

## SUSCEPTIBILIDAD DE *CHRYSOPA EXTERIOR* NAVÁS A *BEAUVERIA BASSIANA* (BALSAMO) VUILLEMIN CEPA LBB-1 EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Orisel Estévez Leyva,<sup>1</sup> Elina Massó Villalón,<sup>1</sup> Rafael Abreu Ávila<sup>1</sup> y Dilaila Baró Bulet<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, La Habana, C.P. 11600, oestevez@inisav.cu; emasso@inisav.cu; rabreu@inisav.cu

<sup>2</sup> Organopónico del Centro Internacional de Restauración Neurológica. Calle 200 e/ 15 y 17, Playa, La Habana, dilaila1969@yahoo.com

### RESUMEN

El uso de la lucha biológica para el control de plagas que afectan a los cultivos se ha generalizado en todo el país debido a sus múltiples ventajas en el ámbito económico, ecológico y social. Dentro de las estrategias de control biológico se emplean diversos medios como el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, y el depredador *Chrysopa exterior* Navás. Para su utilización conjunta se debe pasar por una etapa previa, imprescindible para establecer los posibles efectos negativos de su interacción mediante bioensayos ecotoxicológicos. En este trabajo se evaluó la susceptibilidad de las distintas fases de desarrollo del depredador *C. exterior* al hongo entomopatógeno *B. bassiana* en condiciones de laboratorio. Se utilizaron insectos obtenidos de una cría de laboratorio de *C. exterior* y suspensiones a base de la cepa LBB-1 a las concentraciones de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  esporas  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. Los bioensayos se realizaron bajo condiciones de temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa del  $80 \pm 2\%$ . Los estados preimaginales del entomófago fueron sumergidos en las suspensiones, y los adultos se asperjaron. El parámetro evaluado en los huevos fue su eclosión. En las larvas y los adultos la mortalidad, y para los cocones la emergencia de los adultos. Las suspensiones conidiales del hongo no afectaron ninguna de las fases de desarrollo del insecto, por lo que ambos controles biológicos pueden utilizarse conjuntamente para el control de plagas agrícolas en los sistemas de producción.

Palabras claves: *Chrysopa exterior*, *Beauveria bassiana*, susceptibilidad, bioensayos ecotoxicológicos

### ABSTRACT

The use of biological control for reducing plagues of crops has extended in the whole country, due to the numerous advantages that it brings in economic, ecological and social aspects. Diverse means as entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and the predator *Chrysopa exterior* Navás are used inside biological control strategies. For the combined use it should pass through an indispensable previous stage in order to establish the possible negative effects of their interaction by means ecotoxicological studies. In this way this work was realized to evaluate the different development phases susceptibility of predator *C. exterior* to the entomopathogenic fungus *B. bassiana* in ecotoxicological bioassays under laboratory conditions. Insects obtained from a laboratory breeding of *C. exterior* and suspensions of strain LBB-1 at concentrations of  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  spores  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> were used. Assays were made at temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $80 \pm 2\%$  of relative humidity. Immature states of natural enemies were submerged in suspensions and the adults were sprayed. The parameter evaluated in eggs was its appearance, mortality was evaluated in larvae, and adults emergency were evaluated in pupae. LBB-1 strain suspensions did not affect any development phases of insect, so both biological controls can be used together for agricultural pest control in production systems.

Key words: *Chrysopa exterior*, *Beauveria bassiana*, susceptibility, ecotoxicological bioassays

### INTRODUCCIÓN

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan menor impacto y riesgo ambiental, y que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas sintéticos [Hansen y Johnson, 1999; Iannacone y Alvariano, 2002]. El final del siglo XX, y lo que va del XXI, se han caracterizado por un fuerte apoyo a los esfuerzos de la pro-

tección del ambiente por varios sectores de todas las sociedades, por lo que el control biológico tiene gran importancia en la reducción de organismos indeseables en el necesario equilibrio ambiental [Speciale, 2007].

El control biológico es, sin duda, una de las herramientas principales que el hombre tiene para reducir las poblaciones de artrópodos plaga en los cultivos agrícola-

las. Esto se realiza mediante el uso de entomófagos y entomopatógenos, y está considerado como una de las estrategias fitosanitarias de mayor importancia en la agricultura de Cuba [Massó y Gómez, 2008].

