



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**"Efectividad de insecticidas biorracionales
sobre *Lobesia botrana* Den. et Schiff.
(Lepidoptera: Tortricidae). Evaluación de
efectos letales y subletales"**

*Tesis presentada para optar al título de Magister
Scientiae en Protección Vegetal de la Facultad de
Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP*

Autora: Ing. Agr. María Eugenia Herrera

2019

Directora: Dra. Ing. Agr. Marcela Schneider.

Co- Directora: Ing. Agr. Susana Padín.

Jurado:

Dra. Cristina Mónica Montagna.

Dr. Teodoro Stadler.

Dra. Claudia Viviana Vassena.

A mis padres, por su ejemplo y amor.

Agradecimientos

A mi directora la Dra. Ing. Agr. Marcela Schneider, gracias por haber confiado en mí, guiándome y brindándome su apoyo profesional. Por sus consejos durante el desarrollo de la tesis. Por su gran generosidad para enseñarme, aconsejarme y estar siempre.

A mi Co- Directora: Ing. Agr. Susana Padín por sus valiosos aportes y correcciones a mi trabajo.

A la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza INTA y a su actual Director Regional Dr. José Gudiño, por permitirme continuar mis estudios y formarme como investigadora.

A la Ing. Agr. MSc. Violeta Becerra por confiar en mí, por guiarme, aconsejarme, formarme como profesional y permitirme realizar la Maestría.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por facilitar mis tareas para que yo pudiera trabajar tranquila con mis ensayos y escribir la tesis mientras ellos se encargaban de las tareas de campo y el servicio.

A mi compañera y amiga Fabiana por su valiosísima ayuda con la cría.

A mis queridas amigas Ceci y Dolly, por nuestras largas charlas y momentos compartidos.

A mis padres, por enseñarme con su ejemplo a enfrentar los retos y disfrutar de la belleza de la vida.

A mis hermanas, por estar siempre presentes, brindándome su cariño y alegría.

A mis hijos, por regalarme a través de sus ojos la sencillez de la vida y por alegrarme tanto.

A mi esposo Juan, por acompañarme en este camino siempre con paciencia, por brindarme su apoyo, confianza y su incondicional amor.

Publicaciones derivadas de la tesis

Herrera, M. E., Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. (2016). Método práctico de cría masiva de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en condiciones de laboratorio. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 75(3-4), 163-170. (Online) <https://biotaxa.org/RSEA/article/view/27693>

Garrido, S.; Cichón, L.; Lago, J.; Navarro, M.; Herrera, M. & Becerra, V. (2017) Evaluación de la oviposición de *Goniozus legneri* (Gordh) (Hymenoptera: Bethyridae) sobre distintos lepidópteros de interés frutihortícola. Acta zoológica lilloana 62, 118-121. VI Reunión Argentina de Parasitoidólogos. La Plata, 2017. <http://lillo.org.ar/revis/zoo/2018/2018-azl-v62-s.pdf>

Herrera, M. E., Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. (2017). Tabla de vida y parámetros poblacionales de *Lobesia botrana* (Den. et Schiff.) en condiciones de laboratorio. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 76 (3-4), 1-10. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802017000200005

Aguilera Sammaritano J.; Deymié, M. C.; Herrera, M. E.; Vázquez, F.; Cuthbertson A.; López Lastra, C.; Lechner B. *Metarhizium anisopliae* as an entomopathogen for the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) and its effect as an antagonist to the phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. Egyptian Journal of Biological Pest Control; Lugar: El Cairo; Año: 2018 <https://link.springer.com/article/10.1186/s41938-018-0086-4>

Participación en Congresos:

Efectividad de insecticidas biorracionales sobre larvas de 4º estadio de *Lobesia botrana*. Evaluación de efectos letales y subletales. Herrera, M. E.; Becerra, V. C.; Padín, S. B. & Schneider, M. I. XVI Jornadas Fitosanitarias Argentinas 10, 11 y 12 de octubre 2018, Tucumán.

Efectividad de insecticidas biorracionales sobre huevos de *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). Evaluación de efectos letales y subletales. Herrera, M. E.; Becerra, V. C.; Padín, S. B. & Schneider, M. I. X Congreso Argentino de Entomología 21 al 24 de Mayo de 2018, Mendoza.

Fosfina, una alternativa a la bromuración para el control de *Lobesia botrana* en uva de mesa. Mazzitelli, M. E.; Herrera, M. E.; Quevedo, F.; Cichón, L.; Lago, J.; Garrido, S.; Becerra, V. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 7 al 9 de octubre de 2015, Santa Fe.

II Simposio Argentino de Viticultura y Enología SAVE 2014 “Efectividad de insecticidas sobre *Lobesia botrana* Den. et Schiff (Lepidoptera: Tortricidae) en condiciones de laboratorio: resultados preliminares”. Junio 2014, San Juan.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	ii
Publicaciones derivadas de la tesis	iii
Participación en Congresos:.....	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
CAPÍTULO 1.....	1
1.1. Introducción general	2
1.2. Situación de la vitivinicultura mendocina en Argentina y en el mundo.	2
1.3. Características principales de la plaga cuarentenaria <i>Lobesia botrana</i> (Den. et Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae).....	5
1.3.1. Características generales de la familia Tortricidae.	5
1.4. Antecedentes históricos de la plaga <i>Lobesia botrana</i> . Situación de la plaga en Argentina y el mundo.....	11
2. Control	13
2. 1. Control químico en la agricultura	13
2.2. Control químico en la viticultura	15
3. Los insecticidas biorracionales en el manejo de plagas	15
3.1. Crecimiento y desarrollo de los insectos.....	16
3.2. Insecticidas reguladores del crecimiento	17
3.2.1. Agonistas de la hormona juvenil o juvenoides:	17
3.2.2. Agonistas de la hormona 20-hidroxiecdisona o ecdisoides.	17
3.2.3. Inhibidores de la quitina.....	18
3.3. Bioinsecticidas de origen microbiano: Bacterias entomopatógenas	18
3.3.1. <i>B. thuringiensis</i> : toxicidad y modo de acción	19
CAPÍTULO 2.....	21
2.1. Objetivo general.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
2.3 Hipótesis de Trabajo	22
CAPÍTULO 3.....	23

3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Recolección de organismos a campo: Pie de cría.	24
3.2. Preparación de dieta artificial para <i>Lobesia botrana</i>	24
3.3. Cría y mantenimiento de <i>Lobesia botrana</i> en laboratorio.	25
3.4. Bioensayos de toxicidad: Exposición de <i>Lobesia botrana</i> a insecticidas	25
3.5. Metodología general de preparación y aplicación de los insecticidas evaluados.....	26
3.5.1. Preparación de soluciones y suspensiones de insecticidas.....	26
3.5.2. Métodos utilizados para la exposición de los insecticidas	27
3.6. Análisis estadístico.....	29
CAPÍTULO 4.....	31
Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre huevos de <i>Lobesia botrana</i>	31
4.1. Materiales y Métodos.....	32
4.1.1. Obtención de huevos para los bioensayos de toxicidad.	32
4.1.2. Bioensayos	32
4.2. Evaluación:	33
4.3. Análisis estadístico.....	34
4.4. Resultados	35
4.4.1. Bioensayo para la determinación de la concentración Letal Media (CL ₅₀).....	35
4.4.2. Efectos letales: Efectos sobre el desarrollo embrionario y eclosión de huevos de <i>L. botrana</i>	36
4.4.3. Efectos subletales:.....	37
4.5. Discusión.....	43
CAPÍTULO 5.....	48
Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre estados larvales de <i>Lobesia botrana</i> a través de diferentes vías de exposición.	48
5. a.1. Materiales y Métodos.....	49
5. a.1.1. Obtención de larvas de segundo y cuarto estadio para los bioensayos de toxicidad.	49
5. a. 1.2. Bioensayos	49
5. a. 2. Evaluación:.....	51
5. a 3. Análisis estadístico:.....	52
5. a. 4. Resultados	53
5. a. 4.1 Bioensayo CL ₅₀ de larvas de segundo y cuarto estadio	53

5. b. Evaluación de los efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre el cuarto estadio larval de <i>Lobesia botrana</i> . Ensayo de exposición tópica.	58
5. b.1. Materiales y Métodos.....	58
5. b.1.1. Obtención de larvas de 4º estadio para los bioensayos de toxicidad.....	58
5. b.1.2. Bioensayo.....	58
5. b.2. Evaluación:	59
5. b.3. Análisis estadístico:	60
5. b.4. Resultados	60
5. b.4.1. Efectos de los insecticidas a corto plazo: Mortalidad larvaria.	60
5. b.4.2. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre el tiempo intermuda de las larvas de 4º estadio, porcentaje de pupación y peso pupal.	61
5. b.4.3. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre la emergencia adulta	62
5. b.4.4. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre la longevidad adulta.	62
5. b.4.5. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre la fecundidad.....	63
5.4. Discusión.....	66
CAPÍTULO 6.....	70
Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre pupas de <i>Lobesia botrana</i>	70
6.1. Materiales y Métodos.....	70
6.1.1. Obtención de pupas para los bioensayos de toxicidad.	70
6.1.2. Bioensayo.....	70
6.2. Evaluación:	71
6.2.1. Análisis estadístico:	72
6.3. Resultados	72
6.3.1. Efectos letales y subletales de insecticidas sobre los adultos obtenidos a partir de pupas de <i>L. botrana</i> tratadas.	72
6.4. Discusión.....	75
CAPÍTULO 7.....	78
Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre adultos de <i>Lobesia botrana</i>	78
7.1. Materiales y Métodos.....	79
7.1.1. Obtención de adultos para los bioensayos de toxicidad.....	79
7.1.2 Bioensayo.....	79
7.2. Evaluación:	80
7.2.1. Análisis estadístico:	80

7.3. Resultados	81
a) Efectos de los insecticidas sobre la supervivencia de adultos expuestos a insecticidas. 81	81
b) Efectos a largo plazo de insecticidas sobre la descendencia (F2).....	82
7.4. Discusión.....	85
CAPÍTULO 8.....	90
Conclusiones	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3. 1. INSECTICIDAS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	27
TABLA 4. 1. ANÁLISIS DE REGRESIÓN PROBIT DE HUEVOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> DE 24 H DE EDAD. ENSAYO DE INMERSIÓN DE HUEVOS TRATADOS CON <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI, METOXIFENOCIDE, NOVALURON Y CLORANTRANILIPROLE.	35
TABLA 4. 2. EFECTOS SUBLETALES A LARGO PLAZO DE LOS INSECTICIDAS ENSAYADOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ESTADOS INMADUROS Y ADULTO A PARTIR DE HUEVOS TRATADOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	39
TABLA 4. 3. EFECTOS SUBLETALES DE LOS INSECTICIDAS SOBRE ORGANISMOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> , PROVENIENTES DE HUEVOS TRATADOS (ESTADO DE EXPOSICIÓN).	41
TABLA 4. 4. EFECTO DE LOS INSECTICIDAS ENSAYADOS A LA MCRC SOBRE LA FECUNDIDAD Y LA FERTILIDAD ACUMULADA EN ADULTOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> , PROVENIENTES DE HUEVOS TRATADOS (ESTADO DE EXPOSICIÓN).	43
TABLA 5. 1. RANGO DE DOSIS EVALUADAS (MG I.A. /G INFLORESCENCIA) PARA EL ENSAYO DE CL ₅₀ DE LOS INSECTICIDAS SOBRE EL SEGUNDO Y CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	50
TABLA 5. 2. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL ₅₀) DE LARVAS DE SEGUNDO ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> EXPUESTAS A <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI, METOXIFENOCIDE, NOVALURON Y CLORANTRANILIPROLE. BIOENSAYO DE INGESTIÓN DE INFLORESCENCIAS DE VID.	53
TABLA 5. 3. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL ₅₀) DE LARVAS DE CUARTO ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> EXPUESTAS A <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI, METOXIFENOCIDE, NOVALURON Y CLORANTRANILIPROLE. BIOENSAYO DE INGESTIÓN DE INFLORESCENCIAS DE VID.	53
TABLA 5. 4. EFECTOS SUBLETALES DE LOS INSECTICIDAS ENSAYADOS SOBRE LARVAS DE CUARTO Y QUINTO ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> (APLICACIÓN TÓPICA CON MICROAPLICADOR HAMILTON®).	61
TABLA 6. 1. EFECTOS LETALES Y SUBLETALES DE METOXIFENOCIDE, NOVALURON, CLORANTRANILIPROLE Y <i>B. THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI, SOBRE EL ESTADO DE PUPA DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	73
TABLA 7. 1. TOXICIDAD DE <i>B. THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI, NOVALURON, CLORANTRANILIPROLE Y METOXIFENOCIDE SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO VÍA INGESTIÓN EN ADULTOS.	82
TABLA 7. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS TRANSGENERACIONALES DE <i>B. THURINGIENSIS</i> VAR. KURSTAKI, NOVALURON, CLORANTRANILIPROLE Y METOXIFENOCIDE SOBRE PARÁMETROS	

BIOLÓGICOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> (F2) PROVENIENTES DE ADULTOS EXPUESTOS A INSECTICIDAS	84
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. 1. VARIEDADES TINTAS DE ALTA CALIDAD ENOLÓGICA..	3
FIGURA 1. 2. VARIEDADES ROSADAS DE ALTA CALIDAD ENOLÓGICA..	3
FIGURA 1. 3. VARIEDADES BLANCAS DE ALTA CALIDAD ENOLÓGICA..	4
FIGURA 1. 4. VARIEDADES PARA UVA DE MESA Y PASAS.....	4
FIGURA 1. 5. VINOS VARIETALES EXPORTADOS.....	5
FIGURA 1. 6. FASES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	7
FIGURA 1. 7. CARACTERES LARVARIOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	8
FIGURA 1. 8. PUPAS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> 20X	8
FIGURA 1. 9. ADULTO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	9
FIGURA 1. 10. PRIMERA GENERACIÓN:	10
FIGURA 1. 11. SEGUNDA GENERACIÓN:	11
FIGURA 1. 12. TERCERA GENERACIÓN:	11
FIGURA 1. 13. VISTA DE MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE ESPORAS Y CRISTALES DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	19
FIGURA 1. 14. ESQUEMA DEL MODO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY EN EL TUBO DIGESTIVO DE UNA LARVA DE LEPIDÓPTERO.	20
FIGURA 3. 1 A. CÁMARA DE REPRODUCCIÓN PARA <i>LOBESIA BOTRANA</i> . B: RECIPIENTE CON DIETA ARTIFICIAL	25
FIGURA 3. 2. CÁMARA DONDE SE LLEVÓ A CABO LA CRÍA DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> Y LOS BIOENSAYOS TOXICOLÓGICOS.....	26
FIGURA 3. 3. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS DE EXPOSICIÓN POR INMERSIÓN DE HUEVOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> A INSECTICIDAS.....	27
FIGURA 3. 4 A. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS DE EXPOSICIÓN TÓPICA DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> A INSECTICIDAS. B. MICROAPLICADOR MANUAL	28
FIGURA 3. 5. BIOENSAYOS TOXICOLÓGICOS: EXPOSICIÓN DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> A INSECTICIDAS POR INGESTIÓN	28
FIGURA 3. 6. ESQUEMA SECUENCIAL DE LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS INSECTICIDAS SOBRE ESTADOS INMADUROS Y ADULTOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> EN LABORATORIO. PUNTOS FINALES DE EVALUACIÓN.....	29
FIGURA 4. 1. ESQUEMA DEL BIOENSAYO DE INMERSIÓN DE HUEVOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	33
FIGURA 4. 2. ECLOSIÓN LARVAL DE HUEVOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> TRATADOS POR INMERSIÓN.	36
FIGURA 4. 3. DESARROLLO EMBRIONARIO DE HUEVOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	37
FIGURA 4. 4. EFECTOS TERATOLÓGICOS SOBRE LA METAMORFOSIS DE LARVAS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> EMERGENTES DE HUEVOS TRATADOS	42

FIGURA 5. 1. A. TORRE DE POTTER BURKARD® PARA PULVERIZACIONES DE PRECISIÓN. B. INFLORESCENCIA DE VID PULVERIZADA PARA ENSAYO DE INGESTIÓN CON LARVAS DE SEGUNDO Y CUARTO ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	49
FIGURA 5. 2. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL BIOENSAYO VÍA INGESTIÓN (PULVERIZACIÓN DE INFLORESCENCIAS TRATADAS CON TORRE DE POTTER, BUKARD®) Y SUMINISTRADAS COMO ALIMENTO A LARVAS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	51
FIGURA 5. 3. MORTALIDAD DEL SEGUNDO Y CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> A LAS 48 H POST-TRATAMIENTO.	54
FIGURA 5. 4. EFECTOS TERATOLÓGICOS SOBRE LA METAMORFOSIS DE LARVAS DE 2º (L2) Y 4º (L4) ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO DE INGESTIÓN.	56
FIGURA 5. 5. ESQUEMA SECUENCIAL METODOLÓGICO. APLICACIÓN TÓPICA DE LOS INSECTICIDAS SOBRE ESTADIOS LARVALES DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> Y SU SEGUIMIENTO.	59
FIGURA 5. 6. MORTALIDAD (%) DEL CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> A LAS 48 H DESPUÉS DEL TRATAMIENTO (APLICACIÓN TÓPICA).	60
FIGURA 5. 7. EMERGENCIA ADULTA A PARTIR DE LARVAS DE CUARTO ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> TRATADAS VÍA CONTACTO (APLICACIÓN TÓPICA).	62
FIGURA 5. 8. LONGEVIDAD DE ADULTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LARVAS DE CUARTO ESTADIO DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> EXPUESTOS VÍA CONTACTO (APLICACIÓN TÓPICA CON MICROAPLICADOR HAMILTON®).	63
FIGURA 5. 9. <i>LOBESIA BOTRANA</i> DESARROLLO NORMAL. A. LARVA DE CUARTO ESTADIO. B. PUPA	63
FIGURA 5. 10. EFECTOS DEL METOXIFENOCIDE SOBRE EL CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO DE APLICACIÓN TÓPICA CON MICROAPLICADOR (HAMILTON®).	64
FIGURA 5. 11. EFECTOS DEL <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR KURSTAKI SOBRE EL CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO DE APLICACIÓN TÓPICA CON MICROAPLICADOR (HAMILTON®).	64
FIGURA 5. 12. EFECTOS DEL NOVALURON SOBRE EL CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO DE APLICACIÓN TÓPICA CON MICROAPLICADOR (HAMILTON®).	65
FIGURA 5. 13. EFECTOS DEL CLORANTRANILIPROLE SOBRE EL CUARTO ESTADIO LARVAL DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO APLICACIÓN TÓPICA CON MICROAPLICADOR (HAMILTON®).	65
FIGURA 6. 1. DETALLE DE LA METODOLOGÍA DE APLICACIÓN TÓPICA DE INSECTICIDAS SOBRE PUPAS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> (MICROAPLICADOR MANUAL HAMILTON®).	70
FIGURA 6. 2. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA APLICACIÓN TÓPICA DE LOS INSECTICIDAS SOBRE PUPAS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	71
FIGURA 6. 3. TOXICIDAD DE INSECTICIDAS SOBRE PUPAS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> . ENSAYO EXPOSICIÓN TÓPICA.	74

FIGURA 7. 1. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE SUMINISTRO DE LOS INSECTICIDAS MEDIANTE EL ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL CRÓNICA A TRAVÉS DE AGUA DE BEBER SOBRE ADULTOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	80
FIGURA 7. 2. SUPERVIVENCIA 48 H POST-TRATAMIENTO DE ADULTOS DE <i>LOBESIA BOTRANA</i> EXPUESTOS A INSECTICIDAS. ENSAYO VÍA INGESTIÓN	81

ABREVIATURAS

HJ: hormona juvenil

Bt: *Bacillus thuringiensis*

L1: larva de 1° estadio

L2: larva de 2° estadio

L3: larva de 3° estadio

L4: larva de 4° estadio

L5: larva de 5° estadio

i.a. ingrediente activo

MCRC: máxima concentración recomendada para su uso en campo

Resumen

Lobesia botrana (Den. y Schiff.) es un microlepidóptero cuarentenario para Argentina. Produce pérdidas en el rendimiento, afecta la calidad de la uva para consumo en fresco y para vinificación por favorecer el desarrollo de hongos que provocan la podredumbre del racimo. Su control efectivo con productos de bajo impacto es imprescindible en el manejo integrado de plagas (MIP). El objetivo del trabajo fue evaluar en laboratorio la toxicidad (efectos letales y subletales) de los insecticidas biorracionales: metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre los estados inmaduros y adulto de la polilla de la vid. Se estudiaron los efectos toxicológicos de los insecticidas sobre diferentes estados de desarrollo del insecto a través de distintas vías de exposición. En ensayos de inmersión de huevos el metoxifenocida, clorantraniliprole y novaluron no resultaron ovicidas ni embrionicidas. *B. thuringiensis* var. Kurstaki, tuvo un marcado efecto ovicida/embrionocida. Metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *B. thuringiensis* var. Kurstaki en ensayos tópicos sobre larvas produjeron efecto antialimentario, dando lugar a pupas de bajo peso. Las hembras emergentes mostraron baja capacidad reproductiva. Aplicado vía tópica sobre pupas, *B. thuringiensis* var. Kurstaki permitió el desarrollo pupal hasta al estado de imago. Los productos restantes detuvieron el desarrollo en la etapa preimaginal. Todos los insecticidas redujeron el tiempo de desarrollo intermuda pupa – adulto, así como la supervivencia pupal, longevidad y fertilidad de los adultos obtenidos. En ensayos de ingestión en adultos, el clorantraniliprole fue el único que redujo la supervivencia. Los insecticidas restantes, redujeron la longevidad, fecundidad y fertilidad. Se registraron efectos transgeneracionales para todos los insecticidas ensayados manifestándose alargamiento del tiempo intermuda larvaria - pupal, reducción de la fecundidad, fertilidad y longevidad de adultos emergidos. El presente estudio, con resultados novedosos, demuestra que los insecticidas ensayados fueron tóxicos para todas las fases de desarrollo, provocando efectos letales, subletales y teratológicos.

Abstract

Lobesia botrana (Den. & Schiff.) is a microlepidoptera quarantine pest for Argentina. The European grapevine moth produces important harvest losses, impaired grape quality allowing the gray mold development. Consequently, the effective control with low impact products is essential in the integrated pest management (IPM). The aim of the present study was to assess the toxicity (lethal and sublethal effects) of methoxyfenozide, chlorantraniliprole, novaluron and *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki under controlled laboratory conditions, on immature and adult stages of *L. botrana*. Insecticides were tested through different exposure routes. In dipping eggs bioassay methoxyfenozide, chlorantraniliprole and novaluron neither showed ovicidal nor embryocidal activity. *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, showed a potent ovicidal and embryocidal effect. In larvae by topical exposure, methoxyfenozide, chlorantraniliprole, novaluron and *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki exhibited antifeedant effect, pupal low weight, and impaired reproductive activity on the emerging adults. *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki in topical exposure on pupae, allowed the development to imago stage. Methoxyfenozide, chlorantraniliprole and novaluron stopped the development in the preimaginal stage, reduced intermolt development time of immature stages, pupal survival, longevity and fertility of adults. In adult ingestion trials, chlorantraniliprole reduced dramatically survivorship. Methoxyfenozide, novaluron and *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki reduced longevity, fecundity and fertility. Transgenerational effects were observed for all insecticides tested, increased larval development time, reduced fecundity, fertility and longevity of emerged adults. The present study shows that insecticides were toxic for all stages tested. Sublethal and teratological effects were exhibited.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Introducción general

El estado sanitario de los viñedos mendocinos era de absoluto privilegio ya que no existían organismos que causaran daño económico ni fueran limitantes en el cultivo de la vid (García, 1994). El incremento de la población de la cochinilla harinosa de la vid, al final de la década del 90, causó severos daños en viñedos de las regiones vitícolas argentinas, con excepción de la Patagonia (Becerra *et al.*, 2006). En Argentina, se ha comprobado que esta cochinilla es transmisora del virus *Grapevine Leafroll Associated Virus 3* (GLRaV) en vid (De Borbón *et al.*, 2002).

En octubre de 2010 el SENASA, en la resolución N° 122/2010 declara en todo el territorio de la República Argentina la emergencia fitosanitaria, debido a la introducción de la plaga cuarentenaria, *Lobesia botrana* Den. *et* Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae), comúnmente conocida como “polilla europea de la vid”.

1.2. Situación de la vitivinicultura mendocina en Argentina y en el mundo.

La Argentina cuenta con una superficie cultivada de 224.707 ha, que representan el 2,9% de la superficie mundial. Al inicio el crecimiento de esta actividad fue sostenida y el mercado interno tenía una gran demanda. Entre 1982 y 1992 se produjo una importante erradicación de viñedos que representó el 36% de la superficie existente hasta ese entonces. A partir de 1992 se inició un proceso de reconversión de variedades criollas a cepas de alta calidad enológica. Asimismo, en San Juan se inicia el cultivo de variedades para uva para consumo en fresco (Richard – Jorba, R. 2007).

La cantidad total de viñedos de Argentina en el año 2015 fue de 25.049. El 66% de ellos se encuentran en la provincia de Mendoza, el 20% en San Juan y el 5% en La Rioja. A nivel país en 2015 se observó un predominio de variedades de vinificar que representan el 92% del total implantado, las variedades de mesa constituyen el 5,68% y las uvas aptas para pasas representan el 1,90%.

Sobre el total de 207.252 ha de vid para vinificar, predominan las variedades tintas con el 54,36%, las blancas el 19,84% y las rosadas representan el 25,80%. Entre las variedades de vinificar tintas se destacan la variedad *Malbec*, *Bonarda*, *Cabernet Sauvignon* y *Syrah*, entre otras (**Figura 1.1**).

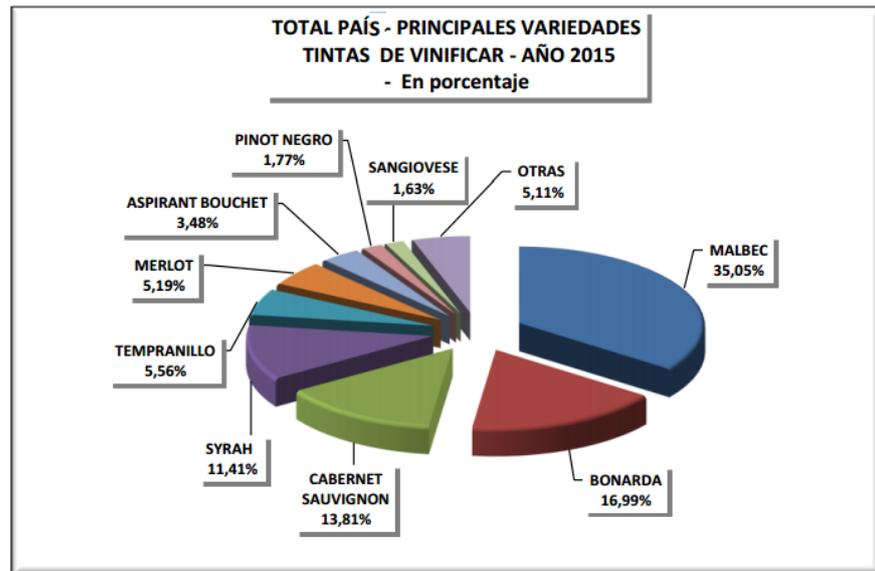


Figura 1. 1. Variedades tintas de alta calidad enológica. Porcentaje en hectáreas. (Base de datos INV 2015).

Entre las variedades rosadas se destacan las siguientes: *Cereza*, *Criolla Grande* y *Moscatel Rosado* (**Figura 1.2**).

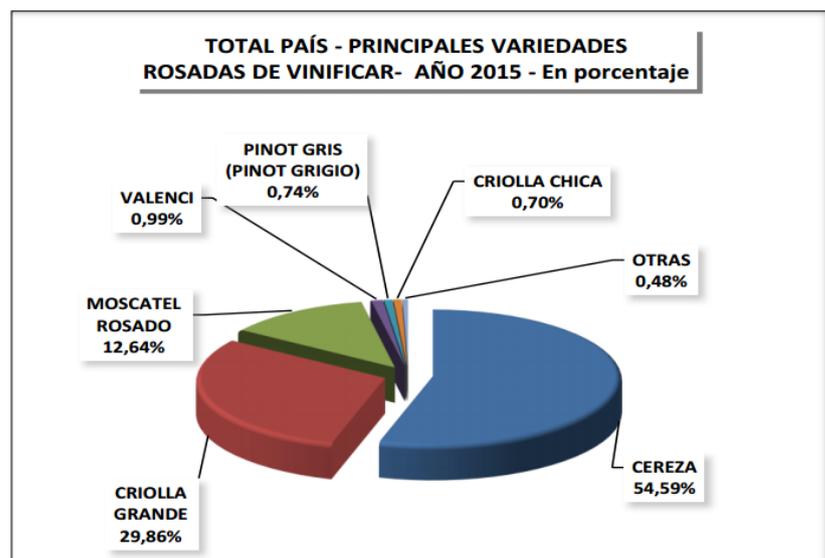


Figura 1. 2. Variedades rosadas de alta calidad enológica. Porcentaje en hectáreas. (Base de datos INV 2015).

Las principales variedades blancas son: *Pedro Jiménez*, *Torrontés Riojano*, *Chardonnay*, *Moscatel de Alejandría*, entre otras (**Figura 1.3**).

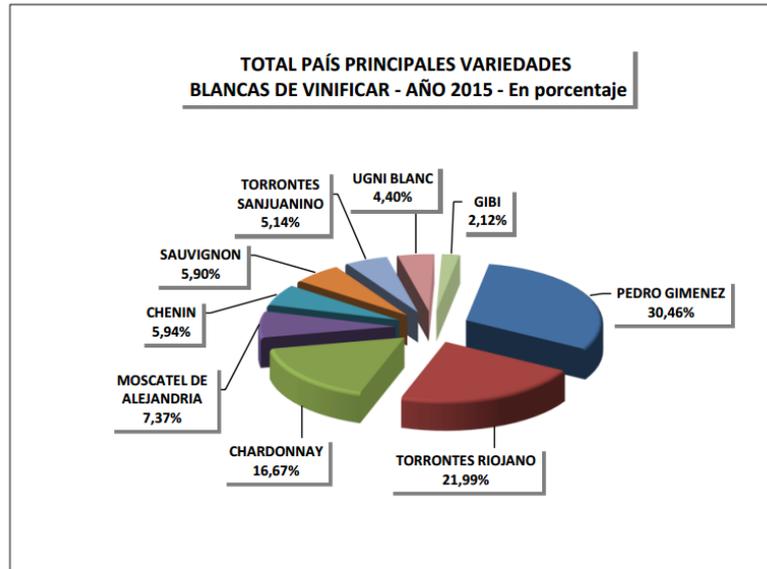


Figura 1. 3. Variedades blancas de alta calidad enológica. Porcentaje en hectáreas. (Base de datos INV 2015).

Entre las cepas de uva de mesa predominan *Flame Seedless*, *Superior Seedless* y *Red Globe*. Las variedades aptas para deshidratado que se destacan son: *Sultanina Blanca* y *Arizul* (INTA CG 351) (**Figura 1.4**) (INV. 2015a).

