsky que se compone de una mezcla de los fijadores glutaraldehído y formaldehído en tampón cacodilato 0,025 M, a pH 6,9. Las concentraciones finales de ambos fijadores fueron 5% y 4%, respectivamente. Para facilitar la penetración de los fijadores las muestras se desgasificaron durante 1 minuto en una bomba de vacío. La fijación se llevó a cabo durante 5 horas a temperatura ambiente. Después se lavaron dos veces durante 30 minutos en tampón cacodilato 0,025 M y se mantuvieron en el mismo medio durante 12 horas a 4°C.

Para la postfijación se utilizó como fijador secundario tetróxido de osmio 1% en tampón cacodilato 0,025 M durante dos horas, al cabo de las cuales las muestras adquieren un color negro signo de la fijación del osmio. Después de tres lavados en el tampón de 30 minutos cada uno, las muestras se deshidrataron de la siguiente manera: etanol 30%, 60 min.; etanol 50%, 60 min.; etanol 70%, una noche a 4°C; etanol 90%, 60 min.; etanol 100%, 60 min., tres veces; etanol 100%: óxido de propileno (1:1, v:v), 5 min.; óxido de propileno, 10 min., tres veces.

A continuación las muestras deshidratadas se infiltraron en la resina Epon 812 (Serva), de naturaleza hidrofóbica y muy apropiada para estudios ultraestructurales. Las muestras se sumergieron en una mezcla de óxido de propileno: Epon (1:1, v:v) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después se pasaron a otro vial con Epon puro en el cual se mantienen otros 45 minutos. El proceso de infiltración se completa durante una noche a 4°C en rotación. Transcurrido ese tiempo las muestras estaban completamente sumergidas en la resina.

La última fase es la de polimerización de la resina. Los viales se sacan a temperatura ambiente unos minutos y se pasan destapados a una estufa a 37°C durante dos horas con el fin de eliminar la humedad que hayan podido tomar. Finalmente cada muestra se deposita individualmente en el fondo de cápsulas de gelatina, se rellenan

completamente con la resina y se introducen en una estufa a 70°C durante 18 horas para conseguir la completa polimerización.

Antes de la tinción se hicieron cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  de espesor para observarlos al microscopio de contraste de fase con el fin de hacer una observación general y elegir las muestras más claras. Posteriormente se realizaron secciones transversales ultrafinas de los embriones tratados y testigos con un microtomo, se montaron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con uranil acetato durante 30 minutos y citrato de plomo durante 2 minutos para ser examinados al microscopio electrónico de transmisión.

#### **6.1.7. Efecto del halofenocida *via adultos* sobre las larvas de la siguiente generación: procesamiento de muestras para el análisis histológico**

Para el estudio del efecto análogo a la hormona de la muda del halofenocida, cinco larvas neonatas de cinco días de edad procedentes de adultos tratados tópicamente con halofenocida y cinco larvas neonatas de la misma edad procedentes de los testigos fueron sometidas a un análisis histológico. Todas ellas fueron fijadas en formaldehído al 4%, luego lavadas en agua destilada y deshidratadas tras pasarlas por etanol y xilol. Posteriormente se incluyeron en Paraplast (Oxford Laboratories International Corp., Irlanda), se hicieron cortes de 6  $\mu\text{m}$  de espesor con un microtomo y fueron examinadas al microscopio óptico.

#### **6.1.8. Estudio de la farmacocinética del hexaflumurón y el halofenocida**

##### **6.1.8.1. Aplicación tópica**

En el caso del hexaflumurón se hicieron tratamientos en dos edades fisiológicas distintas: se consideraba que los adultos eran "viejos" cuando las hembras se encontraban dentro de su periodo de oviposición (adultos procedentes de campo), y

"jóvenes" cuando estaban al comienzo de la oviposición (adultos procedentes de larvas criadas sobre dieta artificial). A las condiciones mencionadas antes el periodo de oviposición tiene una duración de  $40,6 \pm 7,8$  días.

Para este estudio se emplearon compuestos marcados radiactivamente. Machos y hembras adultos de *A. mariaefranciscae* fueron tratados tópicamente con 0,5 µl de una solución de acetona que contenía hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] o halofenocida-[C<sup>14</sup>] por medio de un aplicador Hamilton al que se había acoplado una microjeringa. La cantidad media de radiactividad aplicada en total a cada adulto fue de:

- hexaflumurón :  $46.601 \pm 3.979$  cpm a los viejos y  $36.716 \pm 1.056$  cpm a los jóvenes.
- halofenocida:  $53.957 \pm 9.113$  cpm

En el caso del hexaflumurón se individualizaron los ejemplares tratados, mientras que en el caso del halofenocida se mantuvieron por parejas (macho y hembra). Cada individuo o pareja tratado se depositó en una placa de plástico de 5 cm de diámetro por 1,8 cm de altura que tenía en el fondo una capa de papel de filtro Whatman nº 1, y se le proporcionó como alimento hojas de remolacha *ad libitum*.

En el caso del hexaflumurón, para cada uno de los ensayos, al cabo de distintos tiempos (1, 2, 3, 7 y 14 días) tras la aplicación tópica, se separaron cuatro machos y cuatro hembras así como sus heces, los restos de alimentos y el papel de filtro de la placa en la que estaban para medir en ellos la cantidad de radiactividad. En el caso de los adultos jóvenes también se midió a los 21 días del tratamiento.

En el caso del halofenocida en total se trataron 30 parejas. Al cabo de distintos tiempos (1, 3, 7, 14 y 21 días), seis parejas así como sus heces, los restos de alimentos y el papel de filtro de la placa en la que estaban eran separados y congelados para medir en ellos la cantidad de radiactividad.

Los individuos se congelaban y mantenían a -20°C hasta el momento de ser analizados.

### 6.1.8.2. Penetración y excreción de la radiactividad

Para estimar la cantidad de compuesto marcado radiactivamente que había penetrado en el interior del cuerpo así como la tasa de penetración, cada muestra, formada por dos ejemplares adultos del mismo sexo, se lavó dos veces en 1 ml de acetona durante 10 minutos en viales de centelleo.

En un ensayo preliminar se comprobó que la eficacia de recuperación tras estos dos lavados alcanzaba un valor del 92% de la radiactividad aplicada. La acetona de los lavados se concentró a temperatura ambiente en viales de centelleo hasta su completa evaporación. Posteriormente se añadieron 10 ml de "cocktail" de centelleo (Luma Safe Plus, Lumac, Bélgica), y se determinó la cantidad de radiactividad en un contador líquido de centelleo.

Para medir la retención y excreción del hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] en cada intervalo de tiempo, las heces, el papel de filtro y los restos de alimentos de cada una de las seis muestras (dos adultos del mismo sexo por muestra en el caso del hexaflumurón y una pareja por muestra en el caso del halofenocida) fueron incinerados en un BMO. Los gases originados en la combustión (que incluye el dióxido de C<sup>14</sup>) fueron recogidos en 8 ml de Carbosorb I y 9 ml de Carboluma (Lumac, Bélgica) (SMAGGHE y DEGHEELE, 1994b), y la radiactividad fue medida en un contador líquido de centelleo. Se ha expresado la cantidad de radiactividad medida como un porcentaje de la radiactividad total recuperada en cada muestra. Los datos son la media ( $\pm$  D.S.) de dos repeticiones de dos adultos cada una (para el hexaflumurón) y de tres repeticiones de dos adultos cada una (para el halofenocida). Los datos se ajustaron a una función logarítmica, y la calidad del ajuste se evaluó con el coeficiente de correlación R<sup>2</sup>.

### 6.1.8.3. Acumulación de la radiactividad en el cuerpo

La distribución del C<sup>14</sup> en el interior del cuerpo en cada intervalo de tiempo se determinó mediante la disección de los adultos tratados para separar el tegumento (incluyendo cabeza + cutícula + músculos + cuerpo graso peritoneal asociado), el tubo

digestivo (incluyendo contenido + cuerpo graso visceral + túbulos de Malpighi) y el aparato reproductor. Las placas que contenían hembras así como las hojas de remolacha en su interior se examinaban cuidadosamente para separar los huevos puestos. Cada parte del cuerpo fue diseccionada en un pocillo de vidrio recubierto de cera en el fondo y lavada en medio de disección Grace (Sigma Co., Bornem, Bélgica), para posteriormente ser incineradas en un BMO por separado, siguiendo el procedimiento anterior. Los datos son resultado de dos réplicas de dos individuos cada una (para el hexaflumurón) y de tres réplicas de dos individuos cada una (para el halofenocida). Los huevos que cada pareja había puesto también fueron incinerados para conocer el porcentaje de  $C^{14}$  que les llegaba.

## 6.2. EFECTOS DEL HEXAFLUMURÓN

### 6.2.1. INTRODUCCIÓN

Las benzoilfenilureas (BPU) inhiben la síntesis de quitina de las larvas de los insectos, interfiriendo en la formación o en la disposición (o en ambos procesos) de la quitina de la cutícula, y malogrando así el desarrollo de la muda. Este grupo de compuestos actúan principalmente como larvicidas y ovicidas (RETNAKARAN y WRIGHT, 1987). Al entrar en contacto con larvas en sus diversos estadios de desarrollo, interfiere tanto en el proceso de muda como en la normal formación de diversos órganos en los que interviene la quitina, tales como las mandíbulas. Además, se ha observado también la inhibición de la eclosión de los huevos puestos por hembras tratadas con distintas BPU, incluyéndose insectos de distintos órdenes entre los que se encuentran los coleópteros (ASCHER *et al.*, 1986; MALINOWSKI y PAWINSKA, 1992; HAYNES y SMITH, 1993; SOLTANI *et al.*, 1993, 1996).

Diversos estudios han demostrado que la alta efectividad de las BPU sobre determinadas plagas no afecta apreciablemente a otros artrópodos no perjudiciales (GRANETT, 1987; ISHAAYA, 1990), y ensayos con diflubenzurón y triflumurón mostraron que los insectos depredadores, ácaros, algunos parasitoides y abejas eran más tolerantes

a estos compuestos que la plaga que se quería combatir (RETNAKARAN y WRIGHT, 1987). Este hecho, unido a su baja toxicidad frente a mamíferos, hacen de estos compuestos buenos candidatos para ser incluidos en programas de control integrado.

La búsqueda de nuevas acilureas ha llevado al descubrimiento de diversos compuestos entre los que se encuentra el hexaflumurón. El hexaflumurón ha resultado ser bastante más potente que el diflubenzurón sobre diversas plagas agrícolas (ISHAAYA, 1990). Actúa primariamente como larvicida por ingestión, aunque también se ha observado que posee actividad por contacto y ovicida (KOMBLAS y HUNTER, 1986; HOROWITZ *et al.*, 1992), así como efectos sobre la fecundidad y la fertilidad en distintas especies (ASCHER *et al.*, 1986; HOROWITZ *et al.*, 1992; MARCO y VIÑUELA, 1994).

En la actualidad en España se emplea para el control de numerosas especies de lepidópteros que atacan a especies forestales y frutales, y también contra algunas especies de homópteros y coleópteros. Por otra parte, se han obtenido resultados prometedores en ensayo llevados a cabo en campos de remolacha azucarera contra *A. mariae-franciscae* (AIMCRA, 1998), aunque aún no ha sido registrado para esta especie.

Los objetivos que persigue este estudio son los siguientes:

- 1) Estudiar los efectos del hexaflumurón sobre la fecundidad, fertilidad y desarrollo de la progenie mediante tratamiento tópico o foliar en adultos de *A. mariae-franciscae*.
- 2) Detectar el sexo transmisor del hexaflumurón a la progenie.
- 3) Ensayar la actividad por contacto del hexaflumurón sobre huevos de distintas edades.
- 4) Analizar los efectos del hexaflumurón en la ultraestructura del tegumento del embrión.
- 5) Estudiar la farmacocinética del hexaflumurón en adultos de *A. mariae-franciscae*.

## 6.2.2. RESULTADOS

### 6.2.2.1. Efectos sobre la reproducción y el desarrollo de la progenie

No se encontraron diferencias significativas entre la fecundidad de las hembras tratadas al comienzo de la oviposición (F-0) de forma tópica o foliar y la de las hembras testigo (F = 0,63; P > 0,05), y resultados similares se obtuvieron con los dos tratamientos en la previposición (F-50) y los testigos (F = 1,73; P > 0,05).

En los testigos el porcentaje de huevos que eclosionaron fue siempre superior al 90% a lo largo de todo el periodo de oviposición (Figura 6.1). Cuando las parejas eran tratadas tópicamente con hexaflumurón con anterioridad al comienzo de la oviposición (F-50), el porcentaje de eclosión de los huevos puestos se redujo a un 17,4% durante la primera semana de oviposición, y la inhibición de la eclosión fue completa durante las 16 semanas siguientes. Al microscopio estereoscópico era posible observar que las larvas estaban completamente desarrolladas, e incluso se podían mover en el interior del huevo, pero eran incapaces de eclosionar. El porcentaje de eclosión se fue recuperando progresivamente y en la semana 21 de oviposición se igualó con el de los testigos (Figura 6.1 A). Cuando la aplicación tópica se llevó a cabo nada más comenzar la oviposición el porcentaje de eclosión durante la primera semana fue algo más alto (25%), y se inhibió totalmente a partir de la segunda semana como había ocurrido anteriormente, si bien en este caso duró sólo siete semanas. Las dos semanas siguientes el porcentaje se mantuvo por debajo del 10%, para incrementarse luego rápidamente hasta igualar los valores de los testigos en la semana 11 del comienzo de la oviposición.

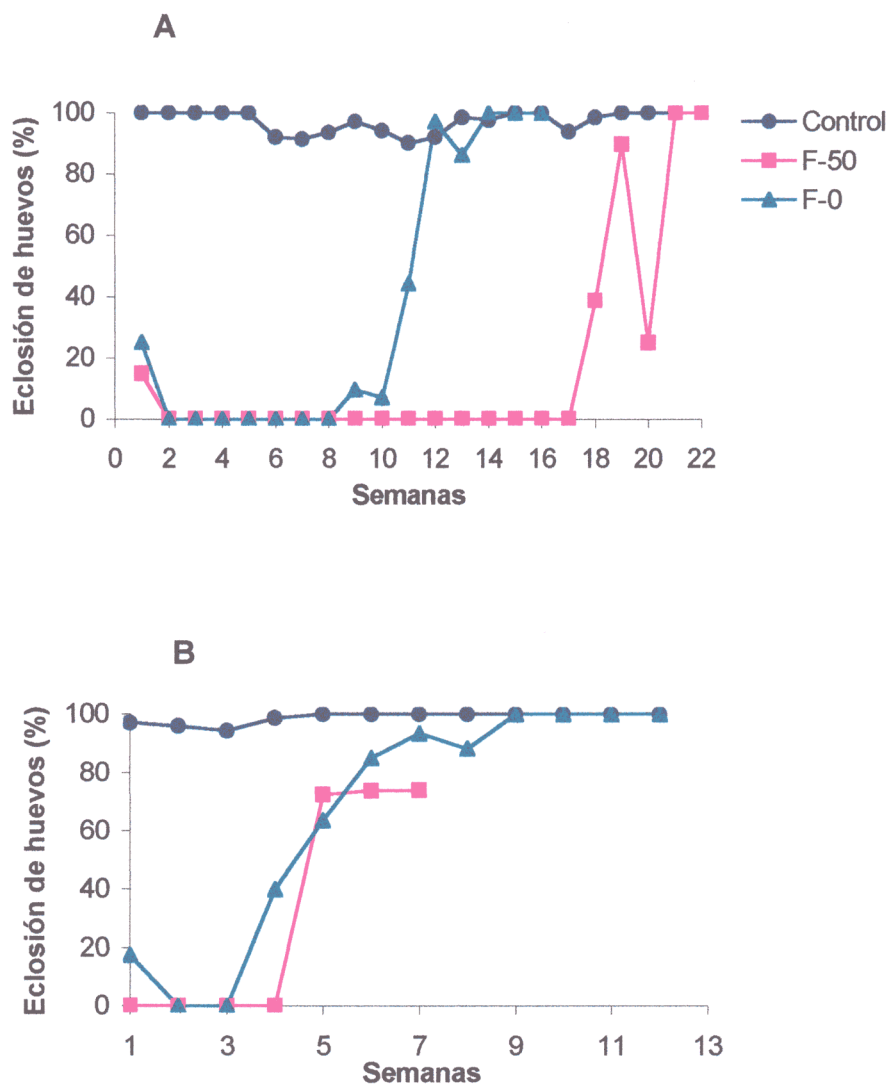


Figura 6.1. Porcentaje de eclosión de huevos de parejas de *A. mariaefrancisca* tratadas con hexaflumurón mediante aplicación tópica (A) o foliar (B)

Cuando se alimentó durante una semana con hojas de remolacha tratadas a los adultos de *A. mariaefranciscae* con anterioridad al comienzo de la oviposición (F-50) y luego se les pasó a hojas sin tratar, la eclosión se inhibió por completo durante las primeras cuatro semanas de oviposición. Posteriormente el porcentaje de eclosión fue incrementándose, aunque nunca llegó a alcanzar el 70% (Figura 6.1.B). En este tratamiento igualmente aplicado a adultos que habían comenzado su periodo de oviposición (F-0) se produjo un porcentaje de eclosión del 20% durante la primera semana, aunque en las dos semanas siguientes la inhibición fue del 100%, pero después fue aumentando gradualmente hasta  $\approx 70\%$  en la quinta semana y alcanzó niveles similares a los testigos en la sexta semana de oviposición.

Cuando solamente se trataron tópicamente los machos de *A. mariaefranciscae* y luego se aparearon con hembras adultas no tratadas, los porcentajes de eclosión de los huevos fueron iguales a los de las parejas testigo (Figura 6.2). Por el contrario, al aparearse hembras tratadas con machos sin tratar el porcentaje de eclosión fue  $\approx 40\%$  en la primera semana de oviposición y después se inhibió por completo hasta la quinta semana. Después se fue recuperando gradualmente hasta igualar los valores de los testigos en la octava semana (Figura 6.2). Ésto es lo que sucede también al tratar tópicamente a ambos sexos, aunque el periodo en que la eclosión de los huevos se halla completamente inhibido es más largo.

La supervivencia de la generación de larvas originadas a partir de adultos tratados con hexaflumurón de forma tópica o foliar se redujo considerablemente (Figura 6.3). En el caso de los testigos, el 75% de las larvas neonatas llegaron a adultos. Sin embargo, sólo un 6% de las larvas de primer estadio originadas a partir de parejas tratadas tópicamente sobrevivió, y ninguna de ellas pasó del tercer estadio larvario. Cuando las parejas estaban expuestas a aplicaciones foliares, sobrevivió el 40% de las larvas de primer estadio, la supervivencia disminuyó en el cuarto estadio al 16%, pupando este porcentaje se mantuvo constante hasta el tercer estadio, para alcanzar en el cuarto un valor del 16%. Sólo el 4% de las larvas iniciales consiguió alcanzar el estado adulto.

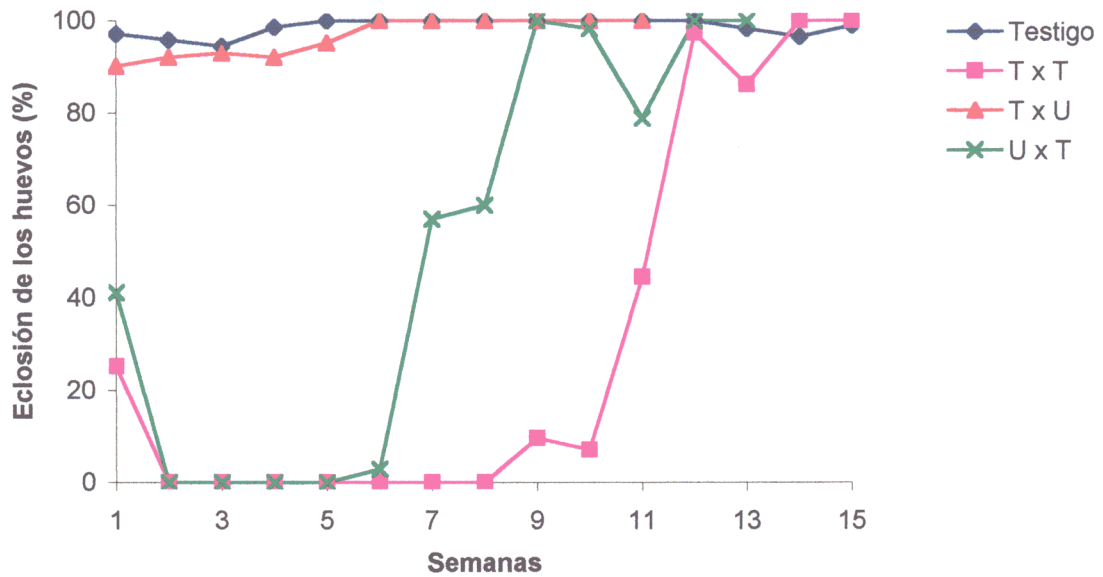


Figura 6.2. Porcentaje de eclosión de huevos de *A. mariaefranciscae* durante el periodo de oviposición, en cuatro tipos distintos de cruzamientos de adultos tratados (T) y no tratados (U) (la primera letra corresponde al macho). Los adultos fueron tratados en la semana siguiente al comienzo de la oviposición

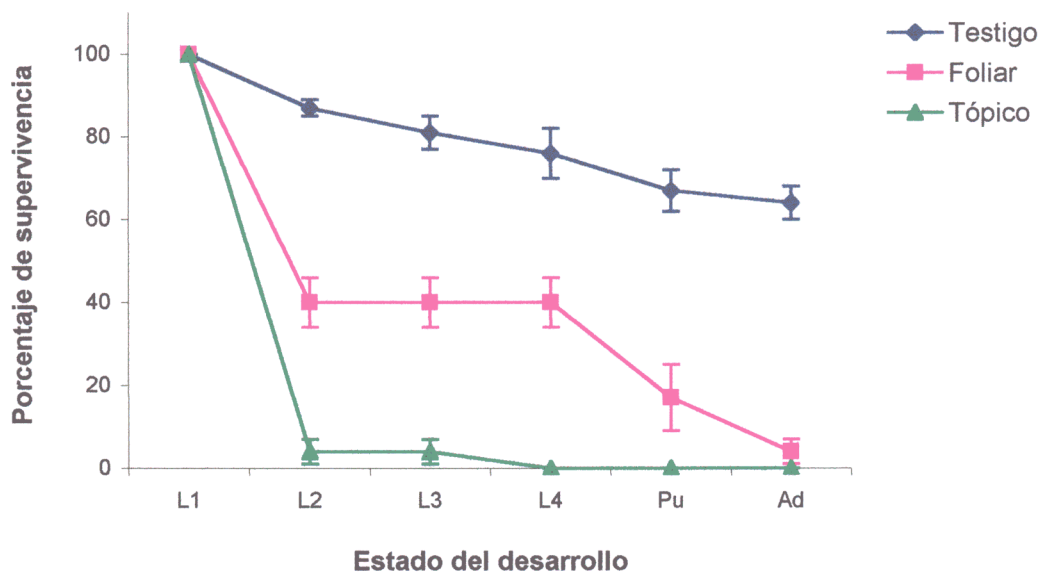


Figura 6.3. Porcentaje de supervivencia de la primera generación de larvas de *A. mariaefranciscae* procedentes de adultos tratados con hexaflumurón

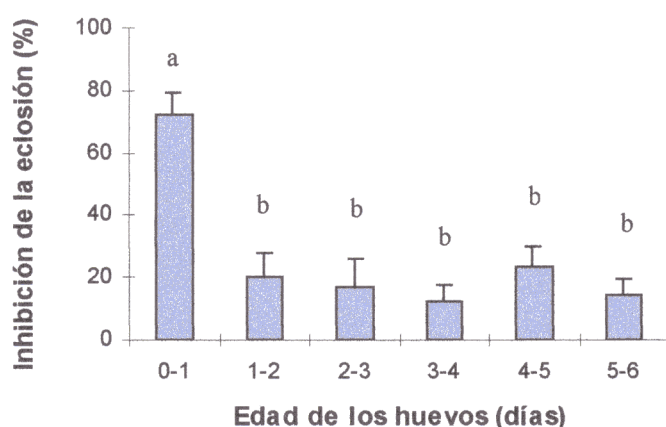
### 6.2.2.2. Efecto ovicida por contacto

Los valores de concentración letal  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  que se obtuvieron para los huevos de *A. mariaefranciscae* de menos de 24 horas tratados con hexaflumurón fueron 16,1 y 31,0  $\mu\text{g IA/ml}$ , respectivamente (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1. Valores de concentración letal ( $\mu\text{g AI / ml}$ ) y pendiente probit del hexaflumurón sobre huevos de *A. mariaefranciscae* de menos de 24 horas.**

Nº de huevos	$CL_{50}$ (95% IC) <sup>a</sup>	$CL_{90}$ (95% IC) <sup>a</sup>	Pendiente probit $\pm$ E.S.	Ordenada en el origen $\pm$ E.S.
300	16,1 (13,6-18,4)	31,0 (26,0-41,7)	4,5 $\pm$ 0,7	-0,4 $\pm$ 0,1

Cuando se compararon porcentajes de inhibición de eclosión de huevos de diferentes edades sobre papel de filtro impregnado con 20  $\mu\text{g IA/ml}$  de hexaflumurón, se pudo comprobar que en los huevos de 24 horas de edad había una fuerte inhibición de la eclosión superior al 70%, significativamente mayor que la experimentada por huevos de mayor edad (de uno a seis días), los cuales sólo sufrían una inhibición de  $\approx$  20%, no existiendo entre ellos diferencias significativas (Figura 6.4).