La mayor parte de los insectos depredadores utilizados en programas de control biológico pertenecen a las familias Chrysopidae y Coccinellidae. La familia Chrysopidae es la más importante de todos los depredadores del orden Neuroptera. Actualmente se consideran agentes biológicos decisivos para el control de plagas insectiles, y se ha difundido su utilización en cultivos comerciales, invernaderos y jardines [Núñez, 1988]. Este neuróptero –llamado comúnmente alas de encaje, mosca de ojos dorados o león de áfidos– es un controlador biológico promisorio en el manejo ecológico e integrado de plagas. Las larvas son depredadores muy voraces que se alimentan de cuerpos blandos de insectos y arácnidos [Fonseca *et al.*, 2000].

El hongo *B. bassiana* se ha utilizado exitosamente para controlar plagas en muchas regiones del mundo, como parte de las estrategias de manejo integrado de plagas. Por sus características patogénicas para controlar insectos, su factibilidad de reproducción en forma artesanal y la rentabilidad de su uso, este hongo representa una alternativa viable al utilizarse sin perjuicios al medioambiente y sin efectos tóxicos [Bateman, 1997].

Se ha demostrado que hay bioplaguicidas que presentan efectos sobre biorreguladores de plagas. El estudio de este aspecto es importante en cuanto a la conservación de la fauna benéfica [Vázquez, 2003]. El conoci-

miento del efecto de los bioplaguicidas sobre la fauna benéfica, y en especial sobre sus diferentes estados en desarrollo, permitirá evitar el uso de aquellos con consecuencias negativas y fomentar el uso de los que causen un menor impacto ecotoxicológico [Iannacone y Lamas, 2003]. Por estas razones se evaluó la susceptibilidad del depredador *C. exterior*, en todas sus fases de desarrollo, al hongo entomopatógeno *B. bassiana* en condiciones de laboratorio, y se valoró la posibilidad del uso conjunto de ambos en los sistemas de producción agrícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos fueron realizados en el Laboratorio de Cría de Artrópodos Benéficos, del Grupo de Trabajo de Tecnologías de Reproducción de Medios Biológicos y Artrópodos Benéficos, perteneciente al Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.

Se evaluó el efecto del hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa LBB-1 sobre huevos, larvas y pupas del depredador *C. exterior* por el método de inmersión durante 5 s, y el efecto sobre adultos se evaluó por el método de aspersión [FAO, 1969], para lo cual se utilizaron suspensiones del hongo preparadas con agua destilada y Tween 80 a las concentraciones de  $1 \times 10^7$  esporas  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^8$  esporas  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, y agua destilada solamente para el caso del testigo (*Tabla 1*). Los bioensayos se realizaron bajo condiciones controladas a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y el  $80 \pm 2\%$  de humedad relativa.

**Tabla 1. Variantes utilizadas**

| <i>Testigo</i> | <i>Aspersión o inmersión en agua destilada</i>  |
|----------------|---|
| Tratamiento 1  | Aspersión o inmersión en suspensión a base de la cepa LBB-1 a una concentración de $1 \times 10^7$ esporas $\cdot$ mL <sup>-1</sup> |
| Tratamiento 2  | Aspersión o inmersión en suspensión a base de la cepa LBB-1 a una concentración de $1 \times 10^8$ esporas $\cdot$ mL <sup>-1</sup> |

Para medir el efecto que ejerce el hongo entomopatógeno *B. bassiana* sobre el desarrollo embrionario de *C. exterior* se utilizaron huevos desfilamentados de 24 h de puestos, los que se seleccionaron bajo un estereoscopio para asegurar su buen estado. Las larvas utilizadas para los bioensayos fueron de primer instar; se escogieron cocones de 48 h de edad, y en los experimentos con adultos se seleccionaron imagos con una semana de emergidos.