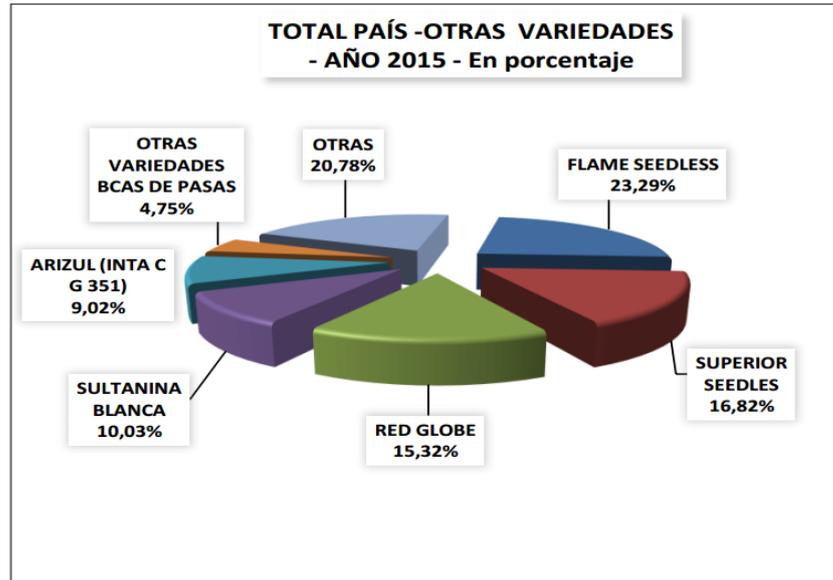


Figura 1. 4. Variedades para uva de mesa y pasas. Porcentaje en hectáreas. INV 2015 (Base de datos INV 2015).

Mendoza es la principal provincia que elabora vino en Argentina. Proporciona más del 70% de toda la producción de vino y posee la mayor cantidad de bodegas en todo el país. La industria vitivinícola argentina, durante 2015, exportó vinos y mostos por un volumen de 3.619.544 hl, lo que representa U\$S 939,48 millones. En cuanto a

las preferencias varietales, se destaca la variedad *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Chardonnay*, *Torrontés Riojano*, *Syrah*, *Sauvignon*, *Pinot Gris* y *Merlot*. (**Figura 1.5**). Entre los compradores de vinos varietales argentinos se destaca EEUU, con el 60,56%, le siguen en importancia Europa con el 33,24%, Asia con el 5,62% África y Oceanía con el 0,58% (INV. 2015b).

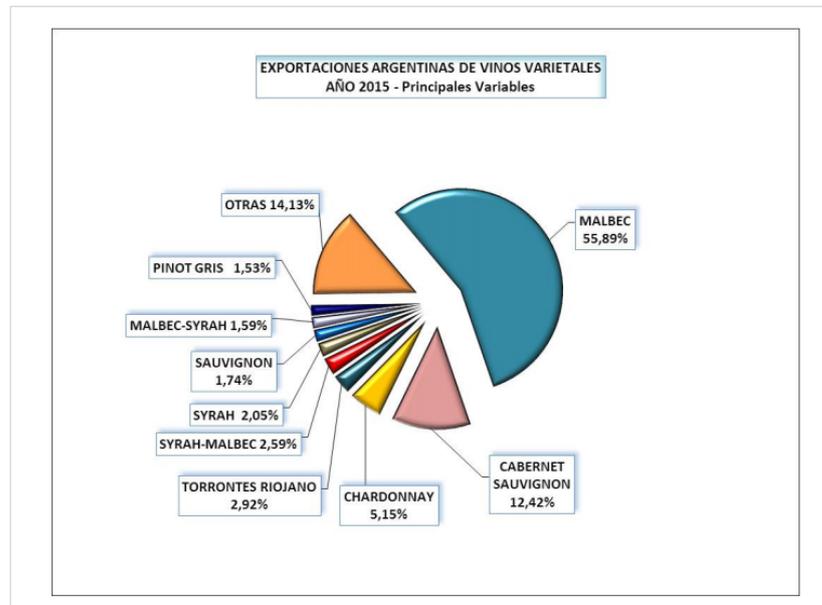


Figura 1. 5. Vinos varietales exportados. Porcentaje en hl. (Base de datos INV 2015).

1.3. Características principales de la plaga cuarentenaria *Lobesia botrana* (Den. et Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae).

1.3.1. Características generales de la familia Tortricidae.

Es una de las familias más grandes de los llamados microlepidópteros, con más de 6.338 especies descritas, presentan hábitos crepusculares o nocturnos, muchas de ellas son importantes plagas agrícolas cuyas larvas polífagas son defoliadoras o perforadoras de brotes, flores o frutos carnosos. Esta familia toma su nombre del latín *Tortus*, retorcido, aludiendo al comportamiento de la mayoría de las larvas del taxón de plegar, o torcer las hojas para constituirse un refugio. Esta familia tiene distribución cosmopolita, sin embargo se encuentra fuertemente representada en regiones templadas y tropicales (Horak, 1991). Se conocen tres tortricidos plaga de la vid en Europa y Oeste de Asia. *Lobesia botrana* Den. et. Schiff., conocida como la polilla europea de la vid y *Eupoecilia ambiguella* Hübner, ambas se alimentan de racimos florales y racimos con frutos formados. La tercera especie es *Sparganothis pilleriana* Den. et. Schiff., se

alimenta tanto de brotes, hojas, racimos florales y frutos formados (Horak & Brown, 1991).

La sistemática de la familia *Tortricidae* es controvertida. Históricamente, la clasificación estaba basada en la morfología externa, los apéndices cefálicos, la forma, venación, patrón de colores del ala y la genitalia (Kennel, 1908). Estudios posteriores, sobre la base de datos moleculares, han demostrado ser muy prometedores para resolver las relaciones filogenéticas dentro de esta familia (Regier *et al.*, 2012).

La posición taxonómica de *L. botrana* es la siguiente (Horak *et al.*, 1995)

Orden: *Lepidoptera*

Suborden: *Heteroneura*

Sección: *Ditrysia*

Superfamilia: *Tortricoidea*

Familia: *Tortricidae*

Subfamilia: *Olethreutinae*

Tribu: *Olethreutini*

Género: *Lobesia* Guenée

Especie: *L. botrana* Denis & Schiffermüller

1.3.2.1. Caracteres morfológicos de *Lobesia botrana*

Lobesia botrana, presenta cuatro estados de desarrollo durante su ciclo: huevo, larva, pupa y adulto.

Huevo: Es plano, de forma lenticular y ligeramente elipsoidal (0,65 - 0,90 mm de longitud por 0,45 - 0,75 mm de ancho), permanece adherido al sustrato. Posee una micrópila, que se encuentra en el extremo del huevo y cuya función es intercambio gaseoso (respiración) (Nation, 2001). La hembra los coloca de manera aislada, raramente en pequeñas agrupaciones de 2-3 huevos, sin formación de ooplacas. Presenta una coloración blanco - amarillenta, es translúcido, con reflejos iridiscente. El corión protector, sin ornamentaciones marcadas, le otorga un aspecto macroscópico liso, aunque posee una fina reticulación poligonal especialmente en los bordes y en torno a la micrópila. Se diferencian 5 fases en el desarrollo embrionario (**Figura 1.6**). En la última

fase, la larva perfora el huevo por uno de los polos empleando las mandíbulas y la cabeza, abandonando el corión nacarado sin ingerirlo, que queda adherido al sustrato.

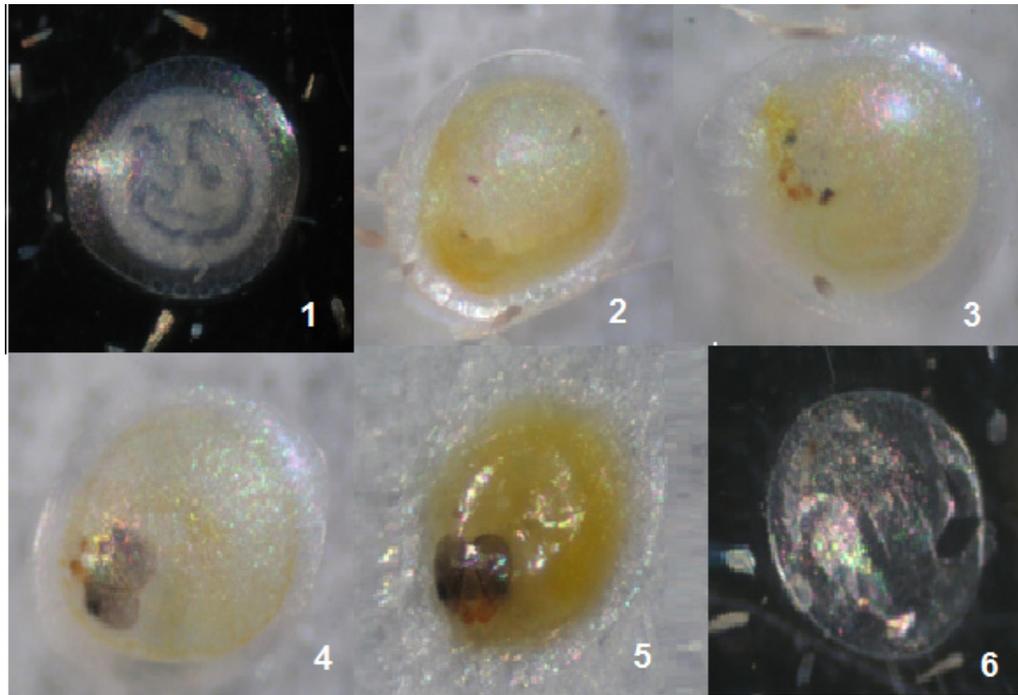


Figura 1. 6. Fases del desarrollo embrionario de *Lobesia botrana*. 1) embrión visible, 2) ojos visibles, 3) mandíbulas visibles, 4) cabeza parda, 5) cabeza negra, 6) corión vacío luego de la eclosión (X40).

Larva: *L. botrana*, presenta cinco estadios. Posee caracteres larvarios que son considerados de valor taxonómico. (Figura 1.7). La larva neonata mide alrededor de 0,95 -1,0 mm de longitud. La cápsula cefálica y el escudo protorácico son pardo-oscuros, casi negros, y el cuerpo amarillo claro. En los estadios siguientes la cabeza y el escudo son de color pardo más claro y el cuerpo de color variable, de amarillo verdoso a violeta oscuro. La larva de 5° estadio alcanza a medir entre 10 y 15 mm, de longitud. A partir de este estadio de desarrollo deja de alimentarse y se ubica en un lugar apropiado para iniciar el proceso de pupación. La larva posee glándulas de secreción con las que teje un capullo sedoso fusiforme de color blanquecino, en cuyo interior se produce la metamorfosis.

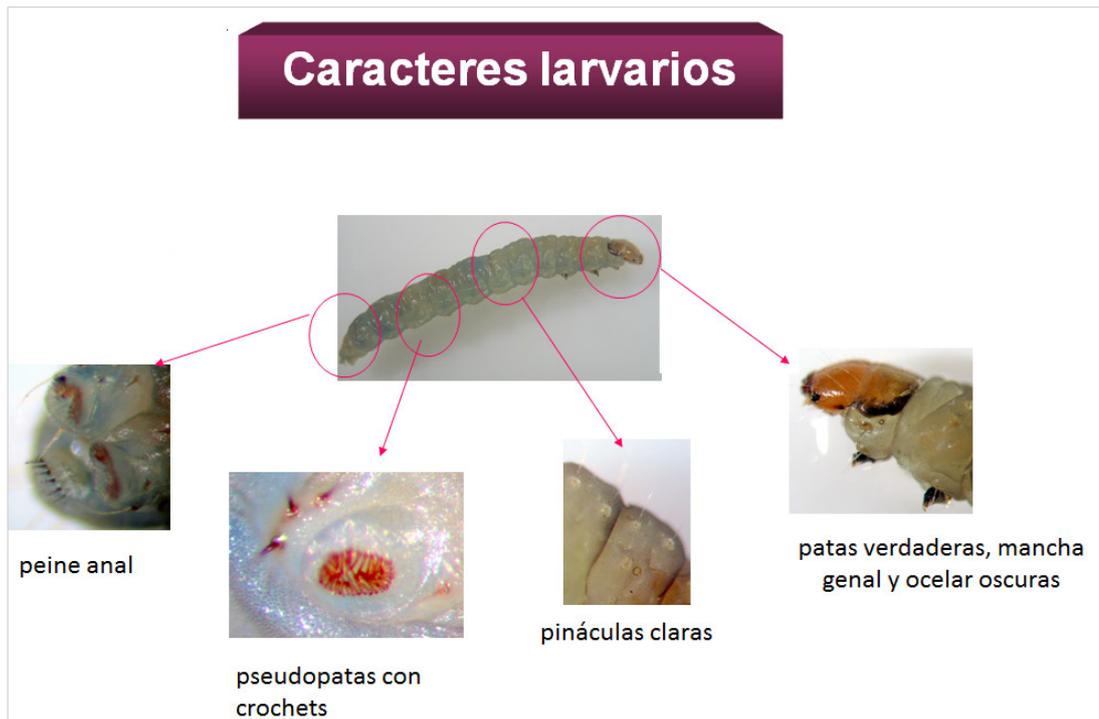


Figura 1. 7. Caracteres larvarios de *Lobesia botrana* 40x

Pupa: Presenta color blanquecino, azul o verde cuando está recién formada, luego pasa a pardo o pardo oscuro en relación a los procesos de quitinización de la cutícula. Su tamaño y peso son mayores en la hembra (macho 4 - 7 mm; hembra 5 - 9 mm). Los sexos en este estado pueden ser diferenciados, por la posición de los primordios genitales, que se sitúan en el segmento abdominal IX en el macho y VIII en la hembra, el orificio genital del macho se encuentra entre dos pequeñas prominencias laterales.

(Figura 1.8).

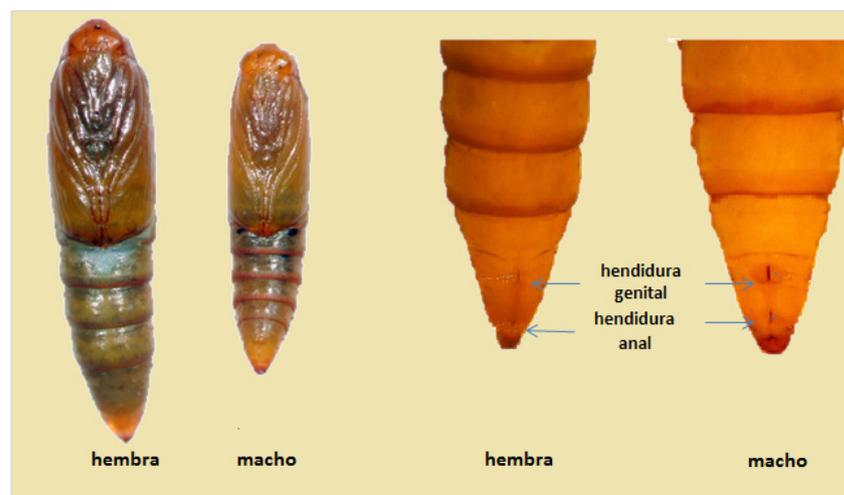


Figura 1. 8. Pupas de *Lobesia botrana* 20x

Adulto: Es un lepidóptero de aproximadamente 10 - 13 mm de envergadura alar y 6 - 8 mm de longitud en reposo (**Figura 1.9**). Las ornamentaciones en mosaico de las alas anteriores (pardo-rojo-azul) contrastan con la coloración grisácea más o menos uniforme de las alas posteriores, ocultas en posición de reposo. A lo largo del borde del 2° par de alas se dispone una fila de flecos de color gris. No existe dimorfismo sexual pronunciado y el diseño alar es similar. Sin embargo, los sexos son fácilmente diferenciables tanto por su morfología como por su comportamiento. Los machos, al igual que en el estado de crisálida, son más pequeños, presentan un abdomen estrecho, poseen un peine anal de escamas modificadas y movimientos ágiles.

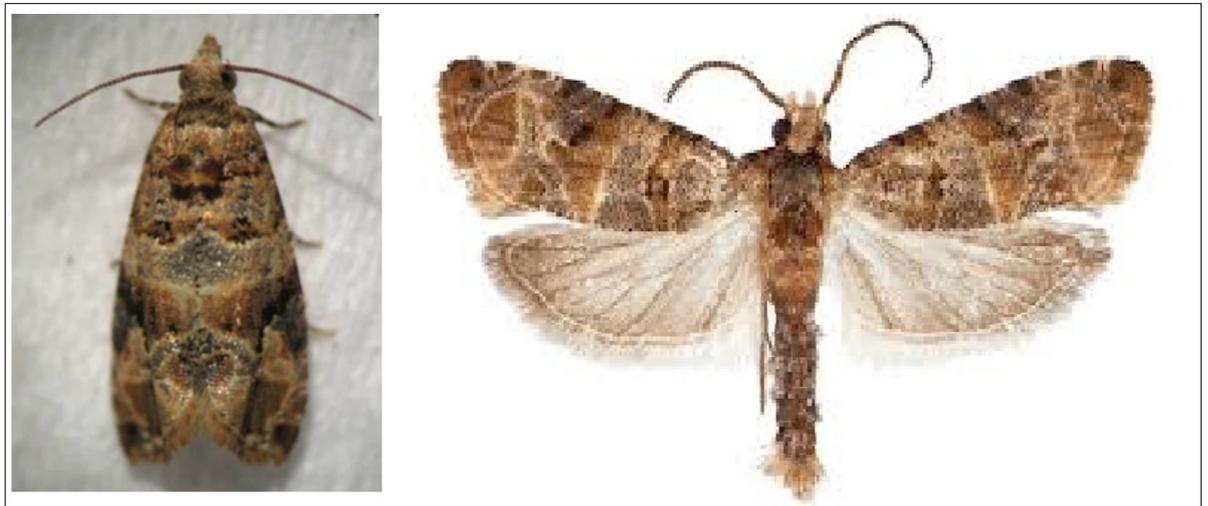


Figura 1. 9. Adulto de *Lobesia botrana*.

1.3.2.2. Desarrollo estacional. Ciclo de vida y daños

Primera generación: Coincide con la floración del cultivo de vid. La hembra coloca los huevos en las brácteas, botones florales y frutos recién cuajados. La larva neonata emerge y se alimenta de las inflorescencias, al devorar total o parcialmente cierto número de botones florales, flores y granos a los que, además, unen por medio de hilos sedosos, formando lo que se denominan glomérulos. Se alimentan de los primordios estaminales y del gineceo. En correspondencia con la muda, donde cambia de estadio larval (ecdisis) forma nuevos glomérulos, comprometiendo mayor cantidad de flores. Concluidos los 5 estadios larvales forma la pupa o crisálida, para luego emerger el adulto y reanudar el ciclo (**Figura 1.10**).

Segunda generación: Las hembras oviponen sobre las bayas verdes, en las zonas más sombreadas de los racimos. Las larvas emergentes realizan una perforación en la inserción peduncular o en el punto de contacto de dos bayas. A medida que cambian de estadio perforan otros granos que unen mediante hilos sedosos refugiándose en el interior de los granos vacíos (**Figura 1.11**).

Tercera generación: se produce cuando la vid se encuentra en el momento de envero o maduración. Las larvas penetran en las bayas y se alimentan de ellas causando como daño directo, pérdidas de cosecha y disminución de la calidad de la uva (Cucchi & Becerra, 2009). Las heridas producidas en los frutos constituyen la puerta de entrada para el desarrollo de diversos hongos fitopatógenos (daño indirecto) *Botrytis*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, entre otros, que provocan podredumbres (Mondy *et al.*, 1998; Armendariz *et al.*, 2007). En uva de mesa los daños se manifiestan por la pérdida de la calidad estética de la uva, depreciando el producto. En uvas para vinificar, los residuos fúngicos generan aromas y sabores desagradables en los vinos, además de los problemas de clarificación durante el proceso de vinificación. Asimismo, causa perjuicios económicos indirectos, a través de las regulaciones que imponen los países importadores en el comercio internacional (**Figura 1.12**) (Mendoza, 2011).



Figura 1. 10. Primera generación: afecta a los botones florales y frutos recién cuajados. Se observan flores y frutos unidos por sedas.



Figura 1. 11. Segunda generación:
las larvas perforan las bayas que unen mediante hilos sedosos refugiándose en el interior de los granos vacíos.



Figura 1. 12. Tercera generación:
afecta a las bayas en envero o maduración. Las heridas facilitan el desarrollo de diversos hongos fitopatógenos que provocan podredumbres.

1.4. Antecedentes históricos de la plaga *Lobesia botrana*. Situación de la plaga en Argentina y el mundo.

Lobesia botrana es nativa de la región Paleártica y se encuentra ampliamente distribuida en Europa Occidental, Asia Central y el norte de África (Razowski, 2003). La bibliografía cita hacia finales de la década de 1800 a *L. botrana* en Norteamérica, lo cual responde a identificaciones erróneas de *Paralobesia viteana* (Clemens) (Kearfott, 1904), un tortricido nativo de América del Norte.

La polilla europea de la vid fue reportada por primera vez en América, en abril de 2008 en Chile, en la zona de Linderos, Región Metropolitana (González, 2008). Posteriormente, la plaga se extendió en toda la región vitícola de ese país (SAG, 2010).

En setiembre de 2009, en el Valle de Napa de California, se encontraron larvas dañando uvas, las que fueron identificadas como *L. botrana*. Este representa el primer registro de la especie en América del Norte.

En marzo de 2010, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) informó la presencia de esta plaga cuarentenaria en dos localidades del departamento de Maipú, provincia de Mendoza (SENASA, 2010 a). A partir de ese momento el SENASA establece una red de monitoreo implementada en el marco del Programa Nacional de Prevención y Erradicación de la plaga. Actualmente este programa abarca, además de las provincias de La Rioja, San Juan y Mendoza, que son las más importantes productoras de vid del país, otras regiones como Patagonia Norte (Alto Valle, Valle Medio, Valle Inferior y Río Colorado en las provincias de Río Negro y Neuquén), NOA Sur (Tinogasta y Valles Calchaquíes en Catamarca y Tucumán) y NOA Norte (Salta y Jujuy). También Córdoba, La Pampa, San Luis, Buenos Aires, Entre Ríos, Misiones, Santa Fe, Santa Cruz y Chubut.

En 2010 se inició un plan de contingencia en San Juan que consistió en el control químico y la colocación de una red de trapeo que comprende una superficie de 1 km de radio a partir del foco encontrado en la localidad de Sarmiento (SENASA 2010b). A pesar de estas medidas, la plaga continuó extendiéndose hacia otros oasis productivos de San Juan. En diciembre de 2016 los departamentos de Sarmiento, Caucete, Pocito, Albardón, Santa Lucía, 25 de Mayo, 9 de Julio, Chimbas y Rawson se encuentran bajo cuarentena o contingencia (SENASA 2016).

En abril de 2017, el SENASA registró capturas de ejemplares adultos en Cafayate (Salta). El mismo año en un viñedo y en una plantación de arándanos, en las localidades de Calabacillas y Colonia Roca (Entre Ríos). En ambos casos, se procedió a intensificar la red de trapeo y a aplicar las medidas de control fitosanitario y cuarentenario (SENASA 2017).

2. Control

2. 1. Control químico en la agricultura

Los primeros plaguicidas químicos se introdujeron a mediados del siglo XX junto con el desarrollo de la industria de síntesis química, impulsado por la mayor producción por hectárea cultivada. Este incremento en la productividad se relaciona con la mecanización agrícola, el uso intensivo de combustibles fósiles, la aplicación de fertilizantes, el empleo de cultivares de alto potencial de rendimiento y la utilización de plaguicidas químicos (Oerke, 2006). En 1939 el químico suizo Paul Hermann Müller, descubrió las propiedades insecticidas del dicloro difenil tricloroetano (DDT), compuesto organoclorado. Se patentó en Suiza en 1940, en USA en 1942 y en Australia en 1943. Luego se descubrieron otras moléculas de esta familia, como el clordano en 1945, el aldrin, el dieldrin, el heptacloro y el toxafeno en 1948, convirtiéndose en los insecticidas de mayor uso hasta 1972. En 1948 Müller recibe el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por su descubrimiento del DDT como insecticida usado en el control de la malaria, fiebre amarilla, y muchas otras infecciones causadas por insectos vectores. Estudios posteriores determinaron que la gran estabilidad química de la molécula, le otorgaba una persistencia inaceptable en el ambiente (Ritter *et al.*, 1995). Además su alta solubilidad en lípidos le confiere una elevada toxicidad crónica y tendencia a la bioacumulación y a la biomagnificación. En 1972 se prohibió el uso del DDT en Estados Unidos y otros países industrializados por su elevada toxicidad en organismos no blanco como aves, bioacumulación en la cadena trófica y la aparición de mecanismos de resistencia en los insectos (Spiro & Stigliani, 2004).

Hacia 1947 se incorporó al mercado un nuevo grupo de plaguicidas, los organofosforados, cuyo mecanismo de acción se atribuye a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, que se encarga de la reducción de los niveles de acetilcolina; uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso. En consecuencia, elevadas concentraciones de acetilcolina, conducen a una exacerbación de las respuestas parasimpáticas en el sistema nervioso de los organismos expuestos (Zamy *et al.*, 2004). Si bien estos poseen una menor persistencia que los organoclorados, en numerosas ocasiones la degradación parcial genera metabolitos de mayor toxicidad que los compuestos iniciales (Vittozzi *et al.*, 2001).

Los insecticidas carbamatos surgen alrededor de 1956, son derivados del ácido carbámico. Actúan inhibiendo la enzima colinesterasa. Presentan una menor

persistencia, dado que son rápidamente hidrolizados en el ambiente. Son de amplio espectro y poseen una baja toxicidad oral y dermal para mamíferos (Bachman & Patterson, 1999).

Los piretroides son un grupo de insecticidas sintéticos, que aparecen en el mercado en la década del 70, pero que surgen mucho antes como un intento por parte del hombre de imitar el efecto insecticida de las piretrinas naturales (piretro) que contiene el crisantemo. En este sentido, la obtención del primer piretroide, se remonta a la fabricación de la aletrina en 1949. Desde ese entonces su uso se ha intensificado a medida que los demás plaguicidas eran desplazados del mercado, ya sea por su alta residualidad, bioacumulación y toxicidad, principalmente en referencia a los organoclorados. Afectan el sistema nervioso central y periférico del insecto, actúan a nivel de los canales axónicos de sodio (Na^+) permitiendo la entrada excesiva del ion, provocando la excitación continua de la membrana del axón, descargas repetitivas y eventualmente parálisis (Ware Whitacre, 2004).

El uso masivo de estos insecticidas ha puesto de manifiesto graves problemas ambientales y sociales a nivel mundial, tales como la contaminación de los suelos, la calidad del agua y la destrucción de la fauna útil (Dehne & Schönbeck, 1994; Schneider *et al.*, 2003 a, b; 2004 a, b; 2008; 2009; Fogel *et al.*, 2016; Rimoldi *et al.*, 2017; Francesena *et al.*, 2018; Devine & Furlong, 2007). Este hecho llevó a entidades de control como la EPA (Environmental Protection Agency of USA) a restringir el uso de ciertos productos y a realizar revisiones periódicas acerca de la toxicidad de otros (Devine & Furlong, 2007).

Como consecuencia aparece una nueva tendencia en la Protección de los Cultivos, que respalda el uso de plaguicidas biorracionales con un modo de acción diferente a los convencionales. Esto ha conducido a la generación de nuevas materias activas, altamente selectivas para el control de plagas, en reemplazo de los insecticidas de amplio espectro empleados hasta el momento, por productos menos tóxicos y de acción específica (Pineda *et al.*, 2004; 2006; 2007; 2009; Rimoldi *et al.*, 2012). Entre los productos de mayor especificidad se encuentran los insecticidas reguladores de crecimiento. En este grupo se destacan los compuestos aceleradores de la muda (MAC) cuya actividad insecticida se basa en alterar el normal desarrollo y la metamorfosis. Son ecdisoides no esteroideos, que actúan en los receptores celulares de la hormona de la muda o ecdisona (Wing *et al.*, 1988) induciendo mudas prematuras y letales en los insectos (Querzola *et al.*, 1996; Gobbi, 2000).

En países en vías de desarrollo como Argentina, la utilización de estos compuestos es aún incipiente principalmente por el alto costo de estas materias activas, careciéndose de información de base acerca de la toxicidad comparativa de los mismos sobre plagas comúnmente presentes en cultivos agrícolas del país (Rimoldi, 2012).

2.2. Control químico en la viticultura

La situación de los viñedos mendocinos, tanto para uva de mesa como para vinificar es privilegiada, ya que, salvo algunas enfermedades criptogámicas, no tiene plagas que causen daño económico. Esto hace innecesaria la aplicación de plaguicidas que perturben el equilibrio ecológico (García, 1994; Strafile & Becerra, 2001).

Sin embargo, en los últimos años se ha producido un importante cambio, debido a la emergencia de dos insectos que atacan la vid: cochinilla harinosa de la vid (Becerra *et al.*, 2006) y la polilla europea de la vid (González, 2010). El ingreso de este lepidóptero fitófago llevó al SENASA a declarar la emergencia fitosanitaria, con el objetivo de lograr su erradicación. En el anexo de la Res. 504/2010 se autoriza, en forma temporaria, el empleo de insecticidas químicos para su control. En este listado, se exponen productos convencionales de amplio espectro como organofosforados, carbamatos, piretroides, insecticidas novedosos como los reguladores de crecimiento de los insectos y los bioinsecticidas como el *Bacillus thuringiensis* (SENASA 2010).

3. Los insecticidas biorracionales en el manejo de plagas

El uso de plaguicidas de amplio espectro ha traído aparejado la aparición de efectos adversos en el ambiente, en las poblaciones de insectos, además de las repercusiones sociales, lo que ha impulsado la demanda de otras alternativas para el control de las plagas. El uso de plaguicidas biorracionales, el desarrollo de moléculas químicas selectivas, profundos conocimientos de fisiología, toxicología y biotecnología pueden ayudarnos a tener una visión más integral del control biológico y químico (Horowitz *et al.*, 2009).

En los últimos 20 años se han incorporado principios activos nuevos, conocidos como “insecticidas de nueva generación”, muchos tienen ciertas ventajas como la baja toxicidad para los mamíferos, alta especificidad, mayor selectividad hacia los organismos benéficos, lo que reduce su impacto sobre el ambiente (Devine & Furlong, 2007; Ishaaya *et al.*, 2007).

Esta nueva clase de insecticidas denominados biorracionales abarca productos como, reguladores del crecimiento (IGR), inhibidores de la síntesis de lípidos (inhibidores de la Coenzima A), moduladores de la rianodina (neurotransmisor), e insecticidas biológicos (de origen microbiano y botánicos) (CASAFE 2015).

Los neonicotinoides fueron considerados por la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) como biorracionales desde su incorporación al mercado en la década del 90. Luego este organismo en 2008 reevaluó su registro debido al potencial destino ambiental y a la toxicidad de las materias activas sobre polinizadores. (Armengaud *et al.*, 2002; Blacquiere *et al.*, 2012; Decourtye *et al.*, 2004; Thompson, 2003); así como también sobre otros insectos benéficos como los depredadores y parasitoides de plagas agrícolas (Fogel *et al.*, 2013, 2016; Rimoldi *et al.*, 2017; Sohrabi *et al.*, 2012, 2013).

3.1. Crecimiento y desarrollo de los insectos

El crecimiento y desarrollo de los insectos se produce a través de la metamorfosis. Este fenómeno se encuentra regulado por hormonas. La hormona de la muda o ecdisona (HM) es secretada por las glándulas protorácicas. Su función es desencadenar los procesos de la muda, inducidos por una alta concentración de la ecdisona en la hemolinfa que provoca la renovación total del exoesqueleto, proceso llamado apólisis. La hormona juvenil (HJ) se produce en unas pequeñas glándulas denominadas corpora allata. Esta es la encargada de mantener las características inmaduras del insecto (Nijhout, 1994).

