

Determinacion de la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* L., bajo condiciones de laboratorio.

Yeison D. Mondragón Sánchez & Brayan S. Triana Marroquín

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Agrarias
Programa de Ingeniería Agronómica
Pamplona, 2020

154301: trabajo de grado

Junio 4 de 2020

Determinacion de la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* L., bajo condiciones de laboratorio.

Yeison David Mondragón Sánchez

Brayan Steeven Triana Marroquín

Trabajo de grado realizado en la modalidad de investigación presentada como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Tutor

I. A. Ph D. Humberto Giraldo Vanegas
Docente

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Agrarias
Departamento de Agronomía
Programa de Ingeniería Agronómica
Pamplona , 2020

Determinacion de la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* L., bajo condiciones de laboratorio.

Autor(es)

Yeison David Mondragón Sánchez

Brayan Steeven Triana Marroquín

Nota de aceptación

Firma del presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Agradecimientos

- I. A nuestras familias, en especial a nuestros padres, los cuales han dado su fortaleza, sus ánimos, su paciencia en este camino formativo como persona y profesional.

- II. A nuestro tutor el doctor Humberto Giraldo Vanegas , por apoyarnos y aportar su extenso conocimiento en nuestro proyecto y formación como Ingenieros Agrónomos.

- III. A nuestros docentes de las diferentes áreas los cuales nos transmitieron una parte significativa de su experiencia siendo estos los pilares en nuestra formación como ingenieros agrónomos, no solo en el carácter académico, sino también social y personal.

Tabla de Contenido

1. Introducción	11
2. Problema y descripción del problema.....	13
3. Justificación	15
4. Objetivos.....	16
4.1. General	16
4.2. Específicos	16
5. Marco referencial.....	17
5.1. Antecedentes regionales	17
5.2. Antecedentes nacionales	19
5.3. Antecedentes internacionales	21
6. Marco contextual	24
7. Marco teórico.....	25
7.1. Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss).....	28
7.1.1. Origen y distribución del neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss).....	28
7.1.2. Generalidades y morfología Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss).....	29
7.1.3. Clasificación y descripción botánica	29
7.1.3.1. Árbol.....	30
7.1.3.3. Hoja	30
7.2. Origen y distribución de <i>Plutella xylostella</i> L.	33
7.2.1. Descripción	34
7.2.2. Taxonomía	35
7.2.3. Morfología y Biología.....	35
7.2.4. Ciclo biológico.....	37
8. Marco legal.....	40
8.1. Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas -plaguicidas- artículos pirotécnicos.	40
8.2. Ministerio de salud decreto 775 del 16 de abril de 1990	41
8.3. Ley 1252 del 2008.....	41
8.4. Capítulo VI. Trabajo de grado.....	42
8.4.1. Artículo 35.- Definición de Trabajo de Grado.....	43
8.4.2. Artículo 36 .- Modalidades de Trabajo de Grado: El Trabajo de Grado, puede desarrollarse en las siguientes modalidades.	43
9. Metodología.....	44
9.1. Localización del Estudio.	44
9.2. Recolección del material biológico en campo.....	44

9.3.	Técnica de Cría.....	45
9.4.	Preparación de los extractos acuosos de Neem.....	47
9.5.	Montaje del experimento.....	50
9.6.	Diseño Experimental.....	51
10.	Resultados y análisis.....	53
10.1.	Mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> L.....	53
10.2.	Mortalidad de los extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , causada en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i>	54
10.3.	Mortalidad de los extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , causada en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i>	56
10.4.	Dosis Letal Media (DL ₅₀).....	58
10.5.	Mortalidad acumulada (horas) en las diferentes dosis de extractos de semillas de <i>A. indica</i>	61
10.6.	Mortalidad acumulada (horas) en las diferentes dosis de extractos de hojas.....	63
10.7.	Tl ₅₀ de extractos de semillas y hojas de <i>A. indica</i>	65
10.8.	Sobrevivencia de <i>P. xylostella</i> a los tratamientos de extractos acuosos de hojas y semillas de <i>A. indica</i>	70
11.	Conclusiones.....	75
12.	Recomendaciones.....	77
13.	Bibliografía.....	79
14.	Anexos.....	84

Lista de Figuras

Figura 1.	Laboratorio de sanidad vegetal.....	24
Figura 2.	Distribución mundial del neem.....	28
Figura 3.	Árbol de neem de tres años de edad.....	31
Figura 4.	Hojas de neem.....	31
Figura 5.	Flor de neem.....	31
Figura 6.	Fruto de neem.....	32
Figura 7.	Semilla de neem.....	33
Figura 8.	Distribución mundial de <i>P. xylostella</i>	34
Figura 9.	Clasificación Taxonomía de <i>P. xylostella</i>	35
Figura 10.	Vista superior de adulto macho(a), adulto hembra (b) de <i>P. xylostella</i>	39
Figura 11.	A) jameo para recolección adultos y B) recolección de larvas y pupas.....	45
Figura 12.	Distribución de los tratamientos y las repeticiones.....	46
Figura 13.	A) sumergimiento de los discos en cada tratamiento y B) disposición de los discos en sus respectivos recipientes.....	47
Figura 14.	A) recolección de hoja y B) recolección de semilla de <i>A. indica</i>	48

Figura 15. A) semillas trituradas y B) hojas triturados, ambos listos para someter al proceso de macerado.....	49
Figura 16. Extractos de neem tanto de hoja (izquierda) como de semilla (derecha), en sus correspondientes concentraciones.	49
Figura 17. Respuesta en las mortalidades de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	55
Figura 18. Histograma con porcentajes de mortalidad (%) causada en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , por las tres concentraciones de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	56
Figura 19. Respuesta en las mortalidades de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	57
Figura 20. Porcentajes de mortalidad (%) causada en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , en tres concentraciones de extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	58
Figura 21. Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a tres concentraciones de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.	60
Figura 22. Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a tres concentraciones de extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.	61
Figura 23. Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i>	63
Figura 24. Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos de hojas de <i>A. indica</i>	64
Figura 25. Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad, y horas de muerte de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , para la dosis 100.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de neem.....	67
Figura 26. Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad, y horas de muerte de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , para la dosis 66.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de neem.....	67
Figura 27. Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad, y horas de muerte de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , para la dosis 33.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de neem.....	68
Figura 28. Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad, y horas de muerte de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , para la dosis 100.000 mg/l de extractos acuosos de hojas de neem.....	69
Figura 29. Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad, y horas de muerte de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , para la dosis 66.000 mg/l de extractos acuosos de hojas de neem.....	69
Figura 30. Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad, y horas de muerte de larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , para la dosis 33.000 mg/l de extractos acuosos de hojas de neem.....	70

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cultivo del neem	29
Tabla 2. Tratamientos con extractos acuosos de Hojas y Semillas y sus concentraciones en mg/l.....	50
Tabla 3. Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en los tratamientos con extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	55
Tabla 4. Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en los tratamientos con extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	57
Tabla 5. Dosis letales DL50 y DL90, de los extractos acuosos de hojas y semillas de <i>A. indica</i> para larvas de <i>P. xylostella</i> , en condiciones de laboratorio	60
Tabla 6. Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i>	62
Tabla 7. Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos de hojas de <i>A. indica</i>	63
Tabla 8. Tiempo Letal Medio (TL50), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , en condiciones de laboratorio. 65	
Tabla 9. Tiempo Letal Medio (TL50), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a tres dosis de extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , en condiciones de laboratorio.....	66
Tabla 10. Sobrevivencia de larvas de <i>P. xylostella</i> sometidas a los tratamientos de extractos acuosos de semillas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.	71
Tabla 11. Sobrevivencia de larvas de <i>P. xylostella</i> sometidas a los tratamientos de extractos acuosos de hojas de <i>A. indica</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	74

Lista de Anexos

Anexo 1. Formato de muestreo	84
Anexo 4. Despulpado de semillas de neem,	85
Anexo 5. Semilla de neem recién despulpadas.	85
Anexo 6. Revisión de las unidades experimentales con ayuda del estereoscopio.	85
Anexo 7. Cámaras de reproducción y crianza de <i>P. xylostella</i>	85
Anexo 8. Cámaras de reproducción de <i>P. xylostella</i>	85
Anexo 9. Larvas de <i>P. xylostella</i>	85
Anexo 10. Discos de repollo desinfectados.	86
Anexo 11. Ubicación de las larvas en cada uno de los recipientes plásticos.	86
Anexo 12. Secado a la sombra de las semillas de neem	86
Anexo 13. Pupas del tratamiento de control.	86
Anexo 14. Adherente usado	86
Anexo 15. Observación en cuanto a la mortalidad de las larvas	86
Anexo 16. Proceso de filtrado de las soluciones madres de neem.....	87

Resumen

El presente trabajo se realizó para evaluar los efectos de extractos acuosos de hojas y semillas Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) sobre polilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.) en condiciones de laboratorio. Se determinó los porcentajes de mortalidad, la dosis letal 50 (DL_{50}) y el tiempo letal promedio (TL_{50}) para larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a diferentes concentraciones (dosis) de extractos de hojas y semillas. Tanto las semillas como las hojas de *A. indica* se cosecharon en los parques de la ciudad de Cúcuta (425 msnm), Norte de Santander, colectando de los árboles, los frutos con epicarpio color verde-pálido debido a que este estado fenológico es la etapa que mayor contenido de azadiractina se acumula en la semilla. A partir de la concentración o solución madre, tanto de los extractos de hojas y los extractos de semillas al 100% (100.000 mg/l), se obtuvieron las disoluciones al 66% (66.000 mg/l) y 33% (33.000 mg/l). El diseño experimental consistió de un modelo estadístico completamente al azar, tanto para los extractos de hojas como para los extractos de semillas de *A. indica*; cada uno con cuatro tratamientos y cada tratamiento con 5 repeticiones y cada repetición con cinco unidades experimentales. Cada Unidad Experimental estuvo constituida por una larva, con su correspondiente disco de 3 cm de diámetro de hoja de repollo con su tratamiento respectivo (100 unidades experimentales en cada extracto). Las larvas de segundo instar larval (L_2), provenían de una cría masiva que se había establecido en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, a partir de larvas colectadas en el CISVEB y en la Normal de Pamplona. Los Tratamientos fueron aplicados sumergiendo discos de hojas de repollo de 3 cm de diámetro en cada concentración. Una vez instalado el experimento se iniciaron observaciones cada 6 horas durante 4 días. Al quinto día, el disco sin tratamiento fue cambiado y luego cada tres días, para que las larvas continuaran su desarrollo. Los datos, fueron analizados estadísticamente por medio del Software SPSS

Statistics 26.0 y con pruebas de Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Con Análisis de Regresión se encontró la DL_{50} y el TL_{50} . Se determinó que el tratamiento con extracto de semilla 100%, 66% y 33% obtuvieron el 96%, 84% y 68% de mortalidad de las larvas, en comparación al tratamiento con extracto de hoja 100%, 66% y 33%, en donde se obtuvieron el 84%, 64% y 36% respectivamente en cuanto a la mortalidad en comparación con el Control que fue del 0%. En cuanto al DL_{50} , en el caso de los tratamientos con extracto de semilla fue de 37.000 mg/L y de los tratamientos con extracto de hoja fue de 57.250 mg/L. por otra parte en cuanto al TL_{50} el cual es el valor medio del intervalo de tiempo, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada, Se determinó que la dosis de 100% de extractos de semillas mata el 50% de la población a las 22 horas, la dosis 66% lo hace a las 36 horas y la dosis 33% mata la mitad de la población a las 57 horas, en el caso de los extractos de hoja, se determinó la dosis 100% mata el 50% de la población a las 39 horas, la dosis 66% lo hace a las 55 horas y la dosis 33% mata la mitad de la población a las 114 horas. Lo anterior indica que la aplicación de una solución de semilla al 100% es más efectiva para el control de la plaga problema en condiciones de laboratorio, debido al alto contenido de terpenoides. La duración hasta la emergencia de los imagos y su sobrevivencia también fue afectada por los tratamientos con extractos de hojas de neem, emergiendo solamente dos adultos (8%) a los 50 días en la dosis 66.000 mg/l; seis adultos (24%) a los 46 días en la dosis 33.000 mg/l; mientras que, en el Control emergieron 24 imagos a los 34 días, con una sobrevivencia del 96%.

Palabras clave: Polilla de las crucíferas, extractos de neem, mortalidad, dosis letal media, tiempo letal medio.

1 Introducción

El deterioro del medio ambiente y el perfeccionamiento de la calidad de vida del hombre, son dos de los factores más importantes que motivan al ser humano a buscar nuevos métodos o procesos de producción alimenticia, todo esto con una perspectiva generalizada de obtener una mejor rentabilidad y comercio, pero en un porcentaje considerable de los casos no se tiene en cuenta los efectos adversos, que pueden llegar a generar cierto tipo o método de producción a implementar, como lo son nuevos problemas asociados a plagas y enfermedades agrícolas sino se realiza los manejos adecuados y cuyos métodos de control como lo es el químico están modificando y deteriorando el ecosistema que se encuentra alrededor de estos.

Los cultivos de hortalizas constituyen un renglón agrícola de importancia económica y cultural para los productores de todas las regiones del mundo. En América Latina las principales hortalizas sembradas presentan variaciones temporales en cuanto a las áreas dedicadas a su cultivo, los volúmenes de producción y el consumo por las personas, esto es derivado de factores tales como la cultura, el clima y la dieta que se lleve a cabo en cada lugar en específico, su importancia también radica en su valor nutricional, debido a que estas son usadas en el campo culinario para el acompañamiento de ensaladas, además de amplia superficie sembrada de la cual se deriva el sosteneamiento de un importante sector agrícola y campesino y grandes generadores de empleo en el campo y la agroindustria

La principal plaga de las hortalizas en el mundo es la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L., conocida también como polilla de la col o polilla del repollo, es una especie de insecto lepidóptero de la familia Plutellidae que ha llegado a ser verdaderamente cosmopolita y es la única de todo el Orden Lepidoptera con una distribución continua y global. Se ha convertido en la plaga más destructiva de cosechas

de plantas cultivadas de la familia Brassicaceae, como distintas variedades de Brassica oleracea, como *B. oleracea* var. capitata (repollo) y *B. oleracea* var. botrytis (coliflor). Es muy difícil de controlar debido su ciclo biológico es muy corto y aplicación indebida de productos químicos, por lo cual ha desarrollado resistencia a numerosos plaguicidas. De hecho, es la primera especie en desarrollar resistencia a diclorodifeniltricloroetano (DDT), durante la década de 1950, y frente a toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (toxinas Bt), durante la década de 1990. (Brenes, 2000). Sus poblaciones pueden alcanzar frecuentemente el 75% del total de insectos en un cultivo y causan pérdidas de hasta el 90% en la producción.

El caso específico del uso de *A. indica* se ha demostrado que su principal compuesto plaguicida es la azadiractina (Aza), que está presente mayormente y en altas concentraciones en las semillas, exhibiendo una mejor actividad biológica. Este tipo de insecticida ejerce un amplio control en los distintos órdenes de insectos como Blattodea, Caelifera, Dermaptera, Diptera, Ensifera, Heteróptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Phasmida, Phthiraptera, Siphonoptera y Thysanoptera.

Debido a los daños causados por la polilla dorso diamante (*P. xylostella*), considerada una plaga primaria de cultivos de la familia Brassicaceae, incluyendo especies silvestres y cultivadas y dada la importancia del cultivo a nivel nacional e internacional, además de la problemática generada por los métodos de control usados en esta, se hace necesario investigar un método de control eficaz para la plaga y que no cause un impacto que modifique de forma negativa la zona donde se tiene establecido el cultivo, como es el caso de uso de extractos de Neem.

2 Problema y descripción del problema

Actualmente cuestiones como el deterioro del medio ambiente y el mejoramiento de la calidad de vida del ser humano, son dos de los factores más cruciales que motivan al ser humano a optar por nuevos métodos o procesos de producción de alimentos ya sea artesanal o industrial, todo esto con un enfoque generalizado de obtener una mejor rentabilidad y comercio, sin embargo en muchos de los casos esto se realiza sin tener en cuenta los impactos negativos, que conllevan a generar nuevos problemas asociados a plagas y enfermedades agrícolas cuyas métodos de control como lo es el químico están deteriorando el ecosistema que se encuentra alrededor de estos.