Para todos los estados de desarrollo las evaluaciones se realizaron diariamente hasta que se observó el nacimiento de la larva, en el caso de los huevos, para determinar el porcentaje de eclosión y el tiempo en que eclosionaron. Para las larvas y los adultos se registró la mortalidad y el tiempo al cual murieron, y en ambos casos los muertos se colocaron en cámara húmeda. Para el caso de los cocones se observaron hasta la emergencia de los adultos para medir el porcentaje de emer-

sión. En todas las fases de desarrollo evaluadas se continuó la observación del ciclo de vida de los insectos hasta que fue completado.

Se realizó análisis de varianza simple (ANOVA) y prueba de significación de Tukey para un nivel de significación del 5% ( $\alpha = 0,05$ ) por el programa Statistica versión 6.

Se utilizó la escala de toxicidad a enemigos naturales aplicada por la Organización Internacional para el Control Biológico e Integrado de los Animales y Plantas perjudiciales para los cultivos (OILB) [Viñuela *et al.*, 1993] en ensayos residuales de laboratorio para la comparación con los resultados.

Escala de toxicidad a enemigos naturales:

Categoría 1 Inocuo (< 30%)

Categoría 2 Ligeramente tóxico (30-79%)

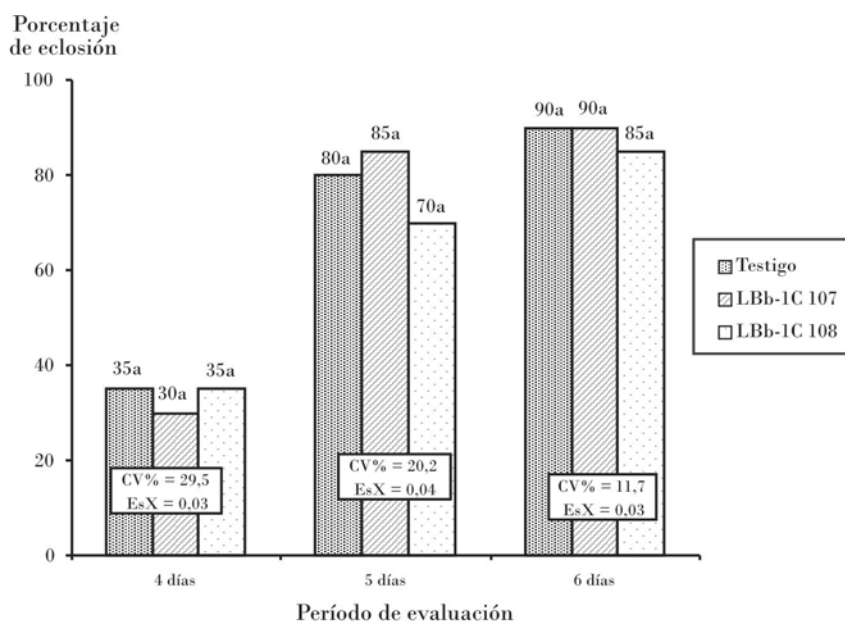
Categoría 3 Moderadamente tóxico (80-99%)

Categoría 4 Tóxico (> 99%)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de eclosión de los huevos de *C. exterior* con las concentraciones del hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa LBb-1 de  $1 \times 10^7$  esporas  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^8$  esporas  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> fueron altos, con el 90 y el 85%, respectivamente, y no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el testigo, que fue del 90%.

El desarrollo embrionario de los huevos de *C. exterior* con las dos concentraciones utilizadas no se vio afectado. El tiempo de eclosión de los huevos osciló entre cuatro y seis días. A los cuatro días se inició el nacimiento de las larvas, y a los cinco se produjo la mayor eclosión que continuó hasta los seis días (*Fig. 1*).



*Figura 1.* Porcentaje de eclosión de huevos de *C. exterior* tratados con *B. bassiana* a los diferentes días de evaluados.

Al evaluar el efecto de suspensiones de *B. bassiana* a concentraciones entre  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^8$  conidios  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> sobre huevos de *Chrysoperla externa* con 24 h de edad, Amorim *et al.* (2005) determinaron que no hubo efecto sobre la viabilidad en ninguna de las concentraciones utilizadas, resultado que coincide con el obtenido en esta investigación.

