



Universitat de Lleida
Registre General

21 MAIG 1998

E: 1996

S:

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANÁLOGO DE LA ECDISONA
TEBUFENOCIDA EN *CYDIA POMONELLA*
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)**

SEBASTIÀ PONS MIQUEL

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANÁLOGO DE LA ECDISONA
TEBUFENOCIDA EN *CYDIA POMONELLA*
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)**

SEBASTIÀ PONS MIQUEL

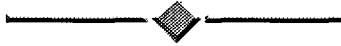
(043) 1998 PON

15201-16791 E

Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal



**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANÁLOGO DE LA ECDISONA
TEBUFENOCIDA EN *CYDIA POMONELLA*
(LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)**

Memoria para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

por

SEBASTIÀ PONS MIQUEL



VºBº Director:

Jesús Avilla Hernández

Dr. Ingeniero Agrónomo

Universitat de Lleida

Mayo 1998

1805-52360

0147-42260

INDICE

Agradecimientos	5
Resumen general	7
CAPÍTULO I	
Introducción general	16
Antecedentes	18
1. <i>Cydia pomonella</i> L.	18
1.1. Sistemática	18
1.2. Distribución geográfica y hábitat	18
1.3. Descripción del insecto	19
1.4. Biología de <i>C. pomonella</i>	21
1.4.1. Emergencia, vuelo, copulación y oviposición	21
1.4.2. Desarrollo embrionario, eclosión, desarrollo larvario y pupal	24
1.4.3. Ciclo biológico y diapausa	26
1.4.4. Depredación y enemigos naturales	26
2. Regulación hormonal: Ecdisona	27
2.1. Muda larvaria y metamorfosis	27
2.2. Reproducción y diapausa	28
3. Control de <i>C. pomonella</i>	28
3.1. Control integrado de plagas en manzano y peral	29
3.2. Control químico: Utilización de insecticidas reguladores del crecimiento	30
3.3. Control químico: Prevención de resistencias	32
4. Tebufenocida	34
4.1. Insecticidas antecesores a tebufenocida	34
4.2. Características, espectro y modo de acción de tebufenocida	35
4.3. Tebufenocida en el control de <i>C. pomonella</i>	37
4.4. Posteriores a tebufenocida	37

Objetivo	38
-----------------	----

CAPÍTULO II

Direct Toxicity of the Ecdysone Agonist Tebufenozide to Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae)	39
--	----

CAPÍTULO III

Larvicidal activity of the IGR's Tebufenozide, RH 2485, Diflubenzuron and Fenoxicarb on neonate larvae of <i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	60
--	----

CAPÍTULO IV

Sublethal Effects of Tebufenozide, a Molt-Inducing Insecticide, to the different stages of <i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	71
---	----

CAPÍTULO V

Efecto del momento de aplicación, utilización de coadyuvantes y volumen de tratamiento en la efectividad de tebufenocida para el control de <i>Cydia pomonella</i> (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)	85
---	----

CAPÍTULO VI

Discusión general	112
Conclusiones	119
Referencias bibliográficas	121

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a la ayuda y colaboración de diversas instituciones y personas. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos:

En primer lugar quiero mencionar a dos personas que me han apoyado y transmitido su confianza durante todos estos años, Jesús Avilla y Helmut Riedl. Ellos han demostrado ser unos magníficos profesionales, pero sobretodo unas excelentes personas y amigos.

A la Universitat de Lleida, por la beca ACID que me concedió el año 1993 y que me permitió trabajar junto con Helmut en los Estados Unidos.

A la CIRIT por la concesión de una beca en el año 1994 y que me permitió continuar con la investigación y trabajo de esta tesis.

A Rohm and Haas Co., no sólo por su ayuda económica, sin la cual no hubiera podido finalizar este trabajo, sino por su apoyo constante y su confianza en mí, especialmente por parte de Stephen Connor.

A la Oregon State University, y concretamente a la Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center, donde pude disfrutar de una cordialidad y apoyo inmejorables. Son muchas las personas de esta institución a las que estoy agradecido, pero quiero hacer especial mención a De, Diane y Paul.

A Ramón Canela, que fue quien me enredó en todo esto y me animó a pedir la beca ACID de la Universidad de Lleida.

A todos los compañeros del Laboratorio de Entomología del IRTA-UdL, con los que inicié mi interés por la Entomología y el Control de Plagas.

A Laura, quien ha sabido estar siempre entusiasta y animándome en este trabajo, aún cuando ésto parecía la *Historia Interminable*. A toda mi familia por su apoyo y ánimo.

Este trabajo ha estado parcialmente financiado por:

Universitat de Lleida. Beca ACID, 1993

CIRIT. Beca de recerca a l'estranger, 1994

Rohm and Haas Co.

Oregon State University

RESUMEN

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANÁLOGO DE LA ECDISONA TEBUFENOCIDA EN *CYDIA POMONELLA* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)

Sebastià Pons Miquel

Cydia pomonella (L.) es una plaga clave en el cultivo de frutales en gran parte del mundo, principalmente en manzanos. El manejo de esta plaga ha sido una constante en aquellas zonas donde ha representado un problema, ya sea por la severidad de los daños causados o por la necesidad de adoptar estrategias de lucha más racionales que el uso de insecticidas de amplio espectro. Con la implementación de programas de control integrado se han descartado un gran número de insecticidas por diversos motivos, como por ejemplo su toxicidad, ya sea a mamíferos o a otros organismos que no son la plaga en sí. Esto ha permitido la entrada en el mercado de otros insecticidas o técnicas de control que se caracterizan por perfiles eco-toxicológicos más favorables pero también se caracterizan por ser productos que requieren de un conocimiento técnico más exhaustivo para poder ser utilizados con éxito. Generalmente es necesario conocer sobre qué estados actúa el insecticida y si posee cierta acción y/o produce efectos subletales sobre los otros estados del insecto que puedan contribuir de forma significativa en el control de la plaga. Uno de los insecticidas de reciente implementación en el control de carpocapsa ha sido tebufenocida, análogo de la hormona ecdisona, descubierto por Rohm and Haas Company (Philadelphia, PA) y presentado como larvicida específico contra lepidópteros.

La finalidad de esta tesis ha sido investigar en algunos parámetros de la actividad biológica de tebufenocida, análogo de la hormona ecdisona, sobre *C. pomonella*. Para dicho estudio se profundizó en el conocimiento de los efectos letales de tebufenocida en los diferentes estadios de *C. pomonella*; se estudió una metodología para la evaluación de la susceptibilidad de una determinada población de carpocapsa a tebufenocida; se comparó la actividad larvicida de tebufenocida con otros reguladores del crecimiento de insectos; se estudiaron los efectos subletales de tebufenocida en los diferentes estadios de *C. pomonella*; se determinó el momento de aplicación en campo y el efecto de la

utilización de coadyuvantes y volumen de tratamiento en la efectividad de tebufenocida en el control de *C. pomonella*.

En estudios sobre la actividad ovicida de tebufenocida en carpocapsa, se ha obtenido que la actividad residual de tebufenocida en huevos varía considerablemente dependiendo del substrato en que los huevos han sido puestos. En aplicaciones en laboratorio, la CL_{50} fue de 4,35 ppm en hojas de manzano tratadas con distintas concentraciones de tebufenocida. No hubo diferencias entre el control y los tratamientos (excepto algunas dosis muy altas) en la mortalidad de los huevos cuando el substrato utilizado fueron manzanas o papel encerado. Tebufenocida fue unas 30 veces más activo cuando los huevos fueron puestos sobre el residuo en hojas, que cuando fueron tratados tópicamente. Los huevos puestos sobre manzanas y tratados tópicamente no fueron afectados, y sólo fueron afectados ligeramente los huevos colocados sobre papel encerado, aunque dependiendo de la edad en que eran tratados. La mortalidad conseguida en estos tratamientos osciló entre el 40 y el 60%, sin que se vieran afectados los huevos que se encontraban cerca de la eclosión. Por lo tanto, se demuestra la actividad ovicida de tebufenocida, aunque ésta se ve condicionada por factores como pueden ser el substrato de puesta y si las aplicaciones son tópicas o residuales. Aunque no se han investigado las causas que producen estas diferencias en toxicidad entre tipo de aplicación y sobretodo entre substratos, se ha especulado en que son las propias características fisiológicas de la hoja las que facilitan la penetración del insecticida a través del corion al interior del huevo, y así conseguir afectar al embrión.

Tebufenocida fue muy activo cuando las larvas neonatas de carpocapsa fueron alimentadas con manzanas tratadas con este insecticida, donde se obtuvo una LC_{50} de 16,08 ppm. Se obtuvo un ligero daño en la superficie de las manzanas como consecuencia de la alimentación de las larvas, incluso en las concentraciones más altas evaluadas. Esto indica que el tiempo transcurrido entre la ingestión del insecticida y la parada de la alimentación de las larvas, como efecto de tebufenocida, es lo suficiente como para que se produzcan ligeros daños. Cuando se utilizó dieta artificial se obtuvo una LC_{50} de 0,22 ppm para larvas neonatas, 0,40; 0,29 y 1,47 ppm para segundo, tercer y cuarto estadio larvario respectivamente, siendo iguales las rectas Probit en el segundo y tercer estadio larvario.

En cuanto a la actividad por contacto sobre larvas neonatas de carpocapsa, cuando las larvas fueron expuestas durante una hora sobre hojas de manzano tratadas, la CL_{50} fue de 499,9 ppm, mucho menor que el valor obtenido cuando actuó por ingestión. También se observaron diferencias en la toxicidad de tebufenocida por contacto sobre neonatas dependiendo del sustrato. Las CL_{50} fueron similares cuando se expusieron las larvas sobre hojas tratadas durante 1 hora (499,9 ppm), que sobre plástico durante 4 horas (348,7 ppm). Estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en la humedad, textura, etc. entre los dos sustratos, que pueden facilitar que la larva esté expuesta a mayores cantidades del insecticida en el caso de la hoja, o también debidas a una ingestión del insecticida cuando la larva realiza mordiscos exploratorios en la hoja.

En aplicaciones tópicas de tebufenocida, a una concentración de 400 ppm, sobre adultos de carpocapsa no se observó ningún efecto en la longevidad de las mariposas que fue entre 6 y 7 días.

Tebufenocida (RH 5992) fue menos activo que el también análogo de la hormona ecdisona RH 2485 cuando larvas neonatas fueron alimentadas con manzanas tratadas, siendo la LC_{50} de éste último compuesto unas cuatro veces menor que la de tebufenocida. Fenoxicarb no tuvo ningún efecto larvicida cuando larvas neonatas se alimentaron con manzanas tratadas con este insecticida a una dosis de 200 ppm. No se comprobó si dichas larvas podrían desarrollarse y convertirse posteriormente en adultos normales. Disflubenzurón tampoco tuvo ningún efecto larvicida cuando larvas neonatas se alimentaron con manzanas tratadas con disflubenzurón a una dosis de 200 ppm. No se observó nada anormal cuando se realizó la evaluación de la mortalidad larvaria, pero en este caso tampoco se comprobó si las larvas continuarían desarrollándose normalmente.

Se estudiaron los efectos subletales de tebufenocida sobre huevos, por lo que se evaluó la duración del desarrollo embrionario de los huevos que sobrevivieron a aplicaciones tópicas de tebufenocida. Se obtuvo un retraso en el desarrollo embrionario que se produjo cuando los tratamientos se realizaron sobre huevos recién puestos (estado blanco) y cuando estaban aproximadamente en la mitad de su desarrollo (anillo rojo),

pero no se observó cuando los huevos tratados estaban cerca de su eclosión. Esto indica que tebufenocida afecta en cierta forma el desarrollo embrionario, aunque a partir de cierto punto del desarrollo tebufenocida ya no produce ningún efecto en el embrión. No se obtuvieron diferencias entre las distintas dosis de tebufenocida aplicadas, aunque sí entre éstas y el control.

Se encontró que tebufenocida afecta a la fecundidad y viabilidad de los huevos puestos cuando se aplica tópicamente sobre mariposas de carpocapsa. La fecundidad de hembras de carpocapsa fue menor cuando éstas fueron tratadas con tebufenocida a 400 ppm; la fertilidad también fue menor cuando se trataron tanto machos como hembras a la misma dosis con tebufenocida. También la fecundidad y fertilidad fueron menores que el testigo cuando se trataron mariposas de carpocapsa a dosis iguales o inferiores a 200 ppm, aunque en este caso las diferencias no eran estadísticamente significativas. Tebufenocida afectó a la fecundidad y fertilidad de adultos de *C. pomonella* cuando éstos fueron expuestos durante 24 horas a follaje tratado en campo con tebufenocida a una dosis de 330 g ma/ha, donde los porcentajes de reducción obtenidos en el tratamiento con tebufenocida fueron del 66,8% en la fecundidad y del 73,6% en la fertilidad respecto al testigo.

Aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, cuando se suministró tebufocida (0,1 ppm) en dieta a larvas mantenidas en condiciones diapausantes durante 50 días el porcentaje de larvas en diapausa fue del 57%, mientras que en el control fue del 99%. Tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la rotura de la diapausa cuando se cambiaron las condiciones a no diapausantes.

En tratamientos en campo contra la primera generación de carpocapsa, no se obtuvieron diferencias significativas entre las aplicaciones de tebufenocida aplicado como ovicida o como larvicida. La carencia de diferencias entre los distintos momentos de aplicación puede indicar que en aplicaciones tempranas se obtiene el beneficio del control ovicida de tebufenocida, y en aplicaciones tardías la ventaja del efecto larvicida. Cuando tebufenocida fue aplicado como ovicida (50 grados día) se obtuvo un 5% de

penetraciones profundas en fruto. Cuando fue aplicado como larvicida (139 grados día), se obtuvo un 8% de entradas. Sin embargo cuando la aplicación fue entre estos dos periodos, el porcentaje de entradas fue del 21%. Esto puede ser debido a que en esta aplicación, tebufenocida actuó tópicamente sobre un porcentaje considerable de huevos, y por lo tanto el tratamiento ovicida no fue eficaz, y demasiado pronto para actuar como larvicida.

Se obtuvieron diferencias en el porcentaje de mortalidad larvaria entre volúmenes de caldo utilizado en campo, siendo del 64,4% cuando se utilizaron 935 l/ha y del 81,1% cuando se utilizaron 3.741 l/ha. Esto indica la importancia de alcanzar un buen nivel de cobertura en aplicaciones con tebufenocida para obtener un nivel de control alto. En las aplicaciones de tebufenocida en campo, prácticamente no disminuyó el porcentaje de control larvario de este insecticida hasta 24 días después de su aplicación. Por lo tanto, tebufenocida es un insecticida que dispone de una persistencia considerable, mayor que un insecticida como por ejemplo metilazinfos. De los cuadyuvantes ensayados, parece ser que Silwet-77 y Latron AG-98 incrementan la persistencia de tebufenocida.

Palabras clave: *Cydia pomonella*, Tebufenocida, ecdisona, IGR, diflubenzurón, fenoxicarb, manzano, control de plagas.

SUMMARY

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE ECDYSONE AGONIST TEBUFENOZIDE ON *CYDIA POMONELLA* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE)

Sebastià Pons Miquel

The codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) is a worldwide pest of pome fruits and walnuts. The implementation of integrated control programs on agriculture has brought the development of new insecticides to control this pest. Insect growth regulators (IGRs) were among the more promising new insecticides for codling moth control which came out of this development effort. They combine effectiveness against key pests with selectivity to predatory mites and other natural enemies. In contrast to the neurotoxic conventional OP insecticides, IGRs offered new modes of action by interfering with hormonal regulation of insect growth, although they usually need more detailed data about their biological activity against each pest. Within this group there are the molting accelerating compounds (M.A.C.), insecticides that imitate the natural insect molting hormone, 20-hydroxiecdysone. Tebufenozide is an insecticide which belongs to this new group. The ecdysone agonists such as tebufenozide or RH-5849 are a more recent discovery and represent a new pesticide chemistry which was pioneered by Rohm & Haas Company (Philadelphia, PA). These compounds are primarily active against lepidopterous pests and affected larvae undergo a lethal larval molt. On tree fruits the primary targets have been codling moth and leafrollers.

The aim of this study was a) to develop information on the stage susceptibility of codling moth to the ecdysone agonist tebufenozide, particularly on those life stages which have opportunity for topical and residual exposure to tebufenozide in the field: eggs, neonate larvae, and adults; b) to evaluate a field-implementable larval bioassay for resistance testing and establish reference values for tebufenozide susceptibility in codling moth larvae; c) to compare the larvicidal activity of tebufenozide with other IGR's; c) to evaluate any sublethal effect that may contribute to the overall control of the pest; d) to determine all the parameters which may contribute to the success of the chemical in field applications, such as timing, use of surfactants or volume effect.

In the studies about the ovicidal activity, the residual toxicity of tebufenozide to codling moth eggs varied considerably with the substrate on which eggs were laid. On sprayed leaves the LC_{50} for eggs was 4.35 ppm. By comparison, on sprayed fruit egg mortality was very low and was not different from the untreated control except for the two highest concentrations. Tebufenozide was about 30 times more toxic when codling moth eggs were laid on top of sprayed leaves than when they were treated topically. As with the residual treatments, a substrate effect was also noted with the topical treatment. Eggs on leaves showed a clear dose-response to topical tebufenozide treatments while eggs on the apple surface were not affected. We did not investigate why tebufenozide was more toxic on leaves than on fruit and can only speculate on the underlying mechanisms involved. Apple leaves and fruit differ greatly in terms of their surface characteristics, morphology, and microclimate of the boundary layer (e.g., humidity). The age of eggs had little effect on susceptibility to topically applied tebufenozide as shown in tests with eggs on waxed paper except when they were close to the point of hatching. Eggs in the 'white' stage of development were as susceptible as eggs in the 'red ring' stage. In both cases tebufenozide caused mortality ranging from 40 to 60% with no discernible increase in mortality from the lowest to the highest concentration tested. Eggs in the 'black head' stage close to hatching showed no effect from topical tebufenozide treatments.

Tebufenozide was highly active against codling moth neonates when it was ingested during fruit entry as indicated by the low LC_{50} of 16.08 ppm. Some feeding damage occurred even at the highest concentrations suggesting that tebufenozide's effect on larvae is not immediate after it is ingested. The LC_{50} for neonates feeding on artificial diet was 0.22 ppm, and 0.40; 0.29 and 1.47 ppm for the second, third and fourth instar respectively. The dose-mortality response of neonates was significantly different from older larvae as indicated by a steeper slope and lower LC values. Second and third instars responded in a similar way to tebufenozide and there was no difference in the slope and intercept of the dose-response lines. Of the different instars tested, fourth instar was the least susceptible to tebufenozide as indicated by the higher LC values.

Exposing neonates to residue on natural and artificial substrates had notable effects on larval survival. Neonates moving around for 1 h on apple leaves treated with different

concentrations of tebufenozide were affected by this exposure . However, the LC_{50} for a 1 h contact exposure on treated leaves was considerably lower than the oral LC_{50} on treated apples (499.9 vs. 16.08 ppm, respectively). Contact exposure to residue in plastic petri dishes did not affect subsequent larval survival as much as exposure on treated leaves. For instance, a 4 h exposure in the plastic dishes had roughly the same effect as a 1 h exposure on treated leaves as indicated by the respective LC_{50} values (499.9 vs. 348.7 ppm). Possible reasons why tebufenozide exposure on leaves produced higher larval mortality than exposure in the petri dishes are that neonates do more exploratory feeding on a natural substrate than on a plastic surface. Also, the deposit structure of tebufenozide and the microclimatic conditions on a leaf surface may be such that tebufenozide is more easily picked up by larvae on a leaf than on a plastic surface.

Tebufenozide had no direct toxicity to moths and did not decrease their longevity. Male as well female moths sprayed with 400 ppm of tebufenozide lived as long as moths sprayed with distilled water.

Tebufenozide (RH 5992) and RH 2485, another ecdysone agonist, were highly active against *C. pomonella* neonate larvae when the chemical was ingested while entering the fruit, and the LC_{50} of RH 2485 was four times lower than tebufenozide. Fenoxycarb and diflubenzuron at 200 ppm did not show any mortality against the first instar of *C. pomonella* larvae. It was not investigate if the larvae would complete the development normally.

Eggs laid on waxed paper treated topical with tebufenozide had a delay in their development. This delay was when the eggs were on white and red ring stage, but not when the eggs were in black head. There were no differences between the tebufenozide rates in the development length.

There were statistical differences in the number of laid eggs and their viability when moths were treated topical with tebufenozide at 400 ppm. When tebufenozide was applied at lower rates there were not statistical differences, although tebufenozide reduced egg laying in a dose dependent manner. There was a reduction in the fecundity

and fertility on adults of *C. pomonella* exposed to foliage treated with tebufenozide. The average number of eggs laid and hatched per female was significantly different from the untreated, and the percentage of reduction was 66.8% in eggs laid and 73.6% in eggs hatched. The percentage of fertility for the untreated moths was 70% and it was 55.8% when the moths were exposed to the insecticide residue.

There were no statistical differences on the percentage of diapause when the larvae was held for 50 days under diapause conditions and it was fed with diet containing different rates of tebufenozide, although it was observed a reduction of the percentage when the dose of tebufenozide was increased. When the tebufenozide rate was 0.1 ppm the total larval mortality was close to 82% and the diapause was 57%, while in the control was 99% of the larvae on diapause. When the diapause period was broken with a non diapausing photoperiod there were no differences between rates.

When tebufenozide was applied against the first generation of codling moth, there were not statistical differences between an ovicidal timing (50 degree days) and a larvicidal timing (139 degree days). When it was applied as ovicidal there was 5% of fruit entries, and when applied with a larvicidal timing there was 8% of entries. But when the treatment was done between this two timings there was 21% of fruit entries.

There were differences between the larval mortality between spray volumes in field insecticide applications. The average control was 64.4% when 935 l/ha and 81.1% when the volume was 3,741 l/ha. This indicates that tebufenozide needs a good coverage to achieve an acceptable control. In field treatments, the good larval control was maintained until 24 days. The surfactants Silwet-77 and Latron AG-98 give the longest persistence.

Key words: *Cydia pomonella*, Tebufenozide, ecdysona, IGR, diflubenzuron, fenoxicarb, apple, pest control.

Capítulo I

Introducción general

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las superficies de manzanos y perales en España son alrededor de unas 50.000 ha y 40.000 ha respectivamente, de las que aproximadamente el 30% de manzanos y el 40% de perales se encuentran en la provincia de Lleida. En la Comunidad Europea, la superficie de manzanos y perales es de unas 450.000 ha, y en Estados Unidos de unas 215.000 ha. Considerando que tanto en Europa como en Estados Unidos *Cydia pomonella* (L.) es una plaga clave en los cultivos de fruta de pepita se hace patente el interés en la investigación de nuevas técnicas o insecticidas contra esta plaga.

El Control Integrado de Plagas (CIP) ha sido especialmente importante en frutales de pepita, y fundamentalmente en manzano. Desde su inicio, los programas de control integrado han ido introduciendo términos como el de modelización de la fenología de los insectos, seguimiento y muestreo de plagas, determinación de umbrales de tolerancia, fauna auxiliar, manejo de resistencias, etc. Actualmente existen diversos reglamentos de producción integrada dependiendo de los cultivos, localidades u organismos que las regulen, donde además del control de plagas se abarcan factores que afectan a la producción, como fertilización, riego, recolección, etc. En manzano, debido a la dificultad del control de determinadas plagas como por ejemplo *C. pomonella*, la aparición de resistencias, o la proliferación de otras plagas como por ejemplo *Panonychus ulmi* Koch, se ha impulsado el desarrollo de dichos programas quizás de una forma más rápida que en otros cultivos.

La industria química ha asumido su parte de responsabilidad y su función en la filosofía de la producción integrada, quizás también condicionada por la aparición de resistencia a diversos productos químicos. Esta determinación se ha visto reflejada en un cambio de actitud de la industria respecto a la utilización de sus productos químicos ya existentes en el mercado y al desarrollo de nuevos. De esta forma, en los últimos años han aparecido en el mercado un amplio número de insecticidas que en líneas generales suelen disfrutar de un dossier eco-toxicológico más favorable, como pueden ser los insecticidas que en sentido amplio se enmarcan como reguladores del crecimiento de los insectos (RCI ó IGR). Dentro de este grupo se incluyen los análogos de la hormona de la muda (MAC), grupo en el que se encuentra el tebufenocida.

ANTECEDENTES

1. *Cydia pomonella* (L).

Este insecto constituye una de las plagas más importantes en los frutales de pepita y nogales en gran parte del mundo. Su interés ha generado un gran número de estudios, centrados en una gran diversidad de temas como su fenología, biología, morfología y técnicas de control.

1.1. Sistemática.

Según Bonnemaïson (1964) la posición sistemática de *C. pomonella* es la siguiente:

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Suborden: Heteroneura

Superfamilia: Tortricoidea

Familia: Tortricidae

Subfamilia: Olethreutinae

Género: *Cydia*

Especie: *Cydia pomonella* (Linnaeus 1758)

Son sinónimos de esta plaga, *Carpocapsa pomonella* L., y *Laspeyresia pomonella* L. Los nombres populares de este tortricido son carpocapsa, gusano de la pera y la manzana, palomilla de la manzana, barreno de manzanas y peras, entre otras combinaciones parecidas. El nombre común en inglés es "apple worm" (Greiff 1985), aunque el término más extendido es el de "codling moth" acuñado por Wilkes en 1747 (Barnes 1991).

1.2. Distribución geográfica y hábitat.

Segun Bovey (1966), *C. pomonella* es originaria de la región eurosiberiana y su zona de repartición actual es muy amplia por todo el mundo. En Japón y Corea no se ha introducido aún, constituyendo prácticamente la única excepción de países de climatología templada exentos de esta plaga. En Estados Unidos se cree que fue introducida hace ya más de 200 años (Beers *et al.* 1993). El área de distribución de la carpocapsa se centra en aquel territorio donde se acumule en verano una cantidad

mínima de unos 600 grados día, tomando como temperatura base los 10 °C, valor que equivale aproximadamente a la cantidad de grados día necesarios para el desarrollo completo de una generación. El número de generaciones varía entre localidades, debido a las condiciones climáticas, y dentro de una zona también puede variar dependiendo de la orografía. Por ejemplo, en países nórdicos se ha señalado una sola generación anual, pero en Palestina hasta cuatro y cinco generaciones (Tadic 1963). La humedad relativa es un factor poco importante en la vida del insecto, ya que las larvas se desarrollan en el interior de los frutos, y los huevos y pupas están protegidos ante situaciones de sequedad (Shel'deshova 1967).