La metamorfosis, está regulada por la relación entre las concentraciones de la hormona de la muda y la hormona juvenil. Durante la fase larvaria, para iniciar el proceso de muda, la concentración de la hormona juvenil (HJ) debe descender a niveles no detectables para que la ecdisona sea liberada y así dar lugar a la formación de una nueva cutícula. Luego se alcanzan niveles basales de ecdisona, momento en que el insecto tiene completamente formado su nuevo exoesqueleto y se desencadena la ecdisis desprendiéndose la exuvia, dando lugar al cambio de estado (Riddiford, 1994).

En los lepidópteros, en el último estadio larval el nivel de HJ desciende a niveles no detectables proporcionando una señal para la liberación de un pequeño pico de ecdisona que estimula la síntesis de la cutícula pupal y el insecto cambia de estado. Después de la pupación comienza la secreción de ecdisona promoviendo la formación de estructuras del adulto (Rechcigl & Rechcigl, 1999). En la etapa adulta estas dos

hormonas también están involucradas en la regulación de la maduración reproductiva. Cuando los insectos son expuestos a los insecticidas, puede provocar efectos a corto plazo, que se expresan en la mortalidad, también pueden provocar efectos a largo plazo, induciendo un desarrollo anormal de los insectos y/o alteraciones en la capacidad reproductiva, ya sea en la proporción sexual, reducción de la fecundidad y fertilidad de las hembras con una fuerte repercusión en el crecimiento poblacional (Dhadialla *et al.*, 1998).

3.2. Insecticidas reguladores del crecimiento

Partiendo de los estudios de Williams (1956), quien propone usar las hormonas de los insectos como base química para el desarrollo de insecticidas, surge la tercera generación de insecticidas (Williams, 1967). Durante las últimas décadas, se ha avanzado en el desarrollo de nuevos principios activos que actúan sobre sitios bioquímicos, presentes en determinado grupo de insectos. Son insecticidas cuyo modo de acción imita a las hormonas que intervienen en el desarrollo y el crecimiento de los insectos plaga (Sláma *et al.*, 1974; Laskowska-Bozek & Zielinska, 1978). Estos presentan la ventaja de tener una alta especificidad para los insectos blanco y una toxicidad mínima para individuos benéficos y depredadores (Dhadialla *et al.*, 2005)

Según sus mecanismos de acción se pueden clasificar en tres grupos:

- Agonistas de la hormona juvenil o juvenoides.
- Agonistas de la hormona 20-hidroxiecdisona o ecdisoides.
- Inhibidores de la quitina.

3.2.1. Agonistas de la hormona juvenil o juvenoides:

Los agonistas de la HJ son reguladores de crecimiento de insectos. Son altamente eficaces, causan una amplia gama de trastornos en las especies susceptibles. Actúan desequilibrando las concentraciones de las hormonas naturales durante los procesos de crecimiento y desarrollo normal de las distintas plagas. Provocan deformaciones, evitan que el insecto complete la metamorfosis e impiden la emergencia adulta. Además, tienen acción supresora sobre la embriogénesis (Ishaaya & Horowitz, 1994; Dhadialla *et al.*, 1998).

3.2.2. Agonistas de la hormona 20-hidroxiecdisona o ecdisoides.

También son llamados aceleradores del proceso de muda (MAC). Estos productos químicos son mucho más potentes que la hormona natural del insecto para

inducir la muda, afectan la alimentación del insecto y el incremento de peso. La administración del agonista de ecdisoma, induce la muda y el insecto muere atrapado dentro de la cutícula exuvial, asimismo la alimentación se detiene entre las 4-16 horas después de la exposición al producto y la muda se inicia en ausencia de un ecdisteroideo.

Las larvas de lepidópteros, dípteros y coleópteros son los principales insectos afectados por estos productos. Los efectos que se manifiestan dependen del momento en que se aplique el insecticida, así por ejemplo, si el tratamiento ocurre temprano en un determinado estadio, se induce una muda anticipada que resulta ser letal para el individuo, pero si el insecto es tratado hacia el final del mismo, se producirá una muda normal, que es seguida por la muda anticipada y letal (Dhadialla *et al.*, 1998). La exposición en insectos adultos puede afectar la producción de óvulos y la espermatogénesis (Smaghe & Degheele, 1994).

3.2.3. Inhibidores de la quitina.

A esta clase de insecticidas pertenecen dos grupos químicos: benzoilureas y tiadiazinonas. Estos actúan sobre los estados larvales de la mayoría de los insectos inhibiendo la síntesis de la quitina, parte vital de su exoesqueleto. Los efectos típicos que producen es la formación de una cutícula frágil y en consecuencia, un esqueleto débil y deforme. Se observa la ruptura de la cutícula malformada y la deshidratación del insecto, causándole la muerte (Ware & Whitacre, 2004).

3.3. Bioinsecticidas de origen microbiano: Bacterias entomopatógenas

Desde su descubrimiento hace un siglo, el *Bacillus thuringiensis* (Bt) ha sido utilizado como bioinsecticida en agricultura, silvicultura y para el control de mosquitos debido a sus ventajas de toxicidad específica sobre el insecto blanco, falta de residuos contaminantes y seguridad hacia organismos no objetivo. Hoy Bt es el insecticida microbiano comercial más exitoso, que comprende alrededor del 90% del mercado de bioplaguicidas. Las propiedades insecticidas de esta bacteria se deben a la presencia de proteínas insecticidas, también llamadas cristales, producidos durante la esporulación (Sansinenea, 2012). Bt fue descubierto en Japón por Shigetane Ishiwata en 1901 como el agente causal de una enfermedad en el cultivo de larvas de gusanos de seda, quien describió que muchas de las larvas murieron al ser expuestas al bacilo y otras quedaron muy débiles. El uso del Bt como insecticida se logró en 1920. El primer registro de su

aplicación para el control de insectos fue en Hungría a finales de 1920 (Husz, 1928). En 1961, el Bt fue registrado como insecticida en la EPA (Environmental Protection Agency). Varias empresas estadounidenses comenzaron su fabricación y comercialización (Van der Laan, 1967).

3.3.1. *B. thuringiensis*: toxicidad y modo de acción

B. thuringiensis es una bacteria Gram - positiva, anaerobia facultativa que mide aproximadamente 1 μm de ancho y 5 μm de largo. Produce numerosos tipos de proteínas denominadas δ -endotoxinas con propiedades insecticidas. Son una alternativa a los plaguicidas químicos sintéticos, lo que condujo al desarrollo de bioinsecticidas y a la obtención de cultivos transgénicos. La incorporación de genes que codifican la producción de las proteínas cristalinas insecticidas proporciona a los cultivos genéticamente modificados, resistencia a las plagas. (Schnepf *et al.*, 1998). Se han dividido en proteínas Cry (crystal) y Cyt (crystal y toxina) (Crickmore *et al.*, 1998). (Figura 1.13).

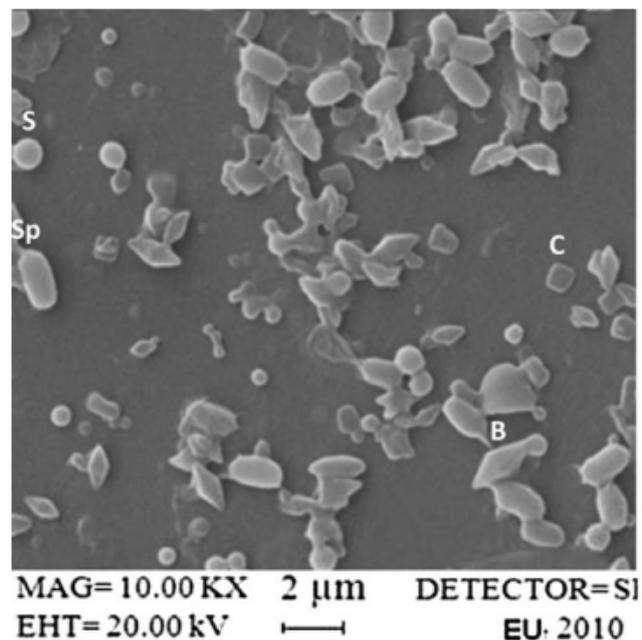


Figura 1. 13. Vista de microscopio electrónico de espigas y cristales de *Bacillus thuringiensis*. B, bipiramidal; C, cúbico; S, esférico; Sp, espora.

- a. Proteína cry: Están formadas por 168 proteínas que presentan morfológicamente como cristales cúbicos, esféricos, bipiramidales, cuadrado-aplanados, etc. Estas proteínas, deben solubilizarse en el intestino medio del insecto, las proteasas intestinales degradan al cristal liberando la δ -endotoxinas. La unión de la toxina

Cry en los receptores del intestino medio crean canales de iones o poros, se produce la lisis de las células epiteliales del intestino medio y luego provoca la muerte del insecto (Hofmann *et al.*, 1988).

- b. Proteína cyt: son toxinas hemo y citolíticas. Son producidas por algunas cepas Bt. Estas forman poros en la membrana celular. Se unen directamente a lípidos, insertándose para destruirla (Promdonkoy & Ellar, 2000). Esta toxina afecta la muda de los insectos, causando efectos teratogénicos a dosis subletales (Espinasse *et al.*, 2002, 2004). Es activo contra dípteros, coleópteros, lepidópteros, y algunas especies de nematodos. (**Figura 1.14**).

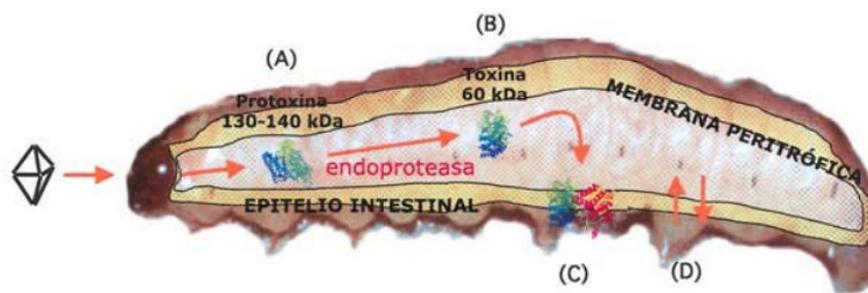


Figura 1. 14. Esquema del modo de acción de las proteínas Cry en el tubo digestivo de una larva de lepidóptero. **(A)** Solubilización de la toxina. **(B)** Procesamiento de la protoxina a toxina mediante proteasas digestivas. **(C)** Unión de la toxina al receptor de las células del epitelio intestinal. **(D)** formación de poros en la membrana celular que produce su lisis (Poza Gómez, 2004).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Evaluar, en condiciones de laboratorio, la toxicidad de insecticidas biorracionales registrados para el control químico de la polilla de la vid, *Lobesia botrana*, poniendo énfasis en la evaluación a nivel letal y subletal a fin de determinar la efectividad de control de estos insecticidas.

2.2. Objetivos Específicos

- 1)- Estudiar los efectos letales de los insecticidas objeto de estudio sobre estados inmaduros y adulto de *Lobesia botrana*.
- 2)- Evaluar efectos subletales de los insecticidas objeto de estudio sobre estados inmaduros y adulto de *Lobesia botrana*, principalmente aquellos relacionados con aspectos reproductivos de la plaga.

2.3 Hipótesis de Trabajo

Los insecticidas biorracionales son eficaces para el control de *Lobesia botrana*, y presentan un alto potencial como alternativa a los insecticidas convencionales de amplio espectro.

CAPÍTULO 3
MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de organismos a campo: Pie de cría.

Durante la temporada 2015-2016 se estableció un pie de cría a partir del material recolectado del área vitícola de la localidad de Cruz de Piedra (33°01'52"S; 68°46'34"O), Maipú, provincia de Mendoza. Se tomaron racimos infestados con ejemplares de *L. botrana* de diferentes estados, los cuales se llevaron al laboratorio bajo condiciones de cuarentena, donde se mantuvieron para que continúen con su desarrollo y descartar así enfermedades o parasitismo. Una vez verificada la sanidad de los organismos recolectados, se inició el pie de cría, la cual se desarrolló en una cámara, bajo condiciones controladas de luz, con fotoperiodo 16:8 (L: O), 25 ± 5 °C de temperatura y entre 30-50% HR, esta última teniendo en cuenta las características de la zona de viticultura. La técnica de cría fue modificada por Herrera *et al.* (2016) a partir de la detallada por Ferreira *et al.* (2003).

3.2. Preparación de dieta artificial para *Lobesia botrana*.

La dieta utilizada es la descrita por (Ferreira *et al.*, 2003). En resumen, en un recipiente apto para someter al calor se diluyó 10 g de agar en agua fría. Se calentó la mezcla hasta ebullición, se retiró del fuego. Se agregó 3,20 g de ácido ascórbico, 1 g de ácido benzoico, 0,75 g de estreptomina, 0,075 g de fumagilina, 31 g de germen de trigo, 32,50 g de harina de maíz, 32,50 g de levadura de cerveza y 1 g de metil hidroxybenzoato. Se mezcló con batidora eléctrica. Al final se incorporó el aceite de maíz, el alcohol etílico y el carbendazim 5% SC (C₉H₉N₃O₂). El preparado obtenido se colocó en caliente en recipientes de plástico de 30 cm x 20 cm x 5 cm provistos de tapa hermética destinados a la cría, previamente esterilizados con alcohol 90°. Los mismos se conservaron refrigerados a una temperatura de aproximadamente 10 °C hasta su uso.

3.3. Cría y mantenimiento de *Lobesia botrana* en laboratorio.

Etapa adulto: los adultos de *L. botrana* se colocaron en la cámara de reproducción, que consistió en una botella de 2000 ml de PVC, provista de un bebedero con una solución de miel de abejas al 5% como fuente de alimentación. Ahí se verificó la cópula y el plástico fue el sustrato de oviposición (**Figura 3.1 a**).

Etapa de huevo - larva: la botella con las posturas fue desinfectada a fin de evitar el desarrollo de enfermedades. Se realizaron dos enjuagues con una solución de 500 ml de agua corriente y 12 cm³ de hipoclorito de sodio, luego se enjuagó con agua corriente. Se realizó la inmersión durante 1 minuto en una solución de 500 cm³ de agua corriente, 1 g de estreptomicina y 1 g de fumagilina. Se dejó secar al aire. Luego se recortó el PVC que contenía huevos. Se incrustaron los trozos de plástico sobre la dieta artificial. Previamente se realizó un reticulado sobre la superficie de la dieta, a fin de que las larvas emergentes se desplazaran hasta ubicarse en estas hendiduras. Las larvas permanecieron allí desde la eclosión de las neonatas y hasta completar su desarrollo larvario, es decir los cinco estadios larvales (**Figura 3.1 b**).

Etapa de pupa – adulto: Una vez alcanzado el estado de pupa, se extrajeron las crisálidas, las cuales fueron transferidas a recipientes esterilizados previamente con alcohol 90°, los mismos eran de 4 cm de diámetro por 4 cm de alto con tapa hermética, sin ningún soporte. Allí permanecieron hasta la emergencia de los adultos, quienes iniciaron el ciclo nuevamente.

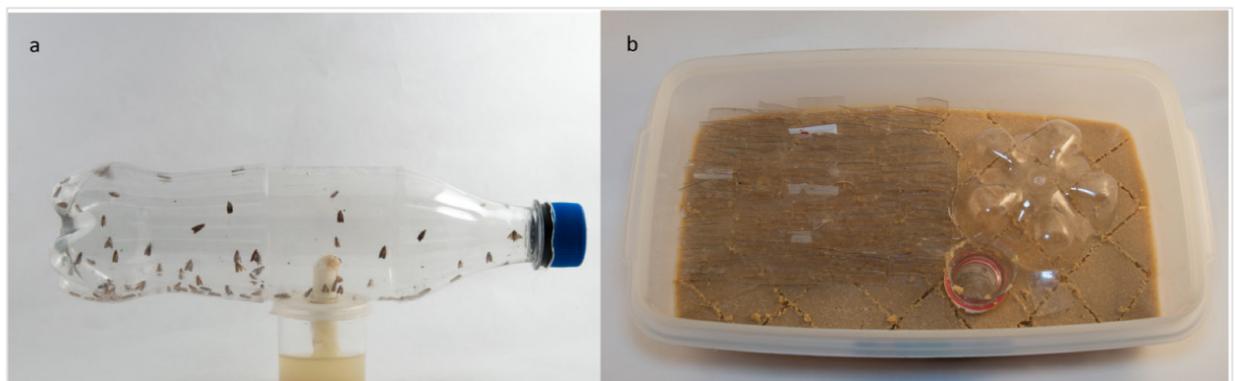


Figura 3. 1 a. Cámara de reproducción para *Lobesia botrana*: botella de PVC para la cópula y oviposición, acondicionada con bebedero con solución de miel al 5%. **b:** Recipiente con dieta artificial que contiene trozos de PVC con huevos de la especie.

3.4. Bioensayos de toxicidad: Exposición de *Lobesia botrana* a insecticidas

Se mantuvieron paralelamente dos colonias, una permanente y otra de menor escala para llevar a cabo los bioensayos. Se utilizaron dos cámaras de cría con idénticas

condiciones. Las cámaras contaban con termohigrómetros de precisión (máximo y mínimo), y un timer para automatizar el fotoperíodo (**Figura 3.2**).

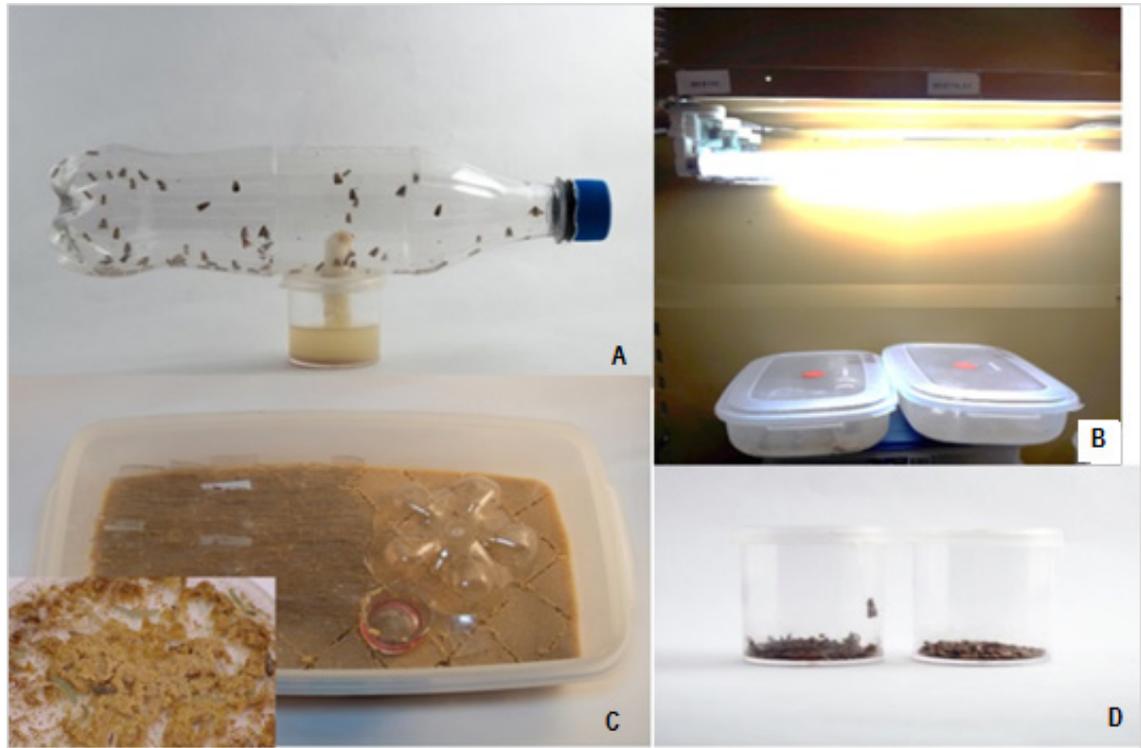


Figura 3. 2. Cámara donde se llevó a cabo la cría de *Lobesia botrana* y los bioensayos toxicológicos. **A.** Cámara de copulación y sitio de oviposición. **B.** Recipientes con individuos en desarrollo en cámara de cría. **C.** Recipientes herméticos donde los insectos permanecen desde el estado de huevo al estado pupal. **D.** Recipientes herméticos donde se verifica la emergencia adulta.

3.5. Metodología general de preparación y aplicación de los insecticidas evaluados.

3.5.1. Preparación de soluciones y suspensiones de insecticidas.

Las soluciones de insecticidas utilizadas en los bioensayos fueron preparadas al inicio de cada experimento. En la **tabla 3.1** se detalla el nombre del ingrediente activo, nombre comercial, las formulaciones comerciales, su pureza, la máxima dosis recomendada para su uso en campo y la empresa fabricante en Argentina.

Para evaluar la toxicidad de cada insecticida, se prepararon las diferentes soluciones madre y a partir de éstas se realizaron las diluciones correspondientes (Schneider, 2002). Los solventes utilizados fueron agua destilada y acetona, dependiendo del tipo de ensayo y método de exposición seleccionado (ingestión, inmersión, tópico, etc.) siguiendo los protocolos y metodologías detallados en (Schneider *et al.*, 2003 a, b; 2004 a, b; Pineda *et al.*, 2004; 2006; Gobbi *et al.*, 2010). Además, se estimó la CL_{50} de los insecticidas, a fin de medir la efectividad de los

mismos. Se utilizaron de 4-6 concentraciones, las cuales se establecieron a partir de la MCRC para cada insecticida (Darvas & Polgar, 1998).

Tabla 3. 1. Insecticidas utilizados en los bioensayos de toxicidad de *Lobesia botrana*.

Ingrediente activo	Nombre comercial	Pureza y formulación	MCRC (mg i. a./L)	Empresa fabricante
metoxifenocide	Intrepid ®	24% SC	72	Dow Agro Sciences S.A
clorantraniliprole	Coragen ®	20% SC	40	DuPont S.A
novaluron	Rimon Supra ®	10 % SC	100	Magan S.A
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i>	Dipel L Plus ®	3,5% EC	525	Summit Agro S.A

3.5.2. Métodos utilizados para la exposición de los insecticidas

En este punto se explica las diferentes vías de exposición de los organismos a los insecticidas, siguiendo los protocolos ya mencionados anteriormente.

Exposición por inmersión: consiste en sumergir a los organismos durante cierto tiempo en una solución de un insecticida, utilizando como solvente agua destilada (**Figura 3.3**).

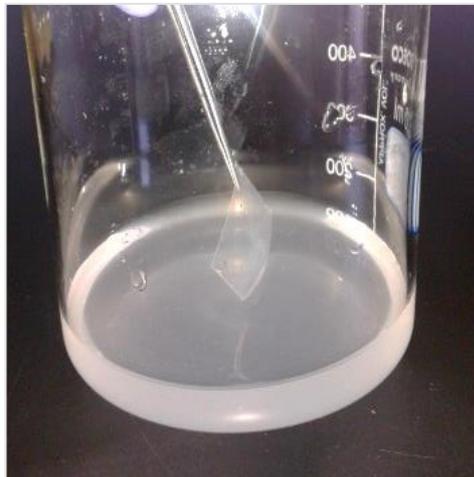


Figura 3. 3. Ensayos Toxicológicos de exposición por inmersión de huevos de *Lobesia botrana* a insecticidas.

Exposición tópica: se realiza mediante un microaplicador manual (Hamilton ® Reno, Nevada USA), colocando sobre el organismo una gota de volumen conocido de la solución del insecticida a evaluar. En este caso se utiliza como solvente acetona para

facilitar una rápida evaporación de la gota, asegurando el depósito del insecticida sobre la cutícula del insecto (**Figura 3.4**).

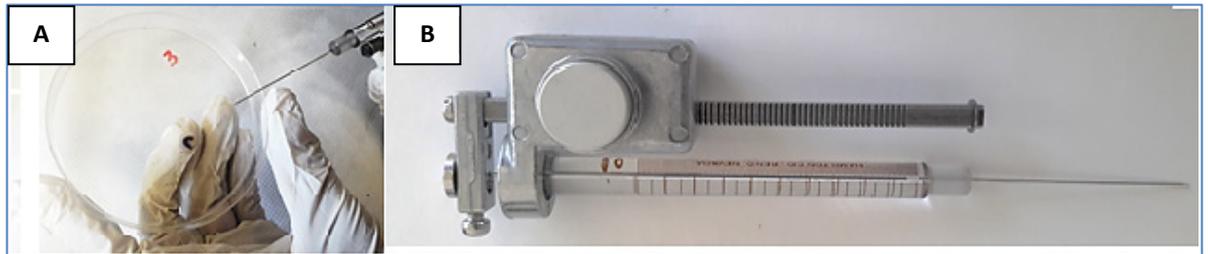


Figura 3. 4 A. Ensayos Toxicológicos de exposición tópica de *Lobesia botrana* a insecticidas. B. Microaplicador manual (Hamilton®, Reno, Nevada USA).

Exposición por ingestión: se trata de exponer a los insectos a órganos vegetales previamente tratados con los insecticidas a evaluar, o a través del agua de beber preparada con las soluciones de insecticidas (**Figura 3.5**).



Figura 3. 5. Bioensayos Toxicológicos: exposición de *Lobesia botrana* a insecticidas por ingestión: **a.** inflorescencias de vid pulverizadas con las soluciones de insecticidas a evaluar para ensayos por ingestión en el estado larval. **b.** bebederos con soluciones insecticidas para exposición de adultos.

En la **figura 3.6** se resumen los métodos de aplicación de los insecticidas, para cada estado/estadio de desarrollo del insecto y los puntos finales de evaluación.

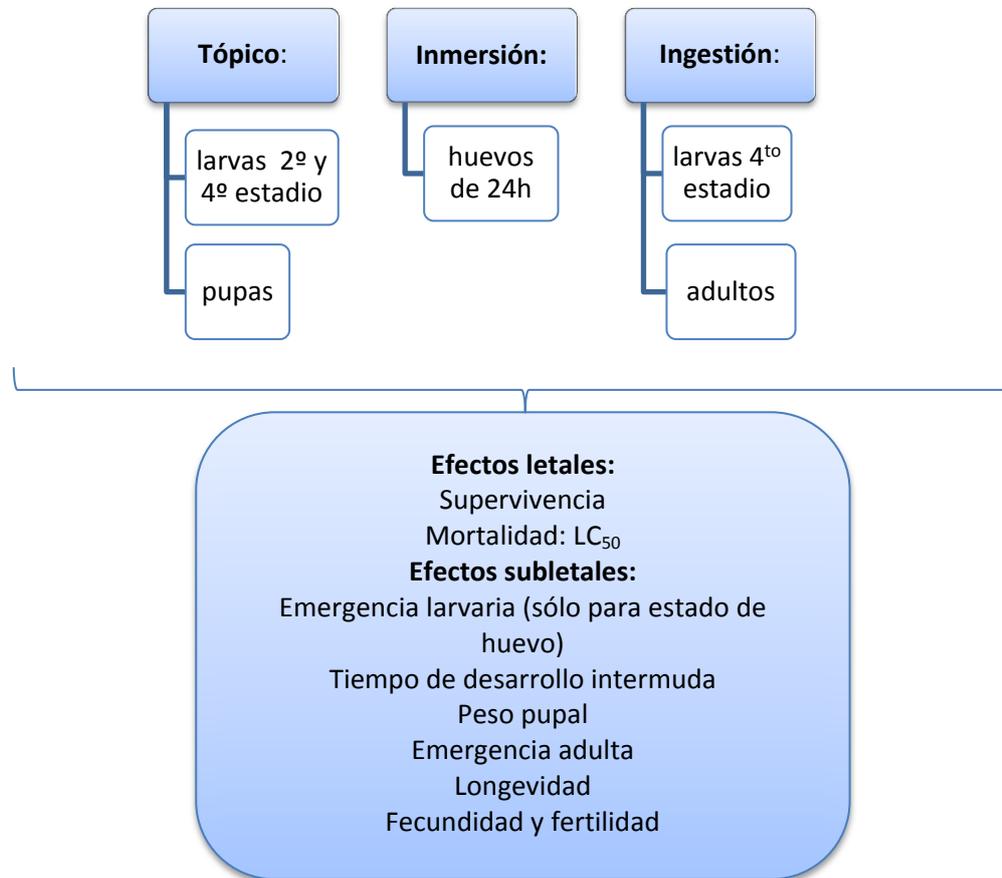


Figura 3. 6. Esquema secuencial de la evaluación toxicológica de los insecticidas sobre estados inmaduros y adultos de *Lobesia botrana* en laboratorio. Puntos finales de evaluación.

3.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron con el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento). Para corroborar las premisas del ANOVA se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba de Cochran, Hartley y Levene. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica $y = \log(x+1)$ y angular: $p' = \arcseno \sqrt{p}$. Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ($y = \arcsen \sqrt{x}$) para posteriormente ser reevaluados. El análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, luego de su transformación, se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-

Wallis. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0 con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 4

Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre huevos de *Lobesia botrana*.

4. Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre huevos de *Lobesia botrana*

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Obtención de huevos para los bioensayos de toxicidad.

La exposición se realizó sobre huevos de 24 h de edad. Para obtenerlos se colocaron 15 parejas de adultos provenientes de una misma cohorte en la cámara de copulación (botella PVC), a los cuales se les suministró una solución de miel al 5% como fuente de alimentación.

4.1.2. Bioensayos

4.1.2.1. Bioensayo para la determinación de CL₅₀ de los insecticidas sobre el estado de huevo.

Se prepararon diluciones a partir de la MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) de los siguientes productos comerciales: Intrepid® (metoxifenocida, 24% i.a., Dow-Agroscience Arg, Bs. As., Argentina); Coragen® (clorantraniliprole, 20% i.a., DuPont Arg, Bs. As., Argentina); Rimon Supra® (novaluron, 10 % i.a., Magan Arg, Bs. As., Argentina); y Dipel L Plus® (*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, 3,5% i.a., Summit Agro Arg, Bs. As., Argentina), tomando un rango de 6 concentraciones como mínimo e incluyendo la MCRC, a fin de estimar los valores de CL₅₀ (corresponde a la concentración de insecticida que produce la muerte del 50% de la población expuesta). El bioensayo consistió en 100 huevos de 24 h por concentración. Los huevos se sumergieron en las soluciones de insecticida correspondiente durante 3 s, de acuerdo con Pineda *et al.*, (2004). Para cada insecticida y el control se registró el número de huevos sin eclosionar a las 72 h post-tratamiento (Figura 4.1).

4.1.2.2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el estado de huevo.

Se evaluaron las MCRC de los productos comerciales mencionados anteriormente. Las soluciones para cada insecticida fueron preparadas usando agua destilada como disolvente. La unidad experimental consistió en 20 huevos y se realizaron 3 réplicas por tratamiento, incluyendo al control. Las posturas de 24 h de edad se sumergieron en la solución del insecticida correspondiente, tal como se describe en el apartado anterior. Los controles se trataron con el solvente solo (agua destilada).

Luego de tratados, se dejaron secar bajo campana en cajas de Petri previamente identificadas con el tratamiento y la réplica (9 cm diámetro y 1,5 cm alto) y se llevaron a cámara de cría bajo condiciones controladas de temperatura 25 ± 5 °C, humedad relativa 30 - 50% y fotoperíodo 16:8 (L: O) (**Figura 4.1**).