En estudios de Iannacone y Lamas (2002) para evaluar el efecto de dos extractos botánicos (rotenona y azadiractina) y un insecticida carbámico sobre huevos del depredador *C. externa* en bioensayos ecotoxicológicos, determinaron que ninguno de los tres productos a las dosis máximas utilizadas causaron efectos negativos en el porcentaje de eclosión de huevos, lo que

podiera sugerir que la eclosión de huevos no es muy afectada por productos biológicos, extractos botánicos e insecticidas químicos.

En los bioensayos del hongo entomopatógeno *B. bassiana* cepa LBB-1 realizados sobre larvas de primer instar de *C. exterior*, las concentraciones utilizadas provocaron mortalidades del 12 y 20%, y se observaron

diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo, que no presentó mortalidad. A las 72 h de la aplicación, el tratamiento 1 presentó una mortalidad baja, no diferente del testigo, no así con el tratamiento 2, que con el 16% sí difirió de ambos. A las 96 h se observaron mortalidades del 12% para el tratamiento 1 y del 20% para el 2, diferentes estadísticamente entre sí y respecto al testigo (Fig. 2).

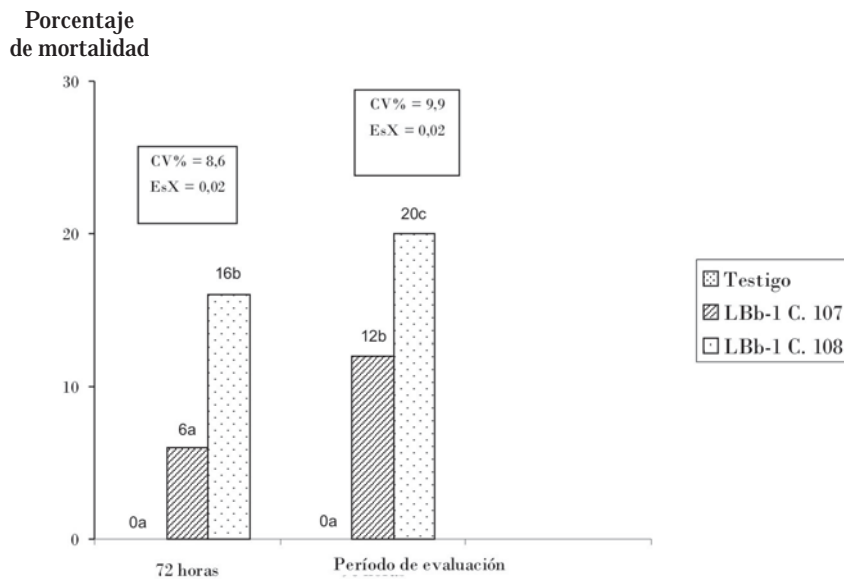


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *C. exterior* de primer instar tratadas con *B. bassiana* a las 72 y 96 h de exposición.

En bioensayos realizados en el laboratorio con *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*, Generoso (2002) verificó que esos hongos eran selectivos a larvas de primer y tercer instar de *C. externa*, ya que provocaron bajas mortalidades en esos estadios de desarrollo. Por otra parte, al evaluar un bionemático constituido por la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* sobre larvas de *C. exterior* en bioensayos ecotoxicológicos realizados en laboratorio, García (2005) reportó bajos porcentajes de mortalidad, entre el 10 y el 30%, con lo que confirmó la ausencia de patogenicidad del hongo sobre este depredador.

Thungrabeab y Tongma (2007) realizaron experimentos para conocer el efecto de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre los enemigos naturales *Coccinella septempunctata* L., *Chrysoperla carnea* (Stephens) y *Dicyphus tamaninii* Wagner, así

como también el insecto beneficioso de la tierra *Heteromurus nitidus* Templeton. Se obtuvo que *B. bassiana* no resultó patogénico para los insectos evaluados, ya que no presentaron mortalidad. Para el caso de *M. anisopliae* solamente se registró mortalidad para *C. carnea* y *D. tamaninii* con el 4 y el 10%, respectivamente. En este estudio los autores señalaron a *B. bassiana* y *M. anisopliae* como agentes de control biológico relativamente seguros sobre insectos no diana, como los enemigos naturales y los insectos benéficos de la tierra.