C. pomonella constituye una plaga de pomáceas, básicamente de manzanas y peras. El daño lo realizan las larvas que penetran y se alimentan del fruto, en el que generalmente se dirigen hacia la cavidad seminal, donde se alimentan de las semillas (Tadic 1963). La sensibilidad de las peras a ser atacadas por carpocapsa es varietal, y en cualquier caso es menor que la de las manzanas. Parece ser que en primavera las larvas neonatas tienen mayor éxito en la entrada de las peras, pero dicha penetración se hace más difícil a medida que el fruto crece hasta que alcanza cierto nivel de madurez, periodo donde las larvas penetran fácilmente el fruto (Westigard *et al.* 1976; Westigard 1979). La variedad más susceptible al ataque de carpocapsa es la “Barlett” (“Williams”), siguiéndole las variedades “Bosc”, “Comice” y “Anjou”, siendo esta última poco susceptible. Las nueces también son un hospedante para la carpocapsa, e incluso se considera la plaga más importante en áreas como California (Riedl & Barnes 1979). Otros hábitats secundarios pueden ser melocotones, albaricoques, ciruelas, o incluso kakis y naranjas, aunque generalmente este tipo de ataques es debido a la proximidad a zonas con manzanas y peras con un alto grado de infestación.

1.3. Descripción del insecto.

El insecto adulto es una mariposa de unos 10 mm de longitud y unos 15-22 mm de anchura. Las alas son de color grisáceo; el primer par de alas tiene bandas de diferentes tonalidades de gris y negro y en la zona distal una mancha muy característica de color cobre. Se ha observado esporádicamente una forma la cual presenta una coloración de las alas gris uniforme (Bovey 1966), citado como *Laspeyresia pomonella* forma

putamina Stgr. del cual incluso se ha llegado a seleccionar una línea de coloración gris más claro que la coloración habitual, pero que presenta las mismas características en cuanto a longevidad, fecundidad y fertilidad (Charmillot & Rosset 1977). Las hembras, generalmente suelen ser mayores, aunque a veces existe gran variabilidad de tamaño entre individuos de un mismo sexo, por lo que el tamaño no es útil para la separación de los. Se diferencian los dos sexos de este tortricido en el crin alar, que en los machos está formado por un solo crin, de color marrón, y en las hembras está formado por tres. Una característica muy fiable y rápida en la clasificación de sexos en mariposas es la forma del abdomen. En las hembras, el abdomen es fusiforme, la anchura del quinto y cuarto segmento es mayor, y termina en forma de pico de flauta (Audemard 1976).

La preparación de genitales es otro procedimiento muy útil en la clasificación de tortricidos, especialmente en aquellos que debido a su mal estado no es posible otro tipo de reconocimiento. Ferro & Akre (1975) describen con detalle tanto la genitalia externa como interna del macho y de la hembra de carpocapsa. En el macho las valvas son anchas y presentan una pilosidad característica. El aedeagus, de una longitud entre 1 y 1,5 mm, contiene dos grupos de espinas distribuidas una en la zona distal, y la otra en la zona lateral de la hoja que forma este órgano. En la hembra, la bursa copulatrix contiene también dos espinas en su zona central (Allman 1930).

Los huevos de carpocapsa son de forma lenticular planoconvexa, de forma ligeramente elíptica, de dimensiones 1 a 1,2 mm. La transparencia del corion permite seguir la evolución del desarrollo embrionario sin dificultad. Según Richardson *et al.* (1982), el desarrollo embrionario se puede separar en 18 estadios distintos, aunque generalmente el desarrollo embrionario en carpocapsa suele clasificarse en tres estados que son estado blanco, anillo rojo y cápsula cefálica negra. El estado de anillo rojo no siempre se produce, y parece ser el tipo de luz lo que condiciona la aparición de los pigmentos que dan nombre a este estado. Es a partir del estado número 14, según Richardson *et al.* (1982), cuando el embrión abandona el amnion y empieza a alimentarse en la yema, se inicia la deposición de la cutícula y el embrión alcanza su longitud máxima.

La larva de carpocapsa es de color rosáceo. La cápsula cefálica es negra en los cuatro primeros estadios larvarios y pardo en el último; su anchura es un parámetro fiable para la clasificación del estadio (Pons *et al.* 1994). El cuerpo de la larva es cilíndrico y se divide en 12 segmentos. El torax tiene tres segmentos, donde se encuentran en cada uno de ellos las patas torácicas. Los dos primeros segmentos abdominales de la larva no tienen patas, pero sí las tienen en los segmentos del 6 al 9, así como el último, el segmento anal (Tadic 1963). Las larvas no presentan peine anal y las falsas patas van provistas de 15 a 25 pequeños ganchos (Bovey 1966). Es posible observar por transparencia los testículos en los machos en el quinto segmento abdominal, a partir del cuarto estadio larvario. Algunas veces restos de comida o excrementos en el rectum pueden confundirse con los testículos, pero con cierta experiencia la observación de dichas manchas, los testículos, pueden utilizarse para sexar las larvas (Hansen & Harwood 1968).

La pupa de carpocapsa tiene una longitud de 9 a 10 mm y su coloración varía de marrón miel a marrón oscuro dependiendo de la edad. Existen diferencias morfológicas de las pupas entre los dos sexos. La hembra tiene tres segmentos móviles abdominales, seguidos de una parte final que consiste en cuatro segmentos fusionados. El macho tiene cuatro segmentos móviles y la parte final consiste en tres segmentos fusionados. También hay diferencias en la posición de la abertura genital, la cual está situada en el segmento abdominal noveno en los dos sexos, pero en la hembra consiste en una abertura de forma lineal, mientras que en el macho es circular (Tadic 1963).

1.4. Biología de *C. pomonella*.

1.4.1. Emergencia, vuelo, copulación y oviposición.

El inicio de la emergencia de las mariposas de carpocapsa en primavera varía en función de las condiciones climáticas de cada zona y año, aunque en nuestras latitudes suele aparecer hacia finales de abril o principios de mayo. Establecer correctamente el inicio del vuelo de las primeras mariposas tiene una gran importancia ya que definirá el inicio del control de esta plaga. En estudios realizados por Tadic (1963) en la proporción de las primeras mariposas emergidas se observó que no existe protandria ni protoginia en carpocapsa, pero sí que durante los primeros días de emergencia la

proporción de machos era casi el doble que la de hembras. Aunque el número de hembras es mayor que el de machos en una población larvaria de carpocapsa, en el primer vuelo la proporción de adultos machos es mayor que la de hembras. Este fenómeno indica que la mortalidad larvaria en las hembras que pasan el invierno en diapausa es más alta que en los machos (Hagley 1974).

La longevidad de las mariposas se encuentra entre los 40 y los 50 días cuando la temperatura es de 15,5 °C para una humedad entre el 60 y el 75%, disminuyendo cuando aumenta la temperatura y decrece la humedad relativa. A 30 °C la longevidad de las mariposas es tan sólo de 13 días, existiendo poca variación entre sexos, aunque existe discrepancia entre autores en este último apartado (Hagley 1972). Cisneros & Barnes (1974) sí encontraron diferencias significativas en la longevidad de adultos de carpocapsa entre sexos, siendo mayor en el caso de los machos, y no habiendo diferencias entre poblaciones procedentes de explotaciones de manzanos o de nogales.

En evaluaciones sobre la capacidad de apareo de mariposas de carpocapsa recién emergidas se ha comprobado que éstas eran capaces de realizar el apareo ya dentro de las primeras 12 horas después de la emergencia, independientemente de las condiciones de fotoperiodo y de que se produzca crepúsculo o no (Gehring & Madsen 1963). En condiciones naturales se observa que la mayor actividad sexual se produce precisamente durante las horas del crepúsculo (Van Leeuwen 1929), y concretamente es en la hora inmediata después del crepúsculo cuando se ha observado, en condiciones de campo, el máximo de actividad sexual de las mariposas de *C. pomonella*, sin que se observe una correlación con la temperatura ni la humedad relativa (Wong *et al.* 1971). Se ha observado que la alimentación de las mariposas aumenta su longevidad, aunque este hecho tampoco influye en el aumento de la fecundidad de las hembras ni en la proporción de huevos eclosionados (Howell 1981). En estudios realizados por Riedl & Loher (1980) se observó que el 50% de la oviposición se había acumulado unas dos horas y media antes de la oscuridad completa. Cada hembra puede ser fecundada varias veces, hecho que puede ser verificado por el examen del número de espermátóforos dentro de la bursa copulatrix. Es ampliamente conocido el papel que ejercen las feromonas como atrayentes de los machos hacia las hembras, pero parece ser que los

estímulos visuales también ejercen un papel muy importante en la orientación del macho hacia la hembra cuando la distancia entre ambos es pequeña (Hutt & White 1977). Se ha observado una influencia de la densidad poblacional y la actividad sexual. En una población de mariposas con un porcentaje mayor de machos, las hembras se aparean más veces que los machos, y cuando la proporción mayor es la de hembras el fenómeno es a la inversa. En cuanto al tiempo que transcurre entre la emergencia de las mariposas y su apareo, en estudios realizados en laboratorio se ha obtenido que entre el 75 y el 92% de las hembras se apareaban en menos de un día (Howell *et al.* 1978).

Se ha observado que existe una correlación entre la longevidad de las mariposas y el número de huevos depositados por éstas (Hagley 1972). La alimentación de los adultos no afecta ni a la copulación, ni a la fecundidad ni al desarrollo embrionario normal de los huevos. La fecundidad de las hembras depende en gran medida de las condiciones climáticas por lo que el número de huevos puede ser muy variable, aunque como media dicho número se sitúa entre 50 y 60 huevos (Tadic 1963). Se han encontrado diferencias en la fecundidad entre poblaciones de primavera y verano. Mariposas hembras emergidas durante el verano producían una media de 42 huevos por hembra, mientras que las emergidas en primavera tan solo una media 20 huevos por hembra, sin que existiesen diferencias entre el peso de las hembras de primavera y verano (Ferro & Akre 1975).

Una vez que la oviposición se inicia, los huevos se distribuyen principalmente en las hojas, aunque la mayoría de éstos se encuentran muy próximos a los frutos. En manzanas, el porcentaje de huevos puestos en los frutos se encuentra alrededor del 40%; el porcentaje en la parte superior de las hojas es aproximadamente del 40% y el 20% restante en la parte inferior de las hojas, variando ligeramente dichos porcentajes dependiendo de la variedad. Se ha observado que los árboles con mayor número de frutos concentraban mayor número de huevos de carpocapsa (Wood 1965). Según Jackson (1979), el porcentaje de huevos depositados en frutos es menor, tan solo el 8%, y prácticamente la totalidad de los huevos puestos se encuentran a no más de 20 cm de distancia del fruto. En peras, la mayoría de los huevos se encuentran también sobre las hojas, aunque en su mayoría en la parte inferior de las hojas, contrariamente con lo que

ocurre en manzano (Hattingh 1943). La concentración de huevos cerca de los frutos parece ser debido a la atracción que ejercen compuestos volátiles como el α -farneseno sobre las hembras de carpocapsa (Wearing & Hutchins, 1972). Esta concentración de huevos cerca de frutos podría implicar una alta densidad tanto de hembras, como de larvas en los frutos, aunque no se ha observado ningún efecto repelente a las hembras que se proponen realizar la oviposición (Hilker 1898).

1.4.2. Desarrollo embrionario, eclosión, desarrollo larvario y pupal.

La duración del desarrollo embrionario de huevos de *C. pomonella* es de 86 GD (temperatura base de 10°C), y las etapas más características son las de huevo blanco, anillo rojo y cápsula cefálica negra (Richardson *et al.* 1982). En las últimas fases del desarrollo embrionario se puede observar la pequeña larva dentro del huevo, donde en las fases previas a la eclosión se aprecia el movimiento de las mandíbulas. La temperatura mínima para que se produzca desarrollo embrionario y posterior eclosión es de 11°C, a la que se obtiene un 9% de eclosión. A 10 °C sí se observa desarrollo embrionario aunque los huevos nunca llegan a eclosionar (Hagley 1972).

Una vez que se produce la eclosión del huevo, la larva neonata penetra un fruto con el fin de iniciar su alimentación. El proceso que las larvas siguen es el de búsqueda de frutos, “vagabundeo” por el fruto, penetración e inicio de la alimentación, siendo de gran importancia la temperatura y la humedad relativa en la longevidad de dichas larvas (Jackson & Harwood 1980). Considerando su tamaño, las larvas neonatas presentan una gran movilidad que puede llegar a ser hasta casi 5 cm por minuto, dependiendo de la temperatura. La capacidad de desplazamiento de las larvas es muy grande, pudiendo desplazarse hasta más de 10 m y alcanzar un fruto con éxito (Steiner 1939). En larvas colocadas sobre fruta, en dos horas la mayoría de las larvas ya han penetrado el fruto (Jackson 1982). El proceso de penetración en la fruta requiere un gran esfuerzo y energía por parte de la larva neonata, por lo que producir la penetración por el cáliz, lesiones o entre dos frutos si estos están en contacto facilita enormemente este proceso (Audemard 1976).

La totalidad del desarrollo larvario se realiza en el interior de los frutos, donde la larva inicia su alimentación. La duración del desarrollo larvario está condicionada por diversos factores como la temperatura y la alimentación de la larva. La duración del desarrollo de cada uno de los cinco estados larvarios ocupa 3,2; 2,1; 2,3; 2,9 y 10,7 días respectivamente cuando las larvas son alimentadas con dieta artificial y mantenidas bajo condiciones constantes de fotoperiodo de 16:8 (L:O)h y 25°C de temperatura, lo que equivale a 318 GD (temperatura base 10°C) para el desarrollo completo de la larva (Pons *et al.* 1994). Algo mayor es la duración del periodo de desarrollo larvario más pupal obtenida en estudios previos cuando las larvas fueron mantenidas bajo condiciones de 26°C y 50% de HR, donde ésta osciló entre los 30 y 35 días en el caso de los machos y 31 y 37 días en el caso de las hembras dependiendo de la dieta utilizada, siendo la utilización de manzanas una de las dietas que permitió completar el desarrollo en uno de los periodos más cortos. La dieta basada en manzanas permite obtener también pupas y adultos de mayor peso que utilizando diversas dietas artificiales, aunque esto no se traduce ni en diferencias en la longevidad de los adultos, ni en la fecundidad o fertilidad de las hembras (Hathaway *et al.* 1971).

Una vez que la larva ha completado su desarrollo larvario, inicia el proceso de pupación, para el cual se esconde preferiblemente entre la corteza de las ramas o el tronco del árbol, o se entierra, tejiendo un capullo para así iniciar la pupación. El movimiento de las larvas se produce generalmente de noche, y las larvas son capaces de orientarse y encontrar las zonas más adecuadas para su propósito (McLellan 1960). En estudios donde se evaluó la duración del proceso de pupación, éste ocupó 9,8 días cuando los insectos fueron mantenidos bajo condiciones constantes de fotoperiodo a 16:8 (L:O)h y 25°C de temperatura, siendo el peso de las pupas hembras de 51 mg de media, y el de los machos de 44 mg, procedentes de larvas alimentadas con dieta artificial (Pons *et al.* 1994). En estudios donde las pupas procedían de larvas alimentadas con manzanas, los pesos que se obtuvieron fueron ligeramente inferiores: 42,2 mg y 34,1 mg para hembras y machos respectivamente y 44,5 mg y 34,7 mg para hembras y machos alimentados con dieta artificial (Howel 1970), datos que concuerdan con los realizados por Hathaway *et al.* (1971) evaluando diversas dietas. Cuando la pupa ha finalizado su desarrollo, se puede observar vagamente la mariposa a través del

tegumento del exuvio pupal. Esta ejerce una serie de movimientos con el abdomen, con la finalidad de perforar el capullo y realizar una apertura al exterior. La mitad inferior del exuvio queda enganchado en la corteza, y en la parte superior de éste se abre una sutura que permite a la mariposa emerger lentamente (Tadic 1963).

1.4.3. Ciclo biológico y diapausa.

C. pomonella se sincroniza con las condiciones climáticas de cada zona sobreviviendo a los periodos invernales y desarrollando una o varias generaciones durante los periodos climáticos y de alimentación favorables. La sensibilidad de carpocapsa a la disminución del fotoperiodo induce a las larvas a entrar en el proceso de diapausa hasta la primavera siguiente. Por lo tanto son varios los factores que influyen en la inducción de la diapausa: el fotoperiodo, la temperatura pero también la duración del desarrollo de los frutos y la disponibilidad de alimento.

La temperatura durante este periodo de diapausa afecta a la emergencia de las mariposas. En áreas frías, el final de la diapausa es más uniforme y las emergencias en la primavera siguiente se produce en un periodo relativamente corto. Un invierno más moderado produce que el proceso de emergencia se reparta en varios meses, solapándose con las siguientes generaciones de carpocapsa (Riedl 1983). En condiciones de día largo las larvas diapausantes son capaces de reanudar su desarrollo, rompen la diapausa, y la temperatura acelera el proceso de la pupación (Shel'deshova 1967; Sieber & Benz 1980). En definitiva, lo que ocurre en condiciones naturales es que esta sensibilidad del insecto al fotoperiodo y temperatura permite la sincronización de su desarrollo con el de su huésped.

1.4.4. Depredación y enemigos naturales.

En condiciones de campo, la depredación o parasitismo se produce básicamente sobre huevos, larvas de primer estadio y sobre larvas diapausantes. Según estudios realizados en Canadá por McLellan (1962), el porcentaje de huevos depredados o parasitados es en general bajo: 14,4 % depredados y un 2,4% parasitados por *Trichogramma* sp. Entre las especies de depredadores citadas se encuentran los trips *Haplothrips faurei* Hood y *Leptothrips mali* Fitch, los míridos *Diaphnidia* sp., *Hyaliodes barti* Knight, *Pilophorus*

perplexus D. & S y *Blepharidopterus angulatus* Fall. Sí es elevado el porcentaje de parasitismo o depredación que se produce en las larvas hibernantes, donde un 59% de las larvas son destruidas: un 47% por pájaros, un 9% por el braconídeo *Ascogaster quadridentata* (Wesm.) y un 3% por bajas temperaturas. En huertos de manzanos que no han sido tratados con insecticidas de amplio espectro el porcentaje de mortalidad en huevos es ligeramente superior al 25%, siendo el parasitismo debido a *Trichogramma* sp. el factor principal (14%), siendo también muy baja (10%) la mortalidad de las larvas de primer estadio en este tipo de huertos (Wood 1965).

2. Regulación hormonal: Ecdisona.

Tanto el crecimiento como el desarrollo de los insectos están esencialmente controlados por hormonas. Secretadas en una determinada concentración y secuencia permiten el proceso de muda en insectos, controlar la metamorfosis o la diferenciación sexual. Las glándulas protorácicas consisten en grupos de células secretoras responsables de la producción de la hormona de la muda, la hormona ecdisona.

2.1. Muda larvaria y metamorfosis.

La ecdisona es la hormona responsable de los procesos de muda y metamorfosis en insectos. En 1954, se aisló por primera vez la hormona ecdisona, en forma cristalina, partiendo de una tonelada de pupas de *Bombyx mori* (Bellés 1988). Una década después se pudo conocer su estructura molecular, aunque al realizarse su estudio al mismo tiempo en diversos grupos de investigación condujo a cierta confusión en la terminología (β -ecdysona, polipodin A, ecdysterona y crustacerona) para designar la molécula 20-hidroxiecdisona (Horn *et al.* 1966).

En diversas especies se ha detectado un pico de ecdisteroides en la hemolinfa poco antes de la muda. Dicho incremento del nivel de esta hormona se correlaciona con las cuatro fases o etapas básicas en que se divide el proceso de la muda: *etapa de preparación*, donde las células de la epidermis experimentan una mayor actividad: síntesis de ADN, división celular y diferenciación de estructuras especializadas; *apolisis*, donde se forma una membrana ecdisial sobre la epidermis y se segrega un fluido enzimático que digerirá la cutícula anterior; *digestión de la cutícula anterior* y

formación progresiva de una nueva cutícula; *ecdisis*, en la que se produce el desprendimiento del resto de la cutícula no digerida. En cuanto a la metamorfosis, la diferenciación de las células epidérmicas para constituir un exoesqueleto de pupa o de adulto requiere la presencia de la hormona de la muda y la ausencia de hormona juvenil (Bellés 1988).

2.2. Reproducción y diapausa.

Se han descrito efectos de la 20-hidroxiecdisona en la vitelogenesis en diversos dípteros, y sobre la diferenciación de nuevos folículos en insectos de otros órdenes, así como su influencia en la ovulación y espermatogénesis (Bellés 1988). Durante la diapausa, el proceso de espermatogénesis cesa, pero Friedländer y Benz (1981) observaron la reanudación parcial de este proceso mediante la aplicación de la hormona 20-hidroxiecdisona en cultivos de testículos extraídos de larvas en diapausa.

Aunque de forma simplista, se puede entender la diapausa larvaria como el proceso en el que las glándulas protorácicas interrumpen la producción de la hormona ecdisona. En principio podría parecer posible la activación del proceso de la muda en larvas diapausantes mediante la administración exógena de esta hormona, lo que se ha conseguido en diversas especies de insectos, como por ejemplo, en *C. pomonella*, donde mediante la inyección de 20-hidroxiecdisona en larvas diapausantes se consiguió que éstas puparan (Sieber & Benz 1980), aunque la respuesta obtenida varía entre especies, dosis y estadio larvario en que es aplicada la hormona (Denlinger 1985).

3. Control de *C. pomonella*.

Hasta la aparición de programas de control integrado de plagas, el control de carpocapsa se ha llevado a cabo con insecticidas generalmente de amplio espectro. Estos han sido básicamente insecticidas organofosforados (acefato, diazinón, clorpirifos, fenitrotión, fosmet, malatión, metilparatión, metilazinfos, etc), carbamatos (metomilo, carbaril, etc) y piretroides (bifentrín, cipermetrina, esfanvalerato, deltametrina, permetrina, etc.). Posteriormente se han introducido insecticidas denominados biológicos como el *Bacillus thuringiensis* Berliner (Purcell & Granett

1986) o a base de preparados del virus de la granulosis, e insecticidas reguladores del crecimiento como los inhibidores de la síntesis de quitina y análogos de hormonas.

Junto con la aparición de insecticidas también se han desarrollado nuevas técnicas de control de *C. pomonella*, como por ejemplo la liberación de adultos estériles, captura masiva y confusión sexual.

3.1. Control integrado en manzano y peral.

En la definición y aplicación de un programa de control integrado a menudo se plantea la cuestión si se debe dar prioridad a un programa que promueva el desarrollo o protección de los artrópodos beneficiosos (enemigos naturales) o si se deben promover medidas de control selectivas. El primer caso suele corresponder a situaciones de cultivos intensivos bajo plástico donde el control de una determinada plaga va asociado a un número reducido de especies de enemigos naturales. El segundo caso corresponde a una situación típica de cultivos anuales, plantaciones de frutales, etc, donde el número de especies que intervienen en dicho sistema es amplio, y muchas de ellas no constituyen una depredación o parasitismo especializado en las plagas clave. Curiosamente, el control integrado en manzanos tiene más puntos en común con el primer tipo, ya que el problema más grave inducido por la eliminación de enemigos naturales es el de la proliferación de ácaros fitófagos (Blommers 1994).

Con el uso de medidas de control más selectivas se hace necesario la utilización de un método de seguimiento de la plaga. La utilización de trampas de feromonas es una técnica extendida para seguir el vuelo de las mariposas de *C. pomonella* y así predecir el inicio de eclosión de los huevos así como el nivel de la plaga. El cálculo de los grados día es una información complementaria a la suministrada por las trampas de feromona. Calculando el número de grados día a partir de la primera captura de un adulto de carpocapsa en una trampa de feromona se puede estimar el porcentaje de eclosión en un momento determinado (Brunner *et al.* 1982), aunque la eficiencia de las trampas de feromonas varía durante el transcurso de la primavera y verano, siendo más real su estimación en la primera emergencia de mariposas que posteriormente (Riedl *et al.* 1976).

3.2. Control químico: Utilización de insecticidas reguladores del crecimiento.

La utilización de insecticidas denominados reguladores de crecimiento (IGR) ha sido potenciado en programas de control integrado en frutales con la idea de sustituir insecticidas de amplio espectro, generalmente organofosforados. Estos insecticidas suelen gozar de un perfil eco-toxicológico más aceptable que los insecticidas tradicionales. Dentro del grupo genérico de insecticidas reguladores de crecimiento se encuentran los siguientes grupos:

Insecticidas inhibidores de la síntesis de quitina, son clasificados como acílureas, benzoilfenílureas o también difenílureas. Dentro de este grupo se encuentran productos como el teflubenzurón (Dart[®], Nomolt[®]), clorfluazurón (Atabron[®]), triflumurón (Alsystin[®]), hexaflumurón (Consult[®]), flufenoxurón (Cascade[®]), flucycloxurón (Andalin[®]), lufenurón (Match[®]), novalurón y diflubenzurón (Dimilin[®]). Las benzoilfenílureas producen efectos letales y subletales (efectos en la reproducción). La muerte del insecto se produce debido a los trastornos ocasionados en el proceso de la muda, el cual se inicia con la apólis y pero la ecdisis no es completada. Estos compuestos también son ovicidas, ya que parece ser que interrumpen la síntesis de la cutícula embrionaria. Estudios sobre la toxicidad de triflumurón y diflubenzurón en carpocapsa realizados en laboratorio, describen la toxicidad de estos compuestos como ovicidas, y entre 6 y 50 veces menos tóxicos sobre larvas neonatas (Purcell & Granett 1986). El efecto ovicida de inhibidores de la síntesis de quitina como flufenoxurón puede venir determinado por la forma en que los huevos son expuestos al insecticida. Pueden producirse diferencias en la toxicidad cuando los huevos son puestos sobre el residuo o son tratados tópicamente. Por ejemplo, en estudios realizados en la especie *Adoxophyes orana* F. v. R. sólo se obtuvo el efecto ovicida cuando los huevos fueron puestos sobre una superficie tratada previamente (Charmillot *et al.* 1991).

