

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE SANIDAD VEGETAL

USO DE EXTRACTOS DEL ARBOL NIM *Azadirachta indica* A. Juss
EN LA PROTECCION DE PLANTULAS DE FRIJOL COMUN
Phaseolus vulgaris L. CONTRA MOSCA BLANCA *Bemisia tabaci* Genn.

DIPLOMANTE: BENITO ZELEDON ANTON
ASESOR: Msc. PAMELA KAY ANDERSON
CONSULTOR: Msc. HUMBERTO TAPIA BARQUERO

MANAGUA, NICARAGUA 1990.

P R E S E N T A C I O N

1. TITULO DEL PROYECTO:

Informe preliminar sobre *Bemisia tabaci* Genn. en frijol común en siembra con riego

2. TITULO DEL EXPERIMENTO:

Uso de extractos del árbol *Nim Azadirachta indica* A. Juss en la protección de plántulas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. contra mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn:

3. RESPONSABLE:

Benito Zeledón Antón

4. ASESOR:

Pamela Kay Anderson

5. CONSULTOR:

Humberto Tapia Barquero

6. INSTITUCION:

Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Sanidad Vegetal

7. DURACION:

- a) Formulación del anteproyecto: Noviembre 1987.
- b) Ejecución de parte experimentales: Diciembre 1987 - Febrero 1988
- c) Elaboración escrita de tesis: Marzo - Diciembre 1989

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo
A mis madres: Cándida Antón y Herminia Antón.

Así también al grupo de personas
quienes me han apoyado en todo
momento durante mi vida estudiantil

A la memoria del Ing. Humberto Francisco Tapia Barquero

ABRADECIMIENTO

Agradezco el apoyo brindado por parte del Proyecto Nim del Centro Nacional de Protección Vegetal (CNPV) del Ministerio de Desarrollo Agropecuario y Reforma Agraria (MIDINRA) e igualmente al organismo Deutsche Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit GmbH (gtz).

A las compañeras: Maritza Mendez y Mireya Monterrey por facilitarme el acceso al material de Nim y por la escritura del manuscrito respectivamente.

De manera especial a las asesoras: Pamela Kay Anderson y Kathrina Gruber.

Expreso agradecimiento por la facilidad del uso de las instalaciones de la Escuela de Sanidad Vegetal del Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias (ISCA), así también por el apoyo financiero brindado por el grupo de cooperación Agencia Estatal Noruega de Desarrollo (NORAD).

INDICE

Sección	Página
Agradecimiento	i
Indice	ii
Indice de Cuadros y Figuras	iii
Resumen	iv
I. Introducción	1
II. Objetivos	10
III. Materiales y Métodos	11
IV. Resultados	15
V. Discusión	25
VI. Conclusiones	32
VII. Recomendaciones	33
VIII. Bibliografía	34

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Nombre	Pag.
No.		
1	Valores de t_c para pruebas pareadas de tratamientos con Extractos metanólicos y acuosos de Nim aplicados al follaje de frijol común para pruebas de preferencia con <i>B. Tabaci</i>	17
2.	Oviposición (No. huevos/foliolo) 24 horas después de tratamiento con extracto acuoso de 25 y 50 g/l de Nim en frijol común variedad Revolución-81, Laboratorio SAVE/ISCA. Managua, Nicaragua, 1987.	18
3.	Oviposición (No. huevos/foliolo) 24 horas después de tratamiento con extracto acuoso de 50 g/l de semilla de Nim en frijol común variedad Revolución-81. Laboratorio CNPV/MIDINRA. Managua, Nicaragua, 1988.	19
4.	Evaluación de fitotoxicidad en follaje de frijol común en sus primeros 20 días de vida con diferentes tratamientos con extractos de Nim. Invernadero SAVE/ISCA. Managua, Nicaragua, 1987.	20
5.	Evaluación de fitotoxicidad en follaje de cinco variedades diferentes de frijol común en sus primeros 20 días de vida con un tratamiento de 50 g/l de extracto de Nim. Invernadero CNPV/MIDINRA. Managua, Nicaragua, 1988.	21

Figuras	Nombre	Pag.
1.	Períodos críticos de la planta de frijol y su posible protección con aplicaciones de extractos de <i>Nim A. indica</i>	22
2.	Forma en que se presentan las quemaduras, manchas y escaldaduras en las hojas de frijol común, como sintomatología de fitotoxicidad por aplicaciones de tratamiento 50 g/l de extracto acuoso de semilla de <i>Nim A. indica</i>	23
3.	Modelo de jaula para prueba de oviposición con <i>B. tabaci</i> en folíolos de frijol	24

RESUMEN

El presente trabajo constituye una de las alternativas para proteger al cultivo del frijol común *Phaseolus vulgaris* L. de insectos vectores que lo atacan. Con aplicación de la sustancia insecticida proveniente de la semilla del árbol *Azadirachta indica* A. Juss conocido como Nim (ó Neem), se afecta el comportamiento de adultos de mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn en vez de hacer aplicaciones calendarizadas con químicos sintéticos.

El estudio se realizó en invernaderos y laboratorios de ISCA y CNPV, desarrollado en dos pruebas: de oviposición y fitotoxicidad. Cada prueba comprendió dos ensayos. El primero de oviposición en que se evaluaron ocho tratamientos con nueve repeticiones cada uno y el segundo incluyó el tratamiento promisorio 50 g/l de semilla molida de Nim con el doble de repeticiones que el primer ensayo de oviposición. Para la prueba de fitotoxicidad se evaluaron ocho tratamientos en plántulas de una variedad de frijol de grano rojo (Rv.-81), para el segundo ensayo se eligieron los dos tratamientos que provocaron mayor fitotoxicidad y se evaluaron en cinco variedades de frijol con ciclo vegetativo diferente.

Los resultados preliminares indican que los extractos acuosos de semilla de Nim afectan la oviposición de los adultos de *B. tabaci* en folíolos de frijol común, independiente de la concentración pero a su vez el tratamiento de mayor concentración provoca fitotoxicidad durante las dos primeras semanas de desarrollo de las plántulas, este inconveniente se puede evitar al usar concentraciones bajas de extractos recién elaborados y aplicados, o bien con el uso de variedades de frijol de ciclo vegetativo corto, además que la recuperación posterior de las plantas es total.

Se recomienda continuar ensayos tanto de laboratorio, invernadero y campo evaluando la acción por parte de los extractos de Nim sobre los insectos vectores de enfermedades viróticas.

Los fitosanitarios previenen incrementos de población de *B. tabaci* al final del ciclo vegetativo del algodón *Gossypium hirsutum* L. que luego se trasladan a las plantaciones de frijol con riego al iniciar éstas su ciclo vegetativo. Sobre esta base se pueden desarrollar epifitotias a causa de los virus transmitidos por *B. tabaci* al frijol común.

De la mayoría de enfermedades transmitidas por insectos en los países neotropicales existe escasez de información y en especial de las relaciones vector-patógeno-huésped. En consecuencia faltan bases de conocimiento sobre las que se deben tomar decisiones racionales de cuando intervenir en el ciclo de transmisión del insecto a fin de evitar éste. La investigación necesaria para construir tal base de conocimiento, debe dar las herramientas para el manejo a mediano y largo plazo. Sin embargo, en el corto plazo aún queda la interrogante: Cómo proteger las plantaciones de frijol de los insectos vectores y los patógenos que estos transmiten?

