

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**DINAMICA DE LA AZADIRACTINA EN ARBOLES  
DE NIM (*Azadirachta indica* A Juss) DE MEXICO Y  
SU EFECTO CONTRA DOS INSECTOS  
DE ALMACEN**

**POR**

**MARIO CRUZ FERNANDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS  
CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA  
DE POSTCOSECHA**

**NOVIEMBRE 1998**



10

TD  
SB292  
.N5  
C789  
1998  
c.1



1080110341

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DINAMICA DE LA AZADIRACTINA EN ARBOLES  
DE NIM (*Azadirachta indica* A Juss) DE MEXICO Y  
SU EFECTO CONTRA DOS INSECTOS  
DE ALMACEN

POR

MARIO CRUZ FERNANDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS  
CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA  
DE POSTCOSECHA

NOVIEMBRE 1998

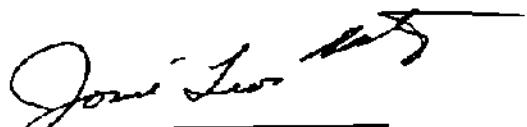


1  
SB 292  
.NS  
C789  
1998  
1

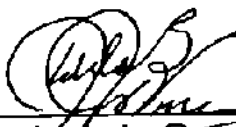


**DINAMICA DE LA AZADIRACTINA EN ARBOLES DE NIM  
(*Azadirachta indica* A. Juss) DE MEXICO Y SU EFECTO  
CONTRA DOS INSECTOS DE ALMACEN**

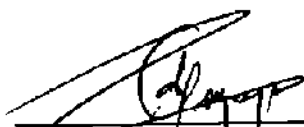
**Aprobación de la Tesis:**



**Ph.D. Josué Leos Martínez**  
Asesor Principal



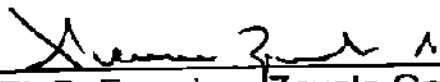
**Ph.D. José Luis de la Garza González**  
Co-asesor



**Dra. Aurora Garza Zuñiga**  
Co-asesor



**Ph.D. Emilio Olivares Sáenz**  
Co-asesor



**Ph.D. Francisco Zavala García**  
Subdirector de Estudios de Postgrado

Noviembre, 1998

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Naty, por su amor, comprensión y por compartir su vida a mi lado.

A mis hijos, adorables por siempre Paola Magaly, Fabiola, e Iván.

A mis padres, Ma. Salomé (†) y Manuel, por darme la existencia, amor y apoyo incondicional.

A mi suegra Virginia, por su apoyo y amor ilimitado hacia mi familia.

A mis hermanos y hermanas, les agradezco inmensamente su cariño y su apoyo incondicional.

A los compañeros y amigos del Postgrado con los cuales compartí agradablemente esta etapa de mi vida: Manuel Mata, Sergio Garcia, Javier Bracho, Noé Flores, Mario Leal, José Hernández, Mario Alzáldúa, Raúl Torres y otros más. Gracias por su amistad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi mas sincero agradecimiento a las siguientes personas e Instituciones:

Al Comité de Tesis: Al Dr. Josué Leos Martínez, por la dirección de esta investigación y por haberme brindado su confianza y la fortuna de ser su discípulo. A los Doctores José Luis de la Garza, Aurora Garza Zúñiga y Emilio Olivares Sáenz por su incondicional colaboración, interés, comentarios y sugerencias al presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la Beca-Crédito para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Asimismo, por el financiamiento económico dispuesto para la realización del trabajo de tesis.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) por concederme su apoyo y confianza para realizar estudios de doctorado; particularmente al Centro de Investigación Regional del Noreste y Campo Experimental Ebano.

A la Facultad de Agronomía de la UANL, por darme la oportunidad de realizar este postgrado, en especial a la Subdirección de Postgrado y Academia de Parasitología de Postcosecha de la cual me honro en formar parte de sus generaciones.

Al personal del Laboratorio de Entomología de Postcosecha, y Laboratorio de Microbiología (Dr. Rigoberto González y M.C. Juanita Aranda); y M.C. Eduardo Aguirre Andrade del Campo Experimental Ebano, por el apoyo brindado.



## **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

**Mario Cruz Fernández**

**Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias Agrícolas con Especialidad en Parasitología de Postcosecha**

### **Datos personales:**

**Nacido en Tamuín, S.L.P. el 29 de Mayo de 1955, hijo de María Salomé Fernández Pérez y Manuel Cruz Hernández.**

### **Educación:**

**Egresado del Colegio Superior de Agricultura Tropical como Ingeniero Agrónomo en Agricultura Tropical, en junio de 1978.**

**Egresado de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro como Maestro en Ciencias en Tecnología de Semillas, en junio de 1993 con carta de felicitación.**

### **Experiencia Profesional:**

**Investigador Titular del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), adscrito al Campo Experimental Chetumal, en Chetumal Q. Roo de 1978 a julio 1985 y al Campo Experimental Ebano, Ebano, S.L.P. de agosto de 1985 a la fecha.**

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
1.1. Hipótesis.....	2
1.2. Objetivos.....	3
<b>2. REVISION DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. El Arbol de Nim.....	4
2.1.1. Importancia.....	4
2.1.2. Adaptación.....	4
2.1.3. Clasificación y Descripción Botánica.....	6
2.1.4. Producción.....	7
2.2. Efecto Plaguicida del Arbol de Nim.....	7
2.2.1. Efecto Sobre Insectos.....	7
2.2.2. Aplicación Contra Insectos de Almacén.....	9
2.3. Componentes Activos del Arbol de Nim.....	11
2.3.1. Componentes en General.....	11
2.3.2. La Sustancia AZA.....	12
2.3.3. Contenido de AZA.....	12
2.4. Almacenamiento de la Semilla de Nim.....	15
2.5. Insectos de Granos Almacenados.....	17
2.5.1. Gorgojo del Maíz ( <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky).....	18
2.5.1.1. Importancia.....	18
2.5.1.2. Descripción.....	18
2.5.2. Gorgojo Pinto del Frijol ( <i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman).....	19
2.5.2.1. Importancia.....	19
2.5.2.2. Descripción.....	20
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	21
3.1. Contenido de Azadiractina (AZA) en Hojas, Frutos y Semillas de Arboles de Nim Establecidos en México.....	21
3.1.1. Area de Estudio.....	21
3.1.2. Tratamientos de Estudio.....	22
3.1.3. Variables Analizadas.....	22
3.1.4. Preparación de Extractos de AZA.....	23
3.1.5. Análisis de AZA por HPLC.....	24
3.2. Efecto del Ambiente de Almacén y Periodo de Almacenamiento Sobre el Contenido de AZA en Hojas y Semillas de Nim.....	24
3.2.1. Area de Estudio.....	24

	<b>Página</b>
3.2.2. Tratamientos de Estudio.....	25
3.2.3. Variables Analizadas.....	25
3.2.4. Preparación de Extractos de AZA y Análisis por HPLC.....	26
3.3. Polvos y Extractos de Hojas y Semillas de Nim para el Control de <i>S. zeamais</i> y <i>Z. subfasciatus</i> .....	26
3.3.1. Area de Estudio.....	26
3.3.2. Tratamientos de Estudio.....	26
3.3.3. Variables Analizadas.....	27
3.3.3.1. Mortalidad y población total de insectos.....	28
3.3.3.2. Porcentaje de daño al grano.....	29
3.3.4. Preparación de Tratamientos.....	29
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>30</b>
4.1. Contenido de Azadiractina (AZA) en Hojas, Frutos y Semillas de Arboles de Nim Establecidos en México.....	30
4.1.1. Características de Arboles y Semillas de Nim.....	30
4.1.2. Efecto de la Localidad y Etapa Fenológica en el Contenido de AZA en Hojas.....	31
4.1.3. Efecto de la Localidad en el Contenido de AZA en Frutos y Semillas.....	33
4.2. Efecto del Ambiente de Almacén y Período de Almacenamiento Sobre el Contenido de AZA en Hojas y Semillas de Nim.....	36
4.3. Polvos y Extractos de Hojas y Semillas de Nim para el Control de <i>S. zeamais</i> y <i>Z. subfasciatus</i> .....	39
4.3.1. Daño a los Granos de Maíz y Frijol.....	39
4.3.1.1. Polvos y extractos de hojas.....	40
4.3.1.2. Polvos y extractos de semillas.....	42
4.3.2. Mortalidad de Insectos.....	44
4.3.2.1. Mortalidad de insectos bajo tratamientos de hoja de nim.....	44
4.3.2.2. Mortalidad de insectos bajo tratamientos de semilla de nim.....	46
4.3.3. Población de Insectos (Emergencia).....	48
4.3.3.1. Población de <i>S. zeamais</i> bajo tratamientos de hoja de nim.....	49
4.3.3.2. Población de <i>Z. subfasciatus</i> bajo tratamientos de hoja de nim.....	51
4.3.3.3. Población de <i>S. zeamais</i> bajo tratamientos de semilla de nim.....	53
4.3.3.4. Población de <i>Z. subfasciatus</i> bajo tratamientos de semilla de nim.....	55
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>63</b>
<b>7. APENDICE.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características de las localidades donde se ubican los árboles de nim en México que se estudiaron durante 1995 y 1996.....	22
2. Características de los ambientes donde se almacenaron las hojas y las semillas de nim.....	24
3. Comparación de medias de las características de árboles y semillas de nim en tres localidades.....	30
4. Contenido de AZA ( $\mu\text{g/g}$ ) en hoja, fruto y semilla de nim por localidad.....	32
5. Coeficientes de correlación ( $r$ ) entre contenidos de AZA y variables observadas en el árbol y semilla de nim.....	35
6. Contenido de AZA ( $\mu\text{g/g}$ ) en hojas y semillas de nim, y porcentajes de reducción ocurrida cada dos meses de almacenamiento en tres ambientes de almacén.....	37
7. Humedad relativa (HR) y temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) ocurrida en Marín y Ebano, durante seis meses de almacenamiento de hoja y semilla de nim.....	39
8. Porcentaje de daño al grano de maíz y de frijol tratados con polvo y extracto de hoja de nim con diferentes dosis de AZA.....	41
9. Porcentaje de daño al grano de maíz y de frijol tratados con polvo y extracto de semilla de nim con diferentes dosis de AZA.....	43
10. Porcentaje de mortalidad corregida de <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Zabrotes subfasciatus</i> después de 1 día de aplicar polvo y extractos de hoja de nim con diferentes dosis de AZA.....	45
11. Porcentaje de mortalidad corregida de <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Zabrotes subfasciatus</i> después de 1 día de aplicar polvo y extracto de semilla de nim con diferentes dosis de AZA.....	47
12. Población (P) y porcentaje de población (P%) de <i>Sitophilus zeamais</i> bajo tratamientos de hoja de nim a 25, 60, 90 y 120 días.....	50
13. Población (P) y porcentaje de población (P%) de <i>Zabrotes subfasciatus</i> bajo tratamientos de hoja de nim a 60, 90 y 120 días.....	52
14. Población (P) y porcentaje de población (P%) de <i>Sitophilus zeamais</i> bajo tratamientos de semilla de nim a 25, 60, 90 y 120 días.....	54
15. Población (P) y porcentaje de población (P%) de <i>Zabrotes subfasciatus</i> bajo tratamientos de semilla de nim a 60, 90 y 120 días.....	56



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Contenido de AZA en hojas de nim por etapa fenológica y localidades.	32
2. Contenido de AZA en hojas de nim almacenadas durante seis meses en tres ambientes.....	37
3. Contenido de AZA en semillas de nim almacenadas durante seis meses en tres ambientes.....	38
4. Daño al grano de maíz y frijol tratado con polvo y extracto de hoja de nim.....	41
5. Daño al grano de maíz y frijol tratado con polvo y extracto de semilla de nim.....	43
6. Mortalidad (no corregida) de <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Zabrotes subfasciatus</i> a 1 día de muestreo bajo diferentes dosis de polvo y extractos de hoja de nim.....	45
7. Mortalidad (no corregida) de <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Zabrotes subfasciatus</i> a 1 día de muestreo bajo diferentes dosis de polvo y extractos de semilla de nim.....	47

## RESUMEN

**Mario Cruz Fernández**

**Fecha de Graduación: Noviembre de 1998**

**Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Agronomía**

**Título del Estudio: Dinámica de la azadiractina en árboles de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén.**

**Número de Páginas: 73**

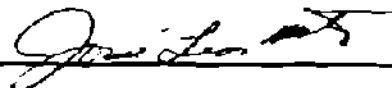
**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias  
Agrícolas con Especialidad en Parasitología de  
Postcosecha.**

**Áreas de Estudio: Agronomía (Entomología de Postcosecha, Plantas Insecticidas).**

**Propósitos y Métodos de Estudio:** El árbol de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) posee propiedades insecticidas basadas en su contenido de azadiractina (AZA). La AZA puede variar en su contenido, en su efectividad contra los insectos y en su poder residual. La finalidad de la investigación fue determinar si existe variación en el contenido de AZA entre ambientes y etapas fenológicas; medir el potencial de almacenamiento del AZA en hojas y semillas; y determinar la dosis y forma apropiada de aplicación de nim en el control de insectos de granos almacenados. Para ello se cuantificó el contenido de AZA en hojas en etapa vegetativa y floración; hojas y frutos en fructificación; hojas y semillas en madurez fisiológica, de árboles de tres ambientes de México. Por otra parte, se midió el contenido de AZA cada dos meses en hojas y semillas almacenadas en tres ambientes y durante seis meses. Además, se probaron dosis de polvos y extractos, de hojas y semillas contra los insectos *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* en granos de maíz y frijol almacenados durante 120 días.

**Contribución y Conclusiones:** Existe variación en el contenido de AZA del nim entre ambientes y etapas fenológicas. En todos los ambientes el contenido de AZA en semillas fue mas alto que el de las hojas, y no se encontró AZA en los frutos. En hojas, el mayor contenido de AZA fue en la etapa vegetativa y floración en los ambientes cálido seco (Marín) y cálido subhúmedo (Tuxpan). En semicálido húmedo (Córdoba) no existieron diferencias entre etapas y el contenido en hojas y semillas fue bajo. El potencial de almacenamiento de AZA en hojas y semillas es bajo; existió una disminución drástica de su contenido en corto tiempo, más severo en el de las hojas. Los insectos responden de manera específica a la fuente, forma y dosis de aplicación de AZA. El polvo de hojas no afectó a los insectos. El extracto de hojas no afectó a *S. zeamais*; en dosis de 6% (14.4 µg de AZA en 100 g de frijol), afectó a *Z. subfasciatus*. El polvo de semilla a 2% (16.9 µg de AZA en 100 g de grano) controló ambos insectos. El extracto de semillas a 4% (33.7 µg de AZA en 100 g de frijol) controló a *Z. subfasciatus* y a 6% (50.6 de µg de AZA en 100 g de maíz) a *S. zeamais*.

**Firma del Asesor Principal:**



---

## SUMMARY

Mario Cruz Fernández

Graduation Date: November, 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Agronomía

**Research Title:** Dynamics of azadirachtin in neem trees (*Azadirachta indica* A. Juss) from Mexico and its effects on two stored grain insects.

**Number of Pages:** 73

**Doctoral Candidate in Agricultural Science with major in Postharvest Parasitology.**

**Subjects for Research Work:** Agronomy (Entomology Postharvest, Insecticides Plants).

**Objetive and Methods of Study:** The neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) has insecticide properties based on its azadirachtin (AZA) content. The concentration, effectiveness against insects, and residual power of AZA may vary. The objective of this research was: to asses the AZA contents in neem trees planted in different environments and different growth stages; to quantify the storage capacity of AZA in leaves and seeds; and to determine the quantity and best application method for controlling stored grain insects. To accomplish these objectives, the AZA content was quantified in leaves during vegetative and flowering stages; in leaves and fruits during fruit development; and in leaves and seeds at physiological maturity. All determinations were made in neem trees planted at three different environments in Mexico. Additionally, the AZA content was measured every other month during a six month period in leaves and seeds stored at three environments. Further more, powder and extracts from leaves and seeds, were tested against *Sitophilus zeamais* and *Zabrotes subfasciatus* on maize and beans stored for 120 days.

**Contribution and Conclusions:** The AZA content in neem trees was different among environments and phenological stages. In all environments, the AZA concentration in seeds was higher than in leaves. AZA was not found in fruits. For hot-dry and warm-humid environments (Marín and Tuxpan, respectively) the leaves showed the highest AZA concentration at vegetative and flowering stages. For temperate-humid environment (Córdoba), the AZA concentration was low, and there were not significant differences in AZA concentrations on leaves among growth stages. The storage capacity of AZA in leaves and seeds was low. There was a fast reduction on its content in a short time, the fast being on leaves. Powder and extracts from leaves and seeds had specific effects against insects. The leaf powder was not effective. The leaf extract did not show any effect on *S. zeamais*, but it was effective on *Z. subfasciatus* at 6% concentration (14.4 µg AZA on 100g of bean). Seed powder at 2% (16.9 µg AZA on 100g of grain) was effective against both insects. Seed extract at 4% (33.7 µg AZA on 100g of bean) was effective against *Z. subfasciatus* and at 6% (50.6 µg AZA on 100g of maize), against *S. zeamais*.

**Major Advisor:** \_\_\_\_\_

## 1. INTRODUCCION

Los problemas con insectos durante el almacenamiento de granos son muy serios, particularmente porque los factores abióticos favorecen su desarrollo poblacional. Tal es el caso de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) y *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), que respectivamente son las plagas más importantes del maíz y frijol en el almacén, pues además de contaminar los granos con sus cuerpos y excrementos pueden reducirlos a polvo y cáscara.

En la protección de granos y semillas almacenadas contra insectos, es muy frecuente el uso de insecticidas sintéticos. La aplicación de químicos, aunque es efectiva, ha ocasionado serios problemas de contaminación ambiental, de salud, de resistencia en los insectos y de incrementos en los costos de postproducción. Una alternativa de solución a estos problemas, es el uso de plantas con propiedades insecticidas; una de ellas, es el árbol llamado nim.

El nim (*Azadirachta indica* A. Juss) es una planta de la familia Meliaceae que posee propiedades plaguicidas basadas principalmente en su contenido de azadiractina (AZA). Estas propiedades incluyen actividad insecticida, principalmente antialimentaria, repelente y reguladora del crecimiento de los insectos (NRC, 1992). Al ser un insecticida botánico la AZA tiene la capacidad de biodegradarse con facilidad y no contamina el ambiente. Además, por su modo de acción sobre los insectos, no es tóxica al hombre.

Esta especie es originaria de la India, actualmente está distribuida en varios países y fue introducida a México en 1989 (Leos y Salazar, 1992). Su utilización en este país representa una alternativa para el control de plagas de campo y de almacén. Su aplicación en la protección de granos y semillas almacenados tiene gran significado, sobre todo en aquellos que son



considerados como básicos en la alimentación de alrededor de 90 millones de mexicanos, y que debido al crecimiento de la población (2.64% anual) su abastecimiento actual y futuro es uno de los principales problemas que enfrenta el país (INEGI, 1994).

Debido a su naturaleza y bioactividad, la AZA puede variar en su contenido en el árbol y a través de sus etapas fenológicas, en su efectividad en contra de los insectos y en su poder residual. Esta investigación tiene como premisa contribuir al entendimiento de esta sustancia y medir el potencial de los árboles de nim, introducidos y establecidos en varias localidades de México por la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para ser utilizados como fuente de insecticida botánico en el control de plagas de almacén.

### 1.1. Hipótesis

- 1) Existe variación en el contenido de AZA en los árboles de nim distribuidos en México entre ambientes y etapas fenológicas.
- 2) El ambiente de almacén y el período de almacenamiento influyen en el contenido de AZA en hojas y semillas de nim, almacenados.
- 3) Los efectos de la AZA dependen de su concentración y de la especie de insecto a controlar; entonces existe una dosis óptima de AZA para el control de *S. zeamais* y de *Z. subfasciatus* en maíz y frijol almacenados.
- 4) La forma y fuente de aplicación de AZA determina el efecto sobre los insectos en almacén; por consiguiente, *S. zeamais* y *Z. subfasciatus* responderán de manera específica a estos factores de aplicación.

## 1.2. Objetivos

1. Medir el contenido de AZA en hojas, frutos y semillas de árboles de nim distribuidos en México, en diversos ambientes y etapas fenológicas del árbol para determinar si existe variación.
2. Determinar el potencial de almacenamiento de la AZA contenida en hojas y semillas de nim.
3. Determinar la dosis apropiada de AZA, utilizando como fuentes polvos y extractos, de hojas y semillas de nim, para el control de *S. zeamais* y *Z. subfasciatus*.