Análogos de la hormona juvenil, entre los que se encuentran el metropeno (Altosid[®], Precor[®], Apex[®], Kabat[®], Manta[®]), el quinopreno (Enstar[®]) o el hidropreno (Altozar[®]). Este tipo de insecticidas actúan generalmente en tres etapas: sobre la embriogénesis (efecto ovicida que generalmente es el que más contribuye en el control), sobre la diapausa y sobre la morfogénesis (Coll 1988). Fenoxicarb (Comply[®], Insegar[®], Pictyl[®],

Varikill[®]) se encuentra dentro de este grupo. Su utilización es diversa como por ejemplo contra psylla, carpocapsa, enrolladores y minadores de hojas o cochinillas. Existen estudios que demuestran que fenoxicarb tiene actividad larvicida sobre diversas especies de noctuidos (Chandler *et al.* 1992). En carpocapsa, fenoxicarb sólo tienen efecto ovicida cuando es aplicado previa oviposición o sobre huevos recién puestos (Charmillot *et al.* 1989). Por el contrario, fenoxicarb sólo actúa como larvicida en el control del tortricido *Platynota idaeusalis* Walker en manzano. No se observó ningún efecto ovicida aún cuando los huevos fueron puestos sobre el residuo del insecticida (Hull *et al.* 1991).

Antagonistas de la hormona juvenil, donde se pueden incluir los precocenos. Quizás el compuesto más conocido dentro de este grupo sea el butóxido de piperonil, el cual ha sido utilizado como sinérgico de insecticidas, como por ejemplo los pteretroides. Contrariamente al grupo anterior, estos insecticidas adelantan la metamorfosis artificialmente, por lo que inducen adultos precoces más o menos inviábiles (Casas & Messeguer 1988).

Análogos de la hormona de la muda. Se denominan como ecdisteroides aquellos productos que presentan actividad similar a la hormona de la muda. Existen un número elevado de fitoecdisteroides conocidos, como por ejemplo la ajugalactona y la norsengosterona, activos frente a la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Marco & Tomás 1988). Tebufenocida se encuentra dentro de este grupo de los análogos de la hormona de la muda, registrado bajo el nombre de Mimic[®] o Confirm[®] dependiendo de países y usos. Otros insecticidas también análogos de la hormona de la muda son el RH-5849, predecesor de tebufenocida y el posteriormente desarrollado RH-2485. Producen una aceleración en el proceso de muda larvaria, lo que provoca irregularidades en la muda como formación de doble cápsula cefálica, malformaciones en las mandíbulas, pérdidas de hemolinfa, etc.

Antagonistas de la hormona de la muda. Estos compuestos inhiben la muda de los insectos, y los primeros que fueron descubiertos se encontraron en plantas. Algunos de estos insecticidas son la azadiractina (Align[®]), brasinolida y la digitonina. Producen

problemas en la mudas larvarias, malformaciones en las pupas y en los adultos que consiguen emerger, así como diversos efectos subletales.

Algunos de los citados reguladores de crecimiento como el diflubenzurón o el triflumurón han sido evaluados en programas de control integrado en comparación con organofosforados como el fosmet, obteniéndose buen control de *C. pomonella* (Westigard & Gut 1986). Una de las ventajas que se obtienen en la utilización de productos como diflubenzurón es la baja toxicidad sobre algunos enemigos naturales como los fitoseidos, y se evita un incremento de plagas como la araña roja *P. ulmi* en manzanos (Anderson & Elliot 1982). En una evaluación de un programa de control de carpocapsa en pera mediante la utilización de diflubenzurón en comparación con organofosforados se obtuvieron los mejores niveles de control mediante la utilización del inhibidor de la síntesis de quitina, además de menores niveles de psyla, probablemente debido al menor efecto del insecticida sobre la fauna útil (Westigard 1979). En 1984 y 1985 se produjeron daños muy elevados en parcelas de manzanos tratadas con diflubenzurón en comparación con daños muy bajos obtenidos en parcelas de características similares. Esta diferencia en la susceptibilidad de dicha población de carpocapsa a este inhibidor de la síntesis de quitina conduce a la idea de la posible aparición de resistencia a este insecticida, en donde curiosamente era la primera vez que se utilizaba (Moffit *et al.* 1988).

3.3. Control químico: Prevención de resistencias.

Los insecticidas organofosforados han sido ampliamente utilizados en el control de carpocapsa, especialmente metilazinfos, sorprendentemente durante más de 30 años. Sin embargo, en algunas áreas de diversos países se ha observado la pérdida de eficacia en el control de carpocapsa. Curiosamente también se han observado pérdidas de eficacia de algunas benzoflureas, incluso en zonas donde no se habían utilizado previamente, por lo que nos podemos encontrar ante casos de resistencia cruzada (Riedl *et al.* 1992). Mediante la utilización de dos técnicas, consistentes en aplicaciones tópicas del insecticida sobre mariposas de carpocapsa e incorporación del insecticida en la cola adhesiva en las trampas de feromonas, se contabilizó la susceptibilidad de carpocapsa a metilazinfos en diversas áreas de Estados Unidos (Varela *et al.* 1993).

Dicha técnica permite conocer la situación y la evolución en susceptibilidad a determinados insecticidas de diversas poblaciones de carpocapsa.

La falta de eficacia de diflubenzurón en el control de carpocapsa en el Sur de Francia puede estar explicada por la presión de selección que se ha ejercido con este producto desde su homologación en dicho país. Su utilización como ovicida permite que en aplicaciones tardías (aplicado después de la puesta) y a la dosis de 10 g ma/hl su efecto ovicida sea menor, y además las larvas neonatas eclosionadas están expuestas a una dosis subletal del producto. La dosis registrada en otros países de Europa y Estados Unidos es de 15 a 20 g ma/hl (Sauphanor *et al.* 1994). La evaluación en laboratorio de dicha resistencia mediante suministro de diversos insecticidas a larvas neonatas obtenidas en laboratorio a partir de dos poblaciones larvarias capturadas en campo reveló una resistencia de 370 veces en el caso de diflubenzurón. También se observó resistencia cruzada con otros dos insecticidas inhibidores de la quitina (teflubenzurón y triflumurón), como también con tebufenocida (resistencia de 26 veces), insecticida que nunca había sido aplicado antes en dicha zona, por lo tanto se trata de resistencia múltiple (Sauphanor & Bouvier 1995). Debido a esta problemática, se hace necesaria la utilización de técnicas que permitan detectar la aparición de líneas de carpocapsa resistentes, y que esto se pueda ejercer localmente, de forma que se puedan cambiar y redefinir las estrategias de lucha (Sauphanor *et al.* 1996).

Debido a la problemática existente de resistencia múltiple observada en Francia, se han realizado en Italia evaluaciones de resistencia a diflubenzurón y tebufenocida. Para tal estudio se utilizó un kit diseñado por la empresa Rohm and Haas que consistía en diversas cajitas de cría donde se introduce dieta conteniendo el insecticida y donde se evalúa la mortalidad larvaria. Dicho estudio permitió confirmar la presencia de resistencia a diflubenzurón, pero también demuestra la inexistencia de resistencia cruzada entre diflubenzurón y tebufenocida (Regioli & Manaresi 1997).

4. Tebufenocida.

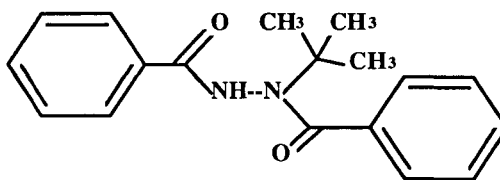
Este insecticida pertenece al grupo de los análogos de la hormona de la muda, la hormona ecdisona, aunque su estructura no es esteroideal ya que pertenece al grupo químico de las dibenzoilhidracinas. Descubierta y desarrollada por Rohm and Haas Co. se caracteriza por ser un insecticida prácticamente exclusivo para lepidópteros y de tener un perfil toxicológico muy favorable.

4.1. Insecticidas antecesores a tebufenocida.

RH 5849 fue el primer compuesto no esteroideal considerado como un análogo de la hormona ecdisona.

Propiedades físicas y químicas (Mauchamp 1995).

Estructura molecular:



Código:	RH-5849
Nombre (IUPAC):	1,2-dibenzoil-1- <i>tert</i> -butilhidracina
Fórmula molecular:	$C_{18}H_{20}N_2O_2$

Introducido en células de *Drosophila* mimetiza la acción de la 20-hidroxicdisona causando una serie de procesos como la inhibición de la proliferación de células y la inducción de acetilcolinesterasa (Wing 1988). Suministrado a cualquiera de los estadios larvarios de *Manduca sexta* produce una iniciación prematura de la muda de la larva al interferir directamente los receptores de la hormona ecdisona, produciéndole la muerte. Este hecho ocurre sin que se incrementen los niveles de la hormona 20-hidroxicdisona, y aunque en ensayos in vitro su actividad fue menor que la hormona ecdisona, en ensayos in vivo la actividad fue mucho mayor (Wing *et al.* 1988).

En estudios realizados con el insecticida RH 5849 con el objetivo de discernir el efecto sobre el coleóptero *Popillia japonica* Newman, y el lepidóptero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, se obtuvo que este insecticida produjo un alto porcentaje de mortalidad en

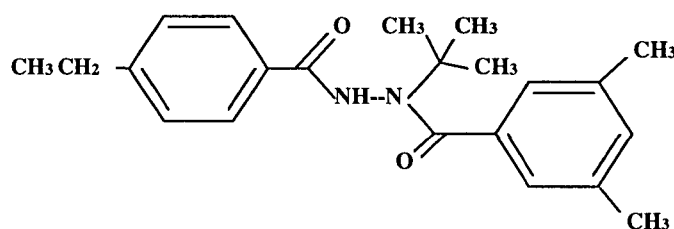
las dos especies, siendo los síntomas producidos alteraciones en el proceso de muda, pérdida de hemolinfa, doble cápsula cefálica, entre otras aberraciones (Monthéan & Potter 1992). En aplicaciones del insecticida RH 5849 en *Podisus nigripinus* Dallas y *Podisus maculiventris* Say, heterópteros depredadores de algunos lepidópteros y coleópteros, no se observó ningún efecto en el crecimiento, desarrollo, comportamiento, fecundidad o fertilidad de ambos insectos (Smagge & Dagheele 1995).

4.2. Características, espectro y modo de acción de tebufenocida.

Tebufenocida está caracterizado como compuesto no mutagénico, no oncogénico, no teratogénico, no se ha observado ningún tipo de hipersensitividad, ni toxicidad a embriones o fetos, ni es neurotóxico. Se considera prácticamente no tóxico en mamíferos ($LD_{50} > 5000$ mg/kg vía oral y dermal en ratas con producto técnico). Tebufenocida se comercializa bajo el nombre de Confirm[®] y Mimic[®], dependiendo de su uso y país. En Estados Unidos, por ejemplo, Mimic[®] es la formulación registrada para uso forestal y Confirm[®] para uso agrícola. En España, Mimic[®] (240 g ma/l, suspensión concentrada) es la formulación registrada en plagas y cultivos agrícolas.

Propiedades físicas y químicas (Rohm & Haas 1992).

Estructura molecular:



Clase química:	diacilhidracina
Código:	RH-5992 RH-75992
Nombre (ISO):	Tebufenocida
Nombre (IUPAC):	N- <i>tert</i> -butil-N'-(4-etilbenzoil)-3,5-dimetilbenzohidracina
Nombre químico:	3,5- ácido dimetil benzoico 1-(1,1-dimetiletil)-2-(4-etilbenzoil)hidracina
Punto de fusión (°C):	190 a 191
Solubilidad en agua:	0,83 ppm

Presión de vapor (25°C):	2×10^{-8} Torr
Peso molecular:	352 g/mol
Fórmula molecular:	$C_{22}H_{28}N_2O_2$

Tebufenocida actúa sobre la proteína receptora de la hormona ecdisona, la cual activa y por lo tanto se inicia el proceso de muda larvaria. Como consecuencia se produce un cese en la actividad alimentaria de la larva, la formación de una nueva pero malformada cutícula y posteriormente la muerte de la larva (Rohm & Haas 1992).

En España Mimic está registrado en frutales de pepita y viña contra carpocapsa y polilla del racimo respectivamente, a una dosis entre 500 y 600 ml (formulado)/ha, aunque se encuentra en trámite la ampliación de registro a tomate y pimiento. Algunas de las especies controladas por cultivo son:

Cultivo	Especie	Dosis (g ma/ha)**
Manzano	<i>Cydia pomonella</i>	170 - 330
	<i>Grapholita molesta</i>	330
	<i>Grapholita prunivora</i>	330
	<i>Pandemis limitata</i>	330
Nogales	<i>Cydia pomonella</i>	130 - 280
	<i>Anarsia lieatella</i>	130 - 280
Maíz	<i>Ostrinia nubilalis</i>	130 - 280
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	130 - 280
Algodón	<i>Spodoptera exigua</i>	65 - 130
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	65 - 130
Vegetales	<i>Ostrinia nubilalis</i>	130
	<i>Spodoptera exigua</i>	65 - 130
	<i>Trichoplusia ni</i>	130

** Las dosis han sido calculadas y redondeadas a partir de las que se dan en el *Technical Information Bulletin* de Rohm and Haas Co, ya que en dicho boletín las dosis están en unidades americanas.

Entre los insectos o ácaros beneficiosos donde se ha confirmado que tebufenocida no tiene ningún efecto disruptivo se encuentran especies como *Amblyseius fallacis* (Garman), *Typhlodromus occidentalis* (Nesbitt), *Typhlodromus pyri* (Schenten), *Stethorus punctum* (Le Conte), *Ascogaster quadridentata* Wesmael, *Chrysoperla carnea* (Stephens) o *Apis mellifera* L. Incluso en estudios realizados sobre el posible efecto en fauna fluvial de invertebrados no se ha detectado ninguna toxicidad (Kreutzweiser *et al.* 1994).

4.3. Tebufenocida en el control de *C. pomonella*.

Charmillot *et al.* (1994) describen las deformaciones ocasionadas en larvas de *Choristoneura fumiferana* Clemens tratadas con tebufenocida junto con fotografías obtenidas con microscopio electrónico, donde se aprecian claramente las deformaciones en la cápsula cefálica de dichas larvas. El mismo tipo de deformaciones son descritas en *C. pomonella*, muda prematura con una formación anticipada de la cápsula cefálica, y formación de piezas bucales no funcionales. Este mismo autor obtiene una mortalidad larvaria del 80% en ensayos realizados en laboratorio con manzanas tratadas en campo, equivalente al control ovicida obtenido con fenoxicarb y teflubenzurón.

En aplicaciones en campo tanto de tebufenocida como de su predecesor RH-5849 se han obtenido buenos controles de carpocapsa en Oregón, ya sean aplicados en el mismo momento que insecticidas ovicidas típicos como diflubenzurón o fenoxicarb, o bien aplicados como larvicidas típicos como metilazinfos (Riedl & Shearer 1988, Riedl & Shearer 1989, Riedl & Shearer 1990). En aplicaciones en campo en Nueva Zelanda también se obtuvo un buen control de carpocapsa con aplicaciones de tebufenocida cada dos semanas e iniciadas en plena floración hasta un total de diez tratamientos (Walker *et al.* 1991).

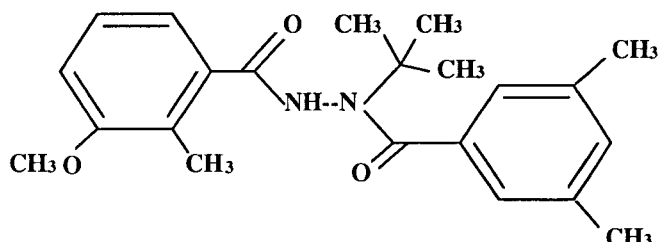
4.4. Posteriores a tebufenocida.

RH-2485 es el siguiente análogo de la hormona ecdisona desarrollado por Rhom and Haas. También controla una amplia gama de lepidópteros y actúa principalmente por ingestión, aunque también tiene cierta actividad por contacto y sistemía. El modo de

acción de este insecticida parece ser parecido a tebufenocida, aunque actúa a dosis ligeramente menores.

Propiedades químicas (Thirugnanam 1996).

Estructura molecular:



Código:	RH-2485	RH-112,485
Nombre (ISO):	Metoxifenocida (propuesto)	
Nombre (IUPAC):	N- <i>tert</i> -butil-N'-(3,5-dimetilbenzoil)-3-metoxi-3-metilbenzohidracina	
Fórmula molecular:	$C_{22}H_{28}N_2O_3$	

OBJETIVO

La finalidad de esta tesis fue discernir la capacidad insecticida de tebufenocida contra *C. pomonella*. Para dicha valoración, era necesario satisfacer los siguientes objetivos:

- Conocimiento de los efectos letales de tebufenocida en los diferentes estadios de *C. pomonella*.
- Comparación de la actividad larvicida en *C. pomonella* de tebufenocida con otros reguladores del crecimiento de insectos.
- Conocimiento de los efectos subletales de tebufenocida en los diferentes estadios de *C. pomonella*.
- Conocimiento del momento de aplicación, utilización de coadyuvantes y volumen de tratamiento en la efectividad de tebufenocida en el control de *C. pomonella*.

Direct Toxicity of the Ecdysone Agonist Tebufenozide to Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae)

Pons et al.: Toxicity of tebufenozide to codling moth

SEBASTIÀ PONS^{1*}, HELMUT RIEDL¹ AND JESÚS AVILLA²

¹Oregon State University, Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center,
3005 Experiment Station Drive, Hood River, OR 97031

²Centre UdL-IRTA de R+D, Area de Protecció de Conreus, Av. Rovira Roure 177,
25198 Lleida, Spain.

* Current address: DuPont Iberica S.A., Protección de Cultivos, Av. Diagonal 561,
08029 Barcelona, Spain.

Enviado a: Journal of Economic Entomology

ABSTRACT. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) has ovicidal, larvicidal but no adulticidal activity against codling moth, *Cydia pomonella* (L.). The toxicity to eggs varied with the application and with the substrate on which eggs were laid. On apple leaves, the ovicidal activity of tebufenozide was about 30 times greater when eggs were laid on top of the residue than with topical application of eggs after they were laid (LC₅₀s of 4.35 and 1123.8 ppm, respectively). Eggs laid on treated apples were not affected by tebufenozide residue. The LC₅₀s for neonate larvae feeding on treated apples and on treated artificial diet were 16.08 and 0.22 ppm, respectively. In tests with artificial diet susceptibility to tebufenozide decreased with larval age. Bioassays with artificial diet established reference lines for tebufenozide susceptibility in different instars. Contact exposure of neonates to tebufenozide residue on treated leaves or on a plastic surface caused mortality in larvae. Larval mortality increased with the duration of contact exposure. The effect of contact exposure on larval mortality was greater on treated apple leaves than on a treated plastic surface. Tebufenozide had no direct toxicity to adults (both sexes) and their longevity was not affected. Due to its ovicidal and larvicidal activity there is more flexibility in terms of spray timing with tebufenozide than with IGRs (e.g., diflubenzuron) which are only effective against codling moth eggs.

Key words: codling moth, tebufenozide, ecdysone, IGR

The codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) is a worldwide pest of pome fruits and walnuts. For the last 35 years control has been achieved primarily by the frequent application of azinphosmethyl and other organophosphate (OP) insecticides (Croft and Riedl 1991). IPM programs which were being developed in the mid 1970s in many fruit-growing areas created a need to control codling moth more selectively without impacting biological control of other pests. Insect growth regulators (IGRs) were among the first selective insecticides for codling moth control. In contrast to the neurotoxic conventional OP insecticides, IGRs offered new modes of action by interfering with the hormonal regulation of insect growth and development. They combine effectiveness against key pests with selectivity to predatory mites and other natural enemies. Three groups of IGRs have become available for use on tree fruits: first the chitin-synthesis inhibitors; then the juvenile hormone mimics; and more recently the ecdysone agonists (Riedl and Brunner 1996). Chitin-synthesis inhibitors such as diflubenzuron have been used in Europe for control of codling moth and other fruit pests for almost two decades. However, resistance development has now limited their usefulness (Riedl and Zelger 1994; Sauphanor and Bouvier 1995). The juvenile hormone mimic fenoxycarb has been used in Europe primarily for leafroller control (Charmillott et al. 1994b). Fenoxycarb has also activity against codling moth but has not been used much for that purpose. The ecdysone agonists such as tebufenozide or RH-5849 are a more recent discovery and represent a new pesticide chemistry which was pioneered by Rohm & Haas Company (Philadelphia, PA). These compounds are primarily active against lepidopterous pests and affected larvae undergo a lethal larval molt (Wing et al. 1988). On tree fruits the primary targets have been codling moth and leafrollers. IGRs from these three groups have been registered for some time now in Europe and in other fruit-growing areas around the world. However, in spite of an intensive development effort by the agricultural chemical industry not a single IGR has so far been labeled for tree fruits in the United States.

Field testing of ecdysone agonists on tree fruits began in the late 1980s. In field studies carried out in Oregon four cover sprays of tebufenozide provided codling moth control comparable to other IGRs (e.g., fenoxycarb, diflubenzuron) or a standard program with azinphosmethyl (Riedl and Shearer 1988, 1989, 1990). However, results of other field evaluations of tebufenozide for codling moth control were not as consistent (Reissig et al.

1995). This raised questions about optimal timing of tebufenozide in a seasonal control program and about the life stages which should be targeted. Therefore, the principal aim of this study was to develop information on the stage susceptibility of codling moth to the ecdysone agonist tebufenozide. We concentrated in particular on those life stages which have opportunity for topical and residual exposure to tebufenozide in the field: eggs, neonate larvae, and adults. A further aim of this study was to evaluate a field-implementable larval bioassay for resistance testing and establish reference values for tebufenozide susceptibility in codling moth larvae.

Materials and Methods

Codling Moth Colony. A colony of *C. pomonella* collected in 1991 in an apple block at the Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center, Hood River, OR, was maintained on thinning apples in an insectary at $24 \pm 2.5^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h as described by Riedl and Loher (1980). This colony supplied the different life stages used in the experiments. Larvae from the same apple block are added annually to the colony to maintain vigor and genetic make-up representative of a feral population.

Insecticide Formulations, Laboratory Applications, and Bioassays. Tebufenozide was evaluated as a 2F (flowable) and 70%WP (wetable powder) formulation. Unless stated otherwise, the 2F formulation was used in experiments. The nonionic spray adjuvants Latron AG-98 or Latron B-1956 were added to the formulations in some tests to improve wetting. Formulated insecticides and adjuvants were provided by Rohm & Haas (Philadelphia, PA). After a stock solution of tebufenozide was prepared with distilled water different concentrations were obtained by serial dilutions. All laboratory applications were performed with a Potter spray tower fitted with a final spraying nozzle (Burkhard, Rickmanshire, England). Applications were made with 2 ml of the desired concentration of tebufenozide (distilled water for the control) at 103 kPa and with a 5 s settling time. Small apples and leaves from unsprayed Red Delicious trees and waxed paper (Cut-Rite, Reynolds Metal, Richmond, VA) were used as substrates for eggs. In addition to thinning apples, an agar-based diet described by Sender (1969) and a soybean-wheat germ diet (Stonefly Industries, Bryan, TX) were used in experiments with neonates.

All bioassays were conducted at $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 80% RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h (continuous light in some tests).

Residual Toxicity of Tebufenozide to Eggs on Different Substrates. The residual toxicity to eggs was evaluated on three oviposition substrates: on leaves, on fruit, and on waxed paper. After treatment in the spray tower and air drying, the different substrates were exposed to five pairs of moths for 48 h in an oviposition chamber described by Riedl et al. (1995). The walls were lined with pubescent cloth to encourage egg laying on the oviposition substrates on the floor of the chamber. Only substrates treated with the same concentration were placed in an oviposition chamber at any one time to avoid cross contamination. Between 20 and 250 eggs were treated per concentration and replication. Each experiment was replicated three to four times. Egg mortality was assessed when egg hatch was completed in the untreated control and again several days later.

To evaluate the residual toxicity to eggs on the leaf surface, disks were cut with a gasket punch (25 mm diameter) from unsprayed apple leaves. Then the upper side of each leaf disk was sprayed with concentrations ranging from 0.75 to 75 ppm. Twelve leaf disks were placed on moist paper toweling on the floor of the oviposition cage. After oviposition, leaf disks were placed on moist cotton in petri dishes. The same methodology was followed to evaluate the residual toxicity to eggs laid on waxed paper. Disks (25 mm diameter) were cut from waxed paper and were sprayed with 150, 300 and 600 ppm of tebufenozide.

To assess the residual toxicity of tebufenozide to eggs laid on apples, two sets of tests were conducted. In the first test, small apples were treated in the spray tower with 37.5, 150, 300 and 600 ppm tebufenozide. Only the area around the stem end of each apple was treated. In the second test, fruit was dipped in the following tebufenozide concentrations : 1.5, 7.5, 15, 75, 150 ppm. In the dip test adjuvant (Latron AG-98) was added at a rate of 0.05% to improve wetting. The control apples were dipped in distilled water plus adjuvant. Six treated apples were placed in each oviposition chamber. Only the area around the stem end of each fruit was exposed to ovipositing moths.

Topical Toxicity of Tebufenozide to Eggs on Different Substrates. Eggs on waxed paper, on apple and on leaf disks were treated topically with tebufenozide. Eggs of known age on waxed paper were obtained with an oviposition cage described by Riedl and Loher (1980). Waxed paper was pulled across the open floor of the cage at hourly intervals which segregated the eggs by the hour of deposition. Three different age groups of eggs were tested (age in degree days [DD] in parenthesis): eggs in the 'white' stage at the beginning of the incubation period (7.5 DD; threshold temperature 10°C); in the 'red ring' stage at the mid-point of the incubation period (45 DD), and in the 'black head' stage shortly before hatch (75 DD). Waxed paper with eggs was cut into circles (70 mm diameter) and sprayed with 75, 150, 300, and 600 ppm tebufenozide. After drying, waxed paper with eggs were placed in petri dishes. To determine the topical toxicity to eggs laid on natural substrates (leaf and apple surface), the same procedures were followed as for the residual tests (see above) except that leaf disks and apples were removed after 24 h from the oviposition chamber. This assured that eggs were 24 h old or younger at the time they were sprayed.