MANEJO CLASICO DE LOS INSECTOS VECTORES

El control químico es el método común de manejo de las poblaciones de vectores. El mal uso de esta práctica es problemática por el alto costo de deterioro del medio ambiente, por la intoxicación humana y la pérdida de divisas que implica su importación y en particular las aplicaciones químicas han mostrado no ser tan efectivas para proteger el frijol contra transmisión de virus que hacen los adultos de *B. tabaci*.

El uso de productos químicos para reducir la propagación de enfermedades virales transmitidas por *B. tabaci* se eleva a 56 productos de 7 grupos. Se observó que 15 de ellos son efectivos para eliminar adultos de *B. tabaci*, 12 de acción moderada, 5 inefectivos, 23 de resultados contradictorios y 1 de resultado no determinado. En cuanto a reducir incidencia de las enfermedades, estos mismos químicos 6 de ellos ejercen buen control, 5 de acción moderada, 7 no efectivos, 14 de resultados contradictorios, 24 no determinados adecuadamente (SHARAF, 1986).

En evaluaciones sobre el cultivo de frijol, en Guatemala usando las dosis más altas posibles (2-2.5 l/ha y 2-2.5 kg/ha) de los insecticidas comerciales Thiodan (Endosulfan), Tamarón (Metamidofos), Metasystox (Oxidemetón etil), Dipterex (Triclorfon), Sevin (Carbaril) concluyen que estos insecticidas no tienen efecto sobre la diseminación del mosaico dorado (ALONZO y COJULUN, 1974).

A su vez el uso de químicos no contempla el conocimiento de *B. tabaci* como vector. *B. tabaci* transmite los geminivirus de una manera semipersistente. *B. tabaci* infectada con virus del mosaico dorado pueden transmitirlo a una planta saludable en un periodo de tiempo de seis minutos (BIRD, 1978). Por esa razón cualquier plaguicida efectivo contra *B. tabaci*, debe tener una acción rápida, residual y efectiva con 100% de mortalidad (SHARAF, 1986). NENE (1973) considera que no existe un insecticida que pueda matar a *B. tabaci* tan rápido que prevenga la inoculación del virus. Con lo que se puede inferir que la capacidad de matar el insecto no determina la incidencia de la enfermedad.

El uso de productos químicos para reducir la propagación de enfermedades virales transmitidas por *B. tabaci* se eleva a 56 productos de 7 grupos. Se observó que 15 de ellos son efectivos para eliminar adultos de *B. tabaci*, 12 de acción moderada, 5 inefectivos, 23 de resultados contradictorios y 1 de resultado no determinado. En cuanto a reducir incidencia de las enfermedades, estos mismos químicos 6 de ellos ejercen buen control, 5 de acción moderada, 7 no efectivos, 14 de resultados contradictorios, 24 no determinados adecuadamente (SHARAF, 1986).

En evaluaciones sobre el cultivo de frijol, en Guatemala usando las dosis más altas posibles (2-2.5 l/ha y 2-2.5 kg/ha) de los insecticidas comerciales Thiodan (Endosulfan), Tamarón (Metamidofos), Metasystox (Oxidemetón metil), Dipterex (Triclorfon), Sevin (Carbaril) concluyen que estos insecticidas no tienen efecto sobre la diseminación del mosaico dorado (ALONZO y COJULUN, 1974).

A su vez el uso de químicos no contempla el conocimiento de *B. tabaci* como vector. *B. tabaci* transmite los geminivirus de una manera semipersistente. *B. tabaci* infectada con virus del mosaico dorado pueden transmitirlo a una planta saludable en un periodo de tiempo de seis minutos (BIRD, 1978). Por esa razón cualquier plaguicida efectivo contra *B. tabaci*, debe tener una acción rápida, residual y efectiva con 100% de mortalidad (SHARAF, 1986). NENE (1973) considera que no existe un insecticida que pueda matar a *B. tabaci* tan rápido que prevenga la inoculación del virus. Con lo que se puede inferir que la capacidad de matar el insecto no determina la incidencia de la enfermedad.

Además, *B. tabaci* es un eficiente transmisor. La presencia de un individuo infectado por planta es adecuado para la transmisión del virus de mosaico dorado. Si el número asciende a diez adultos por planta de frijol, se logra una transmisión de 100% (GAMEZ, 1971).

Entonces en la práctica el umbral económico para *B. tabaci* como vector sería cercano a cero en este cultivo, (SHARAF, 1986).

La implicación de esto es que para proteger la plantación contra virus transmitidos por *B. tabaci* es necesario el uso de aplicaciones calendarizadas de químicos, teniendo en cuenta de que se habla de insectos vectores migratorios, dichas aplicaciones deben hacerse casi a diario, lo que no tiene sentido económico, de salud ni de protección ambiental.

OPCION VIABLE: ARBOL DE NIM

Ante esta situación y basados en las alternativas para proteger una plantación, se propone la aplicación de sustancias naturales que repelen a los adultos de *B. tabaci* en frijol en vez de aplicaciones totales de químicos sintéticos.

El Nim *Azadirachta indica* A. Juss es un árbol perenne de zonas áridas tropicales de la India y países vecinos. Los extractos de semilla y hojas del árbol por siglos han sido usados en la medicina tradicional y para repeler los insectos. Actualmente su uso es más diversificado en la medicina moderna, farmacéutica, reforestación, carpintería y la sanidad vegetal.

Las sustancias obtenidas (aceites y terpenoides) del Nim, se muestran altamente eficaces en el control de plagas en ensayos de laboratorio y campo respecto a más de 60 especies de insectos nocivos, incluyendo las plagas más dañinas en Nicaragua (HELLPAP, 1985). La lista sigue aumentando según las investigaciones se examinan nuevos organismos.

Las investigaciones sobre los efectos de extractos de Nim han recibido mucha atención en los años recientes.

La sustancia insecticida de origen vegetal contenidas en Nim

La sustancia natural a usar sería extracto de semillas de Nim *Azadirachta indica* A. Juss, con mayor contenido de *Azadirachtina* (inhibidor hormonal) y otras sustancias tales como salanim, nímboi, melantriol y varias más con propiedades diferentes a ciertos insectos como inhibidor de las hormonas de crecimiento como antialimentario y repelente.

En la problemática de insectos dañinos en siembras de frijol con riego se encuentra con una mayor frecuencia y daño, el complejo *Spodoptera sp.-B. tabaci* (CISNEROS et al., 1985).

En la búsqueda de tratamientos promisorios con Nim como parte integrante de un método de manejo integrado de insectos dañinos, en trabajos investigativos se ha informado lo siguiente:

Efectividad de Nim

PRADHAM (1962) informa que extractos acuosos de la semilla impiden las actividades alimenticias del saltamontes *Schistocerca americana gregaria* Forsk. También concentraciones bajas de *Azadirachtina* y extractos acuosos de semilla de Nim repelen oviposición de la plaga de la col *Crociodolomia binotalis* Zell en el laboratorio y campo (FAGDOONEE, 1981).