**Figura 6.4. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de *A. mariaefranciscae* expuestos a papel de filtro tratado con hexaflumurón.**

Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

### 6.2.2.3. Efectos en la ultraestructura del tegumento del embrión

Visto al microscopio electrónico, el tegumento de un embrión control de *A. mariaefranciscae* consta de una fina epicutícula densa a los electrones, seguida de una ancha procutícula y una capa de células epiteliales que se hallan separadas del hemocele por una fina membrana basal. La procutícula es claramente lamelada, conforme a la organización general de las cutículas que contienen quitina (FILSHIE, 1982). La epidermis está organizada en una sola capa de células, y en su borde apical, en contacto con la procutícula se revelan los microvilli, que aumentan considerablemente la superficie de la membrana plasmática, con las típicas placas de la membrana plasmática en sus extremos (Figuras 6.5 y 6.6), que indican la secreción de la cutícula lamelada de los insectos (LEOPOLD *et al.*, 1985). De acuerdo con BINNINGTON (1993), se podían distinguir tres capas en la epicutícula: La epicutícula interna, la epicutícula externa y la capa superficial. Como cabía esperar, la epicutícula y la procutícula presentaban una densidad a los electrones muy homogénea, y las tres capas (epicutícula, procutícula y epidermis) eran paralelas y se mostraban uniformes en cuanto a espesor y estructura (Figuras 6.5 y 6.6).

El tratamiento con hexaflumurón dio lugar a síntomas claros de desorganización de la ultraestructura del tegumento. La procutícula aparecía con espacios vacíos y cuerpos densos a los electrones (Figuras 6.7 y 6.8), dando a la cutícula una apariencia heterogénea. Tanto la endo- como la exocutícula carecían por completo de una estructura clara, y no se encontró la típica organización lamelada, dando lugar a una estructura amorfa. En los microvilli se apreciaban placas de la membrana plasmática pequeñas e irregulares (Figura 6.8). El espesor total de la procutícula de los embriones testigo fluctuó entre 1,5 y 1,9  $\mu\text{m}$ , y en los embriones tratados el hexaflumurón sólo lo redujo ligeramente. La epicutícula de los embriones tratados también manifestó anomalías debidas al hexaflumurón (Figura 6.7), que derivaron en una falta de uniformidad del espesor de su capa más ancha y más clara, que se corresponde con la capa interna, formada por proteínas.

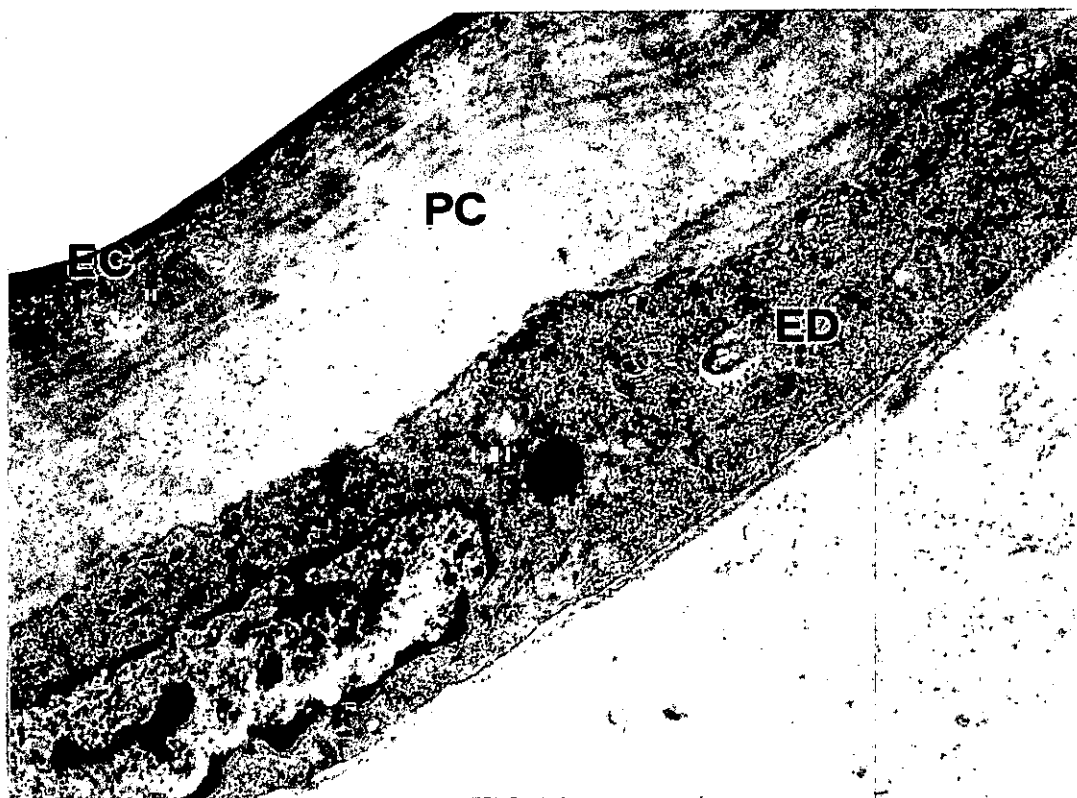


Figura 6.5. Aspecto general que presenta el tegumento de un embrión testigo de *A. mariaefrancisciae*. La procutícula (PC) está claramente lamelada. La epicutícula (EC) y la procutícula presentan un espesor uniforme. La epidermis (ED) está constituida por una capa de células, y está separada del hemocele por una fina membrana basal (MB)

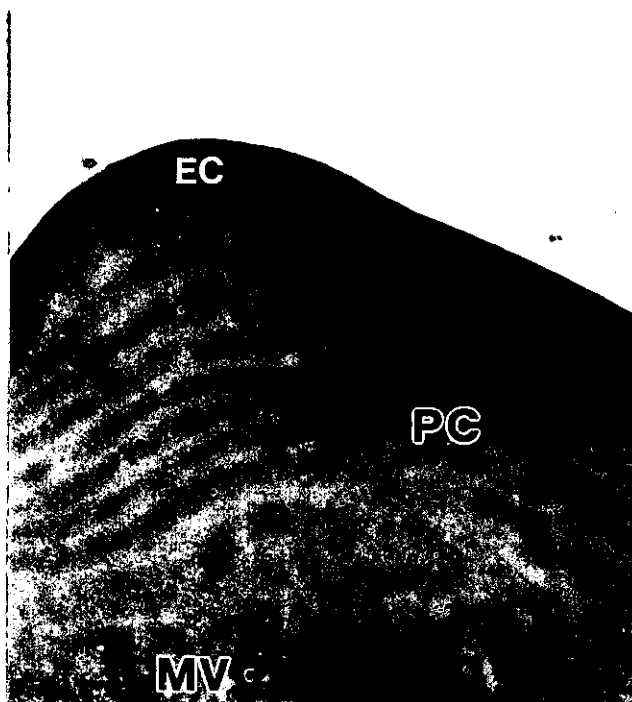


Figura 6.6. Epicutícula (EC) y procutícula (PC) de un embrión testigo. La procutícula está claramente lamelada. Los microvilli (MV) del borde apical de las células de la epidermis presentan placas densas y regulares en su extremo (flecha)

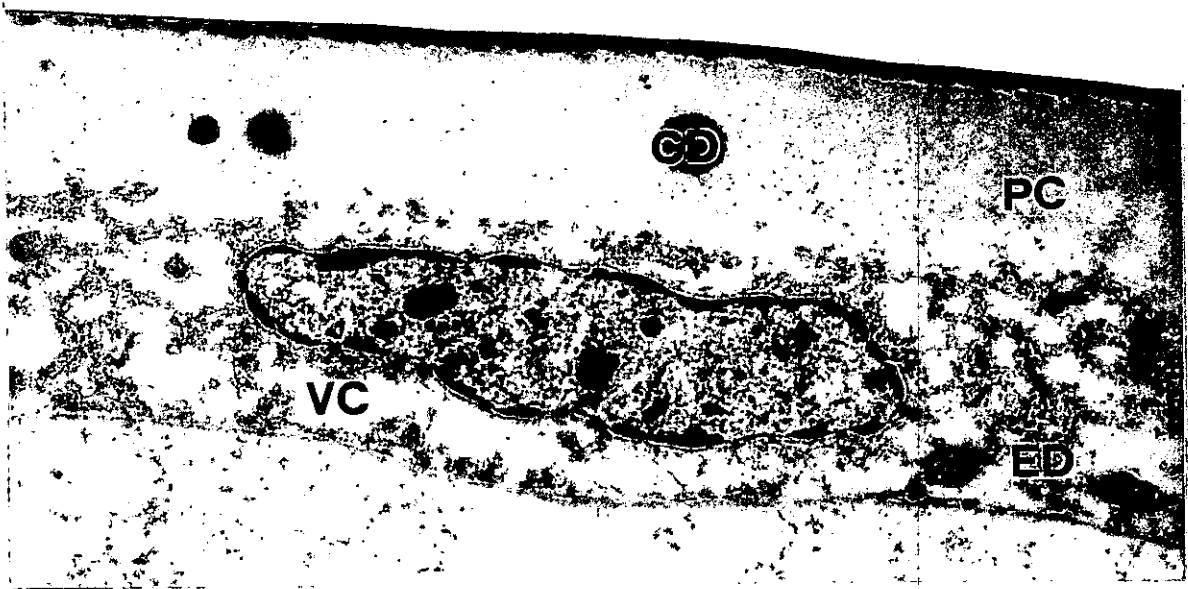


Figura 6.7. Aspecto general que presenta el tegumento de un embrión de *A. mariae franciscae* procedente de adultos tratados tópicamente con hexaflumurón. La procutícula (PC) muestra cuerpos densos a los electrones (CD) y ausencia de lamelas. La epidermis (ED) muestra extensas zonas vacuoladas (VC). La epicutícula (EC) presenta un grosor irregular

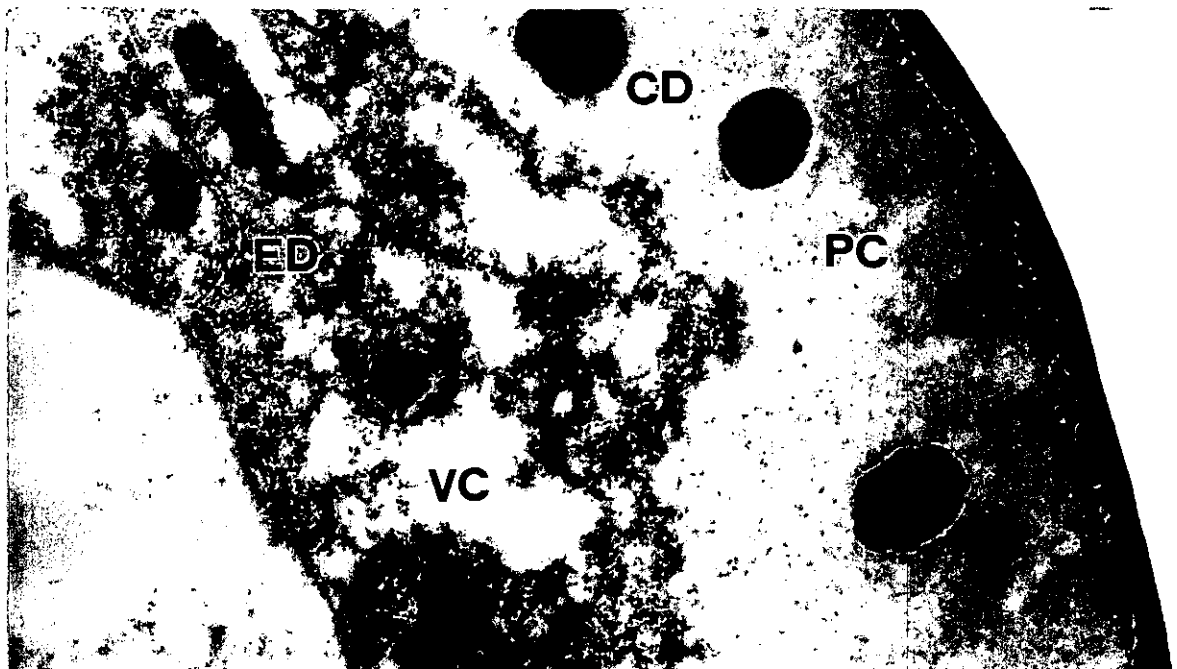


Figura 6.8. Detalle del tegumento de un embrión procedente de adultos tratados con hexaflumurón. Aparecen expansiones del citoplasma (flecha) desde la epidermis (ED) hacia la procutícula (PC). El perfil de los microvilli (MV) es irregular y la densidad de las placas en su extremo se ha reducido. La epicutícula (EC) muestra un grosor irregular

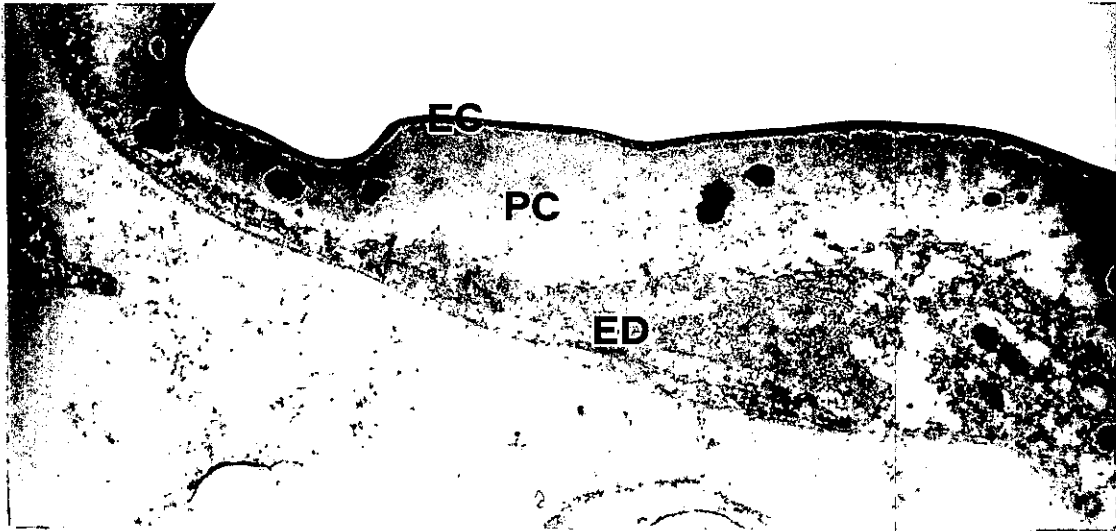


Figura 6.9. Tegumento de un embrión de *A. mariaefranciscae* procedente de adultos tratados tópicamente con hexaflumurón. La epicutícula (EC), procutícula (PC) y epidermis (ED) muestran un espesor irregular.

Por último, el estudio reveló irregularidades en la epidermis de las secciones de embriones tratados. Al igual que en el resto del tegumento, el espesor de esta capa no era uniforme (Figura 6.9). Los microvilli apicales de las células epidérmicas eran irregulares, en el citoplasma aparecieron numerosos espacios vacuolados y se apreciaban claros síntomas de degeneración celular. También se apreciaron proyecciones del citoplasma hacia la procutícula (Figura 6.8).

#### 6.1.2.4. Farmacocinética del hexaflumurón en *A. mariaefranciscae*

La curva que representa la tasa de penetración del hexaflumurón- $[C^{14}]$  a través del tegumento siguió un perfil logarítmico similar tanto en machos como en hembras de los adultos jóvenes y viejos. (Figuras 6.10 A y B). El insecticida marcado se absorbió

#### 6.2.2.4. Farmacocinética del hexaflumurón en *A. mariae franciscae*

La curva que representa la tasa de penetración del hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] a través del tegumento siguió un perfil logarítmico similar tanto en machos como en hembras de los adultos jóvenes y viejos. (Figuras 6.10 A y B). El insecticida marcado se absorbió más rápidamente durante los tres primeros días de los adultos jóvenes, machos y hembras; luego la pendiente decreció, indicando que la tasa de penetración estaba disminuyendo y por tanto alcanzando una concentración máxima. Dos semanas después del tratamiento el 80% y el 73% de la cantidad de C<sup>14</sup> aplicada había penetrado en hembras y machos jóvenes, respectivamente, y el 75% y 70% en hembras y machos viejos. El ajuste de los datos a una curva logarítmica fue bueno tanto para los adultos jóvenes (hembras:  $R^2 = 0,99$ ; machos:  $R^2 = 0,98$ ) como para los viejos (hembras:  $R^2 = 0,89$ ; machos:  $R^2 = 0,96$ ). La comparación de las tasas de penetración del hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] (dy/dx) en adultos de ambas edades demostró que el insecticida se absorbía con más rapidez en los adultos viejos (Figura 6.10 A y B).

Igualmente, encontramos patrones similares en las distintas edades fisiológicas, por lo que se estimó un único modelo de absorción del hexaflumurón. Agrupando los datos de adultos jóvenes y viejos resultó un ajuste logarítmico altamente significativo ( $R^2 = 0,99$ ) para machos y hembras (Fig. 6.10 C).

El 50% de la radiactividad aplicada tópicamente había pasado al interior del cuerpo después de 3,2 días en las hembras, mientras que en machos este porcentaje de penetración se alcanzó después de 5,2 días (Figura 6.10 C) siendo, por tanto, la penetración 1,6 veces más rápida en hembras que en machos. En todos los distintos intervalos de tiempo estudiados la cantidad de hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] en el interior del cuerpo fue mayor en hembras que en machos. Dos semanas después del tratamiento el 77% de la radiactividad aplicada se hallaba en el interior del cuerpo de las hembras, y el 72% en machos.

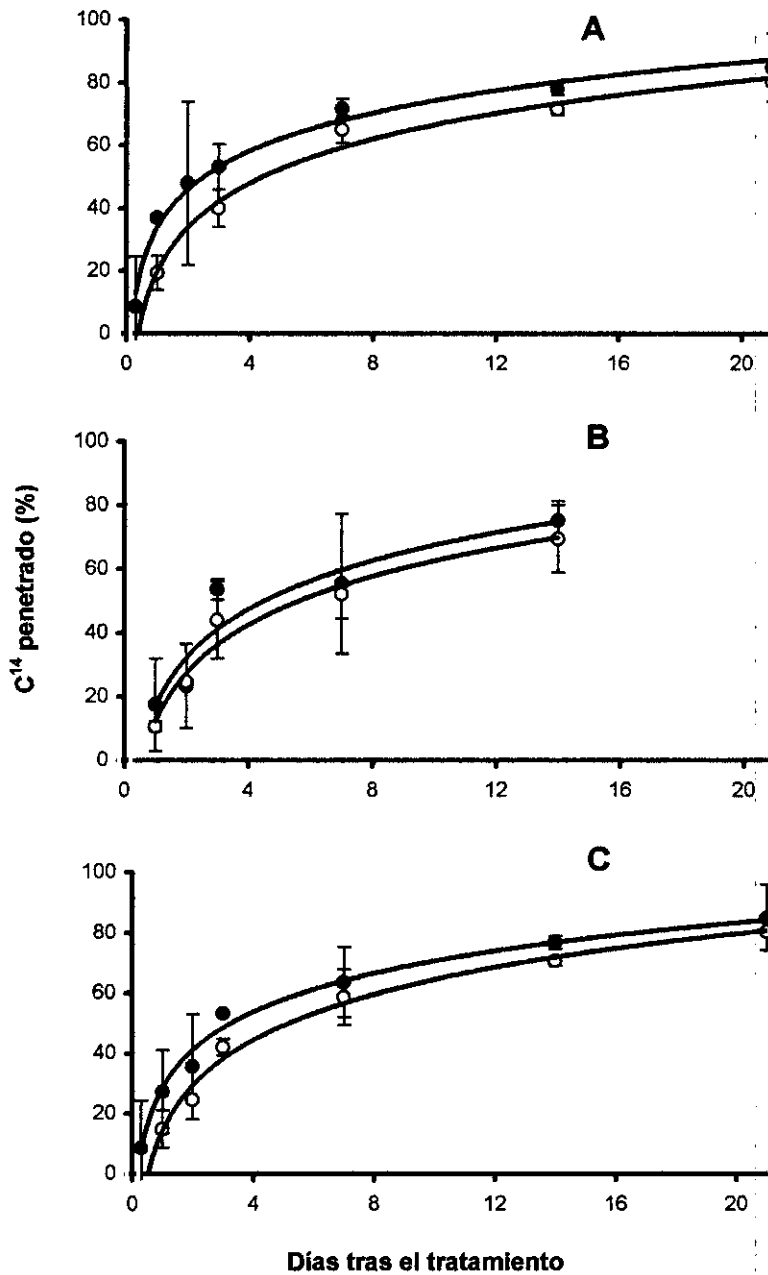


Figura 6.10. Porcentaje (media  $\pm$  D.S.) del hexafluorón-  $C^{14}$  aplicado sobre machos ( $\circ$ ) y hembras ( $\bullet$ ) adultos jóvenes (A) y viejos (B) de *A. mariaefrancisca* y del total (C), absorbido a través de la cutícula en distintos intervalos de tiempo. Las curvas representan el ajuste a una función logarítmica.

De la misma forma, los perfiles de las curvas de excreción del hexaflururón-[C<sup>14</sup>] de machos y hembras de adultos jóvenes y viejos mostraron un perfil similar (Figuras 6.11 A y B). Tanto los machos jóvenes como los viejos habían excretado aproximadamente la misma cantidad de radiactividad dos semanas después del tratamiento tópico: 41% y 45%, respectivamente. Sin embargo en las hembras el porcentaje de C<sup>14</sup> excretado varió en función de su edad. En las jóvenes el 50% del producto se había excretado a los 4,8 días, mientras que en las viejas este porcentaje no se alcanzó hasta los 8,9 días. Dos semanas tras la aplicación del hexaflururón-[C<sup>14</sup>] el 66% y 55% de la radiactividad aplicada se había excretado en las hembras jóvenes y viejas, respectivamente. Estos valores se calcularon con las curvas estimadas, cuyos ajustes fueron de 0,9 en hembras jóvenes y 0,8 en viejas.