Contact Toxicity of Tebufenozide to Neonate Larvae. The interior of plastic petri dishes (50 mm diameter x 9 mm) were treated in the spray tower with different concentrations of tebufenozide. After drying, groups of 5 neonates were kept for 2 h in dishes treated with 100, 300, 400, 600, 1200 and 2400 ppm; for 4 h in dishes treated with 15, 30, 60, 150, 300 and 600 ppm; and for 6 h in dishes treated with 75, 150 and 300. After exposure, neonates (20 to 25 per concentration; two replications) were transferred with a camel hair brush to cups with 2 ml of agar-based artificial diet. Larval mortality was evaluated after 10 d.

In addition, contact toxicity to neonates was evaluated using apple leaves as substrate. Both sides of leaves were sprayed in the spray tower with 37.5, 150 and 600 ppm tebufenozide (distilled water in the control) and placed in an upright position in small vials with water. After drying, neonates (50 per leaf; three leaves per concentration) were placed on each leaf and kept there for 1 h. Afterwards neonates were removed from the leaves and placed individually in plastic portion cups with artificial diet.

Oral Toxicity to Neonate Larvae on Treated Apples. To determine the oral toxicity of tebufenozide to neonates feeding on their natural food source, small apples (35-40 mm diameter), with the stem end up, were treated in the spray tower with 3.75, 7.5, 15, 30 and 60 ppm tebufenozide (70% WP). The adjuvant Latron B-1956 was added at 0.05% to improve wetting. Control apples were sprayed with distilled water plus adjuvant. After drying, No. 1 gelatin capsules (Eli Lilly, Indianapolis, IN), with one end cut away, were attached with bees wax to the treated apple surface. Four capsules were attached to a single apple, and ten apples were used per concentration and replication. A single egg in the 'black head' stage, close to hatching, was cut from waxed paper and enclosed in each capsule. By caging fully developed eggs instead of neonates, larval mortality due to handling was avoided. Eggs which did not hatch were not included in the analysis. Larval mortality and feeding damage were evaluated after 7 d. Feeding damage was recorded either as an 'entry' (>6 mm deep) or as a 'sting' (shallow feeding, < 6 mm).

Oral Toxicity of Tebufenozide to Different Larval Instars on Artificial Diet. Larvae of different sizes were collected from the insectary colony and sorted by instar according to head capsule width (Pons et al. 1994). Instars one to four were used in this test. Fifth instars were not included because of their erratic feeding and tendency to cocoon soon after they were removed from the apple. The soybean-wheat germ diet used in this test was a suitable larval medium for codling moth and compared favorably to the agar diet. The average duration of development was 35.4 days (at 24 ° C and 80% HR), and 80% of the neonates completed development to adult stage (Pons, unpublished data).

Individual larvae were placed in a plastic portion cup with 2 ml of the soybean-wheat germ diet. The diet contained 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 ppm tebufenozide (70% WP) for the neonates; 0.1, 0.5, and 1.0 ppm for the second and third instars, and 0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 ppm for the fourth instars. Control larvae were fed diet without tebufenozide. Dry diet was mixed with various amounts of the 70% WP formulation to produce the different treatments. Treated diet was stored in the refrigerator. On the basis of 100 g of the diet, 80 ml of distilled water was added to 20 g of diet mix just before it was used

in experiments. For each instar between 25 and 50 individuals were tested per concentration. Mortality was assessed after seven days.

Topical Toxicity of Tebufenozide to Adults. To assess the direct toxicity to adults, one day old unmated moths were placed with the wings down on trap liners coated with a thin layer of polybutene adhesive (Tanglefoot Co., Grand Rapids, MI). Moths were sprayed in the spray tower with 400 ppm tebufenozide plus 0.05% adjuvant (Latron B-1956). Control moths were sprayed with distilled water plus adjuvant. Groups of five moths (total of 30 per sex) were treated in this manner. Moths were checked daily until all had died.

Statistical Analysis. Dose-mortality data were analyzed by probit analysis using POLO-PC (LeOra Software 1987) to calculate LC values, dose-response lines, and compare responses from different bioassays. All other statistical procedures such as two sample t-tests, analysis of variance (ANOVA), and Fischer's LSD multiple-comparison tests were carried out with the Number Cruncher Statistical System (Hintze 1995).

Results and Discussion

Residual and Topical Toxicity of Tebufenozide to Eggs. The residual toxicity of tebufenozide to codling moth eggs varied considerably with the substrate on which eggs were laid (Table 1a). On sprayed leaves the LC_{50} for eggs was 4.35 ppm. By comparison, on sprayed fruit egg mortality was very low and was not different from the untreated control except for the two highest concentrations (Table 2). No dose-response line and LC values could be calculated to characterize the residual toxicity of tebufenozide to eggs on the fruit surface. Similarly, tebufenozide sprayed on waxed paper had no toxicity to codling moth eggs laid on top of the residue (Table 2). The method of application also affected the mortality response on fruit. When apples were dipped instead of sprayed tebufenozide was more toxic to eggs and it was still possible to obtain a dose-mortality response. The increased toxicity on dipped fruit was likely due to a higher deposit, different deposit structure, and improved distribution of the residue. However, even on dipped fruit tebufenozide residue was significantly less toxic to codling moth eggs than on

sprayed leaves as indicated by the higher LC_{50} (about 30 times) and a flatter slope of the dose-response line (Table 1a).

Tebufenozide was about 30 times more toxic when codling moth eggs were laid on top of sprayed leaves ($LC_{50} = 4.35$ ppm) than when they were treated topically ($LC_{50} = 123.8$ ppm). As with the residual treatments, a substrate effect was also noted with the topical treatment. Eggs on leaves showed a clear dose-response to topical tebufenozide treatments while eggs on the apple surface were not affected (Table 1b). The age of eggs had little effect on susceptibility to topically applied tebufenozide as shown in tests with eggs on waxed paper except when they were close to the point of hatching (Table 3). Eggs in the 'white' stage of development were as susceptible as eggs in the 'red ring' stage. In both cases tebufenozide caused mortality ranging from 40 to 60% with no discernible increase in mortality from the lowest to the highest concentration tested (75 to 600 ppm, respectively). It is not clear why this was so. Eggs in the 'black head' stage close to hatching showed no effect from topical tebufenozide treatments.

Although previous studies with codling moth and other Lepidoptera suggested otherwise (Charmillot et al. 1994a&b), our results demonstrate that the ecdysone agonist tebufenozide has ovicidal activity against codling moth. It is likely that the lack of ovicidal activity of tebufenozide to codling moth reported by Charmillot et al. (1994b) was due to the inert oviposition substrate (plastic) used in the experiments. This is the first time that such a pronounced substrate effect was observed for an IGR. It is possible that the ovicidal activity of other IGRs (e.g., chitin synthesis inhibitors, juvenile hormone mimics) is affected in a similar way depending on the plant part on which eggs are laid. We did not investigate why tebufenozide was more toxic on leaves than on fruit and can only speculate on the underlying mechanisms involved. Apple leaves and fruit differ greatly in terms of their surface characteristics, morphology, and microclimate of the boundary layer (e.g., humidity). Apple leaves have large numbers of stomata which regulate gas exchange and transpiration. The lower leaf surface can have more than several hundred stomata/mm, while the upper leaf surface has none (Barceló et al. 1987). However, some transpiration also occurs through the cuticle on the upper leaf surface. We suggest that the humidity permeating through the leaf cuticle on the upper surface is enough to keep the chorion

permeable, allow tebufenozide to move from the leaf surface into the egg, and interrupt normal egg development. The situation is quite different on the fruit. Gas exchange through the epidermis of a fruit is facilitated primarily by the lenticels which are not nearly as dense as stomata on a leaf. Except for the lenticels, the fruit exterior consists mostly of a thick layer of wax which protects the fruit and prevents water loss. Little humidity can travel through the fruit epidermis and the exterior wax layer. Therefore, due to the lack of humidity the underside of a codling moth egg laid on the fruit surface would not be as permeable as on a leaf. This could explain why eggs on treated fruit were not affected to the same extent by tebufenozide residue as eggs laid on treated leaves. Another possible explanation for the lower toxicity of tebufenozide residue to eggs on fruit is that the compound gets bound up in the wax layer of the fruit cuticle and, as a result, is not as readily available as residue on the leaf surface. An interesting substrate effect was recently observed with horticultural spray oils applied topically to codling moth eggs. In that case, the substrate effect was reverse. Oil was more toxic to eggs laid on the fruit surface and less toxic to eggs on leaves (H. Riedl, unpublished data). The ability of oil-treated eggs to respire through the underlying leaf tissue, especially at high humidity when the stomata are fully open, may be responsible for their increased survival compared to eggs on the waxy fruit surface. It was surprising that there was also a substrate effect with topical application. Topically applied tebufenozide was more toxic to eggs on leaves than to eggs on fruit. We suggest that the high humidity in the boundary layer of a leaf (as compared to low humidity on a fruit) may be responsible for keeping the exposed upper side of the egg permeable which would facilitate greater penetration of the toxicant through the chorion.

It is important to view these findings relative to the oviposition behavior of the codling moth, in particular the placement of eggs. On apple as well as pear the female moth lays most of its eggs on foliage close to a fruit. The proportion of eggs found on different plant parts varies with the host, cultivar and time of year. For instance, on Bartlett pear Westigard et al. (1979) found only 11% of all eggs on the fruit while the majority (74%) was laid on the underside of leaves. On apple the proportion of eggs laid on the fruit is generally higher than on pear due to the greater pubescence of apple leaves which discourages egg-laying. Wood (1965), studying several apple cultivars, reported about 40% of eggs on the fruit, 40% on the upper and 20% on the lower surface of leaves. Our

research has shown that eggs on the fruit are less susceptible to tebufenozide and many are likely to survive exposure than eggs on foliage. In addition, neonates hatching from eggs on the fruit have a greater chance for survival than neonates hatching from eggs on leaves since they do not have to travel as far before they bore into the fruit. Jackson (1982) has shown that the probability for neonates to reach a fruit and make a successful entry decreases with the distance they have to travel. These two factors combined give eggs on the fruit greater importance although their numbers, especially on pears, may appear small relative to the eggs laid on foliage.

Table 1. Residual (a) and topical (b) toxicity of tebufenozide to codling moth eggs laid on different oviposition substrates; LC values expressed in ppm.

Substrate	n	Slope \pm SE	LC ₅₀	LC ₉₀	χ^2
	tested		95% CL	95% CL	
(a) Residual toxicity					
Apple - leaf	1053	1.12 \pm 0.08	4.35	59.43	45.0
			2.55 - 6.70	31.23 - 181.68	2
Apple - fruit ^a	1610	0.65 \pm 0.06	117.47	10590	37.6
			51.17 - 387.87	1844.1 - 0.7E+06	2
Apple - fruit	2718		Conditions for probit analysis not met		
Waxed paper	488		Conditions for probit analysis not met		
(b) Topical toxicity					
Apple - leaf	528	1.10 \pm 0.28	123.75	1805.5	0.0
			45.4 - 182.3	927.9 - 12902.0	5
Apple - fruit	566		Conditions for probit analysis not met		
Waxed paper	1825		Conditions for probit analysis not met for any of the egg development stages tested		

^a Dipped for 5 s; sprayed in other tests.

Table 2. Residual toxicity of tebufenozide to codling moth eggs laid on treated apples or waxed paper.

Concentration (ppm)	Apple % egg mortality \pm SE	Waxed paper % egg mortality \pm SE
Untreated control	7.86 \pm 3.34a	10.55 \pm 2.81NS
37.5	15.63 \pm 5.34ab	-
150	16.68 \pm 5.23ab	5.55 \pm 3.05
300	26.96 \pm 7.35b	7.24 \pm 3.70
600	28.76 \pm 4.26b	5.30 \pm 2.80

Means followed by the same letter are not significantly different; NS=not significant. Data transformed to arcsine for ANOVA: apples ($F=4.12$; $df=4, 19$; $P<0.05$); waxed paper ($F=0.61$; $df=3, 8$; $P=0.627$).

Table 3. Topical toxicity of tebufenozide to codling moth eggs laid on apple and waxed paper; eggs on waxed paper treated at three different stages of development.

Concentration (ppm)	% egg mortality \pm SE			
	Apple White stage	Waxed paper White stage	Waxed paper Red ring	Waxed paper Black head
Untreated control	4.16 \pm 1.06NS	11.2 \pm 4.08a	12 \pm 3.79a	7.2 \pm 2.65NS
75	-	40.8 \pm 7.53b	60 \pm 6.81b	14.4 \pm 4.12
150	10.95 \pm 6.07	46.4 \pm 10.63b	46.4 \pm 9.52b	13.6 \pm 3.92
300	5.09 \pm 2.65	46.4 \pm 7.55b	54.4 \pm 7.0b	7.2 \pm 2.94
600	7.26 \pm 3.49	55.2 \pm 5.12b	63.2 \pm 12.09b	5.6 \pm 2.99

Means followed by the same letter are not significantly different; NS = not significant. Data transformed to arcsine for ANOVA: eggs (white stage) on apples ($F=0.60$; $df=3, 8$; $P=0.630$); eggs on waxed paper: 'white' stage ($F=6.30$; $df=4, 20$; $P<0.01$); 'red ring' stage ($F=5.86$; $df=4, 20$; $P<0.01$); 'black head' stage ($F=1.16$; $df=4, 20$; $P=0.357$).

Oral Toxicity of Tebufenozide to Neonate Larvae on Treated Apples. Tebufenozide was highly active against codling moth neonates when it was ingested during fruit entry as

indicated by the low LC_{50} of 16.08 ppm (Table 4a). Some feeding damage occurred even at the highest concentrations suggesting that tebufenozide's effect on larvae is not immediate after it is ingested (Table 5). At the lower concentrations most larvae produced deep entries. At 60 ppm, the highest concentration tested, larval mortality exceeded 90% and most feeding damage consisted of stings (superficial, shallow feeding). The first visible sign of the effects of tebufenozide on neonates is that they stop feeding and lose mobility. This effect occurs within 24 h after neonates begin to feed on the treated fruit surface. Within the following 24 h the neonate larva attempts to shed its old head capsule but cannot complete the process. The lighter colored newly formed head capsule becomes clearly visible underneath the darker colored old head capsule. Eventually, without being able to feed, the young larva with two head capsules stacked on top of each other dies.

Oral Toxicity of Diet-Incorporated Tebufenozide to Different Larval Instars. In these experiments tebufenozide (70% WP) was added to an instant soybean-wheat germ diet. Larvae continuously ingested tebufenozide while feeding on the diet. By comparison, on sprayed apples neonates only have an opportunity to ingest tebufenozide while penetrating the skin of the fruit (see above). Therefore, it was expected that the LC values for neonates feeding on tebufenozide-laced diet would be substantially lower than the comparable values on treated apples (Table 4b). The LC_{50} for neonates feeding on artificial diet was 0.22 ppm compared with 16.08 ppm on treated apples. The dose-mortality response of neonates was significantly different from older larvae as indicated by a steeper slope and lower LC values (Table 4b). Second and third instars responded in a similar way to tebufenozide and there was no difference in the slope and intercept of the dose-response lines. Of the different instars tested, fourth instars were the least susceptible to tebufenozide as indicated by the higher LC values. The dose-responses lines of first and fourth instars were significantly different from the response lines of instars two and three. Tebufenozide treated artificial diet has been used previously to assess the susceptibility of lepidopterous larvae. Chandler et al. (1992) applied tebufenozide spray to the surface of artificial diet and also mixed a tebufenozide water emulsion with dry diet to evaluate the susceptibility of *Spodoptera exigua* Huebner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Budía et al. (1994), also working with *S. exigua*, used an agar-based diet for the same purpose. The disadvantage of agar-based diets is that the insecticide is mixed in with the diet while it is

still liquid. This can only occur at higher temperatures which may cause some break-down of the insecticide. The advantage of the instant soybean-wheat germ diet we used is that it can be prepared at room temperature and that heating is not necessary.

Table 4. Oral toxicity of tebufenozide (70% WP) to codling moth larvae feeding on (a) treated apples and on (b) treated soybean-wheat germ diet; LC values expressed in ppm.

Instar	n tested	Slope \pm SE	LC ₅₀ 95% CL	LC ₉₀ 95% CL	X ²
(a)					
L1	702	2.43 \pm 0.22	16.08 12.4 - 19.9	53.98 41.0 - 81.1	22.02
(b)					
L1	125	4.46 \pm 0.78	0.22 0.19 - 0.26	0.44 0.36 - 0.64	1.07
L2 ^a	106	2.13 \pm 0.64	0.40 0.17 - 0.60	1.58 0.95 - 7.60	0.01
L3 ^a	152	1.72 \pm 0.37	0.29 0.16 - 0.44	1.62 0.96 - 4.78	0.19
L4	206	2.92 \pm 0.82	1.47 0.86 - 2.17	4.03 2.60 - 13.11	1.19
L2 & L3 (combined)	258	1.86 \pm 0.30	0.34 0.24 - 0.43	1.64 1.10 - 3.27	1.47

^a Dose-response lines for L2 and L3 are the same; both are significantly different from L1 and L4.

Table 5. Mortality and feeding damage of neonate codling moth larvae on apples treated with tebufenozide.

Concentration (ppm)	% mortality \pm SE	% entries \pm SE	% stings \pm SE
Untreated control	11.67 \pm 2.87	85.83 \pm 3.10a	10.00 \pm 2.84a
3.75	13.33 \pm 3.11	80.83 \pm 4.10ab	15.83 \pm 3.28ab
7.5	25.83 \pm 4.31	70.83 \pm 4.57b	25.00 \pm 4.56b
15	60.28 \pm 4.35	41.39 \pm 4.79c	52.78 \pm 4.49c
30	71.39 \pm 5.19	26.94 \pm 5.22d	70.28 \pm 4.95d
60	93.33 \pm 2.66	4.17 \pm 2.10e	84.72 \pm 3.12e

Means followed by the same letter are not significantly different. Data transformed to arcsine for ANOVA: entries ($F=59.66$; $df=5, 174$; $P<0.01$); stings ($F=51.55$; $df=5, 174$; $P<0.01$).

Contact Toxicity of Tebufenozide to Neonate Larvae. Exposing neonates to residue on natural and artificial substrates had notable effects on larval survival. These results suggest that tebufenozide may have some contact activity although it is difficult to exclude the possibility that some tebufenozide was ingested during exploratory feeding. Neonates moving around for 1 h on apple leaves treated with different concentrations of tebufenozide were definitely affected by this exposure (Table 6). However, the LC_{50} for a 1 h contact exposure on treated leaves was considerably lower than the oral LC_{50} on treated apples (499.9 vs. 16.08 ppm, respectively). Contact exposure to residue in plastic petri dishes did not affect subsequent larval survival as much as exposure on treated leaves (Table 6). For instance, a 4 h exposure in the plastic dishes had roughly the same effect as a 1 h exposure on treated leaves as indicated by the respective LC_{50} values (499.9 vs. 348.7 ppm). As expected, contact toxicity of tebufenozide to neonates increased with the duration of exposure in the plastic dishes. Possible reasons why tebufenozide exposure on leaves produced higher larval mortality than exposure in the petri dishes, are that neonates do more exploratory feeding on a natural substrate than on a plastic surface. Also, the deposit structure of tebufenozide and the microclimatic conditions on a leaf surface may be such that tebufenozide is more easily picked up by larvae on a leaf than on a plastic surface. Jackson (1982) reported that exploratory feeding on the leaf surface may help

sustain larvae during extended search periods. In the field, neonates spend on average 2 h searching for a fruit. Once they reach a fruit, they may spend another 45 min or longer before they penetrate the skin (Jackson 1982). In light of our findings and the extended time periods neonate larvae may spend searching for a suitable fruit it appears that contact exposure to tebufenozide should not be ignored as a larval mortality factor.

Table 6. Mortality of neonate codling moth larvae following timed exposures to tebufenozide residue on treated substrates; LC values expressed in ppm.

Exposure (h)	n tested	Slope \pm SE	LC ₅₀ 95% CL	LC ₉₀ 95% CL	X ²
1 ^a	598	2.26 \pm 0.40	499.9 310.1 - 896.5	1844.7 983.2 - 8821.5	16.93
2	580	2.17 \pm 0.27	894.8 489.5 - 1701.2	3472.2 1788 - 4E+04	19.11
4	381	1.51 \pm 0.33	348.7 179.9 - 799.3 ^b	2444.8 970.9 - 1E+07 ^b	7.14
6	200	2.60 \pm 0.59	111.5 71.5 - 145.7	345.7 247.7 - 715.8	0.13

^a Neonates placed on treated apple leaves; inside treated plastic petri dishes in other tests.

^b 90% CL calculated due to heterogeneity of data.

Toxicity of Tebufenozide to Adults. Tebufenozide had no direct toxicity to moths and did not decrease their longevity (Table 7). Male as well female moths sprayed with 400 ppm of tebufenozide lived as long as moths sprayed with distilled water. The average life span of moths in our tests was 6 to 7 days. Information on the longevity of moths reported in the literature varies widely. According to Tadic (1957) moths can live as long as 13-18 days under field conditions. In the laboratory, however, their life span can be considerably shorter. White and Hutt (1973) reported an average longevity of 3.9 and 5.3 days for male and female moths, respectively.

Table 7. Longevity (d) of male and female codling moth adults treated topically with tebufenozide.

Concentration (ppm)	Males Number of days \pm SE	Females Number of days \pm SE
Untreated control	6.06 \pm 0.71	7.03 \pm 0.81
400	7.06 \pm 0.53	6.53 \pm 0.54

Data transformed to \sqrt{x} for the analysis. Non-parametric t-test (Kolmogorov-Smirnov) used due to unequal variances. Differences between treatments not significant: males ($t=0.35$; $df=58$; $P=0.297$); females ($t=0.35$; $df=58$; $P=0.594$).

Assessing the Susceptibility of Field-Collected Larvae to Tebufenozide. The use of a tebufenozide-laced artificial diet promises to be a convenient bioassay method to evaluate the susceptibility status of codling moth larvae to tebufenozide. A laboratory spray tower is not necessary for this bioassay since the insecticide is incorporated in the diet. Our results suggest that second and third instars can be tested as a group since their toxicological response to tebufenozide was the same. For resistance testing, codling moth larvae can be obtained from infested fruit collected in the field. As was done in the present study, the age of larvae can be conveniently determined by head capsule width measurements with the aid of a stereo microscope. After sorting larvae by size, only those larvae whose head capsule width measures between 0.5 and 0.8 mm (second and third instars) are used for the bioassays. Each larva is then placed in a small plastic cup containing 2 ml of prepared soybean-wheat germ diet mixed with tebufenozide. Different concentrations of the tebufenozide-diet mix are obtained as described above. The tebufenozide laced diet is conveniently stored in dry form in the refrigerator and mixed with water just prior to testing. A range of concentrations should be tested with at least 30 larvae per concentration. The bioassay diet should be conducted and assessed in the same manner as described here. After correcting for natural mortality using Abbott's formula (Abbott 1925), concentration-mortality response data can be plotted on log-probit paper for a graphic determination of LC_{50} and LC_{90} values or data can be analyzed with a probit analysis program. Mortality response lines can then be compared to the reference line for second and third instars (combined) in Table 4b. It is desirable that reference lines are

established for local populations before tebufenozide is commercially used in an area to assess the regional variability in larval susceptibility to this IGR.

Implications for Timing of Codling Moth Control Programs Using Tebufenozide.

The susceptibility of different codling moth life stages to an insecticide must be taken into account for the timing of sprays in the field. There is more latitude in terms of timing with a broad-spectrum OP insecticide since it controls several codling moth life stages. For instance, azinphosmethyl controls neonate larvae but also adults and eggs (Brunson and Dean 1963). Seasonal sprays are timed to egg hatch and the presence of neonate larvae. The first azinphosmethyl spray is applied at 250 DD after Biofix (beginning of spring flight estimated by pheromone trap) when the first eggs begin to hatch. By comparison, timing of codling moth sprays with insecticides whose spectrum of activity is limited only to one life stage (e.g., eggs) has to be more exact for adequate control. The ovicidal IGRs diflubenzuron and fenoxycarb are only effective against codling moth if eggs are laid on top of the residue (Moffitt et al. 1984). Therefore, these products have to be applied at the beginning and at the peak of egg-laying in each generation (at 100 and 550 DD from Biofix in the first and at 1100 and 1550 DD in the second generation, respectively). Our research has shown that tebufenozide has ovicidal and larvicidal but no adulticidal activity against codling moth. This should give tebufenozide more flexibility in terms of spray timing compared with the ovicidal IGRs. Therefore, it does not appear as critical at what point of egg development the first codling moth spray is applied since tebufenozide also controls neonates. The first tebufenozide spray in the spring could be applied as early as 100 DD from Biofix when egg-laying begins but no later than 250 DD when the first eggs begin to hatch. However, it may be advantageous to apply tebufenozide not at the beginning of egg-laying (100 DD) but to delay the first spray until more foliage has expanded and residue is not diluted as much by rapid leaf and fruit growth, and because some of the eggs (those laid on apples) would not be controlled. Potential impacts on beneficials (e.g., pollinators, natural enemies) do not appear to be a problem with tebufenozide and do not have to be considered when timing sprays since tebufenozide is only active against lepidopterous insects.

Acknowledgements. This research was supported by grants to the senior author from the University of Lleida and the Generalitat de Catalunya (CIRIT), Spain in 1993/94. The authors also acknowledge with thanks the financial support and test materials provided by Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA.

References Cited

- Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of a pesticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Barceló, J., G. Nicolás, B. Sabater & R. Sánchez. 1987.** Pérdida de agua por la planta. Transpiración, pp. 106-139. *In* Ediciones Pirámide S.A. Fisiología vegetal. Madrid, 819 p.
- Brunson, M.H. & F.P. Dean. 1963.** Bioassay of the toxicity of insecticides to the codling moth in apple orchards. U.S. Dep. Agric. ARS-33-90.
- Budía, F., V. Marco & E. Viñuela. 1994.** Estudios preliminares de los efectos del insecticida RH-5992 sobre larvas de distintas edades de *Spodoptera exigua* (Hübner). *Bol. San. Veg. Plagas* 20: 401-408.
- Chandler, L. D., S. D. Pair & W. E. Harrison. 1992.** RH-5992, a new insect growth regulator active against corn earworm and fall armyworm. *J. Econ. Entomol.* 85: 1099-1103.
- Charmillot, P. J., R. Favre, M. Pasquier, M. Rhyn & A. Scalco. 1994a.** Effet du régulateur de croissance d'insectes (RCI) tébufénozide sur les oeufs, les larves et les papillons des vers de la grappe *Lobesia botrana* DEN. & SCHIFF. et *Eupoecilla ambiguella* Hb. *Mitteil. Schweiz. Entomol. Gesellsch.* 67: 393-402.
- Charmillot P. J., D. Pasquier & N. J. Alipaz. 1994b.** La tébufénozide, un nouveau produit sélectif de lutte contre le carpocapse *Cydia pomonella* L. et la tordeuse de la pelure *Adoxophyes orana* F.V.R. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 26: 123-129.
- Croft, B. A. & H. W. Riedl. 1991.** Chemical control and resistance to pesticides of the codling moth, pp. 371-387. *In* L.P.S. van der Geest & H. H. Evenhuis (eds.), *Tortricid pests: their biology, natural enemies and control.* Elsevier, Amsterdam, 808 p.
- Hintze, J. L. 1995.** Number Cruncher Statistical System, version 6.0. Kaysville, UT.