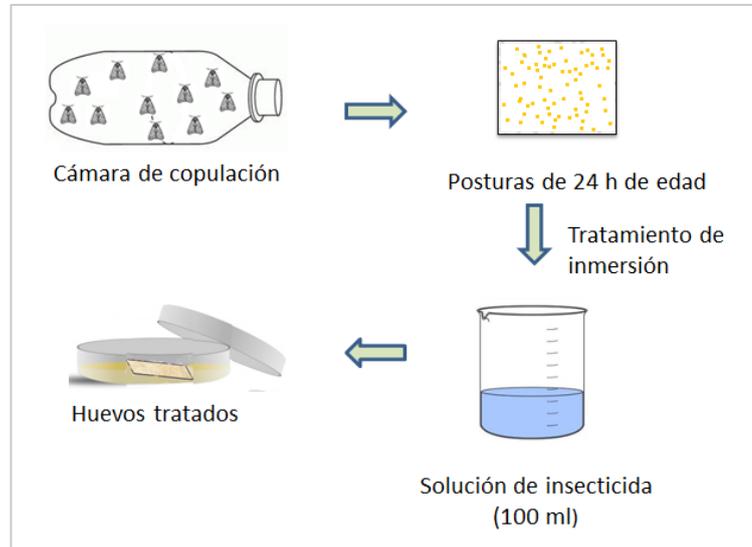


Figura 4. 1. Esquema del bioensayo de inmersión de huevos de *Lobesia botrana*

4.2. Evaluación:

4.2.1. Bioensayo para la determinación de CL_{50} de los insecticidas sobre el estado de huevo

Para cada insecticida y el control se registró el número total de huevos sin eclosionar a las 72 h post-tratamiento, tomando la no eclosión como muerte. Con estos valores de mortalidad acumulada se estimó la CL_{50} , a través de un análisis de regresión (relacionado concentración y mortalidad) para cada uno de los insecticidas ensayados.

4.2.2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el estado de huevo

Periódicamente, a partir de las 24 h post-tratamiento y durante 4 días consecutivos, se revisaron las posturas bajo lupa estereoscópica para registrar el número de huevos eclosionados. Aquellos que no lograron eclosionar durante ese período se consideraron muertos. Se evaluó como efecto letal (corto plazo) de los insecticidas el porcentaje de eclosión, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de eclosión} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de huevos eclosionados}}{\text{N}^\circ \text{ huevos inicial}} \times 100$$

Los huevos no eclosionados se fijaron en solución de Bouin®, luego se deshidrataron en series de etanol grado analítico (70, 90 y 100%) para su montaje entre

porta y cubre objetos, utilizando Hoyer® como líquido montaje. Los preparados se secaron en estufa para su posterior observación con el microscopio binocular Axiostar Plus, ZEISS®.

De las larvas emergidas de los huevos tratados, se seleccionaron al azar 10 de ellas, las que fueron individualizadas en cajas de Petri por tratamiento. Las mismas se mantuvieron en cámara de cría y se les suministró dieta artificial, registrándose la evolución de las mismas a lo largo del tiempo (efectos a largo plazo). Para determinar los efectos a largo plazo de los insecticidas se evaluaron las siguientes variables o puntos finales de evaluación toxicológica: supervivencia larval, tiempo intermuda de los estados inmaduros larvales (del primero al quinto estadio larval) y pupal, porcentaje de pupación respecto al primer y al quinto estadio larval, peso pupal, emergencia adulta (en relación a los individuos que llegaron a pupar y a las larvas eclosionadas) y longevidad adulta. Con los individuos que completaron el ciclo de vida y llegaron a la fase adulta se evaluó la fecundidad y fertilidad de las hembras. En cada tratamiento, se formaron parejas que se acondicionaron en botellas provistas de un bebedero con agua con miel al 5% (cámara de copulación). A diario y durante seis días consecutivos se registró el número de huevos colocados por hembra (fecundidad) y posteriormente la emergencia larval a partir de esos huevos (fertilidad) por hembra y tratamiento.

4.3. Análisis estadístico

4.3.1 Bioensayo para la determinación de CL_{50} de los insecticidas sobre el estado de huevo

Para la estimación de la CL_{50} , los datos de mortalidad acumulada por tratamiento fueron sometidos a Análisis de Regresión Probit, a través del cual se establece la relación entre la concentración de exposición y la mortalidad registrada. Se utilizó el programa informático Probit desarrollado por el Departamento de Entomología de la Universidad Nacional de Chung-Hsing (Chi, 1997).

4.3.2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el estado de huevo

Los resultados obtenidos de los ensayos de MCRC, se analizaron con el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento). Para corroborar las premisas del ANOVA se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba de

Cochran, Hartley y Levene. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica $y = \log(x+1)$ y angular: $p' = \arcseno \sqrt{p}$. Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ($y = \arcsen \sqrt{x}$) para posteriormente ser reevaluados. El análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, luego de su transformación, se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0 con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

4.4. Resultados

4.4.1. Bioensayo para la determinación de la concentración Letal Media (CL₅₀)

Se estimó la CL₅₀ a partir de los datos de mortalidad acumulada a las 72 h post-tratamiento. Los valores del análisis se detallan en la **tabla 4.1**.

Tabla 4. 1. Análisis de regresión Probit de huevos de *Lobesia botrana* de 24 h de edad. Ensayo de inmersión de huevos tratados con *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, metoxifenocide, novaluron y clorantraniliprole.

Insecticida	n ^a	pendiente ± SE	CL ₅₀ (mg i. a. /L)	χ ²	gl
<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki	7	5,69 ± 0,18	0,44	5,21	4
metoxifenocide	6	- 1,54 ± 0,42	68,59	3,99	3
novaluron	6	- 4,70 ± 0,57	101,20	7,53	3
clorantraniliprole	6	- 3,87 ± 0,74	54,20	5,20	3

Datos obtenidos del programa informático Probit desarrollado por el Departamento de Entomología de la Universidad Nacional de Chung-Hsing (Chi, 1997).

^aNúmero de concentraciones de insecticidas probadas.

Los valores estimados de la CL₅₀ para el novaluron y el clorantraniliprole, superan las MCRC (100 mg i.a./ L; 40 mg i.a./L respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto la baja eficacia ovicida de estos productos para el control *L. botrana* al estado de huevo. La CL₅₀ del metoxifenocide, se encuentra apenas por debajo de la MCRC (72 mg i.a./L) lo que incrementa la eficacia de control. El *B. thuringiensis* var. kurstaki mostró una actividad ovicida manifiesta, lo cual demuestra

un efectivo control de la polilla de la vid al estado de huevo, ya que la CL_{50} estimada se encuentra muy por debajo de la MCRC (525 mg i.a. /L).

4.4.2. Efectos letales: Efectos sobre el desarrollo embrionario y eclosión de huevos de *L. botrana*

Como se puede observar en la **figura 4.2**, el tratamiento con *Bacillus thuringiensis* a la MCRC (1500 cm/hl) ocasionó un 100% de mortalidad en los huevos expuestos al insecticida (no se observó desarrollo embrionario). La susceptibilidad de los huevos de *L. botrana* a clorantraniliprole, novaluron y metoxifenocide fue muy baja, no registrándose un efecto ovicida importante en dichos tratamientos. La mortalidad embrionaria (embrión desarrollando dentro el huevo) se verificó mediante la observación de preparados microscópicos (**Figura 4.3**).

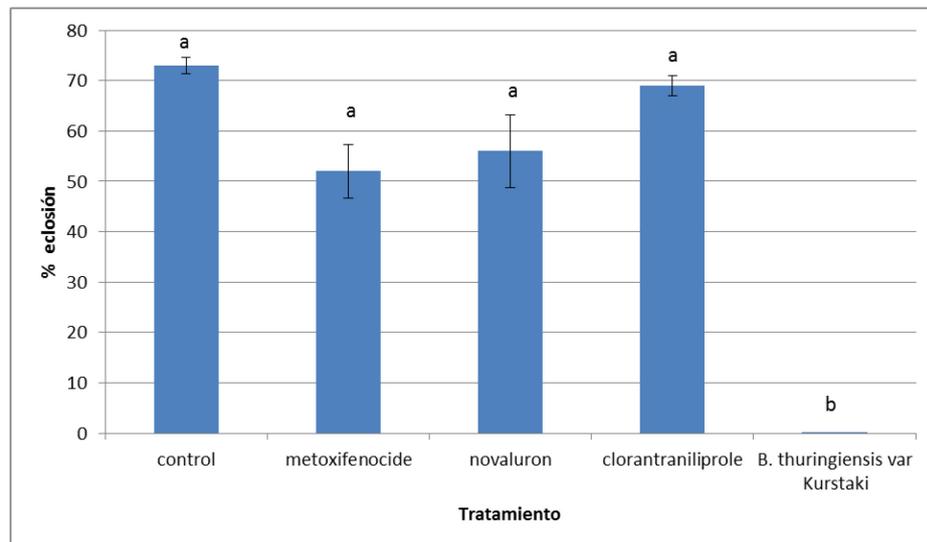


Figura 4. 2. Eclosión larval de huevos de *Lobesia botrana* tratados por inmersión.

Los datos se expresan como valores medios \pm ES ($p < 0,05$). Las diferentes letras indican diferencias significativas con respecto al control

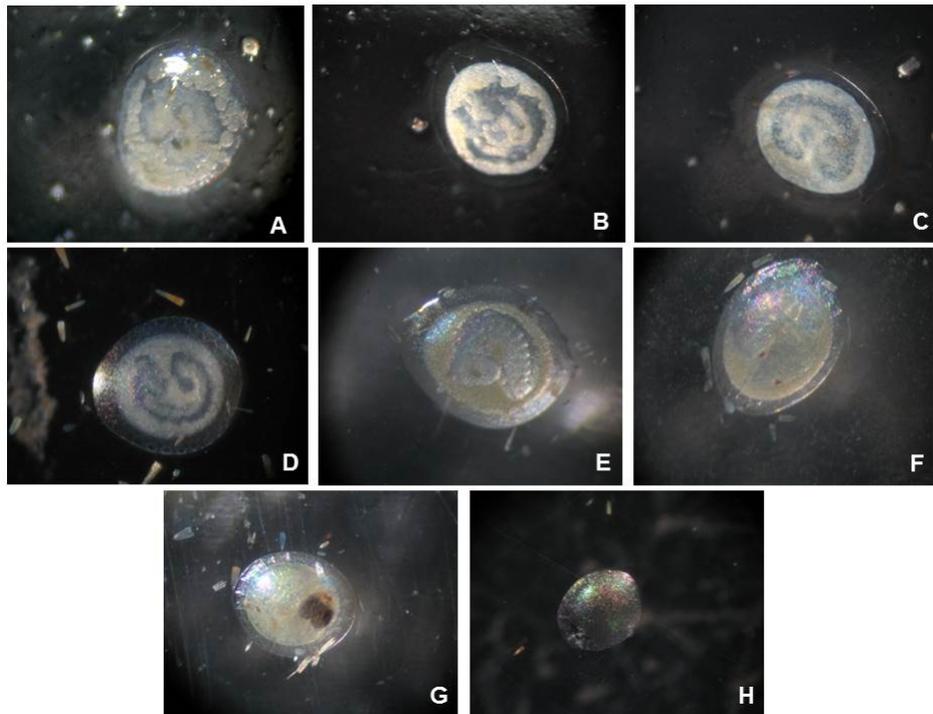


Figura 4. 3. Desarrollo embrionario de huevos de *Lobesia botrana*. **A, B, C.** Inhibición del desarrollo embrionario de huevos tratados con *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **D, E, F, G, H.** Desarrollo embrionario de huevos sin tratar (control) (12, 24, 36, 48 y 72 h post-tratamiento).

4.4.3. Efectos subletales:

4.4.3.1. Efectos a largo plazo: supervivencia de estadios inmaduros y adulto a partir de huevos tratados.

Como se observa en la **tabla 4.2**, el tratamiento de inmersión de huevos con metoxifenocida, produjo una reducción significativa de la supervivencia de las larvas de 2° estadio en un 52% con respecto al control (95,8%). Mientras que el clorantraniliprole redujo la supervivencia a larvas de 5° estadio a un 34% respecto del control. En los estadios larvales L1, L3 y L4, no se observaron efectos significativos en la supervivencia para ninguno de estos insecticidas con respecto al control. Clorantraniliprole a la concentración ensayada, disminuyó la supervivencia pupal en un 46%, respecto a L5 en comparación al control (97,6%).

Clorantraniliprole y metoxifenocida redujeron la supervivencia pupal respecto a la eclosión de huevos en un 14,57% y 19,4%, respectivamente en relación al control (56,2%). Clorantraniliprole y novaluron, redujeron la emergencia adulta respecto a las pupas formadas en un 26,66 % y 31,33 % en relación al control. Clorantraniliprole y

metoxifenocida redujeron la emergencia adulta respecto de los huevos eclosionados en un 9 % y 19% respectivamente en relación al control.

Tabla 4. 2. Efectos subletales a largo plazo de los insecticidas ensayados sobre la supervivencia de estados inmaduros y adulto a partir de huevos tratados de *Lobesia botrana*.

Tratamiento	Concentración (mg ia L ⁻¹)	Supervivencia larval (%)					Supervivencia pupal (%)		Emergencia adulta (%)	
		L1	L2	L3	L4	L5	respecto L5	respecto huevos eclosionados	respecto de pupa	respecto de huevos
control	0	73,40 ± 11,80 a	95,80 ± 2,61 a	100,00 ± 0,0 a	96,60 ± 3,40 a	100,00 ± 0,0 a	97,60 ± 2,40 a	56,20 ± 7,09 a	100,00 ± 0,0 a	49,80 ± 4,71 a
clorantraniliprole	40	53,40 ± 7,79 a	87,20 ± 9,68 a	78,60 ± 10,20 a	89,60 ± 7,75 a	34,00 ± 15,36 b	46,00 ± 20,39 b	14,57 ± 7,00 b	26,66 ± 19,40 b	9,00 ± 4,67 b
metoxifenocide	72	45,00 ± 18,39 a	52,00 ± 16,81 b	80,00 ± 20,00 a	75,00 ± 25,00 a	60,00 ± 24,49 ab	80,00 ± 20,00 ab	19,40 ± 9,05 b	53,33 ± 12,24 ab	19,40 ± 9,05 b
novaluron	100	69,40 ± 4,22 a	93,40 ± 6,60 a	63,60 ± 17,30 a	77,00 ± 7,23 a	80,00 ± 12,24ab	71,20 ± 13,99 ab	39,00 ± 13,20 ab	31,33 ± 3,88 b	45,40 ± 11,74 a
Análisis estadístico		F= 4,92 gl= 4; 18 p= 0,074 (1)	K= 12,38 gl= 4; 18 p= 0,014 (2)	F= 5,68 gl= 4; 18 p=0,0039 (1)	K= 9,97 gl= 4; 18 p=0,0408 (2)	F= 5,52 gl=4; 18 p=0,0044 (1)	K=10,74 gl= 4; 18 p= 0,03 (2)	F=5,19 gl= 4; 18 p= 0,06 (1)	K= 10,99 gl= 4; 18 p=0,02 (2)	F=7,14 gl= 4; 18 p= 0,013 (1)

Los datos se expresan como valores promedios ± ES (p < 0,05) los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes.

(1) ANOVA; (2) Kruskal - Wallis.

L1: larva de 1° estadio, L2: larva de 2° estadio, L3: larva de 3° estadio, L4: larva de 4° estadio, L5: larva de 5° estadio

4.4.3.2. Efectos a largo plazo: tiempo de desarrollo intermuda de estadios inmaduros de individuos emergidos de huevos de *L. botrana*.

La **tabla 4.3** muestra los valores del tiempo intermuda de los estados inmaduros. Debido a la alta mortalidad causada por *Bt* var. *kurstaki* (525 mg i.a./L), no hubo sobrevivientes para evaluar efectos subletales (100% de mortalidad de huevos). Los individuos que emergieron de los huevos tratados con clorantraniliprole retrasaron el proceso de muda, prolongando el periodo de L1 a adulto durante 41,5 días, respecto del control, cuya duración fue de 32,75 días. Metoxifenocide y novaluron se comportaron de manera semejante al control. El novaluron fue el único que redujo significativamente tanto el peso de pupas como así también la longevidad de los adultos que emergieron de ellas. El clorantraniliprole redujo significativamente el peso pupal.

Tabla 4. 3. Efectos subletales de los insecticidas sobre organismos de *Lobesia botrana*, provenientes de huevos tratados (estado de exposición).

Tratamiento	Concentración (mg ia L-1)	tiempo de desarrollo intermuda (días)							Peso pupal (mg)	Longevidad adulta (días)
		L1-L2	L2-L3	L3-L4	L4-L5	L5-Pupa	L1-Pupa	L1-Adulto		
control	0	5,45 ± 0,08 b	5,56 ± 0,99 b	5,87 ± 0,18 a	8,05 ± 0,33 ab	12,54 ± 0,58 a	24,47 ± 0,44 a	32,75 ± 0,28 ab	10,83 ± 0,45 a	7,91 ± 0,20 b
clorantraniliprole	40	6,91 ± 0,09 d	6,77 ± 0,16 c	6,20 ± 0,11 ab	11,47 ± 1,28 bc	12,70 ± 0,54 a	26,20 ± 2,72 a	41,50 ± 0,86 c	9,27 ± 0,89 b	7,75 ± 0,47 ab
metoxifenocide	72	4,85 ± 0,11 a	4,11 ± 0,38 a	6,18 ± 0,50 ab	10,30 ± 0,83 c	13,40 ± 1,04 a	25,00 ± 1,26 a	31,85 ± 2,68 ab	9,57 ± 0,89 ab	8,16 ± 1,07 b
novaluron	100	6,00 ± 0,09 c	6,72 ± 0,11 c	6,87 ± 0,24 b	7,74 ± 0,49 a	11,30 ± 0,64 a	24,95 ± 0,39 a	29,35 ± 1,17 a	9,18 ± 0,53 b	6,16 ± 0,29 a
Análisis estadístico		F= 99,91 gl= 3; 99 p= 0,001 (1)	K= 69,21 gl= 3; 81 p=0,0001 (2)	K= 11,97 gl= 3;73 p=0,0076 (2)	K= 8,82 gl= 3;71 p= 0,032 (2)	K= 8,71 gl= 3;63 p= 0,03 (2)	K= 1,53 gl= 3; 63 p= 0,68 (2)	K= 18,59 gl= 3 ;63 p= 0,0003 (2)	K= 5,67 gl= 3; 65 p=0,13 (2)	K= 13,62 gl= 3;42 p= 0,0034 (2)

Los datos se expresan como valores medios ± ES (p < 0,05). Dentro de cada columna, los datos seguidos con diferente letra denotan diferencia significativa. (1) ANOVA; (2) Kruskal - Wallis

L1: larva de 1° estadio, L2: larva de 2° estadio, L3: larva de 3° estadio, L4: larva de 4° estadio, L5: larva de 5° estadio

En la **figura 4.4** se observan algunas alteraciones en el proceso de muda de los insectos expuestos a los insecticidas en relación al control, como resultado del efecto a largo plazo de los insecticidas ensayados sobre el estado de huevo.

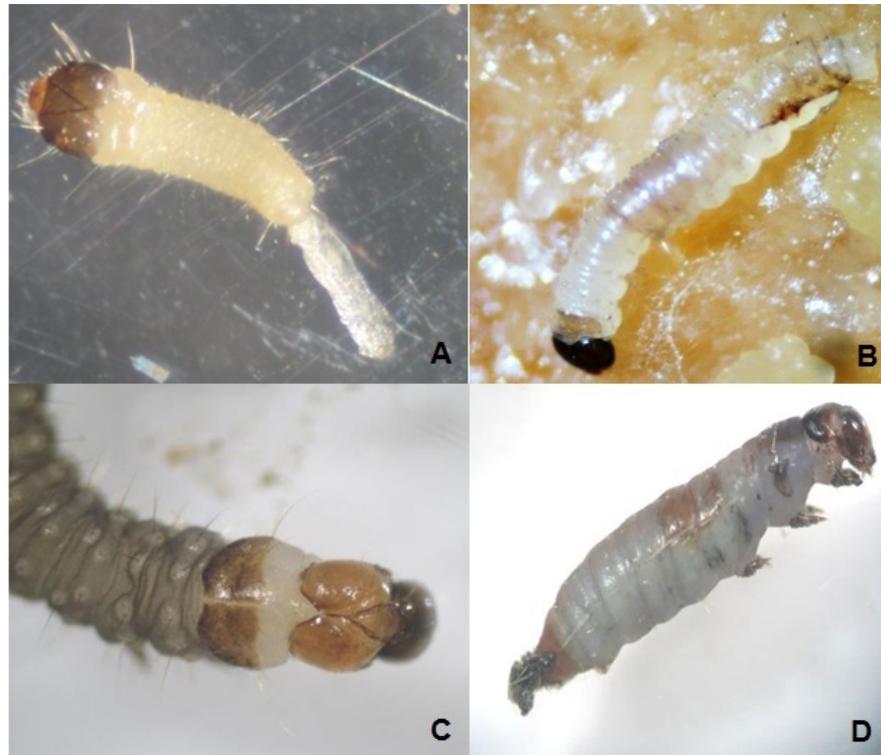


Figura 4.4. Efectos teratológicos sobre la metamorfosis de larvas de *Lobesia botrana* emergentes de huevos tratados. **A.** larva neonata con expulsión del intestino (clorantraniliprole, novaluron y metoxifenocide) **B.** larva de 2º estadio con ecdisis incompleta (exuvia adherida al cuerpo) (metoxifenocide) **C.** larva con doble cápsula cefálica (novaluron) **D.** larva del último estadio la cual presenta características intermedias entre larva y pupa (metoxifenocide).

4.4.3.3. Efectos a largo plazo: fecundidad y fertilidad

La **tabla 4.4** muestra los resultados obtenidos para la fecundidad y fertilidad acumuladas durante seis días consecutivos, a partir de las oviposiciones de hembras de *L. botrana* recolectadas durante este periodo. Las MCRC ensayadas de clorantraniliprole, metoxifenocide y novaluron redujeron significativamente el número promedio de huevos puestos por hembra (fecundidad acumulada), sólo el metoxifenocide afectó de manera significativa al número promedio de huevos eclosionados (fertilidad) con respecto al control.

Tabla 4. 4. Efecto de los insecticidas ensayados a la MCRC sobre la fecundidad y la fertilidad acumulada en adultos de *Lobesia botrana*, provenientes de huevos tratados (estado de exposición).

Tratamiento	Concentración (mg i. a. L ⁻¹)	Fecundidad ^(a)	Fertilidad (%) ^(b)
control	0	129,66 ± 20,30 a	95,12 ± 15,47 a
clorantraniliprole	40	64,00 ± 15,56 b	73,87 ± 19,01 ab
metoxifenocide	72	71,66 ± 16,65 b	61,06 ± 25,96 b
novaluron	100	65,33 ± 15,87 b	75,02 ± 29,19ab
Análisis estadístico		F= 5,97 gl= 3;116 p= 0,0008 (1)	F= 4,54 gl= 3;85 p= 0,055 (1)

Los datos se expresan como valores medios ± ES ($p < 0,05$). Dentro de cada columna, los datos seguidos con diferente letra denotan diferencia significativa. ⁽¹⁾ ANOVA; ⁽²⁾ Kruskal - Wallis

^(a) Puesta acumulada durante seis días consecutivos de oviposición (fecundidad acumulada).

^(b) porcentaje de huevos eclosionados (fertilidad acumulada).

4.5. Discusión

El huevo proporciona resistencia mecánica e impermeabilidad para el embrión en desarrollo (Nation, 2008), además de preservarlos frente a factores ambientales adversos e incluso contra los plaguicidas (Campbell, 2016). El corion es una estructura compleja formada por células foliculares (Chapman, 1998). Presenta dos capas: el exocorion cubierto por una capa discontinua de mucosa e internamente una capa delgada denominada el endocorion, que contiene carbohidratos (Cônsoi et al., 1999). El blastodermo es un estrato celular que dará lugar a todas las células del cuerpo de la larva. El vitelo del huevo, proporcionará alimento al embrión en desarrollo, hasta la eclosión larval (Takesue *et al.*, 1980, Tojo & Machida, 1998). Los huevos poseen estructuras para la respiración (aerópilas) y fertilización (micrópilas). Estas aberturas son sitios potenciales para el ingreso de plaguicidas (Hinton, 1969). Las variaciones en la susceptibilidad del estado de huevo podrían deberse a las características del corion de las diferentes especies, tipo, número y forma de las micrópilas o por los mecanismos de

resistencia del embrión (Outram, 1967). Las primeras investigaciones sugieren que los insecticidas a base de aceite, actúan cubriendo los aerófilos, limitando la llegada de oxígeno al embrión, aunque se sabe que el corion posee componentes cerosos que permiten el paso de insecticidas a base de aceite (Tunc *et al.*, 2000).

Los resultados de estos bioensayos con huevos de *L. botrana* indican que *B. thuringiensis* var. *kurstaki* afecta la viabilidad del embrión, demostrando una elevada eficacia con efecto ovicida, lo cual fue corroborado con la estimación de la CL_{50} . La misma se encuentra 1200 veces por debajo de la MCRC. El efecto insecticida de *B. thuringiensis* sobre el estado de huevo fue estudiado en diferentes lepidópteros *Plutella xylostella* (L.), *Spodoptera litura* (F.) y *Pieris rapae* (L.), con la formulación *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 2500 UI/mg producido por el laboratorio Hubei (Liu & Zhang, 1997). Sobre *L. botrana* con *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 20WP 1600 UI formulado del laboratorio Abbot (Roditakis, 1986) en condiciones de laboratorio. En todos los casos, Bt a la máxima concentración recomendada de campo, no tuvo efecto sobre la eclosión de los huevos tratados, pero causó una elevada mortalidad de las larvas neonatas. Los individuos obtenidos continuaron su desarrollo y la mortalidad, se verificó luego de la eclosión, cuando las larvas emergentes ingirieron parte del corion para efectuar el orificio de salida. (Smith & Salkeld, 1966; Bradley & Agnello, 1988). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestros estudios serían los primeros que demuestran el efecto ovicida de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel L Plus®).

Considerando los resultados, se podría hipotetizar que los insecticidas evaluados sobre los huevos de *L. botrana* atravesarían el corion a través de las aerópilas y micrópilas. Si bien metoxifenocide, clorantraniliprole y novaluron no tuvieron un efecto ovicida marcado (dadas las mortalidades registradas y las CL_{50} para cada uno de ellos), provocaron efectos subletales considerables. Afectaron el tiempo de desarrollo, interfirieron posteriormente en procesos fisiológicos relacionados con la metamorfosis, redujeron la emergencia adulta y la fecundidad de los insectos.

El presente estudio revela que el novaluron no afectó la supervivencia de las larvas eclosionadas de los huevos tratados, ni el tiempo de desarrollo de las mismas, a diferencia de lo observado por Ghoneim, *et al.* (2017) para *Pectinophora gossypiella* (Saunders), no obstante, se observó una reducción del peso de las pupas formadas (Biddinger *et al.*, 1996; Biddinger & Hull, 1999, Hamadah *et al.*, 2017) perjudicando la

longevidad de los insectos emergentes (Tunaz & Uygun, 2004; Khajepour *et al.*, 2012). Este insecticida produjo efectos negativos sobre la reproducción, resultados que se observaron sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Radwan *et al.*, 1978), *Choristoneura occidentalis* (Freeman) (Madore *et al.*, 1983) y *Cydia pomonella* (L.) (Soltani & Soltani-Mazouni, 1992). Se ha demostrado que el novaluron una vez absorbido, presenta un transporte transovárico, que incide en la fecundidad de los individuos expuestos (Medina *et al.*, 2002; Trostanetsky & Trostanetsky, 2008). Sin embargo ensayos realizados por Gökçe *et al.* (2009) y Kim *et al.* (2011) demostraron que el novaluron no afecta la fecundidad de *Cydia pomonella*, no obstante se observó una importante reducción en la viabilidad de los huevos. Se ha corroborado que la ovogénesis está regulada por factores ambientales como ciclo día / noche, temperatura, humedad y nutrición, que influyen en el comportamiento de la puesta de huevos (Giorgi & Deri, 1976). El inicio de la vitelogénesis es un proceso donde los requerimientos nutricionales son elevados, y que dependerá en gran parte de las reservas acumuladas en los cuerpos grasos durante la etapa inmadura del insecto (Buszczak *et al.*, 1999). Estudios realizados por Drummond-Barbosa & Spradling en 2001 indicaron que el estado nutricional en el inicio de la vitelogénesis tiene impacto en la maduración del folículo. Esto indicó que una alimentación insuficiente en las etapas inmaduras del insecto reducen la tasa de desarrollo de células germinales de las ovariolas, impactando en la puesta de huevos y en el tamaño de los mismos (Gullan, & Cranston, 2014;. Moreau, *et al.*, 2016). Por otro lado, los insecticidas inhibidores de la síntesis de quitina, interfieren específicamente en la reproducción dado que inducen la formación de adultos con ciertas anomalías que reducen su potencial reproductivo. Los adultos pueden ser estériles o tener genitales anormalmente desarrollados, lo que dificulta el proceso de apareamiento o la capacidad de producir descendencia fértil (Biddinger & Hull, 1999; Tunaz & Uygun 2004).

Numerosos autores señalan los efectos del metoxifenocida en diferentes especies de lepidópteros. En este estudio, el metoxifenocida no causó un efecto ovicida significativo, coincidiendo con lo observado por Zamora *et al.* (2008) sobre huevos de *Spodoptera frugiperda* (Smith), pero se verificó un importante impacto sobre el peso promedio de las larvas eclosionadas. Resultados similares se registraron sobre larvas de *Diatraea grandiosella* (Dyar) (Trisyono & Chippendale, 1998), *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Pineda *et al.*, 2004; 2006), y *Rachiplusia nu* (Guenée) (Rimoldi *et al.*,

2015). Smagghe *et al.* en 1997 reportaron que los compuestos agonistas de la ecdisona provocan alteraciones en el intestino de las larvas de *Chrysodeixis chalcites*, lo que explica su efecto antialimentario e impacto en la ganancia de peso. Analizando los resultados obtenidos, el metoxifenocida no tuvo un efecto significativo en el peso de las pupas, pero incidió negativamente en la supervivencia pupal y la emergencia adulta, coincidiendo con lo descrito por Eizaguirre *et al.* en 2007, en ensayos de ingestión sobre larvas *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). Tampoco incidió sobre el tiempo de desarrollo larval, a diferencia de lo observado sobre *Spodoptera frugiperda* donde se evidenció un marcado alargamiento de la etapa larvaria (Pineda *et al.*, 2009). Por otro lado, se observó una importante reducción de la fecundidad y la fertilidad, al igual que lo registrado en ensayos con *Spodoptera exigua* (Hübner) (Smagghe & Degheele 1994); *Plodia interpunctella* (Hübner) (Salem *et al.*, 1997); *Spodoptera littoralis* (Pineda *et al.*, 2007); *Cydia pomonella* (Sun & Barrett, 1999; Knight, 2000, Smagghe *et al.*, 2004); *Argyrotaenia velutinana* (Walker) y *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Sun *et al.*, 2000). Todos los efectos subletales observados en los insectos sobrevivientes, tuvieron repercusiones negativas sobre la dinámica poblacional de los insectos (Pineda *et al.*, 2004).