Las hortalizas constituyen un renglón agrícola de importancia económica para los productores de todas las regiones del planeta. En el continente de América mas exactamente América Latina, las principales producciones hortalizas sembradas presentan variaciones temporales en cuanto a las áreas dedicadas a su cultivo, los volúmenes de producción implementados y el consumo percapita, esto es ocasionado por factores tales como la cultura, el clima y la dieta alimenticia que se lleve a cabo en cada lugar en específico, su importancia también radica en su valor nutricional, ya que estas son usadas en el campo culinario para el acompañamiento de ensaladas, de igual forma de amplia superficie sembrada de la cual se deriva el sosteneemiento de un importante sector agrícola y campesino y grandes generadores de empleo en el campo y la agroindustria

En nuestro país el consumo de hortalizas como son las crucíferas (Brócoli, coliflor, repollo, rábano) entre otras comestibles, son de gran importancia formando parte de la dieta alimentaria del hombre debido a su poder nutricional . En la actualidad la horticultura se encuentra bastante difundida en lo largo del país, aunque su estado fitosanitario no sea el más

adecuado actualmente el manejo o control de plagas y enfermedades, se basa en el uso de productos químicos en gran parte de manera desmesurada lo que está provocando problemas en el cultivo productos comercializables y en el medio ambiente.

A pesar de la importancia de la plaga y a la necesidad de frecuentes aplicaciones de insecticidas, se han realizado pocos trabajos que permitan determinar la presencia de agentes que contribuyan al control natural, biológico o fitoquímico y la incidencia que tienen en la densidad poblacional de la plaga; Una de estas plagas cosmopolita muy destructiva y de gran importancia económica en los cultivos comerciales de la familia Brassicaceae es la polilla del repollo, *P. xylostella* (Talekar & A, 1993).este se reconoce por ser un insecto plaga, con gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas, además que posee aún una alta variabilidad genética que unida al corto período generacional le permite lograr rápidamente resistencia a diferentes insecticidas que se distribuyen comercialmente.

3 Justificación

Según diferentes estudios en el sector de las hortalizas, en la actualidad para el control de la *P. xylostella*, se utilizan insecticidas de síntesis química, como piretroides, carbamatos y organofosforados, los cuales tienen acción inmediata, pero causan efectos adversos en la salud y en el ambiente. Adicionalmente, la ausencia de enemigos naturales capaces de controlar a sus poblaciones, y su resistencia a numerosos insecticidas convencionales hacen que este insecto se establezca rápidamente en áreas productoras de brassicáceas. Se calcula que los costos mundiales asociados al control de *P. xylostella*, sumados a las pérdidas en la producción agrícola, están entre cuatro y cinco billones de dólares anuales (Arregui, 2010).

Debido a lo anterior, este proyecto tuvo como finalidad comprobar el efecto que tiene la aplicación de extractos de Neem para el control de *P. xylostella*, la cual se reconoce como una de las plagas limitantes para los cultivos de la familia de las Brassicaceae a la cual pertenece el repollo. El control para esta plaga se realiza en su mayoría con productos químicos, sin embargo estos no son muy adecuados para el cultivo debido a que el uso excesivo de estos puede bajar la calidad del producto limitando el ingreso a diferentes mercados, de igual forma provoca la creación de resistencias de la plaga a estos productos en muy poco tiempo, además que altera el entorno debido a que afecta la población de polinizadores y controladores naturales, por ende se pone sobre la mesa la implementación de nuevas prácticas innovadoras que no solo controlen la plaga si no que sean amables con el medio ambiente.

4 Objetivos

4.1.General

- Determinar la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* L., bajo condiciones de laboratorio.

4.2.Específicos

- Determinar la mortalidad causada por extractos acuosos de hojas y semillas de *A. indica*, sobre *P. xylostella*.
- Encontrar la DL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *A. indica*, sobre *P. xylostella*.
- Precisar el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *A. indica*, sobre *P. xylostella*.
- Establecer el efecto de los extractos acuosos de hojas y semillas de *A. indica*, sobre la duración de los estados de desarrollo de *P. xylostella*.

5 Marco referencial

5.1. Antecedentes regionales

- Jhonatan Gualdrón-Panqueva, Deisy Viviana Toloza-Balcucho y Humberto Giraldo-Vanegas (2017). Evaluación de extractos de Neem *Azadirachta indica* A. Juss, como repelente e insecticida contra la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae), en la variedad Castillo en la Granja Experimental Villa Marina de la Universidad de Pamplona.

Resumen: se evaluó la mortalidad y el efecto repelente causado por extractos de hojas y semillas neem *Azadirachta indica* A. Juss, contra la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari, en la variedad Castillo. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con siete tratamientos: Semillas 33%, Semillas 66%, Semillas 100%, Hojas 33%, Hojas 66%, Hojas 100% y Control y cuatro repeticiones. Los extractos se prepararon a partir de una solución madre compuesta por 2 kg de semillas maceradas en 20 L de agua y una solución madre compuesta por 2 kg de hojas maceradas en 20 L de agua. A partir de estas soluciones madre se prepararon las disoluciones al 33% y 66% de hojas y semillas. Las unidades experimentales consistieron en ramas productivas con granos entre dieciséis y veinte semanas de desarrollo. Tratada cada unidad experimental y colocada una manga entomológica, fue infestada con diez hembras de broca. Se evaluaron durante quince días los granos brocados y mortalidad. Para el análisis de los datos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), se empleó una prueba de Tukey para la comparación de medias, cuando este resultaba significativo, Se determinó que los tratamientos Semilla 66%, Semilla

100% y Semilla 33% solo permiten 11,15%, 12,50% y 14,50% de granos brocados respectivamente, mientras que el Control presenta el 55% de granos brocados. Los tratamientos Semilla 66%, Hoja 33% y Semilla 100% causaron los más altos porcentajes de mortalidad con 49%, 44,5% y 41,50%, mientras que el Control presentó solamente 9% de mortalidad. Se encontró efecto negativo de los extractos de hojas y semillas de neem en la tasa reproductiva de *H. hampei*. Se concluyó que los tratamientos a base de extractos acuosos de semillas de Neem presentaron los mejores resultados. El uso de bioplaguicidas en el agroecosistema del cultivo del café es viable, pudiendo ser una alternativa nueva para aplicar en el Manejo Integrado de la Broca del Café. A partir del primer día, después de la aplicación de los tratamientos se observaron los efectos inmediatos en mortalidad y repelencia, esto debido principalmente al alto contenido de azadirachtina que actúa como repelente y fagodisuasivo

- Jhayyers Stefan Silva-Lizarazo y Humberto Giraldo-Vanegas (2018). Ciclo biológico de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) y sus Enemigos Naturales en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB), Pamplona, Norte de Santander

Resumen: Se realizó la biología de *Plutella xylostella* (L.), conocida como la polilla dorso diamante o polilla del repollo, en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB) y en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, de la Universidad de Pamplona. La colecta de los estados inmaduros y adultos de *P. xylostella* y sus enemigos naturales se hizo en los huertos hortícolas experimentales (CISVEB); mientras que la parte experimental en el Laboratorio de Sanidad Vegetal. Bajo condiciones de temperatura de 16,9°C a 18,9°C, Humedad Relativa promedio de 73,8 %, se inició una cría masiva de *Plutella sp.*, para realizar las observaciones y toma de datos sobre el ciclo biológico del

insecto. La duración promedio del ciclo de vida fue de 57,06 días, pasando por huevo con duración de $9,11 \pm 1,242$ días; estado larval fue de $19,54 \pm 2,620$ días, y la duración del estado de pupa fue de $9,93 \pm 1,698$ días. Se determinaron cuatro instares larvales aplicando la Ley de Dyar (1.980); la anchura promedio de las cápsulas cefálicas fue de: 0,144 mm larva I; 0,253 mm larva II; 0,405mm larva III; 0,599 mm larva IV. La oviposición de las hembras fue de 43,66 huevos con una duración de $28 \pm 8,08$ días; la longevidad promedio de los adultos fue de $18,48 \pm 5,124$ días. Se determinaron los parasitoides de huevos *Trichogramma* sp., el parasitoide de larvas *Diadegma insulare* (Cresson) y los depredadores *Harmonia axyridis* (Pallas), *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville y *Chrysoperla* sp.

5.2. Antecedentes nacionales

- Natalia Vinasco-Arias¹ y Alberto Soto-Giraldo (2014). efecto insecticida de *Azadirachta indica* a. juss sobre *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae). Departamento de Producción Agropecuaria, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia
[http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia22\(1\)_4.pdf](http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia22(1)_4.pdf)

Resumen: La mosca blanca *T. vaporariorum* es una de las principales plagas de cultivos hortícolas debido a que los adultos e inmaduros succionan la savia de las hojas, lo que debilita las plantas e impide el desarrollo normal de los frutos. En este trabajo fue estudiado en laboratorio los efectos letales y subletales del extracto comercial de semillas de neem Bioneem® en el crecimiento poblacional de la mosca blanca *T. vaporariorum*. Los efectos letales fueron estimados a través de test de toxicidad aguda con obtención de curvas dosis-respuesta y sus respectivas concentraciones letales, y los efectos subletales a través de

la estimativa de la tasa instantánea de crecimiento poblacional (ri). Las concentraciones letales y subletales del Bioneem® para *T. vaporariorum* fueron 1,86 y 0,89% del producto, respectivamente, lo que indica que podría utilizarse para el control de la plaga.

- Sáenz, Adriana. (2012). Susceptibilidad de *Plutella xylostella* L. a *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Revista Colombiana de Entomología, 38 (1), 94-96. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v38n1/v38n1a16.pdf>

Resumen: *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) conocida como polilla dorso de diamante (DDM) es una de las plagas más importantes en cultivos de crucíferas en Colombia. La estrategia de control más utilizada ha sido el uso de insecticidas de síntesis química como piretroides, carbamatos, organofosforados y reguladores de crecimiento. Como una alternativa de control, se evalúa la susceptibilidad del tercer instar de DDM al nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. SL0708 en condiciones de laboratorio. Se probaron cinco dosis de juveniles infectivos (JI) (0, 100, 300, 600, 1200 JI/ml/5 larvas) y se evaluó cada 24 horas la sintomatología, mortalidad y recuperación de JI. Las larvas afectadas por *Heterorhabditis* sp. SL0708 presentaron cambios de coloración de verde a marrón claro, se mostraron poco móviles y con cuerpo flácido. Algunas larvas alcanzaron a mudar a pupa y se observó el desarrollo de adultos de primera generación. El porcentaje promedio de mortalidad fue de 95,6%, con un tiempo de mortalidad entre las 48 y 72 horas. La dosis que mostró diferencias significativas fue 100 JI. De las larvas infectadas por tratamiento se recuperó en promedio diariamente 2.743 JI en cinco días. Las larvas de *P. xylostella* fueron susceptibles a los JI de *Heterorhabditis* sp. SL0708, indicando que se debe continuar evaluando su capacidad patogénica en invernadero y campo.

5.3. Antecedentes internacionales

- Daniel Antonio Villamil Montero, Natalia Naranjo, Mario Andres Van Strahlen (2012). Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* (Stal) (Hemiptera: Miridae). Departamento de Horticultura, Universidade Estadual Paulista
https://www.researchgate.net/publication/287135276_Efecto_insecticida_del_extracto_de_semillas_de_Neem_Azadirachta_indica_sobre_Collaria_scenica_Stal_Hemiptera_Miridae.

Resumen: evaluar el efecto insecticida del extracto etanólico de semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre ninfas de la chinche de los pastos *Collaria scenica* Stal. Para eso, se elaboró un extracto a partir de frutos inmaduros de Neem mediante rotaevaporación. El extracto fue diluido en tres concentraciones de ppm que corresponden a los tratamientos. Por medio de cromatografías en capa delgada se determinó la presencia de azaridactina. Se realizó un experimento DCA de 4 tratamientos y 5 repeticiones que incluyó las tres concentraciones del extracto y un control. En cada repetición se usaron 15 ninfas, colocadas aleatoriamente en cajas plásticas herméticas con alimento y la concentración correspondiente. Diariamente se realizó una aplicación del extracto y se registró porcentaje de mortalidad, número de exuvias y número de individuos que llegaron al estado adulto en cada tratamiento. Los resultados fueron analizados con prueba Kruskal-wallis y GamesHowell para cada variable. Las tres concentraciones del extracto de semillas de Neem presentaron un efecto negativo sobre el desarrollo de las chinches. El tratamiento más concentrado (250 ppm) fue el más eficaz presentando una mortalidad del 97%, menor número de exuvias y menor número adultos al final del ensayo.

- Shelton, A. M., Long, S. J., Walker, A. S., Bolton, M., Collins, H. L., Revuelta, L., ... & Morrison, N. I. (2020). Primer lanzamiento en el campo de un insecto de plaga agrícola autolimitado genéticamente: evaluación de su potencial para la protección de cultivos en el futuro. *Fronteras en Bioingeniería y Biotecnología*, 7, 482. <https://n9.cl/twx0>

RESUMEN : Se necesitan con urgencia enfoques alternativos, basados en la biología para el manejo de plagas, y un enfoque es utilizar insectos genéticamente modificados. A continuación, describimos una serie de estudios integrados de campo, laboratorio y modelado con la polilla del lomo del diamante, *Plutella xylostella* L., una plaga mundial grave de crucíferas. Una cepa "autolimitada" de *Plutella xylostella* L. (OX4319L), diseñado genéticamente para permitir la producción de cohortes de polillas solo para machos para la liberación en el campo, se desarrolló como un enfoque novedoso para proteger los cultivos de crucíferas. Las hembras de tipo salvaje que se aparean con estos machos autolimitados no producirán progenie femenina viable. Nuestros estudios previos en invernadero demostraron que las liberaciones de machos OX4319L conducen a la supresión de la población objetivo de plagas y a la dilución de los genes de resistencia a los insecticidas. Presentamos los resultados de la primera liberación en campo abierto de una cepa autolimitada no irradiada y genéticamente modificada de un insecto plaga agrícola. En una serie de estudios de campo de marca-liberación-recaptura con co-liberaciones de machos OX4319L adultos y sus contrapartes de tipo salvaje, se midió la dispersión, persistencia y supervivencia de campo de cada cepa en un campo de col de 2,83 ha. En la mayoría de los casos, No se detectaron diferencias en estos parámetros. En general, el 97.8% de los machos de tipo salvaje y el 95.4% de los machos OX4319L recapturados se dispersaron a menos de 35 m del punto de liberación. La persistencia prevista no difirió entre las cepas independientemente de la velocidad de liberación. Con una confianza del 95%, se podría esperar que el 75% de los

machos OX4319L liberados a una velocidad de 1,500 vivan entre 3.5 y 5.4 días y se espera que el 95% de estos machos se detecten dentro de los 25.8-34.9 m desde el punto de liberación. La cepa de la polilla no tuvo efecto en la supervivencia del campo, pero la tasa de liberación sí. En conjunto, estos resultados sugieren un comportamiento de campo similar de los machos OX4319L en comparación con su contraparte de tipo salvaje. Los estudios de laboratorio no revelaron diferencias en la competitividad de apareamiento o tasas de crecimiento intrínseco entre las cepas y pequeñas diferencias en la longevidad. Usando los resultados de estos estudios sobre *P. xylostella*, se recomiendan más estudios de campo para demostrar el potencial de esta *P. xylostella* autolimitada para proporcionar supresión de plagas y beneficios de manejo de resistencia, como se demostró previamente en estudios de invernadero.

6 Marco contextual

Este trabajo se llevó a cabo en el municipio Pamplona, ubicado en el departamento de Norte de Santander, está situado en las coordenadas de $7^{\circ} 22' 34''$ de latitud Norte y a $72^{\circ}38' 54''$ de longitud al Oeste de Greenwich, se encuentra situada a 2.586 msnm. Pamplona, limita al Norte con Pamplonita y Cucutilla, al sur con los municipios de Cácosta y Mutiscua, al oriente con Labateca y al occidente con Cucutilla. Su extensión territorial total es de 456 Km², con 76. 983 habitantes aproximadamente. Y su temperatura promedio de 14 a 16°C. Su economía está basada en la gastronomía, la agricultura, el turismo (especialmente el turismo religioso) y la educación.

Con exactitud esta investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en la Universidad de Pamplona, a $7^{\circ} 23' 14''$ de latitud Norte y a $72^{\circ}39' 1''$ de longitud al Oeste de Greenwich, a una altura de 2480 metros sobre el nivel del mar el cual cuenta con una temperatura promedio de 17 °C y 65% de humedad relativa.

Figura 1

Laboratorio de Sanidad Vegetal,



Fuente: Google maps

7 Marco teórico

Las plagas son factores que influyen drásticamente en el rendimiento de las crucíferas; esto se debe a que principalmente atacan la parte comercial, *Plutella xylostella* L., es una plaga cosmopolita y causa serios daños económicos en repollo. Es considerada como la plaga clave de crucíferas en las zonas bajas y cálidas de Centroamérica, (Trabanino, 1998).

La palomilla dorso de diamante se alimenta básicamente de plantas de la familia de las crucíferas, entre las que se encuentran los cultivos de repollo (*B. oleracea* var. *capitata*), coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócoli (*B. oleracea* var. *itálica*), rábano (*R. sativus*), nabo (*B. rapa* *pekinensis*), col de Bruselas (*B. oleracea* var. *gemminifera*), col china (*B. rapa* var. *pekinensis*), mostaza (*B. juncea*) y colza. (Talenkar y Shelton, 1993), y (Martínez, 2013).