Ensayos en invernadero con larvas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith en hojas de maíz, se demostró que el potencial de protección de formulación acuosa de extracto crudo etanólico de semilla de Nim al 0.2% y 0.4% se mantuvo por 21 días aproximadamente (JACOBSON, M. et al., 1984). En esta misma línea en ensayo de laboratorio y campo trabajando con larvas de *S. frugiperda* demostraron ser altamente susceptibles a extractos de semillas del árbol de Nim (WELLFAP, 1985).

Ante la problemática del deterioro del medio ambiente y el alto costo que representan los agroquímicos tradicionales, fué comparada la eficiencia de extractos acuosos de Nim con Deltametrina (Decis), demostrando que su eficiencia no difiere a la del Decis, (FAGDOONEE, 1986). Así también se consiguió un buen control con extractos acuosos de Nim comparable con el alcanzado por methamidophos (Tamarón 600 Ec) y mejores resultados aún ante el Thuricide Hp (*Bacillus thuringiensis*) y Profenophos (Selecron 500 Ec) cuando se controlaban plagas como *Heliothis spp.* y *Plutella xylostella* L. (KIRSCH, 1986).

Impacto sobre insectos benéficos

Conociendo que al aplicar sustancias biológicas, tal como los extractos de Nim, se debe tener cuidado de no hacer daño a plantas ni a insectos benéficos del agroecosistema, persiguiendo un objetivo de manejo integrado de plagas.

Al evaluar en ensayos de campo de maíz *Zea mays* L. el control de *Spodoptera* sp. con tratamiento de Nim se encontró que el grado de parasitismo por *Chelonus insularis* Cres. (Braconidae), *Pristimerus spinator* (Ichneumonidae) y *Achaetenuera* sp. (Tachinidae) no cambió. Igualmente, no se observó diferencias en la composición del espectro de predadores *Ectatomma ruidus* (Formicidae), *Cycioneda sanguinea* (Coccinellidae), *Doru taeniatum* Dohrn (Forficulidae), *Chrysopa* sp. Stephens (Chrysopidae) con aplicación de Nim. En ensayos de laboratorio no se detectó impacto de mortalidad de *Doru taeniatum* ni *Ectatomma ruidus* con las aplicaciones de Nim (HELLPAP 1985).

Fitotoxicidad de algunos extractos de semilla de Nim

Sin embargo un efecto negativo es la fitotoxicidad inducida con la aplicación de tratamientos (1500 y 2000 ppm) de extractos crudos de AZT de semilla de Nim que muestran síntomas en forma de necrosis parcial de hojas en el maíz (HELLPAP 1985). Así también KIRSCH (1987) encontró fitotoxicidad en plantas de cuisante (arveja) combatiendo el minador *Phytomyza horticola* con extractos de semilla de Nim (AZT) a 1000 y 1500 ppm. Estos resultados inducen a prever la posibilidad de ocurrencia de fitotoxicidad en plantas de frijol común.

JUSTIFICACION DEL PRESENTE ESTUDIO

A partir de Enero de 1987, fue aprobado el proyecto insecticida Nim, cuya ejecución es responsabilidad de la Dirección General de Tecnología Agrícola (DSTA) del MIDINRA, con apoyo interno del Centro Experimental Forestal de Direna y cooperación externa de la Fundación UMVERTEILEN de la República Federal de Alemania.

Entre sus objetivos está la siembra de árboles de Nim en pequeña y gran escala, así como la formulación de un producto insecticida botánico a base de Nim. Actualmente se han sembrado aproximadamente 125,000 plantas en terrenos de cooperativas, como en plantaciones comerciales y se espera para 1990 disponer de 200-250 mil árboles sembrados en un área de 300 hectáreas. Se adapta una planta piloto para el procesamiento de los frutos del árbol de Nim y a su vez se trabaja en la formulación de extractos de semillas de Nim a fin de reemplazar en parte el uso de plaguicidas importados (MIDINRA, 1987).

La implementación de este programa necesitará de la investigación a cerca de la efectividad de Nim contra insectos de importancia económica y en condiciones locales. Esto se lleva a cabo en el Centro Nacional de Protección Vegetal (CNPV) adscrito a la Dirección de Sanidad Vegetal del MIDINRA (MIDINRA, 1987). El presente estudio apoya este esfuerzo.

OBJETIVOS

1. Determinar la efectividad protectora de los extractos de Nim contra el insecto vector de virus *Bemisia tabaci* Genn.
2. Valorizar posibles efectos fitotóxicos de los extractos de Nim en plántulas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en invernaderos y laboratorios de la Escuela de Sanidad Vegetal del Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias (ISCA), Km 12 carretera norte, y del Centro Nacional de Protección Vegetal (CNPV) del MIDINRA, Km 12 1/2 carretera sur, de enero 1987 a enero de 1988, utilizando en las pruebas plantas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. cv. Revolución-81.

En el primer ensayo se evaluaron ocho tratamientos:

Un extracto acuoso de hojas de Nim (10 g/l).

Dos extractos acuosos de semilla de Nim (25 y 50 g/l).

Cuatro extractos metanólicos de semilla de Nim (500, 1000, 1500, 2000 ppm, respectivamente).

Un Testigo (agua).

La obtención del extracto de hoja de Nim se efectuó a partir de 10 gramos de hoja (peso fresco), homogenizado en licuadora con un litro de agua, dejado en reposo por 6-12 horas y luego filtrando. Para los extractos de 25 y 50 gramos de semilla molida (molino ó mortero) disuelta en un litro de agua, agitando por 10 minutos y dejando en reposo la mezcla por 24 horas, para luego filtrar.

El extracto metanólico se obtuvo de semillas molidas de Nim. Un primer paso de la extracción se realizó utilizando un extractor (aparato de soxhlet) con el solvente petrolbencina a una temperatura entre 40-60 °C, obteniendo el aceite. Luego se sustituyó la petrolbencina por el solvente metanol para completar el segundo paso de la extracción. La solución obtenida se sometió a la recuperación

del solvente en un rotavapor con una velocidad de 240 rpm y a una temperatura de 55 °C en baño maría, ajustando el proceso de recuperación del metanol del extracto crudo metabólico (FEUERHAKE K., 1985).

Una vez que se obtuvo el extracto crudo de Nim, este se almacenó en refrigerador para su posterior uso, evitando su contacto con la luz y temperaturas altas.

Las plantas de frijol común fueron sembradas en bolsas de polietileno, en invernadero de la Escuela de Sanidad Vegetal del ISCA a temperatura ambiente. Al momento de la siembra se aplicó fertilizante completo Miracle Gro 15-30-15 a razón de 0.42 mg/100 ml agua/bolsa, equivalente a 1 kg por 236 l de agua.

Los tratamientos con extractos de Nim fueron aplicados con un atomizador manual a toda la planta para determinar fitotoxicidad. Y en un folíolo de la hoja trifoliada más joven de la planta para la prueba de oviposición.

Para determinar la posibilidad de que los extractos de Nim funcionen como antialimentarios o repelentes se estableció una prueba de oviposición. Se evaluó indirectamente la preferencia al no poder cuantificar directamente la acción de *Brevia* en hojas de frijol al estar tratadas con las sustancias naturales.

Para la prueba de oviposición se utilizó dos folíolos de la hoja trifoliada más joven, que previamente se había lavado con agua destilada y secado con papel secante. Uno de los folíolos fue tratado con el extracto correspondiente y el otro quedó sin tratar. Luego fueron introducidos a una jaula acondicionada para

introducir hojas (Figura 3) en las que se liberaron entre 30-35 adultos de *B. tabaci* recolectados en el campo. Se asume que las moscas tuvieron opción de escogencia entre foliolo tratado y no-tratado. Se realizaron nueve repeticiones para cada tratamiento.