- Jackson, D.M. 1982.** Searching behavior and survival of first instar codling moths. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 75: 284-289.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC, a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Inc., Berkeley, CA.
- Moffitt, H.R., K.D. Mantey, & G. Tamaki. 1984.** Effects of residues of chitin-synthesis inhibitors on egg hatch and subsequent larval entry of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera:Olethreutidae). *Can. Entomol.* 116: 1057-1062.
- Pons, S., M. Eizaguirre, M.J. Sarasua & J. Avilla. 1994.** Influencia del fotoperiodo sobre la inducción de diapausa de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) en laboratorio y campo. *Invest. Agr. Prod. Prot. veg.* 9: 477-492.
- Reissig, H., D. H. Dunham & C. Smith. 1995.** Apple, secondary pest insecticide testing, 1994. *Arthropod Management Tests* 20: 33-35.
- Riedl, H. & J.F. Brunner. 1996.** Insect growth regulators provide new pest control tools for Pacific Northwest orchards. *Proc. 92nd Ann. Mtg. Wash. State Hort. Assoc.*, pp. 189-200.
- Riedl, H. & W. Loher. 1980.** Circadian control of oviposition in the codling moth, *Laspeyresia pomonella*, Lepidoptera: Olethreutidae. *Entomol. Exp. & Appl.* 27: 38-49.
- Riedl, H. & P. W. Shearer. 1988.** Apple, pest control with IGRs, 1987. *Arthropod Management Tests* 13: 30-31.
- Riedl, H. & P. W. Shearer. 1989.** Insect control with insect growth regulators, 1988. *Arthropod Management Tests* 14: 32-33.
- Riedl, H. & P. W. Shearer. 1990.** Full season insecticide evaluations, 1989. *Arthropod Management Tests* 15: 35-37.
- Riedl, H. & R. Zelger. 1994.** Erste Ergebnisse der Untersuchungen zur Resistenz des Apfelwicklers gegenueber Diflubenzuron. *Obstbau-Weinbau* 31: 107-109.
- Riedl, H., J. Halaj, W.B. Kreowski, R.J. Hilton, and P.H. Westigard. 1995.** Laboratory evaluation of mineral oils for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 140-147.

- Sauphanor, B. & J.C. Bouvier. 1995.** Cross resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. Pestic. Sci. 45:369-375.
- Sender, C. 1969.** Élevage permanent du carpocapse des pommes, *Carpocapsa* (=Laspeyresia) *pomonella* L. sur milieu artificiel simplifié. Ann. Zool. Ecol. Anim. 1: 321-326.
- Tadic, M. 1957.** The bionomics of the codling moth (*Carpocapsa pomonella* L.) as the basis for its control. Mem. Inst. Plant Prot. (Belgrade) 4: 100 pp.
- Westigard, P.H., P.B. Lombard & D.W. Berry. 1979.** Integrated management of insects and mites attacking pear in southern Oregon. Oreg. State Univ. Agric. Exp. Sta. Bull. 634: 41pp.
- White, L. D. & R. B. Hutt. 1973.** Codling moth: effects of chilling on longevity and mating of adults. J. Econ. Entomol. 66: 558.
- Wing, K. D., R. A Slawecki & G. R: Carlson. 1988.** RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval Lepidoptera. Science 241: 470-472.
- Wood, T.G. 1965.** Field observations on flight and oviposition of the codling moth and mortality of eggs and first instar larvae in an integrated control orchard. New Zealand Agric. Res. J. 8: 1043-1059.

Capítulo III

**Larvicidal activity of the IGR's tebufenozide, RH 2485,
diflubenzuron and fenoxicarb on neonate larvae of *Cydia pomonella*
(Lepidoptera: Tortricidae)**

Pons et al.: Codling moth neonate larvae control with IGR's

SEBASTIÀ PONS^{1*}, HELMUT RIEDL¹ AND JESÚS AVILLA²

¹Oregon State University, Mid-Columbia Agricultural Research and Extension
Center,

3005 Experiment Station Drive, Hood River, OR 97031

²Centre UdL-IRTA de R+D, Area de Protecció de Conreus, Av. Rovira Roure 177,
25198 Lleida, Spain.

* Current address: DuPont Iberica S.A., Protección de Cultivos, Av. Diagonal 561,
08029 Barcelona, Spain.

Preparado para: Journal of Economic Entomology

ABSTRACT.

The efficacy of two ecdysone agonist of the molting hormone ecdysone (tebufenozide [RH 5992] and RH 2485), a chitin inhibitor (diflubenzuron), and a juvenile hormone analogue (fenoxycarb) was compared against first instar of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). Both ecdysone agonists showed good activity against neonate which fed on treated apples, and RH 2485 had the greatest larvicidal activity. The LC50 for tebufenozide was 12.09 ppm and for RH 2485 was 3.09 ppm. Neonate larvae suffered no mortality when they fed on apples treated with a high rate (200 ppm) of fenoxycarb or diflubenzuron, and the average of damage was not significant different from the control.

Key words: codling moth, tebufenozide, IGR's.

The codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) is a worldwide pest of pome fruits and walnuts. For the last 35 years control has been achieved primarily by the frequent application of organophosphate (OP) sprays between bloom and harvest (Croft & Riedl 1991). Although still effective in most fruit-growing areas, the broadspectrum activity of organophosphates such as azinphosmethyl and the lack of acceptable selective control options have prevented the implementation of integrated control programs on tree fruits on a wider scale. Since the mid 1970's, the agricultural chemical industry has actively pursued the development of selective insecticides for codling moth control as alternatives for OP insecticides. Insect growth regulators (IGR's) were among the more promising new insecticides for codling moth control which came out of this development effort. They combine effectiveness against key pests with selectivity to predatory mites and other natural enemies. In contrast to the neurotoxic conventional OP insecticides, IGR's offered new modes of action by interfering with hormonal regulation of insect growth. IGR's fall into three groups depending on their mode of action: the chitin-synthesis inhibitors such as diflubenzuron which interferes with chitin formation (Kuijpers 1992); the juvenile hormone mimics such as fenoxycarb which produces numeriea larval, anormal pupation or not well developed adults (Charmillot 1989), and the more recently discovered ecdysone agonists such as tebufenozide which interferes with the molting process (Chandler et al. 1992, Smaghe & Degheele 1994a, 1994b), as well as it was the previous molecule RH 5849 (Wing 1988, Wing et al. 1988, Monthéan & Potter 1992). Chitin synthesis inhibitors are primarily active against codling moth eggs. Therefore, sprays have to be timed to oviposition and not to egg hatch moth control (Westigard 1979, Anderson & Elliot 1982). However, use of chitin synthesis inhibitors against codling moth has decreased in recent years in some areas because of resistance development.

RH 5849 and tebufenozide (RH 5992) were the first ecdysone agonists to be tested for codling moth control. Field studies carried out in Oregon compared their efficacy with other IGR's such as fenoxycarb and diflubenzuron (Riedl & Shearer 1988, 1989, 1990) where good control was achieved with any of ecdysone hormone analogues, comparable to a regular organophosphate treatment. Laboratory studies conducted by Chandler (1994) to compare the larvicidal activity of tebufenozide, diflubenzuron and fenoxycarb against the beet armyworm showed faster knockdown of the ecdysone hormone analogue and the

chitin synthesis inhibitor when applied 1 and 6-d-old larvae than fenoxycarb. Thorough studies to evaluate and compare the effects of RH 5992, RH 2485, diflubenzuron and fenoxycarb on mortality of codling moth neonate have not been conducted. This study was aimed to quantify and compare the effect of four different IGR's (RH 5992, RH 2485, diflubenzuron and fenoxycarb) on codling moth neonate, using a laboratory methodology that could match as much as possible the insecticide ingestion process of the larvae.

Materials and Methods

Chemicals. Formulated tebufenozide (RH 5992 2F [flowable]) and RH 2485 2F were obtained from Rohm & Haas (Spring House, PA), formulated fenoxycarb (Comply® 25WP [wettable powder]) was obtained from Ciba-Geigy Corporation (Citrus Heights, CA), and formulated diflubenzuron (Dimilin® 25WP) was obtained from UNIROYAL Chemical Co. Inc. (Bethany, CT).

Insects. A colony of *C. pomonella* was collected in 1991 in an apple block at the Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center, Hood River, OR. It was maintained in an insectary room under the conditions of $24 \pm 2.5^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h. The larval diet consisted on thinning apples.

Methodological Procedure. Apples (diameter 35-40 mm) from unsprayed Red Delicious trees, with the stem end up, were individually treated in the Potter spray tower fitted with a Final spraying nozzle (Burkhard, Rickmanshire, UK) (Potter 1952). Each treatment consisted of 2 ml applied at 103 kPa with a 5s settling time. The rates used were 3.75, 7.5, 15, 30 and 60 ppm for the ecdysone agonist, and 200 ppm for fenoxycarb and diflubenzuron. Control apples were sprayed with distilled water. Once the apples dried, four No. 1 gelatin capsules (Eli Lilly, Indianapolis, IN) with one end cut away were attached with bee wax to the treated apple surface on the upper side (Figure 1). A single egg in the blackhead stage, close to hatching, was cut from waxed paper and enclosed in each capsule. The number of tested eggs was between 25 and 32 per replication, with a total of four replications for the RH 5992 2F, and three for the RH 2485 2F. The eggs which did not hatch were not taken into account for the analysis. Apples were held at $23 \pm$

0.5°C, 80% RH and continuous light. Larval mortality and feeding damage were evaluated after 7 days.

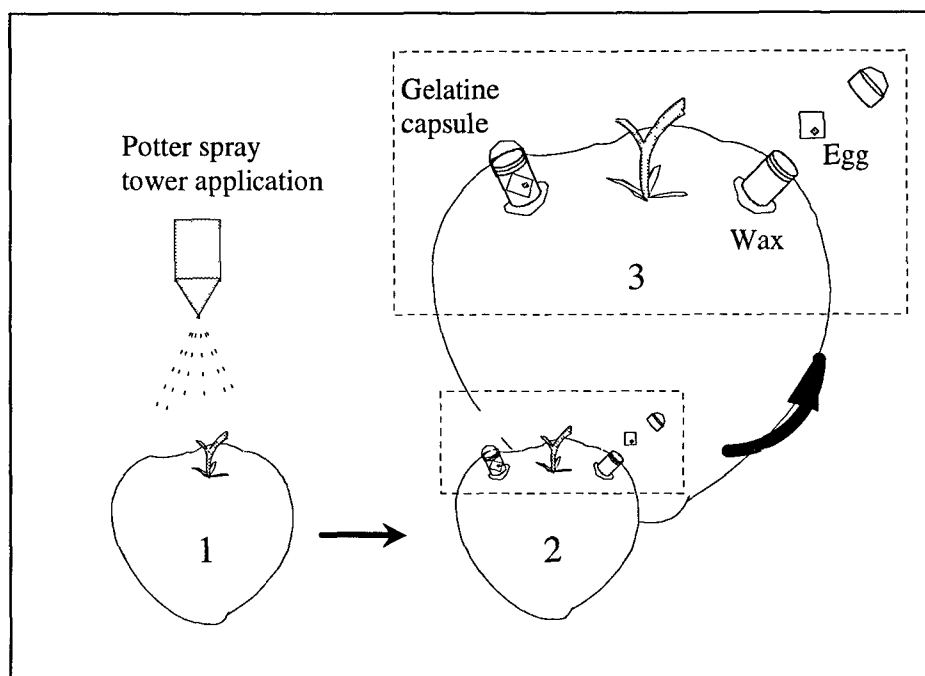


Figure 1. Application of a codling moth egg inside of a gelatine capsule glued with wax on treated apples.

Statistical Analysis. Dose-mortality data were analyzed by probit analysis (LeOra Software 1987). Two sample tests, analysis of variance, and Fischer's LSD multiple-comparison test were carried out the NCSS 6.0 program (Hintze 1995).

Results and Discussion

RH 5992 and RH 2485 were highly active against *C. pomonella* neonate larvae when the chemical was ingested while entering the fruit. Although Hull (1995) did not find significant differences between this two ecdysone agonists in field applications against *C. pomonella*, *Chorisonura rosaceana* Harris and *Argyrotaenia velutinana* Walker, RH 2485 showed greater activity against neonate codling moth larvae in laboratory test (Table 1). The ecdysone hormone is responsible of some changes in the behavior of the larva; after the release of this hormone the larva ceases feeding and prepares the molt or pupation process (Lafont et al. 1974, Bollenbacher et al. 1975). Tebufenozide (RH 5992) acts by binding the ecdysone receptor, so the larvae starts its molting process by stopping the feeding process but is not able to continue the normal process, and dies. The time between

ingestion and feeding cessation is generally enough for the larvae to produce some damage in the fruit (Table 2). The ecdysone analogue RH 2485 was more active against codling moth than RH 5992 but it was either able to avoid some damage on the treated apples (Table 3).

Table 1. Oral toxicity of the two ecdysone agonists tebufenozide and RH 2485 on neonate codling moth larvae which had been fed on treated apples

Insecticide	n	Slope \pm SE	LC50 (ppm)	LC90 (ppm)	X^2
			95%CL	95%CL	
Tebufenozide (RH 5992 2F)	628	2.18 \pm 0.20	12.09	46.68	25.8
			9.2 - 15.1	34.7 - 72.5	4
RH 2485 2F	427	1.38 \pm 0.24	3.09	26.02	13.4
			4.8 - 16.8	16.8 - 68.2	0

Table 2. Mortality, entries and stings average (\pm SE) when neonate codling moth larvae had been fed on apples treated with tebufenozide (RH 5992 2F)

Dose (ppm)	%Mortality \pm SE	%Entries \pm SE	%Stings \pm SE
Control	5.21 \pm 2.71	88.02 \pm 4.41a	5.99 \pm 2.78a
3.75 ppm	21.18 \pm 4.20	73.61 \pm 5.11b	22.22 \pm 4.36b
7.5 ppm	31.25 \pm 3.24	66.15 \pm 3.80b	31.51 \pm 3.70b
15 ppm	65.28 \pm 4.70	36.81 \pm 4.48c	62.15 \pm 4.49c
30 ppm	82.81 \pm 3.20	17.97 \pm 3.71d	78.13 \pm 3.96d
60 ppm	91.30 \pm 2.99	13.04 \pm 3.47d	85.87 \pm 3.79d

Means followed by the same letter are not significantly different. Data were transformed to arcsine for analysis. ANOVA: there were differences between concentrations in the percentage of entries ($F=51.57$; $df=5, 161$; $P<0.01$), and stings ($F=65.79$; $df=5, 161$; $P<0.01$).

Table 3. Mortality, entries and stings average (\pm SE) when neonate codling moth larvae had been fed on apples treated with RH 2485 2F

Dose (ppm)	%Mortality \pm SE	%Entries \pm SE	%Stings \pm SE
Control	3.13 \pm 1.72	96.88 \pm 1.72a	3.13 \pm 1.72a
3.75 ppm	59.78 \pm 5.71	39.13 \pm 5.51b	55.43 \pm 5.53b
7.5 ppm	67.75 \pm 4.42	35.51 \pm 3.96b	55.79 \pm 4.61b
15 ppm	87.50 \pm 4.26	8.33 \pm 2.88c	87.50 \pm 3.01c
30 ppm	93.75 \pm 2.71	4.17 \pm 2.46c	92.71 \pm 2.81c
60 ppm	97.72 \pm 1.57	1.14 \pm 1.14c	93.94 \pm 2.46c

Means followed by the same letter are not significantly different. Data were transformed to arcsine for analysis. ANOVA: there were differences between concentrations in the percentage of entries ($F=119.31$; $df=5, 134$; $P<0.01$), and stings ($F=88.36$; $df=5, 134$; $P<0.01$).

Once demonstrated the larvicidal activity of the two ecdysone mimics RH 5992 and RH 2485 it was also necessary to evaluate the toxicity of other insect growth regulator already used for the codling moth control: diflubenzuron and fenoxycarb. Both insecticides have larvicidal activity for one and seven days old larvae in the species *Helicoverpa zea* Boddie and *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith in laboratory studies (Chandler et al. 1992). In other species, like *Adoxophyes orana* F.v.R., fenoxycarb acts also as a larvicidal if applied in the last instar, but there is not any reference of larvicidal activity of this product against codling moth (Charmillot 1989, Charmillot et al. 1989). It is also mentioned the good activity of fenoxycarb as a larvicidal against *Platynota idaeusalis* Walker, where curiously it does not have any activity as ovicidal (Hull et al. 1991). Fenoxycarb did not shown any mortality against the first instar of *C. pomonella* larvae (Table 4).

In studies conducted by Kuijpers (1992) in different orders, diflubenzuron may affect several immature stages. However, diflubenzuron is between six and fifty times more toxic in eggs of codling moth than firsts instar larvae (Purcell & Granett 1986). In the field, diflubenzuron has been primarily an ovicidal, so two applications of this chitin inhibitor, with a rate of 187 ppm, coinciding with peak codling moth activity provided control comparable to a regular organophosphate treatment (Anderson & Elliot 1982), as well as

three treatment with a lower rate, matching the first and third with beginning of egg laying (Westigard 1979). The lack of larvicidal activity of diflubenzuron against the neonate of codling moth is clearly shown on Table 5.

Table 4. Mortality, entries and stings average (\pm SE) when neonate codling moth larvae had been fed on apples treated with fenoxycarb

Dose (ppm)	%Mortality \pm SE	%Entries \pm SE	%Stings \pm SE
Control	7.77 \pm 1.91	78.61 \pm 4.37	16.94 \pm 3.49
200 ppm	5.17 \pm 2.52	76.44 \pm 4.47	18.68 \pm 4.29

Means followed by the same letter are not significantly different. Data were transformed to arcsine for analysis. ANOVA: there were differences between concentrations in the percentage of mortality ($t=0.69$; $df=57$; $P=0.49$), entries ($t=0.38$; $df=57$; $P=0.71$), and stings ($t=0.15$; $df=57$; $P=0.88$).

Table 5. Mortality, entries and stings average (\pm SE) when neonate codling moth larvae had been fed on apples treated with diflubenzuron

Dose (ppm)	%Mortality \pm SE ^a	%Entries \pm SE ^b	%Stings \pm SE ^c
Control	6.25 \pm 2.26	94.10 \pm 3.49	3.13 \pm 2.29
200 ppm	3.13 \pm 2.29	97.92 \pm 1.44	1.04 \pm 1.04

Data were transformed to arcsine.

In a column, means were not significantly different (Hintze 1995).

^a Not significantly different among treatments ($t=1.25$; $df=46$; $P=0.22$).

^b Not significantly different among treatments ($t=0.82$; $df=46$; $P=0.41$).

^c Not significantly different among treatments ($t=0.74$; $df=46$; $P=0.46$).

The rate of 200 ppm, used for the larvicidal evaluations, was a dose slightly higher than recommended rates in field treatments against codling moth (Anderson & Elliot 1982, Charmillot & Iselin 1985, Charmillot 1989, Charmillot et al. 1989, Westigard 1979, Westigard & Gut 1986, Westigard et al. 1986). In treatments of diflubenzuron and fenoxycarb on larvae of the species *H. zea* and *S. frugiperda*, the larvae were apparently not affected by the insecticide after many days, depending of dose and timing (Chandler et al. 1992). In that case, it would be necessary to study if the larvae which had fed on treated

apples with fenoxycarb or diflubenzuron would be able to develop normally, pupate and have a regular reproduction. Considering this hypothesis as possible, specially in the case of fenoxycarb, that would not avoid serious damage of the larvae on fruit, which would confirm this two insecticides as exclusively ovicidal against codling moth.

Acknowledgments. This research was supported by grants to the senior author from the University of Lleida and the Generalitat de Catalunya (CIRIT), Spain in 1993/94. The authors also acknowledge with thanks the financial support and test materials provided by Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA.

References Cited

- Anderson, D. W. & R. H. Elliot. 1982.** Efficacy of diflubenzuron against the codling moth *Laspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Olethreutidae), and impact on orchard mites. *Can. Ent.* 114: 733-737.
- Bollenbacher, W. E., W. V. Vedeckis, L. J. Gilber & J. D. O'Connor. 1975.** Ecdysone titres and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. *Devel. Biol.*, 44: 46-53. In Cymborowski, B. 1992. *Insect Endocrinology*. Elsevier, PWN-Polish Scientific Publishers. 4: 77-111.
- Chandler, L. D. 1994.** Comparative effects of insect growth regulators on longevity and mortality of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. *J. Entomol. Sci.* 29(3): 357-366.
- Chandler, L. D., S. D. Pair & W. E. Harrison. 1992.** RH-5992, a new insect growth regulator active against corn earworm and fall armiworm. *J. Econ. Entomol.* 85(4): 1099-1103.
- Charmillot, P. J. 1989.** Les régulateurs de croissance d'insectes (RCI), mimiques de l'hormone juvénile, en tant que moyen de lutte morphogénétique et ovicide contre les tordeuses des verges. *Entomol. exp. appl.* 51: 59-69.
- Charmillot, P. J. & P. Iselin. 1985.** Efficacité du diflubenzuron et rémanence de son action ovicide dans la lutte contre le carpocapse, *Cydia pomonella* L. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 17(2): 109-113.

- Charmillot, P. J., B. Bloesch & M. Benz. 1989.** Lutte contre le carpocapse *Cydia pomonella* L. au moyen du fenoxycarb et du teflubenzuron. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. Vol. 21(3): 187-193.
- Croft, B. A. & H. W. Riedl. 1991.** Chemical control and resistance to pesticides of the codling moth, pp. 371-387. In L.P.S. van der Geest & H. H. Evenhuis (Eds.), Tortriced pests: their biology, natural enemies and control. Elsevier, Amsterdam.
- Hintze, J. L. 1995.** Number Cruncher statistical system, version 6.0. Kaysville, UT.
- Hull, L. A. 1995.** Apple, tufted apple bud moth management tactics, 1994. Arthropod Management Tests, 20: 20-24.
- Hull L. A., B. A. Barrett B. A. & E. G. Rajotte. 1991.** Foliar persistence and effect of fenoxycarb on *Platynota idaeusalis* (Lepidoptera: Tortricidae) on apple. J. Econ. Entomol. 84(3): 965-970.
- Kuijpers, L. A. M. 1992.** A review of the selectivity of Dimilin in orchards. Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica 27(1-4): 375-384.
- Lafont, R., J. P. Delbeque, L. De Hys, B. Mauchamp & J. L. Pennetier. 1974.** α - and β -ecdysone levels in insect haemolymph, correlation with development events. Experimentia, 31: 1241-1242. In Cymborowski, B. 1992. Insect Endocrinology. Elsevier, PWN-Polish Scientific Publishers. 4: 77-111.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC, a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Inc., Berkeley, CA.
- Monthéan, C. & D. Potter. 1992.** Effects of RH 5849, a novel insect growth regulator, on japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass. J. Econ. Entomol. 85(2): 507 -513.
- Potter, C. 1952.** An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on electrostatic charge on atomized spray fluids. Ann. appl. Biol. 39: 1-29.
- Purcell, M. & J. Granett. 1986.** Differential age susceptibility of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) to chitin synthesis inhibitors and thuginensin. J. Econ. Entomol. 79: 1624-1626.
- Riedl, H. & P. W. Shearer. 1988.** Apple, pest control with IGRs, 1897. Arthropod Management Tests, 13: 30-31.

- Riedl, H. & P. W. Shearer. 1989.** Insect control with insect growth regulators, 1988. *Arthropod Management Tests*, 14: 32-33.
- Riedl, H. & P. W. Shearer. 1990.** Full season insecticide evaluations, 1989. *Arthropod Management Tests*, 15: 35-37.
- Smagghe, G. & D. Degheele. 1994a.** Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. *Pestic. Sci.* 42: 85-92.
- Smagghe, G. & D. Degheele. 1994b.** The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biological activity of RH-5992 (Tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua*, and *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 49, 224-234.
- Westigard, P. H. 1979.** Codling moth: control on pears with diflubenzuron and effects on nontarget pest and beneficial species. *J. Econ. Entomol.* 72: 552-554.
- Westigard, P. H. & L. J. Gut. 1986.** Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) control on pears with modified programs using insect growth regulators. *J. Econ. Entomol.* 79: 247-249.
- Westigard, P. H. & L. J. Gut & W. J. Liss. 1986.** Selective control program for the pear pest complex in Southern Oregon. *J. Econ. Entomol.* 79: 250-257.
- Wing, K. D., 1988.** RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Science (Washington)*, 241: 467-469.
- Wing, K. D., R. A Slawecki & G. R: Carlson. 1988.** RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval lepidoptera. *Science (Washington)*, 241: 470-472.

Capítulo IV

Sublethal effects of tebufenozide, a molt-inducing insecticide, to the different stages of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)

Pons et al.: Sublethal effects of tebufenozide on codling moth

SEBASTIÀ PONS^{1*}, HELMUT RIEDL¹ AND JESÚS AVILLA²

¹Oregon State University, Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center,

3005 Experiment Station Drive, Hood River, OR 97031

²Centre UdL-IRTA de R+D, Area de Protecció de Conreus, Av. Rovira Roure 177, 25198 Lleida, Spain.

* Current address: DuPont Iberica S.A., Protección de Cultivos, Av. Diagonal 561, 08029 Barcelona, Spain.

Preparado para: Journal of Economic Entomology

ABSTRACT.