En los bioensayos realizados en el laboratorio con cocones de *C. exterior* se observó un alto porcentaje de emergencia de adultos entre el 80 y el 90% en los tratamientos después de los quince días de la aplicación, y no se observaron diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo, que fue del 90% (Fig. 3).

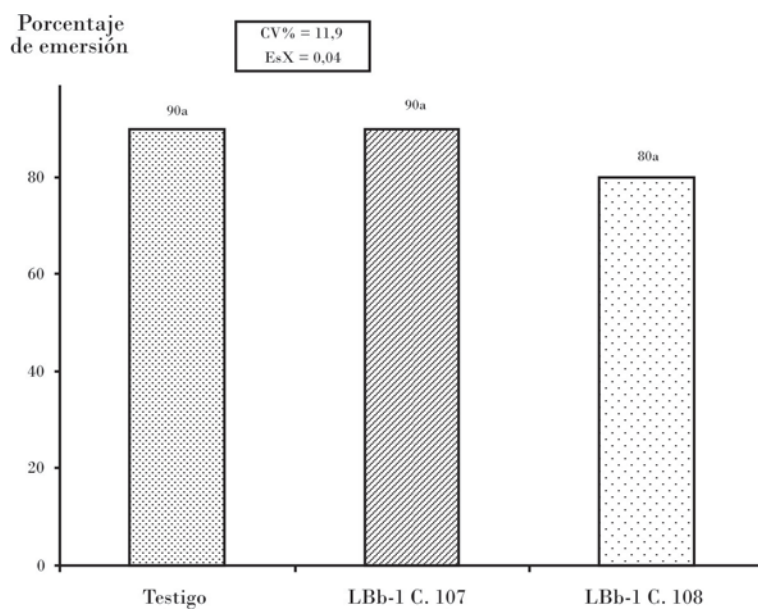


Figura 3. Efecto que provoca el tratamiento de cocones de *C. exterior* con *B. bassiana* en la emergencia de los adultos a los quince días de tratados.

Iannacone y Lamas (2003) también evaluaron el efecto toxicológico de extractos de dos plantas: molle (*Schinus molle*) y lantana (*Lantana camara*) sobre pupas de *C. externa* en bioensayos realizados bajo condiciones de laboratorio. Los extractos acuosos del molle y la lantana a las concentraciones aplicadas no causaron efectos significativos en la emergencia de pupas de *C. externa* en ensayos de inmersión después de lecturas de ocho y veintidós días. Lo alcanzado por ellos es similar al obtenido en esta investigación con *B. bassiana*, y pudiera sugerir

que la fase de pupa es poco susceptible tanto a productos botánicos como biológicos.

En los bioensayos con adultos de *C. exterior*, las concentraciones utilizadas provocaron mortalidades bajas en ambos casos de un 10%, y no se observaron diferencias estadísticas significativas a las 48, 72 y 96 h después de la aplicación, en comparación con el testigo que no registró mortalidad (Fig. 4). En la búsqueda, la información encontrada referida al efecto de los productos biológicos sobre adultos del depredador fue escasa.

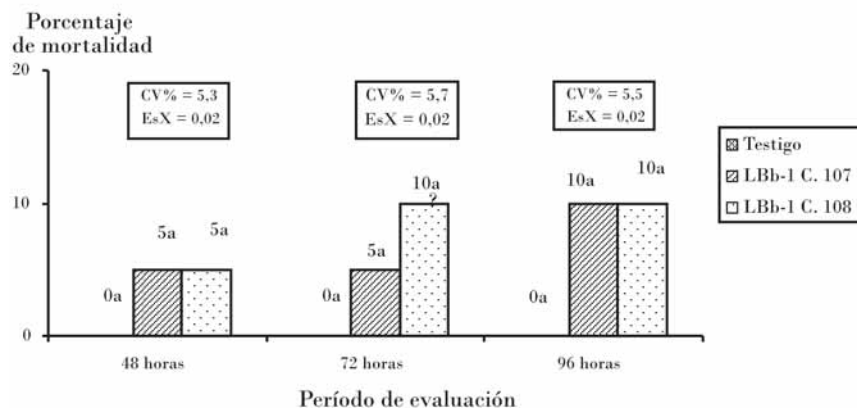


Figura 4. Mortalidad de adultos de *C. exterior* tratados con *B. bassiana* a las 48, 72 y 96 h de exposición.