Se realizó un modelo único de tasa de excreción para hembras y machos (Figura 6.11 C). El ajuste a una función logarítmica fue bueno tanto para hembras ( $R^2 = 0,91$ ) como para machos ( $R^2 = 0,94$ ). Según este modelo dos semanas después del tratamiento con hexaflururón-[C<sup>14</sup>] las hembras habían excretado 1,5 veces más radiactividad que los machos (60% y 41%, respectivamente).

El nivel de radiactividad en el cuerpo de *A. mariaefranciscæ* se mantuvo en los tejidos durante al menos dos semanas tras la aplicación del hexaflururón-[C<sup>14</sup>] (Figura 6.12). Un alto porcentaje de la radiactividad recuperada en los adultos viejos de ambos sexos estaba en el tegumento (Figuras 6.12 C y D). Después de un día las hembras habían retenido un 82% y los machos un 76%. Esta cantidad permaneció prácticamente constante en el tegumento de las hembras durante todo el experimento, mientras que en los machos el nivel decreció a lo largo del tiempo. Tras dos semanas el tegumento de hembras y machos había acumulado, respectivamente, el 74% y 60% de la radiactividad aplicada. Por el contrario, los porcentajes de C<sup>14</sup> recuperados en el tegumento de los adultos jóvenes fueron menores (Figuras 6.12 A y B). En las hembras el porcentaje se redujo levemente desde el 64% (días 1 y 2) hasta el 40% que se alcanzó dos semanas después del tratamiento. Este último valor se corresponde con la mitad de lo que se había recuperado en hembras viejas en el mismo intervalo de tiempo. En los machos jóvenes los porcentajes de radiactividad recuperados oscilaron entre el 73% y el 57%.

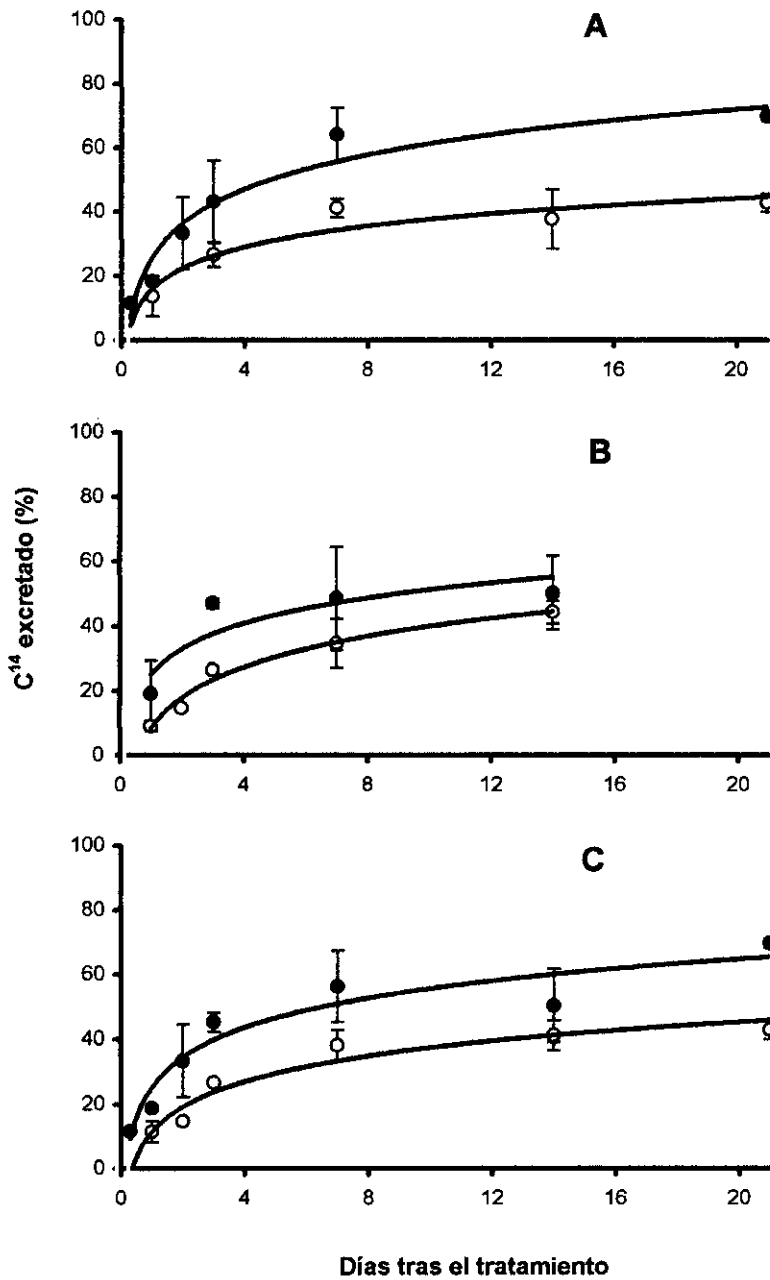


Figura 6.11. Porcentaje (media  $\pm$  D.S.) del hexaflurón-  $C^{14}$  aplicado sobre machos ( $\circ$ ) y hembras ( $\bullet$ ) adultos jóvenes (A) y viejos (B) de *A. mariaefrancisca* y del total (C), recuperado en las heces y papel de filtro en distintos intervalos de tiempo. Las curvas representan el ajuste a una función logarítmica.

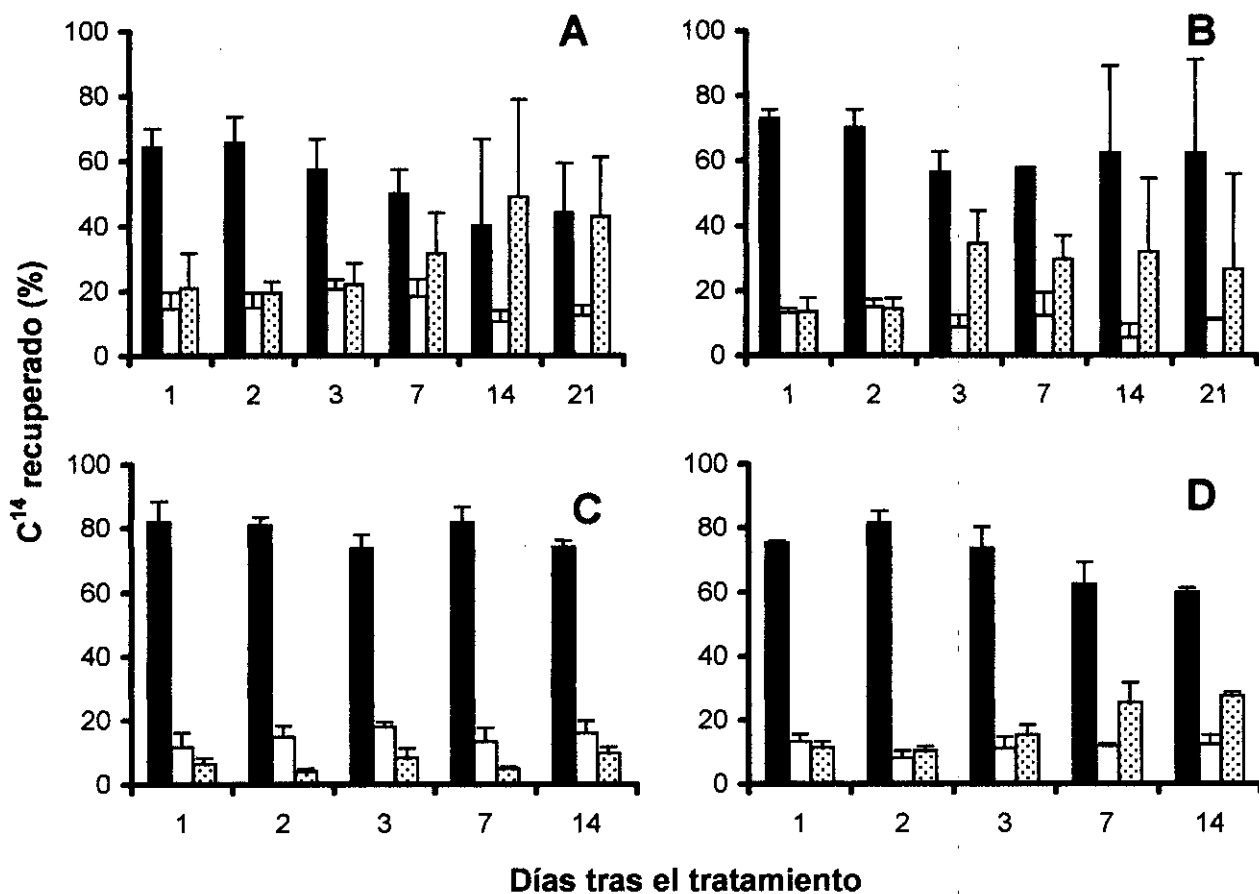


Figura 6.12. Porcentaje (media  $\pm$  D.S.) del hexaflumurón-<sup>14</sup>C aplicado recuperado en el tegumento (■), tubo digestivo (□) y aparato reproductor (▨), en diferentes intervalos de tiempo. A, hembra jóvenes (incluyendo los huevos puestos); B, machos jóvenes; C, hembras viejas; D, machos viejos. En todos los casos, los datos referentes a la misma parte del cuerpo en cada uno de los 4 gráficos no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ )

Los niveles de  $C^{14}$  recuperados en el tubo digestivo fueron bajos independientemente del sexo y la edad fisiológica de los insectos. Los valores fluctuaron entre 11% y 20% desde el principio hasta el final del experimento.

Con respecto a la acumulación del  $C^{14}$  en el aparato reproductor, se detectaron patrones notablemente distintos dependiendo de la edad y del sexo de los adultos de *A. mariaefranciscæ* (Figura 6.12). La radiactividad fue absorbida en las hembras jóvenes en mayor medida que en las viejas. Sólo un día después del tratamiento las hembras jóvenes habían acumulado tres veces más radiactividad (27%) en su aparato reproductor (ovarios y huevos) que las viejas (7%), y estas diferencias se vieron acentuadas con el tiempo. Tras dos semanas desde la aplicación tópica cerca del 50% del hexaflumurón- $[C^{14}]$  aplicado en hembras jóvenes se encontraba sus ovarios y los huevos puestos, mientras que en el mismo intervalo de tiempo las viejas sólo habían acumulado un 9,7% en su aparato reproductor. Asimismo, se detectaron niveles de radiactividad claramente distintos en las gónadas de los machos en función de la edad, aunque las diferencias no eran tan evidentes como en las hembras. Dos días después del tratamiento los porcentajes eran similares, pero el tercer día el porcentaje en los jóvenes aumentó hasta el 35%, más del doble que los viejos (15%), y ese nivel se mantuvo casi constante hasta el final del experimento. En los machos viejos el nivel de  $C^{14}$  fue aumentando gradualmente, y al cabo de dos semanas los porcentajes de ambos grupos de edades se igualaron, acumulando aproximadamente la misma cantidad de radiactividad.

Los resultados obtenidos reflejan que el porcentaje de  $C^{14}$  aplicado que se llegó a incorporar a los huevos puestos tanto por las hembras jóvenes como por las viejas fue muy bajo durante los primeros tres días, pero aumentó progresivamente a lo largo del tiempo (Figura 6.13). La cantidad de radiactividad recuperada en los huevos osciló entre  $12,0 \pm 4,8$  y  $46,9 \pm 3,9$  cpm por huevo entre los días 2 y 14 desde que los adultos fueron tratados tópicamente, lo cual representa unos porcentajes entre 0,03% y 0,13%, respectivamente, de la cantidad aplicada. La cantidad más alta recuperada en un solo huevo (46,9 cpm) equivale a 2,3 pM de hexaflumurón acumulados.

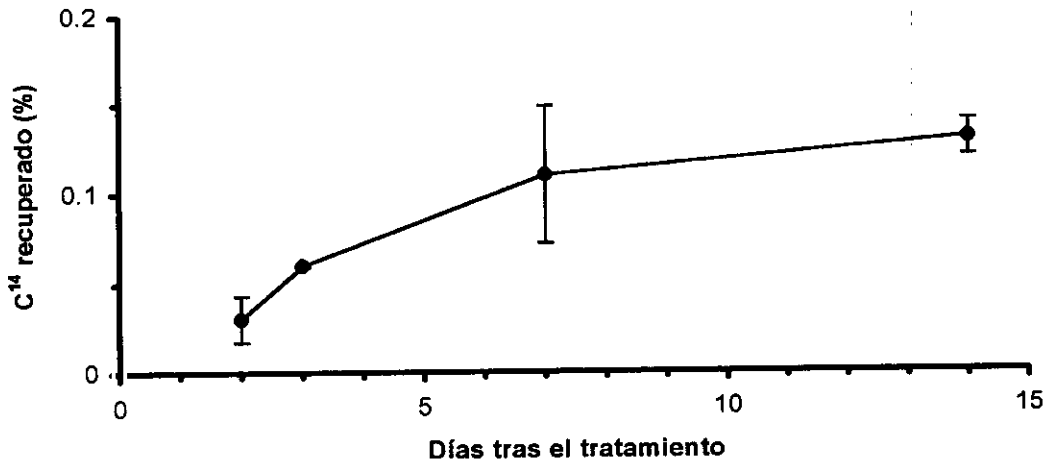


Figura 6.13. Porcentaje (media  $\pm$  D.S.) del hexaflururón- C<sup>14</sup> aplicado recuperado en los huevos de *A. mariaefranciscae* en diferentes intervalos de tiempo

### 6.2.3. DISCUSIÓN

#### 6.2.3.1. Efectos sobre la reproducción y el desarrollo de la progenie

Con este estudio se ha demostrado que una sola aplicación tópica o foliar de hexaflururón sobre adultos de *A. mariaefranciscae* ocasiona un prolongado periodo de inhibición de la eclosión de los huevos puestos. Tanto el método de aplicación del insecticida como el estado fisiológico reproductor en que se encuentran los adultos y el sexo que era tratado fueron factores determinantes en la duración de este periodo. En todos los casos la inhibición de la eclosión fue mayor cuando el insecticida era aplicado tópicamente que cuando la aplicación era foliar. Cuando se trataron los dos sexos con anterioridad al comienzo del periodo de oviposición (F-50) la inhibición de la eclosión fue más persistente que cuando los adultos eran tratados en la primera semana de este periodo. Por último, parece que el hexaflururón se transmitió a la progenie debido

fundamentalmente al tratamiento de las hembras, aunque los machos también pueden contribuir en cierta medida.

El efecto ovicida de insecticidas a través de los adultos ya ha sido citado para otras especies de insectos. ASCHER *et al.* (1986) indicaron que las hembras de *Carpophilus hemipterus* (L.) (Coleoptera: Nitidulidae) ponían huevos estériles durante los 12-14 días siguientes a su exposición a hexaflumurón durante 24 horas. También se detectó una inhibición de la eclosión de los huevos en la mosca doméstica, *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae) alimentada con una dieta tratada con hexaflumurón (LEONARD *et al.*, 1987) y en *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), después de una prolongada exposición al hexaflumurón (HOROWITZ *et al.*, 1992). Se ha apuntado que este efecto ovicida via adultos es debido a la inhibición de la formación de quitina del embrión, el cual normalmente muere en el interior del corion cuando ya está completamente formado (RETNAKARAN y WRIGHT, 1987).

A la dosis tan baja de hexaflumurón que se aplicó (0,03 µg /adulto), el hecho de tratar a machos y hembras o sólo a uno de los sexos tuvo mucha importancia en el porcentaje de inhibición de la eclosión. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la cantidad de hexaflumurón aplicada no fue suficiente para que sólo los machos fueran capaces de transferir la cantidad necesaria para inhibir la eclosión de los huevos. Por el contrario, cuando ambos sexos eran tratados se observó un efecto sinérgico en la inhibición de la eclosión, con un valor del 56%, mientras que sólo se inhibió un 38% al tratar únicamente a las hembras. Este hecho puede ser debido al incremento de la dosis de hexaflumurón en las hembras transferido a través del macho. MOORE *et al.* (1978) observó que el diflubenzurón se transfería del macho de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) a la hembra más por contacto físico que durante la cópula, si bien los machos tratados apareados con hembras sin tratar eran incapaces de transferir la cantidad suficiente para afectar a la eclosión.

Tanto la aplicación tópica de hexaflumurón como la foliar sobre adultos de *A. mariaefranciscae* en su periodo de oviposición ocasionó una alta mortalidad de las larvas de la siguiente generación. De hecho, todas las larvas descendientes de adultos

tratados tópicamente murieron, y sólo el 4% de las procedentes de tratamientos foliares alcanzaron el estado adulto. En *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se observó un efecto ovicida retrasado en la progenie de adultos tratados con clorfluazurón (VAN LAECKE *et al.*, 1989), y lo mismo sucedió en moscas domésticas tratadas con triflumurón (KNAPP y CILEK, 1988). También se obtuvo una reducción significativa del número de descendientes de hembras del escarabajo de la patata que habían sido alimentadas con hojas de patata tratadas con la acilurea CME-13406 (TUTTLE y FERRO, 1988).

El efecto del hexaflumurón sobre la supresión de la eclosión de los huevos puestos por *A. mariae franciscae* durante un largo intervalo de tiempo, unido al drástico efecto que ha mostrado también este compuesto sobre la supervivencia de la progenie, hace pensar que el hexaflumurón podría ser empleado en un futuro en el control de esta plaga en el sur de España.

#### 6.2.3.2. Efecto ovicida por contacto

Los valores de concentración letal obtenidos para los huevos de *A. mariae franciscae* de menos de 24 horas expuestos a papel de filtro tratado con hexaflumurón indicaron que este producto posee una actividad ovicida muy efectiva para este curculiónido. Esta efectividad ha sido ya comprobada en otras especies, como el escarabajo de la patata, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (MALINOWSKI y PAWINSKA, 1992), y en *E. insulana* (HOROWITZ *et al.*, 1992).

La mortalidad de los huevos de 0-24 horas de edad fue significativamente más alta que la de los huevos de uno a seis días de edad (Figura 6.4). Estos resultados indican que el primer día del huevo es el más sensible al hexaflumurón y el momento crítico para la penetración del hexaflumurón o para la síntesis de quitina. HOYING y RIEDL (1980) y PURCELL y GRANETT (1986) obtuvieron resultados similares con huevos de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) tratados con diflubenzurón y triflumurón, respectivamente.

### 6.2.3.3. Efectos en la ultraestructura del tegumento del embrión

El tratamiento tópico con hexaflumurón sobre adultos de *A. mariaefranciscae* ocasionó importantes anomalías y claros síntomas de desorganización en la ultraestructura del tegumento de los embriones formados. Estos efectos descritos anteriormente se corresponden con los encontrados por GROSSCURT (1978) en embriones de *L. decemlineata* justo antes de la eclosión cuando hembras grávidas habían ingerido previamente hojas de patata tratadas con diflubenzurón. La interferencia de las BPU's con la formación de la cutícula, dando lugar a una ausencia de estructura lamelada en la endocutícula, es un fenómeno que ya se ha señalado en estudios con distintos insectos (SOLTANI *et al.*, 1984; BINNINGTON, 1985). La estructura lamelada refleja una disposición regular de las capas de quitina-proteína de la cutícula. La ausencia de esta estructura característica es el resultado de una disposición anómala, lo cual puede ocasionar puntos más frágiles que podrían causar la fractura del tegumento y posteriormente la muerte del embrión. En la procutícula de los embriones tratados se observaron algunos cuerpos opacos densos a los electrones. HASSAN y CHARNLEY (1987) explicaron este efecto como una acumulación de cadenas cortas de quitina. Las irregularidades observadas en las "placas de la membrana plasmática" de las células epidérmicas de los embriones de *A. mariaefranciscae* fueron igualmente observadas en larvas de *Choristoneura fumiferana* (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae) tratadas con dosis subletales de clorfluazurón (RETNAKARAN *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta ambos resultados, se reforzaría la hipótesis de que la procutícula dañada en los embriones tratados estaría fundamentalmente formada por proteínas, al inhibir el hexaflumurón la síntesis de quitina o bien impedir su correcta deposición en la procutícula.

El espesor de la procutícula de los embriones tratados no se vio apenas afectado con respecto al de los testigos. Este hecho sugiere que la síntesis de proteínas y su incorporación a la cutícula no se han visto afectadas (GROSSCURT, 1978; HASSAN y CHARNLEY, 1987), mientras que la producción de quitina sí ha sido inhibida. A pesar de ello existen estudios (BINNINGTON *et al.*, 1987; DEGHEELE, 1990; SOLTANI *et al.*, 1993)

donde se evidenció una drástica reducción del espesor de la cutícula, explicándose este hecho como una reducción del contenido de proteínas y quitina de la cutícula.

Por otro lado, los daños sufridos por la epicutícula fueron equivalentes a los observados en la cutícula larvaria de *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) cuando las larvas fueron tratadas con diflubenzurón (DEGHEELE, 1990), y en la cutícula de los embriones de *L. decemlineata* a los que el diflubenzurón llegó por vía materna (GROSSCURT, 1978). Estos efectos sugieren que el tratamiento con BPU puede también interferir con la disposición de las proteínas de la cutícula. Igualmente, las anomalías observadas en la epidermis de los embriones tratados (espesor variable, microvilli irregulares, espacios vacuolados y proyecciones del citoplasma hacia la procutícula) son similares a las encontradas en larvas de *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) alimentadas con diflubenzurón (HASSAN y CHARNLEY, 1987).

GROSSCURT (1978) señaló que el efecto ovicida de las BPU aplicadas sobre adultos se debe muy probablemente a la inhibición de la síntesis de quitina del embrión, lo cual produce anomalías en la estructura del tegumento y un debilitamiento general de la cutícula. Al mismo tiempo, las fibras musculares no podrían anclarse firmemente a la cutícula por lo cual el embrión no sería lo suficientemente fuerte para romper el corion y moriría en su interior. Esta hipótesis sería consistente con los datos obtenidos en este estudio en el que parece evidente que la formación de la quitina se ha visto profundamente afectada. Un reciente estudio con el efecto de otra BPU, el lufenurón (WILSON y CRYAN, 1997) sobre *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), y otro sobre el control de *Pissodes strobi* (Peck) (Coleoptera: Curculionidae) con diflubenzurón corroborarían este punto de vista. Por el contrario, nuestros datos no sugieren que haya un efecto sobre el proceso de la vitelogénesis como sucedió en el caso de hembras de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) tratadas tópicamente con diflubenzurón (SOLTANI y SOLTANI-MAZOUNI, 1992).

#### 6.2.3.4. Farmacocinética del hexaflumurón en *A. mariaefranciscæ*

Los patrones coincidentes encontrados para la absorción del hexaflumurón a través del tegumento en adultos jóvenes y viejos sugiere que la penetración de este compuesto es independiente de la edad fisiológica a la que se aplica. Asimismo, los resultados obtenidos indicaron que la absorción era lenta, hecho que ya ha sido descrito para otras BPU (RETNAKARAN *et al.*, 1985) y que parece ser un fenómeno general para este grupo de compuestos. Estudios previos han evidenciado que la toxicidad oral de las BPU es más alta que por contacto o mediante tratamiento tópico, especialmente para el estado larvario (RETNAKARAN *et al.*, 1985; DE CLERQ *et al.*, 1995), o bien existen pocas diferencias entre los métodos de aplicación (CLARKE y JEWESS, 1990; HAYNES y SMITH, 1993). Sólo unas pocas especies, entre ellas *A. mariaefranciscæ* (MARCO *et al.*, 1998a), han resultado ser más susceptibles a las BPU por contacto que con la ingestión de hojas tratadas (ASCHER y NEMNY, 1976; MENDEL *et al.*, 1994). De esta forma, al utilizar la curva del modelo obtenido (Figura 6.10 C), el 29% y 14% del hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] aplicado había penetrado en hembras y machos, respectivamente, después de 1 día (Figuras 6.10 A y B). Sin embargo, estos porcentajes tan bajos fueron suficientes para provocar una fuerte inhibición de los huevos. Estos valores coinciden con los obtenidos por SMAGHEE *et al.* (1997), quienes encontraron que sólo un 15% del diflubenzurón aplicado sobre larvas de *Spodoptera exigua* había penetrado 24 horas después del tratamiento, y un 31% en el caso de *Spodoptera littoralis*, pero a pesar de estas proporciones el compuesto mostró aproximadamente la misma alta toxicidad para las dos especies.