Los metabolitos extraídos de ciertas plantas, como el neem (*Azadirachta indica* A. Juss), tienen como ventaja ser biodegradables y no producir desequilibrio en los ecosistemas, al ser de origen vegetal. Estos bioinsecticidas provocan un impacto mínimo sobre la fauna benéfica; son efectivos contra las plagas agrícolas y no tienen restricciones toxicológicas (Giraldo-Vanegas et al., 2006; Gualdron-Panqueva, Toloza-Balcucho y Giraldo-Vanegas 2017).

Se registran más de 400 especies de insectos que pueden ser controladas con bioplaguicidas basados en neem. Igualmente, este insecticida vegetal actúa como nematocida, fungicida, molusquicida, acaricida, bactericida y se conocen casos como viricida. Los extractos de neem actúan en los insectos como fagodisuasivo antialimentario, inhibidor de crecimiento, disminuye la fecundidad y la oviposición, disminuye los niveles de proteínas y aminoácidos en la hemolinfa e interfiere la síntesis de la quitina. Estas características hacen

que las sustancias obtenidas del neem no funcionen como tóxicas, sino que intervienen en los procesos químicos y fisiológicos de los insectos. Se ha demostrado que insecticidas a base de neem, ayudan a disminuir la resistencia de algunos insectos; pues el neem reduce los niveles de enzimas de detoxificación, haciendo a los insecticidas más eficaces (Lowery y Smirle, 2000; citado por Giraldo-Vanegas et al., 2006).

El neem contiene miles de componentes químicos, de los cuales hay más de 100 limonoides (terpenoides), compuestos por C, H y O; lo cual los hace muy solubles en agua y otros compuestos orgánicos, facilitando esto su extracción. La extracción se puede realizar con solventes orgánicos (alcoholes, ketones, éteres), por destilación a vapor y por extractos crudos con agua. El terpenoide más importante es la azadirachtina, de la que existen varios tipos que varían desde la azadiractina A a la azadiractina K. La azadiractina, es un limonoide complejo que presenta nueve isómeros, y fue aislado de semillas de neem en 1968 por Butterworth y Morgan. Además, de la azadiractina, en las semillas, existen otros compuestos importantes como la azadirona, geduninina, neembina, neembolina y salanina; mientras que en las hojas frescas de neem se encuentran la amorastaitina, vilasinina, neembina y salanina. La azadiractina tiene una compleja estructura molecular, y como resultado de esto la primera síntesis no fue publicada hasta 22 años después de que el compuesto fuera descubierto. La primera síntesis total fue completada por el químico Ley en 2007. Los grupos hidroxilos secundarios y terciarios y éter tetrahidrofurano están presentes y la estructura molecular revela 16 centros estereogénicos, siete de los cuales son tetrasustituídos. Estas características explican la gran dificultad que se encuentra cuando se trata de preparar este compuesto a partir de precursores simples, utilizando métodos de química orgánica sintética. En los laboratorios y las pruebas de campo se ha demostrado que es demasiado compleja para que las plagas desarrollen resistencia. Esta condición ha evitado su síntesis, lo cual es un obstáculo para su uso más generalizado como biocida. (Gemma E.

Veitch, Edith Beckmann, Brenda J. Burke, Alistair Boyer, Sarah L. Maslen, Steven V. Ley (2008).

La azadirachtina, interfiere en el sistema hormonal, en las glándulas anexas al cerebro, la corpora cardiaca y la corpora allata, donde se produce la neurohormona PTTH, que regula la biosíntesis de las hormonas de la metamorfosis, la gonadotropiecdysona y la hormona juvenil. La azadirachtina, inhibe la biosíntesis de PTTH y como consecuencia no hay biosíntesis de estas hormonas, lo que imposibilita los pasos de la muda e inhibe la maduración de los huevos (Morgue y Nisbet, 2000; citados por Giraldo-Vanegas et al., 2006).

El uso de los extractos de neem no se limita al control de plagas agrícolas. Se ha encontrado que son efectivos en el control de ectoparásitos del ganado vacuno como la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini) y como vermífugo, en gallinas ponedoras para el control del ácaro *Megninia gynglimara* Megnin y del piojo aviar *Menopon gallinae* L., lo mismo que para el control de los ácaros de la sarna cunícula y porcina. piojos, pulgas y otros ectoparásitos de los aneemales domésticos también se han controlado con resultados excelentes. Igualmente, se ha utilizado para el control de *Meccus pallidipennis* Stål (Hemiptera: Reduviidae) uno de los vectores responsables de la transmisión del parásito *Trypanosoma cruzi* Chagas (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), causante de la enfermedad conocida como tripanosomiasis o Mal de Chagas (Gutiérrez et al.,2018).

7.1. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

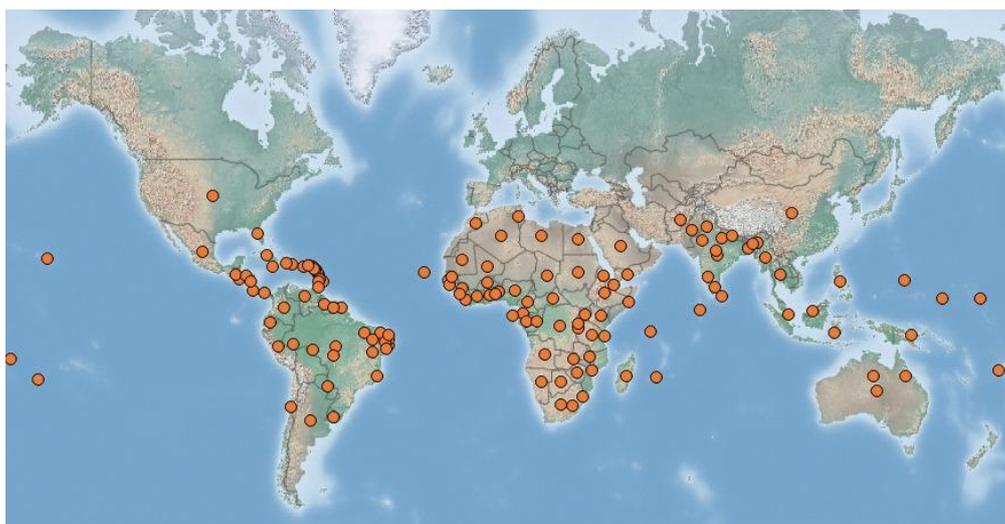
7.1.1. Origen y distribución del neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

El neem es una planta cuyo origen exacto es incierto, la mayoría coincide en que es originario de zonas secas de la India y Birmania, ubicados en la región tropical del Suroeste Asiático, otros lo ubican, en las áreas secas del Sur y Sureste Asiático, incluyendo Pakistán, Birmania, Tailandia, Malasia e Indonesia (Gutiérrez et al.,2018).

En la actualidad se encuentra distribuido en más de 78 países, en el continente asiático, africano, Oceanía, y Centro América. Se estima que en el mundo existen alrededor de 200 millones de árboles, la mayor parte de ellos en Asia, donde crecen bajo cultivo y en forma silvestre, particularmente en la India (Gutiérrez et al., 2018).

Figura 2

Distribución mundial del neem.



Fuente: (CABI, 2019).

7.1.2. Generalidades y morfología *Neem* (*Azadirachta indica* A. Juss)

El neem, conocido por su pronunciación inglesa “neem” es un árbol que mide de cuatro o cinco metros de altura, con hojas pequeñas de color verde intenso, frutos arracimados de forma cónica y de color amarillo, que destacan entre el follaje. Por su belleza y originalidad se utiliza como árbol de tipo ornamental. Procede de la India, su nombre científico es (*Azadirachta indica* A. Juss) y pertenece a la familia Meliaceae (González, 2002).

7.1.3. Clasificación y descripción botánica

El neem tiene como nombre científico (*Azadirachta indica* A. Juss) y pertenece a la familia Meliaceae, a la cual también pertenece el “cedro”, la “caoba”, el “paraíso” (piocha o canelo). La clasificación del neem la describe (Baley, 1977).

Tabla 1

Clasificación taxonómica del cultivo del neem

TAXONOMÍA	NOMBRE
Reino	Vegetal
División	Embriofitas
Sub-división	Angiospermas
Clase	Dicotiledonea
Orden	Geraniales
Familia	Meliaceae
Género	<i>Azadirachta</i>
Especie	<i>Azadirachta indica</i>

Fuente: (Baley, 1977.)

El neem es un árbol de crecimiento rápido, robusto, de hoja perenne, siempre verde y frondosa. Sus características botánicas se describen a continuación.

7.1.3.1. Árbol.

El tronco del neem crece recto y alcanza un grosor hasta de 2.5 m; la corteza es de color gris rojizo y de un espesor hasta de 2.5 cm (Figura 3); el árbol puede alcanzar una altura de 30 m y un diámetro de copa de 25 m; puede vivir por más de 200 años (Baley, 1977).

7.1.3.2. Raíz

Presenta una raíz principal pivotante de rápido crecimiento y desarrollo, clave para resistir la sequía, lo que permite vivir en suelos muy pobres, alcanza hasta el doble de la altura del árbol, con esto permite extraer nutrientes del subsuelo profundo (González, 2002).

7.1.3.3. Hoja

Es peciolada de forma aserrada y de alrededor de 7 a 10 cm de largo, y ancho de 3 a 4 cm; cuando son jóvenes (retoños) son de color rojo cobrizo, al madurar cambian a verde oscuro. Las hojas se agrupan en foliolos de 35 cm de largo, con una separación entre hojas de 3 a 4 cm. Cada foliolo presenta 7 pares, las hojas son compuestas imparipinadas más una terminal (Figura 4). La caída de hojas del árbol ocurre solo bajo extrema sequía o después del daño por heladas (González, 2002).

Figura 3

Árbol de neem de tres años de edad.



Fuente: Inifap, (2004).

Figura 4

Hojas de neem



Fuente: Inifap, (2004).

7.1.3.4. Flor.

Es pequeña de 5 mm, blanca, crema o amarillenta, bisexual, actinomorfa, que crece en racimos de hasta 22 cm de largo de manera axilar; en plena floración su aroma y néctar facilitan su polinización. La floración depende de las condiciones edafoclimáticas de cada región y su fecundidad depende de la cantidad de iluminación recibida, así como de la humedad del suelo, las que estimulan e inhiben el aborto floral (Cruz, 1998).

Figura 5

Flor de neem.



Fuente: Inifap, (2001).

7.1.3.5. Fruto.

Es una drupa elipsoidal, lisa 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 torna amarillenta. La pulpa es jugosa y dulce, consumible por humanos, aves y aneemales; además, encierra a la semilla. El fruto tiene maduración desuniforme, no simultánea (ya que es posible ver en una misma rama flores, frutos inmaduros y frutos maduros), debido al brote secuencial de flores; en México maduran la mayoría de los frutos entre los meses de julio y septiembre (González, 2002).

Figura 6

Fruto de neem



Fuente: Inifap, (2001).

7.1.3.6. Semilla

Tiene forma elipsoidal, mide alrededor de 1.4 cm de largo y 6.5 mm de ancho, está envuelta de una cáscara color café que contiene una semilla y algunas veces hasta dos. Esta es la parte más importante del árbol porque en ella se almacenan todas sus propiedades (González, 2002).

Figura 7

Semilla de neem



Fuente: Inifap, (2004).

7.2. Origen y distribución de *Plutella xylostella* L.

La polilla dorso de diamante es originaria del Mediterráneo, centro de origen de las más importantes especies de la familia crucífera. Este insecto ha sido encontrado en todas las partes del mundo donde se cultiva este tipo de plantas. Se estima que es la especie de Lepidoptera de más amplia distribución, hoy día puede encontrarse en toda América, Europa, Sudeste Asiático, Australia, Nueva Zelanda, India, y África. Ha sido reportada en más de 80 países (Omaña,2016).

Una de las causas por las que la palomilla dorso de diamante causa severos daños en varios países es la ausencia de fauna benéfica natural, especialmente parasitoides (Omaña, 2016).

Lo cual se debe a la capacidad de la plaga para establecerse rápidamente en nuevas áreas productoras, y a su habilidad para emigrar a otras áreas ubicadas a grandes distancias en donde no existe suficiente control biológico asociado (Omaña,2016).

Figura 8

Distribución mundial de *P. xylostella*.



Fuente: (CABI, 2019).

La polilla dorso diamante se ha convertido en uno de los insectos plaga más nocivo para los cultivos de crucíferas en el mundo y su manejo ha ocasionado un alto incremento en los costos de producción de un billón de dólares anualmente causa un costo para su manejo de un billón de dólares. (Talekar y Shelton), 1993 (citados por Martínez, 2013).

7.2.1. Descripción

La polilla dorso de diamantes un insecto holometábolo. Los huevos son de forma ovalada, de color amarillo y miden aproximadamente 0.5 mm. Son colocados de preferencia en el envés de las hojas. Después de la eclosión, la larva de primer instar tiene un color amarillo pálido, con la cápsula cefálica oscura. Las larvas de estadios siguientes van adquiriendo un color verde claro el cual se hace más intenso con el desarrollo; el último par de falsas patas está separado ampliamente formando una V invertida, convirtiéndose ésta en una característica útil para su identificación. Durante el estado de pre-pupa la larva teje un

capullo blanco dentro del cual se convierte en pupa. La pupa mide 0.5-0.6 cm de longitud y es de color verde claro (Muñiz, 2013).

7.2.2. Taxonomía

Figura 9

Clasificación Taxonomía de *P. xylostella*,

Reino :	Animal
Phylum :	Artrópoda
Clase:	Insecta
Orden:	Lepidóptera
Suborden:	Frenatae
Súper Familia:	Yponomeutoidea
Familia:	Plutellidae
Genero:	Plutella
Especie	<i>P. xylostella</i>

Fuente: (Brenes, 2000)

7.2.3. Morfología y Biología

La palomilla dorso de diamante es una plaga que presenta metamorfosis completa; es decir, pasa por los estadios biológicos de huevecillo, larva, pupa y adulto (Martínez, 2013).

Las hembras ovipositan poco más de 200 huevecillos en forma individual, formando pequeños grupos de 2 o 3 en el envés y peciolos de las hojas, en los tallos y flores. Los huevecillos tardan en eclosionar de tres a nueve días dependiendo de la

temperatura ambiental. Después de la eclosión de los huevecillos, las larvas inician inmediatamente su alimentación en el follaje; por lo general las larvas de primer y el segundo instar minan las capas cerosas epidérmicas de las hojas, consumiendo los tejidos del mesófilo esponjoso (Pérez, 2013).

Las de tercer y cuarto instar se alimentan por el envés, consumiendo toda la lámina foliar, excepto la capa cerosa del haz, creando con esto pequeñas ventanas en las hojas. Las larvas se pueden distinguir con facilidad por su hábito nervioso de retorcerse bruscamente o dejar caer a través de un hilo de seda cuando se les molesta. (Martínez, 2013).

Al final del cuarto instar cuando han terminado su periodo de alimentación, inician su estado prepupal. Durante el estado de prepupa la larva teje un cocón blanco dentro del cual se transforma en pupa; esta estructura la adhieren firmemente a diferentes partes de la planta. Las pupas tardan entre 5 y 13 días para transformarse en adultos dependiendo de la temperatura (Martínez, 2013).

El adulto hiberna debajo de los residuos de cosecha y en el suelo, encontrándose durante todo el año sobre crucíferas cultivadas, Los adultos se alimentan del néctar de las flores y de las gotas de agua que la humedad forma en las hojas. (Alatorre., 1992) y (Brenes, 2000).

El ciclo biológico de la palomilla dorso de diamante dura de 19 a 28 días, la cual pasa por los estadios biológicos de huevecillo, larva, pupa y adulta según el (Arregui & Sánchez, 2010).

7.2.4. Ciclo biológico

Silva-Lisarazo y Giraldo-Vanegas en 2018, trabajaron en la biología de *P. xylostella*, bajo condiciones en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Pamplona, determinando el tiempo que dura el insecto desde su estado de huevo hasta que se obtiene un nuevo adulto bajo dichas condiciones.

7.2.4.1. Huevos.

Su oviposición es de forma agrupada entre tres y cinco huevos en el envés de las hojas de repollo, son de color verde amarillentos cuando están recién ovipuestos, posteriormente cambian a un tono más oscuro en su maduración. Antes de eclosionar se puede observar claramente la cabeza oscura y el cuerpo de la larva, de forma casi esféricos (ovalado plano), y en la base un poco anchados. Se observó que la eclosión de los huevos se registró en su mayor parte, un 95% en horas de la mañana desde las 8:00 hasta las 11:00 de la mañana (Silva-Lisarazo y Giraldo-Vanegas, 2018).