A las 24 horas se contó bajo un estereoscopio la oviposición (No. de huevos/foliolo). Los registros de oviposición se evaluaron en base a una prueba de t^* pareada con los datos originales a 0.05 y 0.01 por ciento de significancia.

En el segundo ensayo realizado en el CNPV del MIDINRA se usó el tratamiento que produjo los mejores resultados en el primer ensayo, utilizándose la misma metodología. Se realizaron 18 repeticiones del tratamiento.

La prueba de fitotoxicidad, se llevó a cabo en invernadero, realizándose dos ensayos. El primero desarrollado en ISCA (SAVE) utilizando la variedad de frijol común Revolución 81 y siete tratamientos diferentes de extracto de Nim. Fueron aplicados al follaje total de plántulas de frijol a partir de dos días después de emergidas hasta los 20 días de edad. La preparación de los extractos de Nim se hicieron una sola vez y almacenados a temperatura ambiente por lo que duró el ensayo.

Veinticuatro horas después del tratamiento se registraron síntomas posibles de fitotoxicidad. Este procedimiento se repitió cada día hasta no encontrar ningún síntoma. Se consideró como síntoma, pequeñas manchas, quemaduras y escaldadura en las hojas, (Figura 2).

RESULTADOS

En los resultados de un primer ensayo de oviposición se detectaron diferencias estadísticas a un nivel de 0.05 y 0.01 de significancia para los tratamientos de 25 y 50 g/l extracto acuoso de semilla molida de Nim (cuadro 1). Se encontró una mayor eficiencia en reducción de oviposición por parte del tratamiento 50 g/l con respecto al de 25 g/l; pero a su vez ambos logran diferenciarse del resto de tratamientos evaluados (cuadro 2).

En el presente trabajo los extractos crudos metanólicos de semilla de Nim (500, 1000, 1500, 2000 ppm) y extracto acuoso de hoja de Nim no presentan ninguna posibilidad de reducción de oviposición.

En un segundo ensayo de oviposición, con sólo el tratamiento 50 g/l de extracto acuoso de semilla molida de Nim elegido por presentar mayor diferenciación en la reducción de oviposición que el tratamiento de 25 g/l y además del resto de tratamientos y elevando al doble el número de repeticiones. A un nivel de 0.01 de significancia, la prueba indica que el tratamiento 50 g/l de extracto acuoso de semilla de Nim reduce la oviposición de *B. tabaci* en folíolos de frijol común variedad Revolución-81 de una forma estadísticamente significativa (cuadro 3).

En un primer ensayo de fitotoxicidad, resultó que el tratamiento 25 g/l de semilla de Nim presentó síntomas de fitotoxicidad en la primera semana de desarrollo de las plántulas y para el tratamiento 50 g/l de semilla de Nim los síntomas de fitotoxicidad se presentaron en la primera y segunda semana de desarrollo de las plántulas. Para los restantes tratamientos (extractos cru-

dos metabólicos a diferentes concentraciones) y extracto acuoso de hoja de Nim no se presentaron síntomas de fitotoxicidad (cuadro 4).

Dado de que los tratamientos de 25 y 50 g/l protegieron de forma significativa al frijol común de oviposición de *B. tabaci* aunque también causaron fitotoxicidad a las plántulas de frijol en su primera y segunda semana respectivamente. Se realizó un segundo ensayo de fitotoxicidad para explicar el porqué de la fitotoxicidad.

Los resultados indicaron que para el tratamiento de 50 g/l dos de las variedades de ciclo vegetativo tardío (68-64 días) que son la Revolución-83 y la Revolución-81 presentaron síntomas de fitotoxicidad por dos semanas de desarrollo de las plántulas de frijol común, aunque es notorio que los síntomas son visibles tan sólo cuando las plántulas son asperjadas con extracto acuoso de semillas de Nim de dos días de añejamiento. Dos de los compuestos masales de ciclo vegetativo intermedio (63 días) presentaron síntomas de fitotoxicidad al ser asperjados con extracto acuoso de semilla de Nim de tres y cuatro días de añejamiento pero tan solo en las dos primeras semanas. El compuesto masal de ciclo vegetativo precoz (59 días) no presentó síntomas de fitotoxicidad en ningún día de desarrollo de las plántulas de frijol común. Diferentemente los resultados para el tratamiento 25 g/l no presentaron fitotoxicidad para ninguna de las variedades a lo largo de este ensayo (cuadro 5).

Cuadro 1: Valores de T_c para pruebas pareadas de tratamientos con extractos metanólicos y acuosos de Nim aplicados al follaje de frijol común para preferencia de *B. tabaci*

Tratamiento	Dosis	Concentración		Significancia estadística
		aprox. de IA Azadirachtina ppm	T_c Valores originales	
Extracto crudo metanólico				
de semilla de Nim	2000 ppm	40	0.957	N _e
	1500 ppm	30	1.012	N _e
	1000 ppm	20	1.008	N _e
	500 ppm	10	0.279	N _e
Extracto acuoso de				
semilla de Nim	50 g/l	100	3.873	**
	25 g/l	50	2.572	*
Extracto acuoso de				
hoja de Nim	10 g/l	?	0.434	N _e
Testigo (agua)	---		0.809	N _e

$T_{\alpha 0.05} = 2.306$

$T_{\alpha 0.01} = 3.355$

Cuadro 2: Oviposición (No. huevos/folículo) 24 horas después de tratamiento con extracto acuoso de 25 y 50 g/l de semilla de Nim en frijol común variedad Revolución-81, Laboratorio SAVE/ISCA, Managua, Nicaragua 1987.

Repetición	25 g/l (a)		50 g/l (b)	
	Follaje		Follaje	
	tratado	no tratado	tratado	no tratado
1	0	47	0	209
2	4	81	0	109
3	5	22	0	53
4	9	69	0	36
5	11	60	2	51
6	12	2	2	60
7	15	7	6	34
8	32	56	19	53
9	38	31	20	108

$$t_c (a) = 2.572; \quad t_{\alpha} 0.05 = 2.306$$

$$t_c (b) = 3.873; \quad t_{\alpha} 0.01 = 3.355$$

Cuadro 3: Oviposición (No. huevos/folfolo) 24 horas después de tratamiento con extracto acuoso de 50 g/l de semilla de Nim en frijol común variedad Revolución-81. Laboratorio CNPV/MIDINRA. Managua, Nicaragua, 1988.

Valores originales		
Repetición	Follaje tratado	Follaje no tratado
1	0	59
2	0	61
3	0	64
4	0	89
5	0	93
6	0	106
7	0	139
8	0	115
9	0	168
10	0	283
11	2	66
12	2	220
13	3	69
14	5	302
15	6	192
16	12	74
17	17	227
18	24	88

$t_c = 7.012$; $t_{\alpha=0.01} = 2.898$

Exo 4: Evaluación de fitotoxicidad en follaje de frijol común en en sus primeros 20 días de vida con diferentes tratamien- tos con extractos de Nim. Invernadero SAVE/ISCA. Managua, Nicaragua. 1987.