Sublethal effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist, tebufenozide (RH 5992), were observed on several tests conducted on different egg stages, larval instars and adults of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). It was found that a sublethal dose of tebufenozide produced a delay in the egg development when it is applied topical at white and red ring egg stage. When moths were treated topical with tebufenozide it was observed a reduction on the female fecundity and egg viability. The same effect was observed when moths were exposed during 24 hours to tebufenozide (330 g (AI)/ha) treated foliage, where the percentage of reduction was 66.8% in the fecundity and 73.6% in the fertility. It was not observed any effect in the diapause induction on the codling moth when larvae fed on treated diet and hold in diapausing conditions. When the larvae were moved to non diapausing conditions the larvae break diapause with no differences between treatments.

Key words: codling moth, tebufenozide, sublethal, IGR.

The codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) is a worldwide pest of pome fruits and walnuts. The implementation of integrated control programs on agriculture has brought the development of new insecticides to control this pest. Insect growth regulators (IGRs) were among the more promising new insecticides for codling moth control which came out of this development effort. They combine effectiveness against key pests with selectivity to predatory mites and other natural enemies. In contrast to the neurotoxic conventional OP insecticides, IGRs offered new modes of action by interfering with hormonal regulation of insect growth. Within this group there are the molting accelerating compounds (M.A.C.), insecticides that imitate the natural insect molting hormone, 20-hydroxiecaldysone.

RH 5849, as the first nonsteroidal ecdysteroid agonist (Wing 1988, Wing et al. 1988) and its succeeding RH 5992 (tebufenozide) were the first ecdysone agonists tested on larvae of Lepidoptera. Caterpillars treated with tebufenozide induced a lethal larval molt (Rohm & Haas 1992). Effects on reproductions had been reported in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Spodoptera exigua* (Hübner) treated with tebufenozide (Smagghe & Degheele 1994). In order to get a better understanding of the possibilities of the sublethal effects on the overall control of *C. pomonella*, the aim of this work was to evaluate the effect of tebufenozide in the egg development, adult fecundity and egg viability, and the effect on the diapause.

Materials and Methods

Chemicals. Formulated tebufenozide (RH 5992 2F [flowable]), RH 5992 WP [wetttable powder]), and the surfactant Latron B-1956 were obtained from Rohm & Haas (Spring House, PA).

Insects. A colony of *C. pomonella* was collected in 1991 in an apple block at the Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center, Hood River, OR. It has been maintained since then in an insectary room under the conditions of $24 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH, and a photoperiod of 16:8 (L:D) h. The larval diet consisted on thinning apples.

Product Applications. A Potter spray tower fitted with a Final spraying nozzle (Burkhard, Rickmanshire, UK) was used to apply 2 ml of the desired solutions of tebufenozide on distilled water (distilled water in control) at 103 kPa with a 5s settling time, with a room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Waxed paper (Cut-Rite, Reynolds Metal, Richmond, VA) was used as substrate for the egg laying.

Tebufenozide treatments in different codling moth egg stages and its effect on the incubation period. To assess the effect of tebufenozide on the codling moth egg incubation period, eggs of known age were treated topical and measured the egg development length. To obtain the eggs, 20 couples of codling moths were introduced in an oviposition chamber, and egg laying was conducted on wax paper. The oviposition chamber was built on top a box which had a light and an engine which periodically slide the waxed paper, therefore all eggs had the same age. The eggs were hold in a growth chamber at $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ of temperature and 80% RH. The eggs were treated topical with tebufenozide, grouping them in three different stages: white, red ring and black head egg stage. The white stage concurred with new hatched eggs, which had 7,5 degree days (threshold 10°C). The red ring stage eggs had 45 degree days, and the black head eggs had 75 degree days.

The waxed paper containing the eggs was cut in circles of 70 mm of diameter, and treated into the Potter spray tower with tebufenozide (RH-5992 2F) at the rates 75, 150, 300 and 600 ppm. After drying, small pieces of waxed paper with a single egg each were cut out and returned to a growth chamber. The number of eggs per replication was 25, with a total of 5 replications. Since the objective of this test was to determine any effect of the insecticide in the egg development, those eggs which did not hatch were excluded of the analysis. The eggs were observed twice a day with an interval of 8-12 hours, and it was recorded the incubation period as well as any malfunction in the egg development.

Effects on adult fecundity and egg viability. Codling moth pupae were sexed, and located in different boxes by sex. Once the moths emerged they were kept in a cold chamber between 10 and 15°C , until they were treated in the Potter spray tower. The

moths were never more than two days in the cold chamber. The experiment consisted in a laboratory and a field test. The laboratory test had two groups of treatments: in the first both sexes were treated together with tebufenozide, in the second females and males were treated separately.

When both sexes were treated with tebufenozide (F) in the Potter spray tower, the rates used were 50, 100 and 200 ppm. It was included 0,06% of surfactant in all treatments. After sprayed, the moths were hold in petry dishes (50 x 9 mm), which had waxed paper on the base, and the lid covered by a pubescent cloth in order to concentrate egg laying on the paper. The waxed paper was changed every four days and hold in a growth chamber ($23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 80% HR and 16:8 (L:D) h.) for further egg viability checking. The number of treated couples per replication was 5 (except the first replication, which had 10 couples) with a total of 4 replications. The control included in each replication consisted in sprayed moths with distilled water plus the same amount of surfactant. The number of treated couples per replication was 5 with a total of 4 replications.

When a single sex was treated, it was used the same methodology than the previous test except that the tebufenozide rate was 400 ppm plus the 0.06% of surfactant. The treatments in this test were: only males treated, only females treated and both sexes treated with tebufenozide. The control and the males (when only the females were treated with tebufenozide) and the females (when only the males were treated with tebufenozide) were sprayed with distilled water plus the same amount of surfactant. The number of treated couples per replication was 5 with a total of 4 replications when only one sex was treated, and 6 replication when both sexes were treated.

Three apple trees from a standard Red Delicious apple orchard were sprayed with tebufenozide (WP) using a regular sprayer. The tebufenozide rate was 330 g (AI)/ha and 0.06% of surfactant was added. The spray volume was 935 l/ha and the untreated plot was sprayed with water plus the same surfactant amount. Once the spray dried, a cage was hanged at 1.75 m high, covering a small branch of the tree. The cage was a plastic structure covered by a thin cloth, 0.5 m high and 0.3 m of diameter approximately. Five codling moth unmated couples were introduced inside the cage,

and they stayed in the field for 24 hours. Thereafter, the moths were removed and held inside an oviposition chamber in the insectary room. The moths laid the eggs on waxed paper which were removed every four days, and those eggs were counted and located into petry dishes kept inside a growth chamber ($23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 80% HR, and 16:8 (L:D) h). The eggs were scouted until egg hatching stopped definitively. Therefore, the number of exposed couples to tebufenozide residue was 5 per replication with a total of 3 replications. The control was sprayed with distilled water plus the same amount of surfactant.

Effect of oral sublethal doses of tebufenozide on the diapause. Neonate larvae were kept individually inside rearing cups with 2 ml of artificial diet, which contained one of the following rates of tebufenozide (WP): 0.001; 0.01 and 0.1 ppm. The diet was a general insect dry diet (Stonfly Industries Inc. Bryan, Tx, USA) embody with 80% of distilled water. The larvae was hold in a growth chamber at $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 80% HR, and 14:10 (L:D) h during 50 days, and after this period the percentage of diapause and mortality were assessed. The number of larvae per replication was 45 with a total of 3 replications. The control included diet without the insecticide. The survival larvae were hold at $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 80% HR, and 16:8 (L:D) h conditions during 70 days. Afterwards, the percentage of diapause and mortality were again assessed.

Statistical Analysis. Two sample tests, analysis of variance, and Fischer's LSD multiple-comparison test were carried out with the NCCSS 6.0 program (Hintze 1995).

Results and Discussion

Tebufenozide treatments in different codling moth egg stages and its effect on the incubation period. The percentage of egg mortality obtained in topical treatments with tebufenozide was between 40 and 60% depending of rate and tebufenozide dose. The eggs in black head stage were the less affected by the insecticide treatments. In Table 1 there are the number of survival eggs at tebufenozide topical treatments, therefore those were the eggs used to study the embryological development length since they were able to hatch. There were statistical differences between the treatments on eggs treated at white and red ring stage, but not on black head. The average of number of days needed

to hatch was not different between the different tebufenozide rates, in any of the egg stages.

Table 1. Incubation period of codling moth eggs depending of the egg stage which were treated with tebufenozide at different rates

Rate (ppm)	White stage ^a		Red ring stage ^b		Black head stage ^c	
	n	no. days ± SE	n	no. days ± SE	n	no. days ± SE
Control	109	5.65 ± 0.24 a	110	5.38 ± 0.09 a	116	5.69 ± 0.20
75	74	6.48 ± 0.25 b	50	7.15 ± 0.33 b	107	5.62 ± 0.14
150	67	6.47 ± 0.22 b	67	7.05 ± 0.11 b	108	5.54 ± 0.16
300	67	6.70 ± 0.15 b	62	6.92 ± 0.18 b	116	5.80 ± 0.08
600	56	6.30 ± 0.26 ab	46	7.49 ± 0.42 b	118	5.40 ± 0.14

In a column, means followed by the same letter are not significantly different (Hintze 1995)

^a Significantly different among treatments ($F=3.07$; $df=4, 20$; $P<0.05$)

^b Significantly different among treatments ($F=11.46$; $df=4, 19$; $P<0.01$)

^c Not significantly different among treatments ($F=1.01$; $df=4, 20$; $P=0.425$)

The most representative stages to characterize the whole embryonic codling moth egg development are the white stage, which represents the newly laid eggs, the red ring stage, where usually typical red coloration can be observed (Tadic 1957), and black head egg or eggs close to hatch. These three egg development stages were described in detail by Richardson et al. (1982), where the 18 different embryonic stages were summarized in those three general stages. According with this author, at stage 9 starts the red ring stage, and at stage 14 starts the embryonic feeding into the egg yolk which will be completely consumed at the last stage. It is known that tebufenozide works by binding to the ecdysone receptor protein, then the larvae ceases feeding and produces a malformed cuticle and finally the death (Rohm & Haas 1992). In a normal larvae molting process, this feeding inhibition is as a consequence of an ecdysone titer increase in the insect hemolymph (Lafont et al. 1974; Bollenbacher et al. 1975). Therefore, the delay observed in the eggs treated with tebufenozide at white stage and red ring stage may be due an effect in the embryonic feeding. The greatest delay observed in eggs treated in red ring stage might be explained because of this stage is closer to the embryo feeding. In other insect species there were described several peaks levels of ecdysone during the egg development, corresponding with cuticle depositions

in the eggs (Lagueux et al. 1979). It seems that eggs close to hatch can not be disrupted due that their embryonic development is practically finished. The lack of response between the different rates of tebufenozide is unclear.

The visual effects of tebufenozide on the treated eggs which did not hatch can be included in two main groups. At the first group, there was a total inhibition of the embryo, where the egg remained white and there were not any sign of development. At the second group, it was possible to observe the abdominal segments, and in many cases the embryo almost completed its development, and the mandibles sclerotized were easily seen and even the embryo could move them. There were many eggs that could be included between this two main groups, and it was very common to see embryos with their head uncompleted sclerotized, or an unusual distribution of the red ring spots at this stage, or an unusual location of the embryo within the egg.

Effects on adult fecundity and egg viability. There were no statistical differences in the number of laid eggs and their viability when moths were treated topical with tebufenozide up to 200 ppm (Table 2). The lack of statistical differences is probably due to the heterogeneity of the data. The percentage of reduction in the average number of eggs laid per female was 27.8% when the moths were treated with a dose of 100 ppm of tebufenozide, and 60.2% when they were treated with 200 ppm. The percentage of hatching in the control was 77%, and it was 65%, 63% and 55% when tebufenozide was applied at 50, 100 and 200 ppm respectively. Although there were not statistical differences on the number of eggs laid and hatched among treatments, tebufenozide reduced egg laying in at dose dependent manner.

The number of eggs obtained per female of codling moth in this essay was low compared with the number of eggs obtained in experiments conducted by Gehring and Madsen (1963), where the fecundity was 179 and 162 eggs per female of two different laboratory codling moth rearing lines. In other rearing codling moth colonies, the fecundity was between 164 and 138 eggs per female (Cisneros & Barnes 1974). Nevertheless, in other studies the fecundity average of codling moth was around 50 and 60 eggs per female (Tadic 1957), which is much closer to the number we have gotten in

our work. The low numbers in fecundity obtained in this essay were probably due to the methodology itself. The petry dish where each codling moth couple was enclosed probably it was too small for normal mating and egg laying.

Table 2. Effect of tebufenozide on the fecundity and egg fertility per female of *C. pomonella*, at different rates per adult and topical treatment

Rate (ppm)	n (no. couples)	Fecundity ^a no. eggs ± SE	Fertility ^b no. eggs hatched ± SE
Control	25	41.96 ± 10.22	32.60 ± 9.71
50	25	42.72 ± 8.26	28.08 ± 7.84
100	25	30.28 ± 9.56	19.08 ± 7.64
200	25	16.69 ± 5.70	9.20 ± 5.07

Data transformed to $\sqrt{(x+0,5)}$ for the ANOVA analysis (Hintze 1995).

^a Not significantly different among treatments ($F=2.16$; $df=3, 96$; $P=0.097$).

^b Not significantly different among treatments ($F=1.80$; $df=3, 96$; $P=0.153$).

In the Table 3 there is represented the data obtained on the fecundity per female of *C. pomonella* when moths were sprayed topical with tebufenozide and separately by sex. In this experience the moths were only sprayed with a high rate, since it was seen that lower rates did not bring statistical differences among treatments. There were statistical differences between treatments, and the average of number of eggs laid by female were statistical different among females treated (only females and both sexes) and no treated females (only males treated and the control). Smagghe and Degheele (1994) found similar results when tebufenozide was applied on adults of *S. exigua*, where it was observed an inhibition of the formation of new oocytes, and therefore the egg laying rapidly halted. It has been demonstrated in several insect species that the ovaries are responsible for the ecdysone production and the vitellogenesis process is initiated when this hormone is released (Gwadz & Spielman 1973; Hoffmann & Gerstenlauer 1977).

Table 3. Effect of tebufenozide on the fecundity per female of *C. pomonella* when moths were treated separately by sex.

Rate (ppm)	Females no. eggs \pm SE	Males no. eggs \pm SE	Both sexes no. eggs \pm SE
<i>n</i> (<i>no. couple</i>)	20	20	30
Control	-	-	55.60 \pm 8.08 a
400	26.75 \pm 7.90 b	37.9 \pm 12.11 a	19.23 \pm 3.90 b

Data transformed to $\sqrt{(x+0,5)}$ for the ANOVA analysis. Means followed by the same letter are not significantly different (Hintze 1995). There were significant differences among treatments ($F=3.94$; $df=3, 96$; $P<0.05$).

Table 4. Effect of tebufenozide on the fertility (viable eggs) per female of *C. pomonella* when moths were treated separately by sex.

Rate (ppm)	Females no. eggs \pm SE	Males no. eggs \pm SE	Both sexes no. eggs \pm SE
<i>n</i> (<i>no. couple</i>)	20	20	30
Control	-	-	43.36 \pm 7.85 a
400	16.65 \pm 7.22 b	26.95 \pm 11.63 b	9.7 \pm 3.33 b

Data transformed to $\sqrt{(x+0,5)}$ for the ANOVA analysis. Means followed by the same letter are not significantly different (Hintze 1995). There were significant differences among treatments ($F=4.33$; $df=3, 96$; $P<0.01$).

In applications of tebufenozide on adults of *S. exigua* (Smagghe & Degheele 1994) and RH-5849 on *Popillia japonica* Newman (Monthéan & Potter 1992) there was a reduction in the oviposition, but it was not observed a decrease in the viability of the eggs laid. In the Table 4 there is represented the average of eggs hatched from tebufenozide treated moths. Contrarily to what it was found previously in other species, there were statistical differences among treatments, and the average number of viable eggs laid per codling moth female was statistical different in any tebufenozide treatment from the untreated moths. Therefore, when only males were treated with tebufenozide there was a reduction of 37.8% in the number of viable eggs laid per female. This effect

of tebufenozide on males has been observed in other lepidopteran species (Charmillot et al. 1994).

It has been reported the effect of tebufenozide on the fecundity and fertility on adults of *L. botrana* and *E. ambiguella* which were in contact with residues of 100 ppm for 48 hours (Charmillot et al. 1994). Likewise, there was a reduction in the fecundity and fertility on adults of *C. pomonella* exposed to foliage treated with tebufenozide (Table 5). The average number of eggs laid and hatched per female was significantly different from the untreated, and the percentage of reduction was 66.8% in eggs laid and 73.6% in eggs hatched. The percentage of fertility for the untreated moths was 70% and it was 55,8% when the moths were exposed to the insecticide residue. The fecundity and fertility reduction may be the most important sublethal effect, since can have an important role in the overall codling moth control.

Table 5. Effect of tebufenozide on the fecundity and fertility (viable eggs) per female of *C. pomonella* when moths were exposed to treated foliage on the field during 24 hours

Rate g (AI)/ha	n (no. couples)	Fecundity ^a no. num. eggs ± SE	Fertility ^b no. eggs hatched ± SE
Control	15	103.2 ± 7.30	72.4 ± 8.97
330	15	34.2 ± 9.51	19.1 ± 5.73

Data transformed to \sqrt{x} for the *t*-ANOVA analysis (Hintze 1995).

^a Significantly different among treatments ($t=4,97$; $P<0,01$).

^b Significantly different among treatments ($t=5,19$; $P<0,01$).

Effect of oral sublethal doses of tebufenozide on the diapause. There were statistical differences between treatments, in the larval mortality percentage, when the larvae were fed with diet containing tebufenozide (Table 6). Although there were no statistical differences on the percentage of diapause when the larvae were hold for 50 days under diapause conditions, it was observed a reduction of the percentage when the dose of tebufenozide was increased. When the tebufenozide rate was 0.1 ppm the total larval mortality was close to 82%. When the diapause period was broken with a non

diapausing photoperiod there were no differences between rates. Therefore it is not demonstrated with the methodology used in this study that tebufenozide can have an effect in the diapause of codling moth.

Table 6. Mortality and diapause percentage in larvae fed with tebufenozide treated diet and kept at 14:10 (L:D)h for 50 days. Larvae survival were kept at 16:8 (L:D)h for 70 days

Rate		(14:10)h 50 days ^a		(14:10)h 50 days+(16:8)h 70 days ^b		
ppm	n	Mortality ± SE	Diapause ± SE	n	Mortality ± SE	Diapause ± SE
Control	135	21.40 ± 6.48 ab	99.05 ± 0.95	88	33.95 ± 11.27	3.98 ± 2.02
0.001	135	12.71 ± 6.46 a	97.06 ± 1.70	95	33.41 ± 5.69	6.33 ± 1.42
0.01	135	37.03 ± 9.01 b	78.95 ± 4.16	63	45.07 ± 12.58	6.67 ± 6.67
0.1	135	81.96 ± 4.82 c	57.07 ± 24.09	12	68.89 ± 17.36	-

Data transformed to \sqrt{x} for the ANOVA analysis. Means followed by the same letter are not significantly different (Hintze 1995).

^a Significantly different among treatments for the mortality ($F=12.67$; $df=3, 8$; $P<0.01$), but not significantly different for the diapause percentage ($F=2.37$; $df=3, 8$; $P=0.146$).

^b Not significantly different among treatments for the mortality ($F=0.40$; $df=2, 6$; $P=0.687$), and either for the diapause percentage ($F=0.27$; $df.=2, 6$; $P=0.771$).

Acknowledgments. This research was supported by grants to the senior author from the University of Lleida and the Generalitat de Catalunya (CIRIT), Spain in 1993/94. The authors also acknowledge with thanks the financial support and test materials provided by Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA.

References Cited

Bollenbacher W.E., Vedeckis W.V., Gilbert L.J., O'Connor J.D., 1975. Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. Devel. Biol., 44: 46-53. In Cymborowski B., 1992. Insect endocrinology. Elsevier. Warszawa. 4: 86.

- Cisneros F.H., Barnes M.M., 1974.** Contribution to the biological and ecological characterization of apple and walnut of codling moth, *Laspeyresia pomonella* (L.): Moth longevity and oviposition capacity. *Environmental Entomol.* 3 (3): 402-406.
- Charmillot P.J., Favre R., Pasquier M., Rhyn M., Scalco A., 1994.** Effet du régulateur de croissance d'insectes (RCI) tébufenozide sur les oeufs, les larves et les papillons des vers de la grappe *Lobesia botrana* DEN. & SCHIFF. et *Eupoecilla ambiguella* Hb. *Mitteilungen Der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft Bulletin de la Société Entomologique Suisse.* 67: 393-402.
- Gehring R.D., Madsen H.F., 1963.** Some aspects of the mating and oviposition behavior of the codling moth, *Carpocapsa pomonella*. *J. Econ. Entomol.* 56 (2): 140-143.
- Gwadz R.W., Spielman A., 1973.** Corpus allatum control of ovarian development in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 19: 1441-1448. *In* Downer R. & Laufer H., 1983. *Endocrinology of Insects.* Alan R. Liss. New York. 3: 285.
- Hintze, J. L., 1995.** Number Cruncher statistical system, version 6.0. Kaysvill, UT.
- Hoffmann K.H., Gerstenlauer B., 1997.** Effects of ovariectomy and allatectomy on ecdysteroid synthesis and ecdysteroid titers during larval-adult development of *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera: Gryllidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 35: 149-158.
- Lagueux M., Hetru C., Goltzené F., Kappler C., Hoffmann J.A., 1979.** Ecdysone titer and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol* 25: 709-723. *In* Downer R. & Laufer H., 1983. *Endocrinology of Insects.* Alan R. Liss. New York. 2: 76.
- Lafont R., Delbeque J.P., De Hys L., Mauchamp B., Pennetier J.L. 1974.** α and β -ecdysone levels in insect hemolymph, correlation with development events. *Experientia*, 31: 1241-1242. *In* Cymborowski B., 1992. *Insect endocrinology.* Elsevier. Warszawa. 4: 86.
- Monthéan G., Potter D.A., 1992.** Effects of RH 5849, a novel insect growth regulator, on Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass. *J. Econ. Entomol.* 85 (2): 507-513.

- Potter C., 1952.** An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. appl. Biol.* 39: 1-29.
- Richardson J. C., C. D. Jorgensen & B. A. Croft. 1982.** Embryogenesis of the Codling Moth, *Laspeyresia pomonella*: Use in Validating Phenology Models. *Ann. Entomol. So. Am.* 75: 201-209.
- Rohm & Haas, 1992.** Technical Bulletin.
- Smagghe G., Degheele D., 1994.** The significance of pharmacokinetics and metabolism to the biological activity of RH-5992 (Tebufenozide) in *Spodoptera exempta*, *Spodoptera exigua*, and *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 49, 224-234.
- Tadic, M., 1957.** The biology of the codling moth (*Carpocapsa pomonella* L.) as the basis for its control. Belgrade Univ.
- Wing, K. D., 1988.** RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Science (Washington)*, 241: 467-469.
- Wing, K. D., R. A Slawecki & G. R: Carlson., 1988.** RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval lepidoptera. *Science (Washington)*, 241: 470-472.

Capítulo V

Efecto del momento de aplicación, utilización de coadyuvantes y volumen de tratamiento en la efectividad de tebufenocida para el control de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)

Pons *et al.*: Tebufenocida en el control de *C. pomonella*

SEBASTIÀ PONS^{1*}, HELMUT RIEDL¹ AND JESÚS AVILLA²

¹Oregon State University, Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center,

3005 Experiment Station Drive, Hood River, OR 97031

²Centre UdL-IRTA de R+D, Area de Protecció de Conreus, Av. Rovira Roure 177, 25198 Lleida, Spain.

* Dirección actual: DuPont Iberica S.A., Protección de Cultivos, Av. Diagonal 561, 08029 Barcelona, Spain.

Enviado a: Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas

RESUMEN

En ensayos realizados en plantaciones de manzanos en 1994 en Hood River, Oregon, se evaluó el porcentaje de daño obtenido cuando se trataron la primera y segunda generación de *Cydia pomonella* L con tebufenocida (RH 5992), variando tan sólo la fecha del primer tratamiento para la primera generación. Se evaluaron la persistencia, porcentaje de recubrimiento e influencia en la efectividad de tebufenocida dependiendo del volumen de caldo aplicado por hectárea y del coadyuvante utilizado.

No se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos momentos de aplicación de tebufenocida, ni tampoco entre el tipo de coadyuvante utilizado, pero sí se obtuvieron entre volúmenes. En árboles de tamaño medio, el porcentaje de mortalidad larvaria fue del 60,8% cuando se aplicó tebufenocida a un volumen de 935 l/ha, y del 81,1% cuando se aplicó a un volumen de 3.745 l/ha, porcentaje que no decreció hasta 32 días después del tratamiento. Se obtuvo una buena correlación entre porcentaje de cobertura y porcentaje de mortalidad cuando se trató con 935 l/ha.

Palabras clave: IGR, Tebufenocida, Lepidoptera, *Cydia pomonella*, Control, Persistencia

Introducción

Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), conocida con el nombre común de carpocapsa o agusanado, es una de las plagas más importantes en las explotaciones de frutales de pepita. Tradicionalmente ha sido controlada mediante insecticidas de amplio espectro, principalmente organofosforados, pero la implementación en los últimos años de programas de control integrado ha fomentado el desarrollo de nuevos insecticidas como por ejemplo los reguladores de crecimiento. Dentro de este grupo están los activadores de la muda (M.A.C.), insecticidas que ofrecen mayor especificidad, mejores perfiles eco-toxicológicos y nuevo modo de acción.

Tebufenocida (RH-5992) pertenece al grupo de los activadores de la muda, y siendo un análogo de la hormona ecdisona su estructura no es esteroidea, ya que se incluye dentro del grupo químico de las dibenzoilhidrazinas. Dicho compuesto fue precedido por el RH-5849, del que ya se describió su potencial insecticida contra larvas de lepidópteros (Wing 1988, Wing et al. 1988). Tebufenocida produce una muda larvaria prematura y en consecuencia letal a larvas de distintas especies, observándose un cese de la actividad alimentaria a las pocas horas de suministrar el insecticida a la larva (Smagghe, Degheele, 1994). Debido a que este tipo de insecticidas actúa fundamentalmente sobre un estadio del insecto, factores como el inicio de los tratamientos, porcentaje de cobertura necesario o su persistencia son claves para obtener un control adecuado de la plaga.