Del mismo modo, los modelos de excreción de radiactividad de machos y hembras jóvenes y viejos (Figura 6.11) evidenciaron que la excreción era muy lenta en todos los casos, si bien en las hembras jóvenes se detectó un porcentaje algo más alto dos semanas después de la aplicación tópica. Utilizando la ecuación del modelo obtenido se puede ver que en las hembras la excreción era más rápida. STILL y LEOPOLD (1978), sin embargo, no encontraron diferencias en la eliminación del diflubenzurón-[C<sup>14</sup>] en machos y hembras adultos de *A. grandis*.

Este estudio ha puesto de manifiesto que la tasa de excreción es baja en comparación con la hallada en otros insectos estudiados anteriormente. GRANETT *et al.* (1980) observaron que el diflubenzurón se excretaba muy rápidamente en dos especies de lepidópteros, *Choristoneura occidentalis* Freeman (Lepidoptera: Tortricidae) y *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough) (Lepidoptera: Limntriidae), las cuales habían eliminado el 50% del compuesto absorbido unas 20 horas después de la ingestión, y un 90% y 86%, respectivamente tras 24 horas. STILL y LEOPOLD (1978) encontraron que el 29% y 8% de la radiactividad aplicada a *A. grandis* mediante inyección de diflubenzurón-[C<sup>14</sup>] había sido excretada 6 y 13 días después del tratamiento, respectivamente. Sin embargo, nuestros datos confirman los obtenidos por AUDA *et al.* (1991), quienes concluyeron que la mayor toxicidad del hexaflumurón detectada en el último estadio larvario de *L. decemlineata* frente a *S. littoralis* y *S. exigua* se debía muy probablemente a la mayor retención del compuesto en el cuerpo. Sólo el 57% del hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] ingerido por el escarabajo se había recuperado en sus heces después de 24 horas, mientras que en el mismo intervalo de tiempo se había recuperado más del 90% en las heces de ambos lepidópteros. Igualmente, en larvas de *S. littoralis* se encontró una tasa muy lenta de excreción de otra BPU, el flufenoxurón, tras su aplicación tópica y oral (CLARKE y JEWESS, 1990). Teniendo en cuenta todos estos resultados obtenidos en estudios previos, se puede concluir que la retención del hexaflumurón y/o sus metabolitos en el cuerpo de los adultos de *A. mariaefrancisciae* es alta en comparación con la de otros insectos plaga, incluyendo distintas especies en las que se había considerado que la retención era alta.

Tras el tratamiento tópico con hexaflumurón-[C<sup>14</sup>], el pronoto se comportó como un reservorio del compuesto, ya que el nivel de radiactividad se mantuvo durante al menos dos semanas en el cuerpo de los adultos. De hecho, el porcentaje de C<sup>14</sup> detectado en este punto fue siempre muy elevado en todos los casos (Figura 6.12). No obstante, se apreciaron diferencias entre las distintas edades, siendo siempre mayor la cantidad relativa de compuesto en los adultos viejos que en los jóvenes.

El hecho contrario ocurrió en el tubo digestivo, donde los bajos porcentajes encontrados a lo largo del experimento en todos los casos sugieren que el tránsito del

compuesto a través de éste es rápido y está en equilibrio con la tasa de acumulación/transporte en el cuerpo, llevando a su eliminación a través de las heces o bien reabsorbiéndose del tubo digestivo a la hemolinfa. VAN LAECKE *et al.* (1988) encontraron en el último estadio larvario de *S. exigua* que tanto el diflubenzurón como el clorfluazurón eran rápidamente transportados a la hemolinfa a través del tubo digestivo cuando las larvas se alimentaban de una dieta artificial tratada con estos compuestos. Para las BPU's se ha detectado que la tasa diferencial de transporte desde el tubo digestivo hasta el punto bioquímico de acción es fundamental para su toxicidad (NEUMAN y GUYER, 1987).

La acumulación del compuesto en el aparato reproductor de *A. mariaefranciscae* muestra patrones notablemente distintos dependiendo de la edad y el sexo de los adultos (Figura 6.12). Parece que los adultos jóvenes retienen una mayor cantidad de hexaflumurón o sus metabolitos en su aparato reproductor que los viejos. La radiactividad recuperada en los machos jóvenes podría ser suficiente para afectar de algún modo a la espermatogénesis, y una parte de lo que incorporan se podría transmitir a la hembra en el proceso de apareamiento, malogrando la fertilización de los huevos. En cuanto a las hembras, hay razones fundadas para presumir que los distintos niveles de  $C^{14}$  encontrados en las gónadas y huevos de las jóvenes frente a los de las viejas vienen dados por la edad fisiológica en que se hallan los ovarios. Los ovarios de las hembras jóvenes se han revelado muy activos en la acumulación de vitelogeninas que captan de la hemolinfa y que son destinadas a la formación de los huevos (NEUMAN y GUYER, 1987). Como resultado, las moléculas de hexaflumurón y/o sus metabolitos podrían haber sido incorporados a los ovarios en el proceso de endocitosis por adsorción.

Aunque la cantidad de radiactividad recuperada en los huevos puestos fue baja, fue suficiente para causar la muerte del embrión. El efecto embriocida observado tras la aplicación tópica con hexaflumurón sobre adultos al comienzo de su periodo de oviposición durante un intervalo de tiempo de más de 6 semanas puede explicarse con la acumulación del hexaflumurón en los huevos observada. Igualmente, IVIE y WRIGHT (1978) demostraron en dos dípteros (*Musca domestica* L. y *Stomoxys calcitrans* (L.)) tratados con diflubenzurón que un porcentaje máximo del 1% del insecticida aplicado

llegaba a los huevos, y este valor era suficiente para provocar efecto ovicida en las dos especies. El tratamiento tópico con diflubenzurón también se ha mostrado efectivo al tratar adultos de *A. grandis*; el compuesto en este caso se incorporaba a los ovarios y a los huevos, ocasionando la muerte de estos últimos. Esta efectividad en su actividad ovicida fue también evidente en ensayos de campo para la misma especie (GANYARD *et al.*, 1977; MITCHELL *et al.*, 1980). Asimismo, cuando los adultos de *Carpophilus hemipterus* (L.) (Coleoptera: Nitidulidae) se alimentaban de dieta artificial tratada con diferentes BPU's se advirtió la esterilización de los huevos (ASCHER *et al.*, 1986). Por consiguiente, el efecto embriocida detectado en *A. mariaefranciscæ* tras el tratamiento a los adultos con hexaflumurón no es un hecho aislado, sino que en una gran variedad de especies de insectos se ha demostrado la efectividad de las BPU's sobre los embriones.

El efecto de la edad de los adultos tratados sobre la viabilidad de los huevos no se pudo estudiar aquí debido al escaso número de huevos que pusieron las hembras viejas. No obstante, en el caso de otra BPU, el diflubenzurón, parece que la edad de las hembras afectó a los huevos (GROSSCURT, 1977; 1978). Al mismo tiempo, HOLST (1974) observó que el efecto ovicida del diflubenzurón aplicado en la dieta de los adultos de *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) se debilitó con más rapidez en los adultos viejos que en los más jóvenes. Sin embargo, el tratamiento tópico con diflubenzurón sobre *Riptortus clavatus* (Thunberg) (Hemiptera: Alydidae) ocasionó la reducción de la eclosión de los huevos independientemente de la edad de los adultos (KIM *et al.*, 1992).

Un resumen de todos los resultados indica que las tasas de penetración del hexaflumurón a través del tegumento y de excreción en las heces (o por fricción del cuerpo con el sustrato) presenta diferencias entre adultos jóvenes y viejos, pero al final, en valores absolutos, la cantidad de compuesto dentro del cuerpo alcanza valores similares. La penetración del hexaflumurón-[C<sup>14</sup>] en las hembras es algo mayor, pero la excreción es mucho menor en machos, lo que resulta en una mayor retención del insecticida en estos últimos. Además, las hembras jóvenes absorbieron una mayor cantidad de hexaflumurón durante los 3 primeros días tras el tratamiento. Los resultados sobre la farmacocinética del hexaflumurón y los obtenidos mediante microscopía

electrónica apoyan la idea de que las aberraciones observadas en el tegumento del embrión son el resultado de la acumulación de pequeñas cantidades del compuesto o sus metabolitos en los huevos tras su aplicación tópica sobre adultos de *A. mariaefranciscae*, ocasionando de esta manera la muerte del embrión. La alta retención del compuesto en los tejidos y las bajas dosis requeridas para su efectividad como inhibidor de la eclosión de los huevos hace que sea un compuesto interesante para los tratamientos en campo contra *A. mariaefranciscae*.

### 6.3. EFECTOS DEL PIRIPROXIFÉN

#### 6.3.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos agonistas de la hormona juvenil (HJ) afectan aquellas funciones vitales de los insectos que son controladas o influenciadas por dicha hormona (SEHNAL, 1983). El descubrimiento de que los juvenoides, además de inhibir la metamorfosis, alteraban la embriogénesis, supuso el comienzo de su interés comercial y un aumento en la investigación de compuestos con estas características. Sin embargo, en la práctica su empleo no es sencillo, tanto desde el punto de vista técnico como del estado de las poblaciones del insecto frente al cual se utiliza. Uno de los problemas que plantea el uso de los compuestos agonistas de la HJ es que al actuar sólo sobre ciertos estados, su aplicación debe ser precisa en el tiempo, y al ser compuestos en general poco estables se deben repetir las aplicaciones para que toda la población pase a través de la fase sensitiva y así asegurar la efectividad (SEHNAL, 1983). Por ello debería ser aplicado en poblaciones que se hallen en el mismo momento del desarrollo, ya que de lo contrario los efectos pueden ser los contrarios a los deseados, produciendo larvas supernumerarias que agravarían el problema de la plaga.

Actualmente se están realizando numerosos estudios para la búsqueda de nuevas moléculas más potentes y selectivas agonistas de la HJ, lo que hace que este grupo sea considerado un elemento potencial para su inclusión en los programas de IPM en el control de diferentes insectos de distintos cultivos.

El piriproxifén es un nuevo mimético de la HJ, que ocasiona una supresión de la embriogénesis y afecta a la metamorfosis y a la formación del adulto. Es más estable que los primeros compuestos descubiertos (metopreno, kinopreno y fenoxicarb) y bastante persistente, lo cual aumenta las posibilidades de que el insecto entre en contacto con él. Se ha demostrado su efectividad en distintos órdenes de insectos, incluyendo homópteros (BRADLEY *et al.*, 1995), heterópteros (LANGLEY *et al.*, 1990; DE CLERCQ *et al.*, 1995), tisanópteros (NAGAI, 1990), himenópteros (VAIL y WILLIAMS, 1996), dictiópteros (LIM y YAP, 1996; KAAKEH *et al.*, 1997), sifonápteros (PALMA *et al.*, 1993), ortópteros (PARKMAN y FRANK, 1998), dípteros (BULL y MEOLA, 1993) y lepidópteros

(YOKOYAMA y MILLER, 1991; HATAKOSHI, 1992). Este compuesto es utilizado hoy día sobre todo en recintos cerrados y contra insectos muy localizados: plagas de almacén, insectos de las casas y también tiene un importante uso veterinario.

Se ha demostrado que el piriproxifén posee acción por contacto. En cucarachas produjo esterilidad, anormalidades morfológicas o inhibición de la muda (ROSS y COCHRAN, 1991; LIM y YAP, 1996). Se ha citado también que el uso de piriproxifén sobre adultos de distintas especies de mosca blanca producía infertilidad de los huevos, y además se ha probado un efecto ovicida tras sumergirlos en una solución con este producto (ISHAAYA y HOROWITZ, 1992; ISHAAYA *et al.*, 1994). Los juvenoides han mostrado en numerosos estudios su eficacia frente a coleópteros que constituyen plaga de productos almacenados (SAMSON *et al.*, 1990; LETELLIER *et al.*, 1995), aunque no tenemos datos hasta la fecha del efecto del piriproxifén sobre este orden de insectos.

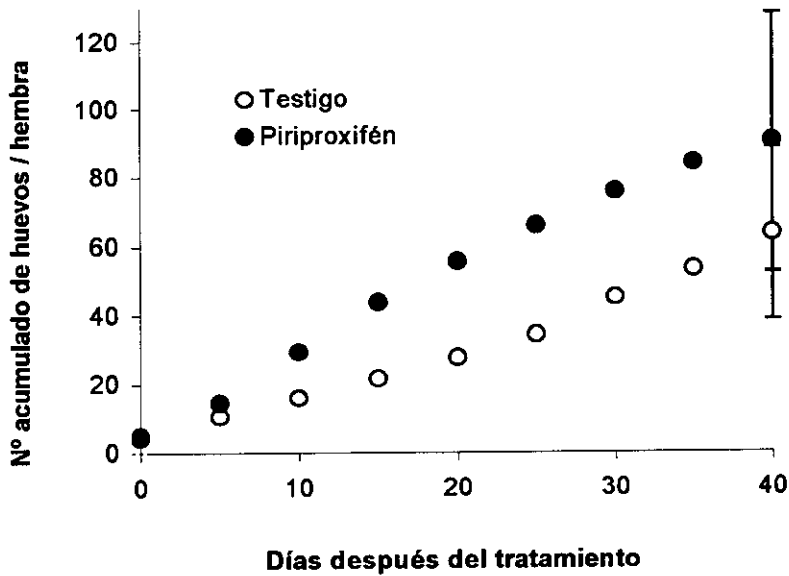
El objetivo de este estudio es estudiar el efecto del piriproxifén sobre la fecundidad, la fertilidad y el desarrollo de la progenie al ser aplicado tópicamente sobre adultos de *A. mariaefranciscae*.

### 6.3.2. RESULTADOS

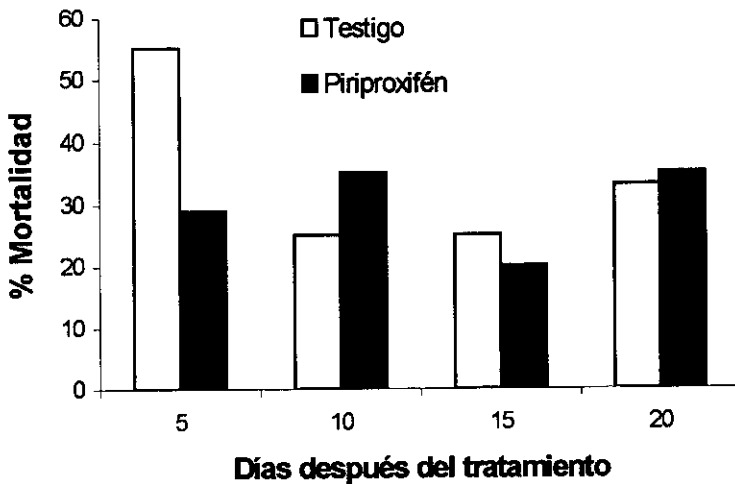
La fecundidad no se vio afectada tras el tratamiento con piriproxifén. El número medio acumulado de huevos puestos por hembra al cabo de 40 días del tratamiento fue superior en las hembras tratadas tópicamente con 10  $\mu$ g del juvenoide que en las hembras testigo (Figura 6.14). Sin embargo, la variabilidad en ambos casos fue muy alta ( $90,3 \pm 38,5$  y  $63,4 \pm 25,1$  huevos, respectivamente), por lo que las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ( $W = 30$ ;  $P > 0,05$ ). La fertilidad tampoco se vio afectada, ya que en todas las hembras, tratadas y testigos, fue superior al 95 %.

Por último, el tratamiento de los adultos con piriproxifén tampoco pareció influir sobre la supervivencia de la progenie (Figura 6.15). Salvo 5 días después del tratamiento, en que la mortalidad de las larvas del grupo testigo fue superior al 50%, en el resto de los casos la mortalidad osciló entre el 20 y el 35% en los dos grupos de

larvas, cifra considerada normal para la cría en el laboratorio de este curculiónido (ver capítulo 3), y no se encontraron anomalías morfológicas externas o diferencias de comportamiento entre ellas.



**Figura 6.14.**  
Efecto de una aplicación tópica de piriproxifén sobre adultos de *A. mariaefrancisca* en el número acumulado de huevos por hembra



**Figura 6.15.**  
Porcentaje de mortalidad de la progenie de *A. mariaefrancisca* a partir de adultos tratados tópicamente con piriproxifén.

### 6.3.3. DISCUSIÓN

La aplicación tópica de 10 µg de piriproxifén sobre adultos de *A. mariaefranciscæ* no produjo ningún efecto sobre su fecundidad, fertilidad y desarrollo de la progenie.

La fecundidad de las hembras tratadas fue mayor que la de las testigo, pero dado que no existieron diferencias significativas en el momento de terminar el ensayo, no podemos concluir que le afectara positivamente a la fecundidad, como se ha observado en algunas especies de coleópteros tras la aplicación de compuestos miméticos de la HJ (ASCERNO *et al.*, 1981; SCHOONEVELD *et al.*, 1977). No obstante, este efecto estimulador de la reproducción visto en otras especies se debió a una interrupción de la diapausa imaginal que caracteriza a muchas especies de este orden, produciendo importantes cambios en su desarrollo gonadal y oviposición.

Aunque ha sido probado con anterioridad el efecto embriocida de este compuesto, la fertilidad de los huevos, superior al 95% en todos los casos, indicó que el piriproxifén no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo del embrión de *A. mariaefranciscæ*. Dadas las características del experimento no fue posible saber si el producto llegaba a los huevos sin que éstos se vieran afectados o por el contrario era excretado o detoxificado con anterioridad.

El efecto transovarial observado en hembras adultas de distintas especies de homópteros (ISHAAYA y HOROWITZ, 1995; HIGBEE *et al.*, 1995) tras la aplicación de juvenoides tampoco pudo detectarse en *A. mariaefranciscæ*. Las larvas de la siguiente generación, además de no presentar una mortalidad mayor, tampoco sufrieron un alargamiento del desarrollo.

Tras el estudio podemos concluir que el piriproxifén no es una buena opción en el control de esta plaga, a pesar de los efectos mostrados en otros insectos, dada su nula efectividad al ser aplicado tópicamente sobre adultos.

## 6.4. EFECTOS DEL HALOFENOCIDA

### 6.4.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos sintéticos no esteroideos análogos de la ecdisona actúan como miméticos de la función biológica de la hormona natural de la muda, la 20-hidroxicdisona, representando un nuevo modo de acción insecticida. En una reciente revisión de este grupo de compuestos, DHADIALLA *et al.* (1998) resaltaron sus efectos letales sobre larvas de diferentes insectos, que mostraban síntomas de hiperecdisonismo. Hasta el momento el tebufenocida ha sido el más ampliamente estudiado, mostrando una alta selectividad contra distintas especies de lepidópteros (SMAGGHE y DEGHEELE, 1993, 1994a, c; SLÁMA, 1995; SMAGGHE *et al.*, 1996a, b; DHADIALLA *et al.*, 1998). La mayoría de los estudios acerca de los efectos de las bisacilhidracinas sobre coleópteros se han centrado en larvas. Al tratar tópicamente las larvas de los crisomélidos *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y *Phaedon cochleariae* (F.) con el análogo de la ecdisona prototipo, el RH-5849, éstas murieron en la vieja cutícula al no ser capaces de desprenderse de ella (DARVAS *et al.*, 1992). SMAGGHE y DEGHEELE (1994c) obtuvieron resultados muy parecidos con larvas de *L. decemlineata* y *Diabrotica virgifera* (LeConte), tras ser tratadas con el mismo compuesto. Recientemente se ha desarrollado un nuevo análogo estructural, el RH-0345 (halofenocida), que parece ser más específico contra coleópteros, y que ya ha mostrado una alta toxicidad contra los estadios larvarios de algunos escarabeidos (COWLES y VILLANI, 1996; ROHMID, 1996; COWLES *et al.*, 1999).

Los ecdisteroides son segregados por las glándulas protorácicas durante las fases juveniles de los insectos, siendo su función principal la inducción de la muda. Sin embargo, también se ha detectado síntesis de ecdisteroides en los ovarios y testículos de los insectos adultos (LOEB *et al.*, 1982, 1987; RAO *et al.*, 1982; ROJO DE LA PAZ *et al.*, 1983; HAGEDORN, 1985; GRAU y LAFONT, 1994; ROMAÑA *et al.*, 1995), lo que ha permitido deducir que la 20-hidroxicdisona tiene un importante papel, junto con la hormona juvenil, en la regulación de la maduración de los órganos reproductores (DHADIALLA *et al.*, 1998). Además el ovario puede actuar como un vehículo de transmisión de ecdisteroides a los huevos en desarrollo en el interior de la hembra

(HSIAO y HSIAO, 1979; RAO *et al.*, 1982). Este papel del aparato reproductor en la síntesis de ecdisteroides hace que los procesos relacionados con la reproducción puedan verse afectados por la aplicación de agonistas de la ecdisona, por medio de la reducción de la fecundidad, de la actividad ovicida o la alteración de los procesos relacionados con la espermatogénesis (HAGEDORN, 1985; GIEBULTOWICZ *et al.*, 1993; CARPENTER y CHANDLER, 1994).

En los estudios realizados hasta el momento con coleópteros adultos se ha empleado el RH-5849, que afectó a la fecundidad de *L. decemlineata*, inhibiendo la puesta poco tiempo después del tratamiento (ALLER y RAMSAY, 1988; SMAGGHE y DEGHEELE, 1994c), y redujo la fecundidad de *Popillia japonica* (Newman) tras alimentarse con hojas tratadas (MONTHÉAN y POTTER, 1992). En el presente trabajo queremos examinar los efectos del halofenocida al ser aplicado tópicamente sobre adultos de *A. mariaefranciscae*. Más concretamente, los objetivos de este estudio son:

- 1) Estudiar el efecto del halofenocida sobre la fecundidad, la fertilidad y el desarrollo de la progenie al ser aplicado tópicamente sobre adultos de *A. mariaefranciscae*.
- 2) Estudiar la farmacocinética del halofenocida en adultos de *A. mariaefranciscae*.

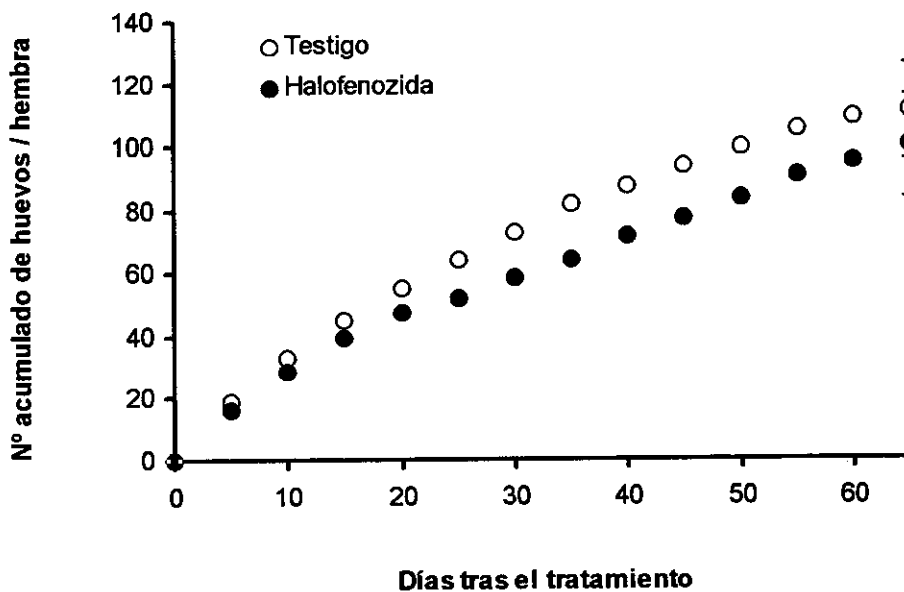
## 6.4.2. RESULTADOS

### 6.4.2.1. Efectos sobre la fecundidad, fertilidad y supervivencia de la progenie

La fecundidad acumulada por hembra (nº acumulado de huevos puestos por hembra) disminuyó un 10% en comparación con los controles cuando adultos de ambos sexos fueron tópicamente tratados con 2 µg de halofenozide (0,2 µg IA / mg de peso fresco), pero el nº total de huevos puestos al final del experimento por los adultos testigos y los tratados no fue significativamente distinto ( $W = 79,0$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 6.16).