7.2.4.2. Larvas.

Esta plaga posee cuatro estadios larvales, las que se caracterizan porque al ser molestadas se tuercen y se caen, quedando suspendida de la planta por un hilo de seda. Recién emergida la larva I, es de color cremoso pálido, posteriormente se oscurece un poco con un punto negro en el extremo que corresponde a la cabeza lo que es muy resaltante. La larva es segmentada en todo su cuerpo con todos sus espiráculos poco

visibles, todo el cuerpo con pequeñas vellosidades de color negro. Inician inmediatamente a alimentarse , consumiendo los tejidos del mesófilo esponjoso de la hoja provocando que esta se observe translúcida en la partes afectadas . Por otra parte en larva 3, su cuerpo es más desarrollado tornando de color grisáceo a verdusco pálido, es segmentada en todo su cuerpo cubiertos en su totalidad de espiráculos más marcados y visibles los cuales contienen pequeñas vellosidades de color negro. En larva 4 la defoliación es en porcentajes altos, debido a el desarrollo de su aparato bucal masticador y sus necesidades alimenticias, su color verde claro bien definido, con sus estructuras morfológicas bien marcadas (Silva-Lisarazo y Giraldo-Vanegas, 2018).

7.2.4.3. Pupa.

La formación de la pupa la realiza finalizando el cuarto instar larval, la cual se envuelve con un tenue capullo de seda blanquecino cubriéndose en su totalidad, a través del cual puede verse la pupa de tipo obtecta. Pasando de verde pálido a curuba o anaranjado claro y finalmente a marrón oscuro. Este capullo se adhiere tanto en el haz como en el envés de la hoja lo que se hace difícil moverlos (Silva-Lisarazo y Giraldo-Vanegas, 2018).

7.2.4.4. El adulto de *P. xylostella*

Se reconocen inicialmente por su tonalidad blanca cremosa en el dorso, dando forma de zig zag similar a un diamante que da origen a su nombre común. Sus alas son de tonalidad café pálido con un fleco de pelos largos al final. El macho a diferencia de la hembra, no se le distingue bien en el dorso la figura de diamante. Una de las características principales que

tiene esta especie es su diferencia de tamaño (dimorfismo sexual) lo cual los hace reconocibles. Los adultos son inactivos en las horas del día, por lo cual se cubren debajo de las hojas de repollo evitando la luz, su actividad es al atardecer y en la noche. En cuanto a la longevidad de los adultos, Su duración promedio fue de $18,48 \pm 5,124$ días, con una duración total en su ciclo de vida de 57,06 días (Silva-Lisarazo y Giraldo-Vanegas, 2018).

Figura 10

Vista superior de adulto macho(a), adulto hembra (b) de *P. xylostella*



Fuente: (Silva-Lisarazo y Giraldo-Vanegas, 2018)

8 Marco legal

8.1.Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas -plaguicidas- artículos pirotécnicos.

Artículo 130°.- En la importación, fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, manejo o disposición de sustancias peligrosas deberán tomarse todas las medidas y precauciones necesarias para prevenir daños a la salud humana, animal o al ambiente, de acuerdo con la reglamentación del Ministerio de Salud.

Plaguicidas.

Artículo 136°.- El Ministerio de Salud establecerá las normas para la protección de la salud y la seguridad de las personas contra los riesgos que se deriven de la fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, uso o disposición de plaguicidas.

Artículo 138°.- El registro que aprobare el Ministerio de Salud para plaguicidas destinados a uso agropecuario no exime a los interesados del cumplimiento de las disposiciones que para tales productos tengan establecidas las autoridades de agricultura.

Artículo 139°.- El Ministerio de Salud podrá autorizar la importación o fabricación de muestras de plaguicidas para fines de investigación, experimentación o registro. Cuando la experimentación con estos productos pueda causar daño a la salud de los trabajadores, de la población o del ambiente tal actividad debe someterse a la vigilancia de las autoridades de salud, las cuales exigirán la adopción de las medidas necesarias para prevenir o remediar tales daños.

Artículo 144°.- Los residuos procedentes de establecimientos donde se fabriquen, formulen, envasen o manipulen plaguicidas, así como los procedentes de operaciones de

aplicación no deberán ser vertidos directamente a cursos o reservorios de agua, al suelo o al aire.

8.2.Ministerio de salud decreto 775 del 16 de abril de 1990

Por el cual se reglamentan parcialmente los Títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.

Artículo 1° Del objeto del control y vigilancia epidemiológica. El control y la vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, deberá efectuarse con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro del ambiente.

Artículo 2° Régimen aplicable al uso y manejo de plaguicidas. El uso y manejo de plaguicidas estarán sujetos a las disposiciones contenidas en la Ley 09 de 1979, el Decreto 2811 de 1974, Reglamento Sanitario Internacional, las demás normas complementarias previstas en el presente Decreto y las que dicten los Ministerios de Salud y de Agricultura o sus institutos adscritos.

8.3.Ley 1252 del 2008

ARTÍCULO 2°. Principios. Con el objeto de establecer el alcance y contenido de la presente ley, se atenderán los siguientes principios:

- Mineemizar la generación de residuos peligrosos mediante la aplicación de tecnologías ambientalmente limpias y la implementación de los planes integrales de residuos peligrosos.
- Prohibir la generación, almacenamiento o eliminación de residuos o desechos peligrosos en ecosistemas estratégicos o importantes del país, en áreas protegidas o de

sensible afectación ecológica, zonas de influencia de humedales o zonas de protección, o recarga hídrica dulce o en mares u océanos.

- Implementar estrategias y acciones para sustituir los procesos de producción contaminantes por procesos limpios, inducir la innovación o reconversión tecnológica, las buenas prácticas de manufactura o la transferencia de tecnologías apropiadas.
- Ejercer una política de producción más limpia como estrategia empresarial, a fin de generar una conciencia y responsabilidad social que incluya el trabajo conjunto entre el Estado, la empresa, la academia y la comunidad para su diseño y ejecución, que involucre la información pública como pilar de la gestión integral de los residuos peligrosos.
- Aprovechar al máximo los residuos peligrosos susceptibles de ser devueltos al ciclo productivo como materia prima, disminuyendo así los costos de tratamiento y disposición final.

8.4. Capítulo VI. Trabajo de grado

El proyecto fue regido por la normatividad establecida por la Universidad de Pamplona la cual reglamenta las modalidades de trabajo de grado, en este caso se toma en cuenta las Normas correspondientes para proyectos de investigación. Mediante el Acuerdo No.186 del 02 de diciembre de 2005 Por el cual compila y actualiza el Reglamento Académico Estudiantil de Pregrado.

8.4.1. ARTÍCULO 35.- Definición de Trabajo de Grado

En el Plan de Estudios de los programas, la Universidad establece como requisito para la obtención del título profesional, la realización por parte del estudiante, de un trabajo especial que se denomina “TRABAJO DE GRADO”.

PARÁGRAFO PRIMERO.- El Trabajo de Grado, según sus características puede ser realizado en forma individual o en grupo. Corresponde al Comité de Trabajo de Grado autorizar que dos (2) o más estudiantes se integren para realizar uno solo. En todos los casos, se presentará un sólo informe.

PARÁGRAFO SEGUNDO.- “El Trabajo de Grado se podrá matricular a partir del 8º. semestre, dependiendo de la modalidad, hasta con máximo dos (2) asignaturas. El Trabajo de Grado debe sustentarse ante un Jurado, compuesto por tres (3) personas conocedoras del tema y puede recibir como calificación: “Aprobado”, “Excelente” o “Incompleto”, cuando no cumpla con los objetivos propuestos en la modalidad en la cual se adelanta, en tal caso, el estudiante deberá matricularlo nuevamente en el semestre académico siguiente.

8.4.2. ARTÍCULO 36.- Modalidades de Trabajo de Grado: El Trabajo de Grado, puede desarrollarse en las siguientes modalidades.

Investigación: comprende diseños y ejecución de proyectos que busquen aportar soluciones nuevas a problemas teóricos o prácticos, adecuar y apropiar tecnologías y validar conocimientos producidos en otros contextos. Para los estudiantes que se acojan a esta modalidad, deberá presentar al Director de Departamento el anteproyecto que debe contener: propuesta para la participación en una línea de investigación reconocida por la Universidad, tutor responsable del Trabajo de Grado y cronograma, previo estudio y aprobación de la misma, del respectivo Grupo de Investigación.

9 Metodología

El presente trabajo se enmarca en la modalidad de Trabajo de Investigación, siendo esta de carácter experimental.

9.1. Localización del Estudio.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, perteneciente al Programa de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Pamplona, localizado a 2.586 msnm, en el municipio de Pamplona Norte de Santander. El estudio se realizó, bajo condiciones controladas, a una temperatura promedio de 16,9 °C, humedad relativa de 72,9%.

9.2. Recolección del material biológico en campo

Para iniciar la cría de *P. xylostella*, se colectaron huevos, larvas, pupas y adultos en los cultivos de Brassicaceae, cultivadas en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB) y el Colegio La Normal (Figura 11), en horarios diurnos, recolectando en forma directa los huevos, larvas y pupas y que se localizan en el envés de las hojas de repollo, coliflor y brócoli, utilizando una mira ocular de una lupa de 30x de aumento para su mejor búsqueda. Las larvas se localizaron principalmente en el envés ya que son sensible a la luz solar, serán colectadas con un pincel doble cero (00), depositándolas en frascos de vidrio transparentes que contenían un orificio en la tapa, cubierta de una malla o toldillo para su oxigenación, adicionándoles hojas tiernas como alimento. Seguidamente la recolección de los adultos se realizó mediante jameos en los cultivos, depositándolos en frascos plásticos con la

misma característica de los recipientes anteriores en la tapa, los cuales se transportaron al Laboratorio para empezar su cría masiva (Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas 2018).

Figura 11

A) jameo para recolección adultos y B) recolección de larvas y pupas..



Fuente: archivo personal,2020

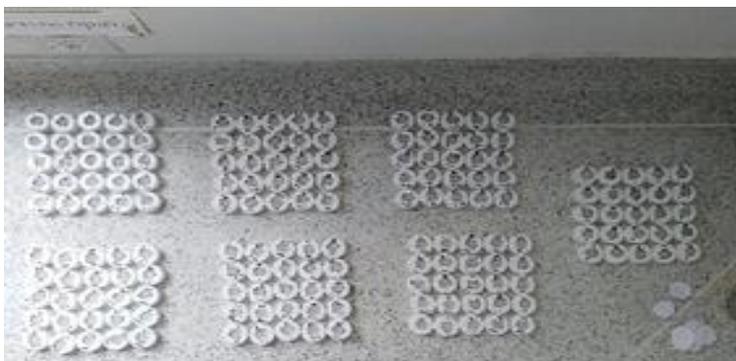
9.3. Técnica de Cría

Los huevos y larvas obtenidas en campo se llevaron al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica, de la Universidad de Pamplona, para establecer el pie de cría, hasta lograr una generación de adultos de *P. xylostella*, los cuales se sexaban y se colocaban por parejas en frascos de vidrio de cuatro litros con hojas de repollo, previamente sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar posibles entomopatógenos y luego lavados en agua destilada, para que realizaran las oviposturas, colocándole a los frascos una tela tul asegurada con una banda de goma para evitar la condensación de agua dentro del frasco. Para esto se realizó observaciones cada 12 horas, con la ayuda de un estereoscopio (ocular de 40x) para hacer un seguimiento a su desarrollo biológico. Los huevos recién puestos se individualizaron, recortando el pedazo de hoja que contenía el huevo, y colocándolos en cajas plásticas de 5 cm de diámetro a las cuales en su tapa se les hizo un orificio circular de 2,50 cm de diámetro e internamente se le pegaba

un pedazo de tela tul, para lograr conseguir condiciones similares con el exterior. El pie de cría a nivel de laboratorio se mantuvo hasta que se logró una producción de huevos de la misma edad, para lograr míneemo 250 larvas y poder iniciar el experimento. Una vez emergidas las larvas, se registraron con un número y fecha, individualizándolas en cajas plásticas de 5 cm de diámetro y colocándolas en discos de hoja de repollo de 3 cm de diámetro, los cuales habían sido previamente sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar posibles entomopatógenos y luego lavados en agua destilada, dejándolos secar por media hora en una malla de plástico. Los discos de hojas de repollo se colocaron sobre un disco de papel absorbente de 5 cm de diámetro dentro de las cajas plásticas, esto para mantener a la larva en un solo sitio y hacer un mejor manejo a la hora de observarla. Tanto los discos de hoja de repollo como los del papel absorbente se cambiaban cada tres días, aunque observaciones previas al montaje del experimento se pudo comprobar que los discos de repollo en las condiciones de laboratorio duraban hasta los cinco días, palatables a las larvas. Cuando las larvas llegaron al segundo instar de desarrollo larval, aproximadamente a los nueve días de edad (Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas 2018), se procedió al montaje del ensayo (Figura 12).

Figura 12

Distribución de los tratamientos y las repeticiones.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 13

A) sumergimiento de los discos en cada tratamiento y B) disposición de los discos en sus respectivos recipientes,



Fuente: archivo personal,2020

9.4.Preparación de los extractos acuosos de Neem

Las hojas y semillas de *A. indica* se cosecharon en los parques de la ciudad de Cúcuta (425 msnm), Norte de Santander, colectando de los árboles, los frutos con epicarpio color verde-pálido debido a que este estado fenológico es la etapa que mayor contenido de azadiractina se acumula en la semilla (Figura 14). Las hojas se cosecharon una semana antes a su maceración. Tanto las hojas como las semillas fueron trasladadas al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica. Los frutos se despulparon, lavaron, eliminando los restos de mucilago, para luego dejarlos secar a la sombra durante una semana. Para realizar los extractos acuosos de semilla se trituraron 100 gramos de semillas por litro de agua con pH 7.0. Para los extractos acuosos de hojas se trituraron de igual manera 100 gramos de hojas por litro de agua con pH 7.0. Ambos se dejaron macerar en recipientes plásticos separados, donde en el primero se destinaron 100 g de semillas en 1,0 l. de agua;

igualmente, se trituraron 100 g de hojas sin peciolo dejándolos macerar también en 1,0 l. de agua (Figura 15), dejándolos en fermentación (maceración) durante 24 horas.

Cumplidas las 24 horas en maceración se procedió al filtrado para separar el líquido con los metabolitos, de las partes sólidas del material vegetal. A partir de la concentración o solución madre al 100% (100.000 mg/l), se obtuvieron las disoluciones al 66% (66.000 mg/l) y 33% (33.000 (mg/l), logrando de esta manera los otros tratamientos (Figura 16). A cada concentración de los tratamientos, y debido a las características cerosas de las hojas de repollo, se adicionó 0,50 ml/l de agua del producto MIXEL TOP que es un tenso activo no iónico y no reactivo, con características especiales de hipotensor y humectante, acción que ejerce al romper la tensión superficial de las gotas de agua, mejorando el cubrimiento y la adherencia de los tratamientos en los discos de repollo. (Gualdrón-Panqueva, Toloza-Balcucho y Giraldo-Vanegas, 2017).

Figura 14

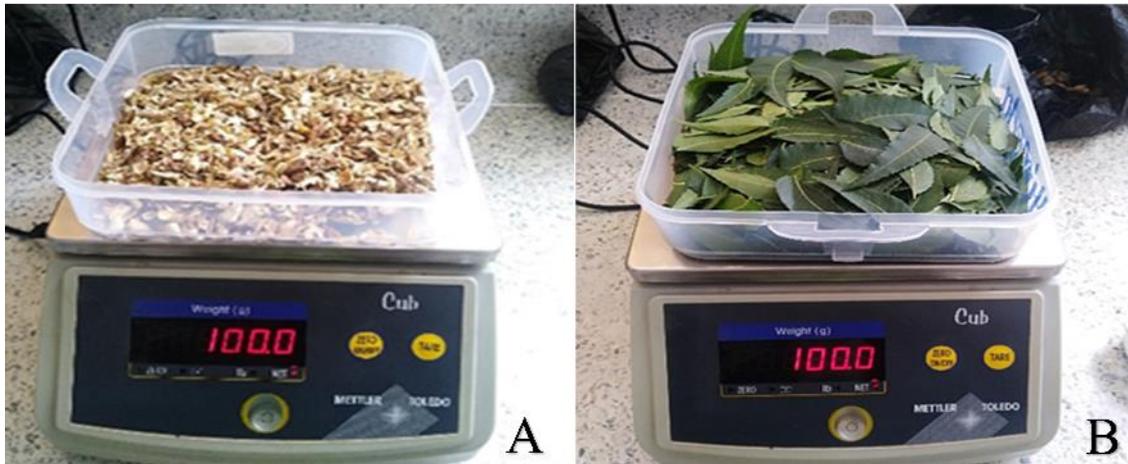
A) recolección de hoja y B) recolección de semilla de *A. indica*,



Fuente: archivo personal,2020

Figura 15

A) semillas trituradas y B) hojas triturados, ambos listos para someter al proceso de macerado.