Castillo *et al.* (2009) realizaron bioensayos de laboratorio con el objetivo de determinar si *B. bassiana* afectaba al parasitoide de la broca del café (*Phymastichus coffea* LaSalle). El principal efecto del hongo se observó en la disminución de la longevidad de los adultos y en la mortalidad del 100% de los inmaduros del parasitoide, cuando el hongo fue aplicado a sus hospederos parasitados.

Otro estudio similar fue realizado por Vázquez (2002) para determinar el efecto bioplaguicida de los hongos *Lecanicillium lecanii* y *B. bassiana* sobre adultos de *Cotesia americanus* (Lepelletier) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de la primavera de la yuca (*Erinnyis ello* L.), que reportó mortalidades del 95,1 y el 84,5%, respectivamente, entre los tres y cinco días posteriores al contacto con las superficies asperjadas con los biopreparados. Esto demuestra que los hongos entomopatógenos pueden ser patógenicos para himenópteros parasitoides y además mostrar diferen-

tes niveles de patogenicidad sobre los insectos benéficos, y ser más dañinos para unos que para otros.

De acuerdo con los resultados en los parámetros evaluados en cada una de las fases de desarrollo del depredador, se procedió a su comparación con la escala de toxicidad a enemigos naturales, aplicada por la OILB [Viñuela *et al.*, 1993] para ensayos residuales de laboratorio.

Estos resultados manifestaron que la mortalidad para la fase de huevo estuvo entre el 10 y el 15%; para las larvas el 12 y el 20%, por lo que este estado de desarrollo inmaduro resultó más sensible al hongo entomopatógeno, mostrando los más altos porcentajes. Los cocones presentaron mortalidades entre el 10 y el 20%, y en el caso de los adultos fue del 10% con las dos concentraciones utilizadas.

Por lo anterior se pueden clasificar estos resultados en la categoría 1 (inocuo) debido a que en los parámetros evaluados los porcentajes de mortalidad se mantuvieron dentro de lo establecido para esta categoría (< 30%) (Tabla 2).

**Tabla 2. Toxicidad de *B. bassiana* sobre los estados de desarrollo de *C. exterior*, de acuerdo con la escala aplicada por la (OILB) [Viñuela *et al.*, 1993]**

| Estados de desarrollo | Porcentaje de mortalidad Tratamiento 1 | Porcentaje de mortalidad Tratamiento 2 | Toxicidad |
|-----------------------|--|--|-----------|
| Huevo                 | 10                                     | 15                                     | Inocuo    |
| Larva                 | 12                                     | 20                                     | Inocuo    |
| Cocón                 | 10                                     | 20                                     | Inocuo    |
| Adulto                | 10                                     | 10                                     | Inocuo    |

Los resultados en el laboratorio sugieren que es posible la utilización conjunta del hongo entomopatógeno *B. bassiana* y el depredador *C. exterior* en los sistemas de producción agrícola para el control de plagas, ya que, si en el laboratorio se registraron bajos niveles de mortalidad, en el campo los efectos negativos del hongo sobre el insecto deben ser menores, ya que, según Alves (1998), la mortalidad observada en condiciones de laboratorio no siempre es equivalente a la obtenida en condiciones de campo, donde la cantidad de inóculo que alcanza el insecto es menor.

Lo anterior coincide con lo planteado por la OILB, que aconseja como primer paso trabajar en condiciones de laboratorio. Si el plaguicida resulta ser inocuo en condiciones de laboratorio, no es necesario conocer su efecto en condiciones de semicampo o campo, ya que si no ha afectado al organismo en estas estrictas condiciones, difícilmente lo pueda hacer en campo; sin embar-

go, por lo general si un plaguicida tiene algún efecto negativo en laboratorio, tendrá que ser objeto de ensayos de semicampo y campo para determinar su actividad, de acuerdo con Viñuela *et al.* (1993).