Tampoco la fertilidad (% de eclosión de huevos) de *A. mariaefranciscae* se vio afectada por el tratamiento con halofenozide. Sin embargo, sí hubo una disminución

significativa de la supervivencia de la progenie procedente de adultos tratados. Más del 80% de las larvas neonatas procedentes de huevos recogidos 5, 15 y 25 días después del tratamiento tópico murieron poco después sin haber mudado al segundo estadio. El porcentaje de mortalidad comenzó a disminuir 35 días después del tratamiento (Figura 6.17). Las larvas que mudaron al segundo estadio larvario no sufrieron ninguna alteración y llegaron al estado adulto en el mismo tiempo que las larvas procedentes de adultos sin tratar. Secciones transversales de larvas de primer estadio de *A. mariaefranciscae* procedentes de adultos tratados revelaron la existencia de dos finas líneas oscuras que indicaban la presencia de una doble cutícula (Figura 6.18). Parece, por tanto, que las larvas de *A. mariaefranciscae* habían muerto en el interior de la antigua cutícula, cuando la siguiente ya estaba formada, siendo incapaces de romperla y abandonarla.



**Figura 6.16. Efecto de una aplicación tópica de halofenocida sobre adultos de *A. mariaefranciscae* en el número acumulado de huevos por hembra**

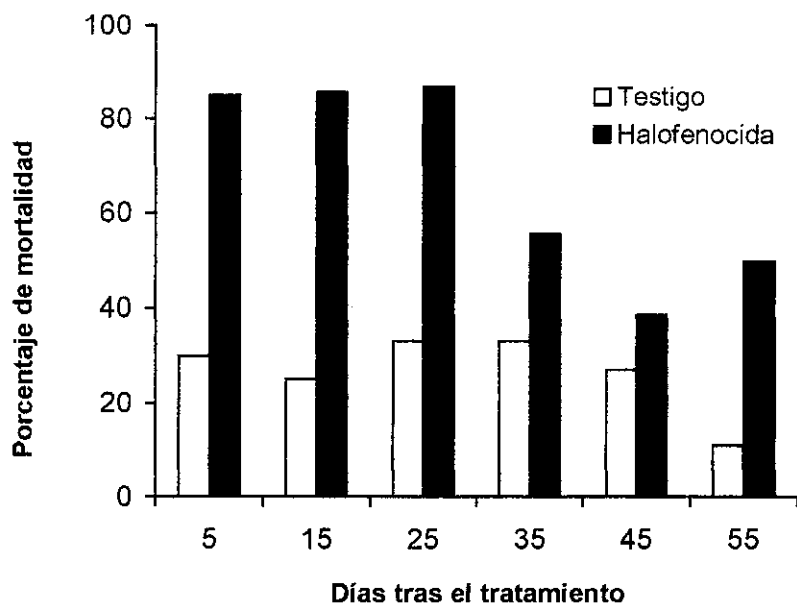


Figura 6.17. Porcentaje de mortalidad de la progenie de *A. mariaefranciscae* a partir de adultos tratados tópicamente con halofenocida

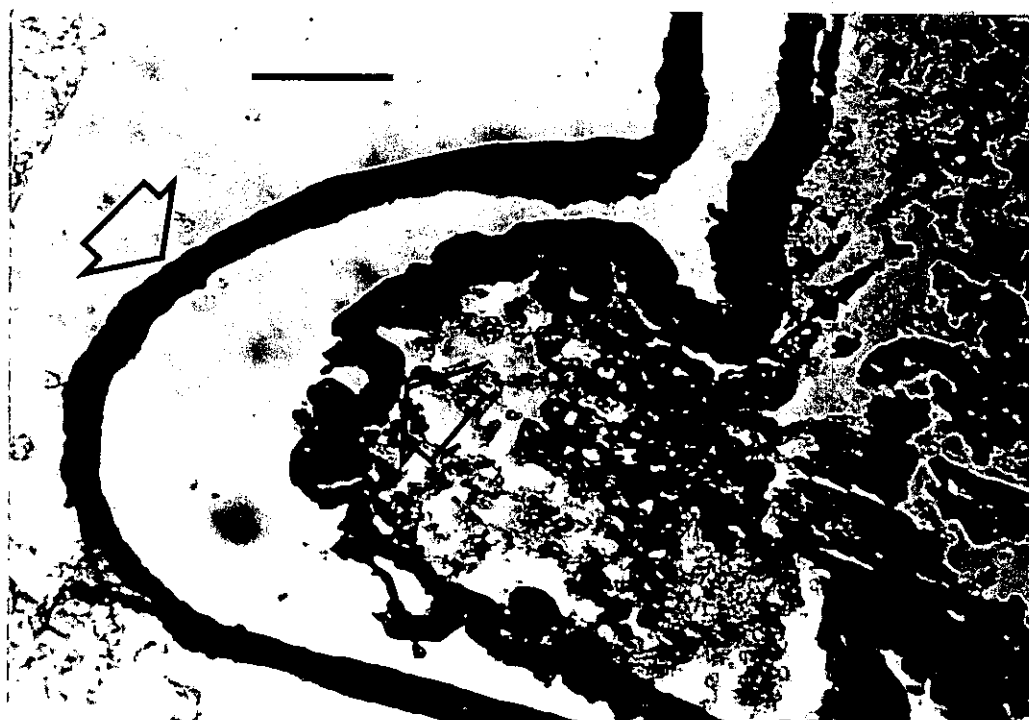


Figura 6.18. Sección transversal de una larva neonata de *A. mariaefranciscae* procedente de adultos tratados tópicamente con 2  $\mu\text{g}$  de halofenocida. Las flechas indican la presencia de una doble cutícula. Barra = 50 nm

#### 6.4.2.2. Farmacocinética del halofenocida en *A. mariaefranciscæ*

La penetración del  $C^{14}$  a través de la cutícula en adultos de *A. mariaefranciscæ* siguió el mismo patrón en machos y hembras (Figura 6.19). El 50% de la radiactividad aplicada había penetrado tras 1,4 días después del tratamiento en hembras y 1,6 días en machos. Tres días después de la aplicación tópica el 71% del  $C^{14}$  aplicado estaba en el interior del cuerpo de las hembras, y el 75% en machos. Posteriormente las pendientes de las curvas disminuyen, cuando las tasas de penetración del compuesto alcanzan un valor máximo. Al final del experimento, tres semanas después del tratamiento, el 92% de la radiactividad había penetrado en las hembras, y el 88% en los machos. Los datos de ambos sexos se ajustaron muy bien a una curva logarítmica (hembras:  $R^2 = 0,98$ ; machos:  $R^2 = 0,93$ ). Las tasas de penetración ( $dy/dx$ ) en machos y hembras demostraron que el  $C^{14}$  fue absorbido a casi la misma velocidad.

Los datos de excreción de los residuos  $C^{14}$  en diferentes intervalos de tiempo a través de las heces también se ajustaron bien a una curva logarítmica ( $R^2 = 0,96$ ). La vida media (50% de excreción) de los residuos calculada con las curvas estimadas fue de 6,9 días, y al final del experimento, tres semanas después de la aplicación tópica con halofenocida  $C^{14}$ , había excretado un 60% de lo aplicado (Figura 6.20).

La mayoría de la radiactividad recuperada en el cuerpo de *A. mariaefranciscæ* se hallaba en el tegumento (Figura 6.21). Un día después del tratamiento en machos el 57% fue recuperado en el tegumento, y tras una semana se recuperó el 77%, valor que se mantuvo casi constante hasta el final (Figura 6.21 B). Las hembras de *A. mariaefranciscæ* también acumularon la mayoría de los residuos  $C^{14}$  en el tegumento, pero la cantidad relativa recuperada disminuyó desde un 65% (un día después del tratamiento) hasta un 42% (tres semanas después) (Figura 6.21 A). Es obvio que este porcentaje fue disminuyendo en la medida que aumentaba la cantidad relativa de residuos  $C^{14}$  recuperados en el aparato reproductor.

Los niveles de radiactividad recuperados en el tubo digestivo fueron muy bajos en ambos sexos, oscilando los porcentajes de recuperación entre 8 y 18 % en hembras y 12 y 26% en machos. En ningún caso hubo diferencias significativas en función del

tiempo transcurrido desde el tratamiento.

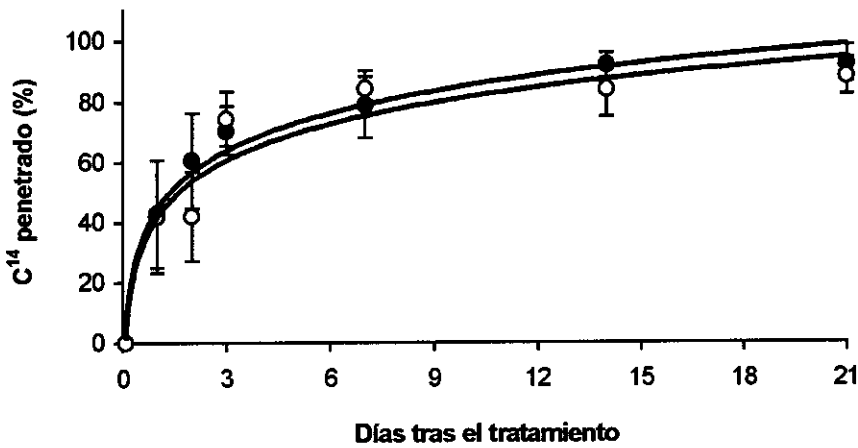


Figura 6.19. Porcentaje ( $\bar{X} \pm D.S.$ ) del C<sup>14</sup> aplicado sobre adultos de *A. mariaefranciscae* absorbido a través de la cutícula en distintos intervalos de tiempo

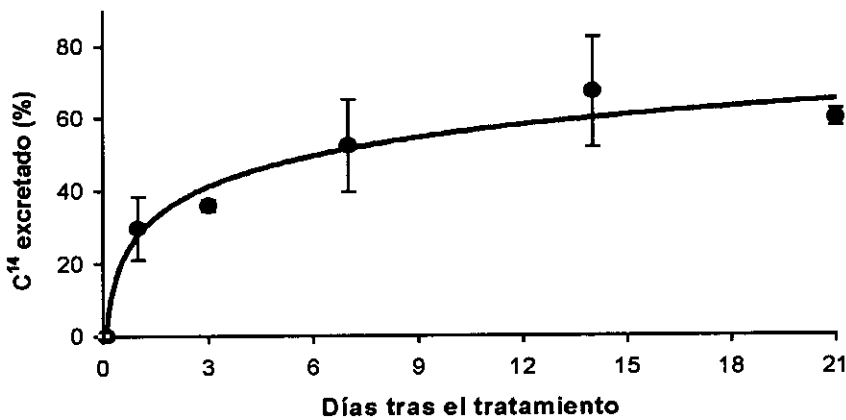


Figura 6.20. Porcentaje ( $\bar{X} \pm D.S.$ ) del C<sup>14</sup> aplicado sobre adultos de *A. mariaefranciscae* recuperado en las heces y papel de filtro en distintos intervalos de tiempo

Los porcentajes de residuos  $C^{14}$  recuperados en el aparato reproductor fueron diferentes en función del sexo. En machos la acumulación se mantuvo casi constante a lo largo del tiempo y en un porcentaje más bajo que el de las hembras (entre 8 y 16%), mientras que en éstas la radiactividad fue mucho más absorbida, oscilando entre un 9% recuperado un día después del tratamiento y un 41% recuperado tres semanas después.

Debido a que la mortalidad de las larvas neonatas procedentes de adultos tratados tópicamente con halofenocida  $C^{14}$  fue muy alta también se midió la radiactividad en los huevos puestos por estos adultos. El porcentaje de  $C^{14}$  aplicado que fue recuperado en los huevos no difirió significativamente a lo largo del experimento ( $F = 0,35$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 6.21). Los valores oscilaron entre 0,026 y 0,042%, lo que se corresponde con 1,6 y 2,6 pM de residuos marcados recuperados por huevo.

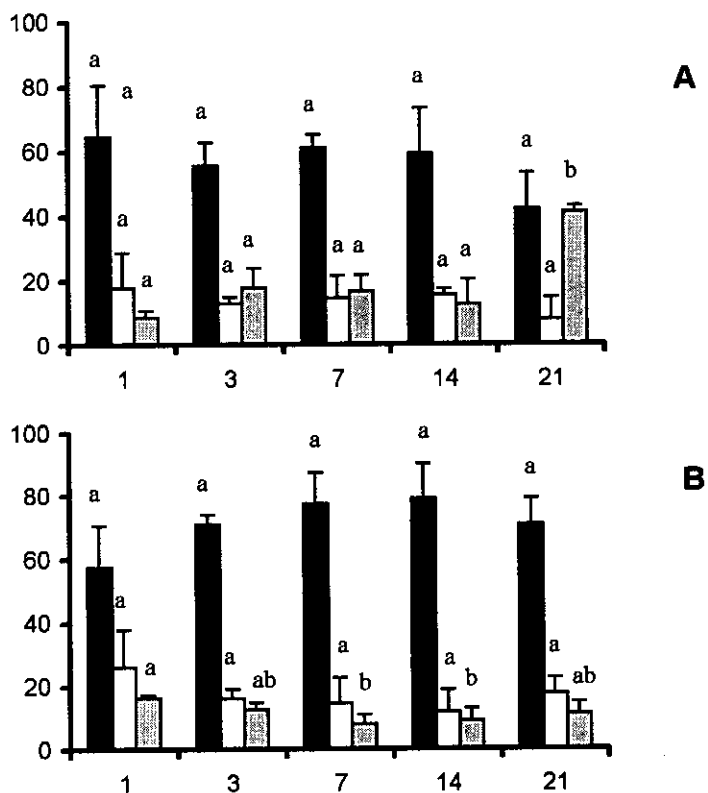


Figura 6.20. Porcentaje (media  $\pm$  D.S.) del halofenocida- $C^{14}$  aplicado recuperado en el tegumento (■), tubo digestivo (□) y aparato reproductor (▨), de hembras (A) y machos (B) en diferentes intervalos de tiempo. Para la misma parte del cuerpo, las columnas con letras distintas presentan diferencias significativas ( $P > 0,05$ )

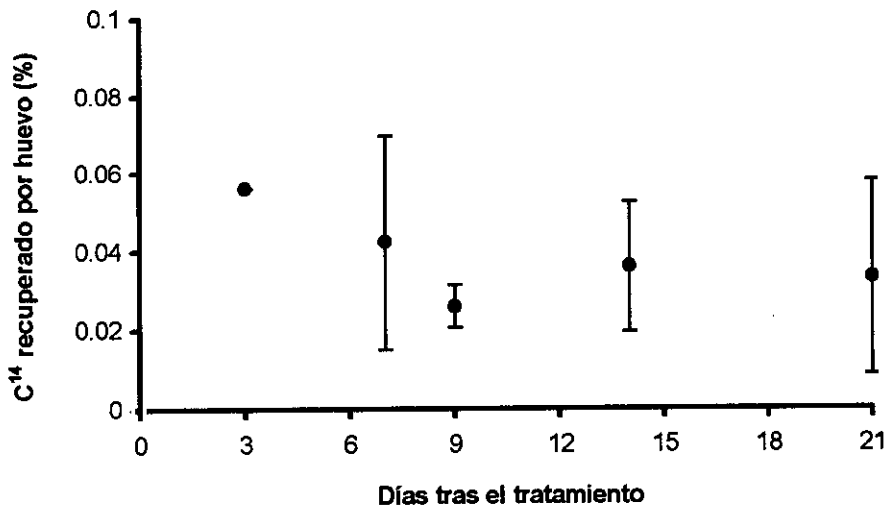


Figura 6.21. Porcentaje ( $\bar{X} \pm D.S.$ ) del C<sup>14</sup> aplicado sobre adultos de *A. mariaefranciscae* recuperado en los huevos puestos en distintos intervalos de tiempo

### 6.4.3. DISCUSIÓN

Existen evidencias de que los agonistas no esteroidales de la hormona de la muda o ecdisona pueden producir trastornos en los procesos regulados por ecdisteroides en los insectos. En este estudio se ha demostrado que la aplicación tópica de halofenocida sobre adultos de *A. mariaefranciscae* produce un descenso de la supervivencia de su progenie.

A pesar de las numerosas pruebas que existen acerca de las alteraciones producidas por insecticidas análogos de la ecdisona sobre el crecimiento de los oocitos y la ovulación en hembras de insectos (LAWRENCE, 1992; SMAGGHE y DEGHEELE, 1994a, c), parece que éstas no suceden en el caso de *A. mariaefranciscae* tras la aplicación tópica de halofenocida, ya que ni la fecundidad ni la fertilidad se vieron modificadas con respecto a los testigos. Sin embargo, el desarrollo de la progenie se vio seriamente afectado. Más del 80% de las larvas de primer estadio que emergieron 5, 15 y 25 días

después del tratamiento de los adultos murieron al poco tiempo de la eclosión de los huevos. Existen evidencias de que en los embriones y en los huevos recién puestos de muchas especies de insectos hay cantidades considerables de ecdisteroides que, bien pueden haber sido sintetizados por el propio embrión (IMBODEN y LANZREIN, 1982; HAGEDORN, 1985) o, más probablemente, se sintetizan en los ovarios de la hembra progenitora y pasan al embrión vía materna (HAGEDORN, 1985; HOFFMANN y LAGUEUX, 1985). Además se ha demostrado que estos ecdisteroides podrían estar implicados en la secreción de las cutículas embrionarias (LAGUEUX *et al.*, 1979) y en la regulación del desarrollo embrionario (HAGEDORN, 1985). En este estudio hemos detectado altos niveles de [ $C^{14}$ ] en los huevos puestos por adultos de *A. mariaefranciscæ* tratados con halofenocida, lo cual hace pensar que de alguna manera esta radiactividad ha pasado de la madre al embrión. La aplicación de halofenocida puede haber alterado la cantidad de moléculas activas ecdisteroidales (agonistas de la ecdisona) en el embrión, afectando al desarrollo de las larvas recién emergidas. Como consecuencia, los primeros estadios murieron poco tiempo después de la eclosión de los huevos. La causa parece ser una muda prematura, ya que secciones transversales de larvas en primer estadio originadas a partir de adultos tratados tópicamente con halofenocida presentaban una doble cutícula bajo el microscopio óptico, y estas larvas fueron incapaces de desprenderse de la vieja cutícula. SMAGGHE y DEGHEELE (1994c) también observaron la presencia de una doble cutícula en larvas del escarabajo de la patata tratadas tópicamente con 20  $\mu$ g de RH-5849 cada una. A la vista de todos estos resultados, parece que el halofenocida, al igual que otras bisacilhidracinas, produce los efectos observados debido a su actividad agonista de la hormona de la muda, uniéndose a receptores de ecdisteroides e induciendo de este modo un ciclo de mudas prematuro que resulta letal (MONTHÉAN y POTTER, 1992; SMAGGHE y DEGHEELE, 1994a, c; SMAGGHE *et al.*, 1996a, c; TRISYONO y CHIPPENDALE, 1997; DHADIALLA *et al.*, 1998).

Los datos obtenidos sobre la farmacocinética de los residuos marcados de halofenocida-[ $C^{14}$ ] en el cuerpo de los adultos de *A. mariaefranciscæ* indicaron que el producto se absorbe a través de la cutícula y luego son transportados al resto de los órganos internos. En el tubo digestivo se encontraron siempre niveles muy bajos de

radiactividad, independientemente del sexo y del tiempo transcurrido desde el tratamiento, lo que puede explicarse por un rápido desplazamiento del producto a través de la luz del tubo. Además, la hemolinfa también podría contribuir al transporte del producto, como ya ha sido indicado en un trabajo previo con larvas del escarabajo de la patata que se alimentaron con hojas tratadas con RH-5849 (SMAGGHE y DEGHEELE, 1993). Los resultados obtenidos sobre la acumulación del halofenocida mostraron que éste era muy persistente en el tegumento. La mayoría de la radiactividad recuperada en los machos se hallaba en la cutícula y el nivel se mantuvo a lo largo del experimento.

La retención de los residuos de  $[C^{14}]$  en el aparato reproductor resultó diferente en función del sexo. En la mayoría de los insectos las hembras adultas tienen más cantidad de ecdisteroides que los machos (HAGEDORN, 1985), y este hecho puede hacer que sean las hembras las que sufran más alteraciones en el sistema hormonal tras el tratamiento con agonistas de la ecdisona. Los machos retuvieron cantidades menores de radiactividad, menos de un 20% del total de  $[C^{14}]$  recuperado, en todos los casos. Además, ensayos llevados a cabo por nosotros con *L. decemlineata* en los que se apareaban machos tratados tópicamente con RH-0345 con hembras sin tratar no dieron como resultado una reducción de la fecundidad (datos no mostrados), lo cual apoyaría esta hipótesis. En el aparato reproductor de las hembras (ovarios + huevos puestos), por el contrario, se retuvieron altos niveles de radiactividad. Esta cantidad, que se mantuvo durante un periodo relativamente largo, no causó una reducción significativa de la fecundidad, pero de alguna forma se transmitió a los embriones, produciendo una drástica reducción en la supervivencia de la progenie. Sólo un pequeño porcentaje del halofenocida- $[C^{14}]$  aplicado se incorporó a los huevos de *A. mariaefranciscae*. Sin embargo la pequeña cantidad recuperada por huevo (entre 1.6 y 2.6 pM) podría haber sido responsable de la alteración del desarrollo de las larvas recién emergidas. Estas cantidades tan bajas son comparables a las encontradas en huevos de *A. mariaefranciscae* procedentes de adultos tratados tópicamente con hexaflumurón, donde 2.3 pM de este producto tuvieron un fuerte efecto embriocida (ver apartado 6.1.2).

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que el tratamiento tópico de adultos de *A. mariaefranciscae* con halofenocida provocó un alto porcentaje de

mortalidad en la progenie debido a que produce un proceso de muda prematura que inhibe la ecdisis. Parte del halofenocida aplicado sobre las hembras se acumuló en su aparato reproductor, y de alguna forma pasó a la siguiente generación. Se ha detectado, por tanto, un efecto transovarial del halofenocida. Los efectos observados sugieren que el halofenocida puede alterar los procesos fisiológicos dependientes de los ecdisteroides relacionados con el desarrollo del embrión.

# Efecto de inhibidores de proteasas en el desarrollo y supervivencia de las larvas de *A. mariaefranciscae*

### 7.1. INTRODUCCIÓN

Los daños causados a los insectos a través de la alteración de la digestión de las proteínas por la transformación del genoma de las plantas con inhibidores de proteasas representa una alternativa nueva en el control de plagas de insectos (ver la revisión de REECK *et al.*, 1997). Sin embargo, debido a la variabilidad existente en las proteasas de los insectos (WOLFSON y MURDOCK, 1990) y al limitado espectro de actividad de estos inhibidores (GARCÍA-OLMEDO *et al.*, 1987), la expresión en plantas de un determinado inhibidor de proteasas puede no dar lugar a un amplio espectro de control. Es, por tanto, necesario, seleccionar los inhibidores apropiados para las proteasas digestivas de cada especie en particular, lo cual requiere el conocimiento de las proteasas presentes en el tubo digestivo de cada insecto, así como su

interacción con los distintos inhibidores.