Fuente: archivo personal,2020

Se utilizó la siguiente fórmula para hacer las respectivas concentraciones:

$$V = \frac{C_d (x) V_d}{C_c}$$

Vd: volumen deseado

Cd: concentración deseada

Cc: concentración conocida (solución madre)

Figura 16

Extractos acuosos de hojas de neem (izquierda) y de semilla (derecha), en sus correspondientes concentraciones.



Fuente: archivo personal,2020

En la Tabla 2, se pueden apreciar los Tratamientos y sus dosis (mg/l) manejados en el bioensayo.

Tabla 2

Tratamientos con extractos acuosos de Hojas y Semillas y sus concentraciones en mg/l.

Tratamiento (Hojas)	Dosis (mg/l)	Tratamiento (Semillas)	Dosis (mg/l)2
H-100	100000	S-110	100000
H-66	66000	S-66	66000
H-33	33000	S-33	33000
Control	0,00	Control	0,00

Fuente: archivo personal,2020

El mismo día que se prepararon las concentraciones, se procedió a realizar los diferentes tratamientos e iniciar el montaje del experimento.

9.5.Montaje del experimento.

Las larvas para el experimento tuvieron un ayuno de tres horas, al término del cual fueron colocadas en discos de hojas de repollo de 3 cm de diámetro, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5%, para evitar mortalidades causadas por factores como entomopatógenos. Los discos de hoja de repollo fueron sumergidas durante cinco segundos en cada uno de las dosis de los tratamientos con los extractos de hojas y semillas de neem.

Una vez retirados los discos, se pusieron a secar a temperatura ambiente por dos horas. Cada disco se colocó individualizado en cajas plásticas de 5 cm de diámetro, sobre discos de papel filtro del mismo diámetro y, sobre cada disco se colocó una larva de *P. xylostella* de nueve días de edad (L₂). Es importante hacer la anotación que todas las larvas utilizadas en este ensayo, tenían nueve días de edad, para uniformizar esta variable, ya que la tolerancia a los tóxicos aumenta con la edad de las larvas de lepidópteros. La caja plástica

fue identificada con Tratamiento, Repetición, número de larva y fecha de iniciación del ensayo. Los discos de repollo fueron cambiados al quinto día, por discos de 3 cm de hoja de repollo, desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5% y lavadas en agua destilada. Una vez montado el ensayo, se realizaron observaciones cada seis horas sobre la mortalidad de las larvas en cada tratamiento, hasta la mortalidad o emergencia de adultos de *P. xylostella*. Aunque el objetivo del presente ensayo, fue determinar la DL_{50} y el TL_{50} , las mortalidades se tomaron hasta las 96 horas de exposición de las larvas, sin cambiar los discos tratados; ya que, dentro del concepto de la DL_{50} , que es la dosis de un material determinado, administrado una sola vez, que provoca la muerte del 50% de un grupo de aneemales de prueba. Al quinto día se cambió el disco tratado por un disco de repollo desinfectado, pero no tratado, los cuales se renovaron cada tres días hasta la formación de pupas y adultos de *P. xylostella*. Al comprobarse la mortalidad de una larva, se anotaba en la Tabla diseñada (Anexo 3) el tratamiento, la repetición, el número de larva en esa repetición y hora de observación de su muerte.

9.6. Diseño Experimental.

En el Diseño Experimental se utilizó un modelo estadístico completamente al azar, tanto para los extractos de hojas como para los extractos de semillas de *A. indica*; cada uno con cuatro tratamientos y cada tratamiento con 5 repeticiones y cada repetición con cinco unidades experimentales. Cada Unidad Experimental estuvo constituida por una larva (100 unidades experimentales en cada extracto). Cada unidad experimental comprendió de una caja plástica de 5 cm de diámetro a las cuales en su tapa se les hizo un orificio circular de 2,50 cm de diámetro e internamente de le pegaba un pedazo de tela tul, para lograr conseguir condiciones similares con el exterior. Cada una de las cajas contenía un disco de papel filtro de 5 cm de diámetro y un disco de hoja de repollo de 3 cm de diámetro. Los discos de hojas

de repollo fueron sumergidos en las diferentes concentraciones de los extractos de hojas o semillas, por espacio de 5 segundos antes de introducirlos a la caja de cada disco con su respectiva larva de *P. xylostella* de segundo instar (L₂). Las larvas utilizadas fueron sometidas a un período de ayuno por 3 h antes de montar el bioensayo, para garantizar el consumo del disco de hoja de repollo tratada.

La mortalidad de una larva se comprobaba con la observación directa y con la ayuda de un pelo de pincel, la larva era molestada para comprobar si respondía a estos estímulos, de todas maneras, estas larvas se mantenían aparte y se hacía un seguimiento para estar seguros de su muerte. Además, la sintomatología presentada por las larvas afectadas, la apariencia inicial de color café claro y acortamiento del cuerpo, hasta aparentar una sequedad intensa, también fueron los signos indicadores del efecto del tratamiento sobre el descarte de las larvas.

Una vez obtenidos los datos, fueron analizados estadísticamente por medio del Software SPSS Statistics 26.0 y con pruebas de Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

Se utilizaron análisis de regresión lineal simple para determinar la relación entre la mortalidad y la concentración de las diferentes dosis, lo que permitió construir la respuesta concentración-efecto, para cada tratamiento, bien sea hojas o semillas, que es la base para la determinación de la DL₅₀.

Con los datos de mortalidad acumulados cada seis horas (desde la hora seis de montado el bioensayo hasta la hora 96), se determinó el tiempo al cual murió el 50% de la población (TL₅₀) para cada extracto y dosis evaluado, igualmente mediante análisis de regresión entre la relación mortalidad acumulada y tiempo de muerte.

10 Resultados y análisis

10.1. Mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* L.

En el presente trabajo de investigación se utilizaron larvas de segundo instar de *P. xylostella*., ya que se ha determinado en cientos de trabajos científicos y experiencias en campo, que los primeros instares larvales de lepidópteros son los más susceptibles a moléculas tóxicas. Además, la composición estructural y bioquímica de la superficie del integumento de las larvas, varía según el instar larval en el que se encuentren. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos de neem afectan el sistema neuroendocrino de los insectos, controlando a su vez la síntesis de las hormonas ecdisona y juvenil, impidiendo el debido proceso de muda, motivo por el cual en la medida que disminuye el instar del insecto, aumenta la mortalidad causada por los metabolitos. Las larvas seleccionadas para el presente bioensayo tenían una edad de nueve días, encontrándose en su segundo instar.

El diseño experimental fue completamente al azar, realizándose análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey. Los porcentajes de mortalidad en el Control en ambos grupos, tanto en el ensayo con extractos acuosos de semillas como en el grupo del experimento de larvas sometidas a los extractos acuoso de hojas de *A. indica*, fueron cero hasta la terminación de los experimentos, motivo por el cual los porcentajes de mortalidad no fueron corregidos con la fórmula de Abbott (1925).

El análisis de los datos demostró resultados contundentes en cuanto a la mortalidad causada por las diferentes dosis a que fueron sometidas las larvas de segundo instar de *P. xylostella*. Son resultados robustos, obteniéndose los siguientes resultados.

10.2. Mortalidad de los extractos acuosos de semillas de *A. indica*, causada en larvas de segundo instar de *P. xylostella*.

En la mortalidad de larvas de *P. xylostella*, causadas por los extractos acuosos de semillas de *A. indica*, se aprecia el efecto tóxico de los extractos a las tres concentraciones (Tabla 3). Al aumentar las dosis hay una respuesta en el aumento de las mortalidades (Figura 17); Los extractos acuosos de semillas de Neem *A. indica*, demostraron un efecto en la mortalidad, generándose tres grupos con diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos; así, un primer grupo conformado con los tratamientos S-100 con 96,00% y S-66 con 84,00% de mortalidad; un segundo grupo con el tratamiento S-33 con 68,00% y un tercer grupo con el tratamiento Control con 0,00% de mortalidad de larvas de segundo instar de *P. xylostella* (Tabla 3).

Se puede observar que, aunque el tratamiento S-100, causa el más alto porcentaje de mortalidad en larvas de *P. xylostella*, no se encontraron diferencias significativas con el tratamiento S-66 (Tabla 3).

Este efecto inmediato de los extractos de semillas de neem se puede deber al alto contenido de azadirachtina la cual actúa como repelente y fagodisuasivo (antialimentario), como lo registran varios autores trabajando con otros insectos (Giraldo-Vanegas et al., 2006; Gualdron-Panqueva, Toloza-Balcucho y Giraldo-Vanegas, 2017).

Giraldo-Vanegas et al.(2006), encontraron efecto repelente inmediato a los extractos de hojas y semillas de neem por *Saccharosydne saccharivora* (Westwood), en cultivos de caña de azúcar.

Tabla 3

Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, en los tratamientos con extractos acuosos de semillas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.

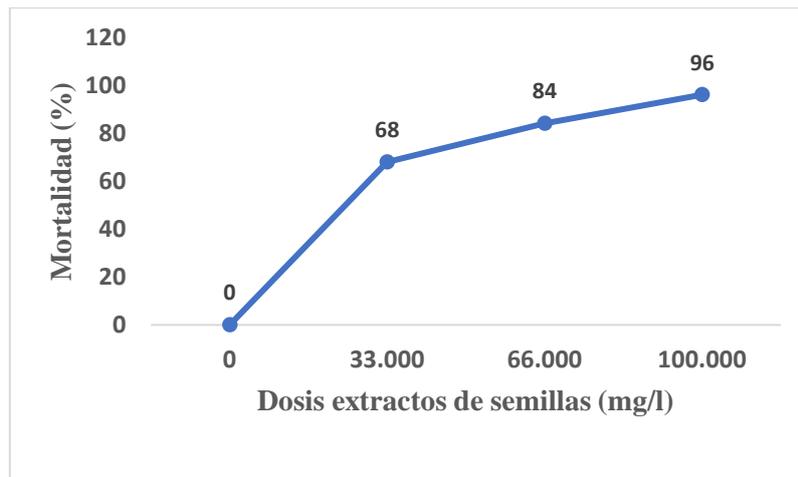
Tratamiento	Dosis (mg/l)	N	Mortalidad (%)	DS
Control	0,00	5	0,00 c	0,00
S-33	33.000	5	68,00 b	10,95
S-66	66.000	5	84,00 a	8,94
S-100	100.000	5	96,00 a	8,94

CV 13,42 ET 4,18

Fuente: archivo personal,2020

Figura 17

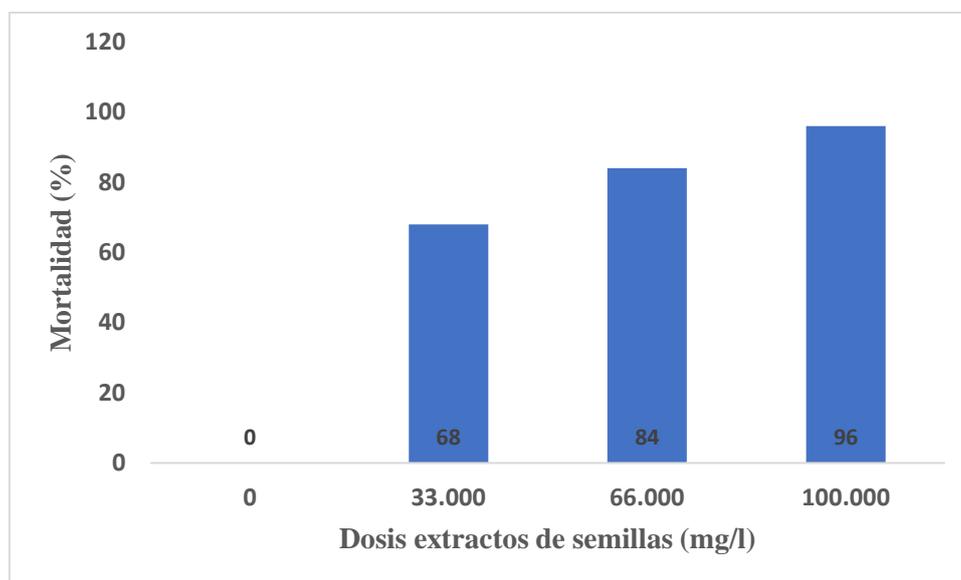
Respuesta en las mortalidades de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio



Fuente: archivo personal,2020

Figura 18

Histograma con porcentajes de mortalidad (%) causada en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, por las tres concentraciones de extractos acuosos de semillas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio



Fuente: archivo personal,2020

10.3. Mortalidad de los extractos acuosos de hojas de *A. indica*, causada en larvas de segundo instar de *P. xylostella*.

En la mortalidad de larvas de *P. xylostella*, causadas por los extractos acuosos de hojas de *A. indica*, se aprecia el efecto de los extractos a las tres concentraciones (Tabla 4). Al aumentar las dosis hay una respuesta gradual en el aumento de las mortalidades (Figura 19). Los extractos acuosos de semillas de Neem *A. indica*, demostraron un efecto en la mortalidad, formándose cuatro grupos con diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos; así, un primer grupo conformado con el tratamiento H-100 con 84,00%, un segundo grupo con el tratamiento H-66 con 64,00%, un tercer grupo con el tratamiento H-33 con 36,00% y el cuarto grupo con el Control con 0,00% de mortalidad de larvas de segundo instar de *P. xylostella* (Figura 19 y 20).

Tabla 4

Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, en los tratamientos con extractos acuosos de hojas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio

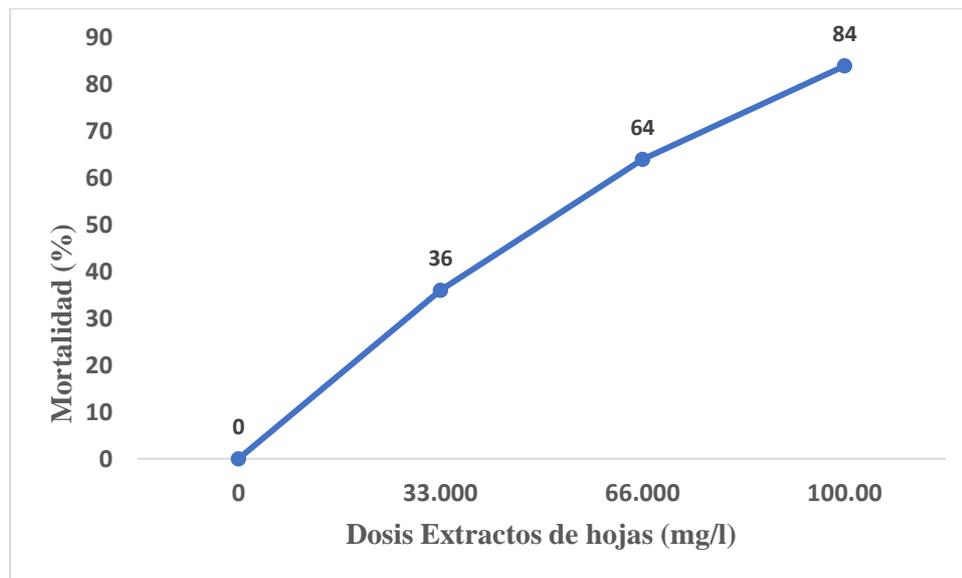
Tratamiento	Dosis (mg/l)	n	Mortalidad (%)	DS
Control	0,00	5	0,00 d	0,00
H-33	33.000	5	36,00 c	8,94
H-66	66.000	5	64,00 b	8,94
H-100	100.000	5	84,00 a	8,94

CV 18,33 ET 3,87

Fuente: archivo personal,2020

Figura 19

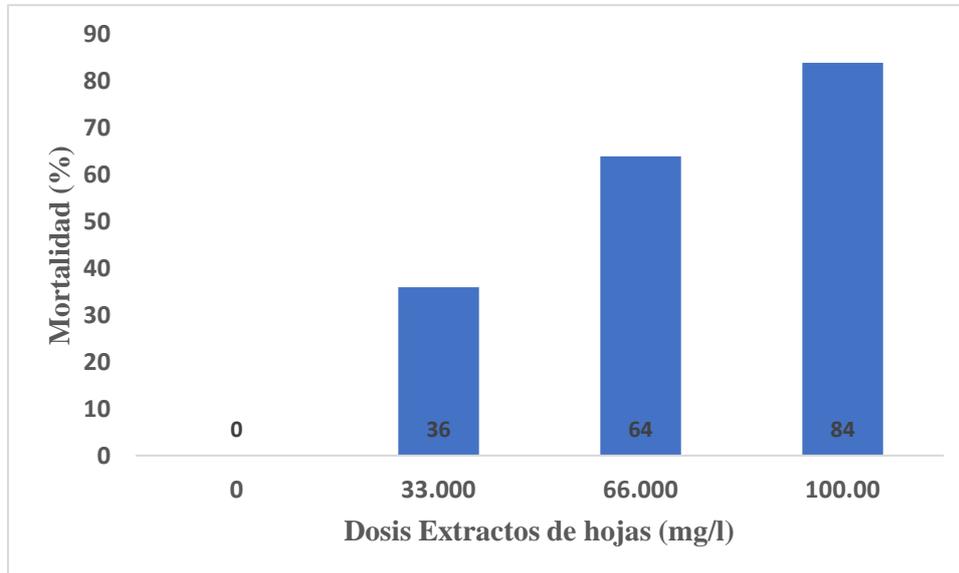
Respuesta en las mortalidades de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos acuosos de hojas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 20

Porcentajes de mortalidad (%) causada en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, en tres concentraciones de extractos acuosos de hojas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.