Materiales y Métodos

Material biológico

Se recogió una colonia de *C. pomonella* en 1991 en un huerto de manzanos en la Mid-Columbia Agricultural Research and Extension Center, Hood River, Oregon, USA. Se colectaron larvas en diapausa mediante la colocación de bandas de cartón en el tronco del árbol. Durante los dos años en que se realizó este trabajo se añadieron individuos a la colonia mediante el mismo procedimiento. La habitación utilizada como insectario se mantenía bajo condiciones controladas de $24 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $60 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR), y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) h.

La dieta de las larvas consistía en manzanas obtenidas en el aclareo de los árboles, a las que se les sometía un tratamiento fungicida con el objetivo de evitar su deterioro (0,06% Benlate® 50WP, 0,3% Captan® 50 WP y 0,12% Rovral® 50 WP). Las manzanas eran sumergidas en la solución fungicida durante un minuto, y una vez secas eran almacenadas en cajas de cartón en una cámara de conservación a una temperatura de $2,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Dentro de las cajas de cría se colocaba una base de manzanas, y sobre éstas, se colocaba una hoja de papel encerado con la puesta de carpocapsa. Tras quince días se colocaban bandas de cartón corrugado, de unos 5 cm de ancho y 20 cm de largo, en las paredes interiores de la caja. Dichos cartones eran recogidos quince días después y se trasladaban a una caja de madera, donde emergían las mariposas, que eran succionadas mediante una bomba, e introducidas en unas cajas cilíndricas con la finalidad de que realizasen la puesta sobre papel encerado. El propio papel que servía como substrato de puesta formaba la pared de dichas cajas. En los lados del cilindro se colocaban tapas con algodón humedecido en agua, de forma que las mariposas podían beber.

Material no biológico.

Los productos químicos convencionales fueron los insecticidas tebufenocida (3,5-acidodimetilbenzoico 1-(1,1-dimetiletil)-2-(4-etilbenzoil) hidracida), formulado como polvo mojable y de una riqueza del 70% y facilitado por la compañía Rohm & Haas (Spring House, PA, USA); metilazinfos (difosfato de O,O-dimetilo y de S-(3,4-dihidro 4-oxo 1,2,4-benzotriazin 3-il) metilo), formulado en polvo mojable y de una riqueza del 50% y de nombre comercial Guthion® 50WP, obtenido de la compañía Gowan Co. (Yuma, AZ, USA). Los coadyuvantes utilizados fueron Latron Ag-98® (alquil polietilenglicol), Latron B-1956® (resina alquídica de glicerina ftálica modificada), facilitados por la Compañía Rohm & Haas (Spring House, PA, USA) y Silwet L-77® (polieter copolímero de silicona) facilitado por la compañía Lovelanc Inc. (Greeley, CO, USA).

Para los tratamientos en campo se utilizó un pulverizador para el ensayo de la determinación del momento de aplicación, y un atomizador convencional para los ensayos de la evaluación del porcentaje de recubrimiento en campo, distribución de la

pulverización, efecto de diversos coadyuvantes y persistencia. Para la determinación del porcentaje del recubrimiento y distribución se utilizaron cartulinas sensibles al agua, que viran del color amarillo al azul cuando son humedecidas (TeeJet, Spraying Systems Co., Wheaton, IL).

Se utilizaron feromonas para el seguimiento del vuelo de carpocapsa. Las trampas de feromonas utilizadas fueron Pherocon® II Trap (Trécé Inc., Salina, CA, USA), equipadas con un difusor estándar CM (1x) de la compañía IPM Technologies, Inc. (West Linn, OR, USA).

Evaluación del momento de la aplicación de tebufenocida en campo contra la primera generación de *C. pomonella*.

Se realizó un ensayo en campo con el objetivo de discernir cual era el mejor momento de aplicación contra la primera generación de carpocapsa, por lo que cada tratamiento consistió en cuatro aplicaciones de tebufenocida a lo largo del año, variando sólo el momento de la primera aplicación.

Se utilizó, como medida para iniciar los tratamientos, los grados día transcurridos desde la primera captura en una trampa de feromonas de un macho de carpocapsa, y considerando como temperatura base los 10°C. Los grados día (GD) en que se realizó la primera aplicación para cada tratamiento fueron 55,5; 111; 138; 166,6 y 222,2 GD, que corresponden respectivamente a los 100; 200; 250; 300 y 400 G.D. calculados en Fahrenheit. Las restantes aplicaciones de tebufenocida se realizaron en el mismo momento para cada tratamiento, y estos fueron a los 305,5 GD (550 GD calculados en Fahrenheit), como segundo tratamiento para la primera generación de carpocapsa; a 694,4 GD (1.250 GD en Fahrenheit), para el primer tratamiento de la segunda generación y tres semanas más tarde se realizó el segundo tratamiento para la segunda generación. La primera aplicación de metilazinfos en el tratamiento standard se realizó a los 138 GD, y las restantes coincidieron con las aplicaciones de tebufenocida. El diseño fue de bloques al azar, donde cada repetición constaba de un árbol con un total de cuatro repeticiones, incluyendo un control. Los tratamientos se realizaron mediante pulverizador tipo pistola y mojando el árbol hasta que se producía goteo. La dosis de tebufenocida fue de 330 g m.a./ha, y la de metilazinfos fue de 1.400 g m.a./ha. La

evaluación del porcentaje de daño se realizó en tres fechas distintas, contabilizando como daño tanto las entradas profundas (mayores a 5 mm) como las picaduras o daños superficiales. Tan sólo en la última evaluación se abrieron las manzanas y se separó entre daño superficial y entradas en los frutos. El tamaño de la muestra fue de 100 frutos. Las dos primeras evaluaciones corresponden a evaluaciones a media estación, y la última antes de la cosecha, y las fechas fueron respectivamente el 27 de Junio, 19 de Julio y 26 de Septiembre de 1997. Las variedades de los manzanos fueron Red Delicious y Newton, plantados a un marco de 6 x 6 metros y podados en forma de vaso. La parcela donde se realizó el experimento constaba de una superficie de 0,5 ha. Se realizó el seguimiento del vuelo de las mariposas de *C. pomonella* utilizando tres trampas de feromonas colocadas a 1,70 m de altura. Las cápsulas de feromonas eran renovadas cada 3 semanas, y los conteos de mariposas se realizaban semanalmente.

Influencia de diversos coadyuvantes en la persistencia y efectividad de tebufenocida.

Para la evaluación del efecto de diversos coadyuvantes en la persistencia y efectividad de tebufenocida en campo, se trataron con el atomizador manzanos de la variedad Red Delicious, de unos 2 metros de altura y podados en forma de vaso. Para evitar posibles contaminaciones entre los distintos tratamientos a la hora de la aplicación se colocó una lámina de plástico de polietileno de tres metros de altura en el lado contrario de donde se encontraba el tractor pulverizando el manzano. Se colocaron tarjetas sensibles a soluciones acuosas en cuatro puntos: norte, sur, este y oeste, considerando la línea de árboles orientada norte-sur. Cada tratamiento constaba de tres repeticiones, y cada repetición de tres árboles. El diseño era de bloques al azar y se incluía un control.

El experimento consistió en la aplicación de tres diferentes coadyuvantes a dosis comerciales más tebufenocida. Los coadyuvantes fueron Latron® B-1956, que se aplicó a una concentración de 0,06%, Latron® AG-98 a 0,06% y Silwet® L-77 a 0,0625%, y tebufenocida a una dosis de 330 g m.a/ha. El volumen de caldo utilizado fue 935 l/ha, que corresponde a 100 galones/acre (GPA). En este ensayo se incluyó un tratamiento con la misma concentración de tebufenocida que en los anteriores (330 g m.a/ha), y el coadyuvante Latron® B-1956 a una dosis de 0,06%, pero esta vez el volumen aplicado

consistió en 3.741 l/ha (400 GPA). El control consistió en una aplicación de agua con un volumen de 935 l/ha. Se incluyó como estándar un tratamiento con metflazinfos a una dosis de 1.400 g m.a/ha sin coadyuvante y aplicado a un volumen de 935 l/ha.

Se recolectaron manzanas con la finalidad de evaluar en laboratorio la mortalidad larvaria cuando larvas neonatas se alimentaban en dichas manzanas. Las muestras se tomaron el mismo día del tratamiento, después de 12 días, 18, 24, 32, 40 y 60 días. Las muestras consistían en cinco manzanas por cada repetición, por lo que se obtenían 15 manzanas por tratamiento. La recolección de las manzanas era realizada con sumo cuidado de forma que su roce con las manos o follaje fuera el menor posible, además las manzanas eran colocadas en tableros donde quedaban clavadas, y así su manipulación era mínima. Una vez en el laboratorio, se adherían a las manzanas seis cápsulas de gelatina (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA). El final de cada cápsula de gelatina se había cortado, y se pegaban a las manzanas con cera de abeja. Se cortaba un trozo de papel encerado el cual contenía un huevo de carpocapsa a punto de eclosionar, y se introducía dentro de la cápsula de gelatina, que posteriormente era tapada. Los huevos que no eclosionaban no eran contabilizados dentro del análisis. Durante los 60 días que duró este experimento, se registraron la lluvia y la temperatura para calcular los grados día, considerando como temperatura base 10°C, También se midió el diámetro de la fruta en cada muestreo para evaluar la posible pérdida de efectividad del producto debido al crecimiento de la fruta. Las manzanas fueron mantenidas en cámaras bajo condiciones controladas a $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 80% HR y luz continua, para la evaluación de la mortalidad y daño una semana después. Los huevos que no eclosionaban no eran contabilizados en el análisis. De nuevo, el daño era considerado como entrada si la larva había sido capaz de penetrar 5 mm o más y como picadura si la perforación era menor de 5 mm.

Efecto del volumen de aplicación

Para la evaluación del efecto del volumen de caldo aplicado en la efectividad larvicida de tebufenocida se trataron tres árboles de gran tamaño, de unos 4 metros de altura y podados en forma de vaso, donde se colgaron manzanas de tamaño medio en diez puntos diferentes: en los cuatro puntos cardinales y en el centro y a dos diferentes

alturas (1,7 y 3,1 m). Las manzanas eran suspendidas mediante un alambre que las atravesaba y que también se hacía pasar por un agujero taladrado en una rama del árbol. La dosis de tebufenocida aplicado fue 330 g m.a/ha con un porcentaje de coadyuvante de 0,06% (Latron® B-1956). Los volúmenes de aplicación fueron 935 y 3.741 l/ha. El control consistió en un tratamiento con agua y el mismo porcentaje de coadyuvante, aplicado a un volumen de 3.741 l/ha. En cada punto se instalaron tarjetas sensibles a soluciones acuosas perpendiculares al suelo y de cara al atomizador, en el mismo alambre a unos 2-3 cm por encima de las manzanas. Después del tratamiento, las tarjetas eran colectadas, y se contabilizaba el porcentaje de superficie de color azul y de color amarillo de las tarjetas para evaluar el porcentaje de cobertura en cada orientación o zona del árbol. Respecto a las manzanas, éstas eran recogidas cortando el alambre que las suspendía, y posteriormente eran clavadas en una bandeja de corcho, de forma que no eran nunca directamente manipuladas. Una vez secas, se les adherían seis cápsulas de gelatina mediante cera de abeja y se introducía un huevo de carpocapsa próximo a su eclosión, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. Las cápsulas eran tapadas y las manzanas mantenidas en una cámara bajo las condiciones de $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 80% HR y luz continua. Los mismos árboles fueron utilizados para los tres tratamientos (los dos tratamientos con tebufenocida y el control), de forma que no existía variación en la posición de la fruta entre los distintos tratamientos. La mortalidad larvaria en las manzanas fue evaluada una semana después de la colocación de las cápsulas de gelatina conteniendo los huevos a punto de eclosionar.

Resultados

Evaluación del momento de aplicación de tebufenocida en campo contra la primera generación de *C. pomonella*.

En la Figura 1 se representa la media del número de mariposas de carpocapsa capturadas por trampa de feromona, junto con el momento en que se realizaron los tratamientos. Como se puede apreciar por el número de capturas por trampa, la presión de la plaga en esta parcela es considerablemente alta, llegando dicha media a 18 adultos por trampa en la primera generación, y cerca de 20 en la segunda, aunque realmente no existe una discontinuidad entre generaciones, produciéndose capturas desde mayo a septiembre.

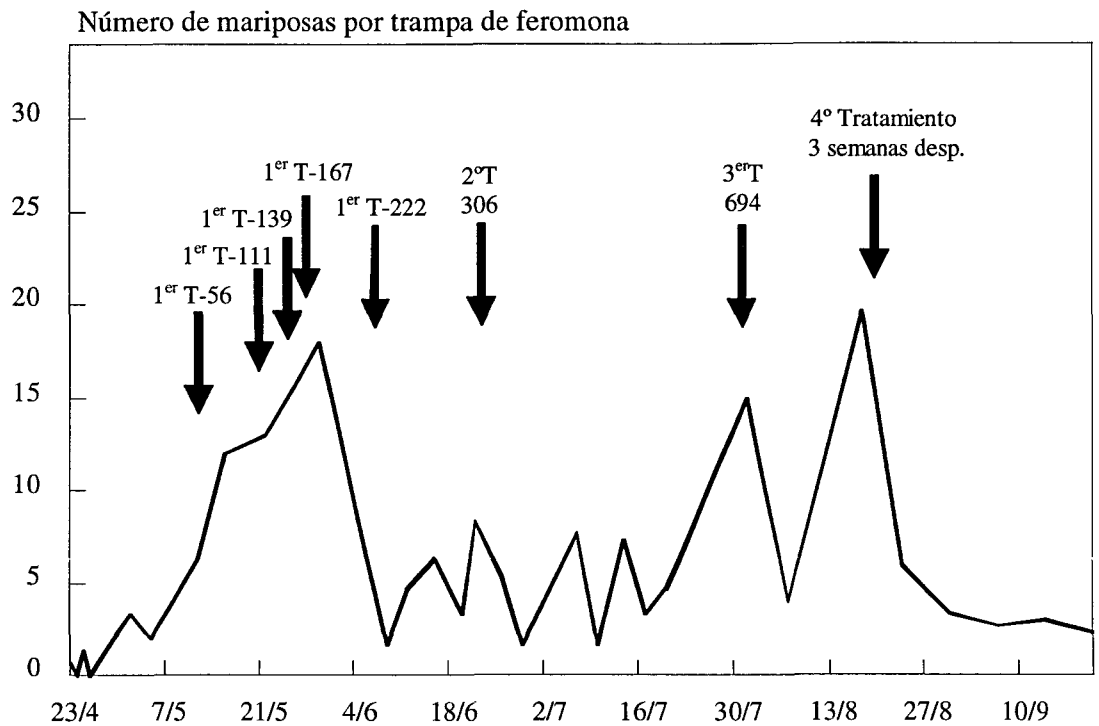


Figura 1. Media de las capturas de adultos de *C. pomonella* por trampa y grados día transcurridos en cada aplicación de tebufenocida

Average codling moth pheromone trapping record and number of degree days on each tebufenozide field application

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de daño obtenido en cada evaluación y tratamiento. La última evaluación corresponde con el momento de cosecha del cultivo. Los porcentajes de control obtenidos fueron extremadamente altos para cualquiera de las distintas fechas evaluadas, y aunque estadísticamente no hubo diferencias entre los distintos tratamientos de tebufenocida, el porcentaje de daño fue menor cuando la aplicación de tebufenocida se realizó temprana, es decir a los 56 grados día. Destaca el elevado porcentaje de daño obtenido en los árboles sin tratar (58%), y también que el porcentaje de daño obtenido en los tratamientos con metilazinfos (8%) es también alto. La explicación a tan elevados porcentajes de daños puede deberse a que el año en que se realizó dicha experiencia la cantidad de frutos cuajados fue baja, debido a condiciones climáticas, y que además la densidad de plaga fue extremadamente elevada. Este fenómeno se tradujo en una alta presión de la plaga al cultivo, y por lo tanto, los porcentajes de daño obtenidos fueron mayores a los que esperados en un año normal.

Tabla 1. Porcentaje de daño en fruto producido por carpocapsa en tratamientos de tebufenocida en campo donde se varió la fecha en que se realizó la primera aplicación

Codling moth fruit damage on different tebufenozide timings

Tratamientos	%Daño ± SE			%Entradas ± SE	
	(27/6/95)	(19/7/95)	(26/9/95)		(26/9/95)
Control	9 ± 4,1	10 ± 7,5	58 ± 9,4	c	41 ± 9,9 d
Tebufenocida 56 GD	1 ± 1	7 ± 3,4	19 ± 4,1	ab	5 ± 2,5 ab
Tebufenocida 111 GD	1 ± 1	8 ± 4,3	39 ± 11,8	bc	21 ± 8,5 cd
Tebufenocida 139 GD	3 ± 1,9	8 ± 2,8	38 ± 6,8	bc	8 ± 3,2 abc
Tebufenocida 167 GD	1 ± 1	9 ± 3,4	32 ± 10,9	b	12 ± 5,8 bc
Tebufenocida 222 GD	4 ± 2,8	10 ± 5,0	29 ± 6,6	b	10 ± 3,4 bc
Metilazinfos	0	2 ± 1,1	8 ± 3,6	a	0 a

Se realizó el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis. Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente distintas. ANOVA: no hubieron diferencias significativas en el porcentaje de daños entre tratamientos para la evaluación del mes de Junio ($F=0,41$; g.l.=6, 21; $P=0,867$), tampoco para la evaluación del mes de Julio ($F=1,70$; g.l.=6, 21; $P=0,171$), pero sí hubieron diferencias significativas para el porcentaje de daños ($F=4,02$; g.l.=6, 21; $P<0,01$) y entradas ($F=6,22$; g.l.=6, 21; $P<0,01$) entre tratamientos en la evaluación del mes de Septiembre.

Influencia de diversos coadyuvantes en la persistencia y efectividad de tebufenocida

En la Tabla 2 se muestran los datos sobre el porcentaje de cobertura obtenido dependiendo del volumen y tipo de coadyuvante utilizado. Se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de cobertura entre los distintos coadyuvantes ensayados y entre volúmenes. En cambio, no hubo diferencias significativas entre el porcentaje de cobertura entre los distintos coadyuvantes y el control o los tratamientos con metilazinfos. Sí fueron significativamente distintas las medias entre el tratamiento a un mayor volumen y el resto de los tratamientos.

Tabla 2. Porcentaje de cobertura dependiendo del volumen y coadyuvante utilizado en aplicaciones en campo

Coverage percentage depending of the water volume and surfactants used in field

<i>treatments</i>			
Tratamiento	Volumen (l/ha)	% Cobertura (media±SE)	
Control	935	50.7 ± 5.6	a b
Tebufenocida+Latron B-1956	3.741	74.6 ± 4.9	c
Tebufenocida+Latron B-1956	935	44.0 ± 4.8	a
Tebufenocida+Latron AG-98	935	50.7 ± 4.9	a b
Tebufenocida+Silvet L-77	935	63.0 ± 4.8	b
Metilazinfos	935	57.1 ± 4.9	a b

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente distintas. Se realizó el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis. ANOVA: hubo diferencias significativas en el porcentaje de cobertura entre tratamientos ($F=5.30$; g.l.=5, 210; $P<0.01$).

En la Tabla 3 se representa el porcentaje de mortalidad para cada muestreo y tratamiento. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada evaluación. Estadísticamente no fueron diferentes los porcentajes de mortalidad larvaria obtenidos entre los coadyuvantes ensayados y aplicados junto con tebufenocida a un volumen de caldo de 935 l/ha. Sí hubo diferencias cuando se comparan los dos volúmenes ensayados. Después de 24 días de la aplicación de tebufenocida a alto volumen se obtiene un 98% de mortalidad larvaria, mientras que la mortalidad obtenida aplicando el mismo coadyuvante y cantidad de tebufenocida por hectárea, pero menor volumen, es del 50%. Es también destacable que en las evaluaciones realizadas hasta 18 días después del tratamiento, la mortalidad larvaria obtenida con el standard, metilazinfos, es siempre mayor a la obtenida con tebufenocida aplicado a un volumen de 935 l/ha, indistintamente del coadyuvante ensayado, pero no ocurre igual cuando se compara con la mortalidad larvaria obtenida cuando se trataron los árboles con tebufenocida a un volumen de 3.741 l/ha. En este caso, la mortalidad larvaria siempre

fue mayor cuando se aplicó tebufenocida a 3.741 l/ha de caldo, que la obtenida en el tratamiento con metilazinfos.

En las Tablas 4 y 5 se muestran los porcentajes de entradas en la fruta y de penetraciones superficiales o picaduras. La suma de ambos parámetros sería el porcentaje de daño en la fruta. Aunque el porcentaje de mortalidad en el tratamiento con tebufenocida aplicado a mayor volumen fue del 81%, y significativamente distinto al obtenido a menor volumen (60%), no hubieron diferencias significativas en el porcentaje de entradas en los frutos evaluados. No ocurrió lo mismo en las evaluaciones que se hicieron posteriormente a los 12, 18 y 24 días, donde sí hubieron diferencias significativas en el porcentaje de entradas entre estos dos tratamientos. En estas tres evaluaciones, el porcentaje de entradas fue entre el 1 y el 8% cuando se aplicó tebufenocida a mayor volumen, y entre el 35 y el 38% cuando se aplicó a un menor volumen.

En la Tabla 6 se representan los grados día (temperatura base 10°C) y la precipitación acumulada a partir de la aplicación de los insecticidas, así como la evolución en el crecimiento de frutos durante el periodo en que se realizó el estudio.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad en larvas neonatas de *C. pomonella* alimentadas con manzanas tratadas en campo con tebufenocida, y recolectadas a los 0, 12, 18, 24, 32, 40 y 60 días de su tratamiento

Mortality percentage of codling moth neonate larvae feeded with field treated apples, which were collected at 0, 12, 18, 24, 32, 40 and 60 days after treatment

Tratamiento	Volumen (l/ha)	Día 0	Día 12	Día 18	Día 24	Día 32	Día 40	Día 60
Producto (dosis/ha)		% Mort. ± SE	% Mort. ± SE	% Mort. ± SE	% Mort. ± SE	% Mort. ± SE	% Mort. ± SE	% Mort. ± SE
Control	935	5,5 ± 2,6 a	16,8 ± 2,8 a	15,5 ± 4,4 a	8,2 ± 2,3 a	8,8 ± 3,1 a	34,4 ± 7,3 ab	5,5 ± 2,6 a
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	64,4 ± 6,8 bc	44,4 ± 6,4 b	68,8 ± 6,6 b	64,8 ± 6,8 b	61,5 ± 5,4 cd	55,7 ± 8,1 bc	58,8 ± 6,7 c
Latron AG-98 (0,06%)	935	60,8 ± 7,3 b	55,5 ± 8,2 bc	63,3 ± 9,5 b	50,2 ± 10,6 b	41,7 ± 9,5 b	46,9 ± 8,3 abc	19,3 ± 7,9 ab
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	64,8 ± 4,9 bc	52,2 ± 5,8 b	66,6 ± 7,4 b	64,2 ± 6,2 b	45,4 ± 7,3 bc	50,5 ± 8,4 bc	60,3 ± 6,9 c
Silwet L-77 (0,0625%)	3.741	81,1 ± 5,1 d	85,5 ± 4,2 d	97,7 ± 1,5 c	98,8 ± 1,1 c	76,6 ± 4,9 d	64,9 ± 4,8 c	58,8 ± 7,0 c
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	79,5 ± 4,1 cd	70,0 ± 6,1 cd	83,3 ± 4,6 b	62,6 ± 7,0 b	64,2 ± 7,6 cd	31,3 ± 7,9 a	23,7 ± 6,3 b
Latron B-1956 (0,06%)	935							
Metilazinfos (1400 g m.a/ha)								

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente distintas. Se realizó el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis. ANOVA: hubo diferencias estadísticamente significativas entre (Día 0: $F=24.28$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 12: $F=13.94$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 18: $F=19.23$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 24 $F=20.54$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 32: $F=11.43$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 40: $F=2.66$; g.l.=5, 84; $P<0.05$, Día 60: $F=13.65$; g.l.=5, 84; $P<0.01$).

Tabla 4. Porcentaje de entradas en fruta producido por larvas de *C. pomonella* alimentadas con manzanas tratadas en campo con tebufenocida, y recolectadas a los 0, 12, 18, 32, 40 y 60 días de su tratamiento

Fruit entries percentage when codling moth neonate larvae feeded on field treated apples which were collected at 0, 12, 18, 32, 40 and 60 days after treatment

Tratamiento	Volumen (l/ha)	Día 0	Día 12	Día 18	Día 24	Día 32	Día 40	Día 60
Producto (dosis/ha)		% Entr. ± SE	% Entr. ± SE	% Entr. ± SE	% Entr. ± SE	% Entr. ± SE	% Entr. ± SE	% Entr. ± SE
Control	935	64,0 ± 6,0 c	57,5 ± 3,8 d	57,7 ± 8,2 d	84,6 ± 3,8 c	47,7 ± 6,2 c	52,7 ± 7,5	66,2 ± 6,6 a
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	37,7 ± 7,3 b	47,7 ± 5,1 cd	27,7 ± 6,2 c	33,1 ± 6,0 b	15,7 ± 3,4 a	48,0 ± 7,6	32,2 ± 5,3 b
Latron AG-98 (0,06%)	935	43,3 ± 7,0 b	37,7 ± 8,0 bc	35,5 ± 8,2 c	38,2 ± 8,5 b	28,7 ± 6,2 abc	57,2 ± 8,7	66,5 ± 7,6 a
Latron B-1956 (0,06%)	935	29,1 ± 5,4 ab	38,8 ± 6,2 bcd	27,7 ± 8,2 bc	30,2 ± 5,6 b	27,6 ± 4,9 abc	50,1 ± 8,2	28,7 ± 6,3 b
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	3.741	30,0 ± 8,3 ab	8,8 ± 3,1 a	3,3 ± 2,4 a	1,1 ± 1,1 a	29,1 ± 7,0 ab	29,2 ± 4,6	32,2 ± 6,3 b
Silwet L-77 (0,0625%)	935	14,8 ± 4,7 a	30,0 ± 6,1 b	11,1 ± 4,1 ab	32,8 ± 6,1 b	41,5 ± 8,0 bc	51,5 ± 7,0	57,1 ± 8,0 a
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	14,8 ± 4,7 a	30,0 ± 6,1 b	11,1 ± 4,1 ab	32,8 ± 6,1 b	41,5 ± 8,0 bc	51,5 ± 7,0	57,1 ± 8,0 a
Latron B-1956 (0,06%)	935	14,8 ± 4,7 a	30,0 ± 6,1 b	11,1 ± 4,1 ab	32,8 ± 6,1 b	41,5 ± 8,0 bc	51,5 ± 7,0	57,1 ± 8,0 a
Metilazinfos (1400 g ma/ha)	935	14,8 ± 4,7 a	30,0 ± 6,1 b	11,1 ± 4,1 ab	32,8 ± 6,1 b	41,5 ± 8,0 bc	51,5 ± 7,0	57,1 ± 8,0 a

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente distintas. Se realizó el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis. ANOVA: hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en todas las evaluaciones a excepción de la evaluación realizada el día 40 (Día 0: $F=9.19$; $g.l.=5, 84$; $P<0.01$, Día 12: $F=9.13$; $g.l.=5, 84$; $P<0.01$, Día 18: $F=8.01$; $g.l.=5, 84$; $P<0.01$, Día 24 $F=23.38$; $g.l.=5, 84$; $P<0.01$, Día 32: $F=2.65$; $g.l.=5, 84$; $P<0.05$, Día 40: $F=1.65$; $g.l.=5, 84$; $P=0.1545$, Día 60: $F=6.30$; $g.l.=5, 84$; $P<0.01$).