Con este fin, ORTEGO *et al.* (1998) caracterizaron las actividades proteolíticas de larvas y adultos de *A. mariae franciscae*, y posteriormente estudiaron *in vitro* el efecto de distintos inhibidores de proteasas sobre la actividad de las proteasas digestivas de este curculiónido. Tanto en larvas como en adultos se encontró un complejo sistema proteolítico para la digestión de las proteínas basado en, al menos, actividades de tipo tripsina, quimotripsina, elastasa, catepsina D, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B. Extractos del intestino medio de las larvas mostraron una actividad proteasa específica más alta que la medida en adultos. No obstante, salvo variaciones cuantitativas, no se encontraron variaciones cualitativas. Por tanto, tanto larvas como adultos exhibieron un mismo perfil proteolítico, como se podía esperar de un insecto con los mismos hábitos alimentarios.

Se ha constatado que la ingestión continuada de inhibidores proteicos añadidos a la dieta de cría de algunas especies ha ocasionado severos efectos en el crecimiento y desarrollo de algunas especies. El objetivo de este estudio es determinar los efectos de algunos inhibidores de proteasas sobre el desarrollo y la supervivencia de las larvas de *A. mariae franciscae*, como base para seleccionar los inhibidores más adecuados para el control de esta especie.

## 7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayos previos habían mostrado la presencia de serín proteasas en el tubo digestivo de larvas y adultos de *A. mariae franciscae*. Por ello, se probaron varios inhibidores de serín proteasas *in vivo* sobre larvas neonatas para establecer su potencial como factores de resistencia. Los inhibidores ensayados fueron: SBBI (Soybean Bowman-Birk Inhibitor), CEOM (Chicken Egg White Ovomuroid), TEI (Turkey Egg White Inhibitor), STI (Soybean Trypsin Inhibitor) y LBI (Lima Bean Inhibitor). Todos proceden de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU).

Las larvas eran alimentadas desde su emergencia hasta su pupación con dieta artificial que contenía un 0,2% (p/p) de albúmina (testigo), o un 0,2% (p/p) de uno de los inhibidores de proteasas citados (SBBI, CEOM, TEI, STI, y LBI), o un 0,2% de las mezclas LBI/TEI (con un 1% (p/p) de cada uno de los componentes), y SBBI/STI/TEI (con 0,066% (p/p) de cada uno).

Las larvas se mantenían individualmente en cajitas, cada una de las cuales contenía un trozo de dieta tratada de unos 0,4 gramos sobre un trozo de papel de filtro. Las condiciones empleadas fueron  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O). Los cambios de dieta se hacían cada 5-7 días para determinar el desarrollo y la supervivencia de las larvas.

### 7.3. RESULTADOS

La supervivencia y el desarrollo de las larvas de *A. mariaefranciscae* alimentadas con dietas artificiales que contenían inhibidores de proteasas se muestra en la Tabla 7.1. La mortalidad de las larvas alimentadas con la dieta testigo que contenía un 0,2% (p/p) de albúmina fue del 25%. Asimismo, las larvas alimentadas con la dieta que contenía un 0,2% (p/p) de CEOM mostraron unos niveles de mortalidad, duración larvaria y pupal y peso de los adultos similares a los de los testigos.

El consumo de las dietas que contenían un 0,2% (p/p) de SBBI, TEI, STI y LBI incrementó la mortalidad al 60-70%, mientras que en las dietas que contenían las mezclas LBI/TEI y SBBI/STI/TEI la mortalidad rondó el 90%. Con todos estos inhibidores de proteasas, tanto por separado como combinados, los tiempos de desarrollo empleados hasta la pupación y hasta la emergencia del adulto se retrasaron significativamente ( $P \leq 0,05$ ). El peso de las pupas y los adultos en estos tratamientos fueron siempre menores que en el control, aunque no significativamente distintos.

**Tabla 7.1. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la supervivencia y el desarrollo de las larvas de *A. mariae franciscae***

Tratamiento <sup>a</sup>	Dosis (% p/p)	N	Mortalidad (%)	Duración larvaria (días)	Peso pupas (mg)	Duración estados inmaduros (días)	Peso adultos (mg)
Testigo (Albúmina)	0.2	40	25.0	53.5 ± 1.7	8.9 ± 0.3	64.9 ± 1.7	6.7 ± 0.2
CEOM	0.2	40	22.5	53.3 ± 1.6	8.9 ± 0.2	64.4 ± 1.8	6.6 ± 0.2
SBBI	0.2	40	70.0	71.9 ± 1.5 *	8.2 ± 0.3	81.0 ± 1.7 *	5.9 ± 0.3
TEI	0.2	40	70.0	68.7 ± 1.7 *	8.3 ± 0.4	79.8 ± 1.6 *	5.8 ± 0.3
STI	0.2	40	67.5	61.5 ± 2.5 *	8.3 ± 0.3	72.8 ± 2.1 *	6.1 ± 0.3
LBI	0.2	40	60.0	66.8 ± 2.3 *	8.5 ± 0.4	78.3 ± 2.2 *	5.9 ± 0.3
LBI/TEI	0.2	40	90.0	61.9 ± 1.8 *	8.5 ± 0.4	73.4 ± 1.7 *	6.1 ± 0.3
SBBI/STI/TEI	0.2	40	87.5	67.1 ± 2.2 *	7.9 ± 0.3	78.0 ± 2.3 *	5.9 ± 0.2

<sup>a</sup> SBBI (Soybean Bowman-Birk inhibitor), CEOM (Chicken Egg White Ovomuroid), TEI (Turkey Egg White Inhibitor), STI (Soybean Trypsin Inhibitor), LBI (Lima Bean Inhibitor); LBI/TEI (0.1% LBI + 0.1% TEI), and SBBI/STI/TEI (0.066% SBBI + 0.066% STI + 0.066% TEI).

\* diferencias significativas con respecto al testigo (test Dunnett de dos colas,  $P < 0.05$ ).

### 7.3. DISCUSIÓN

Muchos autores han demostrado que la ingestión de inhibidores de proteasas en dietas naturales o artificiales puede retrasar el crecimiento y el desarrollo de muchas especies de insectos plaga, lo cual apunta a que estos inhibidores pueden ser un método efectivo para controlar insectos (ver revisión de JONGSMA y BOLTER, 1997). Sin embargo, en la mayoría de los estudios la mortalidad era bastante baja y la protección contra la plaga no era completa, aun usando altos niveles de inhibidores. Se han encontrado porcentajes altos de mortalidad en algunas especies de curculiónidos, pero se obtuvieron con inhibidores sintéticos de bajo peso molecular y con inhibidores de proteasas peptídicos de origen microbiano. ELDEN (1995) indicó que la supervivencia larvaria de *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae) se redujo significativamente tras la ingestión de distintos inhibidores de cisteín- y aspartil-proteasas. Más recientemente, PITTENDRIGH *et al.* (1997) encontraron que el E-64 aumentaba la mortalidad y retrasaba el crecimiento en las larvas de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae).

Cuando las larvas de *A. mariaefranciscae* se alimentaron con una dieta artificial que contenía un 0,2% (p/p) de los inhibidores de proteasas proteicos SBBI, TEI, STI y LBI, la supervivencia se redujo considerablemente y hubo un retraso significativo del desarrollo. La mortalidad registrada con estos inhibidores representa un incremento del 35-45% con respecto a la de los controles, y estos valores están entre los más altos registrados hasta el momento con inhibidores de proteasas de tipo proteico sobre curculiónidos. PURCELL *et al.* (1992) encontraron que no había mortalidad ni aparecían malformaciones al alimentar larvas de *A. grandis* con altos niveles de SBBI y STI. Sin embargo, GRAHAM *et al.* (1997) observaron que la expresión de un inhibidor de tripsina de (carilla-chicharo) en fresa era efectivo contra el ataque de las larvas del curculiónido *Otiorynchus sulcatus* F. a las raíces de esta planta.

Por otra parte, la alimentación de larvas de *A. mariaefranciscae* con inhibidores de proteasas mezclados en la dieta mostraron que algunos ejemplares presentaban trastornos en el momento de la muda y la metamorfosis, apareciendo

individuos con características morfológicas intermedias entre larva y pupa y entre pupa y adulto, que morían pocos días después. También aparecieron algunas larvas con deslizamiento de la cápsula cefálica, señal típica de apolisis, pero se inhibía el siguiente paso de la ecdisis, resultando en un desprendimiento incompleto de la vieja cutícula. Se han indicado alteraciones similares de la muda en el tercer o cuarto estadio de algunas larvas de *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae), tras ser alimentadas desde neonatas con dieta que contenía inhibidores de tripsina y quimotripsina (HEATH *et al.*, 1997). Igualmente, FAKTOR y RAVIV (1997) encontraron que la inyección de SBBI o STI en larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) afectaba a la muda de las larvas, sugiriendo la presencia de otros blancos para los inhibidores de proteasas. BILLINGS *et al.* (1992) señalaron, tras seguimiento de la administración oral de SBBI en ratones, que éste pasaba la barrera del aparato digestivo y podía ser encontrado en prácticamente cualquier órgano, la sangre y la orina. Sin embargo, no existe información sobre la posibilidad de que los inhibidores de proteasas puedan atravesar el tracto digestivo de los insectos y tener así acceso a blancos endógenos. Por otra parte, los efectos sobre el proceso de la muda obtenidos en nuestro estudio unidos a los encontrados por HEATH *et al.* (1997) podrían haberse debido a alteraciones fisiológicas derivadas de su acción en el intestino medio.

Curiosamente, cuando se alimentó a las larvas con dos o tres inhibidores mezclados en la dieta se observó un efecto sinérgico sobre la mortalidad, lo cual redujo la supervivencia hasta un 10-12,5%. La acción complementaria de estos inhibidores puede explicar su efecto sinérgico al proporcionárselos juntos a las larvas. Existen otros ejemplos de efectos sinérgicos de inhibidores de proteasas en distintos insectos. BURGESS *et al.* (1994) observaron un efecto sinérgico de la combinación de inhibidores de proteasas en la supervivencia y el crecimiento de *Teleogryllus commodus* (Orthoptera: Gryllidae). OPPERT *et al.* (1993) encontraron que la mezcla de inhibidores de serín- y cisteín-proteasas en la dieta producía una toxicidad sinérgica en larvas de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Por último, MARKWICK *et al.* (1995) indicaron que cuando las larvas de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) eran alimentadas con dietas a las

que se incorporaban inhibidores de proteasas, la reducción de la tasa de crecimiento era mayor cuando se combinaban varios inhibidores.

Los resultados obtenidos sobre el uso de inhibidores de proteasas para alterar la digestión de las proteínas de *A. mariae franciscae* constituyen un acercamiento al conocimiento de sus procesos digestivos, que podrían emplearse en un futuro para su control, mediante la transferencia de esta capacidad de inhibición a las plantas de remolacha azucarera.

# Conclusiones

1. Se ha desarrollado una nueva dieta artificial para la cría de *A. mariaefranciscae* en el laboratorio, que cumple los requerimientos nutricionales que necesita esta especie para su correcto desarrollo y reproducción, y con la cual se consigue un alto porcentaje de supervivencia (78%) de la población. Su ventaja más significativa respecto a anteriores dietas es que se mantiene libre de microorganismos durante más de una semana, lo cual disminuye la mortalidad debida al exceso de manejo con el consiguiente ahorro de tiempo.
2. Tanto la temperatura como el fotoperiodo influyen en el tiempo del desarrollo larvario y en el porcentaje de pupación de *A. mariaefranciscae*. Existen, además, interacciones entre ambas variables, que afectan especialmente al último estadio larvario, pudiendo llegar a detener su desarrollo e impedir la pupación. Se ha sugerido que este curculiónido podría sufrir una diapausa facultativa durante este estadio, pero serían necesarios nuevos experimentos para confirmarlo.
3. La fecundidad de *A. mariaefranciscae* se relaciona directamente con la temperatura, y de todas las estudiadas la más adecuada para la oviposición fue 26°C. A pesar de su condición de plaga, la fecundidad no fue muy elevada. La razón de su éxito reproductivo se debe a una alta fertilidad de los huevos (superior 90% en todas las condiciones ensayadas), a que deposita los huevos en el interior de los tejidos vegetales, al largo período de oviposición, y a la falta de sincronización entre las hembras.
4. *A. mariaefranciscae* presenta una diapausa reproductora, ya que los imagos no inician la reproducción hasta pasado un periodo superior a dos meses desde su emergencia. En unas condiciones de fotoperiodo de 16:8 h (L:O) *A. mariaefranciscae* exhibió un largo periodo de preoviposición de 106 días y la

fecundidad fue de 39 huevos por hembra, mientras que a 9:15 este periodo se acortó a 80 días y la fecundidad se incrementó a 73 huevos.

5. La aplicación tópica del análogo de la hormona juvenil piriproxifén sobre adultos de *A. mariaefranciscae* no produjo ningún efecto sobre la fecundidad, fertilidad y desarrollo de la progenie, por lo que este insecticida no es una buena opción a tener en cuenta en el control de esta plaga.
6. La aplicación tópica del análogo de la hormona de la muda halofenocida sobre adultos de *A. mariaefranciscae* produce un descenso de la supervivencia de la progenie debido a que induce una muda prematura. Las larvas neonatas inician el proceso de formación de una nueva cutícula sin llegar a desprenderse de la vieja, lo que ocasiona su muerte.
7. Sólo un pequeño porcentaje del halofenocida-[C<sup>14</sup>] aplicado tópicamente se incorporó a los huevos de *A. mariaefranciscae*, siendo suficiente para la alteración del desarrollo de las larvas recién emergidas. Los efectos observados sugieren que el halofenocida puede alterar los procesos fisiológicos dependientes de los ecdisteroides relacionados con el desarrollo del embrión.
8. La aplicación del inhibidor de síntesis de quitina hexaflumurón sobre adultos de *A. mariaefranciscae* ocasiona un prolongado periodo de inhibición de la eclosión de los huevos y una alta mortalidad de las larvas de la siguiente generación. El efecto es mayor cuando el insecticida se aplica tópicamente que cuando la aplicación es foliar. Las hembras son las principales responsables de la transmisión del hexaflumurón a la progenie. La actividad ovicida es particularmente alta para los huevos de menos de 24 horas, debido a que representa un momento crítico para la penetración del compuesto o bien para la síntesis de quitina.
9. El tratamiento tópico con hexaflumurón sobre adultos de *A. mariaefranciscae* ocasiona importantes anomalías y claros síntomas de desorganización en la ultraestructura del tegumento de los embriones formados. La procutícula es la capa más afectada. La exo- y la endocutícula pierden por completo su estructura y

no muestran la típica organización lamelada, lo cual parece estar relacionado con la disposición irregular de las capas de quitina-proteína, que llevan al debilitamiento y a la posterior muerte del embrión.

10. La alta efectividad de bajas dosis de hexaflumurón mediante aplicación tópica o foliar via adultos como inhibidor de la eclosión de los huevos *de A. mariaefranciscae* hace que sea un compuesto interesante para el control de esta plaga.
11. Las larvas alimentadas desde su emergencia hasta la pupación sobre dietas que contenían los inhibidores de serín proteasas SBBI, STI, TEI o LBI mostraron bajas tasas de supervivencia, retrasos en el tiempo de desarrollo y dificultades en el momento de la pupación y emergencia del adulto. Los niveles más altos de mortalidad se encontraron en las larvas alimentadas con dietas en las que se habían combinado dos o tres inhibidores, sugiriendo un efecto sinérgico de los mismos.

# Bibliografía

- AIMCRA. 1998. *Memoria de los trabajos efectuados en la campaña 1997/98, siembra otoño 1996, zona sur*. AIMCRA, Sevilla.
- ALLER H. E. y J. R. RAMSAY. 1988. RH-5849 – A novel insect growth regulator with a new mode of action. *Proc. Brighton Crop Protection Conference –Pests and Diseases*, 2: 511-518.
- ANDREWARTHA, H. G. y L. C. BIRCH. 1984. *The Ecological Web*. Chicago University Press, Chicago.
- ANÓNIMO. 1997. *Anuario de Estadística Agraria*. MAPA, Madrid.
- ASCERNO, M. E.; Z. SMILOWITZ y A. A. HOWER, JR. 1981. Effects of the insect growth regulator hydroprene on diapausing alfalfa weevils. *Environ. Entomol.*, 10: 501-505.
- ASCHER, K. R. S. y N. E. NEMNY. 1976. Contact activity of diflubenzuron against *Spodoptera littoralis* larvae. *Pestic. Sci.*, 7: 447-452.
- ASCHER, K. R. S.; N. E. NEMNY; D. BLUMBERG y S. GOLDENBERG. 1986. Egg-sterilizing effect of benzoylphenilureas via the adult stage of the nitidulid beetle *Carpophilus hemipterus*. *Phytoparasitica*, 14: 187-192.
- AUDA, M.; M. F. EL SAIDY y D. DEGHEELE. 1991. Toxicity, retention and distribution of [<sup>14</sup>C]hexaflumuron in the last larval instar of *Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. *Pestic. Sci.*, 32: 419-426.
- AYALA, J.; M. DOMÍNGUEZ; A. TABERNER y P. CASTAÑERA. 1994. Biología, ecología y medidas de protección del *Aubeonymus mariaefranciscae*. *AIMCRA Actualidad remolachero-azucarera*, 41: 38-42.
- BAKER, J. E. 1982. Digestive proteinases of *Sitophilus* weevils (Coleoptera: Curculionidae) and their response to inhibitors from wheat and corn flour. *Can. J. Zool.*, 60: 3206-3214.
- BAKER, J. E. y J. M. MABIE. 1973. *Tribolium confusum*: food additives as ovicides. *J. Econ. Entomol.*, 66: 765-767.
- BALACHOWSKY, A. S. 1963. *Entomologie appliquée à l'agriculture. Tomo 1. Coléoptères, Vol. 2*. Masson et Cie (eds.), París.
- BASS, M. H. y E. E. BARNES. 1969. Toxicities of antimicrobial agents to white-

- fringed beetle larvae and the effectiveness of certain of these agents against microbial growth. *J. Econ. Entomol.*, 62: 718-719.
- BECK, S. D. 1983. Insect photoperiodism. *Ann. Rev. Entomol.*, 28: 91-108.
- BEEMAN, R. W. 1982. Recent advances in mode of action of insecticides. *Ann. Rev. Entomol.*, 27: 253-281.
- BELL, C. H. y C. R. BOWLEY. 1980. Effect of photoperiod and temperature on diapause in a Florida strain of the tropical warehousemoth *Ephesia cautella*. *J. Insect Physiol.*, 26: 533-538.
- BELLÉS, X. 1988. Las hormonas endocrinas de los insectos. Bases conceptuales para el diseño de insecticidas biorracionales. En: *Insecticidas biorracionales*. Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid. Pp. 15-67.
- BILLINGS, P. C.; W. H. ST. CLAIR; P. A. MAKI y A. R. KENNEDY. 1992. Distribution of the Bowman Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Letters*, 62: 191-197.
- BINNINGTON, K. C. 1985. Ultrastructural changes in the cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, induced by certain insecticides and biological inhibitors. *Tissue Cell*, 17: 131-140.
- BINNINGTON, K. C. 1993. Ultrastructure of the attachment of the bacteria *Serratia entomophila* to foregut cuticle of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabidae) and a review of nomenclature for insect epicuticular layers. *Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.* 22: 145-155.
- BINNINGTON, K. C.; A. RETNAKARAN; S. STONE y P. SKELLY. 1987. Studies on cyromazine and diflubenzuron in the sheep blowfly *Lucilia cuprina*: inhibition of vertebrate and bacterial dihydrofolate. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 27: 201-210.
- BLAND, R. G. 1971. Photoperiod-diapause relationships in the alfalfa-weevil, *Hypera postica*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 64: 1163-1166.
- BOTELLA, M. A.; Y. XU; T. N. PRABHA; Y. ZHAO; M. L. NARASIMHAN; K. A. WILSON; S. S. NIELSEN; R. A. BRESSAN y P. M. HASEGAWA. 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 112: 1201-1210.
- BOUSH, G. M.; F. V. DUNKEL y V. E. BURKHOLDER. 1968. Progeny suppression of *Attagenus megatoma* and *Trogoderma parabile* by dietary factors. *J. Econ. Entomol.*, 61: 644-646.
- BOWERS, W. S. 1982. Endocrine strategies for insect control. *Ent. exp. appl.*, 31: 3-14.
- BRABY, M. F. y R. E. JONES. 1995. Reproductive patterns and resource allocation in tropical butterflies: influence of adult diet and seasonal phenotype on fecundity, longevity and egg size. *Oikos*, 72: 189-204.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BRIESE, D. T. 1996. Oviposition choice by the *Onopordum capitulum* weevil *Larymus latus* (Coleoptera: Curculionidae) and its effect on the survival of immature stages. *Oecologia*, 105: 464-474.
- BROWN, J. R. y J. R. PHILLIPS. 1990. Diapause in *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 83: 1125-1129.
- BROWN, J. R. y J. R. PHILLIPS. 1991. Thermoperiod effects on diapause induction in *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Environ. Entomol.*, 20: 1444-1446.
- BULL, D. L. y R. W. MEOLA. 1993. Effect and fate of the insect growth regulator pyriproxyfen after application to the horn fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.*, 86: 1754-1760.
- BURGESS, E. P. J.; C. A. MAIN; P. S. STEVENS; J. T. CHRISTELLER; A. M. R. GATEHOUSE y W. A. LAING. 1994. Effects of protease inhibitor concentration and combinations on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. *J. Insect Physiol.*, 40: 803-811.
- BURKHOLDER, W. E.; C. P. SCHWALBE y G. M. BOUSH. 1973. Antimicrobial food additives and their effect on *Trogoderma variabile* and *Attageus megatoma* (Coleoptera, Dermestidae). *J. stored Prod. Res.*, 9: 205-211.
- CABEZUELO, P. y C. SANTIAGO-ALVAREZ. 1981. Dimorfismo sexual en pupas y adultos de *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae) plaga de la remolacha. *Bol. Serv. Plagas*, 7: 207-210.
- CARBONERO, P.; J. ROYO; I. DIAZ; F. GARCIA-MAROTO; E. GONZALEZ-HIDALGO; C. GUTIERREZ y P. CASTAÑERA. 1992. Cereal inhibitors of insect hydrolases ( $\alpha$ -amylases and trypsin): genetic control, transgenic expression and insect tests, En: *Third International Workshop on Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, Arolla, Switzerland. Pp. 16-20.
- CARPENTER, J. E. y L. D. CHANDLER. 1994. Effects of sublethal doses of two insect growth regulators on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) reproduction. *J. Entomol. Sci.*, 29:428-435.
- CASIDA, J. E. y G. B. QUISTAD. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 1-16.
- CLARKE, B. S. y P. J. JEWESS. 1990. The uptake, excretion and metabolism of the acylurea insecticide, flufenoxuron in *Spodoptera littoralis* larvae, by feeding and topical application. *Pestic. Sci.*, 28: 357-365.
- COHEN, E. 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Ann. Rev. Entomol.*, 32: 71-93.
- COWLES, R. S. y M. G. VILLANI. 1996. Susceptibility of Japanese beetle, Oriental beetle, and European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) to halofenozide, an

- insect growth regulator. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1556-1565.
- COWLES, R. S.; S. R. ALM y M. G. VILLANI. 1999. Selective toxicity of halofenozide to exotic white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.*, 92: 427-434.
- CHAMBERS, D. L. 1977. Quality control in mass rearing. *Annu. Rev. Entomol.*, 22: 289-308.
- CHECHLACZ, M.; J. MICHALIK y B. CYMBOROWSKI. 1998. Suboptimal temperature-dependent changes in the brain development and activity in *Galleria mellonella* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 38: 66-73.
- CHIPPENDALE, G. M. y A. S. REDDY. 1973. Temperature and photoperiodic regulation of diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *J. Insect Physiol.*, 19: 1397-1408.
- CHIPPENDALE, G. M. y S. D. BECK. 1964. Nutrition of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). V. Ascorbic acid as the corn leaf factor. *Entomol. exp. Appl.*, 7: 241-248.
- CHRISTELLER, J. T. y B. D. SHAW. 1989. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. *Insect Biochem.*, 19: 233-241.
- CHRISTELLER, J. T.; B. D. SHAW; S. E. GARDINER y J. DYMCK. 1989. Partial purification and characterization of the major midgut proteases of grass grub larvae (*Costelytra zealandica*, Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochem.*, 19: 221-231.
- DARVAS, B.; L. POLGÁR; M. H. TAG EL-DIN; K. ERÖSS y K. D. WING. 1992. Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH-5849. *J. Econ. Entomol.*, 85: 2107-2112.
- DAUMAL, J. y H. BOINEL. 1994. Variability in fecundity and plasticity of oviposition behavior in *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 250-256.
- DAVIES, R. G. 1991. *Introducción a la Entomología*. Mundi-Prensa, Madrid.
- DE CLERCQ, P.; A. DE COCK; L. TIRRY; E. VIÑUELA y D. DEGHEELE. 1995. Toxicity of diflubenzuron and pyriproxifen to the predatory bug *Podisus maculiventris*. *Entom. exp. appl.*, 74: 17-22.
- DEGHEELE, D. 1990. Chitin synthesis inhibitors: effects on cuticle structure and components. En: *Pesticides and alternatives*. Casida, J. E. (ed.). Elsevier Science Publishers, B. V. (Biomedical Division). Pp. 377-388.
- DHADIALLA T. S.; G. R. CARLSON y D. P. LE. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 545-569.
- DING, L. C.; C. Y. HU; K. W. YEH y P. J. WANG. 1998. Development of insect-resistant transgenic cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from local sweet potato. *Plant Cell Reports*, 17: 854-860.