Días Después de Germinación

*

TRAT.	DOISIS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ext. met. (semilla)	2000 ppm																					
xt. Met. (semilla)	1500 ppm																					
xt. Met. (semilla)	1000 ppm																					
xt. Met. (semilla)	500 ppm																					
xt. Ac. (semilla)	50 g/l			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
xt. Ac. (semilla)	25 g/l			+	+	+	+	+														
ext. Ac. (hoja)	10 g/l																					
Testigo (agua)	--																					

+ Fitotoxicidad

* Extracto nuevo aplicado

Fig. 4: Evaluación de fitotoxicidad en follaje de frijol común en sus primeros 20 días de vida con diferentes tratamientos con extractos de Nim. Invernadero SAVE/ISCA. Managua, Nicaragua. 1987.

Días Después de Germinación																					
*																					
TRT.	DOSES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ext. Met. (semilla)	2000 ppm																				
Ext. Met. (semilla)	1500 ppm																				
Ext. Met. (semilla)	1000 ppm																				
Ext. Met. (semilla)	500 ppm																				
Ext. Ac. (semilla)	50 g/l			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Ext. Ac. (semilla)	25 g/l			+	+	+	+	+													
Ext. Ac. (hoja)	10 g/l																				
Testigo (agua)	--																				

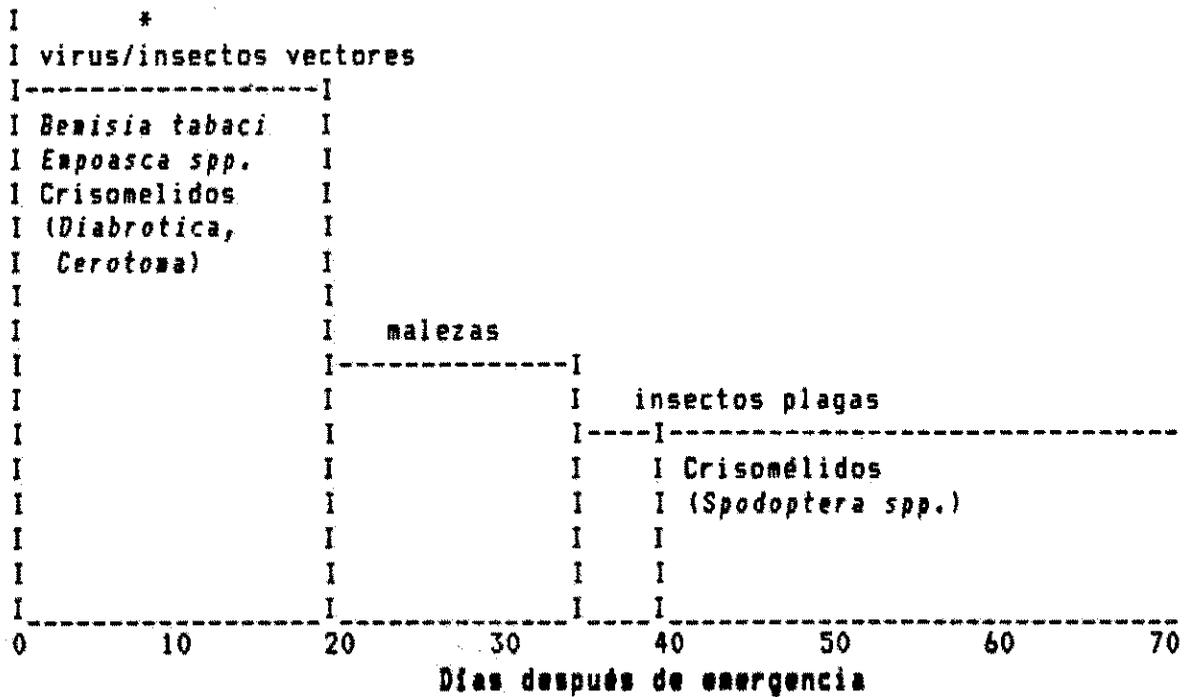
+ = Fitotoxicidad
 - = Extracto nuevo aplicado

Cuadro 5: Evaluación de fitotoxicidad en follaje de cinco variedades diferentes de frijol común en sus primeros 20 días de vida con un tratamiento de 50 g/l de extracto de Nim. Invernadero CNPV/MIDINRA/Managua, Nicaragua. 1988.

		Días Después de Germinación																			
		*	*																*		
Variedad	C. Veg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Rev.-83	68			+	+	+	+			+	+	+	+	+							
Rev.-81	64			+	+	+	+			+	+	+	+								
RCZN 10028-6	63					+	+					+	+								
RCWN 10775-22	63				+	+	+					+	+								
RCZN 10028-16	59																				

= Fitotoxicidad

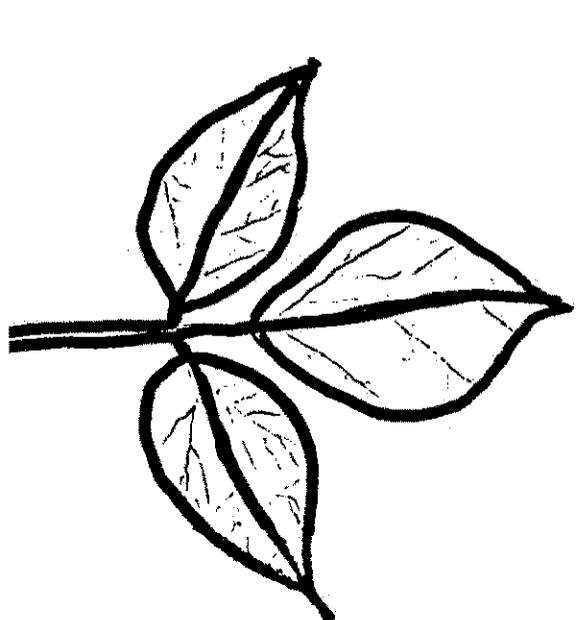
= Extracto nuevo aplicado



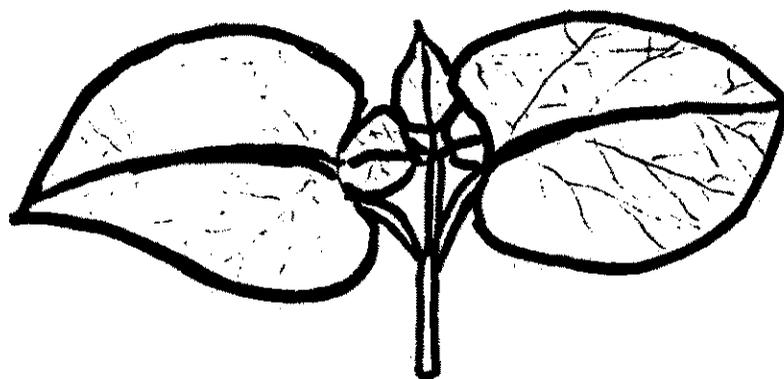
(*): aplicación de extractos de Nim.