Por su parte el clorantraniliprole, interfirió en la regulación de la contracción muscular, al actuar sobre los receptores rianodínicos, ubicados en la membrana de la fibra muscular y nerviosa de los insectos. Los síntomas evidentes que produce son efecto antialimentario y parálisis muscular (Cordova *et al.*, 2006; Lahm *et al.*, 2007). El presente estudio demuestra que el clorantraniliprole no afectó la supervivencia de las larvas que eclosionaron de los huevos tratados, pero se verificó un alargamiento del tiempo de desarrollo de las mismas en coincidencia con las investigaciones realizadas sobre *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Song *et al.*, 2013) y *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Xu *et al.*, 2016). De acuerdo a los estudios realizados por Hannig *et al.* (2009) el retraso en el desarrollo larval se debió a la inanición que sufrieron los individuos debido al impedimento en la locomoción, lo cual impactó reduciendo el peso pupal y la longevidad de los adultos emergentes (Song *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2010). Este insecticida produjo también efectos negativos sobre la fecundidad de las hembras obtenidas pero sin afectar la fertilidad de los huevos. Resultados similares se observaron en evaluaciones con larvas de *Ephestia kuehniella* (Zeller) y *Spodoptera exigua* (Marco & Viñuela, 1994); *Lobesia botrana* (Sáenz-De-Cabezón *et al.*, 2006; Ioriatti *et al.*,

2009); *Plutella xylostella* (Han *et al.*, 2012); *Spodoptera exigua* (Lai & Su, 2011a) y *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Zhang *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que se ve afectado el crecimiento poblacional debido a los efectos registrados.

CAPÍTULO 5

Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre estados larvales de *Lobesia botrana* a través de diferentes vías de exposición.

5. a. Evaluación de los efectos toxicológicos de metoxifenocide, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*. Ensayo por ingestión.

5. a.1. Materiales y Métodos

5. a.1.1. Obtención de larvas de segundo y cuarto estadio para los bioensayos de toxicidad.

Para realizar los bioensayos se utilizaron larvas de 2° y 4° estadio de 24 h de edad. Las mismas provenían de una cohorte de la cría masiva de laboratorio. La exposición de los organismos a los insecticidas se realizó a través del método de ingestión, utilizando inflorescencias tratadas con los diferentes insecticidas. La unidad experimental se pulverizó con el volumen calculado de los insecticidas a punto de goteo. El control se asperjó con agua (**Figura 5.1**).



Figura 5. 1. A. Torre de Potter Burkard® para pulverizaciones de precisión. **B.** Inflorescencia de vid pulverizada (detalle del tamaño de la gota asperjada) para ensayo de ingestión con larvas de segundo y cuarto estadio de *Lobesia botrana*.

5. a. 1.2. Bioensayos

5. a.1.2.1. Bioensayo para la determinación de CL_{50} de los insecticidas sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*.

Para estimar los valores de LC_{50} , se prepararon 6 concentraciones graduales a partir de la MCRC de los siguientes productos comerciales: Intrepid® (metoxifenocide, 24% i. a., Dow-Agroscience Arg, Bs. As., Argentina); Coragen® (clorantraniliprole, 20% i. a., DuPont Arg, Bs. As., Argentina); Rimon Supra® (novaluron, 10 % i. a.,

Magan Arg, Bs. As., Argentina); y Dipel L Plus® (*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, 3,5% i. a., Summit Agro Arg, Bs. As., Argentina).

El bioensayo consistió en 30 inflorescencias de vid que se pulverizaron con torre de Potter a punto de goteo. Las diluciones de los insecticidas a ensayar fueron 50%, 25%, 12,5%, 6,25% y 3,12% de la MCRC. Las inflorescencias de vid se pesaron para establecer la dosis ofrecida de ingrediente activo por gramo de inflorescencia (considerando como peso promedio a $3,89 \pm 0,83\text{g}$) (**Tabla 5.1**). A cada inflorescencia se le colocó una larva de la edad correspondiente. Se registró para todos los insecticidas la mortalidad acumulada a las 72 h post-tratamiento.

Tabla 5. 1. Rango de dosis evaluadas (mg i.a. /g inflorescencia) para el ensayo de CL_{50} de los insecticidas sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*.

Diluciones a partir de la MCRC	Dosis mg i. a./g inflorescencia			
	metoxifenocide	novaluron	clorantraniliprole	<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki
50%	9,25	12,85	5,14	67,48
25%	4,63	6,43	2,57	33,74
12,5%	2,31	3,21	1,29	16,87
6,25%	1,16	1,61	0,64	8,44
3,12%	0,58	0,8	0,32	4,22

5. a.1.2.2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*.

Se evaluaron las MCRC (Máxima Concentración Recomendada para su uso en el Campo) de los productos comerciales, detallados anteriormente. Las soluciones de insecticidas fueron preparadas usando agua destilada como disolvente. La aplicación de los distintos insecticidas se realizó sobre inflorescencias de vid, utilizando una torre de Potter (Burkard®, UK) para pulverizaciones de precisión en laboratorio a una presión de $7,5 \text{ Lb/ inch}^2$ durante 20" (**Figura 5.2**). En el bioensayo de ingestión, el material vegetal se trató el mismo día y las inflorescencias fueron suministradas a demanda durante el periodo larval. Se evaluó el efecto del residuo de dos días (exposición crónica). Las inflorescencias de vid se pesaron previamente para establecer la dosis ofrecida de ingrediente activo por gramo de inflorescencia. Las dosis evaluadas se detallan a continuación: para metoxifenocide 18,50 mg i. a. /g inflorescencia; novaluron

25,70 mg i. a. /g inflorescencia; clorantraniliprole 10,28 mg i. a. /g inflorescencia y para *B. thuringiensis* var. Kurstaki 134,96 mg i. a. /g inflorescencia.

La unidad experimental consistió en una inflorescencia de vid pulverizada, a la cual, una vez seco el residuo se le colocaron 5 larvas de la edad correspondiente al ensayo en cuestión. Se realizaron 6 réplicas para cada tratamiento.



Figura 5. 2. Esquema de la metodología empleada para el bioensayo vía ingestión (pulverización de inflorescencias tratadas con Torre de Potter, Bukard®) y suministradas como alimento a larvas de *Lobesia botrana*.

5. a. 2. Evaluación:

5. a. 2. 1. Bioensayo para la determinación de CL_{50} de los insecticidas sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*

Para cada insecticida y el control se registró la mortalidad de larvas a las 48 h post-tratamiento. Con los valores de mortalidad acumulada se estimó la CL_{50} , a través de un análisis de regresión (relacionado concentración y mortalidad) para cada uno de los insecticidas ensayados.

5. a 2. 2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*.

Se seleccionaron al azar 5 larvas sobrevivientes, las cuales fueron individualizadas por réplica se mantuvieron en cámara de cría y se observaron diariamente bajo lupa estereoscópica, a fin de registrar las mudas correspondientes de las mismas (efecto a largo plazo). Se evaluó el tiempo intermuda para las larvas de 2º estadio, considerando los siguientes: entre segundo y tercero, entre el tercero y cuarto,

entre el cuarto y el quinto estadio larval, y entre este último hasta el estado pupal (L2-L3, L3-L4, L4-L5, L5-pupa) y entre estado de pupa- adulto. Para el caso de las larvas de 4° estadio, se registraron los periodos intermuda entre el cuarto y quinto estadio larval, y entre este y el estado de pupa (L4-L5, L5-pupa), como así mismo, el tiempo entre el estado de pupa hasta la emergencia adulta, porcentaje de pupación, emergencia adulta, discriminada por sexo.

Con los adultos obtenidos se evaluó la fecundidad y fertilidad de las hembras. Para esto, se formaron parejas por tratamiento, y cada pareja se acondicionó en botellas plásticas provistas de un bebedero con agua y miel al 5% (cámara de cópula y oviposición). Durante seis días consecutivos se registró el número de huevos colocados por hembra (fecundidad) y posteriormente la emergencia larval a partir de esos huevos (fertilidad) por hembra y tratamiento.

5. a 3. Análisis estadístico:

5. a.3. 1. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*.

Los datos de mortalidad de larvas se analizaron mediante un programa informático Probit desarrollado por el Departamento de Entomología de la Universidad Nacional de Chung-Hsing (Chi, 1997) para estimar valores de pendiente y concentración letal (CL₅₀).

5. a.3. 2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo) sobre el segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron con el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento). Para corroborar las premisas del ANOVA se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro - Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba de Cochran, Hartley y Levene. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica $y = \log(x+1)$ y angular: $p' = \arcseno \sqrt{p}$. Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ($y = \arcsen \sqrt{x}$) para posteriormente ser reevaluados. El análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, luego de su transformación, se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-

Wallis. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0 con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

5. a. 4. Resultados

5. a. 4.1 Bioensayo CL_{50} de larvas de segundo y cuarto estadio

Tabla 5. 2. Estimación de la concentración letal 50 (CL_{50}) de larvas de segundo estadio de *Lobesia botrana* expuestas a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, metoxifenocida, novaluron y clorantraniliprole. Bioensayo de ingestión de inflorescencias de vid

Insecticida	n ^a	Pendiente ± SE	LC ₅₀ (mg a.i./L)	χ^2	gl
<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki	6	1,96 ± 0,278	133,03	0,78	3
metoxifenocida	6	3,57 ± 0,288	6,02	3,18	3
novaluron	6	3,15 ± 0,292	173,01	0,46	3
clorantraniliprole	6	3,37 ± 0,31	4,97	1,8	3

Parámetros obtenidos del programa informático Probit desarrollado por el Departamento de Entomología de la Universidad Nacional de Chung-Hsing (Chi, 1997).

^a Número de concentraciones evaluadas/insecticida.

Tabla 5. 3. Estimación de la concentración letal 50 (CL_{50}) de larvas de cuarto estadio de *Lobesia botrana* expuestas a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, metoxifenocida, novaluron y clorantraniliprole. Bioensayo de ingestión de inflorescencias de vid

Insecticida	n ^a	Pendiente ± SE	LC 50 (mg a.i./L)	χ^2	gl
<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki	6	2,65 ± 0,26	131,4	0,692	3
metoxifenocida	6	6,77 ± 0,3	10,39	4,16	3
novaluron	6	3,52 ± 0,26	102,45	0,133	3
clorantraniliprole	6	2,77 ± 0,34	11,83	3,98	3

Parámetros obtenidos del programa informático Probit desarrollado por el Departamento de Entomología de la Universidad Nacional de Chung-Hsing (Chi, 1997).

^a Número de concentraciones evaluadas/insecticida

La CL_{50} para larvas de 2° y 4° estadio, se detallan en la **tabla 5.2** y **5.3** respectivamente. Los valores estimados de CL_{50} para los insecticidas *B. thuringiensis* var. kurstaki, metoxifenocida y clorantraniliprole resultaron ser menores que las MCRC (525 mg i. a./L; 72 mg i. a./L; 40 mg i. a./L), lo que demuestra la elevada eficacia de los mismos para el control de la plaga *L. botrana*. En el caso del novaluron que tiene una CL_{50} mayor a la MCRC (100 mg i.a. /L), justifica la menor susceptibilidad de las larvas tratadas, frente a este insecticida.

5. a. 4.2. Bioensayo de MCRC (máxima concentración recomendada para su uso en campo). Efecto a corto plazo sobre la mortalidad del segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana* estadio 48 h después del tratamiento.

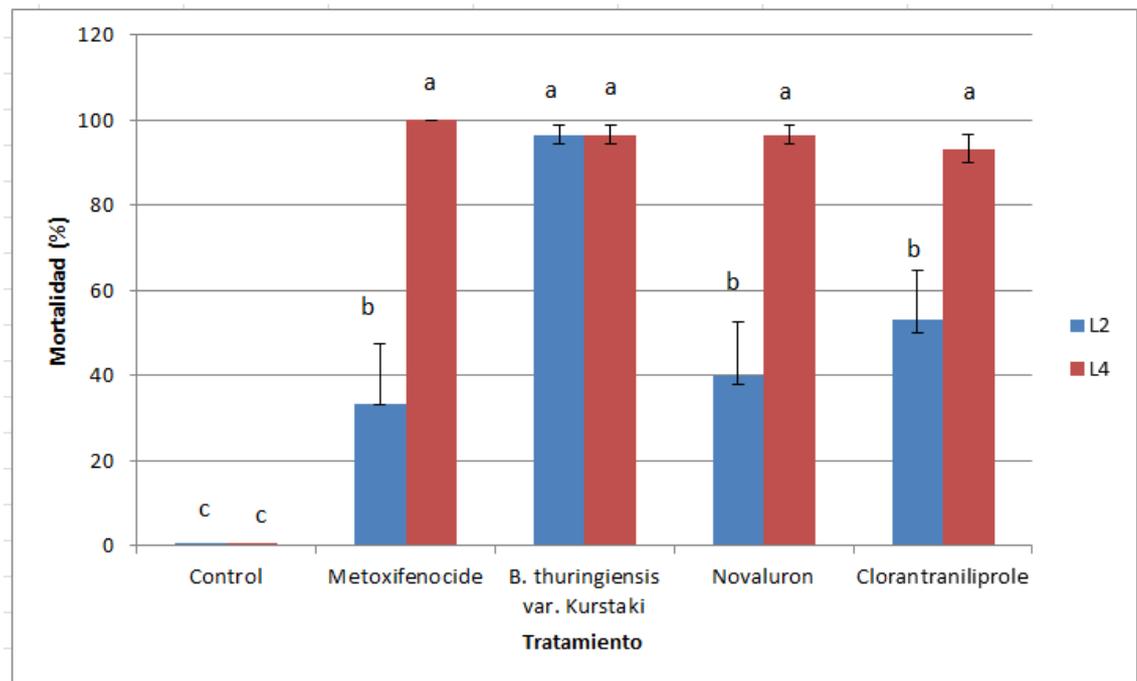


Figura 5. 3. Mortalidad del segundo y cuarto estadio larval de *Lobesia botrana* a las 48 h post-tratamiento. Los datos se expresan como valores medios \pm ES ($p < 0,05$). Las diferentes letras indican diferencias significativas con respecto al control.

La **figura 5.3** muestra la mortalidad post-tratamiento (48 h) de las larvas de 2° y 4° estadio alimentadas con inflorescencias de vid, tratadas con las MCRC de cada insecticida. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto al control. En el caso de las larvas de 4° estadio los insecticidas provocaron un 100% de mortalidad, mientras que para las larvas de 2° estadio, se obtuvo una mortalidad media muy alta por lo que no se pudieron seguir evaluando los efectos a largo plazo.

En la **figura 5.4** se observan algunos efectos teratológicos (malformaciones, anormalidades) en las larvas de la polilla luego de la ingestión de racimos pulverizados.



Figura 5. 4. Efectos teratológicos sobre la metamorfosis de larvas de 2° (L2) y 4° (L4) estadio de *Lobesia botrana*. Ensayo de ingestión:

Control A) L₂, B) L₄. Larvas normales.

Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki (525 mg i.a. /L): C; D) L₂ cutícula oscura por sectores y segmentos torácicos y abdominales contraídos. E) L₄ presenta ulceración de cutícula con pérdida de hemolinfa. F) L₄ presenta cutícula oscura por sectores.

Metoxifenocid (72 mg i.a. /L): G) L₂ presenta expulsión del intestino H) L₂ con exuvia al final del cuerpo. I) L₄ con doble cápsula cefálica J) L₄ cutícula ennegrecida, espuripedios rígidos.

Novaluron (72 mg i.a. /L): K) L₂ con exuvia al final del cuerpo L) L₂ con doble cápsula cefálica M) L₄ muestra contracción de segmentos abdominales y torácicos N) L₄ con doble cápsula cefálica y espuripedios rígidos.

Clorantraniliprole (20 mg i.a. /L): O) L₂ con expulsión de intestino P) L₂ con doble cápsula cefálica Q; R) L₄ presenta contracción de segmentos abdominales y torácicos.

5. a. 4.3. Efectos a largo plazo: no pudieron ser evaluados en este ensayo, dado la elevada mortalidad obtenida en los individuos expuestos a los insecticidas vía ingestión.

5. b. Evaluación de los efectos toxicológicos de metoxifenocide, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre el cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*. Ensayo de exposición tópica.

5. b.1. Materiales y Métodos

5. b.1.1. Obtención de larvas de 4° estadio para los bioensayos de toxicidad.

Para realizar el bioensayo se utilizaron larvas de 4° estadio de 24 h de edad. Las mismas provenían de una cohorte de la cría masiva de laboratorio. En este caso, se trabajó con el cuarto estadio, ya que esta etapa larval resulta ser la más dañina en el campo, dada su voracidad y además presentar mayor susceptibilidad en la exposición vía ingestión.

5. b.1.2. Bioensayo

Se evaluaron las MCRC (Máxima Concentración Recomendada para su uso en el Campo) de los siguientes productos comerciales: Intrepid® (metoxifenocide, 24% i.a., Dow-Agroscience Arg, Bs. As., Argentina); Coragen® (clorantraniliprole, 20% i.a., DuPont Arg, Bs. As., Argentina); Rimon Supra® (novaluron, 10 % i.a., Magan Arg, Bs. As., Argentina); y Dipel L Plus® (*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, 3,5% i.a., Summit Agro Arg, Bs. As., Argentina). Las soluciones de insecticidas fueron preparadas de acuerdo a las concentraciones calculadas y utilizando acetona (Anhedra® Grado Reactivo Analítico) como disolvente, para facilitar la rápida evaporación de la gota y asegurar la deposición del insecticida sobre la cutícula del insecto (Busvine, 1971). La unidad experimental consistió en 5 larvas de 4° estadio de 24 h de edad. Se realizaron 6 réplicas para cada tratamiento. La exposición a los insecticidas se realizó por contacto a través del tratamiento tópico, utilizando un microaplicador manual. (Hamilton® Reno, Nevada USA) (**Figura 3.4**).

Se aplicó por única vez, 1µL de la solución insecticida sobre el 1° segmento abdominal de la larva, al comenzar el experimento (exposición aguda). El control se trató sólo con acetona. Una vez que las larvas se expusieron a los diferentes insecticidas, se colocaron de manera individual en cajas de Petri provistas de dieta artificial. Las larvas de cada tratamiento se observaron diariamente bajo lupa estereoscópica para determinar la supervivencia larvaria como efecto letal (corto plazo) de los insecticidas. Se tomaron al azar 5 larvas sobrevivientes, las cuales se mantuvieron en cámara de cría y se les realizó el seguimiento hasta el final de su desarrollo larvario (**Figura 5.5**).

Con los individuos que alcanzaron el estado adulto se formaron 5 parejas/tratamiento, que se acondicionaron en cámara de cópula y oviposición a fin de realizar el seguimiento de la oviposición y eclosión diaria.

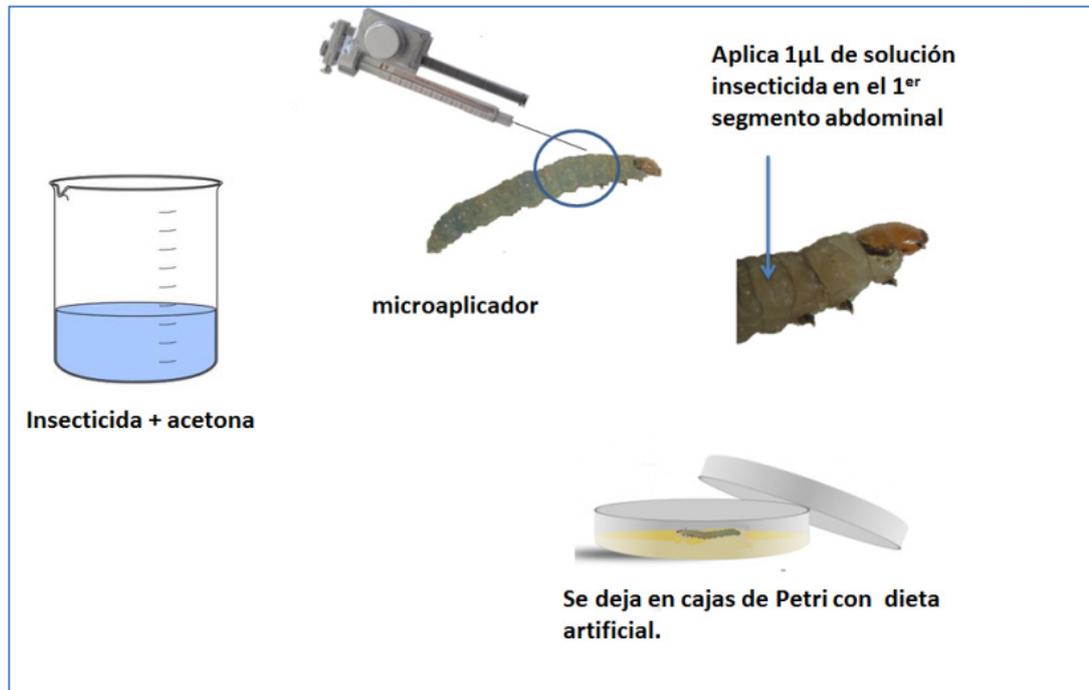


Figura 5. 5. Esquema secuencial metodológico. Aplicación tópica de los insecticidas sobre estadios larvales de *Lobesia botrana* y su seguimiento.

5. b.2. Evaluación:

Las larvas tratadas se observaron diariamente bajo lupa estereoscópica a fin de determinar la supervivencia media de las mismas como efecto a corto plazo. Las larvas sobrevivientes, se mantuvieron en cámara de cría, con el suministro de dieta artificial, registrándose la evolución de las mismas (efecto a largo plazo). Se evaluó el tiempo intermuda para las larvas de 4º estadio, considerando los siguientes: entre el cuarto y el quinto estadio larval, y entre este último hasta el estado pupal (L4-L5, L5-pupa) y entre estado de pupa - adulto. Se calculó el porcentaje de pupación, peso de pupas y emergencia adulta. En los adultos emergentes, se evaluó la fecundidad de las hembras, con el registro del número de huevos colocados durante seis días consecutivos. La fertilidad se determinó observando la emergencia larval a partir de esos huevos (porcentaje en relación al número de larvas emergidas/hembra/tratamiento con respecto al número de huevo puesto/hembra) y la longevidad de los mismos.

5. b.3. Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron con el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento). Para corroborar las premisas del ANOVA se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba de Cochran, Hartley y Levene. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica $y = \log(x+1)$ y angular: $p' = \arccos \sqrt{p}$. Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ($y = \arcsen \sqrt{x}$) para posteriormente ser reevaluados. El análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, luego de su transformación, se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0 con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

5. b.4. Resultados

5. b.4.1. Efectos de los insecticidas a corto plazo: Mortalidad larvaria.

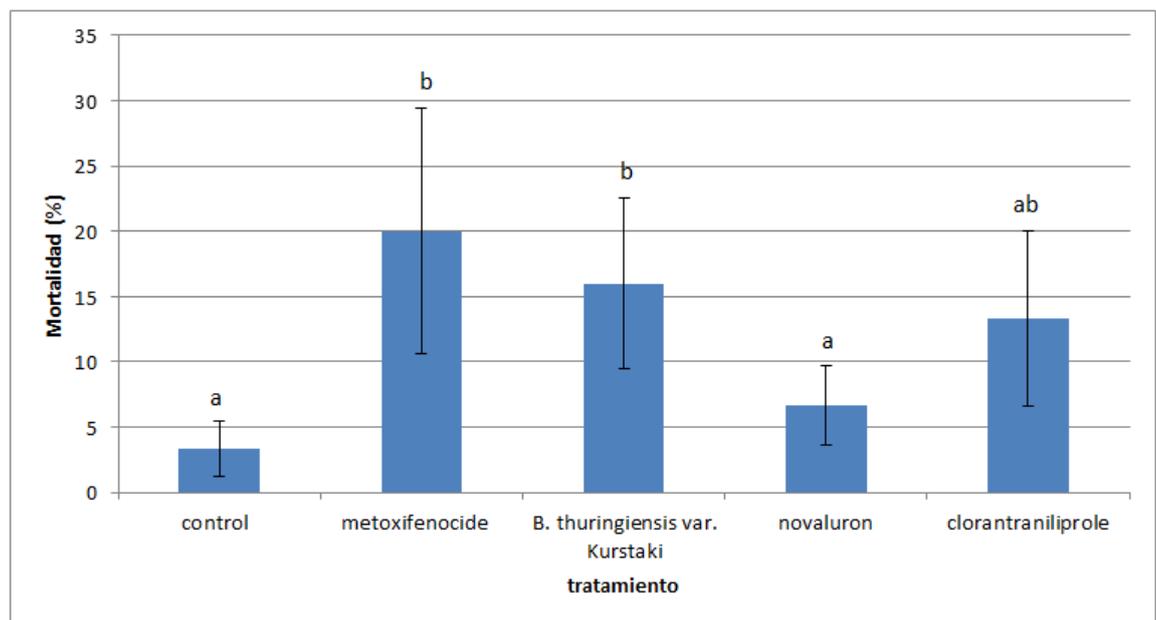


Figura 5. 6 . Mortalidad (%) del cuarto estadio larval de *Lobesia botrana* a las 48 h después del tratamiento (aplicación tópica con microaplicador Hamilton®). Los datos se expresan como valores medios \pm ES ($p < 0,05$). Las diferentes letras indican diferencias significativas con respecto al control.

Cuando se evaluó estadísticamente la mortalidad larvaria a las 48 h post-tratamiento, se observó que metoxifenocide y *B. thuringiensis* fueron los únicos

tratamientos que presentaron diferencias significativas respecto del control, produciendo mortalidades superiores al 15% (**Figura 5.6**)

5. b.4.2. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre el tiempo intermuda de las larvas de 4° estadio, porcentaje de pupación y peso pupal.

Tabla 5. 4. Efectos subletales de los insecticidas ensayados sobre larvas de cuarto y quinto estadio de *Lobesia botrana* (aplicación tópica con microaplicador Hamilton®).

Tratamiento	Concentración (mg i.a./ L) (Dosis µg i.a./g larva)	Tiempo intermuda (días)				% pupación		Peso pupal (mg)
		L4-L5	L5-Pupa	lavarío pupa	L4-Adulto	respecto L4	respecto L5	
control	0	5,43 ± 0,67 a	8,13 ± 0,73 c	11,16 ± 0,73 c	16,76 ± 1,39 c	83,33 ± 3,33 b	90,0 ± 4,47 b	9,23 ± 0,30 c
metoxifenocide	72 (78,03)	4,56 ± 0,46 a	2,33 ± 0,35 a	4,70 ± 0,46 a	4,7 ± 0,46 a	26,66 ± 11,15 a	31,66 ± 11,66 a	8,0 ± 0,48 bc
novaluron	100 (108,38)	4,66 ± 0,34 a	6,83 ± 0,69 bc	9,83 ± 0,72 bc	11,96 ± 1,03 b	86,66 ± 6,66 b	93,33 ± 6,66 b	7,94 ± 0,25 b
clorantraniliprole	40 (43,35)	5,16 ± 0,44 a	4,56 ± 0,77 ab	7,46 ± 0,83 b	8,9 ± 1,24 b	33,33 ± 11,15 a	54,16 ± 18,09 ab	6,49 ± 0,40 ab
<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki	525 (569,02)	6,5 ± 0,67 a	4,66 ± 0,88 ab	8,43 ± 0,86 b	9,03 ± 1,03 b	26,66 ± 9,88 a	54,44 ± 18,49 ab	6,24 ± 0,55 a
Análisis estadístico		K= 5,93 gl=4; 145 p= 0,204 (2)	K= 27,32 gl= 4; 145 p= 0,000 (2)	K= 31,05 gl= 4; 145 p= 0,0000 (2)	K= 50,60 gl= 4; 145 p= 0,0000 (2)	F= 11,85 gl= 4;25 p=0,0000 (1)	K= 12,08 gl= 4; 25 p= 0,017 (2)	F= 9,46 gl= 4;66 p=0,0000 (1)

Los datos se expresan como valores promedio ± ES ($p \leq 0,05$) los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes. (1) ANOVA; (2) Kruskal - Wallis. L4: larva de 4° estadio, L5: larva de 5° estadio

La **tabla 5.4** muestra el tiempo intermuda en días de los individuos sobrevivientes. Se puede observar que para la etapa desde el cuarto hasta el quinto estadio larval (L4 - L5) no hay diferencias para ninguno de los insecticidas ensayados. El tiempo de desarrollo intermuda desde el quinto estadio larval hasta el pupal, se ve afectado por los insecticidas metoxifenocide, clorantraniliprole y *B. thuringiensis* que acortan significativamente esta etapa de desarrollo con respecto al control. Si bien el novaluron también reduce el tiempo intermuda, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Considerando el periodo intermuda entre el cuarto estadio larval al estado de pupa (L4 – Pupa), los insecticidas metoxifenocide,

clorantraniliprole y *B. thuringiensis* var. *kurstaki* acortan significativamente esta fase. Todos los insecticidas ensayados reducen significativamente el periodo intermuda entre el cuarto estadio larval y el adulto (L4-Adulto). El porcentaje de pupación respecto del cuarto estadio larval fue significativamente menor en los tratamientos con metoxifenocida, clorantraniliprole y *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, mientras que respecto al quinto estadio larval sólo metoxifenocida afectó la pupación. El peso de las pupas provenientes de estos ensayos fue significativamente menor todos los insecticidas ensayados respecto del control, excepto para el metoxifenocida.

5. b.4.3. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre la emergencia adulta

La **figura 5.7** muestra que metoxifenocida, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y novaluron afectaron significativamente la emergencia adulta a partir de larvas de 4º estadio de *L. botrana* tratadas respecto al control, con reducciones del 96% para metoxifenocida, 69% para *B. thuringiensis* y del 31% para novaluron.

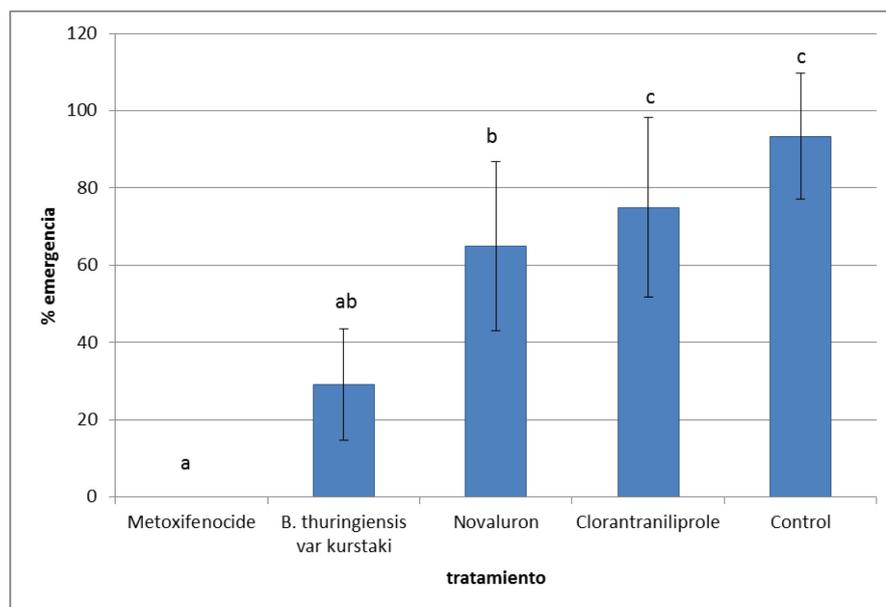


Figura 5. 7. Emergencia adulta a partir de larvas de cuarto estadio de *Lobesia botrana* tratadas vía contacto (aplicación tópica con microaplicador Hamilton®). Los datos se expresan como valores medios \pm ES ($p < 0,05$). Las diferentes letras indican diferencias significativas con respecto al control

5. b.4.4. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre la longevidad adulta.

La **figura 5.8** muestra que novaluron y clorantraniliprole redujeron la longevidad de los adultos obtenidos a partir de larvas de 4º estadio de *L. botrana*, en un rango de 3 y 5, días respectivamente. No se pudo analizar el efecto que produce el metoxifenocida sobre la longevidad, ya que en este caso la emergencia adulta fue nula.