- DOMINGO, P. 1988. Actualidad y perspectivas de desarrollo comercial de los insecticidas biorracionales. En: *Insecticidas biorracionales*. Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid. Pp. 379-405.
- DUNKEL, F. V. y N. R. READ. 1986. Sorbic acid as a long-term protectant in stored corn. *J. Econ. Entomol.*, 79: 805-812.
- DUNKEL, F. V. y N. R. READ. 1991. Review of the effect of sorbic acid on insect survival in rearing diets with reference to other antimicrobials. *Am. Entomol.*, 37: 172-178.
- DUNKEL, F. V.; P. Z. LUNG; L. CHUAN y H. F. YIN. 1982. Insect and fungal response to sorbic acid-treated wheat during storage in South China. *J. Econ. Entomol.*, 75: 1083-1088.
- EIZAGUIRRE, M.; C. LÓPEZ; L. ASIN y R. ALBAJES. 1994. Thermoperiodism, photoperiodism and sensitive stage in the diapause induction of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.*, 40: 113-119.
- ELDEN, T. C. 1995. Selected proteinase inhibitor effects on alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) growth and development. *J. Econ. Entomol.*, 88: 1586-1590.
- ELEK, J. A. y B. C. LONGSTAFF. 1994. Effect of chitin synthesis inhibitors on stored-product beetles. *Pestic. Sci.*, 40: 225-230.
- ELLSBURY, M. M. 1991. Development of the clover stem borer (Coleoptera: Languridae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.*, 20: 1181-1186.
- FAKTOR, O. y M. RAVIV. 1997. Inhibition of molt in *Spodoptera littoralis* larvae treated with soybean Bowman-Birk protease inhibitor. *Entomol. Exp. Appl.*, 82: 109-113.
- FANTINO, A. A.; M. G. KARANDINOS y J. A. TSITSIPIS. 1995. Diapause induction in the *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) Effect of photoperiod and temperature. *Environ. Entomol.*, 24: 1458-1466.
- FANTINO, A. A.; J. A. TSITSIPIS y M. G. KARANDINOS. 1996. Effects of short- and long-day photoperiods on growth and development of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.*, 25: 1337-1343.
- FARINÓS, G. P., A. TABERNER; V. MARCO y P. CASTAÑERA. 1999. Development of an artificial larval diet for a new sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae), and its oviposition behaviour. *J. Econ. Entomol.*, 92: 351-356.
- FERREIRA, C. y W. R. TERRA. 1989. Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochem.*, 19: 383-391.
- FILSHIE, B. K. 1982. Fine structure of the cuticle of insects and other arthropods. En: *Insect Ultrastructure*, King y Akay (eds.). Plenum Press, New York. Pp. 281-312.

- FISK, T.; J. COOPER y D. J. WRIGHT. 1993. Control of *Spodoptera* spp. using ULV formulations of the acylurea insect growth regulator, flufenoxuron: field studies with *Spodoptera exempta* and effect of toxicant concentration on contact activity. *Pestic. Sci.*, 39: 79-83.
- FORNASARI, L. y R. SOBHIAN. 1993. Life history of *Eustenopus villosus* (Coleoptera: Curculionidae), a promising biological control agent for yellow starthistle. *Environ. Entomol.*, 22: 684-692.
- FRICK, K. E. y R. F. WILSON. 1982. Some factors influencing the fecundity and flight potential of *Bactra verutana*. *Environ. Entomol.*, 11:181-186.
- GANGAVALLI, R. R. y M. T. ALINIAZEE. 1985. Diapause induction in the oblique-banded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): role of photoperiod and temperature. *J. Insect Physiol.*, 31: 831-835.
- GANYARD, M. C.; J. R. BRADLEY JR.; F. J. BOYD y J. R. BRAZZEL. 1977. Field evaluation of diflubenzuron (Dimilin) for control of boll weevil reproduction. *J. Econ. Entomol.*, 70: 347-350.
- GARCÍA-OLMEDO, F.; G. SALCEDO; R. SANCHEZ-MONGE; L. GOMEZ; J. ROYO y P. CARBONERO. 1987. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and  $\alpha$ -amylases. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 4: 275-334.
- GATEHOUSE, A. M. R.; J. A. GATEHOUSE; P. DOBIE; A. M. KILMINSTER y D. BOULTER. 1979. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.*, 30: 948-958.
- GERBER, G. H. 1995. Fecundity of *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Can. Entomol.*, 127: 263-264.
- GIEBULTOWICZ, J. M.; M. B. BLACKBURN; P. A. THOMAS-LAEMONT y A. K. RAINA. 1993. Sterilization of the gypsy moth by disruption of sperm release from testes. En: *ACS Conf. Proc. Ser., Pest Manage.: Biol. Based Technol.* Lumsden, R. D. y J.L.Vaughn (eds.). Amer. Chem. Soc., Washington DC. Pp. 114-116.
- GIRALDO, G. y M. ALVARADO. 1990a. Estudios sobre "*Aubeonimus mariaefranciscae* Roud". Plaga de la remolacha. *Cuadernos de Fitopatología*, 24: 116-121.
- GIRALDO, G. y M. ALVARADO. 1990b. Distribución geográfica de *Aubeonimus mariaefranciscae* Roud. (Coleoptera: Curculionidae) plaga de la remolacha. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16: 399-404.
- GNATZY, W. y F. ROMER. 1986. Cuticle: Formation, moulting and control. En: *Biology of the integument. Vol. 1. Invertebrates, Cap. VIII: Arthropoda.* Bereiter-Hahn, J.; A. G. Matultsy y K. Richards (eds.). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 638-684.
- GONZÁLEZ-MELENDE, P.; P. S. TESTILLANO; P. AHMADIAN; B. FADÓN; O. VICENTE y M. C. RISUEÑO. 1995. In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in Capsicum. *Protoplasma*, 187: 60-71.

- GOUGH, N. y J. D. BROWN. 1991. Development of larvae of the whitefringed weevil, *Graphognathus leucoloma* (Coleoptera: Curculionidae), in northern Queensland. *Bull. Entomol. Res.*, 81: 385-393.
- GRAHAM, J.; S. C. GORDON y R. J. MCNICOL. 1997. The effect of the CpTi gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiornhynchus sulcatus* F. Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Appl. Biol.*, 131: 133-139.
- GRANETT, J. 1987. Potential of benzoylphenyl ureas in integrated pest management. En: Wright, J. E. y A. Retnakaran (eds.). *Chitin and benzoylphenyl ureas*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 283-302.
- GRANETT, J.; J. ROBERTSON y A. RETNAKARAN. 1980. Metabolic basis of differential susceptibility of two forest lepidopterans to diflubenzuron. *Ent. exp. appl.*, 28: 295-300.
- GRAU, V. y R. LAFONT. 1994. The distribution of ecdysone metabolites within the body adult *Drosophila melanogaster* females and their sites of production. *J. Insect. Physiol.*, 40: 87-96.
- GROSSCURT, A. C. 1977. Mode of action of diflubenzuron as an ovicide and some factors influencing its potency. *Proc. Br. Crop Prot. Conf.*, 1: 141-147.
- GROSSCURT, A. C. 1978. Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities. *Pestic. Sci.*, 9: 373-386.
- GROSSCURT, A. C.; M. HAAR; B. JONGSMA y A. STOKER. 1988. PH 70-23: a new acaricide and insecticide interfering with chitin deposition. *Pestic. Sci.*, 22: 51-59.
- HACKMAN, R. H. 1971. The integument of arthropoda. En: *Chemical Zoology. Vol. 6*. Florkin, M. y B. T. Scheer (eds.). Academic Press, New, York. Pp. 1-62.
- HACKMAN, R. H. 1987. Chitin and the fine structure of cuticles. En: Wright, J. E. y A. Retnakaran (eds.). *Chitin and benzoylphenyl ureas*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 1-32.
- HAGEDORN, H. H. 1985. The role of ecdysteroids in reproduction. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 8*. Kerkut, G. A. y L. I. Gilbert (eds). Pergamon Press, Oxford. Pp. 205-262.
- HASSAN, A. E. M. y A. K. CHARNLEY. 1987. The effect of Dimilin on the ultrastructure of the integument of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 33: 669-676.
- HATAKOSHI, M. 1992. An inhibitory mechanism over oviposition in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* by juvenile hormone analogue pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.*, 38: 793-801.
- HAYNES, J. W. y J. W. SMITH. 1993. Test of a new growth regulator for boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) by dipping and feeding. *J. Econ. Entomol.* 86: 310-313.

- HEATH, R. L.; G. McDONALD; J. T. CHRISTELLER; M. LEE; K. BATEMAN; J. WEST; R. VAN HEESWIJCK y M. A. ANDERSON. 1997. Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *J. Insect Physiol.*, 43: 833-842.
- HEPBURN, H. E. 1985. Structure of the integument. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 3*. G. A. Kerkut y L. I. Gilbert (eds.). Pergamon Press, Oxford. Pp. 1-58.
- HEPBURN, H. R. y JOFFE, I. 1976. On the material properties of insect exoskeletons. En: *The insect integument*. H. R. Hepburn (ed.). Elsevier Scientific, Amsterdam. Pp. 207-235.
- HIGBEE, B. S.; D. R. HORTON y J. L. KRYSAN. 1995. Reduction of egg hatch in pear psylla (Homoptera: Psyllidae) after contact by adults with insect growth regulators. *J. Econ. Entomol.*, 88: 1420-1424.
- HILDER, V. A.; A. M. R. GATEHOUSE; S. E. SHEERMAN; R. F. BARKER y D. BOULTER. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160-163.
- HODEK, I. y M. HODKOVÁ. 1988. Multiple role of temperature during insect diapause: a review. *Entomol. exp. appl.*, 49: 153-165.
- HOFFMANN, J. A. y M. LAGUEUX. 1985. Endocrine aspects of embryonic development in insects. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 1*. Kerkut, G.A. y L.I. Gilbert (eds.). Pergamon Press, Oxford. Pp. 435-460.
- HOLST, H. 1974. Die fertilitätsbeeinflussende Wirkung des neuen Insektizids PDD 60-40 bei *Epilachna varivestis* Muls. (Col. Coccinellidae) und *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col. Chrysomelidae). *Z. PflKrankh. PflSchutz*, 81: 1-7.
- HOROWITZ, A. R. e I. ISHAAYA. 1994. Managing resistance to insect growth regulators in the sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 866-871.
- HOROWITZ, A. R.; M. KLEIN; S. YABLONSKI e I. ISHAAYA. 1992. Evaluation of benzoylphenyl ureas for controlling the spiny bollworm, *Earias insulana* (Boisd.), in cotton. *Crop Protection*, 11: 465-469.
- HOUSEMAN, J. G.; B. J. R. PHILOGÈNE y A. E. R. DOWNE. 1989. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Can. J. Zool.*, 67: 864-868.
- HOYING, S. A. y D. H. RIEDL. 1980. Susceptibility of the codling moth to diflubenzuron. *J. Econ. Entomol.*, 73: 556-560.
- HSIAO, T. H. y C. HSIAO. 1974a. A practical artificial diet for laboratory rearing of the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 67: 149-150.

- HSIAO, T. H. y C. HSIAO. 1974b. Feeding requirements and artificial diets for the alfalfa weevil. *Entomol. Exp. Appl.*, 17: 83-91.
- HSIAO, T. H. y C. HSIAO. 1979. Ecdysteroids in the ovary and the egg of the greater wax moth. *J. Insect Physiol.*, 25: 45-52.
- HUNT, D. W. A.; G. LINTEREUR y K. F. RAFFA. 1992. Rearing method for *Hylobius radicis* and *H. pales* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.*, 85: 1873-1877.
- IMBODEN, H. y B. LANZREIN. 1982. Investigations on ecdysteroids and juvenile hormones and on morphological aspects during early embryogenesis in the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. *J. Insect. Physiol.*, 28: 37-46.
- ISHAAYA, I. 1990. Benzoylphenyl ureas and other selective insect control agents-mechanisms and application. En: *Pesticides and alternatives*. Casida, J. E. (ed.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 365-376.
- ISHAAYA, I. y A. R. HOROWITZ. 1992. Novel phenoxy juvenile hormone analog (pyriproxyfen) suppresses embryogenesis and adult emergence of sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.*, 85: 2113-2117.
- ISHAAYA, I. y A. R. HOROWITZ. 1995. Pyriproxifen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: mechanism and resistance management. *Pestic. Sci.*, 43: 227-232.
- ISHAAYA, I.; A. DE COCK, y D. DEGHEELE. 1994. Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.*, 87: 1185-1189.
- ISHIHARA, M. y M. SHIMADA. 1994. Causes of reproductive inactivity and recovery of reproductive ability after diapause in females of a multivoltine bruchid, *Kytorhinus sharpianus* (Coleoptera: Bruchidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 532-537.
- IVIE, G. W. y J. E. WRIGHT. 1978. Fate of diflubenzuron in the stable fly and house fly. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 90-94.
- JANDEL CO. 1994. *Table Curve™ 2D. User's Manual Jandel Corporation*. San Rafael, CA.
- JANSSON, R. K. y A. G. B. HUNSBERGER. 1991. Diel and ontogenetic patterns of oviposition in the sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.*, 20: 545-550.
- JIKUMARU, S.; K. TOGASHI; A. TAKETSUNE y F. TAKAHASHI. 1994. Oviposition biology of *Monochamus saltuarius* (Coleoptera: Cerambycidae) at a constant temperature. *Appl. Entomol. Zool.*, 29: 555-561.
- JOHNSTON, K. A.; J. A. GATEHOUSE y J. H. ANSTEE. 1993. Effects of soybean proteinase inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.*, 39: 657-664.
- JONGSMA, M. A. y C. BOLTER. 1997. The adaptation of insects to plant protease

- inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43: 885-895.
- KAAKEH, W.; M. E. SCHARF y G. W. BENNET. 1997. Comparative contact activity and residual life of juvenile hormone analogs used for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. *J. Econ. Entomol.*, 90: 1247-1253.
- KAMATA, N. y M. IGARASHI. 1995. Relationship between temperature, number of instars, larval growth, body size, and adult fecundity of *Quadricalcarifera punctatella* (Lepidoptera: Notodontidae): cost-benefit relationship. *Environ. Entomol.*, 24: 648-656.
- KARILUOTO, K. T. 1978. Optimum levels of sorbic acid and methyl-p-hydroxybenzoate in an artificial diet for *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) larvae. *Ann. Entomol. Fenn.*, 44: 94-97.
- KAYS, S. J.; J. A. HARRISON; D. D. WILSON y R. F. SEVERSON. 1993. Semiartificial diet for the sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.*, 86: 957-961.
- KIM, G.-H.; Y. J. AHN y K. Y. CHO. 1992. Effects of diflubenzuron on longevity and reproduction of *Riptortus clavatus* (Hemiptera: Alydidae). *J. Econ. Entomol.*, 85: 664-668.
- KNAPP, F. W. y J. E. CLEK. 1988. Mortality of eggs and larvae obtained from house flies (Diptera: Muscidae) exposed to triflumuron residues. *J. Econ. Entomol.*, 81: 1662-1664.
- KOEHLER, P. G. y R. S. PATTERSON. 1989. Effects of chitin synthesis inhibitors on German cockroach (Orthoptera: Blattellidae) mortality and reproduction. *J. Econ. Entomol.*, 82: 143-148.
- KOGAN, M. 1975. Plant resistance in pest management. En: *Introduction to insect pest management*. Metcalf, R. L. y W. H. Luckmann (eds.). Wiley, New York. Pp. 103-146.
- KOMBLAS, K. N. y R. C. HUNTER. 1986. A benzoylphenyl urea for rational control of pests on fruit and vegetables. En: *Proceedings British Crop Protection Conference-Pests and Diseases*. Pp. 907-914.
- KUNKEL, J. G. y J. H. NORDIN. 1985. Yolk proteins. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 1*. Kerkut, G. A. y L. I. Gilbert (eds.). Pergamon, Oxford. Pp. 83-111
- KURODA, M.; M. ISHIMOTO; K. SUZUKI; H. KONDO; K. ABE; K. KITAMURA y S. ARAI. 1996. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insect pests, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60: 209-212.
- LAGUEUX, M.; C. HETRU; F. GOLTZENÉ; C. KAPPLER y J. A. HOFFMAN. 1979. Ecdysone titre and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.*, 25:709-723.

- LANGLEY, P. A.; V. HOWL y H. OOUCHI. 1990. Regulation of reproduction in *Rhodnius prolixus* by the juvenile hormone mimic pyriproxifen. *Entomol. Exp. Appl.*, 57: 271-279.
- LASKOWSKI, M. J. y I. KATO. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 593-626.
- LAVEISSIERE, C. y B. SANE. 1994. Régulateur de croissance et piégeage pour la lutte contre *Glossina palpalis palpalis* en Côte d'Ivoire: essai sur le terrain de l'OMS 3019 (Pyriproxifen SUMITOMO). *Insect Sci. Appl.*, 15: 105-110.
- LAWRENCE, P. O. 1992. Egg development in *Anastrepha suspensa*: influence of the ecdysone agonist, RH 5849. En: *Fruit flies: recent advances in research and control programs*. Aluja, M. y P. Liedo (eds.). Springer-Verlag, New York. Pp. 51-56.
- LEATHER, S. R. 1994. The effect of temperature on oviposition, fecundity and egg hatch in the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull. Entomol. Res.*, 84: 515-520.
- LEFEVERE, K. S. y C. A. D. DE KORT. 1989. Adult diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: effects of external factors on maintenance, termination and post-diapause development. *Physiol. Entomol.*, 14: 299-308.
- LENGA, A. y J. HUIGNARD. 1992. Effect of changes in the thermoperiod on reproductive diapause in *Brachidius atrolineatus* Pic (Coleoptera: Bruchidae). *Physiol. Entomol.*, 17: 247-254.
- LEONARD, P. K.; M. N. RICHES y M. HOWARD. 1987. Extended Summaries Pesticides Group Symposium Acylurea Insecticides. *Pestic. Sci.*, 20: 157-159.
- LEOPOLD, R. A.; E. P. MARKS; J. K. EATON y J. KNOPER. 1985. Ecdysial failures in the cotton boll weevil: synergism of diflubenzuron with juvenile hormone. *Pestic. Biochem Physiol.*, 24: 267-283.
- LEORA SOFTWARE. 1987. *POLO-PC, user's guide to probit or logit analysis*. LeOra Software Inc., Berkeley, CA.
- LETELLIER, C.; E. HAUBRUGE y C. GASPARD. 1995. Biological activity of fenoxycarb against *Sitophilus zeamais* Motsch., (Coleoptera: Curculionidae). *J. stored Prod. Res.*, 31: 37-42.
- LIM, J. L. y H. H. YAP. 1996. Induction of wing twisting abnormalities and sterility on German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) by a juvenoid pyriproxifen. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1161-1165.
- LOEB, M. J. 1993. Hormonal control of growth and reproduction in the arthropods: introduction to the symposium. *Amer. Zool.*, 33: 303-307.
- LOEB, M. J.; C. W. WOODS; E. P. BRANDT y A. B. BORKOVEC. 1982. Larval testes of the tobacco budworm: a new source of insect ecdysteroids. *Science*, 218: 896-898.
- LOEB, M. J.; E. P. BRANDT; C. W. WOODS y A. B. BORKOVEC. 1987. An

- ecdysiotropic factor from brains of *Heliothis virescens* induces testes to produce immunodetectable ecdysteroids in vitro. *J. Exp. Zool.*, 243: 275-282.
- MADUBUNYI, L. CH. 1978. External environmental factors regulating imaginal diapause in *Hypera brunneipennis*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 71: 37-39.
- MALINOWSKI, H. y M. PAWINSKA. 1992. Comparative evaluation of some chitin synthesis inhibitors as insecticides against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Pestic. Sci.*, 35: 349-353.
- MARCO, M. P. y J. TOMÁS. 1988. Hormonas de muda y antagonistas. En: *Insecticidas biorracionales*. Nuevas Tendencias, CSIC, Madrid. Pp. 179-226.
- MARCO, V. y E. VIÑUELA. 1994. Effects of hexaflumuron on fecundity, fertility and longevity of *Ephestia kuehniella* Zeller and *Spodoptera exigua* (Hübner). *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59: 457-463.
- MARCO, V. y P. CASTAÑERA. 1996. Eficacia de aplicaciones foliares de insecticidas con Torre de Potter, sobre adultos de *Aubeonymus mariaefranciscae* Roudier (Coleoptera: Curculionidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 22: 659-666.
- MARCO, V.; A. TABERNER y P. CASTAÑERA. 1997. Development and survival of immature *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90: 169-176.
- MARCO, V.; G. PÉREZ-FARINÓS y P. CASTAÑERA. 1998a. Effects of hexaflumuron on transovarial, ovicidal and offspring development of *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.*, 27: 812-816.
- MARCO, V.; J. F. LÓPEZ-OLGUÍN; F. ORTEGO y P. CASTAÑERA. 1998b. Restricted host range of the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae*, a new sugar-beet pest. *Entom. Exp. Appl.*, 87: 201-207.
- MARKWICK, N. P.; S. J. REID; W. A. LAING y J. T. CHRISTELLER. 1995. Effects of dietary protein and protease inhibitors on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, 88: 33-39.
- MARSHALL, L. D. 1990. Intraspecific variation in reproductive effort by female *Parapediasia teterrella* (Lepidoptera: Pyralidae) and its relation to body size. *Can. J. Zool.*, 68: 44-48.
- MASAKI, S. 1980. Summer diapause. *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 1-25.
- MASON, L. J. y T. P. MACK. 1984. Influence of temperature on oviposition and adult female longevity for the soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.*, 13: 379-383.
- MCDONALD, J. K. y A. J. BARRETT. 1986. *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography. Vol. 2: Exopeptidases*. Academic Press, London.
- MCGREGOR, R. 1997. Influence of photoperiod on larval development in the leafmining moth *Phyllonorycter mespilella*. (Lepidoptera: Gracillariidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90: 333-336.
- MCLAUGHLIN, R. E. 1978. Contact transfer of diflubenzuron (Dimilin®) by boll

- weevils and the relation of site of application and effect on egg hatch. *Entomol. Exp. Appl.*, 23: 171-176.
- MENDEL, Z.; D. BLUMBERG e I. ISHAAYA. 1994. Effects of some insect growth regulators on natural enemies of scale insects (Homoptera: Coccoidea). *Entomophaga*, 39: 199-209
- METCALF, R. L. 1990. Insecticidas en el manejo de plagas. En: *Introducción al manejo de plagas de insectos*. Limusa, México. Pp. 271-344.
- MILLER, T. A.; W. J. COOPER y J. W. HIGHFILL. 1982. Relationships between pupal size and egg production in reared female *Antheraea polyphemus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 75: 107-108.
- MITCHELL, E. B.; M. E. MERKL, J. E. WRIGHT, T. B. DAVICH y R. F. HEISER. 1980. Sterility of boll weevils in the field following treatment with diflubenzuron and gamma irradiation. *J. Econ. Entomol.*, 73: 824-826.
- MONTHÉAN, C. y D. A. POTTER. 1992. Effects of RH-5849, a novel insect growth regulator, on Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass. *J. Econ. Entomol.*, 85:507-513.
- MOORE, R. F.; R. A. LEOPOLD y H. M. TAFT. 1978. Boll weevils: mechanism of transfer of diflubenzuron from male to female. *J. Econ. Entomol.*, 71: 587-590.
- MOORE, R. F.; T. M. ODELL y C. O. CALKINS. 1985. Quality assessment in laboratory-reared insects. En: *Handbook of insect rearing, Vol. I*. Singh, P. y R. F. Moore (eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- MOSCARDI, F.; C. S. BARFIELD y G. E. ALLEN. 1981. Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch, and longevity. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74: 167-171.
- MURDOCK, L. L.; G. BROOKHART; P. E. DUNN; D. E. FOARD; S. KELLEY; L. KITCH; R. E. SHADE; R. H. SHUKLE y J. L. WOLFSON. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B: 783-787.
- NAGAI, K. 1990. Effects of a juvenile hormone mimic material, 4-phenoxyphenyl (RS)-2(2-pyridyloxy)propyl ether, on *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) and its predator *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae). *Applied Entomol. Zool.*, 25: 199-204.
- NECIBI, S. y M. J. LINIT. 1997. A new artificial diet for rearing *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 70: 145-146.
- NEUMAN, R. y W. GUYER. 1987. Biochemical and toxicological differences in the modes of action of the benzoylureas. *Pestic. Sci.*, 20: 147-156.
- NEVILLE, A. C. 1986. Cuticle: organization. En: *Biology of the integument. Vol. I. Invertebrates, Cap. VIII: Arthropoda*. Bereiter-Hahn, J.; A. G. Matultsy y K. Richards (eds.). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 611-625.
- NORLANDER, G.; H. NORDENHEM y H. BYLUND. 1997. Oviposition patterns of the pine weevil *Hylobius abietis*. *Entomol. exp. appl.*, 85: 1-9.