PERIODOS CRITICOS EN FRIJOL

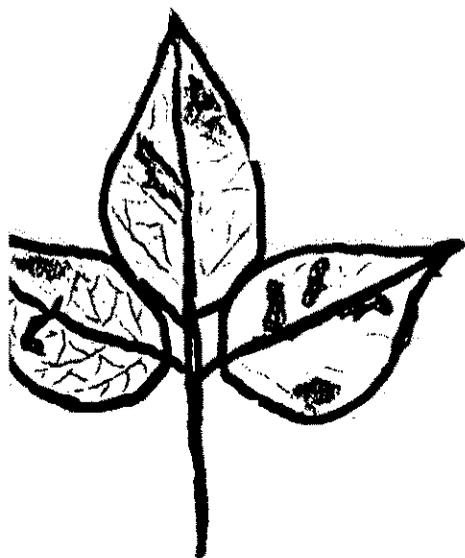
Figura 1: Periodos críticos en frijol y su posible protección con aplicaciones de extractos de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss).



a) - hoja trifoliar normal



b) plántula normal.



c) manchas y escaldaduras en folíolos



d) necrosis marginal

Figura 2: Forma en que se presentan quemaduras, manchas y necrosis marginal en las hojas de frijol común como sintomatología de fitotoxicidad por aplicaciones de tratamiento 50 g/l de extracto acuoso de semilla de *Nim Azadirachta indica* A. Juss.



Figura 3: Modelo de jaula para prueba de oviposición con *B. tabaci* en folíolos de frijol.

DISCUSION

En el primer ensayo de oviposición el tratamiento de 25 y 50 g/l de extracto acuoso de semilla de Nim fueron los únicos que mostraron diferencia significativa en una menor oviposición en el follaje de frijol tratado, hasta alcanzar cero oviposición en varias repeticiones, estos datos son más fuertemente comprobados en un segundo ensayo de oviposición con mayor número de repeticiones que indica una clara reducción de oviposición en un nivel de 0.01 de significancia.

Esto coincide con conocimientos concretos del impacto del Nim sobre *B. tabaci*. DREYER (1984), encontró que extractos de semilla de Nim se comportaron como repelente contra adultos de *B. tabaci* en pipian *Cucurbita pepo* L. en Togo. También en aplicaciones en Sudán, de extracto acuoso de semilla de Nim y hojas del mismo árbol evitaba colonización en hojas de papa *Solanum tuberosum* L. de las moscas blancas logrando mejores efectos con esos extractos que con insecticidas sintéticos (SIDDIQ, 1986).

Si se acepta la oviposición como indicador de aceptación o rechazo del huésped, la aplicación de los tratamientos de 25 y 50 g/l de extracto acuoso de semilla de Nim induce a un fuerte rechazo de las plantas de frijol por parte de *B. tabaci* tal y como se demuestra de manera significativa en el primer ensayo de oviposición para 25 y 50 g/l así como también altamente significativo para el segundo ensayo de 50 g/l.

Así también COUDRIET et al. (1985) informaron que las aplicaciones de Nim al follaje del algodón resultó en menor oviposición lo cual también sugiere que Nim funciona como repelente contra *B. tabaci*.

Es importante recordar que el objetivo con el caso de los vectores no es reducir el número de insectos presentes, sino minimizar el contacto del insecto con el huésped o bien la aceptación del huésped por parte del vector.

En cultivo de crisantemos cuando se asperjó con extractos de semilla de Nim contra colonias de *B. tabaci* el número de huevos fué reducido en 1/4 de su parámetro de normalidad. Adicionalmente los extractos de semilla de Nim reducen la viabilidad de los huevos, prolonga el desarrollo ninfal e incrementa la mortalidad de ninfas en *B. tabaci* cuando ésta se presenta como plaga en cultivos vegetales (LAREW, M. y KNODEL, J. 1986).

Así también en experimento de preferencia alimentaria en frijol con aplicación foliar de extractos acuosos de semilla de Nim (1 y 2%) causaron un efecto repelente en adultos del crisomélido *Ootheca bennigseni* Weise (KAREL, A. 1986).

Los tratamientos de extractos acuosos de semilla molida de Nim, no sólo son promisorios estadísticamente sino también por la facilidad y el bajo costo que su uso presentará a los productores, también la ventaja que representará en disminuir el gasto en divisas para adquisición de menos plaguicidas tradicionales.

En cuanto a la poca posibilidad de control de oviposición que presentan los tratamientos de extractos crudos etanólicos de semilla de Nim (500, 1000, 1500, 2000 ppm) así como también el de 10 g/l de hoja de Nim. Se sabe que los extractos crudos son más enriquecidos con azadirachtina (inhibidor hormonal) que los extractos acuosos aunque estos a su vez poseen mayor diversidad de sustancias insecticidas (azadirachtina, melantriol, salanim, nimbin) que ejercen actividad

variada de inhibidor hormonal antialimentario y repelente sobre algunos tipos de insectos plagas. También se conoce que algunos componentes químicos de las hojas de Nim son compuestos flavonales, compuestos epoxi y violaxantina y otros (TIRIMANNA, A. 1984) y que poseen una actividad larvicida dichas hojas de Nim en larvas del mosquito *Culex pipiens fatigans* (CHAVAN, R. 1984).

Aunque la literatura presenta algunos datos diferentes entre sí, en relación con la eficiencia de disminuir la oviposición y alimentación en insectos plagas con aplicación de extractos crudos de semilla de Nim extraídos con diferente solvente:

- Extractos crudos de acetona y pentano causaron repelencia y reducción de fecundidad en hembras adultas de *Tetranychus cinnabarinus* B. (MANSOUR, F. y ASCHER, K. 1984).
- Extractos crudos enriquecidos "Neemrich I" tiene una alta y prolongada capacidad de impedir la oviposición en adultos de *Phthorimaea operculella* Zell. (SHARMA, et al. 1984).
- Con extractos crudos de semilla de Nim no depositó huevos la mosca de la fruta *Dacus dorsalis* H. (SOMBATSIRI, K. y S. TIGUATTANOT, 1984).
- Extractos crudos con AZT (mezcla azeotrópica) no mostraron ningún efecto sobre el comportamiento oviposicional de *Culex quinquefasciatus* S. (ZEBITZ, C. 1986).

- Diferentes concentraciones de azadirachtina con y sin contacto no repelieron ni inhibieron la oviposición de hembras adultas de *Heliothis armigera* (SAXENA, K. y RENBOLD, H. 1984).

Los tratamientos probados de extracto crudo metanólico en nuestras pruebas no ejercieron ninguna actividad en la oviposición de *B. tabaci*.

Teniendo en cuenta los problemas del uso indiscriminado de productos químicos tales como la inducción de resistencia, altos niveles residuales, intoxicación de personas, amenazas ambientales y en el marco de la investigación que los cultivos deben ser manejados en forma integral y racional, el Nim se visualiza como una fuente prometedora de insecticida seguro y barato, especialmente para países en desarrollo como Nicaragua, adoptando metodologías adecuadas y efectivas para su uso en la sanidad vegetal nicaragüense.

Sin embargo, el primer ensayo de fitotoxicidad mostró que resultan síntomas fitotóxicos en las dos primeras semanas al aplicar extractos acuosos en dosis de 50 g/l en plántulas de frijol. Y tan sólo fitotoxicidad en la primera semana en el tratamiento 25 g/l de extracto acuoso.

No es una solución dejar las aplicaciones hasta la tercera semana de desarrollo de la planta en condiciones de campo similares a la de Nicaragua (lugares bajos y temperaturas altas), los frijoles son más vulnerables a los virus. En ensayos efectuados se observó reducción en el rendimiento de grano de frijol en un promedio de 37.7% y las pérdidas fueron hasta de 56% cuando los virus infectaron los frijoles en las tres semanas después de la siembra (COSTA, 1976).