## **2. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1. El Arbol de Ním**

#### **2.1.1. Importancia**

El árbol de nim, originario de la India, se reporta como una planta con propiedades insecticidas y farmacológicas (Pradhan y Jotwani, 1968). En las áreas rurales de India y Africa tiene amplio uso medicinal (Saxena, 1989). Asimismo, en los escritos del antiguo Sanskrito se menciona que sus propiedades farmacológicas fueron tan populares, que virtualmente era la botica del pueblo (IARI, 1983). Es considerado como una alternativa factible de utilización en el control de plagas y otros usos, principalmente en áreas de agricultura de subsistencia (Ahmed y Grainge, 1986). Leos y Salazar (1992) citan que se le han encontrado muchos atributos deseables adicionales, como crecimiento y rebrote rápido, cerca viva, leña, mejora los suelos agrícolas, es ornamental, y no es maleza ni hospedera de plagas.

#### **2.1.2. Adaptación**

Ahmed y Grainge (1986) mencionan que este árbol habita en zonas desde subhúmedas hasta semiáridas y en las latitudes que van de los 5° LS hasta los 35° LN. Sin embargo su mejor adaptación es en climas cálidos, con lluvias anuales de 400-1200 mm, a menos de 1000 msnm (NRC, 1992), calientes (hasta 50° C), pero libres de heladas o periodos de frío prolongados. Bajo condiciones secas su crecimiento y rendimiento pueden ser variables y

susceptibles a las plagas. El nim es una planta cuyo origen exacto es incierto. La mayoría coincide en que es originario de zonas secas de la montaña Siwalik de la India y Birmania, ubicados en la parte tropical del suroeste asiático (NRC, 1992). Algunos lo ubican en el subcontinente Indo-Pakistaní, y otros en las áreas secas del sur y sureste Asiático, incluyendo Pakistán, Sri Lanka, Birmania, Tailandia, Malasia e Indonesia (Ahmed y Grainge, 1986).

En la actualidad, el nim se encuentra distribuido en más de 30 países. En el Continente Asiático, particularmente en la India, sobre la franja que inicia desde el sur de Delhi y Lahore hasta Cabo Camorín donde existen alrededor de 25 millones de árboles creciendo bajo cultivo y en forma silvestre (Pradhan y Jotwani, 1968). Existen también árboles en Filipinas introducidos por el Instituto Internacional del Arroz (IRRI, siglas en inglés). En Africa, se encuentran árboles en Nigeria y Sudán, sobre la costa este en Etiopía, Somalia, Kenia, Tanzania y Mozambique y en la región oeste, en Mauritania, Togo, Costa de Marfil y Camerún (Ahmed y Grainge, 1986). En Europa, árboles experimentales se encuentran en Alemania (Schmutterer y Doll, 1993) y en la costa oeste de Francia (Roederer, 1991).

En América, el nim se encuentra en las naciones del Caribe, tales como Trinidad y Tobago, Jamaica, Puerto Rico, Islas Virgenes, Surinam, Guyana, Barbados, Cuba, República Dominicana y Haití (Lewis y Elvin-Lewis, 1983; Pliske, 1984). En Centro y Sur América existen plantaciones en Guatemala, Nicaragua y Honduras; Bolivia, Ecuador, Argentina y Brasil (NRC, 1992). Mas recientemente, el árbol de nim ha sido introducido a México, donde varios árboles experimentales han sido plantados en varios estados: Yucatán, Nuevo León, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Durango y Baja California, son algunos de ellos (Leos y Salazar, 1992; Rodríguez y Rodríguez, 1994); así como en Florida, Oklahoma, California y Arizona en Estados Unidos (NRC, 1992).



### 2.1.3. Clasificación y Descripción Botánica

De acuerdo a Bailey (1977), el nim se clasifica de la siguiente manera:

Reino:	Plantae
Subreino:	Trachaeophyta
División:	Pterophyta
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledónea
Orden:	Geraniales
Familia:	Meliaceae
Género:	<i>Azadirachta</i>
Especie:	<i>indica</i>

El nim es un árbol robusto, siempre verde, de rápido crecimiento, de tronco recto que llega a medir hasta 2.5 m de circunferencia, corteza moderadamente gruesa; alcanza una altura de 30 m y un diámetro de copa de 25 m (NRC, 1992); puede vivir por más de 200 años (Jacobson, 1986). La hoja es peciolada de forma aserrada y de alrededor de 7 cm de largo, cuando son jóvenes son de color rojo cobrizo pero posteriormente cambian a verde oscuro, se agrupan en foliolos; la caída de hojas del árbol ocurre solo bajo extrema sequía o después del daño por heladas.

La flor es pequeña (5 mm), blanca, crema o amarillenta, bisexual, actinomorfa, que crece en racimos de manera axilar; en plena floración su aroma y néctar facilitan su polinización (Schmutterer, 1990; NRC, 1992). El fruto es una drupa elipsoidal, lisa y de 1.4 a 2.4 cm de largo producido en racimos; el color de la cáscara al inicio de su formación es verde con endocarpio blanco y duro; al madurar la cáscara se toma amarillenta, la pulpa jugosa y dulce, además encierra a la semilla (NRC, 1992); los frutos tienen maduración desuniforme, no simultánea debido al brote secuencial que ocurre en los racimos (Mahadevan, 1991). La semilla tiene forma elipsoidal, de alrededor de 1.2 cm de ancho y 1.8 cm de largo, cubierta con una cáscara color café que

envuelve algunas veces a dos o tres granos.

#### 2.1.4. Producción

El nim inicia su producción de frutos después de 3 a 5 años de plantado, alcanzando su máximo potencial a los 10 años; en el cual puede ser de más de 50 kg de frutos por árbol anualmente. La floración y formación de frutos ocurre normalmente una vez al año, algunas veces dos, y su rendimiento depende de las condiciones ambientales, precipitación y tipo de suelo de la región de establecimiento (NRC, 1992; IARI, 1983).

En India, árboles de 8 a 10 años de edad han producido 9 kg, los de 15 a 20 años 19 kg de fruto. En Nigeria el rendimiento promedio de fruto es de 20 kg/árbol. El peso de la semilla normalmente representa el 10% del peso del fruto (NRC, 1992). En el oeste de África, árboles de 56 meses de edad tuvieron una producción de materia seca de 12 t/ha, 5.1 t/ha de madera, y 214 g/kg de proteína cruda (CP) con alta relación de CP y energía metabolizable (Lamers *et al.* 1994).

## 2.2. Efecto Plaguicida del Arbol de Nim

### 2.2.1. Efecto Sobre Insectos

Warthen (1989), la NRC (1992) y Saxena (1989) mencionan más de 200 especies de insectos que son afectados por esta planta; mientras que Schmutterer citado por Rodríguez y Rodríguez (1994) mencionan 400 plagas que mostraron susceptibilidad al nim en ensayos de laboratorio.

Saxena *et al.* (1980), Singh (1982) y Saxena (1983) han observado que el nim produce diversos efectos *detrimentales* en varios insectos: actúa como repelente, antialimentario, interruptor del crecimiento y del desarrollo de huevecillos.

La AZA, para Mordue y Blackwell, (1993) es un fuerte antialimentario,

regulador hormonal del crecimiento, y con efectos reproductivos negativos. Agregan que el efecto antialimentario varía marcadamente entre las especies, siendo los lepidópteros los más sensitivos. Asimismo el efecto fisiológico sobre el crecimiento, muda y reproducción son consistentes entre especies, aunque la cutícula e intestinos pueden proveer barreras a la bioefectividad en algunas especies; explican que la AZA tiende a tener: (1) efectos disuasivos y sobre estímulos quimiorreceptores resultando un antialimentario; (2) efectos sobre la ecdisona (hormona de la muda) y la hormona juvenil al bloquear la liberación de la hormona péptida morfogenética, (3) efectos directos sobre otros tejidos resultando en la total pérdida de aptitudes de los insectos.

Ascher (1993) cita que la AZA provoca los siguientes efectos en los insectos: (1) reducción parcial o completa de la fecundidad, e incapacidad para incubar huevecillos; (2) reducción del periodo adulto; (3) repelencia a la oviposición; (4) efectos directos en la oviposición; (5) efectos antialimentarios en larvas, ninfas y adultos; (6) prolonga el estado larval; (7) regulador del crecimiento, afectando la muda de instares entre larvas o ninfas y particularmente en el estado de prepupa y; (8) deformismo y retraso de la emergencia de adultos.

Por su parte Rovesti y Deseo (1990) mencionan que el nim y sus derivados actúan como antialimentarios, repelentes, ovidas y reguladores del crecimiento, reducen la fecundidad de insectos adultos y viabilidad de huevecillos, además el aceite y extractos acuosos presentan inhibición de la germinación y/o desarrollo de algunos hongos patogénicos. Asimismo Koul *et al.* (1992) mencionan que varios químicos aislados del nim presentan efectos sobre los insectos: afectan el comportamiento, crecimiento, desarrollo y fisiología. De ellos la AZA es el compuesto de mayor potencial antialimentario, inhibe el crecimiento, reproducción y afecta las funciones de la endocrina. Rembold y Raychaudhuri (1991) indican que la AZA es una sustancia que inhibe el crecimiento de los insectos al interrumpir la inducción de ecdisona en el proceso de muda y el nivel del compuesto acumulado en el cuerpo resulta en una reducida producción de proteínas neurosecretorias.

Para Rembold *et al.* (1987), la aplicación de AZA-A y AZA-B sobre el crisomélido *Epilachna sp.* interfirieron el control hormonal de crecimiento y desarrollo del insecto. Siddiqui *et al.* (1988b) cuando aplicaron extractos de hojas de nim con éter de petróleo contra *Culex pipiens fatigans*, los extractos mostraron actividad larvícida.

En resumen, el nim tiene efectos detrimentales sobre un gran número de insectos. Los reportes indican diversas formas: actúa como repelente y antialimentario, es regulador hormonal del crecimiento, reduce la fecundidad y aumenta la proporción de huevecillos estériles, funciona como veneno estomacal, inhibe el desarrollo de huevecillos y pupas, acelera la metamorfosis, impide la oviposición, interrumpe la comunicación sexual e inhibe la formación de quitina.

#### 2.2.2. Aplicación Contra Insectos de Almacén

Pal y Prasad (1996) probaron extractos de alcohol obtenidos de plantas, además de insecticidas químicos contra *Trogoderma granarium* Everts, y encontraron la siguiente respuesta a toxicidad (LC50) en orden descendente: malathion > chlopyrifos-methyl > *Azadirachta indica* aceite de semilla > *Acorus calamus* > *Tabernaemontana coronaria* > *Tamarindus indica* > *A. indica* hojas > *Lantana camara* > *Murraya paniculata* > *Eucalyptus sp.*

El uso de hojas de nim aplicado de diferentes formas ha tenido buenos efectos en el control de plagas. El polvo de hoja de nim en diferentes dosis (peso/peso) fue probado por Sharma (1995) contra *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) en maíz almacenado; en dosis de 10% produjo menor emergencia de adultos, y menor pérdida (32.6%) de peso del grano después de nueve meses de almacenamiento. Por su parte Saxena *et al.* (1988) citan que las hojas de nim mezcladas con semillas de cacao resultaron buena medida para repeler el daño de *Cadra cautella* (Walker), *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) y *Sitophilus oryzae* (Linnaeus). Asimismo, pruebas efectuadas por Ambika *et al.* (1981) e Islam (1983) sobre el uso de extractos de hojas de nim, mostraron su efectividad

contra *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus) en dosis de 1 a 5%, en dosis de 8 a 16% la mortalidad fue del 100%. Sin embargo, en el estudio realizado por Al-Hemyari (1994) sobre el control de *C. maculatus* en granos de garbanzo, encontró que el polvo de semillas fue superior al polvo de hojas en dosis de 5% en cuanto al control del insecto. Del mismo modo López (1991) encontró que el polvo de hojas de nim en dosis de 3% no fue efectivo para controlar *S. zeamais*, otras plantas probadas fueron más prometedoras. Esquinca (1994) tampoco encontró efectos significativos de la aplicación de polvos de hojas de diferentes árboles de nim; dosis de 6% no fueron suficientes para afectar la mortalidad de *Tribolium castaneum* (Herbst).

La utilización de semilla de nim ha dado buenos resultados en el control de plagas de almacén, aplicada de diferentes formas: polvos, extractos, aceites o pastas (Ahmed y Greinge, 1986). El polvo de semilla de nim, aplicado en dosis de 1 y 2 g por cada 100 g de trigo sobre el insecto *R. dominica*, produjo 55 y 63% de mortalidad después de 30 días. Otros materiales (sílica gel, silicato de aluminio, talco y rophillite) ocasionaron menor porcentaje de mortalidad (Paiman et al. 1983). Pradhan y Jotwani (1968) al aplicar varias dosis de polvo de semilla de nim, encontraron que dosis de 1 a 2% mezclados con semilla de trigo brindaron protección efectiva contra el daño de *R. dominica*, *S. oryzae* y *T. granarius* entre 10 y 12 meses de almacenamiento. Saxena et al. (1988) mencionan que el polvo de semilla de nim (a 2, 4 y 8%) produjo efectos de repelencia en *T. confusum* y *S. zeamais*; los mismos efectos que causaron los extractos de semilla en dosis de 1 a 3% en *C. maculatus* en garbanzo de Bengala. Sharma (1995) al aplicar polvo de semilla de nim en dosis de 2% en maíz, lo protegió por dos semanas de *S. oryzae*; pero cuando lo aplicó a 10% también lo protegió de *T. granarium* y *R. dominica*, excepto de *T. castaneum* durante seis meses. Por su parte, Borikar y Pawar (1995) encontraron que la aplicación de polvo de semilla a 3% protegió a la semilla de *Vigna radiata* del insecto *C. chinensis*.

## 2.3. Componentes Activos del Arbol de Nim

### 2.3.1. Componentes en General

Los componentes activos del nim se encuentran en la corteza, hojas, frutos, y semillas (NRC, 1992). El IARI (1983) y Jacobson (1986) describen el desarrollo histórico en cuanto al aislamiento de los componentes activos. Citan que Chatterji y Sen en 1919 aislaron el "margosic acid"; en 1942 Siddiqui separó los compuestos nimbin, nimbidin y nimbinin; la salanina por Henderson y colaboradores en 1964; el meliantriol en 1967 por Lavie *et al.*; y la AZA por Morgan en 1968. Los tres últimos componentes son sustancias amargas identificadas como limonoides, del grupo de estereoquímicos homogéneos tetranortriterpenoides (Saxena, 1989; Jacobson, 1986) y de ellas la AZA es considerada como la más potente.

Adicionalmente, se reportan otros compuestos con principios menos activos o desconocidos como el betasitosterol, flavanoides y ácidos grasos. Otras sustancias identificadas recientemente y que están estrechamente ligados a la AZA son: vepaol, isovepaol, nimibidina y 7-diacetil-17-hidroxi-azadiradiona (varios autores citados por Esquinca, 1994).

Por su parte Bokel *et al.* (1990) aislaron tres tetranortriterpenoides del árbol de nim: de extractos de hoja aislaron la nimbina (6-diacetilnimbinal) y la nimbolida (28-dioxo-nimbolida), y de extractos de semilla el nimbinol. De la cáscara del tallo del árbol de nim, Ara *et al.* (1989), aislaron a través de métodos espectroscópicos y transformaciones químicas dos diterpenoides isoméricos: nimbonona (12-etil-13-metoxi podocarpa-8, 11, 13-trien-7-ona) y nimbonolona (12-etil-13-metoxi podocarpa-8, 11, 13-trien-3-ona). Mientras que Siddiqui *et al.* (1988a) también de la cáscara del tallo, y en fracciones ácidas de extractos de etanol determinaron dos diterpenoides: la nimbionona (12-hidroxi-13-metoxipodocarpa-8, 11, 13-trien-3, 7-diona) y nimbionol (3,12-2-hidroxi-13-metoxipodocarpa-8, 11, 13-trien-7-ona), ellos utilizaron métodos químicos y espectrales.

Ermel *et al.* (1991), a través de métodos de cromatografía, aislaron de la semilla de *Azadirachta excelsa* dos sustancias (marrangina y AZA) con extractos de alcohol; ambas sustancias fueron probadas sobre el 4o. instar larval de *Epilachna varivestis*, teniendo efectos significativos como reguladores de crecimiento, siendo la marrangina claramente superior a la AZA. Govindachari *et al.* (1991) aislaron de semillas de nim y a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas en inglés) varios tipos de AZA: A, B y D. Los mismos investigadores pero en 1992 aislaron la AZA-H y AZA-I, éstos nuevos compuestos y sus estructuras fueron confirmadas a través de análisis espectrales.

Siddiqui *et al.* (1992) aislaron tres estructuras a través de análisis espectrales de extractos con etanol de frutos maduros, frescos, sin secar y sin moler: (1) disfurano-azadiradiona [7- $\alpha$ -acetoxi-4, 4, 8-trimetil-5  $\alpha$ -(13  $\alpha$ Me)-androsta-1, 14-dien-3, 16-diona]; (2) 7  $\alpha$ -acetoxi-4, 4, 8-trimetil-5  $\alpha$  (13  $\alpha$ Me)-17-oxa-androsta-1, 14-dien-3, 16diona; (3) 7  $\alpha$ -acetoxi-4, 4, 8-trimetil- 5 $\alpha$ -17-oxa-androsta-1, 14-dien-3, 16diona.

### 2.3.2. La Sustancia AZA

De los componentes activos del árbol del nim, la AZA es la sustancia activa más importante que ha sido aislada (Schmutterer, 1990). Es considerada como una sustancia producida por el metabolismo secundario de la planta. La AZA cuya fórmula química es  $C_{35}H_{44}O_{16}$  (peso molecular 720.7) es una sustancia amarga (limonoide) que pertenece al grupo esteroquímico homogéneo de tetranortriterpenoides (Saxena, 1983 y IARI, 1983).

### 2.3.3. Contenido de AZA

Debido a su naturaleza y bioactividad, la AZA, al igual que otras sustancias botánicas podría variar en su contenido en las diferentes partes de la planta y efectividad, debido a factores: físicos, biológicos, geográficos,

genéticos, ambientales, entre otros.

Para Isman *et al.* (1990), la concentración de los componentes del nim puede variar por el genoma del cual la semilla proviene, del área geográfica de origen y de la variación de las condiciones ambientales anuales. Schmutterer (1990), encontró variaciones de contenido de AZA en las semillas de 0 hasta 10 g/kg e Isman *et al.* (1990) de 0 hasta 4026 ppm. Ermel *et al.* (1987) analizaron 66 muestras de semillas de árboles de nim de diferentes países, al analizar el contenido de AZA a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, siglas en inglés) encontraron diferencias en el contenido entre ellas: semillas de Nicaragua e Indonesia contenían 4.8%; las de Togo, India, Birmania y Mauritania de 3.3 a 3.9%; las de Sudan y Nigeria solo 1.9% y 1.5%; además agregan que el contenido de AZA decrece con las altas temperaturas, con la alta humedad relativa; y con la exposición de los extractos a la luz solar y radiaciones ultravioleta.

Rengasamy y Parmar (1995), midieron el contenido de AZA-A en semillas de árboles de nim en 11 ecotipos de 21 regiones de la India, y su relación con los factores agroecológicos, de ecosistemas, de clima, período de crecimiento anual y suelo. Encontraron que el contenido osciló de 0.14 a 2.02% (peso/peso) y 0.68% en promedio en el grano; que los ecotipos creciendo en regiones de costa, en ecosistemas áridos y semiáridos presentaron alto contenido (>0.72%); mientras que árboles de regiones subhúmedas el contenido fué bajo (0.27%); y que los árboles creciendo en suelos rojos en clima monson registraron altos contenidos. Asimismo, semillas de ecotipos de nim creciendo en ecosistemas áridos y semiáridos contenían tres veces más AZA que aquellos de zonas subhúmedas. Esto explica porque Singh (1987) al medir la actividad antialimentaria, el rendimiento de extracto y el contenido de aceite en semillas de nueve ecotipos de diferentes regiones de India; encontró que los granos de áreas húmedas produjeron mas aceite, pero los de áreas cercanas al desierto tenían mayor actividad antialimentaria.

El contenido de AZA en frutos (incluyendo la semilla), también es variable. La IARI (1983) cita una variación de 0.02 a 0.35% de AZA en los



frutos, y agrega que generalmente los frutos maduros contienen mayor cantidad de AZA que frutos recién formados. En otros estudios realizados por Rengasamy y Parmar (1994) sobre del contenido de AZA en árboles de nim en diferente etapa de floración y fructificación, encontraron que los árboles no presentaron AZA en las flores ni en los frutos verdes colectados a 20, 30 y 40 días después de la antesis; pero los frutos colectados a 50 y 60 días ya mostraron pequeñas cantidades.