## CONCLUSIONES

- El hongo entomopatógeno *B. bassiana* (cepa LBb-1) no afectó en ensayos de laboratorio el desarrollo embrionario de los huevos, el de las larvas, ni la emergencia y la supervivencia de los adultos del depredador *C. exterior*.
- Es posible la utilización conjunta de *B. bassiana* (cepa LBb-1) y *C. exterior* para el control biológico de plagas en los sistemas de producción agrícola debido a la baja susceptibilidad de este depredador al entomopatógeno.

## REFERENCIAS

- Alves, S.: «Fungos entomopatogênicos», *Controle microbiano de insetos*, Fundação Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Brasil, 1998, pp. 289-381.
- Amorim, L. G.; R. Sousa; A. Moino; B. Souza: «Compatibility Between *Beauveria bassiana* and the Predator *Chrysoperla externa* in Laboratory» *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(6), 2005.
- Bateman, R.: «The Development of a Mycoinsecticide for the Control of Locust and Grasshoppers», *Outlook on Agriculture* 26:13-18, 1997.
- Castillo, A.; J. Gómez; F. Infante; F. E. Vega: «Susceptibilidad del parasitoide *Phymastichus coffea* a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio», *Neotropical Entomology* 38(5):665-670, 2009.
- FAO: «Métodos recomendados para la detección y la medición de la resistencia de plagas agrícolas a los plaguicidas», *Boletín FAO* 17(4)76-82, Italia, 1969.
- Fonseca, A. R.; C. Carvalho; B. Souza; C. Ecole: «Functional Response of *Chrysoperla externa* fed on *Schizaphis graminum*», International Congress of Entomology, Brasil, Abstract Book I, 2000.
- García, L.: «Evaluación toxicológica y ecotoxicológica de un bionemático constituido por la cepa imi sd 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*», tesis de doctorado, UNAH, Censa, La Habana, 2005.
- Generoso, A.: «Compatibilidad de *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* com *Chrysoperla externa* e metodologia para avaliação da seletividade», Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- Hansen, L. J.; M. L. Johnson: «Conservation and Toxicology: Integrating the Disciplines», *Conservation Biology* 13(5):1225-1227, EE. UU., 1999.
- Iannacone, J.; L. Alvario: «Evaluación del riesgo ambiental del insecticida cartap en bioensayos con tres invertebrados», *Agricultura Técnica* 62(3):366-374, Chile, 2002.
- Iannacone, J.; G. Lamas: «Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*», *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 65:92-101, Costa Rica, 2002.
- Iannacone, J.; G. Lamas: «Efectos toxicológicos de extractos de molle (*Schinus molle*) y lantana (*Lantana camara*) sobre *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) en Perú», *Agricultura Técnica* 63(4):347-360, Chile, 2003.
- Massó, E.; R. Gómez: «Producción y uso de entomófagos en Cuba», *Fitosanidad* 12(4):253, La Habana, 2008.
- Núñez, E.: «Chrysopidae (Neuroptera) del Perú y sus especies más comunes», *Revista Peruana de Entomología* 31:69-75, 1988.
- Speciale, F.: «Alternativas ante el uso de químicos», *Control Biológico de Insectos*, FCV-UNA, 2007, <http://www.abc.com.py/suplementos/rural/articulos.php?pid=481138> (consultado el 21 de marzo de 2009).
- Thungrabeab, M.; S. Tongma: «Effect of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non Target Insects», *Kmitl Science Technology Journal* 7(1):8-12, Tailandia, 2007.
- Vázquez, L.: «Efecto de *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Cotesia americanus* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de larvas de la primavera de la yuca (*Erinnyis ello* L.)», *Fitosanidad* 6(1):25-27, La Habana, 2002.
- Vázquez, L.: *Manejo integrado de plagas. Preguntas y respuestas para agricultores y extensionistas*, Ed. Cidisav, La Habana, 2003.
- Viñuela, E.; J. A. Jacas; V. Marco; A. Adan; F. Budia: «Los efectos de los plaguicidas sobre los organismos beneficiosos en agricultura. Grupo de trabajo de OILB plaguicidas y organismos beneficiosos. I. Insecticidas y acaricidas», *Phytoma* 45:18-25, España, 1993.