En un segundo ensayo de fitotoxicidad, utilizando los tratamientos 25 y 50 g/l, cinco variedades de diferente ciclo vegetativo y con preparados frescos del extracto; para el tratamiento 50 g/l mostró que los síntomas de fitotoxicidad son fácilmente suprimidos con la aplicación de extractos acuosos recién elaborados y esto es lo más adecuado en las condiciones del campo donde los productores preparan y aplican la necesaria cantidad de extractos para cada aspersion. Es notorio también que variedades de ciclo vegetativo corto logran escapar a fitotoxicidad, presumiblemente a la rápida estabilidad y consistencia de sus tejidos, por otro lado, la fitotoxicidad observada en las primeras etapas de plántulas son superadas por la planta en crecimiento sin perjuicio posterior que afecten el rendimiento de grano. (TAPIA, 1988). Esto nos ofrece la posibilidad de trabajo con variedades de ciclo vegetativo corto que por sus características de comportamiento están próximas a liberarse (DIAZ y DROZCO, 1987). Aunque también es de destacar que para el tratamiento 25 g/l no se detectó ningún tipo de sintomatología de fitotoxicidad.

Es necesario citar que en cuanto a la fitotoxicidad de Nim bajo ciertas condiciones y diferentes cultivos hay diferentes resultados:

- Tanto HELLPAP (1985) y KIRSCH (1987) encontraron fitotoxicidad con extractos crudos (AZT) a base de semilla de Nim en cultivo de maíz y guisante respectivamente.
- Estudios en Ecuador con extracto acuoso de semillas de Nim a diferentes concentraciones (12.5 - 80 g/l) no indicaron ningún tipo de fitotoxicidad en maní, arroz y maíz respectivamente (WENT, U., 1988).

- En conversación personal con el Dr. M. DREYER (1988) encontraron fitotoxicidad en hojas apicales de cebolla en un primer ciclo de cultivo, mas no en un segundo ciclo del mismo cultivo con iguales dosis probadas de 25 y 50 g/l de extractos acuosos de semilla de Nim.

- Con plántulas de crisantemos asperjados con extractos de semilla de Nim (5%) y Margosan-o al 1% (formulado a base de extracto crudo metanólico) se encontró achaparramiento de las plantas por efecto de fitotoxicidad (LINDQUIST, R., 1986).

- En la evaluación de las dos dosis (25 y 50 g/l) en frijol se encontró igualmente diferentes resultados para ambas pruebas de fitotoxicidad, lo cual nos permite indicar que es recomendable el seguimiento de estudio en este tópico de la fitotoxicidad de Nim.

Aun cuando, no se contara con semilla de siembra de variedades precoces de frijol, y se trabajara con variedades intermedias y tardías, los síntomas de fitotoxicidad que en caso se provoquen con la aplicación de extractos acuosos en dosis de 25 y 50 g/l en las dos primeras semanas del desarrollo de las plántulas de frijol, no representa una dificultad, ya que ensayos de afectación foliar a los 10, 15, 30, 45 y 60 días de edad del frijol este presenta tan solo épocas críticas a la iniciación de la floración y durante la formación de vainas, observándose reducciones en el rendimiento. (CIAT, 1973). Igualmente en diferentes grados de defoliación tan solo la pérdida de un 66% del área foliar fue perjudicial para el rendimiento cuando se hizo durante la floración y la formación de vainas (VIEIRA, 1981). Entonces en la práctica se hace viable la aplicación de

extractos acuosos para protección de plántulas de frijol contra la infección viral del vector mosca blanca, teniendo en cuenta también la posibilidad de los extractos acuosos de Nim en una estrategia de manejo de plagas tales como *Empoasca spp.* y algunas especies de Crisomélidos (*Diabrotica*, *Cerotoma*) (Figura 1), estos últimos que son transmisores de virus y concentran su ataque en las tres primeras semanas de crecimiento de las plántulas de frijol (GAMEZ, 1972), teniendo en cuenta la literatura que mundialmente se tiene sobre estudios del impacto que Nim posee para muchas plagas.

CONCLUSIONES

En la evaluación del estudio preliminar de manejo de *B. tabaci* con extractos de semilla de Nim en plántulas de frijol común se puede concluir lo siguiente:

1. Que la utilización del tratamiento (50 g/l) de extracto de semilla de Nim es viable en la protección de plántulas de frijol para evitar colonización de *B. tabaci*, tomando como parámetro la reducción de oviposición de mosca blanca adulta; y en menor proporción tomando en cuenta dicho parámetro, es también viable el tratamiento (25 g/l) de extracto acuoso de semilla de Nim.
2. Aunque con los tratamientos de extracto acuoso de semilla de Nim se presentaron lesiones leves en los folíolos de las plántulas de frijol éstas pueden ser fácilmente evitadas con una adecuada preparación y aplicación de los extractos, así como también el uso de variedades precoces bajo las condiciones de nuestro estudio. Aunque también hay que indicar la necesidad de más investigación del porqué de las lesiones (fitotoxicidad).
3. Para las condiciones de este estudio, las dosis 500, 1000, 1500 y 2000 ppm de extractos crudos metanólicos a base de semilla de Nim no presentaron ninguna eficiencia en cuanto a reducción de oviposición de adultos de *B. tabaci* igualmente no hubo ninguna respuesta del tratamiento de 10 g/l de extracto acuoso de hojas de Nim.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar un rango de dosis de extractos acuosos de semilla de Nim (5, 15, 25, 35, 45, 60, g/l) y también su impacto en plagas típicas de frijol tales como *Spodoptera sp.*, *Diabrotica sp.* y *Empoasca sp.*, tanto a nivel de invernadero como de campo.
2. Estudio sobre el uso de otros tipos de formulaciones de Nim tales como: aceite emulsionado, extracto crudo etanólico + aceite y extractos acuosos + aceite en busca de un efecto más seguro sobre *B. tabaci* y otros insectos vectores (Afidos, Crisomélidos, *Dalbulus sp.*) y sin alcanzar el rango fitotóxico en las plántulas de las especies correspondientes si se presentan.
3. Valorizar a nivel de invernadero los tratamientos de extracto acuoso (25 y 50 g/l) y otros de mayor dosis, trabajando con diferentes plantas y a distintos niveles de desarrollo para conocer más adecuadamente sobre el efecto de la fitotoxicidad y su impacto en el rendimiento de cosecha sobre dichas plantas.
4. Estudios sobre el tipo de aplicación de extractos de semilla de Nim (emulsiones, concentrados solubles, líquidos, granulados) a diferentes lugares tales como área foliar o suelo, para conocer su grado de actividad y aprovechamiento en el control de los insectos chupadores-vectores.