- NOWIERSKI, R. M.; Z. ZENG y A. L. SCHAREN. 1995. Age-specific life table modeling of the russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on barley grown in benzimidazole agar. *Environ. Entomol.*, 24: 1284-1290.
- OBERLANDER, H.; D. L. SILHACEK; E. SHAAYA e I. ISHAAYA. 1997. Current status and future perspectives of the use of insect growth regulators for the control of stored product insects. *J. stored Prod. Res.*, 33: 1-6.
- OPPERT, B.; T. D. MORGAN; C. CULBERTSON y K. J. KRAMER. 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C: 379-385.
- ORTEGO, F.; G. P. FARINÓS; M. RUÍZ; V. MARCO y P. CASTAÑERA. 1998. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscas* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. *Entomol. Exp. Appl.*, 88: 265-274.
- OUYE, M. T. 1962. Effects of antimicrobial agents on micro-organisms and pink bollworm development. *J. Econ. Entomol.*, 55: 854-857.
- PALMA, K. G.; S. M. MEOLA y R. W. MEOLA. 1993. Mode of action of pyriproxyfen and methoprene on eggs of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.*, 30: 421-426.
- PALMER, J. O. y J. R. CATE. Overwintering survival of prereproductive and postreproductive boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) in Central Texas. *Environ. Entomol.*, 21: 117-120.
- PARKMAN, J. P. y J. H. FRANK. 1998. Development and reproduction of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae) after treatments with hydroprone and pyriproxyfen. *J. Econ. Entomol.*, 91: 392-397.
- PENER, M. P.; A. AYALI; G. KELMER; B. BENNETOVA; V. NEMEC; M. REJZEK y Z. WIMMER. 1997. Comparative testing of several juvenile hormone analogues in two species of locusts, *Locusta migratoria migratorioides* and *Schistocerca gregaria*. *Pestic. Sci.* 51: 443-449.
- PEREZ-FARINÓS, G.; G. SMAGGHE; V. MARCO; L. TIRRY y P. CASTAÑERA. 1998. Effects of topical application of hexaflumuron on adult sugar beet weevil, *Aubeonymus mariaefranciscas*, on embryonic development: pharmacokinetics in adults and embryos. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 61:169-182.
- PERNG, F. S.; M. C. YAO; C. F. HUNG y C. N. SUN. 1988. Teflubenzuron resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 1277-1282.
- PICKENS, L. G. y A. B. DE MILO. 1977. Face fly: inhibition of hatch by diflubenzuron and related analogues. *J. Econ Entomol.*, 70: 595-597.
- PINDER III, J. E.; J. G. WIENER y M. H. SMITH. 1978. The Weibull distribution: a new method of summarizing survivorship data. *Ecology*, 59: 175-179.

- PITTENDRIGH, B. R.; J. E. HUESING; R. E. SHADE y L. L. MURDOCK. 1997. Effects of lectins, CRY1A/CRY1B Bt  $\delta$ -endotoxin, PAPA, protease and  $\alpha$ -amylase inhibitors, on the development of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*, using an artificial seed bioassay. *Entomol. Exp. Appl.*, 82: 201-211.
- POWER, R. J. B. y P. SINGH. 1974. Laboratory rearing method for the stem weevil, *Hyperodes bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 1: 531-536.
- PURCELL, J. P.; J. T. GREENPLATE y R. D. SAMMONS. 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22: 41-47.
- PURCELL, M. y J. GRANETT. 1986. Differential age susceptibility of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) to chitin synthesis inhibitors and thuringiensin. *J. Econ. Entomol.*, 79: 1624-1626.
- RAO, K. D. P.; D. M. NORRIS y H. M. CHU. 1982. Ecdysteroids in adults, ovaries and eggs of *Xyleborus ferrugineus* (Coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochem.*, 12: 531-536.
- RAWLINGS, N. D. y A. J. BARRETT. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.*, 290: 205-218.
- REECK, G. R.; K. J. KRAMER; J. E. BAKER; M. R. KANOST; J. A. FABRICK y G. A. BEHNKE. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects, En: *Advances in Insect Control. The role of Transgenic Plants*. Carozzi, N. y M. Koziel (eds.). Taylor & Francis Ltd., London. Pp. 157-183.
- REICHENBACH, N. G. y G. R. STAIRS. 1984. Response of the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) to temperature and humidity: developmental rates and survivorship. *Environ. Entomol.*, 13: 611-618.
- REID, B. L.; G. W. BENNET y J. W. YONKER. 1990. Influence of fenoxycarb on German cockroach (Dyctioptera: Blattellidae) populations in public housing. *J. Econ. Entomol.*, 83: 444-450.
- RETNAKARAN, A. y J. E. WRIGHT. 1987. Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. En: *Chitin and benzoylphenyl ureas*. Wright, J. E. y A. Retnakaran (eds.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 205-282.
- RETNAKARAN, A. y L. JOBIN. 1994. New observations on adult behavior of the white pine weevil and implications on control with diflubenzurón. En: *The white pine weevil: Biology, damage and management*. Alfaro, R. E.; G. Kiss y G. Fraser (eds.). FRDA report 226, Canada. Pp. 270-284.
- RETNAKARAN, A.; J. GRANETT y T. ENNIS. 1985. Insect Growth Regulators. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 12*. Kerkut, G. A. y L. I. Gilbert (eds.). Pergamon, Oxford. Pp. 529-601.
- RETNAKARAN, A.; A. MACDONALD; D. NICHOLSON y J. PERCY-CUNNINGHAM. 1989. Ultrastructural and autoradiographic investigations of the interference of chlorfluazuron with cuticle differentiation in the spruce budworm, *Choristoneura*

- fumiferana*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 35: 172-184.
- REYNOLDS, S. E. 1987. The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pest. Sci.*, 20: 131-146.
- RICHARDSON, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry*, 16: 159-169.
- RIDDIFORD, L. M. 1985. Action of ecdysteroids at the cellular level. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 8*. Kerkut, G. A. y L. I. Gilbert (eds.). Pergamon, Oxford. Pp. 37-84g.
- ROE, R. M.; C. W. CLIFFORD y J. P. WOODRING. 1985. The effect of temperature on energy distribution during the last-larval stadium of the female house cricket, *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.*, 31: 371-378.
- ROHMID, 1996. *Technical information bulletin. RH-0345, turf and ornamental insecticide*. RohMid LLC. Philadelphia, PA, USA.
- ROJO DE LA PAZ, A.; J. P. DELBECQUE; J. BITSCH y J. DELACHAMBRE. 1983. Ecdysteroids in the haemolymph and the ovaries of the firebrat *Thermobia domestica* (Packard) (Insecta, Thysanura): correlations with integumental and ovarian cycles. *J. Insect Physiol.*, 29: 323-329.
- ROMAÑA, I.; N. PASCUAL y X. BELLÉS. 1995. The ovary is a source of circulating ecdysteroids in *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blatellidae). *Eur. J. Entomol.*, 92: 93-103.
- ROSS, M. H. y D. G. COCHRAN. 1991. Effects of German cockroach nymphs of contact exposure to IGRs, singly and in combination. *Entomol. Exp. Appl.*, 61: 117-122.
- ROUDIER, A. 1981. Description d'une espèce nouvelle d'*Aubeonymus* et révision du genre. *Bulletin de la Société entomologique de France*, 86: 237-244.
- RUIZ-HERRERA, J. 1993. La quitina. *Investigación y Ciencia*, 202: 42-49.
- RYAN, C. A. 1981. Proteinase inhibitors, En: *The Biochemistry of Plants*. Marcus, A. (ed.). Academic Press, New York. Pp. 351-370.
- RYAN, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 425-449.
- SALEM, H.; G. SMAGGHE y D. DEGHEELE. 1997. Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plodia interpunctella*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 62:9-13.
- SAMSON, P. R.; R. J. PARKER y E. A. HALL. 1990. Efficacy of the insect growth regulators methoprene, fenoxycarb and diflubenzuron against *Rhizopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) on maize and paddy rice. *J. stored Prod. Res.*, 26: 215-221.
- SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; J. D'AGUILAR y P. CABEZUELO. 1982. *Aubeonymus mariaefranciscae*, une espèce nuisible a la betterave dans le Sud de l'Espagne. *Bull. Soc. Ent. Fr.*, 87: 70-72.

- SAUNDERS, D. S. 1982. *Insect clocks, 2nd ed.* Pergamon, Oxford.
- SAUPHANOR, B. y J. C. BOUVIER. 1995. Cross-resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pestic. Sci.*, 45: 369-375.
- SCHOONEVELD, H.; A. O. SÁNCHEZ y J. DE WILDE. 1977. Juvenile hormone-induced break and termination of diapause in the Colorado potato beetle. *J. Insect Physiol.*, 23: 689-696.
- SCHULER, T. H.; G. M. POPPY; B. R. KERRY y I. DENHOLM. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotech.*, 16: 168-175.
- SEHNAL, F. 1983. Juvenile hormone analogues. En: *Endocrinology of Insects*. A. R. Liss, Inc., New York. Pp. 657-672.
- SHANKS, C. H. y R. P. DOSS. 1987. Feeding responses by adults of five species of weevils (Coleoptera: Curculionidae) to sucrose and sterols. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 80: 41-46.
- SINGH, P. 1977. *Artificial diets for insects, mites and spiders*. IFI/ Plenum, New York.
- SINGH, P. 1983. A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. *Insect Sci. Application*, 4: 357-362.
- SINGH, P. y H. L. HOUSE. 1970a. Antimicrobials agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria affinis*. *Can. Entomol.*, 102: 1340-1344.
- SINGH, P. y H. L. HOUSE. 1970b. Antimicrobials : "safe" levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. *J. Insect Physiol.*, 16: 1769-1782.
- SLÁMA, K. 1995. Hormonal status of RH-5849 and RH-5992 synthetic ecdysone agonists (ecdysoids) examined on several standard bioassays for ecdysteroids. *Eur. J. Entomol.*, 92:317-323.
- SLÁMA, K. 1998. The prothoracic gland revisited. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 91: 168-174.
- SLÁMA, K. Y M. ROMANUK. 1976. Juvenogens, biochemically activated juvenoid complexes. *Insect. Biochem.*, 6: 579-586.
- SMAGGHE, G. y D. DEGHEELE. 1993. Metabolism, pharmacokinetics, and toxicity of the first nonsteroidal ecdysteroid agonist RH 5849 to *Spodoptera exigua* (Hübner), and *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 46: 149-160.
- SMAGGHE, G. y D. DEGHEELE. 1994a. Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pestic. Sci.*, 42:85-92.
- SMAGGHE, G. y D. DEGHEELE. 1994b. The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biological activity of RH-5992 (tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua*, and *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 49:224-234.

- SMAGGHE, G. y D. DEGHEELE. 1994c. Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic RH 5849 on larval development and adult reproduction of insects of different orders. *Invert. Reprod. Devel.*, 25:227-236.
- SMAGGHE, G.; E. VIÑUELA; F. BUDIA y D. DEGHEELE. 1996c. *In vivo* and *in vitro* effects on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: An ultrastructural approach. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32:121-134.
- SMAGGHE, G.; G. SALEM; L. TIRRY y D. DEGHEELE. 1996b. Action of a novel insect growth regulator tebufenozide against different developmental stages of four stored product insects. *Parasitica*, 52:61-69.
- SMAGGHE, G.; H. EELEN; E. VERSHELDE; K. RICHTER y D. DEGHEELE. 1996a. Differential effects of nonsteroidal ecdysteroid agonists in Coleoptera and Lepidoptera: Analysis of evagination and receptor binding in imaginal discs. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 26:687-695.
- SMAGGHE, G.; M. AUDA; K. VAN LAECKE y D. DEGHEELE. 1997. Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of diflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. *Ent. Exp. Appl.*, 82: 255-260.
- SMITH, A. M. 1986. Fecundity and survival of the common armyworm, *Mythimna convecta*: effects of temperature and larval nutrition. *Entomol. exp. appl.*, 42: 31-37.
- SMITH, A. M. y S. A. WARD. 1995. Temperature effects on larval and pupal development, adult emergence, and survival of the pea weevil (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.*, 24: 623-634.
- SOBHIAN, R. y L. FORNASARI. 1994. Biology of *Larinus curtus* Hochhut (Coleoptera: Curculionidae), an European weevil for biological control of yellow starthistle, *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae), in the United States. *Biol. Control*, 4: 328-335.
- SOKAL, R. R. y F. J. ROHLF. 1979. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume, Madrid.
- SOLTANI, N. y N. SOLTANI-MAZOUNI. 1992. Diflubenzuron and oogenesis in the codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Pestic. Sci.* (1992): 257-261.
- SOLTANI, N.; J.- P. DELBECQUE y J. DELACHAMBRE. 1983. Penetration and insecticidal activity of diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Sci.*, 14: 615-622.
- SOLTANI, N.; M. T. BESSON y J. DELACHAMBRE. 1984. Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae): growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21: 256-264.
- SOLTANI, N.; N. SOLTANI-MAZOUNI y J. DELACHAMBRE. 1996. Evaluation of triflumuron, a benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor* pupae (Coleoptera: Tenebrionidae): effects on cuticle. *J. Appl. Ent.*, 120: 627-629.

- SOLTANI, N.; S. CHEBIRA; J.-P. DELBECQUE y J. DELACHAMBRE. 1993. Biological activity of flucycloxuron, a novel benzoylphenylurea derivative, on *Tenebrio molitor*: comparison with diflubenzuron and triflumuron. *Experientia*, 49:1088-1091.
- SOLTANI-MAZOUNI, N. 1994. Effects of ingested diflubenzuron on ovarian development during the sexual maturation of mealworms. *Tissue Cell*, 26: 439-445.
- SOLTANI-MAZOUNI, N. y N. SOLTANI. 1994. Diflubenzuron affected DNA synthesis in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *J. Invert. Reprod. Dev.*, 25:19-21.
- SOLTANI-MAZOUNI, N.; J. DELACHAMBRE y N. SOLTANI. 1993. Le diflubenzuron et la reproduction chez *Tenebrio molitor*: effet sur l'incorporation ovarienne de précurseurs tritiés. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58: 625-633.
- STAAL, G. B. 1986. Anti juvenile hormone agents. *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 391-430.
- STATGRAPHICS. 1997. *Statgraphics, user's guide*. STSC, Rockville, MD.
- STILL, G. G. y R. A. LEOPOLD. 1978. The elimination of (N- [(4-Chlorophenyl)amino]carbonyl]- 2,6-difluorobenzamide) by the boll weevil. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 9: 304-312.
- SUMMY, K. R.; J. R. CATE y D. BAR. 1993. Overwinter survival of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in Southern Texas: evidence and significance of reproductive diapause. *J. Econ. Entomol.*, 86: 369-376.
- TABERNER, A.; J. DOPAZO y P. CASTAÑERA. 1997. Genetic characterization of populations of a DeNovo arisen sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae), by RAPD analysis. *J. Mol. Evol.*, 45: 24-31.
- TAUBER, M. J. y C. A. TAUBER. 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Ann. Rev. Entomol.*, 21: 81-107.
- TAUBER, M. J.; C. A. TAUBER y J. R. NECHOLS. 1996. Life history of *Galerucella nymphaeae* and implications of reproductive diapause for rearing univoltine chrysomelids. *Physiol. Entomol.*, 21: 317-324.
- TAUBER, M. J.; C. A. TAUBER y S. MASAKI. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press, New York.
- TAYLOR, F. y J. B. SPALDING. 1988. Fitness functions for alternative developmental pathways in the timing of diapause induction. *Am. Nat.*, 131: 678-699.
- TAYLOR, P. S.; E. J. SHIELDS; M. J. TAUBER y C. A. TAUBER. 1995. Induction of reproductive diapause in *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) and its implications regarding southward migration. *Environ. Entomol.*, 24: 1086-1095.
- THOMAS, H. A. 1969. A meridic diet and rearing technique for the pales weevil larva. *J. Econ. Entomol.*, 62: 1491-1494.
- THRONE, J. E. 1994. Life history of immature maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory. *Environ. Entomol.*, 23: 1459-1471.

- TOBA, H. H.; A. N. KISHABA; R. PANGALDAN y S. RIGGS. 1969. Laboratory rearing of pepper weevils on artificial diets. *J. Econ. Entomol.*, 62: 257-258.
- TRISYONO, A. y G. M. CHIPPENDALE. 1997. Effect of the nonsteroidal ecdysone agonist, methoxyfenozide and tebufenozide, on the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 90: 1486-1492.
- TSITSIPIS, J. A. 1989. Nutritional requirements. En: *World crop pests, fruit flies, their biology, natural enemies, and control*. Robinson, A. S. y G. Hooper (eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 103-119.
- TUTTLE, A. F. y D. N. FERRO. 1988. Laboratory evaluation of the insect growth regulator CME-13406 on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 654-657.
- URECH, P. A.; T. STAUB y G. BOSS. 1997. Resistance: as a concomitant of modern protection. *Pestic. Sci.*, 51: 227-234.
- VAIL, K. M. y D. F. WILLIAMS. 1996. Perimeter treatments with two bait formulations of pyriproxyfen for control of Pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.*, 89: 1501-1507.
- VAN ECK, W. H. 1979. Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem.*, 9: 295-300.
- VAN LAECKE, K.; D. DEGHEELE y M. AUDA. 1989. Effect of a sublethal dose of chitin synthesis inhibitors on *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica*, 45: 90-98.
- VAN LAECKE, K.; D. DEGHEELE; Y. VAN OUTRYVE D'YDEWALLE y M. F. EL SAIDY. 1988. Distribution and retention of <sup>14</sup>C-diflubenzuron and <sup>14</sup>C-chlorfluazuron in last instar larvae of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica*, 44: 49-57.
- VIÑUELA, E. 1998. Resistencia a insecticidas en plagas de cultivos hortícolas en España. En: *Resistencia a los pesticidas en los cultivos hortícolas*. Cuadrado, I. M. y E. Viñuela (eds.). Almería. Pp. 19-29.
- VOSS, R. H.; D. N. FERRO y J. A. LOGAN. 1988. Role of reproductive diapause in the population dynamics of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in Western Massachusetts. *Environ. Entomol.*, 17: 863-871.
- WADDELL, K. J. y T. A. MOUSSEAU. 1996. Oviposition preference hierarchy of *Brachys tessellatus* (Coleoptera: Buprestidae). *Environ. Entomol.*, 25: 63-67.
- WALSH, K. D. y M. J. LINIT. 1985. Oviposition biology of the pine sawyer, *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 78: 81-85.
- WHITAKER, J. R. 1997. Protease and alpha-amylase inhibitors of higher plants, En: *Antinutrients and Phytochemicals in Food*. Shahidi, F. (ed.). Amer. Chem. Soc., Washington DC. Pp. 10-30.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1972. *The Principles of Insect Physiology*. 7<sup>th</sup> edition.

- Chapman & Hall, London.
- WILSON, T. G. y J. R. CRYAN. 1997. Lufenuron, a chitin-synthesis inhibitor, interrupts development of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*, 278: 37-44.
- WILLIAMS, C. M. 1967. Third-generation pesticides. *Sci. Amer.*, 217: 13-17.
- WILLIAMS, C. M. 1968. Ecdysone and ecdysone analogues: Their assay and action on diapausing pupae of the Cynthia silkworm. *Biol. Bull.* 134: 344-355.
- WING, K. D. 1988. RH-5849, a non-steroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Science*, 241: 467-469.
- WING, K. D. y H. E. ALLER. 1990. Ecdysteroid agonists as novel insect growth regulators. En: *Pesticides and alternatives: innovative chemical and biological approaches to pest control*. Casida, J. E. (ed.). Elsevier, New York. Pp. 251-257.
- WING, K. D.; R. A. SLAWECKI y G. R. CARLSON. 1988. RH-5849, a nonsteroidal ecdysoneagonist: effects on larval lepidoptera. *Science*, 241: 470-472.
- WOLFSON, J. L. y L. L. MURDOCK. 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.*, 16: 1089-1102.
- YOKOYAMA, V. Y. y G. T. MILLER. 1991. Potential of pyriproxifen as a quarantine treatment for codling moth and oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, 84: 942-947.
- YONCE, C. E.; C. GENTRY y R. R. PATE. 1971. Artificial diets for rearing larvae of the plum curculio. *J. Econ. Entomol.*, 64: 1111-1112.
- ZACHARUK, R. Y. 1973. Penetration of the cuticular layers of elaterid larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarrhizium anisopliae* and notes on bacterial invasion. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 101-106.
- ZACHARUK, R. Y. 1976. Structural changes of the cuticle associated with moulting. En: *The insect integument*. Hepburn, H. R. (ed.). Elsevier Scientific, Amsterdam.. Pp. 299-321.