Yakkundi *et al.* (1995) estudiaron el contenido de AZA en frutos (incluyendo a la semilla) en diferente estado de desarrollo, analizado por cromatografía líquida de fase reversa, ellos encontraron que la AZA apareció en pequeñas cantidades después de 9 semanas de formación, y se incrementó lentamente hasta alcanzar el máximo contenido a las 17 semanas (0.38% peso/peso sobre materia seca) momento en que el fruto pasa de verde a amarillo, posteriormente el contenido decreció a la semana 19 (0.29% peso/peso). Los autores mencionan que este período debe ser considerado para obtener el máximo rendimiento de AZA.

Veerendra (1995) analizó las características de las semillas de nim (largo, ancho y peso) procedentes de 10 regiones de Pradesh, India. Los resultados mostraron variación entre localidades: el coeficiente de variación para la longitud de semilla resultó alto (73%), más bajo para el ancho de semilla (35.7%) y para el peso de semilla (25.1%).

Jitendra *et al.* (1996) estudiaron 42 ecotipos de árboles de nim en India y encontraron amplia variación en el contenido de aceite, en sus características físicas y químicas (color, gravedad específica, índice refractivo, cantidad de iodo, de ácido y saponificación), en el total de ácidos grasos; en su composición (oleico, esteárico, palmítico, linoleico, mirístico, arachídico y behénico) y en la presencia de las meliacinas (AZA, nimbina y salanina). El contenido de AZA no se correlacionó con ningún parámetro físico y químico, mientras que el contenido de nimbina y salanina sí mostró significancia en la correlación con los parámetros físicos y químicos de la semilla. Sin embargo los contenidos de salanina y AZA del aceite se correlacionaron con la bioactividad evaluada contra

*Spodoptera litura* (Fabricius).

Johnson *et al.* (1996) determinaron la época apropiada para cosechar las semillas de nim; para ello midieron la concentración de los cinco principales triterpenoides y contenido de aceite durante el período de fructificación en seis árboles. El contenido de aceite se incrementó marcadamente con la época, mientras que la concentración del triterpenoide y proporción de los principales componentes tuvieron pequeños cambios desde el estado de frutos duros y verdes hasta la madurez de la semilla, en esta última etapa el contenido de AZA fue alto (10 µg/g) en semillas de reciente maduración.

Schneider y Ermel (1987) a través de HPLC en fase reversa determinaron la cantidad de AZA de semillas de nim; al utilizar como solvente el metanol encontraron de 6.5 a 6.6 µg/g; cuando utilizaron la mezcla isotrópica en el extracto metanol y metil terciari-butil éter la concentración determinada fue del 17%.

#### **2.4. Almacenamiento de la Semilla de Nim**

La mayoría de las investigaciones al respecto, se han efectuado con la finalidad de mantener y conocer la calidad fisiológica de la semilla (viabilidad, germinación, longevidad) después de cierto período de almacenamiento. Los resultados indican que las semillas tienen bajo potencial de almacenamiento.

En el oeste de Africa, Gamene *et al.* (1996) almacenaron semilla de nim con 87% de germinación en tambos a 20° C de temperatura, a diferente humedad relativa (HR) y durante nueve semanas. El porcentaje de germinación más alto (70%) fue obtenido a HR de 55% y contenido de humedad (CH) en el grano alrededor del 9%; en cambio la germinación más baja (32%) se obtuvo cuando la HR presente fue de 95% y CH de 20 a 25%. En el mismo estudio se probó el efecto de las temperaturas (3, 20, 30, y 50° C) en semillas almacenadas con 8.9% de CH; y por otra parte diferentes CH (4.5, 9.2, y 12.9%) a 3 y 30° C durante cinco semanas. Los resultados indicaron que la germinación se redujo cuando la semilla fue almacenada en altas temperaturas. Sin tomar en

cuenta la humedad en los granos, la pérdida de germinación fue menor a medida que la temperatura se redujo. Ellos ubican a la semilla de nim en la categoría intermedia en cuanto a su potencial germinativo bajo almacenamiento.

En general la semilla de nim después de seis meses de almacenamiento tuvo una germinación cercana a cero, sin embargo cuando fue almacenada con el endocarpio a 8° C y 60% de HR pudo registrar 42% de germinación después de cinco años de almacenaje (Roederer y Bellefontaine, 1989).

Maithani *et al.* (1989) encontraron que la mayor capacidad germinativa y longevidad de semillas de nim se logra cuando éstas alcanzan su madurez fisiológica, que ocurre de 10 a 12 semanas después de la floración cuando el fruto se toma amarillo y cae, época que el fruto alcanza el mayor peso verde, mayor tamaño, el crecimiento total del embrión, endocarpio duro y fibroso. En otra investigación, Rakesh *et al.* (1996) almacenaron semilla colectada de 10 árboles silvestres de nim; estas fueron puestas bajo cuatro condiciones: botellas plásticas, bolsas de polietileno, bolsas de tela en almacén natural y refrigerador a 4° C. La mejor germinación de la semilla, registrada quincenalmente durante 60 días, se obtuvo en semillas contenidas en bolsas de tela y en cuarto frío. La germinación fue reducida paulatinamente a mayor período de almacenamiento.

Ponnuswamy *et al.* (1991) almacenaron semilla de nim con 90% de germinación en ambiente con temperatura de 33.8° C, a los tres meses esta se redujo a 8%, lo anterior se atribuyó al alto contenido de humedad al inicio del almacenamiento (30.8%); en cambio semillas de menor contenido de humedad inicial después de tres meses tenían 62% de germinación.

Venkatesh *et al.* (1990) almacenaron semilla de nim recién cosechada en un cuarto al ambiente, introducida en bolsas de tela y con 91% de germinación; al evaluar su germinación cada 15 días durante cuatro meses, encontraron que la germinación se redujo a 50% a los 15 días de almacenaje y a 10% a los cuatro meses.

En cuanto al contenido de AZA en semillas bajo almacenamiento, Ermel *et al.* (1987) encontraron decrementos en el contenido cuando fueron expuestas a una alta HR y alta temperatura, de la misma manera cuando se expuso a luz

solar directa y a la radiación ultravioleta. Por su parte Yakkundi *et al.* (1995) mencionan que bajo condiciones normales de almacenamiento de la semilla, el contenido de AZA fue inestable; ésta se redujo después de cuatro meses a 68% y 55% del nivel original cuando se almacenó bajo oscuridad y bajo iluminación, respectivamente. Mas recientemente, Johnson *et al.* (1996) almacenaron semilla de nim a 22-24° C y 70-75% de HR por seis meses, encontraron que la semilla sufrió la pérdida total de salarina y de AZA.

Respecto al efecto de almacenamiento sobre contenido de AZA en las hojas, no se encontraron reportes, por lo que su comportamiento se desconoce.

## **2.5. Insectos de Granos Almacenados**

Los insectos provocan grandes pérdidas a los granos almacenados. En México las pérdidas en granos almacenados alcanzan valores hasta del 35%, siendo los insectos una de las causas principales (Schoonhoven, 1978). Este porcentaje significó una reducción de 489 mil toneladas de frijol y 5 millones de toneladas de maíz en la producción obtenida durante 1991; volúmenes muy significativos en el abastecimiento de alimentos tan necesarios para una población de 81 millones de habitantes y un crecimiento anual estimado en 2.5% (INEGI, 1994).

Los daños que ocasionan los insectos a los granos almacenados, además de originar pérdidas de peso, contaminan con excrementos, con hilos de seda, con olores extraños, con sus cuerpos enteros y fragmentos. Indirectamente, provocan calentamiento, migración de humedad, diseminación de patógenos y parásitos del hombre y animales (Vidales, 1991).

Dentro de las plagas agrícolas, el orden Coleóptera tiene gran importancia. Alrededor de 500 a 600 especies se asocian a productos almacenados, entre ellas sobresalen el gorgojo del maíz y el gorgojo pinto del frijol.

## 2.5.1. Gorgojo del Maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky)

### 2.5.1.1. Importancia

Es una plaga que ataca preferentemente al maíz almacenado, de ahí viene su nombre vulgar y científico, pero puede atacar a un gran número de cereales cosechados, causando cuantiosas pérdidas, particularmente en climas cálidos y húmedos, reduciendo los granos a polvo y cáscara. Los adultos vuelan de los graneros a los campos, donde inician la infestación, la que continúa después de la cosecha hasta constituirse en una plaga destructiva en el almacén (SARH, 1980).

### 2.5.1.2. Descripción

Este insecto pertenece al orden Coleóptera, familia Curculionidae y requiere de un mínimo de 30 días para pasar por los estados de huevo, larva y pupa. Su descripción según Robledo (1990) es la siguiente:

**Huevo.** La hembra puede ovipositar entre 300-400 huevecillos, transparentes en forma de pera, los cuales son depositados en orificios hechos por ella misma en el grano. Cada huevecillo es cubierto por una substancia gelatinosa (producida por la hembra) conocida como "tapón de huevo".

**Larva.** En condiciones favorables (27° C y 70% HR) el período de incubación del huevecillo es de 6 a 7 días, del que emerge una larva blanca y ávida, que posteriormente pasa por cuatro estadios larvales; durante estos períodos se alimenta en el interior del grano. La duración del estado larval es en promedio de 13 días.

**Adulto.** Este puede vivir por varios meses o hasta un año; presenta un color negro a café rojizo, el tórax está denso y uniformemente marcado con puntuaciones redondeadas, cada élitro tiene dos puntos rojizos. La cabeza es mas o menos esférica, pero se prolonga en un pico que al extremo lleva el aparato bucal. El tamaño es de 3 a 4 mm.

El pico del macho es grande, se origina en la parte antero-frontal entre los ojos compuestos y presenta múltiples puntuaciones prominentes, marcadas y redondeadas que están dispersas al azar a todo lo largo.

La hembra puede poner huevecillos durante toda su vida, aunque su capacidad reproductora es mayor durante las dos primeras semanas de edad. El pico es delgado y liso, las puntuaciones son menos numerosas y superficiales. En general su pico no es tan rugoso como el del macho.

## 2.5.2. Gorgojo Pinto del Frijol (*Zabrotes subfasciatus* Boheman)

### 2.5.2.1. Importancia

La familia Bruchidae (orden Coleoptera) abarca 850 especies, entre las que se encuentran varias que causan daños a los granos almacenados; 28 de ellas se alimentan del frijol almacenado (Vázquez *et al.* citados por González *et al.*, 1985; Rodríguez y Rodríguez, 1990).

El gorgojo pinto del frijol o gorgojo mexicano del frijol, es considerado como uno de los insectos de mayor incidencia en el frijol almacenado en América Latina y la principal plaga en las regiones cálidas tropicales y subtropicales (Schoonhoven, 1976). Esta plaga puede iniciar su infestación desde el campo, cuando las vainas del frijol se abren o son destruidas por otros insectos.

El daño, que lo ocasiona particularmente la larva, se manifiesta por el consumo y destrucción del endospermo del grano, así como por la contaminación del frijol con sus excrementos y otros restos orgánicos. El deterioro del frijol a consecuencia de su ataque se refleja en reducción de peso y cambios nutricionales del grano, siendo considerables las pérdidas económicas, pues el frijol dañado no es aceptable en el mercado (Ramayo, 1983; Rodríguez y Rodríguez, 1990).

### 2.5.2.2. Descripción

**Huevo.** La hembra una vez que se ha apareado, puede ovipositar en ambiente óptimo (70% HR y 30° C) hasta 52-56 huevecillos en siete días (Pajni y Jabbal, 1986), la máxima oviposición ocurre al tercer día, después disminuye hasta que la hembra muere al onceavo o doceavo día (González *et al.* 1985). Los huevecillos son adheridos fuertemente a la superficie de los granos de frijol y su período de incubación es de cuatro a cinco días bajo condiciones favorables.

**Larva.** Una vez que la larva del primer instar se ha formado, inicia rompiendo con las mandíbulas el corión del huevo en la parte pegada al grano, para después perforar la testa y pasar de ahí a alimentarse con voracidad de los cotiledones. Conforme la larva se alimenta, elabora una galería dirigida al centro del grano, al final sólo queda la cutícula (Tapia, 1983). El periodo larval va de 14 a 17 días, después de pasar por cuatro instares larvales, forma la celda pupal cerca a la testa, haciendo al mismo tiempo un orificio al que le deja sólo una capa muy delgada, la cual romperá el adulto al emerger. Las celdas pupales son visibles y tienen forma de ventanas circulares. Al terminar su desarrollo pupal, los adultos permanecen un día en la celda pupal, para emerger poco después a través de la "ventanita" (Ramayo, 1983; Tapia, 1983).

**Adulto.** El adulto es un gorgojo de 2.5 mm de largo de color negro, con élitros cortos y pubescentes, con dos manchas transversales y claras, el cuerpo es robusto, y el tórax tan ancho en la base como longitudinalmente. Las antenas son filiformes con los segmentos basales, algo rojizos y el resto de color negro. La longevidad del adulto es de 12 a 13 días (Golob y Kilminster, 1982, González *et al.* 1985), y el ciclo total de vida (huevo a adulto) es de 36 días (Golob y Kilminster, 1982).

### **3. MATERIALES Y METODOS**

La presente investigación se constituye de tres estudios, cada uno de ellos efectuados con materiales y métodos particulares, los cuales se detallan a continuación por separado.

#### **3.1. Contenido de Azadiractina (AZA) en Hojas, Frutos y Semillas de Árboles de Nim Establecidos en México**

##### **3.1.1. Area de Estudio**

En octubre de 1990, la FAUANL distribuyó arbolitos de nim con procedencia de Filipinas, en varios estados de la República Mexicana como parte del proyecto de "importación y disseminación del árbol de nim en México". De éstos, se seleccionaron para el estudio los árboles ubicados en Marín, N.L. y Tuxpan, Ver. Además se estudiaron árboles de Córdoba, Ver., introducidos de Nicaragua (diferente origen genético) por el Colegio de Postgraduados, y seleccionados debido a que están ubicados en clima fresco, ambiente de contraste con los de Marín y Tuxpan. Los datos referentes a ellos se muestran en el Cuadro 1. El estudio se desarrolló durante el período de agosto de 1995 a septiembre de 1996.

El árbol de nim tiene amplia adaptación, desde áreas calientes y secas con precipitaciones de 150 mm hasta climas húmedos tropicales con 1600 mm, y desde los 0 a 1000 msnm (Ahmed y Greinge, 1986; Guzmán y Gruber, 1994), Pero de los factores de ambiente, la temperatura, es considerada como el factor que tiene mayor influencia en el desarrollo de los árboles de nim (NRC, 1992).



**CUADRO 1. Características de las localidades donde se ubican los árboles de nim que se estudiaron durante 1995 y 1996.**

Característica	Marín, N.L.	Tuxpan, Ver.	Córdoba, Ver.
Arboles (n)	5	3	5
Edad (años) al inicio	6	6	4
Clima	Cálido seco BS <sub>1</sub> (h')	Cálido subhúmedo AW <sub>2</sub> (c)	Semicálido húmedo (A)C(m)
Temp. Media Anual (°C)	22	24	20
Precip. Total Anual (mm)	500	1351	900
ASNM (m)	360	14	927
Localización			
LN	25° 53'	20° 57'	18° 54'
LW	100° 02'	97° 24'	96° 56'

### 3.1.2. Tratamientos de Estudio

El estudio tuvo como finalidad cuantificar el contenido de AZA y observar la variación entre ambientes y entre etapas fenológicas de árboles de nim. Se seleccionaron 13 árboles de nim en tres localidades de México con diferentes condiciones de clima: Marín, N.L. (cálido seco); Tuxpan, Ver. (Cálido subhúmedo); y Córdoba, Ver. (semicálido húmedo). En cada localidad se tomaron muestras de hojas, frutos y semillas de árboles de nim, para determinar su contenido de AZA. Las muestras fueron tomadas en las siguientes etapas fenológicas: (1) hojas en etapa vegetativa, (2) hojas en floración, (3) hojas y frutos verdes en fructificación y (4) hojas y semillas a partir de la madurez fisiológica de los frutos.

### 3.1.3. Variables Analizadas

La variable principal fue contenido de AZA en hojas, frutos y semillas. El contenido de AZA en las hojas entre ambientes y etapas fenológicas se analizó bajo un diseño factorial (modelo 1); mientras que la AZA en frutos y semillas entre ambientes se analizó bajo un diseño completamente al azar (modelo 2). La

comparación de medias fue aplicando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5%.

$$Y = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk} \quad (\text{modelo 1})$$

$$Y = \mu + A_i + E \quad (\text{modelo 2})$$

- Y = Contenido de AZA
- $\mu$  = Media general
- $A_i$  = Efecto de la  $i$ -ésimo ambiente (A)
- $B_j$  = Efecto de la  $j$ -ésima etapa fenológica (B)
- $(AB)_{ij}$  = Efecto conjunto del nivel  $i$  de A y el nivel  $j$  de B
- $E_{ijk}$  = Error experimental de la unidad experimental.

Otras variables evaluadas en los árboles de nim fueron: diámetro de tallo a los 50 cm, altura de árbol, tamaño de semilla en cuanto a su ancho y largo, y peso de 100 semillas. Variables que fueron analizadas en un diseño completamente al azar y la comparación de medias a través de DMS (5%); así como su correlación con el contenido de AZA en hojas y semillas.

#### 3.1.4. Preparación de Extractos de AZA

La extracción y medición del contenido de AZA, se realizó siguiendo la metodología aplicada por Isman *et al.* (1990) y el Dr. Howard Williams (comunicación personal, Universidad de Texas A&M, 1995) que se detalla como sigue: De cada árbol se tomaron muestras de 500 g de hojas sin pecíolo; 100 frutos verdes; y 100 semillas maduras, frescas y posteriormente descascaradas. Las muestras se secaron, primero al ambiente bajo sombra y después, en estufa a 40° C durante 48 h. Una vez secas, las hojas se molieron en molino eléctrico de rodillos (1/3 de HP), los frutos y semillas se molieron en mortero, hasta obtener un tamaño de partículas menor a 1 mm. Luego, a 3 g de polvo de cada uno de ellos, se les adicionó 15 ml de la mezcla metanol y agua (1:1) y se dejó remojando durante 24 h. Después de este periodo se separó la parte líquida de la sólida con una pipeta. Al líquido obtenido se le adicionó una cantidad igual de éter dietílico y se mezcló uniformemente. Pasados 10 minutos de reposo,

cuando se formaron dos capas, se extrajo la capa inferior para ser filtrada (filtro de 0.5 µm), a este extracto se le determinó el contenido de AZA.

### 3.1.5. Análisis de AZA por HPLC

El análisis y cuantificación de AZA se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la FAUANL utilizando el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, siglas en inglés), modelo Merck Hitachi D-6000 automático. El programa de análisis y procedimiento utilizado fue el recomendado por el Dr. Howard Williams de la Universidad de Texas A&M. Después de calibrar el equipo y correr el estándar de AZA, se procedió a determinar el contenido de AZA en cada muestra y cuantificarlo como el área bajo la curva del pico.

## 3.2. Efecto del Ambiente de Almacén y Período de Almacenamiento Sobre el Contenido de AZA en Hojas y Semillas de Nim

### 3.2.1. Area de Estudio

El experimento se estableció en Marín, N.L. (FAUANL) y Ebano, S.L.P. (INIFAP). El polvo de hojas se almacenó de junio a diciembre de 1996, mientras que las semillas, durante el período de octubre de 1996 a abril de 1997. Las características de los ambientes se presentan en el Cuadro 2.

CUADRO 2. Características de los ambientes donde se almacenaron las hojas y las semillas de nim.

Localidad	Localización		Clima	Temp. Media Anual (°C)	Pción. Total Anual (mm)	HR (%)
	LN	LW				
Marín, N.L.	25° 53'	100° 02'	Cálido Seco (BS <sub>1</sub> )	22	500	67
Ebano, S.L.P.	22° 12'	98° 23'	Cálido subhúm. [AW <sub>0</sub> (e)]	25	881	85
Refrigerador	25° 53'	100° 02'	Controlado	7	-	70

### 3.2.2. Tratamientos de Estudio

Este estudio se estableció con el objetivo de conocer el potencial de almacenamiento de la AZA contenida en hojas y semillas, en cuanto ambientes de almacén y tiempo de almacenamiento. A muestras obtenidas de 600 g de hojas sin peciolo y 300 g de semillas se les determinó la concentración de AZA. Enseguida, 72 unidades experimentales (UE) de 8 g de polvo de hoja y 48 UE de 85 semillas de nim, se almacenaron en frascos de vidrio con tapa perforada durante seis meses bajo tres condiciones de ambiente: (1) cálido seco en Marín, N.L., (2) cálido subhúmedo en Ebano, S.L.P, y (3) ambiente controlado (refrigeración a  $7 \pm 3^\circ \text{C}$  y  $70 \pm 5\%$  de HR). En Marín y Ebano, los frascos permanecieron dentro de un cuarto al ambiente natural. Posteriormente se hicieron análisis de la concentración de AZA a los 2, 4, y 6 meses de almacenamiento. Los tratamientos fueron distribuidos en forma completamente al azar, con seis replicas en los tratamientos de polvo de hoja, y cuatro en los de semillas.