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, F. y R. COJULUM, 1974. Evaluación preliminar de 5 insecticidas en el control de 5 niveles de infectación de mosca blanca, *Bemisia tabaci*, en el cultivo de frijol. XX Reunión anual del PCCMCA. San Pedro de Sula, Honduras p. 14-33.
- BIRD, J. and K. MARAMOROSCH, 1978. Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Adv. vir. Res.*, 22:55.
- BRESSANI, R., 1981. El significado alimentario y nutricional del endurecimiento del frijol. XXVII Reunión anual del PCCMCA. Santo Domingo, República Dominicana. SEF 1-1 SEF 1-2-6.
- CISNEROS, B.M.A., C. LOPEZ C., M. MOLINA R., A. ROBLETO R., T. ANTON A. y J. A. MONTERREY M., 1985. Incidencia de plagas en la siembra de frijol con riego 1984/85 en la región II. DGA/MIDINRA. Managua, Nicaragua. 24 pp.
- COSTA, A.S., 1976. Whitefly-transmitted plant diseases. *Ann Rev. Phytopathology*. 14:429-449.
- CIAT, 1973. Sistema de producción de leguminosas comestibles. Informe Anual. Cali, Colombia. p. 163-206
- COUDRIET, D.L., N. PRABMAKER and D.R. MEYERDIRK, 1985. Sweet potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): Effects of Neem seed extract on oviposition and immature stages. *Environ. Ent.* 14:776-779.

- CHAVAN, S.R. 1984. Chemistry of alkanes separated from leaves of *Azadirachta indica* and their larvicidae/insecticidae activity against mosquitoes. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. Rauischholzhausen.
- DIAZ, J.M., S. DROZCO S., 1987. Avance de los resultados de los viveros centro-americanos de adaptación y rendimiento. XXXIII Reunión anual del PCCMCA. Guatemala, Guatemala. 19 pp.
- DREYER, M. 1984. Effects of aqueous Neem extracts and Neem oil on the main pests of *Cucurbita pepo* in Togo. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. GTZ, Eschborn, Germany. 435-443.
- DREYER, M. 1986. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Wasserextrakten und anderen Produkten aus Niemsamen gegen Schaedlinge an Gemuese- und Feldkulturen in Togo. Diss. Univ. Giessen FRG. 138 pp.
- DREYER, M. 1988. Comunicación personal. Director Proyecto Nim, GTZ, República Dominicana.
- FAGDONEE, I. 1981. Behavioral response of *Crocidolamia binotalis* to Neem. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 1st Int. Neem Conf., Rottach-Egern, FRG. 109-120.

- FAGOODNEE, I., 1986. Use of Neem in vegetable crop protection in Mauritius. In: Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants. Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya. 419-430.
- FEUERHAKE, K. 1985. Untersuchungen zur Gewinnung und Formulierung von sameninhaltsstoffen des Niembaumes (*Azadirachta indica* A. Juss) in Hinblick auf ihre Verwendung als schaedlingsbekaempfungsmittel in den Entwicklungslaendern Diss uni Giessen.
- GAMEZ, R., 1971. Los virus del frijol en Centroamérica I. Transmisión por moscas blancas del virus del mosaico dorado. Turrialba 21 (1):22-27.
- GAMEZ, R., 1972. Los virus del frijol en Centro América II. Algunas propiedades y transmisión por Crisomélidos del virus del mosaico rugoso del frijol. Turrialba 22: 249-257.
- HELLPAP, C., 1985. Ecología poblacional y control biológico biotécnico de *Spodoptera* en Nicaragua. Tesis de PHD, Universidad J.W. Goethe, Frankfurt. 133 pp.
- JACOBSON, M., J.B. STOKES, J.D. WARTHEN Jr., R.E. REDFERN, D.K. REED, R.E. WEBB and L. TELEK, 1984. Neem research in the U.S. Department of Agriculture: an up date. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 2nd. Int. Neem Conf., Rauschholzhausen, FRG. 31-42.

- KIRSCH, K., 1986. Studies on the efficacy of Neem extracts in controlling major insect pests in tobacco and cabbage. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 3rd. Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya. 495-516.
- KIRSCH, K., 1987. Effect of Neem seed extract on insect pests of Tobacco, Cotton and vegetables in the Philippines. Ph. D. thesis, University of Giessen. West Germany.
- KAREL, A.K., 1986. Response of *Ootheca bennigseni* (Coleoptera: Chrysomelidae) to neem extracts. In: Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants. Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya. 393-404.
- LAREW, H.G. and KNODEL, J.J., 1986. Effect of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed extracts on whitefly oviposition, insecticide and acaricide tests. 11, 377.
- LINDQUIST, R.K. 1986. Natural Pesticides coul be irresistible, greenhouse manager, November, 110.
- MARRIAPPAN, V. and R.C. SAXENA, 1984. Custard apple oil, Neem oil and their mixtures: Effects on survival of *Nephotettix virescens* and on rice tungo virus transmission. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A Juss) and other tropical plants. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. Rauschholzhausen, FRG. 413-414.

- MANSOUR, F.A. and ASCHER, K.R.S. 1984. Effects of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernel extracts from different solvents on the carmine spidermite, *Tetranychus cinnabarinus* In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plant. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. Rauschholzhausen. 577-587.
- MIDINRA, 1987. Estudio sobre produccion de insecticida botánico de semilla del árbol de Neem (proyecto). 3 ed. MIDINRA/DGTA. Managua, Nicaragua. S.P.
- NENE, L., 1973. Control of *Bemisia tabaci* Geen. a vector of several plant viruses. Indian J. Agric SC. 43:433-436.
- PRADHAN, S., JOTWANI, M.G. and B.K. RAI. 1962. The Neem seed deferrent to locusts. Indian fmg. 12:7-11.
- SAXENA, K.N. AND REMBOLD, M. 1984. Orientation and ovipositional response of *Heliothis araugera* to certain Neem constituents. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plant. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. Rauschholzhausen.
- SHARAF, N., 1986. Chemical control of *Bemisia tabaci* agriculture. Ecosystems and environment. 17:111-127.

SHARMA, R.N., NAGASAMPAGI, B.A., BOSHLE, A.S., KULKAMI, M.M. and V.B. TUNGIKAR, 1984. "Neemrich": The concept of enriched particulate fractions from Neem for behavioral and physiological control of insects. In: natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plant. Proc. 2nd, Int. Neem Conf., Rauschholzhausen, FRG. 115-128.

SIDDIG, S.A., 1986. A proposed pest management program including Neem treatments for combating potato pest in the Sudan. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 3rd, Int. Neem Conf., Naiarobi, Kenya. 449-459.

SOMBATSIRI, K. and TIGVATTANDT, S. 1984. Effects of Neem extract on some insect pest of economic importance in Thailand. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plant. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. Rauschholzhausen.

TREMINIO, R., 1987. Comunicación personal, Director de la Dirección de Granos Básicos. DGA, MIDINRA. Managua, Nicaragua.

TAPIA, B.H., 1988. Comunicación personal. Director del Proyecto de Postgrado. ISCA. Managua, Nicaragua.

- TIRIMANNA, A.S.L. 1984. Surveying the chemical constituents of the Neem leaf by two dimensional thin layer chromatography. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plant. Proc. 2nd. Int. Neem Conf. Rauischholzhausen.
- VIEIRA, C., 1981. Effect of artificial defoliation on the yield of two indeterminate bean *Phaseolus vulgaris* L. cultivars. Turrialba 31(4): 383-385.
- WENDT, U. 1988. Comunicación personal. Cooperante científico en el Proyecto Nim. CEMADEC-GTZ en Ecuador.
- ZEBITZ, C.P.W. 1986. Potential of Neem seed kernel extract in mosquito control. In: Natural pesticides from the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 3rd, Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya. 555-573.