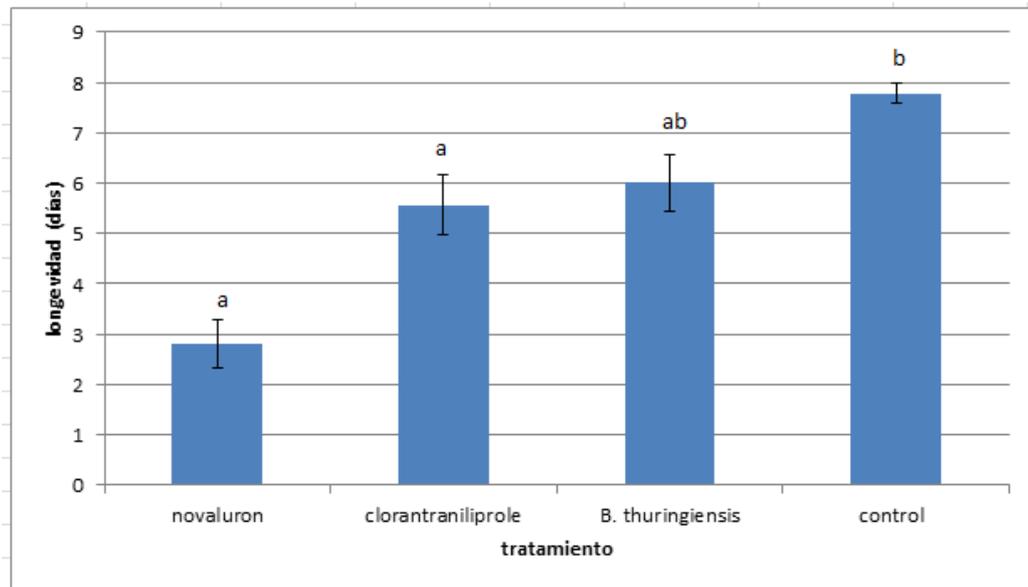


Figura 5. 8. Longevidad de adultos obtenidos a partir de larvas de cuarto estadio de *Lobesia botrana* expuestas vía contacto (aplicación tópica con microaplicador Hamilton®). Los datos se expresan como valores medios \pm ES ($p < 0,05$). Las diferentes letras indican diferencias significativas con respecto al control.

5. b.4.5. Efectos a largo plazo de los insecticidas sobre la fecundidad

Sólo las hembras del testigo fueron capaces de oviponer. La fecundidad de las hembras obtenidas fue nula para todos los insecticidas ensayados.

La **Figura 5.9**, muestra larva de cuarto estadio y pupa de *L. botrana* con desarrollo normal, para referencia.



Figura 5. 9. *Lobesia botrana* desarrollo normal. A. Larva de cuarto estadio. B. Pupa.

Se muestran alteraciones (efectos teratológicos) que se observaron en larvas tratadas con microaplicador Hamilton® (**Figura 5.10, 11, 12, 13**).



Figura 5. 10. Efectos del metoxifenocide sobre el cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*. Ensayo de aplicación tópica con microaplicador (Hamilton®). **A. B** Larva con cutícula vieja ajustando el cuerpo. **C.** Contracción de segmentos abdominales y torácicos. **D.** Larva expulsión de intestino.



Figura 5. 11. Efectos del *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre el cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*. Ensayo de aplicación tópica con microaplicador (Hamilton®). **A.** larva con segmentos abdominales y torácicos contraídos. Se observa ulceración en la cutícula con pérdida de hemolinfa. **B.** cambio en el aspecto y coloración de las larvas. **C.** pupa con exoesqueleto débil, poco endurecido y esbozos alares incompletos. **D.** Larva flácida, el contenido del cuerpo se vuelve marrón - negruzco según se va descomponiendo.



Figura 5. 12. Efectos del novaluron sobre el cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*. Ensayo de aplicación tópica con microaplicador (Hamilton®). **A.** Larva con cutícula ennegrecida por sectores por deposición anormal de quitina. **B.** Pupa con cutícula malformada, se observa quitinización anormal, la unión de los segmentos abdominales es incompleta. **C.** Larva de cuarto estadio donde se observa expulsión del intestino.



Figura 5. 13. Efectos del cloranthraniliprole sobre el cuarto estadio larval de *Lobesia botrana*. Ensayo aplicación tópica con microaplicador (Hamilton®). **A. C.** Contracción de segmentos abdominales y torácicos. Se observa expulsión del intestino. **B.** Cutícula ennegrecida. **D.** Doble cápsula cefálica, exuvia sin desprender al final del cuerpo.

5.4. Discusión

La polilla europea del racimo, es una plaga de importancia cuarentenaria para la República Argentina, su ingreso pone en riesgo la competitividad del sector vitícola y genera una importante crisis en la economía regional, por lo cual el SENASA implementa el control oficial (SENASA 2010 a).

La actividad de los insecticidas analizados en el presente estudio probados vía ingestión sobre la polilla de la vid, resultaron ser compuestos tóxicos para las dos edades larvales ensayadas, mientras que la toxicidad de los mismos productos aplicados vía tópica fue menor, lo que demuestra que la vía de contaminación principal es por ingestión. En estos estudios también se observaron los efectos subletales de los insecticidas sobre larvas tratadas. Se definen los efectos subletales como aquellos que alteran la fisiología, bioquímica y aspectos comportamentales de los individuos que logran sobrevivir a la exposición de un insecticida, ya sea a la concentración máxima de campo o inferiores a ésta (Desneux *et al.*, 2007).

Es necesario tener en cuenta que en los ensayos de exposición tópica, sólo se realizó una única aplicación al comenzar el experimento (exposición aguda), mientras que en los de ingestión, el material vegetal suministrado se renovó periódicamente (exposición crónica); por lo tanto la cantidad ingerida de ingrediente activo en este último caso, fue mayor. La diferencia en los resultados probablemente esté relacionada tanto a la vía de aplicación, como a una mayor ingesta por parte de las larvas cuarto estadio con respecto a las de segundo.

Los individuos sobrevivientes al tratamiento con metoxifenocida, manifestaron los típicos síntomas de los agonistas de la ecdisona: doble cápsula cefálica y reducción de peso de las larvas tratadas. Este acelerador de la muda, actúa desequilibrando la concentración de las hormonas naturales durante los procesos de crecimiento y desarrollo de los insectos; impactando sobre la ganancia de peso promedio de las larvas. Estos resultados se registraron en *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Gobbi *et al.*, 1998; Smaghe & Degheele, 1999; Pineda *et al.*, 2000; 2006), y *Diatraea grandiosella* (Dyar) (Trisyono & Chippendale, 1998) y *Rachiplusia nu* (Guenée) (Rimoldi *et al.*, 2015). Además de malformaciones y nula capacidad reproductiva, impactando negativamente sobre la dinámica poblacional del insecto (Pineda *et al.*, 2004). Ensayos realizados con *Chrysodeixis chalcites* (Esper) reportaron que los compuestos agonistas

de la ecdisona provocaban alteraciones en las paredes del intestino de las larvas tratadas, lo que explica su efecto antialimentario y el bajo peso larval (Smaghe *et al.*, 1997).

Por su parte el clorantraniliprole, actúa sobre los receptores rianodínicos ubicados en la membrana de la fibra muscular y nerviosa de los insectos, afectando la contracción muscular. En los individuos tratados se observó el cese de alimentación y parálisis muscular (Cordova *et al.*, 2006; Lahm *et al.*, 2007), lo que condujo a la pérdida de peso pupal, disminución del porcentaje de pupación y emergencia adulta (Smaghe *et al.*, 1997). Afectó el tiempo de desarrollo de los individuos tratados en coincidencia con las investigaciones realizadas sobre *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Xu *et al.*, 2016), redujo la longevidad, fecundidad de los adultos como se observó sobre larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Marco & Viñuela, 1994; Lai & Su, 2011a), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Zhang *et al.*, 2013; Lai & Su, 2011b) y *Plutella xylostella* (L.) (Guo *et al.*, 2013).

La bibliografía señala los efectos que produce el novaluron sobre el acortamiento del tiempo de desarrollo larval y la reducción del peso pupal, en ensayos realizados con *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Ghoneim *et al.*, 2017) y *Palpita unionalis* (Hübner) (Hamadah *et al.*, 2017). Estos autores afirman que la muerte de los insectos, provocada por los inhibidores de la quitina que puede atribuirse a la inanición, a la incapacidad de desprenderse de la exocutícula durante la ecdisis, a las hemorragias y posterior desecación. Este último fenómeno se debe a la deposición anormal de la quitina, que conduce a la aparición de la cutícula malformada (Hamadah *et al.*, 2017). La cutícula es la capa que recubre al insecto en su parte externa y es secretada por la epidermis. Sus funciones son variadas, siendo la principal de protección, interviniendo en la fisiología del crecimiento y desarrollo del insecto. En ella se pueden distinguir dos capas principales: la interna procutícula de 200 μm , formada por una matriz proteica, en donde se depositan las fibras de quitina. Por un lado, le confieren rigidez, resistencia a las fuerzas de tensión, flexión y compresión y por el otro, flexibilidad y elasticidad al tegumento del insecto, a fin de facilitar los movimientos del mismo. La otra capa es la epicutícula, muy fina de 1 - 4 μm de espesor, no contiene quitina, sino que está compuesta por ceras y lipoproteínas. Es impermeable, su función es evitar la deshidratación del insecto. La deposición irregular de quitina, como resultado del efecto de los insecticidas inhibidores de la quitina, se traduce en una menor flexibilidad y firmeza del exoesqueleto, con lo cual el individuo es susceptible a la desecación, por lo

que las posibilidades de sobrevivencia del insecto tratado son reducidas (Oberlander & Silhacek, 1998).

El *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, acortó el período de desarrollo larval, produjo un efecto antialimentario, generando pupas de bajo peso y escasa viabilidad, como lo señalaron MacIntosh *et al.* 1990 y Gils *et al.* en 1992. Este efecto era esperable teniendo en cuenta el modo de acción de las toxinas hemo y citolíticas de la bacteria. Una vez ingeridos estos cristales se solubilizan a nivel intestinal, paralizando las células del intestino e interfiriendo con el normal proceso de la digestión (Beck *et al.*, 2004). Las toxinas son activadas por enzimas proteolíticas presentes en el epitelio del intestino medio que se unen directamente a receptores específicos ubicados en la membrana celular, insertándose para destruirla (Promdonkoy & Ellar, 2000), lo que provoca la alteración celular con formación de poros que perturba el equilibrio osmótico (Hofte & Whitely, 1989; Gringorten 2001), causando finalmente la muerte de los insectos. (Bravo *et al.*, 2007; Palma *et al.*, 2014). En dosis subletales, estas toxinas afectan la muda de los insectos, causando efectos teratogénicos (Espinasse *et al.*, 2002, 2004). Las hembras que emergieron de este tratamiento, registraron baja longevidad y fecundidad como resultado de la incapacidad para alimentarse (Ignoffo & Gregory, 1972; Salama & Sharaby, 1988). Pedersen *et al.* 1990 sostienen que el número promedio de huevos por hembra es directamente proporcional a su peso. La reducción de la fecundidad después del tratamiento con *B. thuringiensis* ha sido reportada para *Ephestia cautella* (Walker) (Mc Gaughey, 1978) y *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Afify & Matter, 1969) entre otros lepidópteros.

CAPÍTULO 6

Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre pupas de *Lobesia botrana*.

6. Evaluación de las máximas concentraciones recomendadas para aplicación en campo (MCRC) de metoxifenocide, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre pupas de *Lobesia botrana*

6.1. Materiales y Métodos

6.1.1. Obtención de pupas para los bioensayos de toxicidad.

Para realizar los bioensayos se utilizaron pupas de 24 h de edad. Las mismas provenían de la cría masiva de laboratorio, obtenidas a partir de una cohorte de huevos.

6.1.2. Bioensayo

Se evaluaron las MCRC (Máxima Concentración Recomendada para su uso en el Campo) de los siguientes productos comerciales: Intrepid® (metoxifenocide, 24% i.a., Dow-Agroscience Arg, Bs. As., Argentina); Coragen® (clorantraniliprole, 20% i.a., DuPont Arg, Bs. As., Argentina); Rimon Supra® (novaluron, 10 % i.a., Magan Arg, Bs. As., Argentina); y Dipel L Plus® (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, 3,5% i.a., Summit Agro Arg, Bs. As., Argentina). La exposición a los insecticidas se realizó a través del tratamiento tópico, utilizando un microaplicador manual (Hamilton® Reno, Nevada USA). Se aplicó 1µL de solución insecticida sobre el 1° segmento abdominal de la pupa sin capullo (**Figura 6.1**). El control se trató sólo con acetona.

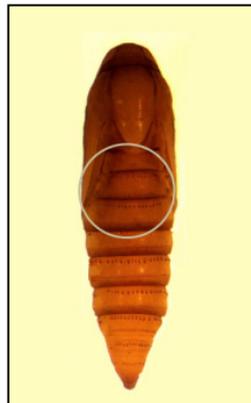


Figura 6. 1. Detalle de la metodología de aplicación tópica de insecticidas sobre pupas de *Lobesia botrana* (microaplicador manual Hamilton®). El círculo destaca el 1° segmento abdominal donde se realizó la aplicación.

Las soluciones insecticidas fueron preparadas usando acetona (Anhedra® Grado Reactivo Analítico) como disolvente, para facilitar la rápida evaporación de la gota y asegurar la deposición del insecticida sobre la cutícula del insecto (Busvine, 1971). Las pupas se pesaron previamente para luego determinar la dosis utilizada. Obteniéndose un

peso medio por pupa de $10,72 \pm 1,08$ mg. La unidad experimental consistió en 1 pupa de 24 h de edad y se realizaron 30 réplicas para cada tratamiento. Una vez que las pupas se expusieron a los diferentes insecticidas, se colocaron individualmente en tubos de vidrio con tapa de algodón (Figura 6.2).

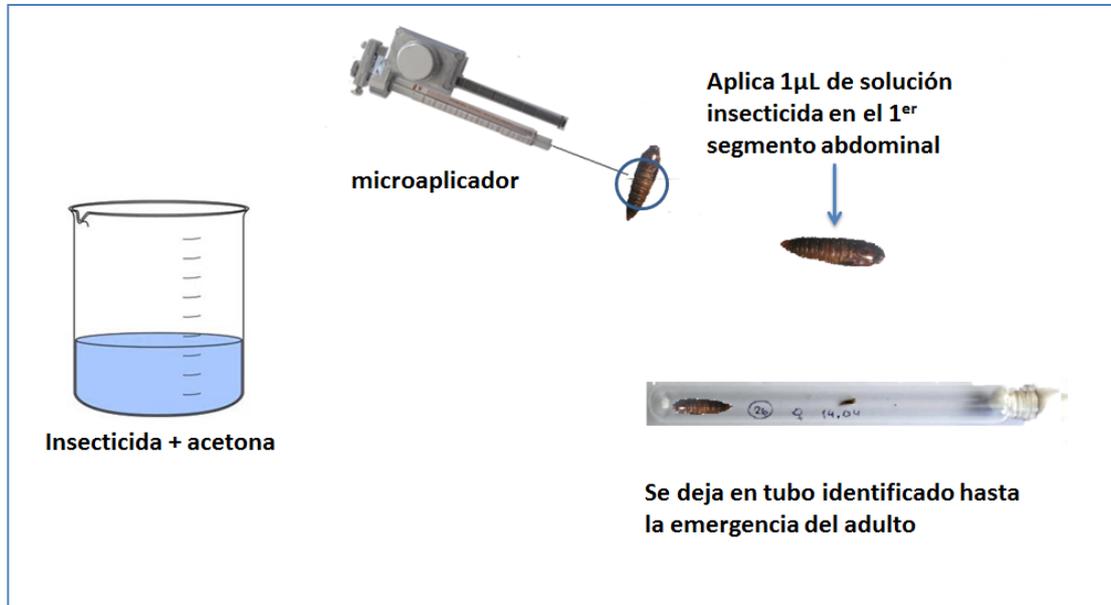


Figura 6. 2. Esquema de la metodología empleada para la aplicación tópica de los insecticidas sobre pupas de *Lobesia botrana*.

6.2. Evaluación:

Se observó la emergencia de los adultos como indicador de la mortalidad de las pupas tratadas como efecto letal de los insecticidas (corto plazo). Para estudiar los efectos a largo plazo (efectos subletales), se evaluó el tiempo intermuda pupa - adulto y con los adultos emergentes se evaluaron la fecundidad y fertilidad de las hembras. En cada tratamiento, se formaron parejas que se acondicionaron en botellas provistas de un bebedero con agua con miel al 5% (cámara de copulación y oviposición). Durante seis días consecutivos se registró el número de huevos colocados por hembra (fecundidad) y posteriormente la emergencia larval a partir de esos huevos (fertilidad) por hembra y tratamiento. También se determinó la longevidad de los individuos obtenidos. Transcurrido el tiempo en el que debería haber ocurrido la emergencia adulta, se procedió a la disección de las pupas de las cuales no se registró emergencia bajo lupa binocular, con el objeto de constatar el estado de desarrollo de los individuos al momento de la muerte (pupa, pre-imago, imago).

6.2.1. Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron con el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento). Previo al análisis, se corroboraron las premisas del ANOVA, evaluando la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba de Cochran, Hartley y Levene. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica $y = \log(x+1)$ y angular: $p' = \arcseno \sqrt{p}$. Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ($y = \arcsen \sqrt{x}$) para posteriormente ser reevaluados. El análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, aun con los datos transformados, se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis y las medianas se compararon con el Test de Box and Wisker Plot. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0 con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

6.3. Resultados

6.3.1. Efectos letales y subletales de insecticidas sobre los adultos obtenidos a partir de pupas de *L. botrana* tratadas.

Los resultados son resumidos en la **tabla 6.1**. Todos los insecticidas ensayados produjeron una reducción significativa en la supervivencia pupal respecto del control, como así también se observó una disminución significativa del tiempo desarrollo pupa adulto. El metoxifenocide redujo la longevidad en los adultos emergentes respecto del control. Las hembras provenientes del tratamiento con metoxifenocide no dejaron descendencia, mientras que los tratamientos con *B. thuringiensis* var. kurstaki y novaluron redujeron significativamente la fertilidad y fecundidad de las hembras en relación al control. En la **figura 6.3** se detalla el estado de desarrollo de las pupas tratadas (desarrollo intra crisálida), al momento de la muerte. Metoxifenocide, clorantraniliprole y novaluron provocaron la muerte de las pupas en la etapa preimaginal, en tanto que *B. thuringiensis* var. kurstaki permitió el desarrollo de los individuos hasta la etapa de imago (adulto).

Tabla 6. 1. Efectos letales y subletales de metoxifenocida, novaluron, clorantraniliprole y *B. thuringiensis* var. kurstaki, sobre el estado de pupa de *Lobesia botrana*.

Tratamiento	Concentración (mg i.a./ L) (Dosis µg i.a./g pupa)	Supervivencia pupas	Tiempo desarrollo pupa-adulto (días)	Longevidad adulta (días)	Fecundidad *	Fertilidad** (%)
control	0	86,66 ± 7,45 c	13,66 ± 0,44 c	8,07 ± 0,13 a	123,69 ± 16,18 b	87,69 ± 15,86 b
metoxifenocida	72 (63,34)	3,33 ± 7,45 a	7,16 ± 0,16 a	3,50 ± 3,50 b	0 a	---
novaluron	100 (87,97)	33,33 ± 11,78 b	9,96 ± 0,54 b	6,18 ± 0,67 a	56,40 ± 13,28 a	35,20 ± 10,55 a
clorantraniliprole	40 (35,19)	0,0 a	***	***	***	***
<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki	525 (461,88)	33,33 ± 20,41 b	9,26 ± 0,60 b	6,70 ± 0,21 a	60,00 ± 15,37 a	38,67 ± 11,93 a
Análisis estadístico		F= 51,45 gl=4; 20 p= 0,0000 (1)	K= 88,32 gl= 4; 145 p= 0,000 (2)	K= 4,13 gl= 3; 45 p= 0,24 (2)	F= 9,45 gl= 2; 117 p=0,002 (1)	F= 73,81 gl= 2; 107 p<0,000 (1)

Los datos se expresan como valores medios ± ES (p < 0,05). Dentro de cada columna, los datos seguidos con diferente letra denotan diferencia significativa. (1) ANOVA; (2) Kruskal-Wallis

(*) Oviposiciones obtenidas durante seis días consecutivos de oviposición (fecundidad acumulada).

(**) Porcentaje de huevos eclosionados en relación a los huevos puestos (fertilidad acumulada).

***No pudo medirse debido a la alta mortalidad registrada en la etapa a corto plazo.



Figura 6. 3. Toxicidad de insecticidas sobre pupas de *Lobesia botrana*. Ensayo exposición tópica. **A.** *B. thuringiensis* var. *kurstaki*; produjo la muerte de la pupa al estado de imago **B.** clorantraniliprole; **C.** metoxifenocide; **D.** novaluron produjeron la muerte de la pupa en la etapa preimaginal.

6.4. Discusión

La hormona juvenil y los ecdisteroides regulan todos los procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con el desarrollo y la reproducción durante toda la vida del insecto. Los ecdisteroides (más conocida como 20H-ecdisona) intervienen en la metamorfosis en conjunto con la hormona juvenil, la cual interrumpe su secreción previo a un cambio de estado (muda), estando presente durante las etapas juveniles y en la fase adulta e interviniendo en los procesos relacionados a la reproducción. Particularmente en los lepidópteros, que presentan metamorfosis completa, la concentración de la hormona juvenil es constante en cada estadio inmaduro del insecto (estadios larvales), en el último estadio larval decrece a niveles muy bajos hasta que se interrumpe su segregación por parte de la *corpora allata*, permitiendo el cambio de estado (metamorfosis), con la consiguiente formación de la pupa. Durante el estado pupal la hormona juvenil desaparece completamente al final del desarrollo pupal para dar lugar a la formación de los caracteres del adulto. Luego, una vez formado el imago, la *corpora allata* sintetiza y libera nuevamente la hormona juvenil cuyo efecto es gonadotrófico, para intervenir en los procesos fisiológicos de la reproducción y ovogénesis (Ishaaya & Horowitz, 2009). Los insecticidas que imitan o antagonizan la acción de la hormona juvenil y de los ecdisteroides, promueven interrupciones en la metamorfosis del insecto. La variación de los niveles de estas hormonas trae aparejado la formación de larvas o pupas anormales que darán origen a adultos malformados, cuyo desempeño reproductivo podría tener un impacto negativo en la dinámica poblacional del insecto (Trisyono & Chippendale, 1997; Dhadialla *et al.*, 1998; Ishaaya *et al.*, 2007).

La cutícula pupal es más que una mera barrera física. Estudios demostraron que hay actividad metabólica sobre la cutícula de la pupa (Sternburg & Kearns, 1952; Quraishi, 1970). Estos autores establecieron que insecticidas aplicados tópicamente sobre pupas de langostas, eran capaces de atravesar la cutícula pupal y ser transportados a regiones adyacentes manifestándose posteriormente los síntomas típicos de la intoxicación. Chebira *et al.* en 2006 estudiaron la cinética de la absorción de insecticidas reguladores de crecimiento, luego de la aplicación tópica en pupas de diferentes edades de *Tenebrio molitor* (L.). Los resultados revelaron una mayor tasa de absorción a través de la cutícula de pupas jóvenes en relación a las mayores. La penetración del insecticida estaba relacionada con la estructura de la cutícula. Las pupas viejas presentaron menor absorción, ya que la endocutícula, además de ser más gruesa,

contiene mayor cantidad de laminillas de quitina en comparación a las pupas jóvenes. Los insecticidas fueron absorbidos a través de la cutícula y luego transportados al resto de los órganos. Por otro lado, se pudieron cuantificar trazas de los insecticidas a nivel del sistema reproductor, tanto de hembras como de machos, lo que explica los efectos en la reproducción de los productos evaluados (Taïbi *et al.*, 2003).

Los resultados de este estudio demostraron que clorantraniliprole, novaluron y metoxifenocida sobre pupas de *L. botrana* produjeron alteraciones en los individuos en formación, impidiendo el normal desarrollo de los imagos. Los adultos que lograron emerger de las pupas tratadas con *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, metoxifenocida y novaluron, vieron reducida su capacidad reproductiva y longevidad. Los resultados obtenidos en esta tesis, coinciden con los reportados por otros autores, en donde se observan adultos deformes en individuos emergentes de pupas tratadas con *B. thuringiensis* (Lüthy, 1980) o provocando efectos teratológicos en la progenie, retraso en el desarrollo pupal y muerte durante la muda o en el estado de pupa (Malaikozhundan & Vinodhini 2018).

Estudios realizados con novaluron muestran que este insecticida prolongó la duración de la fase pupal de *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Ghoneim *et al.*, 2017) y redujo la emergencia adulta en *Palpita unionalis* (Hübner) (Hamadah *et al.*, 2017). Por su parte el clorantraniliprole no afectó significativamente la supervivencia pupal de *Plutella xylostella* (L.) y *Helicoverpa armigera* (Hübner), pero sí extendió la duración de esta fase (Guo *et al.*, 2013). En cuanto a los efectos observados en individuos tratados con metoxifenocida, los resultados coinciden con autores que investigaron otras especies de lepidópteros plaga. En este sentido metoxifenocida por vía tópica en pupas de *Heliothis zea* (Boddie) y *Diatraea grandiosella* (Dyar) afectó el desarrollo de los discos imaginales, precursores de diferentes apéndices como alas, patas, ojos y antenas en insectos adultos (Riddiford, 1980; Oberlander, 1985; Pineda *et al.*, 2004), o dando lugar a la emergencia de individuos con malformación de alas (Chandler *et al.*, 1992; Trisyono & Chippendale 1998). Por otro lado, también se observó alteración de la diapausa en larvas de *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) alimentadas con dieta contaminada con el agonista ecdisteroide (RH-2485) (Eizaguirre *et al.*, 2007), de los parámetros reproductivos de machos provenientes de larvas de *Spodoptera litura* (F.) tratadas con tebufenocida vía ingestión (Seth *et al.*, 2004; Smaghe *et al.*, 2004) y cambios en la proporción de sexos en los adultos de *Platynota*

Idaeusalis (Walker) provenientes de larvas tratadas vía ingestión con tebufenocide (Biddinger *et al.*, 2006; Zarate *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 7

Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocid, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre adultos de *Lobesia botrana*.

7. Evaluación de efectos toxicológicos de metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre sobre adultos de *Lobesia botrana*.

7.1. Materiales y Métodos

7.1.1. Obtención de adultos para los bioensayos de toxicidad.

Los individuos utilizados para el estudio se obtuvieron de la cría masiva que se desarrolla en el laboratorio, a partir de una cohorte de huevos coetáneos. Se utilizaron adultos de 24 h de edad.

7.1.2 Bioensayo

Se evaluaron las MCRC (Máxima Concentración Recomendada para su uso en el Campo) de los siguientes productos comerciales: Intrepid® (metoxifenocida, 24% i.a., Dow-Agroscience Arg, Bs. As., Argentina); Coragen® (clorantraniliprole, 20% i. a., DuPont Arg, Bs. As., Argentina); Rimon Supra® (novaluron, 10% i. a., Magan Arg, Bs. As., Argentina); y Dipel L Plus® (*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, 3,5% i. a., Summit Agro Arg, Bs. As., Argentina). Las soluciones de insecticidas fueron preparadas usando agua destilada como disolvente.

La exposición a los insecticidas se realizó mediante un ensayo de toxicidad oral crónica. Las soluciones insecticidas se prepararon el mismo día y fueron suministradas *ad libitum*, a través del agua de beber durante 72 h consecutivas, teniendo en cuenta la degradación normal del insecticida. Transcurrido ese lapso, se suministró sólo agua destilada con miel al 5%. Al control se le proporcionó desde el principio sólo agua destilada con miel al 5%. Se consideró como unidad experimental 1 pareja de polillas y se realizaron 30 réplicas por insecticida y control. Cada pareja se colocó en una cámara de copulación (botella PVC) la cual sirvió de sustrato de cópula y oviposición, la cual estaba provista de un bebedero con las soluciones de insecticidas correspondientes (**Figura 7.1**).

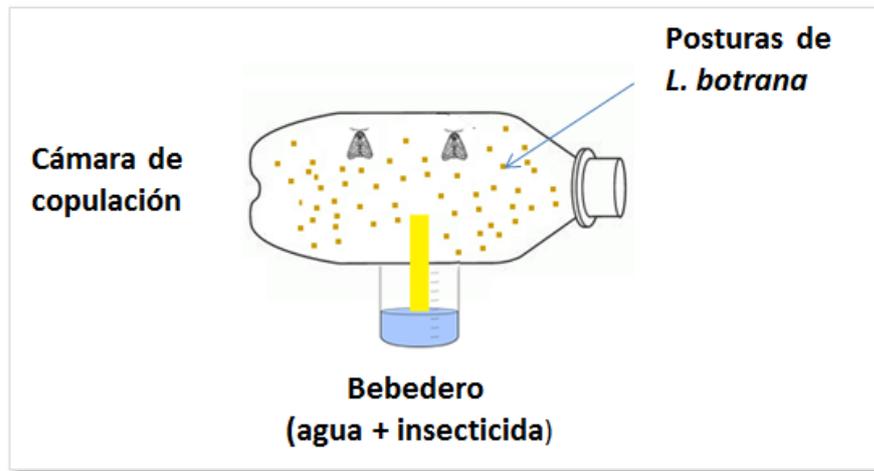


Figura 7. 1. Esquema de la metodología de suministro de los insecticidas mediante el ensayo de toxicidad oral crónica a través de agua de beber sobre adultos de *Lobesia botrana*.

7.2. Evaluación:

Los individuos se observaron diariamente y durante 10 días para determinar la supervivencia de los adultos expuestos a los insecticidas evaluados, discriminando los potenciales efectos de acuerdo al sexo, (efecto a corto plazo). Como efecto a largo plazo se estudiaron la longevidad adulta por sexo y los parámetros reproductivos (fecundidad y fertilidad) de las hembras. Durante 6 días consecutivos se registró el número de posturas/día/hembra para cada tratamiento. Se observó bajo lupa estereoscópica la eclosión de huevos, para determinar la fertilidad de las posturas.

Por otro lado, se estudiaron los efectos transgeneracionales de los insecticidas evaluados, para lo cual se evaluaron los efectos toxicológicos sobre la 2ª generación, tomando al azar de cada tratamiento, al menos 5 larvas emergentes. Como puntos finales de evaluación se registraron: periodo intermuda, peso promedio de pupas por sexo, supervivencia de pupas, longevidad de adultos F2 (discriminada por sexo) y fecundidad y fertilidad de las hembras obtenidas

7.2.1. Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron con el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento), analizando cada variable para cada sexo por separado. Para corroborar las premisas del ANOVA se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de las varianzas con la prueba de Cochran, Hartley y Levene. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica $y = \log$

($x+1$) y angular: $p' = \arcseno \sqrt{p}$. Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ($y = \arcsen \sqrt{x}$) para posteriormente ser reevaluados. El análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, luego de su transformación, se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0 con un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

7.3. Resultados

a) Efectos de los insecticidas sobre la supervivencia de adultos expuestos a insecticidas.

En la **figura 7.2** se presentan los resultados de la supervivencia de adultos a las 48 h post-tratamiento. El clorantraniliprole redujo la supervivencia de hembras en un 50%, mientras que para los machos la reducción fue del 70%. Tanto *B. thuringiensis* var. kurstaki, novaluron como metoxifenocide no afectaron significativamente la supervivencia de los adultos con respecto al control.