Fuente: archivo personal,2020

10.4. Dosis Letal Media (DL₅₀)

LD son las siglas de "Dosis letal", así el DL₅₀ es la dosis de un material determinado, administrado una sola vez, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba. El DL₅₀ es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de un material. Cabe destacar que el DL₅₀ mide la dosis letal, pero no otros efectos secundarios graves, pero no letales.

La prueba fue creada por J.W. Trevan en 1927, cuando intentaba encontrar una fórmula para estimar la relativa potencia de envenenamiento de drogas y medicinas usadas en esa época. Desarrolló la prueba DL₅₀ porque el uso de muerte como "meta", permite comparaciones en químicos que envenenan al cuerpo en muchas formas diferentes. A partir

del trabajo temprano de Trevan, otros científicos han desarrollado diferentes enfoques para métodos más directos y rápidos de obtener el DL₅₀.

Los resultados obtenidos en las pruebas para encontrar el DL₅₀, demostraron que los extractos acuosos de semillas son más letales que los extractos acuosos de hojas de *A. indica*. Así, el análisis de regresión determinó una DL₅₀ a una dosis de 37.000 mg/l y un DL₉₀ a una dosis de 81.455 mg/l con los extractos acuosos de semillas; mientras que con los extractos acuosos de hojas de *A. indica*, el DL₅₀ se consigue con una dosis de 57.250 mg/l y un DL₉₀ a una dosis de 107.250 mg/l. Esto significa que dosis iguales o superiores a los 37.000 mg/l de extractos acuosos de semillas garantiza una mortalidad superior al 50% de la población de *P. xylostella*, concentración levemente superior a la concentración más baja utilizada en este experimento, que fue de 33.000 mg/l. En consecuencia, se necesitaría dosis iguales o superiores a 81.455 mg/l de los extractos acuosos de semillas, para matar al 90% de la población. Igualmente, el DL₅₀ se consigue con una dosis de 57.250 mg/l y un DL₉₀ a una dosis de 107.250 mg/l, para los extractos acuosos de hojas de *A. indica* (Tabla 5).

En las Figuras 21 y 22, se presentan las regresiones lineales simples resultantes de las relaciones dosis y porcentajes de mortalidad causados por los extractos de hojas y semillas de neem, respectivamente, generándose la ecuación de regresión (en donde X es la dosis y Y son los porcentajes de mortalidad) y el R² para los extractos acuosos de semillas $y=0,0009x + 16,69$ y un R²=0,84; mientras que para los extractos acuosos de hojas fue $y=0,0008x + 4,20$ y un R²=0,98.

Los valores de DL₅₀ y DL₉₀, obtenidos permiten afirmar que los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos de hojas y semillas, exhiben un modo de acción insecticida y además es un recurso promisorio para el control de poblaciones de *P. xylostella* en campo, se podría pensar en aplicaciones con concentraciones bajas en mg/l de

los extractos, sobre todo de semillas, lo que se traduce en un ahorro de tiempo y dinero. El único inconveniente es que las semillas de *A. indica* no se consiguen todo el año.

Tabla 5

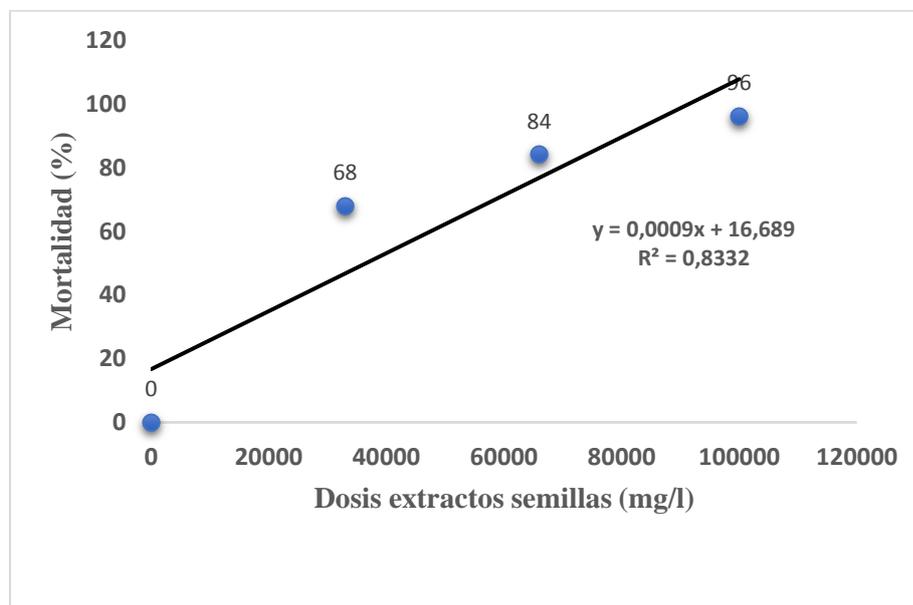
Dosis letales DL₅₀ y DL₉₀, de los extractos acuosos de hojas y semillas de *A. indica* para larvas de *P. xylostella*, en condiciones de laboratorio

Tratamiento	Ecuación Regresión	R ²	DL ₅₀ (mg/l)	DL ₉₀ (mg/l)
Semillas	Y=0,0009X + 16,69	0,84	37.000	81.455
Hojas	Y=0,0008X + 4,20	0,98	57.250	107.250

Fuente: archivo personal,2020

Figura 21

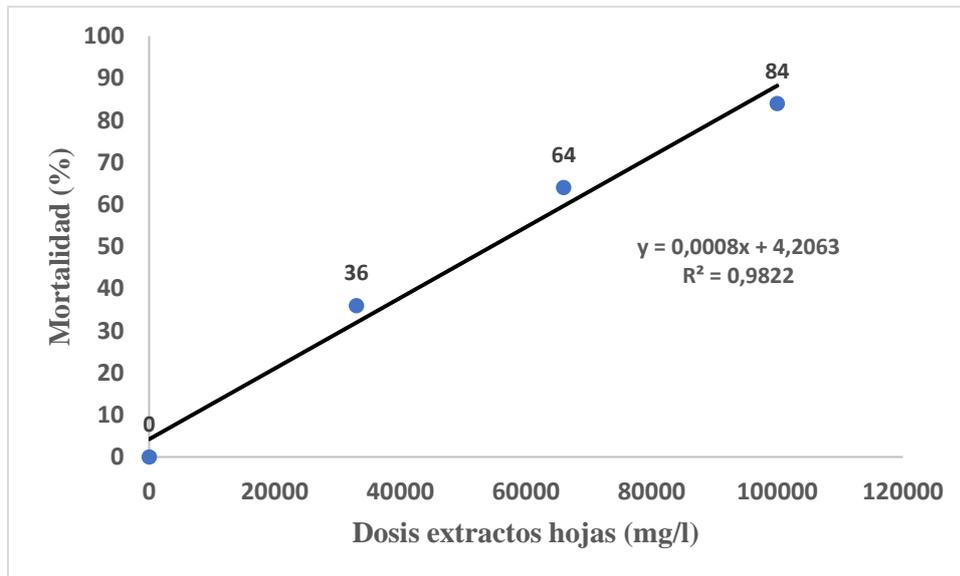
Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a tres concentraciones de extractos acuosos de semillas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 22

Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a tres concentraciones de extractos acuosos de hojas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.



Fuente: archivo personal,2020

10.5. Mortalidad acumulada (horas) en las diferentes dosis de extractos de semillas de *A. indica*.

Al evaluar el efecto de los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos de hojas y semillas de neem utilizados, a las diferentes horas de observación, se encontró que, a mayor dosis, el tiempo de exposición de las larvas al efecto de los metabolitos para provocar su muerte, fue menor (Tabla 6 y 7).

Tabla 6

Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de *A. indica*.

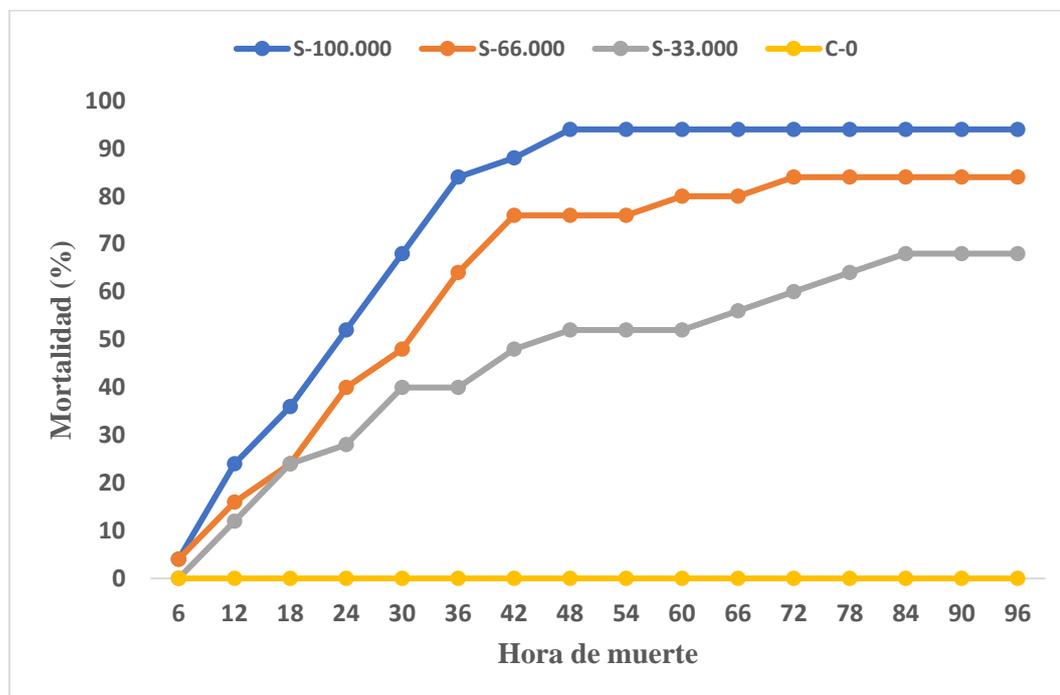
Dosis (mg/l)	Hora de Observación															
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96
100.000	4	24	36	52	68	84	88	96	96	96	96	96	96	96	96	96
66.000	4	16	24	40	48	64	76	76	76	80	80	84	84	84	84	84
33.000	0	12	24	28	40	40	48	52	52	52	56	60	64	68	68	68
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: archivo personal,2020

En la Figura 23, se observa cómo van creciendo los porcentajes de las mortalidades en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres concentraciones de los extractos acuosos de semillas de neem. El tratamiento con la dosis 100.000 mg/l, causa la muerte rápida de las larvas, logrando la máxima mortalidad de 96,00% al segundo día (48 horas) de aplicados los tratamientos, manteniéndose dicho porcentaje hasta el final del experimento; mientras que las dosis de 66.000 mg/l, logran la mortalidad máxima de 84,00% a las 72 horas y la dosis 33.000 mg/l logra la mortalidad máxima de 68,00% a las 84 horas.

Figura 23

Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de *A. indica*.



Fuente: archivo personal,2020

10.6. Mortalidad acumulada (horas) en las diferentes dosis de extractos de hojas

Tabla 7 .

Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos de hojas de *A. indica*.

Dosis (mg/l)	Hora de observación															
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96
100.000	0	8	24	44	48	64	68	68	72	76	80	80	80	80	80	84
66.000	8	12	20	28	40	48	56	56	56	56	60	64	64	64	64	64

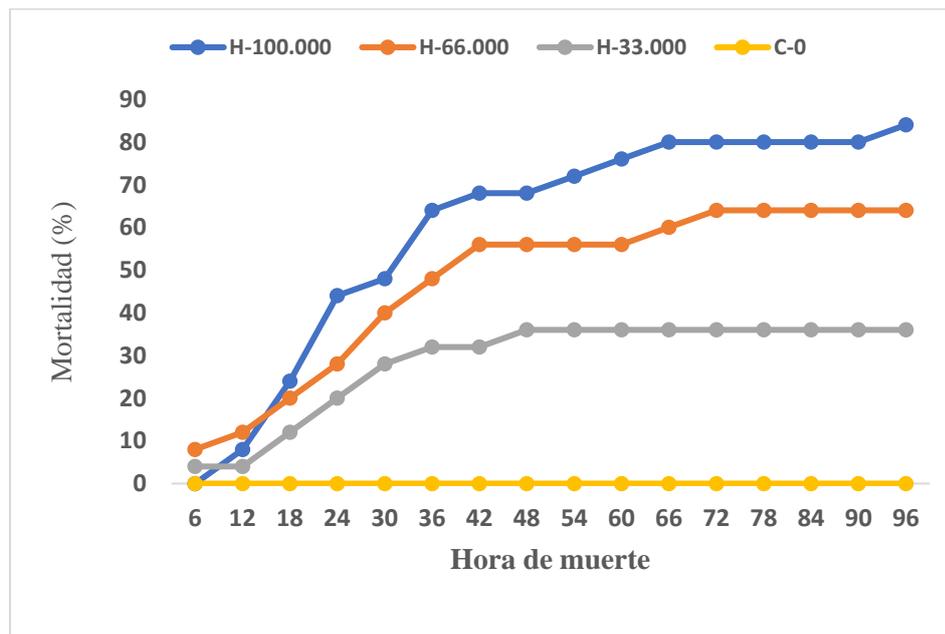
33.000	4	4	12	20	28	32	32	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: archivo personal,2020

En la Figura 24, se observa que las mortalidades en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres concentraciones de los extractos acuosos de hojas de neem, tienen una respuesta más disminuida comparada con la respuesta letal en cuanto a porcentajes de mortalidad y tiempo de acción de los metabolitos secundarios de los extractos de semillas. De esta manera los porcentajes de mortalidad son más bajos; así, el tratamiento con la dosis 100.000 mg/l, produce una mortalidad máxima de 84,00% a las 96 horas de iniciado el experimento; la dosis de 66.000 mg/l, logra la mortalidad máxima de 64,00% a las 72 horas y la dosis 33.000 mg/l logra la mortalidad máxima de 36,00% a las 48 horas de exposición de las larvas a los tratamientos

Figura 24

Porcentajes (%) de mortalidad acumulados cada seis horas, en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos de hojas de *A. indica*.



Fuente: archivo personal,2020

10.7. TL₅₀ de extractos de semillas y hojas de *A. indica*

El Tiempo Letal Medio (TL₅₀), es el valor medio del intervalo de tiempo, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada, tras la administración aguda de un agente químico a una determinada concentración y bajo un conjunto de condiciones definidas.

El TL₅₀ para las tres dosis de extractos de semillas de *A. indica* se pueden observar en la Tabla 8. Se determinó que la dosis 100.000 mg/l de extractos de semillas mata el 50% de la población a las 22 horas con un coeficiente de determinación ($R^2=0,69$), la dosis 66.000 mg/l lo hace a las 36 horas ($R^2=0,79$) y la dosis 33.000 mg/l mata la mitad de la población a las 57 horas ($R^2=0,90$).

Tabla 8

Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos acuosos de semillas de *A. indica*, en condiciones de laboratorio.

Tratamiento	Dosis (mg/l)	Ecuación regresión	R ²	TL ₅₀	TL ₇₂	TL ₉₆
S-100	100.000	Y=0,86X + 31,05	0,69	22	47	75
S-66	66.000	Y=0,85X X + 19,2	0,79	36	62	90
S-33	33.000	Y=0,68X + 10,90	0,90	57	90	125

Fuente: archivo personal,2020

Para los extractos acuosos de hojas de neem, se encontraron los siguientes TL₅₀, para las tres dosis se pueden observar en la Tabla 9, encontrándose que la dosis 100.000 mg/l de extractos de hojas mata el 50% de la población a las 39 horas con un coeficiente de determinación ($R^2=0,79$), la dosis 66.000 mg/l lo hace a las 55 horas ($R^2=0,82$) y la dosis 33.000 mg/l mata la mitad de la población a las 114 horas ($R^2=0,69$).