Tabla 5. Porcentaje de daño superficial (picaduras) producido por larvas de *C. pomonella* alimentadas con manzanas tratadas en campo con tebufenocida, y recolectadas a los 0, 12, 18, 32, 40 y 60 días de su tratamiento
Fruit stings percentage when codling moth neonate larvae feeded on field treated apples which were collected at 0, 12, 18, 32, 40 and 60 days after treatment

Tratamiento	Volumen (l/ha)	Día 0	Día 12	Día 18	Día 24	Día 32	Día 40	Día 60
Producto (dosis/ha)		% Picad. ± SE	% Picad. ± SE	% Picad. ± SE	% Picad. ± SE	% Picad. ± SE	% Picad. ± SE	% Picad. ± SE
Control	935	34,6 ± 5,8 ab	35,5 ± 4,5 ab	40,0 ± 7,5 a	11,7 ± 3,6 a	51,1 ± 5,9 ab	47,4 ± 7,4	26,0 ± 5,0 a
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	61,1 ± 7,2 bc	50,0 ± 4,8 bc	65,5 ± 6,1 b	56,6 ± 5,8 bc	80,8 ± 3,1 d	52,0 ± 7,6	60,6 ± 5,5 b
Latron AG-98 (0,06%)								
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	55,3 ± 6,5 c	62,2 ± 8,0 c	63,3 ± 8,6 b	50,2 ± 8,8 bc	70,1 ± 6,3 cd	42,7 ± 8,7	27,4 ± 7,2 a
Latron B-1956 (0,06%)								
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	935	65,3 ± 6,3 c	55,5 ± 7,0 c	64,4 ± 7,7 b	67,5 ± 5,2 cd	60,6 ± 5,1 bc	45,2 ± 7,6	66,5 ± 6,3 b
Silwet L-77 (0,0625%)								
Tebufenocida (330 g m.a/ha)	3.741	66,1 ± 9,5 c	86,6 ± 4,3 d	88,8 ± 3,5 c	78,2 ± 4,2 d	70,8 ± 7,0 cd	69,6 ± 4,6	60,0 ± 5,8 b
Latron B-1956 (0,06%)								
Metilazinfos (1400 g ma/ha)	935	33,3 ± 7,8 a	25,5 ± 4,8 a	36,2 ± 5,2 a	36,3 ± 4,4 b	42,4 ± 6,8 a	48,4 ± 7,0	38,4 ± 7,3 a

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente distintas. Se realizó el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis. ANOVA: hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en todas las evaluaciones a excepción de la evaluación realizada el día 40 (Día 0: $F=3.82$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 12: $F=13.33$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 18: $F=7.57$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 24 $F=15.93$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 32: $F=5.27$; g.l.=5, 84; $P<0.01$, Día 40: $F=1.71$; g.l.=5, 84; $P=0.1412$, Día 60: $F=7.86$; g.l.=5, 84; $P<0.01$).

Tabla 6. Media del diámetro de las manzanas recolectadas en cada fecha, así como grados día (Tra. base 10°C) y lluvia acumulada a partir de la fecha del tratamiento

Average of the diameter of field collected apples, degree days (threshold 10°C) and accumulated rain in each date after treatment

Evaluación	Día 0	Día 12	Día 18	Día 24	Día 32	Día 40	Día 60
Manzana (mm)	62,9 ± 0,5	69,9 ± 0,6	71,0 ± 0,6	74,8 ± 0,6	77,5 ± 0,6	80,3 ± 0,7	79,9 ± 0,8
Grados día (Tra. base 10°C)	774,4	897,2	938,3	981,6	1040	1111,1	1272,7
Lluvia acumulada (mm)	0	3.1	6.8	10.4	10.6	10.6	43.6

Relación entre el volumen de caldo aplicado y la mortalidad larvaria obtenida en tratamientos de campo con tebufenocida contra *C. pomonella*

Con la colocación de tarjetas sensibles al agua en el mismo punto que se colocaban las manzanas se obtenían dos valores: el porcentaje de cobertura y el porcentaje de mortalidad larvaria. En la Tabla 7 se representan dichos porcentajes, donde se observa que aunque sí se obtuvieron diferencias significativas entre el porcentaje de cobertura entre los volúmenes aplicados no se obtuvieron diferencias significativas entre la mortalidad larvaria. Sí hay diferencias significativas cuando se compara para un mismo volumen de aplicación el porcentaje de cobertura obtenido y el porcentaje de mortalidad. Cuando se produce un menor porcentaje de cobertura también se reduce la mortalidad larvaria. Puede que el porcentaje de cobertura obtenido en las tarjetas a nivel bajo (52%) no corresponda exactamente al porcentaje de cobertura que se obtiene en las manzanas. Como se menciona en la metodología las tarjetas son colocadas verticalmente, y forma un plano paralelo a la marcha del atomizador y perpendiculares al suelo, por lo tanto el goteo que pueda producir no les afecta. En cambio, las manzanas sí pueden recibir parte del producto debido al goteo que se produce en el árbol en el momento del tratamiento, sobretodo en las manzanas colocadas a menor altura.

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas alimentadas con manzanas tratadas en campo con tebufenocida y porcentaje de cobertura del tratamiento dependiendo del volumen de aplicación y de la posición de las manzanas y las tarjetas sensibles en el árbol

Mortality of neonate larvae feeded with treated apples and coverage percentage on field tebufenozide applications depending of the location of the apples and water sensitive cards

Dosis g m.a./ha	Volumen l/ha	%Mortalidad±SE		%Cobertura±SE	
		Nivel bajo (1,7 m)	Nivel alto (3,1 m)	Nivel bajo (1,7 m)	Nivel alto (3,1 m)
Control	3.741	12,1±3,45 a	8,2±3,39 a	-	-
330	935	83,4±5,23 c	63,1±6,56 b	52,42±8,39 b	34,47±5,99 a
330	3.741	80,0±5,75 c	59,8±5,53 b	78,71±6,95 c	59,19±9,75 b

Medias seguidas por la misma letra en las columnas de porcentaje de mortalidad y columnas de porcentaje de cobertura no son significativamente distintas. Se realizó el cambio de variable $\arcsen \sqrt{x}$ para su análisis. ANOVA: hubo diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad entre tratamientos, combinación de concentración o dosis y volumen aplicado ($F=75,67$; g.l.=2, 54; $P<0,01$), el factor nivel ($F=12,94$; g.l.=1, 54; $P<0,01$), pero la interacción entre ambos no fue significativa ($F=0,91$; g.l.=2, 54; $P=0,4096$). Respecto al porcentaje de cobertura, hubo diferencias significativas para el factor volumen ($F=6,48$; g.l.=1, 36; $P<0,05$), también para el factor nivel ($F=10,69$; g.l.=1, 36; $P<0,01$), pero la interacción entre volumen y nivel no fue significativa ($F=0,11$; g.l.=1, 36; $P=0,7452$).

En la Figura 2 se representa la correlación entre el porcentaje de cobertura obtenido y la mortalidad larvaria cuando se aplicó un volumen de caldo de 935 l/ha. El coeficiente de correlación de Spearman obtenido en este caso fue de $r_s=0,83$. Sin embargo, no hubo una buena correlación entre porcentaje de cobertura y mortalidad cuando se aplicó en campo el volumen de 3.471 l/ha ($r_s=0,31$). Probablemente esta falta de correlación cuando se utiliza un mayor volumen se deba al goteo que se produce en los árboles.

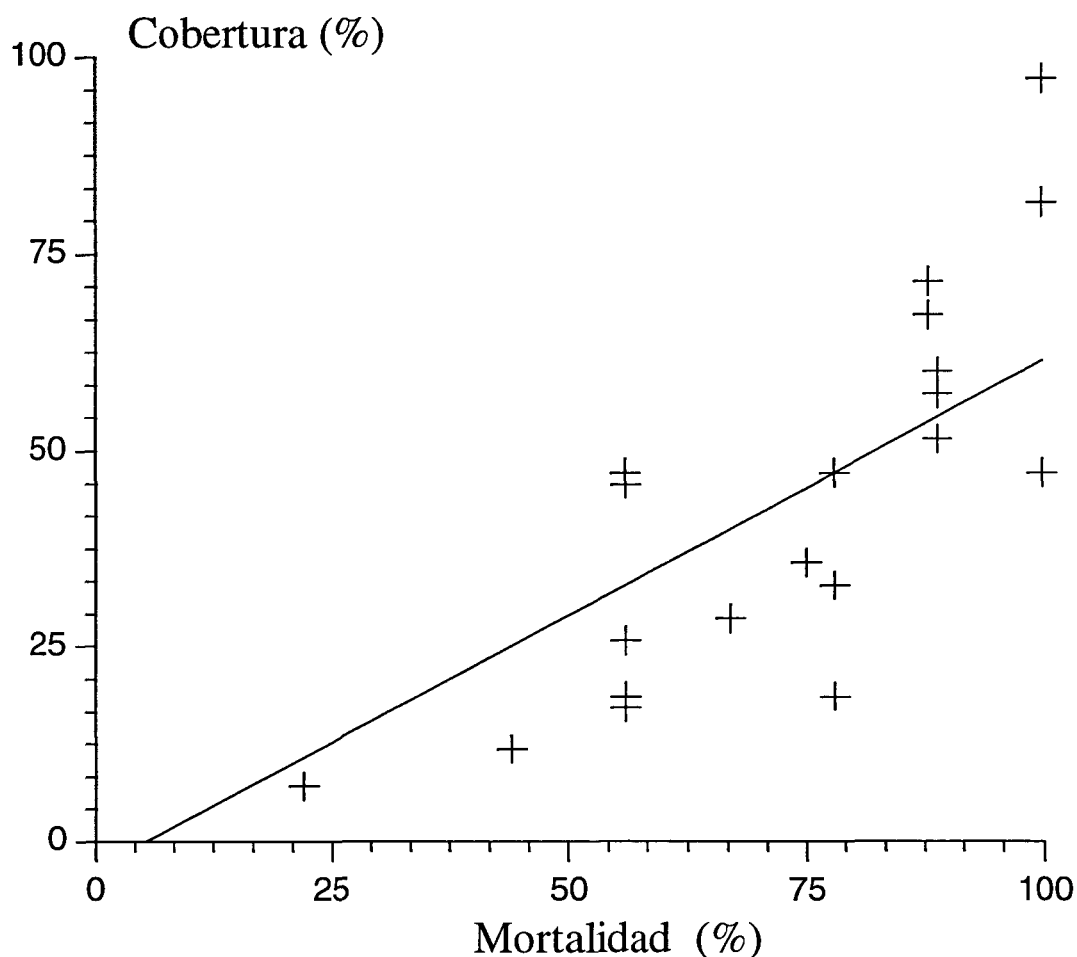


Figura 2. Correlación entre el porcentaje de cobertura y mortalidad larvaria obtenido en aplicaciones de tebufenocida en campo con un volumen de 935 l/ha

Relation between coverage and larval mortality on field tebufenozide applications when the water volume used was 935 l/ha

Discusión

La utilización de trampas de feromonas como herramienta en el seguimiento del vuelo de *C. pomonella* es una práctica común, aunque su eficacia puede variar dependiendo de diversos factores (Riedl, 1980). Según Ahmad y Al-Gharbawi (1986) la altura en la colocación y situación de la trampa en la parcela influyen enormemente en su eficacia. La fiabilidad del seguimiento del vuelo de *C. pomonella* mediante trampas de feromonas parece variar entre el inicio del vuelo, donde parece ser una buena herramienta, y la primavera y generación del verano, donde su uso no parece tan fiable (Riedl et al., 1976). La curva de vuelo representada en la Figura 1 muestra claramente

el inicio de la emergencia de las mariposas pero no son tan claros los datos relativos a los otros picos. Puede que la reducción en las capturas para el primer pico se deba a la competencia entre las trampas y las mariposas, por lo que tanto los máximos obtenidos para cada vuelo, así como el número de individuos capturados durante todo el cultivo no tienen porque tener una correlación con el vuelo y nivel de infestación en campo. Por lo tanto, en una finca como la que se ha realizado la parcela, de pequeñas dimensiones y con una alta densidad de población, es cuestionable si realmente las trampas de feromonas son una herramienta fiable.

Según distintas referencias citadas anteriormente, existe una alta correlación entre los grados día y las capturas en trampas de feromona, especialmente para la predicción de las primeras emergencias de adultos y la primera generación. Pero hay que tener en cuenta que los primeros adultos en emerger son machos, y que también puede producirse el hecho que en días de viento disminuyen el número de adultos en vuelo pero siguen produciéndose emergencias de mariposas (Ahmad, 1988). Por lo tanto, la utilización de grados día debe considerarse tan solo como una herramienta útil en la predicción del vuelo, y en la decisión del momento de realizar los tratamientos; y la utilización de las trampas de feromonas, como una mera indicación de la iniciación y seguimiento del vuelo. El inicio de los tratamientos contra carpocapsa suele decidirse dependiendo del tipo de producto a utilizar, así si se trata con un insecticida caracterizado principalmente como ovicida su aplicación suele ser entre los 55 y 85 GD, máximo en la curva de la oviposición. Si es aplicado un insecticida tipo organofosforado, principalmente larvicida, aunque también activo contra huevos y adultos, suele recomendarse su aplicación a los 140 GD, coincidiendo con el inicio de la curva de eclosión (Westigard, Gut, 1986). Aunque tebufenocida ha sido generalmente presentado como exclusivamente larvicida, en aplicaciones en campo de RH-5849 (análogo de la ecdisona predecesor de tebufenocida) y RH-5992, coincidiendo el primer tratamiento con el máximo de la oviposición, se obtuvo buen control de la plaga e incluso mejores resultados que los tratamientos con fenoxicarb o diflubenzurón (Riedl, Shearer, 1988; 1989; 1990). Por lo tanto parece obvio que fuera necesario discernir cuando debían iniciarse los tratamientos con tebufenocida, si debía aplicarse como ovicida, o si debía utilizarse como larvicida. En la primera evaluación

del porcentaje de daño, fecha que corresponde con la segunda aplicación de tebufenocida, se obtiene un porcentaje que oscila entre el 1 y el 4% cuando tebufenocida es aplicado como ovicida o larvicida (Tabla 1). Por lo tanto parece lógico deducir que aún siendo el tratamiento a los 56 GD el más desfavorable ya que transcurre el mayor número de días entre la primera aplicación y la segunda se obtiene un porcentaje de daño menor o igual a los tratamientos posteriores, lo que puede ser explicado debido al beneficio de la acción ovicida de tebufenocida. El aumento en el porcentaje de daño observado en la segunda evaluación (unas 3 semanas después de la segunda aplicación) probablemente se deba a la pérdida de eficacia de tebufenocida debido a la dilución del producto como consecuencia del crecimiento vegetativo y/o quizás a una excesiva presión de la plaga.

La utilización de los grados día como modelo predictivo en la emergencia y vuelo de *C. pomonella* es una metodología también común en el control de esta plaga la cual permite relacionar los grados día con el porcentaje de huevos eclosionados y porcentaje de emergencias de adultos (Brunner et al., 1982). Una aplicación a 55,5 GD corresponde a una aplicación donde todavía no existe eclosión y se ha producido un 15% de emergencias. A 111 GD ya corresponde con un 40% de adultos emergidos lo que implica un gran número de puestas sobre material no tratado previamente. Una aplicación a 138 GD corresponde a una aplicación típica como larvicida, donde se inicia la eclosión (3% de eclosión). Por lo tanto, se puede deducir que las aplicaciones tempranas pudieron beneficiarse del efecto ovicida de tebufenocida, y que los daños obtenidos se deban a una excesiva amplitud entre aplicaciones (6 semanas) entre la primera y segunda, así como también entre las sucesivas aplicaciones. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de daños en las observaciones realizadas el 27 de Junio y 19 de Julio, sí que el porcentaje de daños fue menor, al igual que lo fue en la observación realizada el 26 de Septiembre, en el momento de la cosecha.

Respecto al estudio de la persistencia de tebufenocida en campo, se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de cobertura entre los distintos volúmenes aplicados, así como en general una alta persistencia independientemente del tipo de

coadyuvante utilizado. Charmillot et al. (1994) también evaluaron la persistencia de tebufenocida utilizando una metodología similar a la utilizada en este trabajo, aunque difiere en la evaluación del porcentaje de mortalidad, ya que dichos autores realizan una suelta de un número determinado de larvas sobre manzanas tratadas, para contabilizar el posterior número de larvas sobrevivientes pasado un periodo de tiempo. Dichos autores obtienen porcentajes de mortalidad que oscilan entre el 100% y el 80% en las primeras evaluaciones, hasta alcanzar alrededor del 60% transcurrido algo más de un mes después del tratamiento con tebufenocida. En cambio, los porcentajes de mortalidad obtenidos en nuestro estudio (Tabla 3) varían entre el 81% y el 64% para la primera evaluación (inmediatamente después del tratamiento) dependiendo del volumen aplicado, siendo también el decremento obtenido en la efectividad de este insecticida parecida a la obtenida por dichos autores. Por lo tanto, no deja de ser sorprendente que los porcentajes de mortalidad obtenidos por Chamillot et al. (1994) sean superiores a los obtenidos en este trabajo cuando las dosis por hectárea de tebufenocida y volumen aplicado por dichos autores fue menor: 240 g m.a./ha y un volumen entre 400 y 1.000 l/ha, frente a 330 g m.a./ha y un volumen entre 935 y 3.741 l/ha en nuestro ensayo. En cuanto a los tratamientos con metilazinfos, el porcentaje de mortalidad larvaria obtenido en el ensayo está por debajo de lo que correspondería a un tratamiento convencional con este producto, ya que también se obtendría el beneficio de la actividad por contacto del insecticida, y evidentemente también control en adultos (Riedl et al., 1986). No parece que la utilización de cualquiera de los coadyuvantes ensayados proporcione un incremento de la efectividad del insecticida aunque sí se obtuvo un mayor decremento del porcentaje de mortalidad larvaria en los tratamientos de tebufenocida cuando se utilizó Latron B-1956, estas diferencias se obtuvieron a partir de los 40 días después del tratamiento, por lo que desde un punto de vista práctico dichas diferencias tienen poca importancia.

Cuando se evaluó el tipo de daño obtenido, diferenciando entre entradas y picaduras dependiendo de si se trataba de daño real, profundo, o tan solo de ligeras penetraciones donde el daño no había progresado, se obtuvieron destacables diferencias entre los volúmenes utilizados. En general, el porcentaje de penetraciones osciló entre el 30 y el 40% para aquellos tratamientos con tebufenocida a 935 l/ha en las primeras cinco

evaluaciones. En cambio, dicho porcentaje fue mucho menor cuando se aplicó un volumen de 3.741 l/ha, con la excepción de la primera evaluación donde no se obtuvieron diferencias entre volúmenes. Una posible explicación puede ser la relación entre la dosis y la velocidad de acción del insecticida. El efecto de dilución o disminución de la concentración cuando se mantiene la cantidad de materia activa por hectárea y se aumenta la cantidad de volumen aplicado probablemente no se puede aplicar en este caso, ya que la dosis de 330 g m.a./ha sea muy alta, además aplicaciones a mayor volumen producen goteo que tiende a acumular parte del producto insecticida en la parte superior del fruto.

En este estudio, el porcentaje de daño observado al sumar el porcentaje de penetraciones y picaduras se encuentra cerca del 100% en todos los tratamientos con tebufenocida. El daño total obtenido con metflazinfos fue alrededor del 50% para las tres primeras semanas, porcentaje que en campo generalmente no se obtiene. Este hecho indica que la metodología utilizada tan solo nos permite comparar el porcentaje de daño entre los distintos tratamientos, pero no extrapolar a condiciones de campo.

Cuando se realizó un estudio concreto para correlacionar el volumen de caldo aplicado por hectárea y la mortalidad larvaria se obtuvo una buena relación cuando dicho volumen fue de 935 l/ha, pero no cuando el volumen fue mayor. En este caso, los árboles eran de gran tamaño, por lo que al utilizarse un volumen alto, quizás la aplicación no sea del todo uniforme, ya que se produce goteo, lo que produce cierta acumulación de producto en la zona superior de los frutos, acumulación que no se traduce en un mayor porcentaje de recubrimiento en las tarjetas. De todas formas, parece claro el hecho de ser necesaria una buena cobertura cuando se trata con un insecticida de las características de tebufenocida.

Conclusiones

La inexistencia de diferencias significativas entre el porcentaje de daños obtenidos entre las diversas fechas de inicio de aplicaciones de tebufenocida en campo parecen indicar cierta actividad ovicida de este compuesto.

La persistencia de tebufenocida es alrededor de un mes en las condiciones del ensayo. Probablemente, el factor de dilución debido al crecimiento vegetativo de frutos y hojas es el que más influye en la persistencia de tebufenocida en campo. No se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos coadyuvantes utilizados en el porcentaje de cobertura del tratamiento, en la mortalidad larvaria, ni en la persistencia.

Parece necesario obtener un buen recubrimiento en el momento del tratamiento para obtener buenos resultados con este insecticida. Aunque los mejores resultados se obtuvieron con volúmenes de caldo extremadamente altos (3.745 l/ha) con la finalidad de asegurarnos una total cobertura en el tratamiento, probablemente volúmenes menores pueden también proporcionar buenos resultados.

Agradecimientos.

Expresamos nuestro agradecimiento a la Universitat de Lleida por la concesión de una beca ACID en 1993, y a la CIRIT por la concesión de una beca en 1994 ambas al primer autor. Especialmente expresamos nuestro agradecimiento a Rohm and Haas Co. por la ayuda tanto de material como económica a este trabajo.

SUMMARY**Effect of timing, surfactants and coverage on field treatments of tebufenozide on *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)**

Trials were conducted in apple orchards from Hood River, Oregon, to find best timing for tebufenozide (RH-5992) treatments on the first generation of codling moth, *Cydia pomonella* (L.). Percentage of damage, insecticide persistence, treatment coverage, and effect of surfactants were assessed.

There were no statistical differences between the timings for the first application of tebufenozide, neither between the different surfactants tested, but there were statistical differences between the volumes applied. In medium size trees, the percentage of larval mortality obtained in the laboratory with field treated apples was 60.8% when tebufenozide was applied at 935 l/ha, and it was 81.1% when the volume was 3,745 l/ha, and the percentage did not decrease until 32 days after treatment. When tebufenozide was applied at 3,745 l/ha, the percentage of larval mortality was higher than the treatments with azinphosmethyl. High relation between coverage and larval mortality was obtained when trees were treated with tebufenozide using a volume of 935 l/ha.

Key words: IGR, Tebufenozide, Lepidoptera, *Cydia pomonella*, Timing, Persistence

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD T.R., 1988. Degree-days requirements for predicting emergence and flight of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lep., Olethreutidae). J. Appl. Ent. 106: 345-349.
- AHMAD T.R., AL-GHARBAWI Z.A., 1986. Effects of pheromone traps design and placement on catches of codling moth males. J. Appl. Ent. 102: 52-57.
- BRUNNER, J.F., HOYT S.C., WRIGHT M.A., 1982. Insect answers: codling moth control. A new tool for timing sprays. Wash. State Univ. Ext. Serv. Ext. Bull. 1072.
- CHARMILLOT P. J., PASQUIER D., ALIPAZ N.J., 1994. La tébufénozide, un nouveau produit sélectif de lutte contre le carpocapse *Cydia pomonella* L. et la tordeuse de la pelure *Adoxophyes orana* F.V.R. Revue suisse Vitc. Arvoric. Hortic. Vol. 26 (2): 123-129.
- RIEDL H., 1980. The importance of pheromone trap density and trap maintenance for the development of standardized monitoring procedures for the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). Can. Ent. 112: 655-663.
- RIEDL H., CROFT B.A., HOWITT A.J., 1976. Forecasting codling moth phenology based on pheromone trap catches and physiological-time models. Can. Ent. 108: 449-460.
- RIEDL H., HANSON L.A., SEAMAN A., 1986. Toxicological response of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) populations from California and New York to azinphosmethyl. Agric. Ecosystems Environ., 16: 189-201.
- RIEDL H., SHEARER P.W., 1988. Apple, pest control with IGRs, 1897. Arthropod Management Tests, 13: 30-31.
- RIEDL H., SHEARER P.W., 1989. Insect control with insect growth regulators, 1988. Arthropod Management Tests, 14: 32-33.
- RIEDL H., SHEARER P.W., 1990. Full season insecticide evaluations, 1989. Arthropod Management Tests, 15: 35-37.
- SMAGGHE G., DEGHEELE D., 1994. Action of a novel nonsteroidal ecdysteroid mimic, tebufenozide (RH-5992), on insects of different orders. Pestic. Sci. 42: 85-92.
- WESTIGARD P.H., GUT L.J., 1986. Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) control on pears with modified programs using insect growth regulators. J. Econ. Entomol. 79: 247-249.

WING, K. D., 1988. RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Science (Washington)*, 241: 467-469.

WING, K. D., SLAWECKI R.A., CARLSON G.R., 1988. RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval lepidoptera. *Science (Washington)*, 241: 470-472.