### 3.2.3. Variables Analizadas

Se determinó el contenido de AZA en cada periodo de muestreo por ambiente de almacén. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente bajo un diseño factorial, donde el factor A fue el ambiente de almacén y el factor B el periodo de almacenamiento, su modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk} \quad \text{donde:}$$

- $Y_{ijk}$  = Observación de la  $i$ -ésimo ambiente de almacén (A) en el  $j$ -ésimo periodo de almacenamiento (B) en la  $k$ -ésima repetición.
- $\mu$  = Media general.
- $A_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo ambiente(A).
- $B_j$  = Efecto de  $j$ -ésimo periodo de almacenamiento (B)
- $(AB)_{ij}$  = Efecto de la interacción del nivel  $i$  de A y del nivel  $j$  de B.
- $E_{ijk}$  = Error experimental

La comparación de los valores medios de los tratamientos se efectuó mediante la prueba de DMS (5%).

#### **3.2.4. Preparación de Extractos de AZA y Análisis por HPLC**

La preparación de extractos y análisis de AZA se efectuó tal como se describe en las secciones 3.2.4. y 3.2.5.

### **3.3. Polvos y Extractos de Hojas y Semillas de Nim para el Control de *S. zeamais* y *Z. subfasciatus***

#### **3.3.1. Area de Estudio**

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Plagas de Productos Almacenados de la FAUANL, en Marín, N.L. y durante el período de mayo a octubre de 1997. El experimento se estableció en dos cámaras de crecimiento: (1) cámara ambiental (Ambi-hi-low serie 895-001) en la cual se condujo la prueba contra *S. zeamais* y en donde se mantuvo la temperatura a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$  y  $70 \pm 3\%$  de HR; y (2) cámara de fabricación manual, en donde se desarrolló la prueba contra *Z. subfasciatus* a  $27 \pm 4^\circ \text{C}$  y  $70 \pm 5\%$  de HR.

#### **3.3.2. Tratamientos de Estudio**

El bioensayo de laboratorio consistió en evaluar: dosis de AZA contenida en hojas y semillas de nim aplicada en forma de polvo y de extractos en proporciones de 0, 2, 4, 6 y 8% (peso/peso) contra los insectos de granos almacenados *S. zeamais* y *Z. subfasciatus* en granos de maíz y frijol, respectivamente. El contenido de AZA determinado en hojas fue de  $2.4 \mu\text{g/g}$ , mientras que el de las semillas fue de  $8.43 \mu\text{g/g}$  por peso seco.

La unidad experimental consistió de 100 g de granos sanos y enteros de

maíz y frijol, contenidos en frascos de vidrio de 235 ml con tapa plástica. A estos, se les aplicó el tratamiento correspondiente mezclando (el extracto o polvo) uniformemente con el grano mediante agitación manual. Inmediatamente después se realizó la infestación, introduciendo 20 insectos adultos con menos de una semana de edad. Los tratamientos se asignaron al azar dentro de la cámara ambiental con cuatro repeticiones. Las variables tomadas se analizaron a través de un diseño factorial, para los tratamientos de hoja y para los tratamientos de semilla, ajustándose al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

- $Y_{ijk}$  = Respuesta de la combinación de la  $i$ -ésima forma (A) en la  $j$ -ésima dosis (B) en la  $k$ -ésima repetición.  
 $\mu$  = Media general.  
 $A_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima forma de aplicación (A).  
 $B_j$  = Efecto de la  $j$ -ésima dosis (B).  
 $(AB)_{ij}$  = Efecto conjunto del nivel  $i$  de A y el nivel  $j$  de B.  
 $E_{ijk}$  = Error experimental.

La comparación de medias de tratamientos de la forma de aplicación fue a través de DMS (5%), mientras que las correspondientes a dosis a través de polinomios ortogonales.

### 3.3.3. Variables Analizadas

Las variables determinadas fueron: (1) mortalidad de insectos, (2) población total de insectos, y (3) porcentaje de daño al grano. La primera variable se midió a 1 día; la segunda a, 25, 60, 90 y 120 días en maíz y a 60, 90 y 120 días en frijol; y la tercera a 120 días, al término del experimento.

### 3.3.3.1. Mortalidad y población total de insectos

Para medir estas variables, se vació el contenido de la unidad experimental sobre una criba para separar el polvo del grano, posteriormente del polvo se separaron los insectos y se contó el número de vivos y muertos, éstos fueron eliminados en cada evaluación, excepto el día 1. Con los valores de los datos obtenidos, en cada fecha de evaluación, se obtuvo la siguiente información.

**Mortalidad.** En primera instancia, se obtuvo el porcentaje de mortalidad (% M) de cada parcela experimental, la cual se estimó de la siguiente manera:

$$\%M = (\text{Número de insectos muertos} / \text{población total}) (100)$$

Pero para obtener valores verdaderos del %M, se hizo la corrección de datos con la fórmula de Abbot, la cual se denomina mortalidad corregida (MC) y corrige la mortalidad en los tratamientos respecto al testigo, ocurrida en forma natural o por algún factor ajeno al efecto de tratamiento:

$$MC = (X - Y / 100 - Y) (100) \quad \text{donde:}$$

- MC = Mortalidad corregida
- X = Porcentaje de mortalidad en el tratamiento
- Y = Porcentaje de mortalidad en el testigo

Los datos de MC a su vez, para efecto de análisis de varianza, también se transformaron en ángulos Bliss (arco seno  $\sqrt{MC/100}$ ).

**Población Total.** Suma de insectos vivos y muertos en cada evaluación. Datos que, para análisis de varianza, fueron transformados a  $\sqrt{x+1}$

### 3.3.3.2. Porcentaje de daño al grano

Esta variable se evaluó a los 120 días. De cada unidad experimental formada por 100 g de granos, se separó y se pesó la cantidad de polvo y de grano picado producido por los insectos, valores que sumados forman la variable denominada porcentaje de daño al grano. Los valores se transformaron en ángulos Bliss ( $\arcsin \sqrt{\%/100}$ ) para fines de análisis estadístico.

### 3.3.4. Preparación de Tratamientos

*Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* se reprodujeron en frascos de vidrio conteniendo 5 kg de maíz o frijol, respectivamente. Para el establecimiento de las pruebas, se utilizaron insectos adultos de edad conocida. Para lo anterior fue necesario tamizar el grano infestado, separar todos los insectos adultos y luego retirarlos, para enseguida reanudar la cría en los frascos con insectos inmaduros. De aquí se obtuvieron insectos adultos jóvenes que se utilizaron en los bioensayos.

En las pruebas se utilizó maíz de la variedad Hualahuises y frijol de la variedad Pinto Americano, ambos con granos al inicio de la prueba, completamente sanos y enteros, con un contenido de humedad de 14.2% y 11.3%, respectivamente, medida con el determinador de humedad Steinlite 400G.

Las hojas y semillas utilizados en las pruebas, se obtuvieron de árboles de nim distribuidos en la FAUANL y de áreas cercanas. Las muestras después que se secaron, primero a la sombra y después en estufa a 40° C, fueron molidas finamente. Parte del polvo obtenido se utilizó para aplicarlo a los tratamientos correspondientes; el resto fue utilizado para obtener los extractos para los otros tratamientos. El contenido de AZA en hojas y semillas se realizó por el procedimiento que se indica en el apartado 3.1.4. y 3.1.5.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Contenido de Azadiractina (AZA) en Hojas, Frutos y Semillas de Árboles de Nim Establecidos en México

#### 4.1.1. Características de Árboles y Semillas de Nim

El análisis estadístico de las características de árboles y semillas entre localidades se muestra en el Cuadro 3. Los resultados indicaron efectos significativos ( $p < 0.05$ ) entre localidades en cuanto a diámetro ( $\emptyset$ ) de tallo, altura de árbol, ancho y peso de semilla. No hubo significancia para el largo de semilla.

CUADRO 3. Comparación de medias de las características de árboles y semillas de nim en tres localidades.

Localidad	Arbol			Semillas		
	Edad (años)	$\emptyset$ Tallo (cm)	Altura (m)	Largo (cm)	Ancho (mm)	Peso de 100
Marín	6	15.6 a	4.1 b	1.34	6.4 b	20.5 b
Tuxpan	6	16.7 a	7.0 a	1.47	7.0 ab	27.1 a
Córdoba	4	4.4 b	2.7 c	1.36	7.3 a	23.4 b
Promedio		13.8	4.2	1.37	6.9	23.2
p>F		0.0	0.0	0.07	0.01	0.02
CV (%)		18.9	12.8	4.9	5.6	12.9

Los valores en cada columna con la misma letra no son diferentes entre sí (DMS: 05).

Se observa que el diámetro de tallo y altura de los árboles osciló de 4.4 a 16.7 cm y de 2.7 a 7.0 m, respectivamente, con diferencia entre localidades. Los árboles de nim ubicados en Córdoba, presentaron menor altura (2.7 m) y menor diámetro de tallo (4.4 cm) debido a la menor edad; los de Marín fueron de menor altura (4.1 m) que los de Tuxpan (7.0 m) por las óptimas condiciones de

temperatura y humedad en esta última localidad, pero sin diferencia estadística en cuanto al grosor del tallo (15.6 cm y 16.7 cm, respectivamente).

El tamaño de semilla promedio, medido como: largo, ancho y peso de 100 semillas, fue de 1.37 cm, 6.9 mm y 23.2 g en el mismo orden. No se encontraron diferencias significativas entre localidades en el largo de las semillas, aunque las de Tuxpan fueron más alargadas (1.47 cm) que las de Córdoba (1.36 cm) y Marín (1.34 cm). Respecto al ancho de semilla, se observó que las de Córdoba fueron las más anchas (7.3 mm), contrario a las de Marín que son angostas (6.4 mm); mientras que las de Tuxpan, con un ancho de 7.0 mm se ubican en el promedio. En cuanto al peso de 100 semillas, las cosechadas de árboles ubicados en Tuxpan de clima cálido subhúmedo, fueron significativamente las de mayor peso (27.1 g) comparadas a las obtenidas en Córdoba (23.4 g) y Marín (20.5 g).

Los árboles de Córdoba (clima semicálido húmedo) son los de menor diámetro de tallo y altura, pero también tenían menor edad; el tamaño de las semillas estaba cerca del promedio. Los árboles de Marín (clima cálido seco) eran de altura baja, de grueso tallo y producían semillas pequeñas, alargadas, angostas y de menor peso. Por el contrario, los árboles de Tuxpan eran altos, de tallo grueso, y producían semillas alargadas, anchas y pesadas.

#### 4.1.2. Efecto de la Localidad y Etapa Fenológica en el Contenido de AZA en Hojas.

El análisis estadístico de los contenidos de AZA en hojas de nim, mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre localidades, entre etapas fenológicas y en la interacción de estos factores (Cuadro A.1. del Apéndice). La comparación de los promedios de la interacción entre etapas fenológicas y localidades se muestra en el Cuadro 4 y su representación gráfica en la Fig. 1.

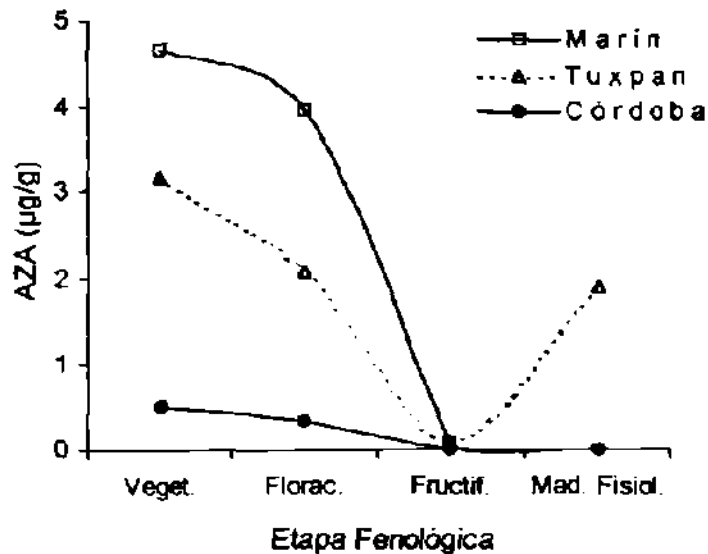
El efecto de ambiente en cada etapa fenológica fue observado en Marín y Tuxpan, donde existió una disminución del contenido de AZA en las hojas a partir de la etapa vegetativa, a floración y fructificación, para volver a

incrementarse ligeramente durante el periodo de maduración de frutos, cuando las semillas alcanzaron su madurez fisiológica.

**CUADRO 4.** Contenido de AZA ( $\mu\text{g/g}$ ) en hoja, fruto y semilla de nim por localidad.

Localidad	Hoja					Fruto	Semilla
	Vegetat.	Floración	Fructific.	Mad. Fisiol.	Prom.		
Marín	4.65 a(a)	3.97 a(a)	0.07 a(b)	0.09 b(b)	2.19	0.0	9.00 a
Tuxpan	3.17 b(a)	2.09 b(ab)	0.08 a(c)	1.91 a(b)	1.81	0.0	8.38 a
Córdoba	0.50 c(a)	0.34 c(a)	0.00 a(a)	0.00 b(a)	0.21	0.0	4.74 b
Promedio	2.71	2.14	0.04	0.48		0.0	
CV (%)					30.9		21.5

Los valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letras dentro de paréntesis), no son diferentes entre sí (DMS: 05).



**FIGURA 1.** Contenido de AZA en hojas de nim por etapa fenológica y localidades.

En las etapas vegetativa y de floración, las hojas de árboles de Marín contenían mayor AZA que las de Tuxpan y Córdoba. En la etapa de fructificación, los contenidos de AZA en las hojas fueron muy bajos y no

mostraron diferencias entre localidades. En la etapa de madurez fisiológica, fueron los árboles de Tuxpan los que registraron mayor contenido de AZA en las hojas (1.91 µg/g); menores valores se registraron en las hojas de árboles de Marín (0.09 µg/g) y Córdoba (0.0 µg/g). Por otra parte, en los árboles de nim ubicados en Córdoba, los contenidos de AZA en las hojas en todas las etapas fenológicas fueron cercanos a cero, incluso en la de fructificación y madurez fisiológica la sustancia no apareció; por lo que no existieron diferencias significativas entre etapas fenológicas en esta localidad.

#### 4.1.3. Efecto de la Localidad en el Contenido de AZA en Frutos y Semillas.

Los contenidos de AZA en frutos verdes y semillas de nim determinados en cada localidad también se incluyen en el Cuadro 4. Los datos indicaron diferencias no significativas entre localidades en el contenido de AZA en los frutos, debido a que no se encontró AZA en frutos de ninguna localidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rengasamy y Parmar (1994), Yakkundi *et al.* (1995) y Johnson *et al.* (1996), los cuales tampoco detectaron AZA en frutos en este estado de crecimiento. En cuanto al contenido de AZA en semilla (Cuadro 4), se encontró que el contenido se incrementó a partir de que los frutos maduraron y las semillas alcanzaron la madurez fisiológica; observándose altos niveles de AZA (4.74 a 9.00 µg/g) en comparación con los obtenidos en las hojas (0.0 a 4.65 µg/g) y en los frutos (0.0 µg/g).

Se observó que existieron diferencias significativas entre localidades en cuanto al contenido de AZA en semillas. El mayor contenido fue registrado en semillas de árboles establecidos en Marín (9.0 µg/g), siendo estadísticamente igual al contenido encontrado en los de Tuxpan (8.38 µg/g). El contenido de AZA mas bajo, y diferente significativamente a los otros dos, se observó en semillas provenientes de árboles de Córdoba (4.74 µg/g).

Los resultados, afines con los obtenidos por Ermel *et al.* (1987) y Singh (1987), muestran que los contenidos de AZA varían por efecto del área geográfica; y que, como lo mencionan Singh (1987), y Rengasamy y Parmar

(1995), la AZA decrece por efecto de la alta humedad relativa y temperatura, condiciones que se presentan en climas cálidos húmedos y semicálidos húmedos, como es el caso de Tuxpan y Córdoba. Mientras que en las áreas cercanas al desierto, como la localidad de Marín donde impera el clima cálido seco, las semillas tienden a almacenar mayor contenido de AZA, como sucedió en este estudio.

La AZA es una sustancia del metabolismo secundario que pertenece al grupo químico de los terpenoides (triterpenoides). De acuerdo a Domínguez (1980) son sustancias de complejidad variable, elaboradas en procesos de asimilación o de eliminación en el metabolismo de plantas que a menudo se ignoran, por lo cual se les llama metabolitos secundarios. Para Bidwell (1993), esta sustancia al igual que muchas otras, es almacenada en las hojas durante la etapa vegetativa, debido a que el árbol se encuentra en latencia. Una vez que se da el estímulo floral, la latencia se interrumpe y el árbol entra en actividad metabólica, requiriendo de las sustancias almacenadas para utilizarlas durante la floración, y la formación y llenado de frutos. Por lo cual, el contenido de AZA disminuye significativamente en las hojas y no se detecta en los frutos verdes, para ser llevada y almacenada en las semillas a partir de que éstas alcanzan la madurez fisiológica. Una vez que el árbol produce la semilla, entra en latencia y la sustancia nuevamente se almacena en las hojas.

El hecho de que en Marín se registraron los mayores contenidos de AZA tanto en las hojas como en las semillas, se debe a que la etapa vegetativa de los árboles ocurre durante la temporada fría (octubre a marzo), situación que favorece la latencia y con ello el almacenamiento de mayor cantidad de AZA que en las otras localidades. En cambio, en climas tropicales y semicálidos, con alta precipitación y temperaturas estables, la latencia no se presenta en gran magnitud, permitiendo que la actividad metabólica continúe, situación que ocasiona que la AZA se almacene en menor cantidad, puesto que es utilizada para el metabolismo continuo del árbol de nim, como lo muestran los menores contenidos de AZA en las hojas y semillas, tanto en Tuxpan como en Córdoba.

Las variables morfológicas del árbol (diámetro de tallo y altura) y de las

semillas (largo y ancho) de nim, se correlacionaron con el contenido de AZA en las hojas en las diferentes etapas fenológicas y con el de AZA en la semilla; los resultados de estos análisis se muestran en el Cuadro 5.

**CUADRO 5. Coeficientes de correlación (r) entre contenidos de AZA y variables observadas en el árbol y semilla de nim.**

Variable	AZA en Hoja				AZA en Semilla
	Vegetat.	Floración	Fructific.	Mad. Fisiol.	
<b>Arbol</b>					
Ø tallo	0.8438 **	0.7784 **	0.3125 ns	0.1818 ns	0.6924 **
Altura	0.4497 ns	0.3492 ns	0.2228 ns	0.5057 ns	0.4896 ns
<b>Semilla</b>					
Ancho	-0.8016 **	-0.8885 **	-0.3735 ns	0.0382 ns	-0.6891 **
Largo	-0.0859 ns	-0.3299 ns	-0.0874 ns	0.5043 ns	-0.0344 ns
Peso	0.0065 ns	-0.0670 ns	0.0900 ns	0.5454 ns	0.1620 ns
AZA	0.8789 **	0.8667 **	0.7423 **	0.5477 ns	

ns = correlación no significativa; \*\* = correlación significativa; n = 13

Se encontró que el contenido de AZA en las hojas durante la etapa vegetativa y de floración, y el contenido de AZA en las semillas tuvo correlación positiva con el diámetro de tallo de los árboles, y negativa con el ancho de semilla. También existió correlación positiva del contenido de AZA en la semilla con el contenido de AZA en las hojas en las etapas, vegetativa, de floración y de fructificación. Por el contrario, la altura del árbol y peso de semilla, no tuvo ninguna correlación con el contenido de AZA en hojas, ni en semillas.

Las variaciones en las características de los árboles y de semillas, y su relación con el contenido de AZA en este estudio preliminar son atribuibles al efecto de ambiente, dado las grandes diferencias entre localidades, el cual influye sobre los caracteres más susceptibles al efecto de ambiente, como los procesos metabólicos en el cual se incluye a la AZA. Sin embargo, también debe considerarse lo que indica Veerendra (1995), de que las variaciones pueden ser genéticas y que dependen de su origen o procedencia. Los árboles de este estudio provienen de semilla sexual y de diferente procedencia, al menos los de Córdoba, por lo cual puede existir variación entre ellos. De

acuerdo a Falconer (1975) el comportamiento de un genotipo va a depender de lo heredado por su progenitor y del ambiente local, de tal modo que siempre existe interacción genética ambiental, el cual es un fenómeno universal. Cuando la heredabilidad de un genotipo es baja, la correlación fenotípica se da principalmente por la correlación ambiental. Si esta es alta, la manera de eliminar el efecto de interacción, sería mediante la obtención de genotipos idénticos. En el caso del nim sería a partir de plantas clonales (reproducción asexual), lo cual se sugiere efectuarlas en el futuro.