Trujillo-Ruiz, Zapata-Restrepo, Hoyos-Sánchez, Yepes-Rodríguez, Capataz-Tafur, Orozco-Sánchez (2008), evaluaron cuatro concentraciones de extractos etanólicos de *A. indica* (2.500, 5.000, 10.000 y 30.000 ppm) y el testigo (alcohol 96%) para determinar la mortalidad en el tiempo (0, 12, 18, 25, 40 h), sobre el segundo instar de *S. frugiperda*. Se determinó una DL_{50} a las 12 h de 2.256 ppm ($R^2 = 88,54\%$), a las 18 h de 3.928 ppm ($R^2 = 90,3 \%$), a las 25 h de 2.818 ppm ($R^2 = 90,3 \%$) y a las 40 h de 1.064 ppm ($R^2 = 90,3 \%$). Las dosis de 5.000 ppm, 10.000 ppm y 30.000 ppm, no presentaron diferencia estadística en su acción letal, pero fueron efectivas en el control del insecto.

Tabla 9

Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a tres dosis de extractos acuosos de hojas de *A. indica*, en condiciones de laboratorio

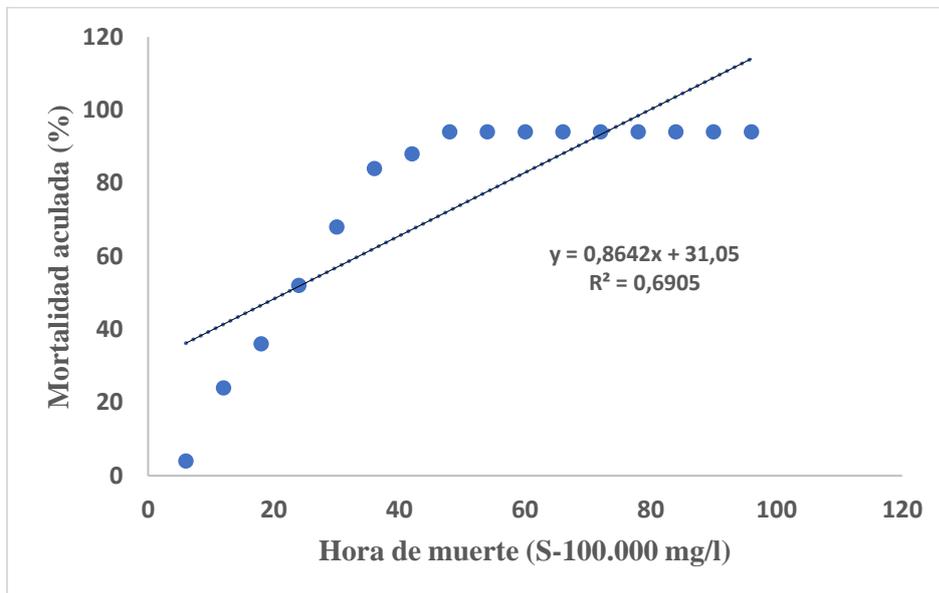
Tratamiento	Dosis (mg/l)	Ecuación regresión	R ²	TL ₅₀	TL ₇₂	TL ₉₆
H-100	100.000	Y=0,85X + 16,40	0,79	39	65	94
H-66	66.000	Y=0,62X + 15,6	0,82	55	91	130
H-33	33.000	Y=0,34X + 11,1	0,69	114	179	250

Fuente: archivo personal,2020

En las Figuras 25, 26 y 27; se presentan las ecuaciones de regresión para cada una de las dosis de los extractos acuosos de semillas de neem, correspondientes a 100.000mg/l, 66.000 mg/l y 33.000 mg/l, respectivamente.

Figura 25

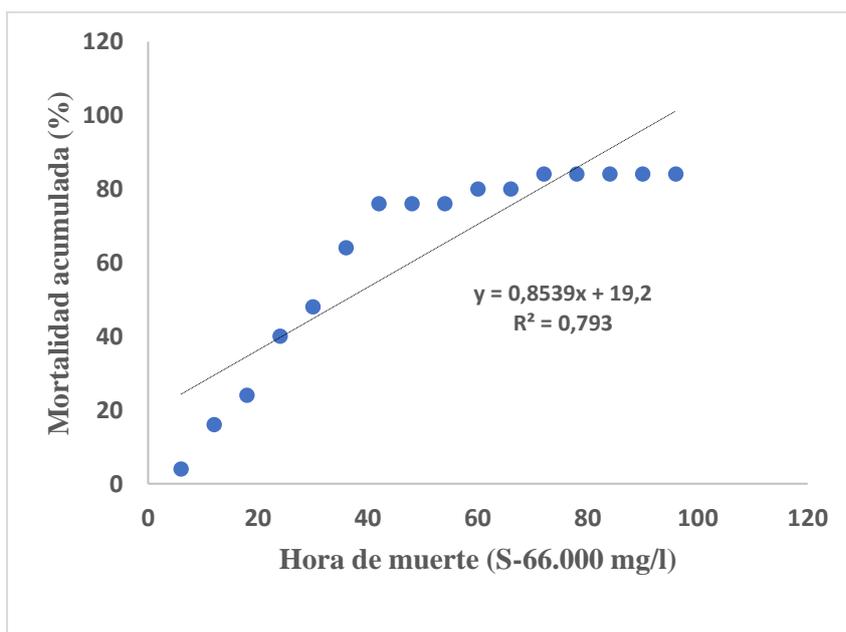
Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad y horas de muerte de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, para la dosis 100.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de neem.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 26

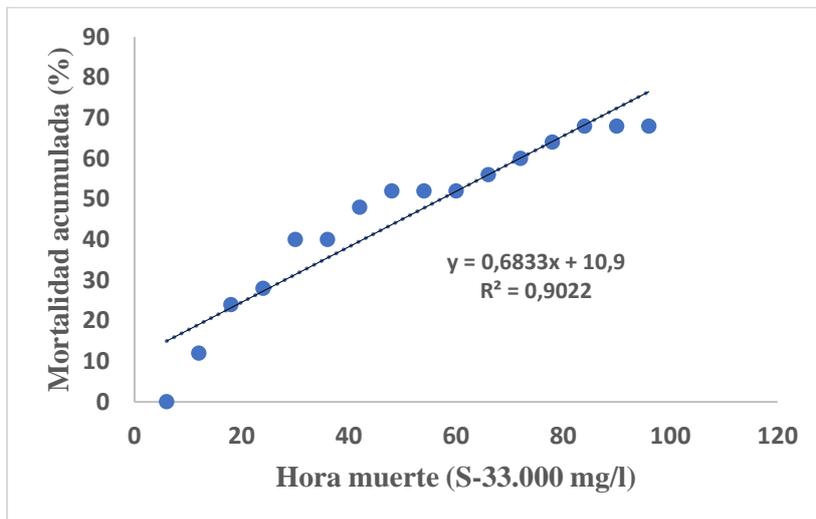
Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad y horas de muerte de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, para la dosis 66.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de neem.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 27 .

Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad y horas de muerte de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, para la dosis 33.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de neem.

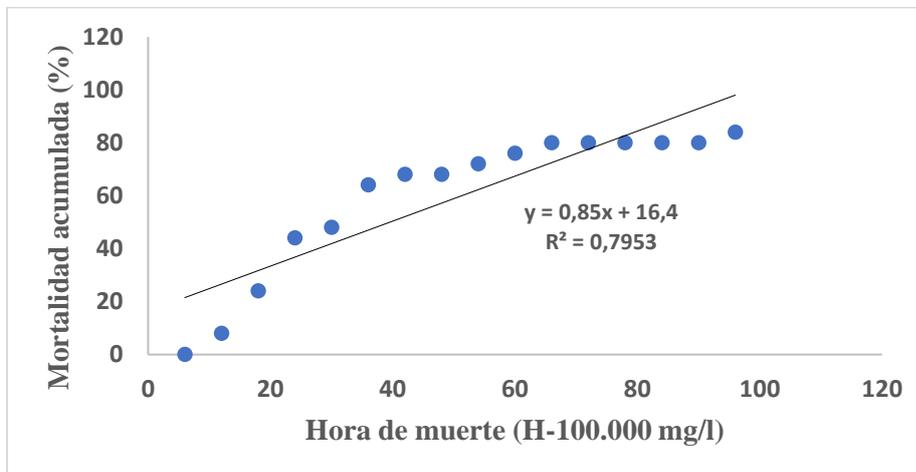


Fuente: archivo personal,2020

En las Figuras 28, 29 y 30; se presentan las ecuaciones de regresión para cada una de las dosis de los extractos acuosos de hojas de neem, correspondientes a 100.000mg/l, 66.000 mg/l y 33.000 mg/l, respectivamente

Figura 28

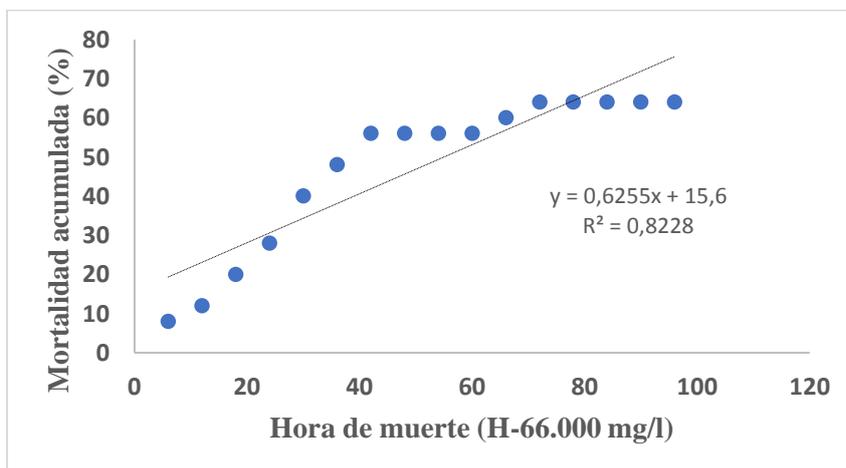
Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad y horas de muerte de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, para la dosis 100.000 mg/l de extractos acuosos de hojas de neem.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 29 .

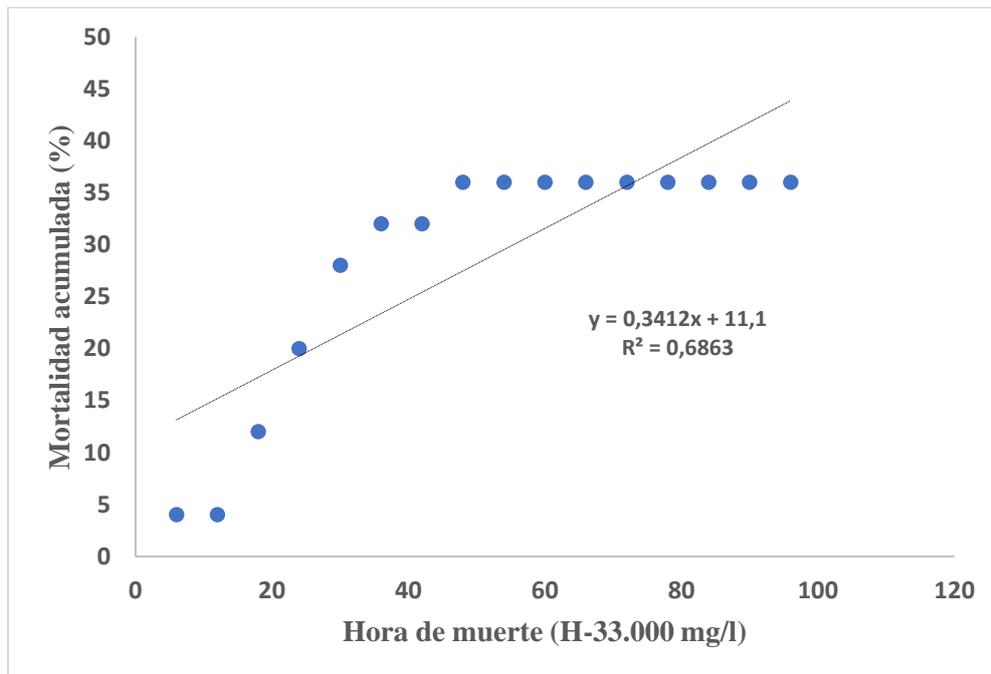
Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad y horas de muerte de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, para la dosis 66.000 mg/l de extractos acuosos de hojas de neem.



Fuente: archivo personal,2020

Figura 30 .

Regresión entre porcentajes acumulados de mortalidad y horas de muerte de larvas de segundo instar de *P. xylostella*, para la dosis 33.000 mg/l de extractos acuosos de hojas de neem.



Fuente: archivo personal,2020

10.8. Sobrevivencia de *P. xylostella* a los tratamientos de extractos acuosos de hojas y semillas de *A. indica*.

Los efectos letales de los extractos acuosos de semillas de neem, se presentan en la Tabla 10, donde se puede observar que a pesar de que la mortalidad de las larvas baja a concentraciones menores, las larvas que no murieron durante el tiempo de observación del experimento de 96 horas (cuatro días) y, según el diseño del ensayo que consistió en someter las larvas a un solo tratamiento, esto quiere decir que las larvas fueron sometidas en cada tratamiento durante cuatro días, primero porque esta es la duración de los discos de repollo que se mantienen palatables al insecto; segundo, para simular una sola aplicación como ocurriría en condiciones de campo y, tercero que para calcular la DL_{50} se debe realizar una

sola vez la aplicación de los tratamientos según el Protocolo para este tipo de experimentos. Al término de este tiempo de exposición de las larvas, el disco de repollo se cambió por uno sin tratar, para que las larvas que no murieron en los cuatro días de sometimiento a discos de repollo con los diferente tratamientos continuaran su desarrollo; así, se determinó que en la dosis 100.000 mg/l, logró sobrevivir una sola larva; en la dosis 66.000 mg/l, lograron sobrevivir cuatro larvas; en la dosis 33.000 mg/l, lograron sobrevivir ocho larvas; pero ninguna logró completar su desarrollo hasta el estado de pupa; solamente todas las 25 larvas del Control llegaron hasta pupa, de estas 25 pasaron al estado adulto 24, determinándose una sobrevivencia de 96%, lo que se considera normal en este tipo de ensayos. Estos resultados se pueden explicar, debido a que los extractos acuosos de semillas de *A. indica* contiene otros metabolitos diferentes y en mayor concentración, como la Azadiractina que contienen las hojas en menor concentración. Esta molécula actúa sobre los procesos de metamorfosis en los insectos, como inhibidor de la quitina y mimetizarse con las hormonas juvenil y de la muda. Este efecto ha sido demostrado en diferentes ensayos, varios investigadores han demostrado los efectos adversos sobre la biología de insectos; así, Gualdrón-Panqueva, Toloza-Balcucho y Giraldo-Vanegas (2.017) encontraron el efecto negativo en la ovoposición de las hembras de *H. hampei*, sometidas a tres dosis de extractos de semillas de neem. Las hembras sometidas a dosis de 100.000 mg/l solo colocaron 1,25 huevos/hembra; mientras que las hembras del Control ovopositaron 42,75 huevos/hembra.

Tabla 10

Sobrevivencia de larvas de *P. xylostella* sometidas a los tratamientos de extractos acuosos de semillas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.

Dosis (mg/l)	Mortalidad (%)	Larvas muertas	Larvas vivas	Pupas	Adultos	Sobrevivencia adultos (%)
100.000	96	24	1	0	0	0

66.000	84	21	4	0	0	0
33.000	68	17	8	0	0	0
Control	0	0	25	25	24	96

Fuente: archivo personal ,2020

Con los extractos acuosos de hojas, solamente llegaron al estado de pupa y luego al estado adulto, dos ejemplares sometidos a la dosis de 66.000 mg/l y seis ejemplares adultos en la dosis 33.000 mg/l, los cuales eran más pequeños que los adultos obtenidos del Control; mientras que en el Control llegaron al estado de pupa las 25 larvas y de esas 25 pupas emergieron 24 imagos, con una sobrevivencia de la especie del 96%. En el tratamiento H-100 (100.000 mg/l), no se obtuvo adultos (Tabla 11).

Otro aspecto importante que se encontró fue el efecto de los metabolitos de los extractos de hojas en la duración de los estados de desarrollo de *P. xylostella*. Primero se puede observar que en la dosis 100.000 mg/l, ninguna larva logró llegar al estado de pupa (0%). Una vez cambiados los discos de repollo sin tratar, se observó que lograron llegar al estado de pupa cinco larvas a los 35 días en la dosis 66.000 mg/l, lo que representa un 20% de sobrevivencia de pupas; nueve larvas pasaron a pupa (36% de sobrevivencia) a los 33 días, en la dosis 33.000 mg/l y, en el Control llegaron al estado de pupa (100%) las 25 larvas a los 25 días (Tabla 11). Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas (2.018), en estudios sobre el ciclo de vida de *P. xylostella* determinaron que la duración para llegar a pupa en condiciones de laboratorio en la Universidad de Pamplona fue igual al Control de este bioensayo.