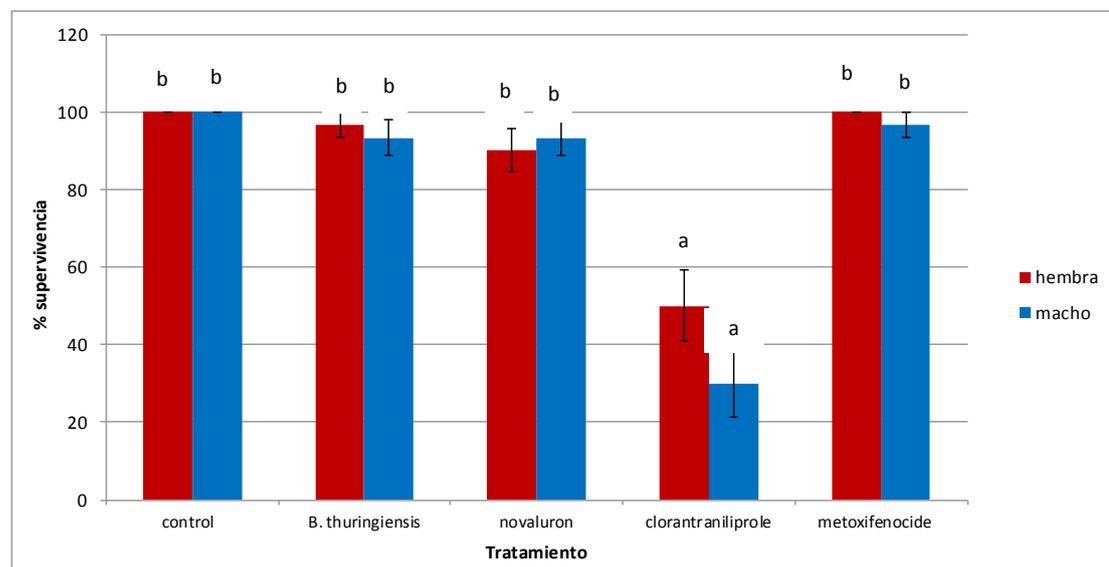


Figura 7. 2. Supervivencia 48 h post-tratamiento de adultos de *Lobesia botrana* expuestos a insecticidas. Ensayo vía ingestión (agua de beber). Los datos corresponden al porcentaje promedio (\pm Error estándar)

En los individuos sobrevivientes fue posible evaluar los efectos a largo plazo o subletales sobre los parámetros reproductivos (fertilidad y fecundidad) y la longevidad de los adultos (**Tabla 7.1**).

Tabla 7. 1. Toxicidad de *B. thuringiensis* var. kurstaki, novaluron, clorantraniliprole y metoxifenocide sobre aspectos biológicos de *Lobesia botrana*. Ensayo vía ingestión en adultos.

Tratamiento	Concentración (mg i.a. L ⁻¹)	Fecundidad *	Fertilidad ** (%)	Longevidad (días)	
				hembra	macho
control	0	130,83 ± 8,16 d	97,29 ± 2,31 c	9,5 ± 0,29 c	8,43 ± 0,3 c
<i>B. thuringiensis</i> var. kurstaki	525	30,73 ± 13,06 b	54,21 ± 7,04 b	7,46 ± 0,32 b	5,76 ± 0,36 b
novaluron	100	53,94 ± 15,45 c	31,11 ±14,62 a	8,23 ± 0,42 bc	7,63 ± 0,31 c
clorantraniliprole	40	3,2 ± 2,49 a	32,34 ± 26,15 a	5,2 ± 0,47 a	3,83 ± 0,38 a
metoxifenocide	72	19,56 ± 8,45 b	61,59 ± 9,18 b	8,7 ± 0,28 c	7,53 ± 0,28 c
Análisis estadístico		K= 92,39 gl=4; 894 p= 0,0000 (2)	K= 124,50 gl=4;251 p= 0,0000 (2)	K= 48,11 gl=4 ; 145 p= 8,91E ⁻¹⁰ (2)	F= 30,44 gl=4;145 p=0,0000 (1)

Los datos se expresan como valores medios ± ES ($p < 0,05$). Dentro de cada columna, los datos seguidos con diferente letra denotan diferencia significativa. (1) ANOVA; (2) Kruskal-Wallis. (*) Puesta acumulada durante seis días consecutivos de oviposición (fecundidad acumulada). (**) Porcentaje de huevos eclosionados (fertilidad acumulada).

La fecundidad y la fertilidad fueron afectadas por todos los insecticidas ensayados, observándose una reducción en el número de huevos depositados en relación al control del 76,51% para *B. thuringiensis* var. kurstaki, 58,77% para novaluron, 97,55% para clorantraniliprole y 85,04% metoxifenocide. En relación a la fertilidad, se observó una reducción en la eclosión de huevos con respecto al control del 44,27% por *B. thuringiensis* var. kurstaki, 68,02% por novaluron, 66,75% por clorantraniliprole y 36,69 para metoxifenocide. La longevidad adulta se vio reducida por *B. thuringiensis* var. kurstaki aproximadamente en 2,35 días y por clorantraniliprole en 4,45 días para ambos sexos, comparado con los organismos del control.

b) Efectos a largo plazo de insecticidas sobre la descendencia (F2)

Se determinó el efecto de los insecticidas sobre el tiempo intermuda de la descendencia, observándose que todos los insecticidas alargaron significativamente la etapa larvaria y pupal respecto del control, a excepción del clorantraniliprole.

El tiempo intermuda de la fase juvenil se vio prolongada en un 61,8% por *B. thuringiensis*, 44,7% por novaluron y 66,7 % por metoxifenocida con respecto del control.

Los insecticidas evaluados no afectaron la supervivencia ni el peso de las pupas. Sin embargo, la fecundidad, fertilidad y longevidad de adultos emergidos resultaron significativamente menores que lo observado en los individuos control. En este sentido, la fecundidad de las hembras fue reducida en un 72,35% por *B. thuringiensis*, 83% por novaluron y 91% por metoxifenocida, en relación al control. Hembras provenientes de adultos tratados con clorantraniliprole, fueron incapaces de dejar descendencia. La fertilidad de las posturas fue reducida en un 65% por *B. thuringiensis*, 70% por novaluron y 88% por metoxifenocida, respecto al control. La longevidad adulta fue reducida en un 19,77% (1,75 días) para *B. thuringiensis*, 37,85% (3,35 días) para novaluron 49,15% (4,35 días) para clorantraniliprole y 35% para metoxifenocida (3,1 días), en relación al control (**Tabla 7.2**).

Tabla 7. 2. Efectos toxicológicos transgeneracionales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, novaluron, clorantraniliprole y metoxifenocida sobre parámetros biológicos de *Lobesia botrana* (F2) provenientes de adultos expuestos a insecticidas

Tratamiento	Concentración (mg i.a. L ⁻¹)	Periodo Intermuda F2						Pupas			Longevidad Adulta		Fecundidad *	Fertilidad ** (%)
		L1 - L2	L2 - L3	L3 - L4	L4 - L5	L5- Pupas	pupa-adulto	Supervivencia (%)	Peso hembras	peso machos	hembra	macho		
Control	0	6,43 ± 0,53 a	6,86 ± 0,57 a	7,00 ± 0,58 a	7,26 ± 0,63 a	10,43 ± 0,87 a	15,10 ± 0,66 b	90,00 ± 4,47 a	11,48 ± 0,29 a	9,03 ± 0,22 a	9,10 ± 0,27 c	8,60 ± 0,22 b	125,90 ± 12,06 b	95,34 ± 4,93 b
<i>B. thuringiensis</i>	525	8,13 ± 0,14 b	8,31 ± 0,17 b	9,26 ± 0,28 b	13,31 ± 0,35 c	18,27 ± 0,34 c	17,26 ± 0,53 c	76,66 ± 3,33 a	11,82 ± 0,48 a	8,04 ± 0,72 a	7,90 ± 0,52 b	6,30 ± 0,73 a	34,80 ± 15,09 a	37,70 ± 23,25 a
novaluron	100	11,00 ± 0,24 c	10,03 ± 0,22 bc	8,90 ± 0,23 b	9,40 ± 0,34 b	15,63 ± 0,37 b	14,26 ± 0,53 b	72,00 ± 10,19 a	11,51 ± 0,43 a	7,90 ± 0,33 a	5,30 ± 0,47 a	5,70 ± 0,44 a	21,40 ± 9,48 a	43,83 ± 13,24 a
clorantraniliprole	40	8,20 ± 0,25 b	8,40 ± 0,74 b	6,62 ± 0,82 a	7,45 ± 1,65 a	12,66 ± 2,69 ab	10,80 ± 1,59 a	63,33 ± 20,27 a	10,13 ± 1,47 a	8,10 ± 0,10 a	6,0 ± 0,0 ab	3,00 ± 0,0 a	0,0 a	----
metoxifenocida	72	7,90 ± 0,16 b	12,40 ± 0,27 c	12,40 ± 0,27 c	12,40 ± 0,22 c	17,96 ± 0,53 c	17,96 ± 0,53 c	68,58 ± 12,98 a	11,32 ± 0,48 a	8,58 ± 0,35 a	5,70 ± 0,39 a	5,80 ± 0,44 a	11,10 ± 6,35 a	14,49 ± 3,85 a
Análisis estadístico		K= 81,12 gl=4;14 4 p= 0,000 (2)	K= 66,22 gl= 4;144 P= 0,000 (2)	K= 72,45 gl= 4;139 p=0,000 (2)	K= 70,52 gl= 4;125 p= 0,000 (2)	K= 42,47 gl= 4;120 p= 0,000 (2)	K= 32,05 gl= 4;113 p= 0,00 (2)	K= 3,16 gl=4; 25 p= 0,53 (2)	F= 0,58 gl= 4; 66 p= 0,67 (1)	K= 5,34 gl= 4;48 p= 0,25 (2)	K= 48,11 gl= 4; 145 p= 0,000 (2)	F= 30,44 gl=4; 145 P=000 0 (1)	K= 66,44 gl= 4;241 p= 0,000 (2)	K= 37,87 gl= 3;73 p= 0,000 (2)

Los datos se expresan como valores promedio ± ES ($p < 0,05$) los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes. (1) ANOVA; (2) Kruskal-Wallis L1: larva de 1° estadio, L2: larva de 2° estadio, L3: larva de 3° estadio, L4: larva de 4° estadio, L5: larva de 5° estadio (*) puesta acumulada durante seis días consecutivos de oviposición (fecundidad acumulada). (**) porcentaje de huevos eclosionados (fertilidad acumulada).

7.4. Discusión

La susceptibilidad de los insectos plaga a los insecticidas varía de acuerdo al estado de desarrollo de los individuos evaluados, entre otros factores. Por lo general, la cutícula de los estados inmaduros es más permeable debido a la baja quitinización (Ebeling, 1974; Soltani *et al.*, 1983). Comparando los niveles de absorción de diflubenzuron a través de la cutícula de pupas de diferentes edades, se demostró que pupas de 24 h de edad, presentaron un nivel de absorción superior del insecticida, respecto de pupas de 2 días de edad (Chebira *et al.*, 2006). Luego, comparando adultos del coleóptero *Tenebrio molitor* (L.) y del lepidóptero *Spodoptera littoralis* (Boisd.) después de 24 h de exposición a diflubenzuron, se observó que los niveles de absorción alcanzaron aproximadamente 33% y 15% respectivamente, por lo que las diferencias en la tasa de absorción podrían deberse no sólo a la edad, sino también a la especie considerada (El-Saidy *et al.*, 1989; Chebira *et al.*, 2006).

Los insecticidas, en general, ejercen efectos directos sobre la fisiología y el desempeño de los insectos expuestos. Estos pueden persistir en las generaciones siguientes, tanto en plagas, como organismos benéficos (Guo *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014). La exposición de adultos de *Sogatella furcifera* (Horváth) a buprofezin, impactó en el desarrollo y redujo la longevidad y la fecundidad de la progenie (Ali *et al.*, 2017). Ensayos realizados con tebufenozide sobre larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner), registraron reducción de la fertilidad en las generaciones posteriores (Smagghe *et al.*, 1998). Los efectos transgeneracionales son de gran relevancia, ya que demuestran que el impacto de los insecticidas puede repercutir en generaciones posteriores a la expuesta y sumar a la efectividad en el control de la plaga en cuestión. Las consecuencias del uso de insecticidas en los parámetros demográficos, requieren de una investigación mucho más profunda.

Con respecto a los resultados del presente capítulo, se ha podido observar que todos los insecticidas suministrados oralmente a adultos de *L. botrana* afectaron la fecundidad y la fertilidad de la misma. Sin embargo, sólo los tratamientos con *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y clorantraniliprole redujeron además la longevidad de los individuos tratados. También se observó el efecto transgeneracional de los insecticidas ensayados sobre la progenie, registrándose un alargamiento de la etapa larvaria y pupal, como así también una reducción de la longevidad, la fecundidad y la fertilidad de la descendencia todos los insecticidas ensayados.

Las condiciones ambientales donde se desarrollan los individuos parentales pueden ser transferidas y ejercer cambios en el desarrollo, fisiología, comportamiento y comunicación de los descendientes. Los efectos retardados de los insecticidas pueden impactar en la dinámica poblacional de las especies (Beckerman *et al.*, 2002). Los efectos transgeneracionales son de gran relevancia, ya que demuestran que la exposición a un insecticida puede ser duradera, incluso cuando los mismos ya no están presentes en las generaciones subsiguientes. Estudiar la influencia de insecticidas a largo plazo en la dinámica poblacional de un insecto requiere investigaciones más profundas para el uso adecuado de insecticidas (Müller *et al.*, 2017).

Estos estudios están poco abordados en los ensayos de efectividad de insecticidas sobre organismos plaga, ya que, si bien pueden quedar individuos sobrevivientes, esta tesis muestra que el efecto de los insecticidas aquí ensayados, sigue afectando la supervivencia, longevidad e incluso aspectos reproductivos de la progenie.

En la fase adulta el nivel de hormonas juveniles asciende para inducir el proceso de previtelogénesis, vitelogénesis, desencadenar la actividad de las glándulas accesorias, producir feromonas sexuales y provocar la ovogénesis (Ishaaya & Horowitz, 2009). El incremento exógeno del nivel de un análogo de la hormona juvenil en el estado adulto impacta negativamente en la reproducción. Retnakaran *et al.* (1985) demostraron que había una transferencia del insecticida a los huevos y su posterior impacto sobre el desarrollo embrionario.

Numerosos autores señalaron el efecto del metoxifenocida sobre la fecundidad y fertilidad de lepidópteros. Smagghe y Degheele (1994) sugirieron que los insecticidas aceleradores de la muda producen un efecto quimioesterilizante en las hembras, lo que interfiere en la ovogénesis y por ende en la fecundidad. No obstante, Carpenter y Chandler (1994) observaron menor fecundidad y fertilidad de hembras de *Helicoverpa zea* (Boddie) no tratadas, apareadas con machos expuestos a metoxifenocida, concluyendo que no fueron capaces de transferir el esperma durante la cópula. Resultados similares se registraron para *Cydia pomonella* (L.) (Sun & Barrett, 1999; Hoelscher & Barrett, 2003), *Argyrotaenia velutinana* (Walker) y *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Sun *et al.*, 2000; Hoelscher & Barrett, 2003). Smagghe y Degheele (1992a, b; 1994a, b) observaron que adultos de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) no sólo reducían la fecundidad, sino que también se registró una disminución en la

supervivencia y longevidad de la descendencia. Adultos *S. exigua* expuestos a metoxifenocida no redujeron la fecundidad, pero afectó significativamente fertilidad en comparación al control (Rodríguez *et al.*, 2010). Pineda *et al.* (2009) manifestaron que adultos de *S. littoralis* tratados por ingestión, mostraron reducción de la longevidad, fecundidad y fertilidad. Además, también estos autores registraron efectos transgeneracionales en el porcentaje de pupación de la progenie pero sin ejercer ningún efecto en la emergencia adulta.

El impacto del novaluron sobre la reducción de la fecundidad y fertilidad obtenida en el presente capítulo coincide con lo reportado por diversos autores. Chang y Borkovec (1990) ensayaron diflubenzuron, inhibidor de la síntesis de quitina, sobre machos de mosca doméstica *Musca domestica* (L.) los cuales fertilizaron hembras sin tratar. Se demostró la transferencia del insecticida a través de los espermatozoides, afectando el desarrollo embrionario de los huevos depositados. Resultados similares fueron descritos por Pospischil *et al.* (1980) quienes observaron que el novaluron, administrado oralmente a adultos de la mosca doméstica indujo la producción de huevos infértiles e influyó en el desarrollo de las larvas que lograron eclosionar. Estudios realizados sobre adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst) confirmaron el transporte transovárico del novaluron, su impacto sobre la eclosión de huevos y posterior influencia en el desarrollo larval (Elek, 1998; Ishaaya *et al.*, 2002; Kostyukovsky & Trostanetsky, 2006). El transporte transovárico del novaluron a través de las hembras de *Pectinophora gossypiella* (Saunders) dio como resultado la inhibición de la eclosión de huevos y retraso en el desarrollo de larvas (Hamadah & Ghoneim, 2017). Soltani & Soltani Mazouni (1992) comprobaron que la reducción de la fertilidad y de la viabilidad de los huevos de adultos de *C. pomonella* tratados con diflubenzuron, se debió a la interferencia en la vitelogénesis y en la maduración de oocitos de las hembras. Efectos similares observaron Gökçe *et al.* 2009 en adultos *C. pomonella* tratados con novaluron. El movimiento transovárico de estos compuestos en el adulto expuesto hacia los huevos y larvas es un mecanismo que han verificado numerosos investigadores (Cutler *et al.*, 2005, Kostyukovsky & Trostanetsky 2006, Wise *et al.*, 2007; Alyokhin *et al.*, 2008) y que puede ser valorado positivamente para el control de un organismo plaga.

Varios trabajos han observado también efectos transgeneracionales como los descritos en el presente estudio. En este sentido, ensayos realizados sobre adultos de *Plutella xylostella* (L.) con clorantraniliprole demostraron efectos transgeneracionales:

como alargamiento del estado larvario y pupal, elevada mortalidad de larvas y reducción de la fecundidad y fertilidad de los huevos. Todos estos factores impactaron sobre el crecimiento poblacional (Guo *et al.*, 2013). Efectos similares fueron registrados por Wang *et al.* (2017) en adultos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) tratados con ciantraniliprole. Se registró alargamiento de la duración de la etapa ninfal y pupal, disminución de la supervivencia del periodo ninfal, pseudopupa y adulto. Asimismo, redujo la duración del periodo de oviposición y la fecundidad de las hembras tratadas, impactando en el incremento poblacional. Ensayos realizados sobre larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) demostraron una incidencia negativa sobre la capacidad reproductiva de los adultos y su descendencia (Zhang *et al.*, 2013). Por otro lado, adultos de *Helicoverpa assulta* (Guenée) manifestaron una disminución en la fecundidad y reducción del peso pupal de la progenie. Estos resultados sugieren que esta diamida antranílica podría incidir en el crecimiento de la población al afectar la supervivencia y la reproducción de los insectos expuestos (Dong *et al.*, 2017). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente tesis con este mismo insecticida.

Reportes bibliográficos señalan la influencia del *B. thuringiensis* sobre adultos de lepidópteros (Ali & Watson, 1982) y dípteros (Indrasith *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1997). *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ensayado sobre adultos de *Heliothis virescens* (F.) y *S. exigua*, mostraron una importante reducción de la longevidad de adultos e incluso una alta tasa de mortalidad de los mismos (Grove *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Ali *et al.* (1982), confirmaron que este insecticida biológico no solo redujo notoriamente la longevidad de adultos de *H. virescens*, sino que también afectó el comportamiento reproductivo y la fecundidad, observando anormalidades (efectos teratológicos) en los adultos sobrevivientes. Del mismo modo, Sedaratian *et al.* (2013) reportaron que el Bt sobre *H. armigera*, provocó un alargamiento significativo de la fase juvenil de la progenie y una reducción de la fecundidad y fertilidad en los adultos obtenidos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio.

Tanto los efectos letales, como los subletales de los insecticidas evaluados sobre adultos de *L. botrana*, son relevantes a la hora de considerar el crecimiento poblacional y la dispersión de la plaga en un cultivo, ya que la alteración de los parámetros reproductivos impacta directamente, condicionando el crecimiento poblacional de la especie. Estos estudios son de relevancia en relación al manejo y control de la plaga, ya

que si bien el adulto no ocasiona el daño económico en el cultivo (por no ser fitófago), el control dirigido a este estado de desarrollo disminuye su tasa de incremento y la dispersión de la plaga.

CAPÍTULO 8

Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos en los bioensayos con metoxifenocida, clorantraniliprole, novaluron y *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki sobre los diferentes estados de desarrollo de *Lobesia botrana* y a través de diferentes vías de exposición, es posible concluir:

✓ El metoxifenocida, mimético de la hormona de la muda, MAC no resultó ovicida ni embrionicida, pero afectó a los individuos emergentes. Se observó un efecto antialimentario muy marcado, que impactó sobre el peso de las larvas eclosionadas y pupas formadas. Incidió negativamente sobre la fecundidad y la fertilidad de los adultos obtenidos. Aplicado tópicamente sobre larvas produjo un efecto antialimentario, impactando sobre el peso de pupas y disminuyendo la capacidad reproductiva de las hembras. En la exposición a pupas, detuvo el desarrollo en la etapa preimaginal, redujo la supervivencia y el tiempo de desarrollo intermuda pupa – adulto, disminuyó la longevidad y fertilidad de los adultos emergidos. Suministrado oralmente a adultos impactó sobre la fecundidad y la fertilidad de los individuos tratados. En la descendencia (efectos transgeneracionales) alargó el tiempo intermuda larvaria y pupal, y redujo la fecundidad, fertilidad y longevidad de individuos emergidos.

✓ El clorantraniliprole, no mostró efecto ovicida ni embrionicida. En las larvas que eclosionaron, se verificó un efecto antialimentario que impactó en el peso pupal, la longevidad y la fecundidad de los adultos emergentes. Ensayado tópicamente en larvas, produjo cese alimentario, que resultó en una pérdida del peso pupal, disminución en el porcentaje de pupación, emergencia adulta, reducción de la longevidad y fecundidad de los adultos obtenidos. Sobre pupas, detuvo el desarrollo en el estado de preimago. Ensayado en adultos redujo la supervivencia, longevidad, fecundidad y fertilidad. En la progenie (efectos transgeneracionales) redujo el tiempo intermuda de la etapa larvaria y pupal. No afectó la supervivencia ni el peso de las pupas. Disminuyó la fecundidad, fertilidad y longevidad de adultos emergidos.

✓ El novaluron, inhibidor de la síntesis de quitina, no resultó ovicida ni embrionicida, produjo una reducción del peso de las pupas formadas, redujo la longevidad y fecundidad de los insectos emergentes. Ensayado tópicamente sobre larvas, afectó la capacidad de las mismas para desprender la exocutícula, produjo pérdida de hemolinfa y reducción del tiempo de desarrollo larval y del peso pupal. Sobre pupas, disminuyó la supervivencia, redujo el tiempo de desarrollo intermuda pupa – adulto, la longevidad y la fertilidad de los adultos obtenidos. Suministrado a adultos

no afectó la supervivencia ni la longevidad pero si redujo la fecundidad y la fertilidad. En la descendencia (efectos transgeneracionales) prolongó el tiempo intermuda larvaria y pupal, redujo la fecundidad, fertilidad y longevidad de adultos emergidos

✓ El insecticida biológico (bioplaguicida), *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, tuvo un efecto ovicida/embrionocida muy marcado. Su eficacia, fue corroborada con la estimación de la CL_{50} , la cual se encuentra 1200 veces por debajo de la MCRC. Aplicado tópicamente sobre larvas ocasionó efecto antialimentario, acortamiento el período de desarrollo larval, generando pupas de bajo peso y escasa viabilidad. Ensayado sobre pupas, permitió que el desarrollo pupal llegara al estado de imago pero acortó el tiempo desarrollo pupa adulto y redujo la longevidad, fecundidad y fertilidad de los adultos que emergieron. Sobre adultos redujo la supervivencia, la longevidad, la fecundidad y la fertilidad de los individuos tratados, en la progenie obtenida (efectos transgeneracionales) alargó la etapa larvaria y pupal si bien no afectó la supervivencia, ni el peso de las pupas. Redujo la fecundidad, fertilidad y longevidad de adultos emergidos.

✓ La actividad de los insecticidas probados vía ingestión, resultaron ser muy tóxicos para las larvas de segundo y cuarto estadio, en comparación a la toxicidad de los mismos productos aplicados vía tópica lo que demuestra que la vía de contaminación principal es la ingestión.

✓ El presente estudio demuestra que los insecticidas utilizados fueron tóxicos para todas las fases de desarrollo de *L. botrana*. Además, los sobrevivientes mostraron efectos subletales variados. Esto indica que la combinación de efectos letales y subletales tiene implicancias importantes que contribuyen a mejorar el control químico de esta plaga cuarentenaria.

✓ Todos los insecticidas ensayados afectaron negativamente la reproducción de la plaga. Estos efectos también son importantes desde el punto de vista práctico, ya que al reducirse la descendencia, la población de la plaga puede mantenerse por debajo del nivel de daño económico.

✓ Los insecticidas con actividad IGR produjeron efectos teratológicos (deformaciones, malformaciones, alteraciones en la muda) que condujeron a una posterior muerte de los insectos expuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afify, A. M. & Matter, M. M. (1969). Retarded effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fecundity of *Anagasta kuehniella* (Zell). *Entomophaga* 14: 447–456.
- Ali, A. - S. A., & Watson, T. F. (1982). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) Adult and Egg Stages 1. *Journal of Economic Entomology*, 75(4), 596–598.
- Ali, E., Liao, X., Yang, P., Mao, K. K., Zhang, X. L. & Shakeel, M. (2017). Sublethal effects of buprofezin on development and reproduction in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Scientific Reports*, 7, 16913.
- Alyokhin A, Guillemette R & Choban R. (2009). Stimulatory and suppressive effects of novaluron on the Colorado potato beetle reproduction. *Journal of Economic Entomology* 102: 2078-2083
- Armendariz, I., Campillo, G., Perez-Zanz, A., Capilla, C., Juárez, J. S., & Miranda, L. (2007). La polilla del racimo (*Lobesia botrana*) en la D.O. Arribes, años 2004 a 2006. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas*, 33, 447-489.
- Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M. (2002). Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honey bees in Devillers, J; Pham-Delegue, M.H., *Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals*, New York: Taylor & Francis, p. 85.
- Bachman, J., & Patterson, H. H. (1999). Photodecomposition of the carbamate pesticide carbofuran: kinetics and the influence of dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* 33(6), 874-881.
- Becerra, V., González, M., Herrera, M. E. & Miano, J. L. (2006). Dinámica poblacional de *Planococcus ficus* Sign. (Hemiptera - Pseudococcidae) en viñedos. Mendoza (Argentina). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, XXXVIII 1, 1-6.
- Beck, L., Römbke, J., Ruf, A., Prinzing, A., & Woas, S. (2004). Effects of diflubenzuron and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxin on soil

invertebrates of a mixed deciduous forest in the Upper Rhine Valley, Germany. *European Journal of Soil Biology*, 40 (1), 55-62.

- Beckage, N. E. (2000). Insect growth regulator. *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*, 123-137.
- Beckerman, A., Benton, T. G., Ranta, E., Kaitala, V., & Lundberg, P. (2002). Population dynamic consequences of delayed life-history effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(6), 263-269.
- Biddinger, D. J., L. A. Hull, & B. A. Mc Pheron. (1996). Cross-resistance and synergism in azinphosmethyl resistant and susceptible strains of tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae) to various insect growth regulators and abamectin. *Journal of Economic Entomology*. 89: 274 -287
- Biddinger, D. J., & Hull, L. A. (1999). Sublethal effects of selected insecticides on growth and reproduction of a laboratory susceptible strain of tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(2), 314-324.
- Biddinger D, Hull L, Huang H, McPheron B & Loyer M (2006) Sublethal effects of chronic exposure to tebufenozide on the development, survival, and reproduction of the tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* 99: 834 - 842
- Blacquiére, T., Smagghe, G., Van Gestel, C.A., Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973 - 992.
- Bradley Jr, J. R., & Agnello, A. M. (1988). Comparative persistence of the ovicidal activity of thiodicarb, chlordimeform, and methomyl against *Heliothis spp.* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. *Journal of Economic Entomology*, 81(2), 705-708.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435.
- Busvine J. R. (1971). A critical review of techniques for testing insecticides. CAB. London.

- Buszczak, M., Freeman, M. R., Carlson, J. R., Bender, M., Cooley, L., & Segraves, W. A. (1999). Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development*, 126 (20), 4581-4589.
- Campbell, B. E., Pereira, R. M., & Koehler, P. G. (2016). Complications with controlling insect eggs. In *Insecticides Resistance*. InTech.
- Carpenter, J. E. & Chandler, L. D. (1994). Effects of sublethal doses of two insect growth regulators on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) reproduction. *Journal of Entomological Science*. 29, 428-435.
- CASAFE. (2015). Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes: Guía de productos fitosanitarios. CASAFE. Buenos Aires. Argentina
- Chandler, D., Pair D. & Harrison E. (1992). RH-5992, a new growth regulator active against corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85: 1099 -1103.
- Chang, S. C., & A. B. Borkovec. (1980). Effects of diflubenzuron and flufenfluron on viability of house fly eggs. *Journal of Economic Entomology* 73: 285 – 287
- Chapman, R. F., & Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge University Press.
- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Salamin, C. & Briand, F. (2006). Efficacité larvicide et ovicide sur les vers de la grappe *Lobesia botrana* et *Eupoecilia ambiguella* de différents insecticides appliqués par trempage des grappes. *Revue suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture*, 38 (5), 289.
- Chebira, S., Soltani, N., Muylle, S., & Smagghe, G. (2006). Uptake and distribution of three insect growth regulators diflubenzuron, flucycloxuron and halofenozide in pupae and adults of *Tenebrio molitor*. *Phytoparasitica*, 34 (2), 187-196
- Chi, H., (1997). Computer Program for the Probit Analysis. <http://140.120.197.173/Ecology/prod02.htm/Probit-MSChart.zip>.
- Cônsoli, F. L., Kitajima, E. W., & Parra, J. R. P. (1999). Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma*

- pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology, 28 (3), 211-231.
- Cordova, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J. S., Lahm, G. P. & Rhoades, D. F. (2006). Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. Pesticide Biochemistry and Physiology, 84 (3), 196-214.
- Costa, M. A., Moscardini, V. F., Gontijo, P. D., Carvalho, G. A., de Oliveira, R. L. & de Oliveira, H. N. (2014). Sublethal and trans- generational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Ecotoxicology, 23, 1399–1408
- Cucchi, N. J. A. & Becerra, V. C. (2009). Manual de tratamientos fitosanitarios para cultivos de clima templado bajo riego. Sección III: Vid.
- Cutler C, Scott-Dupree C, Tolman J & Harris CR. (2005). Acute and sublethal toxicity of novaluron, a novel chitin synthesis inhibitor, to *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Pest Management Science 61: 1060-1068
- Darvas B., Polgar L.A. (1998). Novel type insecticides: specificity and effects on non target organisms, pp. 188-259. En: I. Ishaaya y D. Degheele (Eds.). Insecticides with Novel Modes of Action. Springer. Berlin.
- De Borbón, C.; Gracia, O. & Gómez Talquenca, G. (2002). Mealybugs and Grapevine Leafroll- Associated Virus 3 in Vineyards of Mendoza, Argentina. American Journal of Enology and Viticulture 55 (3): 283-285.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham Del'egue, M.H. (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honey bees under semifield and laboratory conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety. 57, 410 - 419.
- Dehne, H.W., Schönbeck, F., (1994). Crop protection: past and present. Crop Production and Crop Protection. Elsevier. Amsterdam. 45 - 71.
- Delbeke F., Vercruyse P., Tirry L., de Clercq P. & Degheele D. (1997). Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). Entomophaga 42:349–358.