#### **4.2. Efecto del Ambiente de Almacén y Período de Almacenamiento Sobre el Contenido de AZA en Hojas y Semillas de Nim**

El análisis de varianza de los datos del estudio, mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del efecto de ambiente de almacén, del periodo de almacenamiento, y del efecto conjunto de ambos factores sobre el contenido de AZA en hojas y semillas (Cuadro A.2. del Apéndice).

Los contenidos de AZA en hojas y semillas de nim en cada ambiente de almacén y período de almacenamiento se muestran en el Cuadro 6. Al iniciar el almacenamiento el contenido de AZA era de 1.869 ( $\mu\text{g/g}$ ) y 9.345 ( $\mu\text{g/g}$ ), en hojas y semillas, respectivamente.

En todas las condiciones de almacenamiento probadas se presentó una disminución drástica del contenido de AZA en muy corto tiempo, particularmente en las hojas (Fig. 2). En Marín y Ebano, la pérdida de AZA en hoja fue casi total a dos meses de almacenamiento (0.032  $\mu\text{g/g}$  y 0.052  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente) con un 98.3% y 97.2% de reducción, en ambos casos, esta reducción fue lineal. Mientras que bajo refrigeración la reducción fue del 60.1% en el mismo periodo, y a los cuatro meses de 96.4%; disminución que tuvo una tendencia lineal cuadrática. Aunque estadísticamente el ambiente de refrigeración superó a Marín y Ebano, a los dos meses de almacenamiento, fue un hecho de que la cantidad de AZA mantenida fue insignificante y los porcentajes de pérdida fueron muy altos.

CUADRO 6. Contenido de AZA ( $\mu\text{g/g}$ ) en hojas y semillas de nim y porcentajes de reducci3n ocurrida cada dos meses de almacenamiento en tres ambientes de almac3n.

Ambiente	Almacenamiento (meses)						
	0	2		4		6	
	AZA	AZA	%	AZA	%	AZA	%
<b>Hojas</b>							
Marin (Cal. seco)	1.869	0.032 b	98.3	0.000 a	100	0.000 a	100
Ebano (Cal. subhúm)	1.869	0.052 b	97.2	0.000 a	100	0.000 a	100
Refrigerador	1.869	0.746 a	60.1	0.067 a	96.4	0.000 a	100
<b>Semillas</b>							
Marin (Cal. seco)	9.345	5.945 b	36.4	1.593 b	82.9	0.026 a	99.7
Ebano (Cal. subhúm)	9.345	3.765 c	59.7	0.357 c	96.2	0.000 a	100
Refrigerador	9.345	6.986 a	25.2	2.414 a	74.2	0.357 a	96.2

Los valores en cada columna con la misma letra no son diferentes entre sí (DMS: 05).

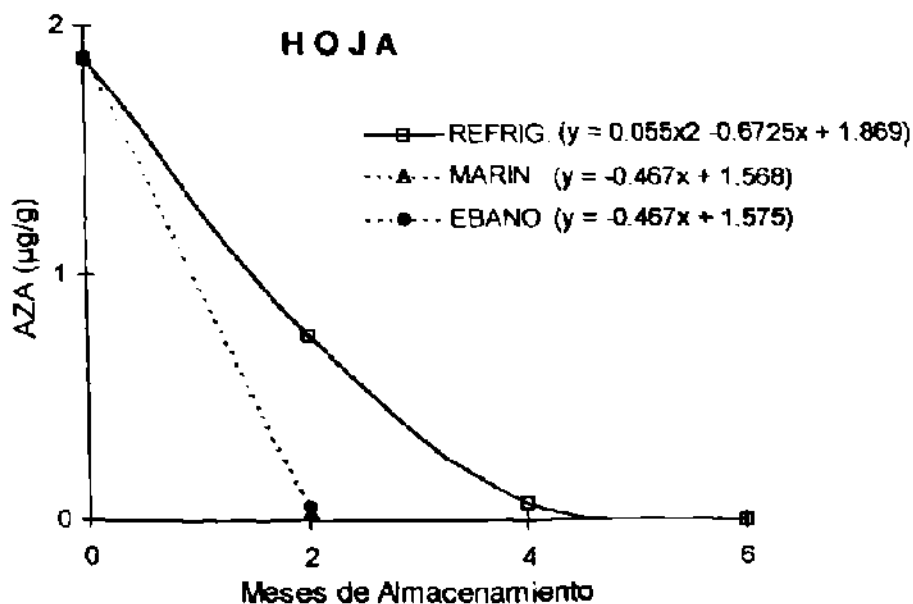


FIGURA 2. Contenido de AZA en hojas de nim almacenadas durante seis meses en tres ambientes.



El contenido de AZA en semilla, también sufrió una reducción drástica y significativa en cada período de almacenamiento y en cada ambiente de almacén. En refrigeración la disminución fue más lenta (Fig. 3); los porcentajes de reducción respecto al nivel inicial fueron de 25.2% y 74.2% a los dos y cuatro meses, respectivamente. En ambiente natural y en los mismos períodos, los porcentajes de reducción fueron mayores: 36.4% y 82.9% en Marín; y 59.7%, y 96.2% en Ebano. A seis meses de almacenamiento, la reducción fue casi en los tres ambientes. La disminución de AZA en los tres ambientes ocurrió en forma lineal cuadrática, y los modelos matemáticos indicaron que las reducciones de AZA fueron en el siguiente orden: Ebano>Marín>Refrigeración.

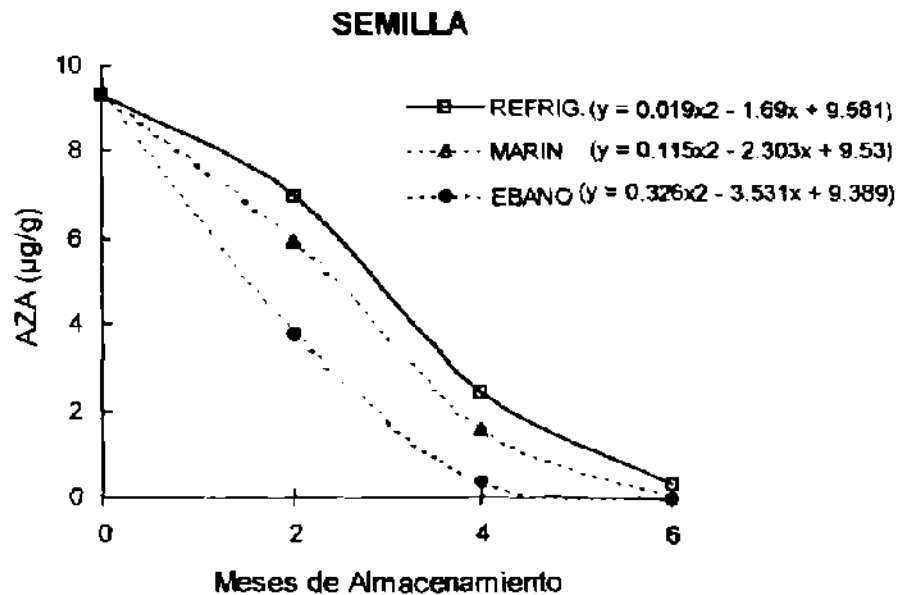


FIGURA 3. Contenido de AZA en semillas de nim almacenadas durante seis meses en tres ambientes.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ermel *et al.* (1987) y Johnson *et al.* (1996), quienes citan que la disminución de AZA en semillas se favorece en condiciones de alta temperatura y alta humedad relativa; con una pérdida total en menos de seis meses de almacenamiento. En los ambientes

naturales de este estudio, se presentó mayor HR y temperatura en Ebano que en Marín, en los dos períodos de almacenamiento de hojas y semillas (Cuadro 7); sin embargo la reducción de AZA en ambos ambientes fue muy similar, no existiendo diferencias entre ellas. Por lo cual tales condiciones son inapropiadas para conservar la AZA y requiere de mejores ambientes de almacén.

La AZA es una sustancia difícil de conservar (Yakkundi *et al.* 1995), aún bajo condiciones controladas de refrigeración, como lo demostró esta investigación, por lo que se requiere de estudios para mejorar las formas y condiciones de almacenamiento.

CUADRO 7. Humedad relativa (HR) y temperatura (°C) ocurrida en Marín y Ebano, durante seis meses de almacenamiento de hoja y semilla de nim.

Meses	Hoja				Meses	Semilla			
	HR		°C			HR		°C	
	Marín	Ebano	Marín	Ebano		Marín	Ebano	Marín	Ebano
Jun	75.0	78.9	30.7	30.5	Oct	76.2	77.5	23.1	26.4
Jul	74.6	79.5	31.2	29.5	Nov	74.4	76.4	18.7	23.9
Ago	76.7	85.3	28.9	28.4	Dic	74.6	80.1	15.8	19.7
Sep	78.6	83.1	27.6	28.6	Ene	75.6	79.5	13.4	19.4
Oct	76.2	77.5	23.1	26.4	Feb	75.9	81.3	15.5	21.6
Nov	74.4	76.4	18.7	23.9	Mar	70.8	82.5	20.4	24.6
Prom.	75.9	80.1	26.7	27.9		74.6	79.5	17.8	22.6

#### 4.3. Polvos y Extractos de Hojas y Semillas de Nim para el Control de *S. zeamais* y *Z. subfasciatus*

##### 4.3.1. Daño a los Granos de Maíz y Frijol.

Se midió el porcentaje de daño al grano de maíz y al frijol ocasionado por los gorgojos a 120 días de almacenamiento. Los datos fueron convertidos a ángulos Bliss para efectuar el análisis estadístico.

#### 4.3.1.1. Polvos y extractos de hojas

Los resultados obtenidos indicaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) en los tratamientos de hoja: forma de aplicación (polvo, extracto); dosis (0, 4.8, 9.6, 14.4 y 19.2  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano) de hojas de nim y sus interacciones, en las dos especies de grano (Cuadro A.3. del Apéndice). Por lo tanto, los resultados de la aplicación de polvos y de extractos de hojas y en las dosis probadas al término de 120 días de prueba, son explicados basados en la interacción.

El porcentaje de daño al grano de maíz y de frijol, y la comparación entre tratamientos de nim se muestra en el Cuadro 8. La comparación de tratamientos a través de polinomios ortogonales para conocer la tendencia de su efecto, se muestra en el Cuadro A.5. del Apéndice y gráficamente en la Fig. 4.

Se observó que el porcentaje de daño en donde no se aplicó tratamientos de nim (dosis 0%) osciló de 26.0 a 30.5% en maíz, y de 62.7 a 69.1% en el frijol, y que los tratamientos de extractos de hoja, tuvieron mayor efecto que los tratamientos de polvo sobre la reducción de daño en ambos tipos de grano: en maíz la diferencia significativa ocurrió a partir de las dosis de 14.4  $\mu\text{g}$  de AZA, y en frijol a partir de la aplicación de 9.6  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano.

La aplicación de polvo de hoja a los granos de maíz y frijol, en sus diferentes dosis (4.8 a 19.2  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano) no mostraron diferencias entre ellos, y las tendencias a través de polinomios ortogonales no fueron significativas en el caso de maíz, y solo lineal en el de frijol (Fig. 4). Tales dosis no tuvieron ningún efecto sobre la disminución del daño, incluso los daños fueron superiores al testigo: 28.7 a 30.2% en maíz, y de 65.6 a 68.8% en frijol.

En el caso de los extractos de hoja de nim, el daño fue menor a medida que se incrementó la dosis con una tendencia lineal cuadrática en maíz y lineal, cuadrática y cúbica en frijol (Fig. 4). En maíz, los tratamientos redujeron el daño al grano de 30.1 a 10.1% a medida que se incrementó la dosis. Respecto al daño en frijol, existió diferencia entre dosis y el menor daño también fue en la medida que la dosis se incrementó. Sin embargo se observó que cuando la

dosis se aumentó a 14.4 y 19.2  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano, los daños fueron de 5.3% o menos. Estos tratamientos tuvieron un eficiente control de insectos desde los 60 días de iniciada la prueba.

CUADRO 8. Porcentaje de daño al grano de maíz y de frijol tratados con polvo y extracto de hoja de nim con diferentes dosis de AZA.

Dosis		Hoja	
% (peso/peso)	AZA ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Polvo	Extracto
<b>Maiz</b>			
0	0.0	26.0 b (b)	30.5 a (b)
2	4.8	30.2 a (a)	30.1 a (a)
4	9.6	28.7 ab (a)	29.4 a (a)
6	14.4	29.1 ab (a)	19.6 b (b)
8	19.2	29.4 a (a)	10.1 c (b)
<b>Frijol</b>			
0	0.0	62.7 b (b)	69.1 a (a)
2	4.8	65.6 ab (b)	63.7 a (b)
4	9.6	67.4 ab (a)	40.3 b (b)
6	14.4	66.2 ab (a)	5.3 c (b)
8	19.2	68.8 a (a)	0.7 d (b)

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis) no son diferentes entre sí (DMS: 05).

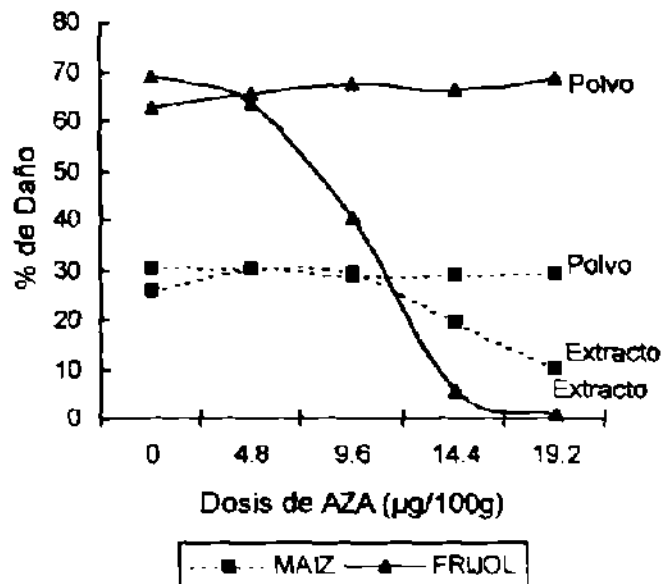


FIGURA 4. Daño al grano de maíz y frijol tratado con polvo y extracto de hoja de nim.

#### 4.3.1.1. Polvos y extractos de semilla

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) de la aplicación de semilla de nim en las fuentes de variación: forma (polvo y extracto), dosis (0, 16.86, 33.72, 50.58 y 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano) y su interacción, sobre el daño en las dos especies de grano (Cuadro A.4. del Apéndice).

El daño expresado en porcentaje tanto en granos de maíz como en granos de frijol y la comparación de tratamientos se muestra en el Cuadro 9, mientras que el efecto de tratamientos a través de polinomios ortogonales para conocer la tendencia de la respuesta en el Cuadro A.5. del Apéndice, en forma gráfica en la Fig. 5.

Se encontró que el porcentaje de daño en los testigos (dosis 0%) varió de 28.2 a 29.9% en maíz, y de 66.1 a 66.7% en el frijol. Los tratamientos que recibieron el polvo de semilla presentaron menor daño en los granos que en los tratamientos donde se aplicaron los extractos de semilla: en maíz se presentó menor daño bajo dosis de 16.86 a 50.58  $\mu\text{g}$ , y en frijol de 16.86 y 33.72  $\mu\text{g}$  de AZA. En frijol, la dosis alta de AZA (67.44  $\mu\text{g}$ ) del polvo de semilla superó estadísticamente al extracto, sin embargo el daño al grano es mínimo por lo que se considera que ambos tratamientos tuvieron buen control.

Los tratamientos de semilla de nim como fuente insecticida en forma de polvo y extracto, brindaron eficiente protección y tuvieron, en forma significativa menor daño a los granos atribuibles al mayor contenido de AZA aplicada.

Con polvo de semilla, existió diferencia entre los tratamientos de AZA, éstos respondieron en forma lineal cuadrática y cúbica sobre granos de maíz y frijol (Fig. 5). A partir de dosis de 16.86  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano, los porcentajes de daño se redujeron a 5.3% o menos en maíz; y a menos de 1.3% en frijol. Tales dosis tuvieron una protección eficiente de los granos, observándose sanos y enteros físicamente.

CUADRO 9. Porcentaje de daño al grano de maíz y de frijol tratados con polvo y extracto de semilla de nim con diferentes dosis de AZA.

Dosis		Semilla	
% (peso/peso)	AZA ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Polvo	Extracto
<b>Maíz</b>			
0	0.0	29.9 a (a)	28.2 a (a)
2	16.86	5.3 b (b)	10.1 b (a)
4	33.72	1.8 c (b)	3.6 c (a)
6	50.58	0.0 d (b)	0.6 d (a)
8	67.44	0.0 d (a)	0.0 e (a)
<b>Frijol</b>			
0	0.0	66.7 a (a)	66.1 a (a)
2	16.86	1.3 b (b)	28.5 b (a)
4	33.72	0.6 c (b)	5.7 c (a)
6	50.58	0.6 c (a)	0.1 d (b)
8	67.44	0.7 c (a)	0.1 d (b)

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis) no son diferentes entre sí (DMS: 05).

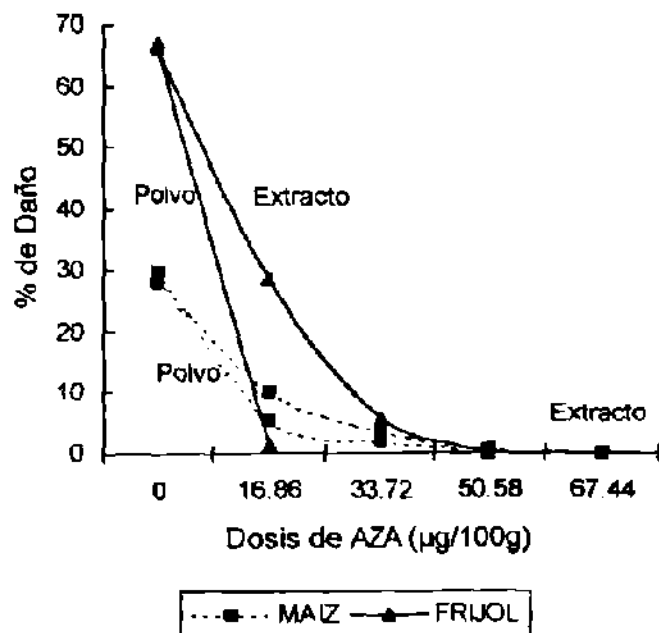


FIGURA 5. Daño al grano de maíz y frijol tratado con polvo y extracto de semilla de nim.

Por otra parte, las dosis de AZA de los extractos de semilla también presentaron diferencias entre tratamientos, su efecto fué lineal cuadrática en los granos de maíz y lineal cuadrática y cúbica en los de frijol (Fig. 5).

Su efectividad se manifestó cuando fueron aplicados en dosis de 33.72 µg de AZA en 100 g de grano, reduciendo los daños a 3.6% o menos en maíz y a 5.7% o menos en frijol. Con esta dosis se logró una eficiente protección de los granos, manteniendo la población de insectos controlada y de la misma manera a los granos sanos y enteros físicamente.

#### 4.3.2. Mortalidad de Insectos

Se evaluó el porcentaje de mortalidad de los gorgojos *S. zeamais* y *Z. subfasciatus* a un día después de la aplicación de los tratamientos de nim. Los porcentajes corregidos fueron transformados a ángulos Bliss para realizar el análisis de varianza.

##### 4.3.2.1. Mortalidad de insectos bajo tratamientos de hoja de nim

El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre los niveles ( $p < 0.01$ ) de los factores probados: forma de aplicación (polvo, extracto); dosis (0, 4.8, 9.6, 14.4 y 19.2 µg de AZA/100 g de grano) y su interacción sobre la mortalidad de *S. zeamais*. Por el contrario, los tratamientos de hoja no afectaron significativamente la mortalidad de *Z. subfasciatus* a un día de aplicación (Cuadro A.6. del Apéndice).

Los porcentajes de mortalidad en ambos insectos, tratados con polvos y extractos de hojas de nim, y la comparación entre sus dosis se encuentran en el Cuadro 10; las tendencias de respuesta de los tratamientos a través de polinomios ortogonales en el Cuadro A.8. del Apéndice y gráficamente en la Fig. 6.

Los datos obtenidos mostraron que los tratamientos de hoja, tanto polvos como extractos, ocasionaron baja mortalidad en los insectos; y que los extractos

causaron mayor mortalidad que el polvo de hoja, solo en el caso de *S. zeamais* de manera significativa.