En cuanto a la emergencia de imagos, se encontró que en la dosis 66.000 mg/l, de las cinco pupas solamente emergieron dos adultos a los 50 días, con una sobrevivencia del 8%; en la dosis 33.000 mg/l, de las nueve pupas solo emergieron seis adultos a los 46 días, con una sobrevivencia del 24%; mientras que, en el Control, de las 25 pupas emergieron 24

imago a los 34 días, con una sobrevivencia del 96%. Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas (2.018), en estudios sobre el ciclo de vida de *P. xylostella* determinaron que la duración para llegar a imago en condiciones de laboratorio en la Universidad de Pamplona fue de 32 días, promedio muy similar al Control en el presente experimento.

Se puede apreciar fácilmente, que los metabolitos de los extractos de hojas de *A. indica* afectan el desarrollo normal de los estados de *P. xylostella*, modificando su desarrollo negativamente, siendo los adultos obtenidos de los tratamientos 66.000 y 33.000 mg/l, más pequeños, poco desarrollados, muy lentos, muriendo a los pocos días.

Desde las 96 horas de establecido el bioensayo las larvas aún vivas continuaron con su metamorfosis, su proceso de cambio de ínstar larval, por lo que el efecto de mortalidad de larvas en los tratamientos después de estas horas podría estar muy influenciado por la azadiractina y sus derivados los cuales generarían desordenes hormonales por la afección de las células neurosecretoras del cerebro, causando inhibición del crecimiento de la cutícula (integumento), porque la azadiractina bloquea los receptores de ecdisonas debido a que sus estructuras químicas son similares, además de afectar la síntesis de la hormona juvenil

Li; Song; Yin; Jia y Zou (2.019), probaron cinco dosis de extractos de neem contra el acrídido asiático *Oxya chinensis* Thunberg, encontrando que el extracto de etanol al 95% poseía la mayor actividad insecticida con un DL₅₀, que oscilaban entre 14,93 y 55,66 mg/ml. A un examen patológico en ninfas muertas reveló que había lesiones prominentes, incluidas las células regenerativas reducidas en el intestino medio e hinchadas y degeneradas, igualmente observaron células cilíndricas en el quinto instar de *O. chinensis* después del tratamiento. En lo ultraestructural, observaron características especiales en las células cilíndricas, las microvellosidades y las mitocondrias estaban gravemente dañadas. Estos

resultados sugirieron que el extracto de éter de petróleo de las hojas de neem tenía una potente actividad insecticida y podría ser un insecticida candidato.

Tabla 11

Sobrevivencia de larvas de *P. xylostella* sometidas a los tratamientos de extractos acuosos de hojas de *A. indica*, bajo condiciones de laboratorio.

Dosis (mg/l)	Mortalidad (%)	Pupas (días)	Pupas (%)	Adultos (días)	Sobrevivencia adultos (%)
100.000	84	0	0	0	0
66.000	64	5 (35)	20	2 (50)	8
33.000	36	9 (33)	36	6 (46)	24
Control	0	25 (25)	100	24 (34)	96

Fuente: archivo personal,2020

Es importante acotar que la proporción sexual también se ve afectada por las moléculas de los extractos acuosos de hojas de neem, con base a los adultos que sobrevivieron a los tratamientos y los cuales fueron todas hembras. Aunque hay muy pocos datos, llamó la atención que la proporción sexual en los adultos del Control fue 1: 1, proporción similar a la obtenida por Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas (2018) en sus estudios sobre el ciclo de vida de *P. xylostella*. En los tratamientos con la dosis de 66.000 mg/l lograron sobrevivir dos adultos y en la dosis 33.000 mg/l lograron llegar al estado adulto seis larvas, todas hembras, en ambos tratamientos, no cumpliéndose la proporción sexual 1:1 esperada. Sobre estos resultados, se puede especular que los extractos acuosos de hojas de neem pueden tener efecto sobre la proporción sexual de la especie, que nos llevaría a pensar que las hembras de *P. xylostella* pueden ser más resistentes o tolerantes a las moléculas de los extractos acuosos de hojas de neem.

11 Conclusiones

- La producción de metabolitos secundarios mediante el uso de extractos acuosos de *A. indica*, ofrece la posibilidad de producir biocidas de una manera segura y sustentable para los agroecosistemas de hortalizas.
- Las concentraciones de 100.000 mg/l de extractos acuosos de semillas de *A. indica* ejercieron el mayor efecto letal en larvas de segundo instar (L₂) de *P. xylostella*.
- Los extractos acuosos de semillas de *A. indica* son más letales, ya que la DL₅₀ fue de 37.000 mg/l; mientras que con los extractos acuosos de hojas la DL₅₀ se consigue con una dosis de 57.250 mg/l.
- Dosis iguales o superiores a los 37.000 mg/l de extractos acuosos de semillas garantiza una mortalidad superior al 50% de la población de *P. xylostella*.
- La dosis 100.000 mg/l de extractos de semillas, causa el 96,00% de mortalidad de las larvas al segundo día (48 horas) de aplicados los tratamientos; mientras la dosis 100.000 mg/l, de extractos de hojas, produce una mortalidad máxima de 84,00% a las 96 horas.
- El TL₅₀ para la dosis 100.000 mg/l de extractos de semillas es 22 horas; mientras que en la dosis 100.000 mg/l de extractos de hojas es 39 horas.

- Ninguna de las larvas sometidas a las tres dosis de los extractos acuosos de semillas de neem logró completar su desarrollo hasta el estado de pupa, lo mismo sucedió con la dosis 100.000 mg/l, en los extractos acuosos de hojas; mientras que todas las larvas del Control llegaron al estado de pupa.
- La duración hasta la emergencia de los imagos y su sobrevivencia también fue afectada notoriamente por los tratamientos con extractos de hojas de neem, emergiendo solamente dos adultos (8%) a los 50 días en la dosis 66.000 mg/l; seis adultos (24%) a los 46 días en la dosis 33.000 mg/l; mientras que, en el Control emergieron 24 imagos a los 34 días, con una sobrevivencia del 96%.
- Los adultos de *P. xylostella*, obtenidos de las dosis 66.000 y 33.000 mg/l de los extractos de hojas de *A. indica*, resultaron ser más pequeños, poco desarrollados, muy lentos, muriendo a los pocos días.

12 Recomendaciones

- Continuar con los bioensayos con extractos acuosos de *A. indica* y otras plantas promisorias para el control fitoquímico de artrópodos plaga.
- El uso de extractos acuosos de neem contra *P. xylostella* en cultivos de repollo y otras hortalizas, es seguro, fácil de obtener, económico, biodegradable y no afecta la entomofauna benéfica.
- Motivar a los agricultores en el uso de extractos de plantas, para que sea incluido dentro de los Programas de Manejo Integrado de Plagas.
- Concentrar los esfuerzos de investigación, dirigidos a *P. xylostella* y otros artrópodos plaga en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB).
- Se recomienda el uso de extractos de semillas de neem para el control de *P. xylostella* en el cultivo de hortalizas y otras plagas, sin embargo en épocas en donde no se presenta fructificación en el árbol de neem, se sugiere la aplicación de extractos acuosos de hojas como método de control de la plaga con aplicaciones periódicas, las cuales si están disponibles todo el año.

- Desarrollar ensayos en los cuales se evalué la eficiencia de los extractos acuosos de neem para el control de *P. xylostella*. en condiciones de campo, con el fin de comparar la variación de los resultados obtenidos con los presentados en el laboratorio y de acuerdo con esto recomendar las dosis adecuadas al productor.
- Se recomienda optar por controles fitoquímicos con extractos de neem para el control de *P. xylostella*, debido a que esta presenta una alta adaptabilidad y resistencia a las moléculas químicas comerciales, lo que hace que sea más difícil su control en campo.
- Realizar estudios más profundos sobre la letalidad de los extractos acuosos de hojas y semillas de neem sobre los sexos de *P. xylostella*.

13 Bibliografía

- Abbott, W. S.(1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal Economic Entomology (18):265-267. <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/18/2/265/785683?redirectedFrom=fulltext>
- Arregui, c., & Sánchez, D. y. (7 de Abril de 2010). Horticultura. Obtenido de I. Bertolaccini; D. Sánchez y C. Arregui: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-manual_de_horticultura_urbana_y_periurbana.pdf.
- Alatorre , K. 1992. Principales plagas de las crucíferas en Honduras. Proyecto Manejo Integrado de Plagas (MIPH- EAP).
- Baley, L. H. 1977. Manual of cultivated plants. Mc. Millan publishing, Co., Inc. New York. pp. 612-613. <https://archive.org/details/manualofcultiva00bail>
- Brenes, B. J. 2000. Cría masiva y liberación de parasitoides de *Plutella xylostella* L. y su manejo a través de *Bacillus thuringiensis* en el cultivo de repollo (*Brassica oleracea* L.) en tres épocas de siembra. Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. p. 52. <https://repositorio.una.edu.ni/1764/>
- Cruz, F. M. 1998. Dinámica de la azadiractina en árboles de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén. Tesis de Doctorado. UANL. Facultad de Agronomía. 73. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110341.PDF>
- Gemma E. Veitch, Edith Beckmann, Brenda J. Burke, Alistair Boyer, Sarah L. Maslen, Steven V. Ley (2008). «Synthesis of Azadirachtin: A Long but Successful Journey». Angewandte Chemie International Edition 46: 7629. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol026260y>

- González, 2002 . El proceso científico técnico que ha dado origen al aprovechamiento del árbol de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) como fuente de insecticida botánico. En: Taller de intercambio de experiencias y conocimientos sobre el cultivo del árbol de Neem en América Latina (Del 2 al 6 de Noviembre, 1992. Managua). (Memoria). Comité organizador. Managua
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3769/1/08.pdf>
- Gualdrón-Panqueva, J.; Toloza-Balcucho, D. V. y Giraldo-Vanegas, H. (2017). Evaluación de extractos de Neem *Azadirachta indica* A. Juss, como repelente e insecticida contra la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae), en la variedad Castillo en la Granja Experimental Villa Marina. Trabajo de Grado Ingeniero Agrónomo. Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Agrarias. Pamplona. 86 p.
- Gutiérrez, J. E. B., Jesús, C. R. H., Ríos, J. L. Z., Olguín, J. F. L., de la Peña, A. H., & Nápoles, J. R. (2018). Efecto de Extractos de Semillas de *Azadirachta indica* 1 Aplicado a *Meccus pallidipennis* (Stål) 2 en Condiciones de Laboratorio. *Southwestern Entomologist*, 43(2), 465-474. <https://n9.cl/v81n>
- Giraldo-Vanegas H., Vargas Á., Sarmiento A., Hernández E., Amaya F., Ramírez M., Ramírez F. y Contreras E. J. (2006). Evaluación de Bioplaguicidas para el manejo del saltahojas verde de la caña de azúcar *Saccharosydne saccharivora* (Westwood) (Hemiptera:Delphacidae), en el valle San Antonio-Ureña, Táchira, Venezuela. *Agronomía Tropical*. 56(2): 253-276.
- Martínez, Z. W. (junio de 2013). Recuperado el 14 de Marzo de 2018, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4373/T19838%20Z>

- Montero, D. A. V., Naranjo, N., & Van Strahlen, M. A. (2012). Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *Collaria scenica*, Stal (Hemiptera: Miridae). *EntomoBrasilis*, 5(2), 125-129.
<https://www.periodico.ebras.bio.br/ojs/index.php/ebras/article/view/224>
- Morgue (LUNTZ), A. J. and A. J: Nisbet. 2000. Azadiractin rom the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc: Entomol. Bras.* 29(4):615-632. https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S030180592000000400001&script=sci_arttext&tIng=en
- Muñoz, B. R., & Jaramillo, M. A. (2013). folleto técnico núm. 27 manejo integrado de la palomilla dorso diamante. Obtenido de http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3911/CIR_CE_01020851200053062ok.pdf?sequence=1
- Natalia Vinasco-Arias1 y Alberto Soto-Giraldo (2014). efecto insecticida de *Azadirachta indica* A. Juss sobre *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae).
[http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia22\(1\)_4.pdf](http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia22(1)_4.pdf)
- Lowery, D. T. and M. J. Smirle. 2000. Toxicity of insecticides to obliquebanded leafroller, *Chroristoneura rosaceana*, larvae and adults exposed previously to neem seed oil. *Entomol. Exp. Appl.* 95:201-207.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1570-7458.2000.00658.x>
- Li, L., Song, X., Yin, Z., Jia, R. y Zou, Y. (2019). Actividades insecticidas y mecanismo de extractos de hojas de neem contra *Oxya chinensis*. *Archivos Brasileños de Medicina Veterinaria y Ciencia Aneemal* , 71 (1), 1-10.
<https://n9.cl/es/s/xy26q>

- Omaña, R. &. (4 de Abril de 2016). Particularidades biológicas de *Plutella xylostella* (L.) en la finca Arizona, municipio Jáuregui, Venezuela. Revista Única, 5(2), 130-138. <http://revistas.unica.cu/index.php/uciencia/article/view/238/1039>
- Pérez, H. (2013). Cría y liberación del Parasitoide *Diadegma insulare* (Cresson) de la palomilla del repollo (*Plutella xylostella* L.) dentro de un contexto de MIP. Tesis Ing. Agr. Managua- Nicaragua. p. 24 - 31. <https://repositorio.una.edu.ni/1744/>
- Pérez, I. G. (Noviembre de 2013). efecto de franjas marginales de *Brassica campestris* L., en repollo sobre *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) y sus enemigos naturales. Obtenido de <http://xn--http-4b7a/bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/498/tesis.pdf?sequen%20ce=1&isAllowed=y>
- Ruíz, P. A. T., Restrepo, L. N. Z., Sánchez, R. A. H., Rodríguez, F. C. Y., Tafur, J. C., & Sánchez, F. O. (2008). Determinación de la DL50 y TL50 de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 61(2), 4564-4575. <https://www.redalyc.org/pdf/1799/179915376010.pdf>
- Sáenz, A. (2012). Susceptibilidad de *Plutella xylostella* L. a *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). Revista Colombiana de Entomología, 38 (1), 94-96. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v38n1/v38n1a16.pdf>
- Silva-Lizarazo, J. S. y Giraldo-Vanegas, H. (2018). “Ciclo biológico de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera:Plutellidae) y sus enemigos naturales en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB), Pamplona, Norte de Santander.”. Trabajo de Grado Ingeniero Agrónomo. Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Agrarias. Pamplona. 51 p.

- Shelton, AM, Long, SJ, Walker, AS, Bolton, M., Collins, HL, Revuelta, L., ... y Morrison, NI (2020). Primer lanzamiento en el campo de un insecto de plaga agrícola autolimitado genéticamente: evaluación de su potencial para la protección de cultivos en el futuro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* , 7 , 482. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00482/full?utm_campaign=fullarticle&utm_medium=referral&utm_source=inshorts
- TRABANINO, R. 1998. Guía para le Manejo Integrado de Plaga invertebrada en Honduras. Escuela
- Talekar, N.S. Y Shelton, A.M (1993). «Biología, ecología y gestión de la polilla del diamante». *Revisión anual de entomología* 38: 275-301. doi: 10.1146 / annurev.en.38.010193.001423.
- Villamil,D. Naranjo,N. Van Strahlen, M (2012).Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* (Stal) (Hemiptera: Miridae). Departamento de Horticultura, Universidade Estadual Paulista,https://www.researchgate.net/publication/287135276_Efecto_insecticida_del_extracto_de_semillas_de_Neem_Azadirachta_indica_sobre_Collaria_scenica_Stal_Hemiptera_Miridae

14 Anexos

Anexo 1 Formato de muestreo

Extracto de semilla, hoja o testigo					
tratamiento	repetición	Larva	fecha de muerte	hora de muerte	
Tratamiento del 100%, 66% y 33%	1	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
	2	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
	3	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
	4	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
	5	1			
		2			
		3			
		4			
		5			

Fuente: archivo personal,2020

Anexo 2 Despulpado de semillas de neem,



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 3 Semilla de neem recién despulpadas.



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 4 Revisión de las unidades experimentales con ayuda del estereoscopio.



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 5 Camaras de reproduccion y crianza de *P. xylostella*.



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 6 Camaras de reproduccion de *P. xylostella*



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 7 Larvas de *P.xylostella*



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 8 Discos de repollo desinfectados.



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 9 Ubicacion de las larvas en cada uno de los recipientes plasticos.



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 10 Secado a la sombra de las semillas de neem



Fuente: archivo personal

Anexo 11 Pupas del tratamiento de control.



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 12 Adherente usado



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 13 Observacion en cuanto a la mortalidad de las larvas



Fuente: archivo personal,2020

Anexo 14 Proceso de filtrado de las
soluciones madres de neem



Fuente: archivo personal,2020