- Desneux, N., Decourtye, A. & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology.*, 52, 81-106.
- Devine, G. J., & Furlong, M. J. (2007). Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human values*, 24(3), 281-306.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. & Le, D.P., (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology.* 43, 545 – 569.
- Dhadialla, T. S., Retnakaran, A., & Smagghe, G. (2005). Insect growth-and development-disrupting insecticides. In *Comprehensive insect molecular science*, volume 6: control (pp. 55-115). Pergamon; Elsevier.
- Dong, J., Wang, K., Li, Y. & Wang, S. (2017). Lethal and sublethal effects of cyantraniliprole on *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 136, 58–63.
- Drummond - Barbosa, D., & Spradling, A. C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology*, 231(1), 265-278.
- Ebeling, W. (1974). Permeability of insect cuticle. In *The Physiology of Insecta* Second Edition pp. 271-343.
- Eizaguirre M., López C., Schafellner C. & Sehnal F. (2007). Effects of ecdysteroid agonist RH-2485 reveal interactions between ecdysteroids and juvenile hormones in the development of *Sesamiano nagrioides*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 65: 74-84
- Elek, J.A. (1998) Treatment of adult Coleoptera with a chitin synthesis inhibitor affects mortality and development time of their progeny. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89:31-39.
- El-Saidy, M.F., Auda, M. & Degheele, D. (1989) Detoxification mechanisms of diflubenzuron and teflubenzuron in the larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Journal Pesticide Biochemistry and Physiology* Elsevier. 35:211-222.
- Environmental Protection Agency (EPA). <https://www.epa.gov/pesticide-reevaluation/groups-pesticides-registration-review#neonic> [Acceso: febrero de 2019]

- Espinasse S, Gohar M, Lereclus D. & Sanchis V (2002) An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin I production. *Journal of Bacteriology* 184:5848–5854
- Ferreira, A., Bastos, M. & Aguiar, A. (2003) Criação de traça da uva *Lobesia botrana* Den. & Schiff. En: Actas do VI Encontro Nacional de Protecção Integrada, 2003, Castelo Branco-Portugal. pp. 83-88.
- Fogel, M.N., Schneider, M.I., Desneux, N., González, B., Ronco, A.E. (2013). Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology* 22, 1063 - 1071
- Fogel, M. N., Schneider, M. I., Rimoldi, F., Ladux, L. S., Desneux, N., & Ronco, A. E. (2016). Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14918-14926.
- Francesena, N., & Schneider, M. I. (2018). Selectivity assessment of two biorational insecticides, azadirachtin and pyriproxyfen, in comparison to a neonicotinoid, acetamiprid, on pupae and adults of a Neotropical strain *Eretmocerus mundus* Mercet. *Chemosphere*, 206, 349-358.
- García, M., (1994). Plagas del viñedo cuyano. *Revista Agro de Cuyo* 8, Centro Regional Cuyo INTA, octubre de 1994, Pág. 1-2, San Juan, Argentina
- Ghoneim, K., Hassan, H. A., Tanani, M. A. & Bakr, N. A. (2017). Toxic and disruptive effects of Novaluron, a chitin synthesis inhibitor, on development of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. Journal of the Entomological Research Society*, 2(2), 36-47
- Gill, S. S., Cowles, E. A. & Pietrantonio, P. V. (1992). The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 615–634.
- Gilligan, T. M., Epstein, M. E., Passoa, S. C., Powell, J. A., Sage, O. C., & Brown, J. W. (2011). Discovery of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) in California: an invasive species new to North America (Lepidoptera: Tortricidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 113(1), 14-30.

- Giorgi, F. & Deri, P. (1976). Cell death in ovarian chambers of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 35, 521-533
- Gobbi, A., Budia, F., Smaghe, G. & Viñuela, E. (1998). Effects of tebufenozide on larvae of *Spodoptera littoralis*. Influence of the exposure method. *Boletín de Sanidad Vegetal*, 24: 41 - 56
- Gobbi, A., Budia, R., Schneider, M., Del Estal, P., Pineda, S. & Viñuela, E. (2000) Acción del Tebufenocida sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Mythimna unipuncta* (Haworth) y *Spodoptera exigua* (Hübner). *Boletín de Sanidad Vegetal*, 26: 119-127
- Gökçe, A., Kim, S. H. S., Wise, J. C., & Whalon, M. E. (2009). Reduced egg viability in codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) following adult exposure to novaluron. *Pest Management Science*, 65(3), 283-287.
- González, R. H. (2008). Biología, desarrollo, caracterización, de daños y manejo fitosanitario de la polilla Europea de la vid, *Lobesia botrana* (D & S) (Lep., Tortricidae). Universidad de Chile, Dirección de Extensión, Santiago, Chile. 25 pp. *Entomological Society* 30: 287–299.
- González, M. (2010) *Lobesia botrana*: Polilla de la uva. En *Revista Enología*, 7(2)
- Gringorten JL (2001) Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In: Ishaaya I (ed.) *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, pp. 167– 207. Springer, Berlin.
- Grove M, Kimble W, & McCarthy WJ (2001) Effects of individual *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins on adult *Heliothis virescens* (F.) and *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *BioControl* 46:321
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2014). *The insects: an outline of entomology*. John Wiley & Sons. Wiley-Blackwell; 618 pp.
- Guo, L., Desneux, N., Sonoda, S., Liang, P., Han, P. & Gao, X. W. (2013). Sublethal and transgenerational effects of chlorantraniliprole on biological traits of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Crop Protection*, 48, 29-34.

- Hamadah, K. H., & Ghoneim, K. (2017). Ovicidal activities and developmental effects of the chitin synthesis inhibitors, noviflumuron and novaluron, on the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae).
- Hamadah, K.H., Mansour, A. N., Elsoud, A. A., & Ghoneim, K. (2017). Toxicity and Disruptive Impacts of Novaluron, A Chitin Synthesis Inhibitor, on Development and Metamorphosis of The Olive Leaf Moth *Palpita unionalis*. International Journal of Trend in Scientific Research and Development, 1 (Issue-4).
- Han, W., Zhang, S., Shen, F., Liu, M., Ren, C., & Gao, X. (2012). Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Pest Management Science, 68 (8), 1184-1190.
- Hannig, G. T., Ziegler, M., & Marçon, P. G. (2009). Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 65(9), 969-974.
- Herrera, M. E., Dagatti, C. V. & Becerra, V. C. (2016). A practical rearing method for *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) under laboratory conditions. Revista de la Sociedad Entomologica Argentina, 75(3-4), 160-164.
- Hinton, H. E. (1969). Respiratory systems of insect egg shells. Annual Review of Entomology, 14(1), 343-368.
- Hoelscher, J.A. & Barrett, B.A. (2003). Effects of methoxyfenozide-treated surfaces on the attractiveness and responsiveness of adult Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Economic Entomology. 96, 623-628.
- Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hütter, & V. Pliska. (1988). Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). European Journal of Biochemistry 173:85–91.
- Hofte H, Whitely HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbial Review 53: 242–255.
- Horak & Brown (1991). Taxonomy and phylogeny L.P.S. Van der Geest, H.H. Evenhuis (Eds.). In Tortricid Pests. Their Biology, Natural Enemies and Control,

- Horowitz, A. R., Ellsworth, P. C. & Ishaaya, I. (2009). Biorational pest control—an overview. In *Biorational Control of Arthropod Pests* (pp. 1-20). Springer Netherlands.
- Husz B. (1928) *Bacillus thuringiensis* Berl. A bacterium pathogenic to corn borer larvae. *Int Corn Borer Invest Science Report* 1:191–193
- Ignoffo, C. M., & Gregory, B. (1972). Effects of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin on Larval Maturation, Adult Longevity, Fecundity, and Egg Viability in Several Species of Lepidoptera. *Environmental Entomology*, 1(3), 269–272.
- Indrasith, L.S., N. Suzuki, K. Ogiwara, S. Asano & H. Hori, (1992). Activated insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovars killed adult house flies. *Letters in Applied Microbiology* 14: 174–177.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2015) Consumo Mercado Interno. Datos estadísticos.
http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2015/REGISTRO_VD_OS_2015.pdf [Acceso: Octubre 2016]
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2015b) Exportaciones Argentinas de Productos Vitivinícolas – Año 2015.
http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2015/COMENTARIO_A%C3%91O_2015.pdf [Acceso: Octubre 2016]
- Ioriatti, C., Anfora, G., Angeli, G., Mazzoni, V., & Trona, F. (2009). Effects of chlorantraniliprole on eggs and larvae of *Lobesia botrana* (Denis & Schifferrmüller) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science*, 65(6), 717-722.
- Ishaaya, I., De Cock, A., & Degheele, D. (1994). Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: *Aleyrodidae*). *Journal of Economic Entomology*, 87(5), 1185-1189.
- Ishaaya, I., Horowitz, AR, Tirry, L & Barazani, AR (2002) Novaluron (Rimon), una novela IGR: mecanismo, selectividad e importancia en los programas de IPM. *Meded. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 67: 617-626.
- Ishaaya, I., Barazani, A., Kontsedalov, S. & Horowitz, A. R. (2007). Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. *Entomological Research*, 37(3), 148–152.

- Ishaaya, I. & Horowitz, A. R. (2009). Biorational control of arthropod pest (p. 408). Springer.
- Ishiwata S (1901) On a new type of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sansi Kaiho 114:1–5
- Kearfott, W. D. (1904). North American Tortricidae. Transactions of the American Kennel, J. V. (1908). Die paläarktischen Tortriciden.
- Khajepour, S., Izadi, H., Asari, M. J., & Liu, N. (2012). Evaluation of two formulated chitin synthesis inhibitors, hexaflumuron and lufenuron against the raisin moth, *Ephestia figulilella*. Journal of Insect Science, 12 (1), 102.
- Kim, S. H. S., Wise, J. C., Gökçe, A., & Whalon, M. E. (2011). Novaluron causes reduced egg hatch after treating adult codling moths, *Cydia pomonella*: Support for transovarial transfer. Journal of Insect Science 11 (1).
- Knight, L. (2000). Tebufenozide targeted against codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) adults
- Kostyukovsky, M. & Trostanetsky, A. (2006). The effect of a new chitin synthesis inhibitor, Novaluron, on various developmental stages of *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research 42:136-148
- Lahm, G.P., Cordova, D., Barry, J., (2009). New and selective ryanodine receptor activators for insect control. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 17, 4127 - 4133.
- Lai, T., & Su, J. (2011a). Assessment of resistance risk in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole. Pest Management Science, 67 (11), 1468-1472.
- Lai, T.C. & Su, J.Y., (2011b). Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). Journal of Pest Science. 84, 381- 386.
- Laskowska-Bożek, H. & Zielińska, Z. M. (1978). Analogi hormonów juwenilnych jako insektycydy trzeciej generacji. Fizjologiczne podstawy (Juvenile hormone

analogue as third generation insecticides. *Physiological Bases. Kosmos* 4: 367-382.

- Liu, S. S., & Zhang, G. M. (1997). Effects of *Bacillus thuringiensis* on eggs of three lepidopterous pests of crucifer vegetable crops. The management of diamondback moth and other crucifer pests, 109-112.
- Lüthy, P. (1980). Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 8 (1), 1-7.
- MacIntosh, S. C., Stone, T. B., Sims, S. R., Hunst, P. L., Greenplate, J. T., Marrone, P. G. & Fuchs, R. L. (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56 (2), 258 –266.
- Madore, C. D., D. G. Boucias, & Dimond J. B. (1983). Reduction of reproductive potential in spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) by a chitin-inhibiting insect growth regulator *Journal of Economic Entomology*. 76: 708 - 710.
- Malaikozhundan, B., & Vinodhini, J. (2018). Biological control of the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in stored grains using the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*. *Microbial Pathogenesis*, 114, 139-146.
- Marco, V. & Viñuela, E., (1994). Effects of hexaflumuron on fecundity, fertility and longevity of *Ephestia kuehniella* Zeller and *Spodoptera exigua* (Hübner). *International Symposium on Crop Protection*. 59, 457 - 463
- Martinez, A.J., D.C. Robacker & J.A. Garcia, (1997). Toxicity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* subspecies darmstadiensis to adults of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*. 90: 130–134.
- Mc Gaughey, W. H. (1978). Effects of larval age on the susceptibility of almond moths and Indian meal moths to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 71(6), 923-925.
- Medina, P., Smagghe, G., Budia, F., del Estal, P., Tirry, L., & Viñuela, E. (2002). Significance of penetration, excretion, and transovarial uptake to toxicity of

three insect growth regulators in predatory lacewing adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 51(2), 91-101.

Mendoza, G. (2011) Daños producidos por *Lobesia botrana* en los viñedos mendocinos. En: SAVE 2011, Simposio Argentino de Viticultura y Enología, 2011, Mendoza. P. 125.

Michaud J. P. & Grant A. K. (2003). Sub-lethal effects of a copper sulfate fungicide on development and reproduction in three coccinellid species. *Journal Insect Science* 3: 1-6.

Mondy, N., Charrier, B., Fermaud, M., Pracros, P., & Corio- Costet, M.F. (1998) Mutualism between a phytopathogenic fungus (*Botrytis cinerea*) and a vineyard pest (*Lobesia botrana*). Positive effects on insect development and oviposition behaviour. *Comptes Rendus de l' Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 321(8), 665-671

Moreau, J., Monceau, K. & Thiéry, D. (2016). Larval food influences temporal oviposition and egg quality traits in females of *Lobesia botrana*. *Journal of Pest Science*, 89 (2), 439-448.

Müller, C. (2018). Impacts of sublethal insecticide exposure on insects—Facts and knowledge gaps. *Basic and Applied Ecology*, 30, 1-10.

Nation J.L. (2008). Reproduction. En: Nation J.L (Ed.). *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Publisher. New York, USA. 497 - 498.

Nijhout HF. (1994). *Insect Hormones*. Princeton Univ. Press 267 pp.

Oberlander, H. (1985). The imaginal discs. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 2, 151-182.

Oberlander, H. & Silhacek, D. L. (1998). New perspectives on the mode of action of benzoylphenyl urea insecticides, pp 93-103. En: Issahaya, I and A.R. Horowitz (Eds.). *Insecticides with novel modes of action*. Springer. Berlin.

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(01), 31-43.

- Outram, I. (1967). Factors affecting the resistance of insect eggs to sulphuryl fluoride—II: The distribution of sulphuryl-35S fluoride in insect eggs after fumigation. *Journal of Stored Products Research*, 3 (4), 353-358.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6 (12), 3296-3325.
- Pedersen, A., Dedes, J., Gauthier, D., & van Frankenhuyzen, K. (1997). Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 83(3), 253-262.
- Pineda, S., Budia, F., Schneider, M. I., Gobbi, A., Viñuela, E., Valle, J. & Del Estal, P. (2004). Effects of two biorational insecticides, spinosad and methoxyfenozide, on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 97(6), 1906 - 1911.
- Pineda, S., Smaghe, G., Schneider, M. I., Del Estal, P., Viñuela, E., Martínez, A. M., & Budia, F. (2006). Toxicity and pharmacokinetics of spinosad and methoxyfenozide to *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 35 (4), 856-864.
- Pineda, S., Schneider, M. I., Smaghe, G., Martínez, A. M., Del Estal, P., Viñuela, E., & Budia, F. (2007). Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 100 (3), 773-780.
- Pineda, S., Martínez, A. M., Figueroa, J. I., Schneider, M. I., Del Estal, P., Viñuela, E., & Budia, F. (2009). Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 102 (4), 1490-1496.
- Poza Gómez, M. D. L. (2004). Maíz Bt: seguimiento de la resistencia de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) y efectos en artrópodos depredadores (Doctoral dissertation, Agronomos).

- Promdonkoy B, Ellar DJ (2000) Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Journal* 350:275–282
- Querzola, P., Manaresi, M., Regiroli, G. & Valuscek, S. (1996). Tebufenozide (MIMIC®) Larvicida con nuovo modo d'azione per la lotta specifica ai lepidotteri. *Giornale Fitopatologiche* 1, 3-8.
- Quraishi, M. S. (1970). Volatilization of DDT-14 c and lindane-14 c from treated surfaces, and metabolism of DDT-14 C by house fly pupae. *The Canadian Entomologist*, 102 (9), 1189-1195.
- Radwan, H. S., Abo-Elghar, M. R., & Ammar, I. M. A. (1978). Reproductive performance of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) treated topically with sublethal doses of an antimoultin IGR (Dimilin). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 86(1 -4)9414
- Razowski, J. (2003). Tortricidae of Europe. Volume 2 Olethreutinae: Fratrišek Slamka, Bratislava 301 pp.
- Rechcigl, J. E., & Rechcigl, N. A. (1999). Biological and biotechnological control of insect pests. CRC Press.
- Regier, J. C., Brown, J. W., Mitter, C., Baixeras, J., Cho, S., Cummings, M. P. & Zwick, A. (2012). A molecular phylogeny for the leaf-roller moths (Lepidoptera: Tortricidae) and its implications for classification and life history evolution. *PLoS One*, 7(4), 35574.
- Retnakaran, A., J. Grannett, & T. Ennis. (1985). Insect growth regulators, pp. 529 - 601. In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert [eds.], *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon, Oxford.
- Richard – Jorba, R. (2007). Crisis y transformaciones recientes en la Región Vitivinícola Argentina. Mendoza y San Juan, 1970-2005. *Revista Estudios Sociales*. ACADI Vol. 16, número 31.
- Riddiford, L. M. (1980). Insect Endocrinology: Action of Hormones at the Cellular Level. *Annual Review of Physiology*, 42(1), 511–528.
- Riddiford, L. M. (1994). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in insect physiology*, 24, 213-274.

- Rimoldi, F., Schneider, M. & Ronco, A. (2010) Efectos de insecticidas convencionales y biorracionales asociados a siembra directa de soja, *Glycine max* L. sobre pupas de *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC 12 al 14 de Mayo de 2010 Santa Fe. Argentina Resúmenes p. 36
- Rimoldi, F., Fogel, M., Schneider, M. & Ronco, A. (2012). Lethal and sublethal effects of cypermethrin and methoxyfenozide on the larvae of *Rachiplusia nu* (Guenee) (Lepidoptera: Noctuidae). *Invertebrate Development and Reproduction* 56 (3): 202-208.
- Rimoldi, F., Fogel, M. N., Schneider, M. I. & Ronco, A. E. (2015). Efectos indirectos de insecticidas convencionales y biorracionales sobre la alimentación de *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 41 (1): 41-47
- Rimoldi, F., Fogel, M. N., Ronco, A. E., & Schneider, M. I. (2017). Comparative susceptibility of two Neotropical predators, *Eriopsis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: Short and long-term effects after egg exposure. *Environmental Pollution*, 231, 1042-1050.
- Ritter L, Solomon K., Forget J., Stemeroff M. & Leary C. (1995) Persistent organic pollutants. An assessment report on: DDT, aldrin, dieldrin, endrin, chlordane, heptachlor, hexachlorobenzene, mirex, toxaphene, polychlorinated biphenyls, dioxins and furans. International Program on Chemical Safety.
- Roditakis, N. E. (1986). Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* on the grape berry moth *Lobesia botrana* Den. & Schiff.(Lepidoptera, Tortricidae) under field and laboratory conditions in Crete. *Entomologia Hellenica*, 4, 31-35.
- Sáenz-De-Cabezón, F.J., Perez-Moreno, I., Zalom, F.G. & Marco, V. (2006). Effects of lufenuron on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) egg, larval, and adult stages. *Journal of Economic Entomology* 99, 427 - 431
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). (2010). Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura. [http://www.sag.gob.cl/noticias/sag-lanza-estrategia-de-control-para-](http://www.sag.gob.cl/noticias/sag-lanza-estrategia-de-control-para)

[lobesia-botrana-en-huertos-de-vid-para-la-temporada-2010-2011](#) [acceso Marzo 2016].

- Salama, H. S. & Sharaby, A. F. (1988). Effects of exposure to sublethal levels of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) on the development of the greasy cutworm *Agrotis ypsilon* (Hufn.). *Journal of Applied Entomology*, 106 (1-5), 396–401.
- Salem, H., Smagghe, G., & Degheele, D. (1997). Effects of tebufenozide on oocyte growth in *Plodia interpunctella*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent (Belgium)*. 62: 9 - 13.
- Sansinenea, E. (2012). *Bacillus thuringiensis biotechnology* (pp. 3-18). Dordrecht; Heidelberg; London; New York, NY: Springer.
- Savini, V., & Fazii, P. (2016). *Bacillus thuringiensis* Insecticide Properties. In *The Diverse Faces of Bacillus cereus* (pp. 139-155).
- Schneider, M. I. (2002). Optimización del empleo en lucha biológica de *H. didymator* (Thunberg) y evaluación ecotoxicológica de modernos plaguicidas en laboratorio. PhD Tesis. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.
- Schneider, M., Smagghe, G. & Viñuela E. (2003 a). Susceptibility of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults to several IGRs pesticides and spinosad by different exposure methods. *IOBC/wprs Bull.* 26 (5):111-122.
- Schneider, M., Smagghe, G., Gobbi A., & Viñuela, E. (2003 b). Toxicity and Pharmacokinetics of Seven Novel Insecticides on Pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a Parasitoid of Early Larval Instars of Lepidopteran Pests. *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1054-1065.
- Schneider, M. I., Smagghe, G. & Viñuela, E. (2004 a). Comparative effects of several insect growth regulators and spinosad on the different developmental stages of the endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Thunberg) *IOBC/wprs Bulletin.* 27 (6): 13-20.
- Schneider, M. I., Smagghe, G., Pineda, S., & Viñuela, E. (2004 b). Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and

- absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control*, 31(2), 189-198
- Schneider, M., Smaghe, G., Pineda, S., & Viñuela, E. (2008). The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae): pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology*, 17(3), 181.
- Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62 (3), 775-806.
- Sedaratian A., Fathipour Y., Talaei-Hassanloui R. & Jurat-Fuentes J. L. (2013) Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. *Applied and Environmental Microbiology* 137:540–549
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2010.a El Senasa declaró la emergencia fitosanitaria por la detección de la plaga *Lobesia botrana*. <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/el-senasa-declaro-la-emergencia-fitosanitaria-por-la-deteccion-de-la-plaga-lobesia-botrana> [Acceso: febrero 2017]
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2016 <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/san-juan-tercer-alerta-para-el-control-de-lobesia-botrana> [Acceso: febrero 2017]
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2010 b <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/lobesia-botrana-plan-de-contingencia-en-san-juan> [Acceso: febrero 2017]
- SENASA Detección de ejemplares de la plaga *Lobesia botrana* en Entre Ríos. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/deteccion-de-ejemplares-de-la-plaga-lobesia-botrana-en-entre-rios> [Acceso: abril 2018]
- SENASA Resolución 122/2010. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/normativas/resolucion-729-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria> [Acceso: Octubre 2016]
- Seth R. K., Kaur J .J., Rao D. K. & Reynolds S. E. (2004) Effects of larval exposure to sublethal concentrations of the ecdysteroid agonists RH-5849 and tebufenozide (RH-5992) on male reproductive physiology in *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology* 50: 505-517

- Sláma, K., Romaňuk, M., & Štorm, F. (1974). *Insects Hormones and Bioanalgesics*. Springer-Verlag, Wien, New York.
- Smagghe, G., & Degheele D. (1992 a). Effects of RH-5849, the first nonsteroidal ecdysteroid agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 21: 119 -128.
- Smagghe, G., & Degheele D. (1992b). Effect of the nonsteroidal ecdysteroid agonist RH- 5849 on reproduction of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica* (Gembloux) 48: 23 - 29.
- Smagghe, G., & Degheele, D. (1994 a). Effect of the ecdysteroid agonists RH-5849 and RH- 5992, alone and in combination with a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen, on larvae of *Spodoptera exigua*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 72: 115 - 123.
- Smagghe, G., & Degheele D. (1994 b). Action of a novel nonsteroidal ecdysteroidal mimic tebufenozide (RH-5992) on insects of different orders. *Pesticide Science* 42: 85 -92.
- Smagghe G., Viñuela, E., Budia, F. & Degheele D. (1997) Effects of the non-steroidal ecdysteroid mimic tebufenozide on tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae). An ultrastructural analysis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 35:179-190.
- Smagghe, G., Bylemans, D., Medina, P., Budia, F., Avilla, J., & Viñuela, E. (2004). Tebufenozide distorted codling moth larval growth and reproduction, and controlled field populations. *Annals of Applied Biology*, 145(3), 291–298.
- Smith, E. H. & Salkeld, E. H. (1966). The use and action of ovicides. *Annual Review of Entomology*, 11 (1), 331-368.
- Sohrabi, F., Shishehbor, P., Saber, M., Mosaddegh, M. S. (2012). Lethal and sublethal effects of imidacloprid and buprofezin on the whitefly parasitoid *Encarsia inaron* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Crop Protection*. 32, 83 - 89.

- Sohrabi, F., Shishehbor, P., Saber, M., Mosaddegh, M. S. (2013). Lethal and sublethal effects of imidacloprid and buprofezin on the sweet potato whitefly parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Crop Protection* 45, 98 -103.
- Soltani, N., Delbecque, J. P. & Delachambre, J. (1983) Penetration and insecticidal activity of diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae. *Pesticide Science* 14:615-622.
- Soltani N & Soltani-Mazouni N. (1992). Diflubenzuron and oogenesis in the codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Pesticide Science* 34: 257-261.
- Song, Y., Dong, J., & Sun, H. (2013). Chlorantraniliprole at sublethal concentrations may reduce the population growth of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(4), 446-451.
- Spiro T. G. & Stigliani W. M. (2004). Química medioambiental. Segunda edición. Pearson. Educación S.A. (editorial). Madrid, España. 619 pp.
- Sternburg, J. & Kearns, C. W. (1952). Metabolic Fate of DDT when applied to certain naturally tolerant Insects. *Journal of Economic Entomology*, 45 (3).
- Strafile, D. & Becerra, V. (2001). Sanidad del Viñedo Argentino. IDIA XXI Buenos Aires-Argentina. 1 (1), 53-56.
- Sun, X. & Barrett, B. A. (1999). Fecundity and fertility changes in adult codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to surfaces treated with tebufenozide and methoxyfenozide. *Journal of Economic Entomology*, 92 (5), 1039-1044.
- Sun, X., Barrett, B. A., Biddinger, D. J. (2000). Fecundity and fertility reductions in adult leafrollers exposed to surfaces treated with the ecdysteroid agonists tebufenozide and methoxyfenozide. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 94: 75-83.
- Taïbi, T., Smagghe, G., Amrani, L. & Soltani-Mazouni, N. (2003) Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135C:257-267.
- Takesue, S., Keino, H., & Onitake, K. (1980). Blastoderm formation in the silkworm egg *Bombyx mori* L. *Development*, 60 (1), 117-124.

- Terriere, L. C. (1984). Induction of Detoxication Enzymes in Insects. *Annual Review of Entomology*, 29 (1), 71–88.
- Thompson, H.M. (2003). Behavioral effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12, 317 - 330
- Tojo, K., & Machida, R. (1998). Early embryonic development of the mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta: Ephemeroptera, Ephemeridae). *Journal of morphology*, 238 (3), 327-335.
- Torres Vila, L.M. (1995). Un aniversario aciago: dos siglos de historia como plaga de la polilla del racimo de la vid, *Lobesia botrana* Den. & Schiff. Sociedad Española de Entomología Aplicada <http://www.seea.es/index.php/divulgacion/polilla-del-racimo-de-la-vid> [Acceso: febrero de 2017]
- Trisyono, A. & Chippendale, M. G. (1997). Effect of the nonsteroidal ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 90(6), 1486 - 1492.
- Trisyono, A. & Michael Chippendale, G. (1998). Effect of the ecdysone agonists, RH - 2485 and tebufenozide, on the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Pesticide Science* 53(2), 177-185.
- Trostanetsky, A., & Trostanetsky, M. (2008). Note: Transovarial activity of the chitin synthesis inhibitor novaluron on egg hatch and subsequent development of larvae of *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica*, 36 (1), 38-41.
- Tunaz, H. & Uygun, N. (2004). Insect growth regulators for insect pest control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28(6), 377-387.
- Tunc, I., Berger, B. M., Eler, F., & Dağlı, F. (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 36 (2), 161-168.
- Van der Laan PA (1967) Insect pathology and microbial control. In: van der Laan PA (ed) *Proc Intern Colloquial on Insect Path & Microbial Control* North-Holland Publishers Co., Amsterdam, pp 252–286

- Vittozzi, L., Fabrizi, L., Di Consiglio, E., & Testai, E. (2001). Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environment International*, 26 (3), 125-129.
- Wang, R.; Zhang, W., Che, W.;, Qu, C., Li F., Desneux, N. & Luo, C. (2017) Lethal and sublethal effects of cyantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) MED. *Crop Protection* 91, 108-113
- Ware, G. W., & Whitacre, D. M. (2004). An introduction to insecticides. The Pesticide Book. Meister Pub. Willoughby, Ohio.
- Williams, C. M. (1956). The juvenile hormone of insects. *Nature*, 178: 212-213.
- Williams, C. M. (1967). Third generation pesticides. *Annals of Science* 217: 13-17.
- Wing, K.D.; Slaweki R. & G.R. Carlson, (1988). A nonsteroidal ecdysone agonist effects on larval Lepidoptera. *Science* 241: 470-47
- Wise J. C., Kim K., Hoffmann E., Vandervoort C., Gökçe A. & Whalon M. E. (2007). Novel life stage targets against plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst), in apple integrated pest management. *Pest Management Science* 63: 737-742
- Xu X. L., Xu D. J., Xu G. C. & Gu Z. Y. (2010). Sublethal effects of chlorantraniliprole on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* 1:139–140
- Xu, C., Zhang, Z., Cui, K., Zhao, Y., Han, J., Liu, F., & Mu, W. (2016). Effects of Sublethal Concentrations of Cyantraniliprole on the Development, Fecundity and Nutritional Physiology of the Black Cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 11(6), 156555.
- Yılmaz, S., Ayvaz, A., Akbulut, M., Azizoglu, U. & Karabörklü, S. (2012). A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. *Journal of stored products research*, 51, 33-40.
- Zamora, M. C., Martínez, A. M., Nieto, M. S., Schneider, M. I., Figueroa, J. I., & Pineda, S. (2008). Actividad de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 351-357.

- Zamy, C., Mazellier P. & Legube B., (2004). Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. *Water Research*. 38(9): p. 2305-2314.
- Zarate, N., Díaz, O., Martínez, A. M., Figueroa, J. I., Schneider, M. I., Smaghe, G., Viñuela E. Budia, E. & Pineda, S. (2011). Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide on the development, survival and reproduction of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 40 (1), 129-137
- Zhang Y., Ma Y., Wan P. J., Mu L. L. & Li G. Q. (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. *Journal of Economic Entomology* 106:614–621
- Zhang, R. M., Dong, J. F., Chen, J. H., Ji, Q. E., & Cui, J. J. (2013). The sublethal effects of chlorantraniliprole on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Integrative Agriculture*, 12 (3), 457-466.