CUADRO 10. Porcentaje de mortalidad corregida en *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* después de 1 día de aplicar polvo y extracto de hoja de nim con diferentes dosis de AZA.

Dosis		Hoja	
% (peso/peso)	AZA ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Polvo	Extracto
<i>S. zeamais</i>			
0	0.0	-	-
2	4.8	0.0 a (b)	1.2 c (a)
4	9.6	0.0 a (b)	10.2 b (a)
6	14.4	0.0 a (b)	22.1 a (a)
8	19.2	0.0 a (b)	12.9 b (a)
<i>Z. subfasciatus</i>			
0	0.0	-	-
2	4.8	7.6 a (a)	2.1 a (a)
4	9.6	3.0 a (a)	4.2 a (a)
6	14.4	4.5 a (a)	4.1 a (a)
8	19.2	4.5 a (a)	6.5 a (a)

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis), no son diferentes entre sí (DMS: 05).

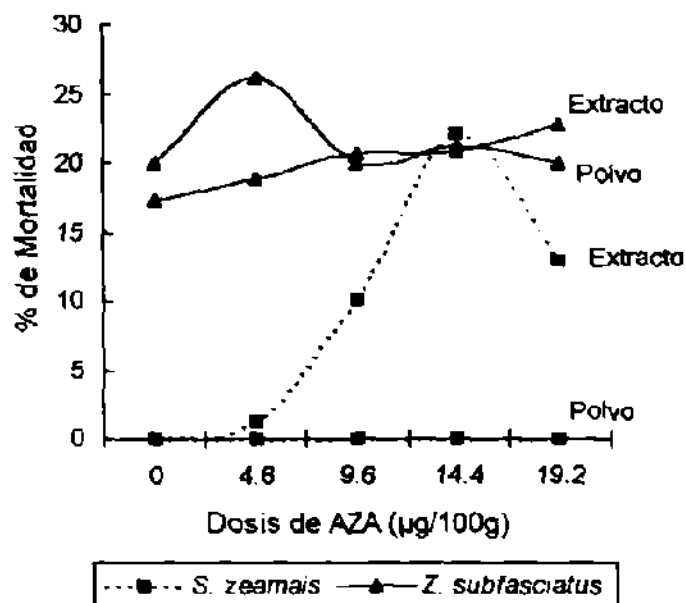


FIGURA 6. Mortalidad (no corregida) de *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* a 1 día de muestreo bajo diferentes dosis de polvo y extractos de hoja de nim.



En maíz, todos los tratamientos de polvo de hojas aplicados a los granos contenían el mismo número de *S. zeamais* vivos establecidos al inicio de la prueba, por lo cual existió cero mortalidad; cuando se aplicó extractos de hoja, se registraron diferencias significativas entre tratamientos y la mortalidad se incrementó con la dosis de manera lineal-cuadrática. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad fue menor al 22%, por lo que se considera que los tratamientos no tuvieron efectividad inmediata sobre los insectos (Fig. 6).

Respecto a *Z. subfasciatus*, este no fue afectado significativamente por los tratamientos de polvo y extracto de hoja. El porcentaje máximo de mortalidad (corregida) de los tratamientos fue de 7.6 y 6.1%, con polvo y extracto de hoja, respectivamente; mientras que en el testigo la mortalidad real fue entre 20 y 17.3%, en el mismo orden. Los porcentajes altos de mortalidad en esta especie ocurren normalmente en forma natural, debido a su sensibilidad al manipuleo.

#### 4.3.2.2. Mortalidad de insectos bajo tratamientos de semilla de nim

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) sobre la mortalidad de *S. zeamais* en cuanto a la forma de aplicación (polvo, extracto) y dosis probadas (0, 16.86, 33.72, 50.58 y 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano), no siendo así para la interacción. Por otra parte, para *Z. subfasciatus* la forma, dosis y su interacción afectaron significativamente el porcentaje de mortalidad (Cuadro A.7. del Apéndice).

Los porcentajes de mortalidad de ambas especies y comparación entre dosis se muestran en el Cuadro 11, la tendencia de respuesta de los tratamientos a través de polinomios en el Cuadro A.8 del Apéndice; y gráficamente en la Fig. 7.

Se encontró que los tratamientos de semilla, en forma de polvo y extracto brindaron eficiente protección y causaron, en forma significativa mayor mortalidad en los insectos dado el mayor contenido de AZA en la semilla y consecuentemente mayor cantidad de AZA aplicada.

CUADRO 11. Porcentaje de mortalidad corregida de *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* después de 1 día de aplicar polvo y extracto de semilla de nim con diferentes dosis de AZA.

Dosis		Semilla		
% (peso/peso)	AZA ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	Polvo	Extracto	Promedio
<i>S. zeamais</i>				
0	0.00	-	-	-
2	16.86	0.0	0.0	0.0 c
4	33.72	7.5	2.5	5.0 b
6	50.58	13.7	3.7	8.7 b
8	67.44	100.0	98.7	99.3 a
		30.3 (a)	26.2 (b)	
<i>Z. subfasciatus</i>				
0	0.00	-	-	-
2	16.86	6.1 b (a)	4.1 c (a)	
4	33.72	29.1 a (a)	12.3 b (b)	
6	50.58	40.0 a (a)	19.9 b (b)	
8	67.44	44.1 a (a)	49.8 a (a)	

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis), no son diferentes entre si (DMS: 05).

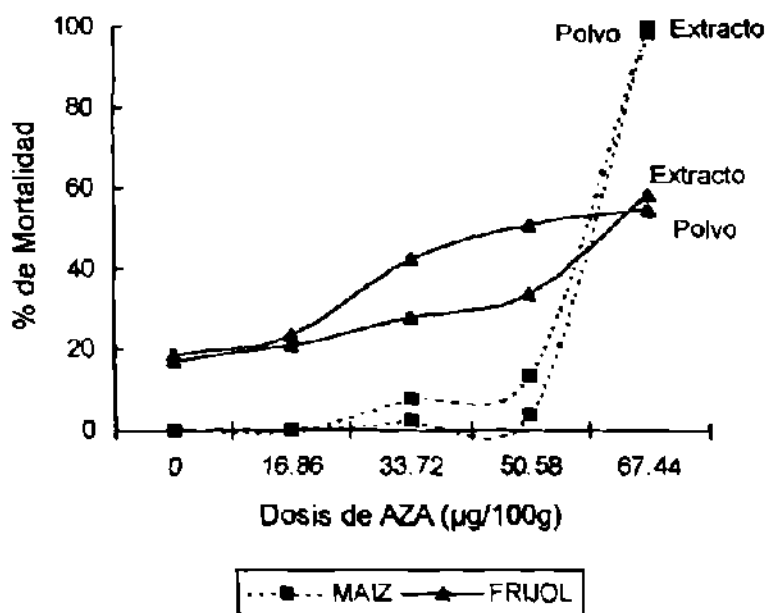


FIGURA 7. Mortalidad (no corregida) de *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* a 1 día de muestreo bajo diferentes dosis de polvo y extractos de semilla de nim.

En maíz, la aplicación de polvo causó mayor mortalidad de *S. zeamais* que los extractos de semilla; y las dosis de AZA difirieron significativamente entre ellas, provocando un efecto lineal cuadrático y cúbico sobre la mortalidad (Fig. 7) y aumentando la mortalidad a mayor cantidad de AZA. Se observó que, los tratamientos con polvo y extractos fueron efectivos de manera inmediata y desde el punto de vista de aplicación práctica, cuando se aplicaron en dosis más alta provocando mortalidades mayores en promedio al 99.3% en los insectos. En otras dosis la mortalidad fue de 8.7% o menos.

En cuanto a la mortalidad (corregida) ocurrida en *Z. subfasciatus*, esta aumentó significativamente con la dosis, y su efecto fue en forma lineal cuadrática para las dosis con polvo y lineal para las de extracto de semilla. Pero los porcentajes obtenidos fueron de 44.1% con polvo y 49.8% con extractos y menores, considerándose que tuvieron baja actividad inmediata sobre la mortalidad de los insectos. Aquí también se observó alto porcentaje de mortalidad de *Zabrotes subfasciatus* en el testigo (18.7 y 17.5%, en polvo y extracto de semilla, respectivamente), situación ya mencionada anteriormente.

#### 4.3.3. Población de Insectos (Emergencia)

Se registró la población de insectos adultos (vivos y muertos) del gorgojo del maíz a 25, 60, 90 y 120 días y del gorgojo pinto del frijol a 60, 90 y 120 días. Los datos fueron transformados a  $\sqrt{x+1}$  para realizar el análisis estadístico. Esta variable tuvo como propósito medir la efectividad de los tratamientos en la reducción de la población de insectos o su menor emergencia comparada con el testigo. En los tratamientos donde el efecto de dosis resultó significativo, la tendencia de la respuesta se hizo a través de polinomios ortogonales (Cuadro A. 13 del Apéndice) y DMS al 5%. La forma de aplicación (polvos y extractos) a través de la prueba de DMS al 5%.

#### 4.3.3.1. Población de *S. zeamais* bajo tratamientos de hoja de nim

El análisis de varianza de la población de *S. zeamais* mostró efectos significativos en los siguientes factores y períodos de evaluación: forma (extracto, polvo) en los cuatro períodos de evaluación; entre dosis en las evaluaciones de 60, 90 y 120 días; y significancia en la interacción sólo en la evaluación efectuada a 90 días (Cuadro A.9. del Apéndice). La población y los porcentajes de población relacionados al testigo en cada dosis de polvo y extracto de hoja de nim se muestra en el Cuadro 12.

En los granos de maíz y en la evaluación realizada a los 25 días, se encontró que no existió diferencia significativa en la población de *S. zeamais* entre los tratamientos de hoja y extractos en comparación con el testigo; incluso algunos tratamientos presentaron mayor población que el testigo, por lo cual no existió ningún control. Sin embargo, en los tratamientos con extracto se registró en forma significativa menor población de insectos que en los tratamientos con polvo de hoja.

Mayor cantidad de insectos se registró a partir de las evaluaciones efectuadas a los 60 días de iniciada la prueba. En esta evaluación, existió diferencia significativa entre dosis y forma de aplicación, no hubo efecto de interacción. El número de insectos presentes entre tratamientos varió significativamente entre dosis, en promedio la población fue entre 30 y 50 insectos, incluso en un tratamiento la población fue mayor a la registrada en el testigo, las mortalidades ocurridas fueron entre 69 y 115%. Aunque existió diferencia entre dosis y estas afectaron a la población en forma lineal a medida que la misma aumentó, la población de insectos fue alta y altos los porcentajes de población comparados con el testigo, por lo cual se consideró que los tratamientos tuvieron poco efecto sobre los insectos. En este período persistió el mayor efecto de extractos sobre el polvo de hojas en forma significativa.

En evaluación a 90 días existió efecto de interacción de dosis y formas de aplicación de tratamientos de hoja, sin embargo la población de insectos y porcentajes de emergencia fueron altos. La emergencia osciló de 108 a 153%

en los tratamientos de polvo y de 33 a 132% en los de extractos de hoja. No existió diferencia significativa entre dosis de polvo de hoja, pero sí entre dosis de extracto de hoja, cuyo efecto en la población fue de manera lineal cuadrático.

CUADRO 12. Población (P) y porcentaje de la población (P%) de *Sitophilus zeamais* bajo tratamientos de hoja de nim a 25, 60, 90 y 120 días.

Dosis		Hoja					
		Polvo		Extracto		Promedio	
%	AZA	P	P%	P	P%	P	P%
peso/peso	(µg/100g)						
25 días							
0	0.0	18.2	100	15.2	100	16.5 a	100
2	4.8	16.2	89	14.0	93	15.0 a	91
4	9.6	19.7	111	14.2	93	17.0 a	102
6	14.4	19.0	105	19.0	127	19.0 a	116
8	19.2	22.2	122	12.5	80	17.0 a	101
		19.1 (a)	107	14.9 (b)	98		
60 días							
0	0.0	43.0	100	45.0	100	44.0 a	100
2	4.8	44.0	102	39.0	87	41.5 ab	94
4	9.6	51.0	119	50.0	111	50.5 a	115
6	14.4	46.0	107	29.0	64	37.5 ab	85
8	19.2	45.0	105	15.0	33	30.0 b	69
		45.8 (a)	108	35.6 (b)	74		
90 días							
0	0.0	64.0 a(a)	100	63.0 ab (a)	100	63.5	100
2	4.8	69.0 a(a)	108	48.0 b (b)	76	58.5	92
4	9.6	94.0 a(a)	147	83.0 a (b)	132	88.5	139
6	14.4	98.0 a(a)	153	48.0 b (b)	76	73.0	114
8	19.2	86.0 a(a)	134	21.0 c (b)	33	53.5	83
		82.2	135	52.6	79		
120 días							
0	0.0	52.0	100	57.0	100	54.5 a	100
2	4.8	45.0	86	40.0	70	42.5abc	78
4	9.6	57.0	110	36.0	63	46.5 ab	86
6	14.4	47.0	90	28.0	49	37.5 bc	69
8	19.2	42.0	81	19.0	33	30.5 c	57
		48.6 (a)		36.0 (b)			

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis), no son diferentes entre sí (DMS: 05).

De acuerdo a la cantidad de insectos y porcentajes de la población registrada en ambos tratamientos de polvo y extractos, en comparación con el testigo, se consideraron que en la práctica no fueron efectivos.

A 120 días, la emergencia fue de 81 a 110% en tratamientos de polvo y de 33 a 70% en los extractos de hoja, los cuales mostraron diferencias significativas entre forma de aplicación y dosis, pero no de interacción. El efecto de dosis fue lineal y se mantuvo el mejor efecto de los extractos de hoja sobre el polvo de hoja.

Como resultado, se puede indicar que el uso de polvo de hojas de nim en sus diferentes dosis, no afectó la población de insectos en ningún periodo de evaluación. Incluso algunos tratamientos registraron mayor población de insectos que el testigo, el cual no recibió tratamiento de nim. En cuanto a la aplicación de extractos de hoja, el efecto significativo sobre el crecimiento poblacional se registró a partir de los 60 días de iniciada la prueba. La dosis mayor de AZA probada (19.2  $\mu\text{g}$  en 100 g de grano), registró el menor número de *S. zeamais* (15-19) y el menor porcentaje de emergencia (33%) que los otros tratamientos. Sin embargo, estos valores no son suficientemente pequeños para ser considerados como tratamientos efectivos a niveles prácticos.

#### 4.3.3.2. Población de *Z. subfasciatus* bajo tratamientos de hoja de nim

Por su parte la población de *Z. subfasciatus* fue afectada en forma significativa en todos los periodos de evaluación (60, 90 y 120 días) por la forma, las dosis y su interacción (Cuadro A.11. del Apéndice). Los datos de población y los porcentajes de población relacionados al testigo registrados en los tratamientos de polvo y extracto de hoja de nim se muestran en el Cuadro 13.

Los tratamientos con polvo de hoja en sus diferentes dosis, tampoco disminuyeron el crecimiento de la población de insectos. Incluso en la mayoría de los tratamientos las poblaciones presentes fueron mayores a las registradas en el testigo, en el cual no se aplicó nim. El porcentaje de emergencia a 60 días

fue de 89 a 120%, de 86 a 112% a los 90 días y de 96 a 101% a los 120 días, poblaciones y porcentajes altos y sin diferencia entre tratamientos, por lo cual se consideró que no tuvieron ningún efecto sobre la población de insectos.

CUADRO 13. Población (P) y porcentaje de la población (P%) de *Zabrotes subfasciatus* bajo tratamientos de hoja de nim a 60, 90 y 120 días.

Dosis		Hoja			
		Polvo		Extracto	
% peso/peso	AZA (µg/100g)	P	P%	P	P%
60 días					
0	0.0	124 a (a)	100	80 a (b)	100
2	4.8	110 a (a)	89	66 a (b)	82
4	9.6	166 a (a)	134	78 a (b)	97
6	14.4	145 a (a)	117	0 b (b)	0
8	19.2	149 a (a)	120	0 b (b)	0
90 días					
0	0.0	198 a (a)	100	224 a (b)	100
2	4.8	171 a (a)	86	148 ab (b)	66
4	9.6	212 a (a)	107	127 b (b)	57
6	14.4	192 a (a)	97	0 c (b)	0
8	19.2	222 a (a)	112	0 c (b)	0
120 días					
0	0.0	187 a (a)	100	166 a (a)	100
2	4.8	189 a (a)	101	138 a (b)	83
4	9.6	200 a (a)	107	54 b (b)	32
6	14.4	186 a (a)	99	0 c (b)	0
8	19.2	180 a (a)	96	0 c (b)	0

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis), no son diferentes entre sí (DMS: 05).

En los tratamientos de extracto de hojas se registró un menor crecimiento de la población de insectos que en los tratamientos de polvo de hoja. En el frijol, la aplicación de las diferentes dosis de extracto de hojas mostró diferencias significativas en todos los períodos de evaluación (60, 90 y 120 días). La población de insectos fue más pequeña a medida que la dosis fue aumentada; con efecto lineal a los 60 días, y lineal-cúbico a los 90 y 120 días. Sin embargo, el efecto sobre la eliminación total de la población y la emergencia de insectos

se obtuvo cuando se aplicaron dosis altas de AZA (14.4 y 19.2  $\mu\text{g}$  en 100 g de frijol), registrados en la evaluación efectuada a los 60 días. A partir de este período la efectividad (evidente) mantuvo a los granos libres de insectos y sanos físicamente hasta el término del experimento.

#### 4.3.3.3. Población de *S. zeamais* bajo tratamientos de semilla de nim

Los datos de población de *S. zeamais* a 25, 60, 90 y 120 días, arrojaron en el análisis de varianza efectos significativos ( $p < 0.01$ ) en los factores probados y períodos de evaluación siguientes: forma de aplicación (polvo, extracto) a los 60, 90 y 120 días; dosis (0, 16.86, 33.72, 50.58 y 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA) en los cuatro períodos de evaluación, las interacciones fueron significativas a los 90 y 120 días (Cuadro A.10. del Apéndice).

La población de insectos y porcentajes del mismo, en los granos de maíz tratados con polvos y extractos de semillas de nim en sus diferentes dosis, se muestran en el Cuadro 14 y la tendencia del efecto de las dosis realizada a través de polinomios se muestra en el Cuadro A.13 del Apéndice.

En este experimento, la aplicación de semilla de nim como fuente insecticida en forma de polvo y extracto, brindó mayor protección al maíz en cuanto a la reducción de la población de insectos y su emergencia, superando a los tratamientos formados con polvos y extractos de hoja. Lo anterior fue atribuible a la mayor concentración de AZA en la semilla. A su vez, se observó que el polvo de semilla ejerció buen control de la población a bajas dosis, mientras que el extracto de semilla fue efectivo a altas dosis. Existió diferencia entre las dosis de polvo y extracto de semilla en todos los períodos de evaluación, disminuyendo el crecimiento de la población *S. zeamais* a medida que la dosis fue incrementada.

En la evaluación efectuada a los 25 días, existieron diferencias entre las dosis de semilla de nim, efecto que fue de manera lineal cuadrática sobre la población de insectos. No existió efecto significativo de forma de aplicación, ni de interacción. Asimismo, el muestreo indicó que los tratamientos de polvo y



extracto fueron efectivos a dosis altas (67.44 µg de AZA), ya que no se encontraron insectos y su emergencia fue de 0%. En dosis menores la emergencia fue mayor a 84% a los 25 días.

CUADRO 14. Población (P) y porcentaje de población (P%) de *Sitophilus zeamais* bajo tratamientos de semilla de nim a 25, 60, 90 y 120 días.

Dosis		Semilla					
		Polvo		Extracto		Promedio	
%	AZA	P	P%	P	P%	P	P%
peso/peso	(µg/100g)						
25 días							
0	0.00	16.0	100	17.0	100	16.5 a	100.0
2	16.86	14.0	87	18.0	106	16.0 a	96.5
4	33.72	15.0	94	15.0	88	15.0 a	91.0
6	50.58	14.0	87	14.0	82	14.0 a	84.5
8	67.44	0.0	0	0.0	0	0.0 b	0.0
		11.8 (a)	67	12.8 (a)	69		
60 días							
0	0.00	39.0	100	45.0	100	42.0 a	100.0
2	16.86	17.0	43	37.0	82	27.0 b	62.5
4	33.72	8.0	20	22.0	49	15.0 c	34.5
6	50.58	0.0	0	0.0	0	0.0 d	0.0
8	67.44	0.0	0	0.0	0	0.0 d	0.0
		12.8 (b)		20.8 (a)			
90 días							
0	0.00	57.0 a (b)	100	72 a (a)	100	64.5	100.0
2	16.86	0.0 b (b)	0	30 b (a)	42	15.0	21.0
4	33.72	0.0 b (b)	0	16 c (a)	22	8.0	11.0
6	50.58	0.0 b (a)	0	0 d (a)	0	0.0	0.0
8	67.44	0.0 b (a)	0	0 d (a)	0	0.0	0.0
120 días							
0	0.00	39.0 a (a)	100	44 a (a)	100	41.5	100.0
2	16.86	0.0 b (b)	0	22 b (a)	50	11.0	25.0
4	33.72	0.0 b (b)	0	18 b (a)	41	9.0	20.5
6	50.58	0.0 b (a)	0	0 c (a)	0	0.0	0.0
8	67.44	0.0 b (a)	0	0 c (a)	0	0.0	0.0

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis), no son diferentes entre sí (DMS: 05).

A 60 días de inicio de la prueba, existió efecto significativo de la forma de aplicación y dosis, pero no en la interacción. Aquí, la efectividad de las dosis de AZA fue notoria, así como el de los extractos sobre el polvo de semilla. La población de *S. zeamais* fue más pequeña a medida que la dosis de nim aumentó, siendo su efecto lineal-cúbico. En los tratamientos de nim donde se aplicaron dosis a partir de 50.58 µg de AZA, no se registraron insectos y por lo tanto no hubo ninguna emergencia. Los resultados hacen considerar a esta dosis, como tratamientos efectivos de control, pues mantuvieron al mínimo la presencia de insectos y su emergencia.

En los períodos siguientes de evaluación (90 y 120 días) existieron efectos de interacción de la forma y dosis. Los mejores resultados fueron registrados con el polvo de semilla, este ejerció mejor efecto (significativo) sobre la población a bajas dosis, mientras que el extracto de semilla fue efectivo a dosis mayores.

En la evaluación efectuada a 90 y 120 días, existió diferencia significativa entre las dosis del polvo de semilla, su efecto tuvo un comportamiento lineal, cuadrático y cúbico sobre la población de insectos. La dosis de 16.86 µg de AZA en 100 g de maíz y mayores, eliminaron la población de insectos y su emergencia total, persistiendo su efecto hasta los 120 días, período final de la evaluación. En el caso de los extractos de semilla, también con diferencia entre dosis, tuvieron un efecto lineal cuadrático a los 90 días y lineal a los 120 días. La mejor respuesta fue lograda cuando se aplicaron dosis de 50.58 µg de AZA y mayores, las cuales eliminaron la población y la emergencia de insectos, esta respuesta fue registrada desde los 60 días de iniciada la prueba.

#### 4.3.3.4. Población de *Z. subfasciatus* bajo tratamientos de semilla de nim

En cuanto a la población de *Z. subfasciatus*, existió diferencia significativa en la forma de aplicación, en las dosis y en la interacción en todos los períodos evaluados 60, 90 y 120 días (Cuadro A. 12. del Apéndice). La comparación entre dosis se efectuó mediante la prueba de DMS al 5% y los datos registrados a 60,

90 y 120 días se muestran en el Cuadro 15.

La tendencia de respuesta de los tratamientos se hizo a través de polinomios ortogonales, que se muestran en el Cuadro 13 del Apéndice.

Las pruebas efectuadas con polvos y extractos de semilla mostraron diferencias entre dosis sobre población del insecto, con buena efectividad y un eficiente control a partir de los 60 días. Asimismo, el polvo de semilla requirió de menor dosis que el extracto para obtener mejores resultados en la reducción de la población. Existieron diferencias entre dosis del polvo y extractos de semilla de nim y su efecto fue lineal cuadrático y cúbico en los tres períodos de muestreo.

**CUADRO 15. Población (P) y porcentaje de población (P%) de *Zabrotes subfasciatus* bajo tratamientos de semilla de nim a 60, 90 y 120 días.**

Dosis		Semilla			
		Polvo		Extracto	
% peso/peso	AZA ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	P	P%	P	P%
60 días					
0	0.00	65 a (b)	100	105 a (a)	100
2	16.86	1 b (b)	1	53 b (a)	50
4	33.72	0 b (a)	0	0 c (a)	0
6	50.58	0 b (a)	0	0 c (a)	0
8	67.44	0 b (a)	0	0 c (a)	0
90 días					
0	0.00	155 a (a)	100	168 a (a)	100
2	16.86	0 b (b)	0	69 b (a)	41
4	33.72	0 b (a)	0	0 c (a)	0
6	50.58	0 b (a)	0	0 c (a)	0
8	67.44	0 b (a)	0	0 c (a)	0
120 días					
0	0.00	180 a (a)	100	170 a (a)	100
2	16.86	0 b (b)	0	107 b (a)	63
4	33.72	0 b (a)	0	0 c (a)	0
6	50.58	0 b (a)	0	0 c (a)	0
8	67.44	0 b (a)	0	0 c (a)	0

Valores con la misma letra en cada columna y en cada hilera (letra dentro de paréntesis), no son diferentes entre sí (DMS 05).

El control de la población con polvo de semilla ocurrió a partir de la dosis de 16.86  $\mu\text{g}$  de AZA, y con extracto de semilla desde 33.72  $\mu\text{g}$  de AZA. Estas

dosis brindaron un control eficiente de los insectos, ocasionando la eliminación total de la población y de su emergencia, manteniendo su efectividad hasta los 120 días.

En general las hojas y semillas han sido probadas y utilizadas contra el ataque de insectos de diferente forma: extractos, polvos, aceites y pastas, con resultados favorables y desfavorables.

En este ensayo el uso de hojas y semillas de nim en forma de polvo y extracto, tuvieron un efecto particular en la protección de los granos de maíz y frijol contra el daño de grano, sobre la mortalidad y reducción del crecimiento de la población de *S. zeamais* y *Z. subfasciatus*. Se encontró que el uso de semillas tuvo mayor efecto sobre los insectos que la aplicación de hojas en sus diferentes formas de preparación dado el mayor contenido de AZA. También que el polvo de semilla fue mejor que el extracto; mientras que el extracto de hoja tuvo mejor efecto que el polvo.

La cantidad inicial de AZA determinada en las hojas y semillas utilizadas en este ensayo fue de 2.4 y 8.43 µg/g, respectivamente; la mayor concentración de AZA en semillas explica en gran parte las diferencias existentes y su mayor efecto comparado al de las hojas al ser aplicados en mayor dosis.

**Polvo de hojas.** El polvo de hojas de nim en dosis de 4.8 a 19.2 µg de AZA en 100 g de grano, no evitó el daño al grano, tuvo bajo efecto sobre la mortalidad y no disminuyó la población de los gorgojos en maíz y frijol a través de 120 días de almacenamiento. En maíz tratado, el daño al grano fue entre 29 y 30%; cero mortalidad y alto porcentaje de emergencia (86 a 134%). En frijol el porcentaje de daño fue de: 66 y 69% en los tratamientos, la mortalidad del insecto fue menor a 26%, la población de insectos y emergencia no controlada (89-134%). Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores, que de igual modo reportan que, el polvo de hojas no arrojó resultados positivos. Tal es el caso de las pruebas efectuadas por Bains *et al.* (1977) contra *Trogoderma granarium*; Ahmed y Sultana (1980) contra *S. oryzae*; Jilani y Su (1983) contra de *S. granarius*; Cobbinah y Appiah-Kwarteng (1989) contra *S. zeamais*; y López (1991) contra *S. zeamais*.

Para Cobbinah y Appiah-Kwarteng (1989) la poca efectividad de los tratamientos puede ser debida a que las partículas de polvo de hoja introducidas dentro del recipiente de prueba, son acumuladas al fondo de los mismos, situación que evita el contacto con los insectos y con la masa de granos. Asimismo, en otra sección de esta investigación se demostró que la AZA varía entre hojas, frutos y semillas; siendo en las hojas y frutos donde se encuentra en menor concentración, y su bajo efecto pudo haber sido atribuido al bajo contenido de AZA en las hojas. Igualmente, las hojas de nim utilizadas en este experimento y los niveles de AZA que contenían, fueron insuficientes para obtener un control efectivo en ambos insectos, siendo recomendable aumentar tales dosis en posteriores ensayos.

**Extractos de hojas.** Los extractos de hoja y en las dosis probadas (4.8 a 19.2  $\mu\text{g}$  de AZA), provocaron diferente efecto entre insectos en cuanto a la reducción del daño al grano, sobre la mortalidad, y sobre la disminución de la cantidad de insectos y emergencia de insectos. En el grano de maíz tratado con extractos de hoja, el daño al grano ocasionado por *S. zeamais* osciló entre 10 a 30%, la mortalidad (corregida) máxima fue de 22%; y la población emergida mayor al 33% (33-132%). Este daño se considera alto, la mortalidad baja y alta la emergencia.

Por su parte, en el gorgojo *Z. subfasciatus*, los extractos de hoja en dosis de 4.8 y 9.6  $\mu\text{g}$  de AZA por 100 g de frijol, no afectaron las variables medidas, en cambio cuando la dosis fue incrementada a 14.4 y 19.2  $\mu\text{g}$  de AZA, el daño al frijol fue de menos de 5%; la población de insectos fue controlada y la población emergida se redujo a menos de 20% desde los 60 días de almacenamiento, manteniendo a los granos de frijol sanos, sin daño adicional, hasta los 120 días en que concluyó la prueba.

Estos resultados muestran que existieron diferencias entre especies en cuanto a su respuesta a esta forma de control. El insecto *Z. subfasciatus* tuvo respuesta a dosis altas de AZA en los extractos; contrario a lo observado en *S. zeamais* el cual no respondió a estas dosis y no fue afectado en forma significativa. Efectos no significativos también fueron encontrados por Ambika et

al. (1981), Islam (1983) y Kossou (1989) contra *Callosobruchus chinensis* y *S. zeamais*, en los cuales los extractos de hojas en altas dosis (de 8 a 16%) no causaron mortalidad en estos dos insectos.

**Polvo de semilla.** La aplicación de polvo de semilla tuvo excelentes resultados: ocasionó que se tuviera el menor porcentaje de daño a los granos, menor población y menor porcentaje de emergencia en los insectos a medida que la dosis fue aumentada. Las dosis establecidas fueron de 16.86 a 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano; en proporción representó 3.5 veces mas que la aplicada en los tratamientos de hojas. Las dosis altas afectaron a los insectos en corto tiempo, y las dosis bajas causaron efecto más tardío. El porcentaje de daño en maíz y frijol tratados con polvo de semillas después de 120 días fue de menos de 5%; mientras que en los tratamientos testigo fue de 30% en maíz y 67% en frijol. Respecto a la población de insectos, *S. zeamais* fue afectado en la primera evaluación (1 día) a la dosis alta de 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano, a 60 días de tratado fue afectado a dosis menores de 33.72 y 50.58  $\mu\text{g}$  de AZA y a 90 días a la dosis mas baja (16.86  $\mu\text{g}$  de AZA). Estas dosis causaron 100% de mortalidad en adultos y la eliminación total de la población de insectos a partir de los periodos mencionados, respectivamente. En cambio, el efecto benéfico de los tratamientos de polvo de semilla sobre *Z. subfasciatus* fue observado a partir de los 60 días. La dosis de 16.86 a 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de frijol, a partir de este periodo, ocasionó la eliminación total de los adultos y su emergencia.

El control de insectos a través de la aplicación de polvos es en general atribuible a que estos llenan los espacios entre granos, estableciendo una barrera al movimiento de los insectos (Cobbinah y Appiah-Kwarteng, 1989). Torres y Rodríguez (1990) mencionan que la acción de polvos minerales y vegetales es sobre el integumento de los insectos, provocando su ruptura y la pérdida de agua al remover la capa de cera, trayendo como consecuencia su deshidratación y muerte posterior. Saxena (1987) por su parte, indica que la efectividad de los polvos de nim se debe a inhibición de la oviposición, observada en *Callosobruchus maculatus* y *C. chinensis*.

**Extracto de semillas.** El uso de extractos de semilla también tuvo un efecto positivo sobre el control de los insectos pero en dosis altas. Cuando se aplicó en dosis mayores de 33.72  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g en frijol y 50.58  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de maíz, los daños fueron menores a 5.7%. En cuanto a la mortalidad, los insectos mostraron diferencias en su respuesta. A un día del tratamiento solo el gorgojo del maíz fue afectado con dosis de 67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano. Posteriormente, los registros de población realizados a los 60 días mostraron que ambos insectos resultaron dañados por los tratamientos: *S. zeamais* respondió a partir de dosis de 50.58  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano y *Z. subfaciatus* a 33.72  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de frijol, causándoles la eliminación total de la población, y manteniéndola de esta manera hasta el término del experimento.

En general, los extractos, de acuerdo a Jotwani y Srivastava (1983) actúan como cubierta protectora, de tal modo que inhiben la puesta de huevecillos, consecuentemente menor cantidad de larvas y menor daño a los granos. También actúan como repelentes, afectan el comportamiento, longevidad y reproducción, afectando el crecimiento y desarrollo (Shapiro *et al.*, 1994).

Los extractos de hoja y semilla son recomendables para el control de insectos cuando contienen sustancias activas (como la AZA) en cantidades suficientes para afectarlos. En este experimento, el contenido de AZA en la semilla fue de 8.43  $\mu\text{g}/\text{g}$ , y en de las hojas de 2.4  $\mu\text{g}/\text{g}$ . La respuesta en forma significativa ocurrió a partir de aplicaciones de 14.4  $\mu\text{g}$  de AZA por cada 100 g de grano, como lo demuestran los resultados obtenidos. Asimismo; el efecto también fue favorecido por las características o propiedades físicas, tanto del polvo de semillas como sus extractos.

El uso de nim tiene buenos resultados sobre el control de insectos, su efectividad dependerá de la cantidad de AZA presente en la parte a utilizar del árbol, de la forma como se aplique, de la dosis a utilizar y de la especie de insecto por combatir.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El contenido de azadiractina (AZA) en hojas del árbol de nim, cambia con la etapa fenológica del árbol y con el ambiente de crecimiento. Los máximos contenidos de AZA en las hojas se registran en la etapa vegetativa (4.65, 3.17  $\mu\text{g/g}$ ) y de floración (3.97, 2.09  $\mu\text{g/g}$ ) y en ambiente cálido seco como el de la localidad de Marín y cálido subhúmedo como el de Tuxpan, respectivamente. En Córdoba (semicálido húmedo), las hojas contienen bajos niveles de AZA (0-0.5  $\mu\text{g/g}$ ) en todas las etapas fenológicas. También se concluye que los frutos verdes de nim no contienen AZA.

El contenido de AZA en semilla es modificado por el ambiente. Las semillas de árboles de Marín (cálido seco) y Tuxpan (cálido subhúmedo) presentan altos contenidos de AZA (9.0 y 8.38  $\mu\text{g/g}$ ), y un menor contenido se registró en las semillas de árboles de Córdoba (4.74  $\mu\text{g/g}$ ).

El contenido de AZA en hojas en la etapa vegetativa y floración, y contenido de AZA en la semilla se correlacionan positivamente con el diámetro de tallo de los árboles y negativamente con el ancho de semilla.

El ambiente de almacén y el período de almacenamiento influye en el contenido de AZA en hojas y semillas de nim. Bajo condiciones de ambientes cálido seco, cálido subhúmedo y refrigeración en el cual fueron almacenadas, existe una disminución drástica del contenido de AZA en corto tiempo, particularmente en el de las hojas, que ocurre en los primeros 2 meses de almacenamiento. Por lo cual es necesario efectuar estudios para mejorar las formas y las condiciones de almacenamiento.

Existe un efecto particular de la aplicación de nim en extractos y polvos de semilla y de hojas y de sus dosis, sobre el control (mortalidad) del gorgojo del maíz, del gorgojo pinto del frijol, y sobre el daño a granos de maíz y frijol



almacenados.

El polvo de hoja de nim en dosis menores a 8% (19.2  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano), no tuvo efectos sobre *S. zeamais* y *Z. subfasciatus*.

El extracto de hojas de nim con menos de 8% (19.2  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano), no tuvo efecto sobre *S. zeamais*. Dosis mayores 6% (14.4  $\mu\text{g}$  por 100 g de grano) causó mortalidad casi total en *Z. subfasciatus* a 25 días de aplicado en frijol.

El polvo de semillas de nim, en dosis de mayores de 2% (16.86  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano), tuvo efectos positivos sobre la mortalidad en el insecto *S. zeamais* y *Z. subfasciatus* a partir de 25 días de aplicados en maíz y en frijol, respectivamente. En dosis de 8% (67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de maíz), produjo mortalidad total en *S. zeamais* a 24 h de aplicarse el tratamiento.

El extracto de semillas de nim, en dosis de 4% (33.72  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de frijol) tiene control efectivo sobre *Z. subfasciatus* a partir de 25 días de aplicado el tratamiento. La dosis de 6% (50.58  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano) afecta a *S. zeamais* y *Z. subfasciatus* después de 25 días de aplicado; mientras que dosis de 8% (67.44  $\mu\text{g}$  de AZA en 100 g de grano), la mortalidad total de los insectos ocurrió a 24 h en *S. zeamais* y a 25 días en *Z. subfasciatus*.

El menor efecto del polvo y extracto de hojas fue debido al bajo contenido de AZA, comparado al determinado y aplicado en las semillas. Por lo cual, para tener una mejor respuesta de esta forma de aplicación es recomendable incrementar la dosis de AZA, asimismo encontrar árboles que contengan mayor contenido de AZA en las hojas.

## 6. LITERATURA CITADA

- Ahmed, S. and M. Grainge. 1986. Potential of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) for pest control and rural development. *Econ. Bot.* 40(2): 201-208.
- Ahmed, A. and P. Sultana. 1980. Comparative efficacy of some indigenous plant materials as repellents against *Sitophilus oryzae* Linn. *Bangladesh. J. Agric. Res.* 5(2): 31-35.
- Al-Hemyari, A.A. 1994. Effectiveness of some plant products as faba-bean protectants against cowpea beetle *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *Ann. Agric. Sci.* 32(9): 997-1007.
- Ambika, B., C.C. Abraham and T. Nalinakumari. 1981. Effect of neem leaf extract and two JH analogues on the development of *Callosobruchus chinensis* Linn. (Coleoptera: Bruchidae). *Agric. Res. J. Kerala.* 19(1): 72-75.
- Ara, I., B.S. Siddiqui, S. Faizi and S. Siddiqui. 1989. Diterpenoids from the stem bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry.* 28(4): 1177-1180.
- Ascher, K.R.S. 1993. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from neem tree, *Azadirachta indica*. *Arch. Insect Biochemistry Physiol.* 22(3/4): 433-449.
- Bailey, L.H. 1977. *Manual of cultivated plants.* McMillan Publishing, Co., Inc. New York. pp. 612-613.
- Bains, S.S., G.S. Battu and A.S. Atwal. 1977. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) material on diapause larvae and the population build-up of *Trogoderma granarium* Evert infesting stored wheat. *Indian J. Plant Prot.* 4(2): 192-196.
- Bidwell, R.G.S. 1993. *Fisiología Vegetal.* AGT Editor S.A. México. (2ª. Reimpresión). 784p.
- Bokel, M., R. Cramer, H. Gutzeit, S. Reeb and W. Kraus. 1990. Tetranortriterpenoids related to nimbin and nimbolide from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *Tetrahedron.* 46(3): 775-782.
- Borikar, P.S. and V.M. Pawar. 1995. Relative efficacy of some grain protectants against *Callosobruchus chinensis* (Linneus). *Pesticide Res. J.* 7(2): 125-127.
- Cobbinah, J.R. and J. Appiah-Kwarteng. 1989. Effects of some neem products on stored maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. *Insect Sci. Applic.* 10(1): 89-92.
- Domínguez, X. A. 1980. *Química orgánica fundamental.* Ed. Limusa, México. pp. 413-434

- Ermel, K., H.O. Kaliinowoski and H. Schmutterer. 1991. Isolation and characterization of marrangin a new insect growth regulating substance from the seed kernels of the marrango tree, *Azadirachta excelsa* (Jack). *J. Appl. Entomol.* 112(5): 512-519.
- Ermel, K., E. Pahlich and H. Schmutterer. 1987. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. In: *Proc. of the 3rd. Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya, 10-15 July 1986* (Schmutterer, H. and K.R.S. Ascher, eds.). pp. 171-184.
- Esquinca-Ruiz, H. 1994. Efecto antagónico del polvo de hoja de árboles de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) del Estado de Nuevo León sobre *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Tesis M.C. FA-UANL. Marín, N.L. 58p.
- Falconer, D.S. 1975. Introducción a la genética cuantitativa. C.E.C.S.A. 5ª. Impresión. México. 430p.
- Gamene, C.S., H.L. Kraak, J.G. Van-Pijlen and C.H.R. de Vos. 1996. Storage behaviour of neem (*Azadirachta indica*) seeds from Burkina Faso. *Seed Sci. Technol.* 24(3): 441-448.
- Golob, P. and A. Kilminster. 1982. The biology and control of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) infesting red kidney beans. *J. Stored Prod. Res.* 18: 95-101.
- González-Valenzuela, M., R. Roche y M.E. Simanca. 1985. Capacidad de infestación y emergencia del coleóptero *Zabrotes subfasciatus*, plaga de granos almacenados. *Ciencias de la Agricultura.* 23: 31-37.
- Govindachari, T.R., G. Sandhya and S.P. Ganeshraj. 1991. Isolation of novel azadirachtins H and I by high performance liquid chromatography. *Chromatographia.* 31 (516): 303-305.
- Govindachari, T.R.; G. Sandhya and S.P.G. Raj. 1992. Azadirachtins H and I: two new tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *J. Natural Prod.* 55(5): 596-601.
- Indian Agricultural Research Institute (IARI). 1983. Neem in Agriculture: I Chemistry of neem bitter principles. *Res. Bull.* 40. 15p.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 1994. Estadísticas históricas de México. Tomo I. 125p.
- Islam, B.N. 1983. Pesticidal action of neem and certain indigenous plants and weeds of Bangladesh. *Proc. 2<sup>nd</sup>. Int. Neem Conf., Fed. Republic Germany. 25-28 May.* pp. 263-289.
- Isman, M.B., K. Opende, A. Luczynski and J. Kaminski. 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* 38(6): 1406-1411.
- Jacobson, M. 1986. The neem tree: Natural resistance *par excellence*. ACS Symposium. Am. Chem. Soc. Series No. 296. pp. 220-232.

- Jilani, G. and C.F. Su. 1983. Laboratory studies on several plant materials as insect repellents for protection of cereal grains. *J. Econ. Entomol.* 76(1): 154-157.
- Jitendra, K., B.S Parmar and J. Kumar. 1996. Physicochemical and chemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* F. *J. Agric. Food Chem.* 44(8): 2137-2143.
- Johnson, S., E.D. Morgan and C.N. Peiris. 1996. Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seed of neem (*Azadirachta indica*). *Ann. Bot.* 78(3): 383-388.
- Jotwani, M.G. and K.P. Srivastava. 1983. A review of neem research in India in relation to insect. *Proc. 2<sup>nd</sup>. Int. Neem Conf., Fed. Republic Germany.* 25-28 May, pp. 43-56.
- Kossou, D.K. 1989. Evaluation des differents produits du neem *Azadirachta indica* A. Juss pour le controle de *Sitophilus zeamais* Motch. sur le maïs en postrecolte. *Insect Sci. Applic.* 10(3): 365-372.
- Koul, O., S.J Rizvi and V. Rizvi. 1992. Neem allelochemicals and insect control. *Allelopathy: basic and applied aspects.* pp. 389-412.
- Lamers, J.P.; K. Michels and R.J. Vandenbeldt. 1994. Trees and windbreaks in the Sahel: establishment, growth, nutritive, and calorific values. *Agrofor. Syst.* 26(3). 171-184.
- Leos-Martínez, J. y R. Salazar-Sáenz. 1992. El árbol de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en México. FA-UANL. Folleto Técnico No.3. 30p.
- López-Sánchez, V. 1991. Especies vegetales del noreste de México para el control del gorgojo *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) en maíz almacenado. Tesis M.C., FA-UANL, Marín, N.L., México. 73p.
- Lewis, W.H. and M.P. Elvin-Lewis. 1983. Neem (*Azadirachta indica*) cultivated in Haiti. *Econ. Bot.* 37(1): 69-70.
- Mahadevan, N.P. 1991. Phenological observations of some forest tree species as an aid to seed collection. *J. Trop. For.* 7(3): 243-247.
- Maithani, G.P., V.K. Bahuguna, M.M. Rawat and O.P. Sood. 1989. Fruit maturity and interrelated effects of temperature and container on longevity of neem (*Azadirachta indica*) seeds. *Indian For.* 115(2): 89-97.
- Mordue, A.J. and A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *J. of Insect Physiol.* 39(11): 903-924.
- National Research Council (NRC). 1992. Neem: A tree for solving global problems. Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Sci. and Technol. for International Development. National Academy Press. Washington, D.C. 107p.
- Paiman, M.H., R. Chauphan and D.S. Gupta. 1983. Some non-toxic materials as wheat protectants against *Rhizopertha dominica*. *J. of Food Sci. Technol.* 20(4): 183-185.
- Pajni, H.R. and A. Jabbal. 1986. Some observation on the biology of *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Bruchidae: Coleoptera). *Res. Bull. Punjab Univ.* 37(3-4): 11-16.

- Pal, R.K. and R. Prasad. 1996. Relative toxicity of certain plant extracts to khapra beetle, *Trogoderma granarium*. *Ann. Plant Prot. Sci.* 4(1): 35-37.
- Pliske, T.E. 1984. The establishment of neem plantations in the American tropics. In : *Natural pesticides from neem tree and other tropical plants.* (Schmutterer, H. and K.R Ascher, eds.). Press Eschborn West Germany. pp. 521-525.
- Ponnuswamy, A.S.; R.S. Raj, C. Surendran and T.V. Karivaratharaju. 1991. Studies on maintaining seed longevity and the effect of fruit grades in neem (*Azadirachta indica*). *Forestry Res. Stan. For. Sci.* 3(3): 285-290.
- Pradhan, S. and M.G. Jotwani. 1968. Neem as an insect deterrent. *Chemical Age of India.* 19(9): 756-760.
- Rakesh, K., K.S. Bangarwa and R. Kumar. 1996. Seed storability in *Azadirachta indica* A. Juss. *Ann. Biol. Ludhiana.* 12(1): 62-66.
- Ramayo R, L. 1983. *Tecnología de granos y semillas.* Departamento de Industrias Agrícolas. UACH, Chapingo. 216p.
- Rembold, H., H. Forster and C. Czoppelt. 1987. Structure and biology activity of azadirachtins A and B. *Natural pesticides from the neem tree (Azadirachta indica A. Juss) and other tropical plants.* Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya, 10-15 July 1986 (Schmutterer, H. and K.R.S. Ascher, eds.). pp: 149-160.
- Rembold, H. and S.P. Raychaudhuri. 1991. The azadirachtins highly active insect growth inhibitors. *Recent advances in medicinal, aromatic and spice crops (Volume 1).* International Conf. held on 28-31 January 1989, at New Delhi, India. pp. 31-37.
- Rengasamy, S. and B.S. Parmar. 1994. Azadirachtin content at different states of flowering and fruiting in neem. *Pesticide. Res. J.* 6(2): 193-194.
- Rengasamy, S. and B.S. Parmar. 1995. Azadirachtin-A content of seeds of neem ecotypes in relation to the agroecological regions of India. *Pesticide Res. J.* 7(2): 161-170.
- Robledo-Guel, M. 1990. *Biología de Sitophilus zeamais Mots y pérdida de peso causados en tres variedades comunes de maíz en el Noreste de México.* Tesis de Lic. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey, N.L. 59p.
- Rodríguez-Rivera, F. y C. Rodríguez-Maciel. 1990. Evaluación de la actividad tóxica de polvos vegetales y minerales sobre el gorgojo mexicano del frijol *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) en frijol almacenado bajo condiciones de laboratorio. En: *II Simposio Nacional Sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas de la Soc. Mex. Entomol.* Oaxaca, Oax. pp. 146-161.
- Rodríguez-Lagunes, A. y S. Rodríguez-Colorado. 1994. *El árbol de nim (Azadirachta indica).* Una revisión de literatura como introducción a su conocimiento. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. 69 p.

- Roederer, Y. 1991. Forestry and agroforestry experiments in the dry zone of the west coast of Reunion. Numero special "La Reunion". Bois et Forests des Tropiques. No. 229: 51-56.
- Roederer, Y. and R. Bellefontaine. 1989. Can neem seeds be expected to keep their germinative capacity for several years after collection?. (no publicado)
- Rovesti, L. and K.V. Deseo. 1990. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) and its potentiality in the control of insects. Informatore Fitopatol. 40(11): 27-32.
- Saxena, R.C. 1983. Naturally occurring pesticides and their potential. In: Chem. and World Food Supplies (L.W. Schemitt, ed.). Chemrawn II, Pergamon, N.Y. pp. 143-161.
- Saxena, R.C. 1987. Antifeedants in tropical pest management. Insect Sci. Applic. 8(4-6): 731-736.
- Saxena, R.C. 1989. Insecticides from neem. Am. Chem. Soc. pp. 110-135.
- Saxena, R.C., G. Jilani and A. Abdul-Kareem. 1988. Effects of neem on stored grain insects. In: M. Jacobson (ed.). Focus on Phytochemical Pesticides. Volume I: The neem tree. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp. 97-111.
- Saxena, R.C., N.J. Liquido and H.D. Justo. 1980. Neem seed oil, a potential antifeedant for the control of the rice planthopper, *Nilaparvata lugens*. Proc. 1st. Int. Neem Conf., Rottach-Egern. pp. 171-88.
- Schmutterer, H. 1990. Observation on pests of *Azadirachta indica* and some species of *Melia* species. J. App. Entomol. 109 (4): 390-400.
- Schmutterer, H. and M. Doll. 1993. The marrango or Philippine neem tree, *Azadirachta excelsa* (= *A. integrifoliola*): a new source of insecticides with growth-regulating properties. Phytoparasitica. 21(1): 79-86.
- Schneider, B.H. and K. Ermel. 1987. Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proc. 3<sup>rd</sup>. Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya, 10-15 July 1986 (Schmutterer, H. and K.R.S. Ascher, eds.). pp: 185-194.
- Schoonhoven, A.V. 1976. Pest of stored beans and their economic importance in Latin America. Proc. of XV Int. Cong. of Entomol. Washington, D.C. pp. 691-698.
- Schoonhoven, A.V. 1978. Pests of beans in Latin America and their control. In Pest of Grain Legumes: ecology and control. Singh, S.R. et al. (Eds). Academic Press. USA. pp. 151-165.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1980. Principales plagas de los granos almacenados. Sistema Alimentario Mexicano. DGSV. 53p.
- Shapiro, M., J.L. Robertson and R. W. Webb. 1994. Effect of neem seed extract upon the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) and its nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. 87(2): 356-360.

- Sharma, R.K. 1995. Neem leaf powder and cob ash against *Rhyzopertha dominica* (F.) in stored maize. *Indian J. Entomol.* 57(1): 15-17.
- Siddiqui, B.S., S. Siddiqui, I. Ara, S. Faizi and T. Mahmood. 1988a. Phenolic tricyclic diterpenoids from the bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry.* 27(12): 3903-3907.
- Siddiqui, B.S., F. Ghiasuddin and S. Siddiqui. 1992. Triterpenoids from the fresh fruit coats of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry.* 31(12): 195-207.
- Siddiqui, S., T. Mahmood, B.S. Siddiqui and S. Faizi. 1988b. Non-terpenoidal constituents from *Azadirachta indica*. *Planta Medica.* 54(5): 457-459.
- Singh, R.P. 1982. Neem in insect pest management. *Symposium on Insect Ecology and Resource Management. Muzaffarn Abstr.* pp. 59-60.
- Singh, R.P. 1987. Comparison of antifeedant efficacy and extract yields from different parts and ecotypes of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) trees. *Natural pesticides from the neem tree (Azadirachta indica A. Juss) and other tropical plants. Proc. of the 3<sup>rd</sup>. International Neem Conf., Nairobi, Kenya, 10-15 July, 1986.* (Schmutterer, H. and K.R.S. Ascher, eds.) pp. 185-194.
- Tapia, B.H. 1983. *Manual general de Técnicas Agropecuarias: manual de producción de frijol.* Managua, Nicaragua. pp. 166-169.
- Torres-Robledo, C. y C. Rodríguez-Hernández. 1990. Polvos vegetales y minerales como alternativa de combate de insectos plaga en maíz almacenado en Cárdenas, Tabasco. En: *II Simposio Nacional Sobre Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas de la Soc. Mex. Entomol. Oaxaca, Oax.* pp. 163-175.
- Venkatesh, D.A., M. Dundaiah and S. Mahadevamurthy. 1990. Viability of neem seeds. *Myforest.* 26(4): 369-370.
- Veerendra, H.C.S. 1995. Variation studies in provenances of *Azadirachta indica* (the neem tree). Special issue: neem-gift of the gods. *Indian For.* 121(11): 1053-1056.
- Vidales-Estrada, M. 1991. Plantas tropicales en el control del gorgojo *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) en maíz almacenado. Tesis M.C. FAUANL. Marín, N.L. 69p.
- Warthen, Jr., J.D. 1989. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss): organisms affected and reference list update. *Proc. Entomol. Soc. Washington.* 91(3): 367-388.
- Yakkundi, S.R.; Thejavathi, R. and B. Ravindranath. 1995. Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 49(3): 2517-2519.

## 7. APENDICE

CUADRO A.1. Análisis de varianza del contenido de AZA en hojas de árboles de nim.

	FV	GL	CM	p>F	CV (%)
Localidad (A)		2	21.420	0.00	
Etapas Fenológica (B)		3	21.425	0.00	
A x B		6	7.010	0.00	
Error		40	0.523		
Total		51			30.9

CUADRO A.2. Análisis de varianza del efecto de ambiente y periodo de almacenamiento sobre el contenido de AZA en hojas y semillas de nim.

	FV	GL	CM	p>F	CV (%)
Hoja	Ambiente	2	0.3964	0.04	
	Periodo	2	18.0252	0.00	
	Interacción	4	0.3021	0.05	
	Error	45	0.1213		
	Total	53			48.20
Semilla	Ambiente	2	8.0675	0.00	
	Periodo	3	209.7541	0.00	
	Interacción	6	2.3952	0.00	
	Error	36	0.0628		
	Total	47			6.08

CUADRO A.3. Análisis de varianza del porcentaje de daño en 100 g de maíz y de frijol a 120 días de almacenamiento bajo tratamientos de hojas de nim.

FV	GL	Daño en Maíz		Daño en Frijol	
		CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	121.641	0.00	4457.992	0.00
Dosis (B)	4	77.266	0.00	979.187	0.00
A x B	4	97.048	0.00	1180.605	0.00
Error	30	2.060		5.562	
CV (%)		4.68		5.37	



CUADRO A.4. Análisis de varianza del porcentaje de daño en 100 g de maíz y de frijol a 120 días de almacenamiento bajo tratamientos de semillas de nim.

FV	GL	Daño en Maíz		Daño en Frijol	
		CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	45.648	0.00	330.337	0.00
Dosis (B)	4	1397.968	0.00	3721.436	0.00
A x B	4	13.474	0.00	304.096	0.00
Error	30	2.624		0.724	
CV (%)		13.62		4.76	

CUADRO A. 5. Significancia estadística (p>F) con polinomios ortogonales de dosis de nim sobre daño al grano de maíz y de frijol causado por *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus*, respectivamente.

Tratamiento	<i>S. zeamais</i>			<i>Z. subfasciatus</i>		
	Lineal	Cuadrático	Cúbico	Lineal	Cuadrático	Cúbico
Polvo de hoja	0.101	0.181	0.137	0.038	0.629	0.510
Extracto de hoja	0.000	0.000	0.689	0.000	0.000	0.001
Polvo de semilla	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000
Extracto de semilla	0.000	0.000	0.570	0.000	0.000	0.000

CUADRO A.6. Análisis de varianza de tratamientos de hoja de nim sobre la mortalidad (corregida) de *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* a 1 día de muestreo.

FV	GL	<i>S. zeamais</i>		<i>Z. subfasciatus</i>	
		CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	2512.519	0.00	9.363	0.695
Dosis (B)	3	216.759	0.00	9.355	0.922
AxB	3	216.758	0.00	83.640	0.260
Error	24	7.294		58.729	
CV (%)		30.48		75.99	

CUADRO.A.7. Análisis de varianza de tratamientos de semilla de nim sobre la mortalidad (corregida) de *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* a 1 día de muestreo.

FV	GL	<i>S. zeamais</i>		<i>Z. subfasciatus</i>	
		CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	288.603	0.01	326.402	0.00
Dosis (B)	3	13149.398	0.00	1373.282	0.00
AxB	3	69.594	0.16	157.262	0.01
Error	24	37.187		33.624	
CV (%)		21.57		20.18	

CUADRO A.8. Significancia estadística con polinomios ortogonales del efecto de dosis de nim sobre el porcentaje de mortalidad de *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus* a 1 día de muestreo.

Tratamiento	<i>S. zeamais</i>			<i>Z. subfasciatus</i>		
	Lineal	Cuadrático	Cúbico	Lineal	Cuadrático	Cúbico
Poivo de hoja	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Extracto de hoja	0.000	0.000	0.121	NS	NS	NS
Polvo de semilla	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.250
Extracto de semilla	0.000	0.000	0.000	0.000	0.087	0.222

CUADRO.A.9. Análisis de varianza de la población total de *Sitophilus zeamais* a 25, 60, 90 y 120 días en granos de maíz tratados con hojas de nim.

FV	GL	25 días		60 días		90 días		120 días	
		CM	p>F	CM	p>F	CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	2.053	0.045	8.460	0.014	37.139	0.000	9.982	0.011
Dosis (B)	4	0.160	0.850	3.413	0.045	6.293	0.030	4.323	0.028
AxB	4	0.468	0.430	2.689	0.094	6.373	0.028	1.924	0.258
Error	30	0.474		1.230		2.026		1.374	
CV (%)		16.47		17.63		17.72		18.31	

**CUADRO.A.10. Análisis de varianza de la población total de *Sitophilus zeamais* a 25, 60, 90 y 120 días en granos de maíz tratados con semilla de nim**

FV	GL	25 días		60 días		90 días		120 días	
		CM	p>F	CM	p>F	CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	0.151	0.46	7.619	0.007	46.493	0.00	21.468	0.00
Dosis (B)	4	14.819	0.00	47.244	0.000	55.503	0.00	39.298	0.00
AxB	4	0.101	0.82	1.922	0.106	4.583	0.00	6.819	0.00
Error	30	0.270		0.916		0.599			
CV (%)		15.19		27.66		22.83		20.66	

**CUADRO.A.11. Análisis de varianza de la población total de *Zabrotes subfasciatus* a 60, 90 y 120 días en granos de frijol tratados con hoja de nim**

FV	GL	60 días		90 días		120 días	
		CM	p>F	CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	354.108	0.00	355.568	0.00	474.673	0.00
Dosis (B)	4	31.276	0.00	80.096	0.00	68.463	0.00
AxB	4	40.168	0.00	93.827	0.00	61.105	0.00
Error	30	4.972		4.015		1.711	
CV (%)		26.08		18.21		12.79	

**CUADRO.A.12. Análisis de varianza de la población total de *Zabrotes subfasciatus* a 60, 90 y 120 días en granos de frijol tratados con semilla de nim**

FV	GL	60 días		90 días		120 días	
		CM	p>F	CM	p>F	CM	p>F
Forma (A)	1	25.831	0.00	24.099	0.00	31.73	0.00
Dosis (B)	4	101.332	0.00	206.041	0.00	228.969	0.00
AxB	4	13.695	0.00	20.808	0.00	35.23	0.00
Error	30	0.266		0.394		0.397	
CV (%)		15.53		15.42		14.38	

CUADRO A.13. Significancia estadística ( $p > F$ ) con polinomios ortogonales de dosis de ním sobre daño al grano de maíz y de frijol a 25, 60, 90 y 120 días, causado por *Sitophilus zeamais* y *Zabrotes subfasciatus*, respectivamente.

Tratamiento	<i>S. zeamais</i>			<i>Z. subfasciatus</i>		
	Lineal	Cuadrático	Cúbico	Lineal	Cuadrático	Cúbico
25 días						
Polvo de hoja	NS	NS	NS	-	-	-
Extracto de hoja	NS	NS	NS	-	-	-
Polvo de semilla	0.000	0.003	0.088	-	-	-
Extracto de semilla				-	-	-
60 días						
Polvo de hoja	0.024	0.062	0.621	NS	NS	NS
Extracto de hoja				0.000	0.0980	0.100
Polvo de semilla	0.000	0.630	0.021	0.000	0.000	0.000
Extracto de semilla				0.000	0.000	0.001
90 días						
Polvo de hoja	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Extracto de hoja	0.009	0.015	0.163	0.000	0.660	0.013
Polvo de semilla	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Extracto de semilla	0.000	0.001	0.797	0.000	0.000	0.010
120 días						
Polvo de hoja	0.003	0.721	0.574	NS	NS	NS
Extracto de hoja				0.000	0.840	0.000
Polvo de semilla	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Extracto de semilla	0.000	0.633	0.063	0.000	0.000	0.000



DONATIVO



