

## Efectos secundarios de la azadiractina, vía contacto residual, en larvas jóvenes del depredador *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera, Chrysopidae)

H. VOGT, M. GONZÁLEZ, A. ADÁN, G. SMAGGHE y E. VIÑUELA

La aplicación vía contacto residual en laboratorio de dos formulaciones de azadiractina a la dosis máxima recomendada en campo: 0,3% de NeemAzal-T/S y 0,15% de Align, produjo diversos efectos negativos en las larvas L<sub>1</sub> del depredador *Chrysoperla carnea* (Stephens). El efecto fue más acusado en el caso de la formulación aceitosa NeemAzal-T/S, pero ambos compuestos provocaron la muerte de prácticamente todos los insectos a lo largo de su desarrollo larvario, un retraso en éste, un menor peso de las larvas, descoordinación de sus movimientos y menor movilidad, así como diversas malformaciones al mudar: mandíbulas distorsionadas, melanización anormal, expulsión del intestino, y restos de la exuvia adheridos al final del cuerpo. Bajo el microscopio electrónico se observaron alteraciones en cutícula y músculos de los insectos tratados: inclusión de cuerpos densos a los electrones, desorientación de las microfibrillas, destrucción de mitocondrias y fibras musculares más ralas.

H. VOGT: Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA). Institute for Plant Protection in Fruit Crops. Schwabenheimer Str. 101. D-69221 Dossenheim. Alemania.

A. ADÁN, M. GONZÁLEZ y E. VIÑUELA: Protección de Cultivos. E.T.S.I. Agrónomos. 28040-Madrid.

G. SMAGGHE: Laboratory of Agrozoology. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Coupure Links 653. B-9000 Gent. Bélgica.

**Palabras clave:** *Chrysoperla carnea*, larvas, azadiractina, Align, NeemAzal-T/S, efectos secundarios, contacto residual.

### INTRODUCCIÓN

La azadiractina, uno de los triterpenoides más abundantes en la meliácea *Azadirachta indica* A. Juss (WILLIAMS y MANSINGH, 1996), produce en los insectos dos tipos de efectos: altera su comportamiento causando repelencia y antiapetitividad, y altera su desarrollo al interferir con la producción tanto de la hormona juvenil como de los ecdisteroides al bloquear la liberación de péptidos morfogenéticos (VAN DER NAT *et al.*, 1991; MORDUE y BLACKWELL, 1993).

La sensibilidad de los insectos parece variar mucho en cuanto a la alteración de su comportamiento, aunque no tanto en cuanto

a los efectos fisiológicos (MORDUE y BLACKWELL, 1993; MORDUE *et al.*, 1996), pero se ha visto que la azadiractina es compatible con gran número de enemigos naturales (RUIZ *et al.*, 1996).

Existe una gran variedad de formulaciones a base de azadiractina (ERMEL y KLEEBOG, 1995) y algunas parecen actuar tanto por contacto como por ingestión (RUIZ *et al.*, 1996). En este trabajo se ha estudiado la acción vía contacto residual del NeemAzal-T/S (formulación utilizada en Alemania) y del Align (formulación registrada en España), en larvas jóvenes del depredador *Chrysoperla carnea* (Stephens), que es abundantísimo en muchos de nuestros cultivos (VIÑUELA *et*



Fig. 1.—Puesta de *Chrysoperla carnea*.



Fig. 2.—Larva de tercer estadio de *Chrysoperla carnea* sobre manzano.

*al.*, 1996) (figuras 1 y 2), siguiendo la metodología de la Organización Internacional para la Lucha Biológica (OILB).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Las larvas de *C. carnea* utilizadas en los ensayos, provenían de una cría continua de laboratorio mantenida en cámara con unas condiciones controladas de  $25 \pm 2$  °C de temperatura,  $75 \pm 5\%$  de humedad relativa y 16 horas luz de fotoperiodo.

Los adultos se alimentaron con agua y una papilla a base de 15 ml de leche condensada, 50 ml de agua destilada, 20 g de fructosa, 50 g de germen de trigo, 30 g de miel, 30 g de levadura de cerveza, 1 huevo y 1 yema, que se guardaba en nevera hasta su

uso. Las larvas se alimentaron únicamente con huevos de la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann).

Grupos de 20 parejas de adultos se colocaron en cajas rectangulares de plástico de 26 x 13 x 6 cm, que se cerraban con una gasa mantenida en su lugar gracias al marco de la tapa de la caja. Las crisopas efectuaban la puesta en esta gasa que se cambiaba diariamente. La papilla se aplicaba en pequeñas cantidades con un pincel sobre las paredes de la caja y se reemplazaba cada 2-3 días porque se secaba. El agua se suministró en pequeños vasos de cristal, que se tapaban con Parafilm y que llevaban un trozo de bayeta, según describen BUDIA y VIÑUELA (1996), y no se cambiaron durante el ensayo.

Cada gasa con huevos, se llevó a cajas rectangulares de plástico de 28 x 18 x 5 cm, con una tapa que tenía un orificio de 20 x 11 cm cubierto por visillo para ventilación. En el

fondo se colocaron varios trozos de papel de filtro doblados en zig-zag para proporcionar refugios a las larvas y evitar que se atacaran entre si, ya que son muy caníbales. Los huevos de *C. capitata* se distribuyeron diariamente sobre el fondo de la caja.

Cuando las larvas pupaban, se retiraban los trozos de papel con los capullos y se ponían en cajas Petri hasta la emergencia de los adultos.

En nuestras condiciones, la duración del ciclo de huevo a adulto fue de unos 25-30 días: de huevo a larva neonata 4 días, 3 estadios larvarios que duran un total de unos 13-15 días y estado pupal 8-12 días.

### Insecticidas

Se utilizaron dos preparados comerciales a base de azadiractina: el NeemAzal-T/S (Trifolio, Alemania) que era un CE con aceites y una riqueza del 1% en azadiractina A y el Align (Sipcam Inagra, España), que era también un CE pero sin aceites y con un 3,2% de azadiractina.

Ambos productos se aplicaron a las dosis máximas recomendadas en campo en Alemania y España respectivamente, que fueron 0,3% para NeemAzal-T/S y 0,15% para Align. Para la preparación de las soluciones, y siguiendo las recomendaciones del grupo de trabajo de la OILB *Plaguicidas y organismos beneficiosos*, se tuvo en cuenta el PIEC o concentración ambiental inicial predecible de un plaguicida, que depende de los l/ha que apliquemos al cultivo y del tipo de cultivo (BARRETT *et al.*, 1994).

El PIEC en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  es igual a la dosis máxima en g/ha multiplicada por un factor corrector que depende del cultivo y dividida por 100. El factor de corrección trata de compensar el hecho de que los cultivos herbáceos son más fáciles de recubrir que los leñosos y mientras que sobre los primeros se queda prácticamente el 100% de lo aplicado (factor = 1), sobre la parte aérea de los leñosos quedaría solamente el 40% (factor = 0,4) y sobre el suelo de éstos el 50% (factor = 0,5).

En nuestros ensayos, como *C. carnea* es muy abundante en los frutales y se localiza sobre todo en el follaje, para calcular el PIEC se usó un factor de 0,4 y 1.000 l/ha. Los residuos a los que se expusieron las larvas, fueron por tanto  $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de NeemAzal-T/S y  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Align.

### Ensayos

Se siguió la metodología normalizada de la OILB (BIGLER, 1988; JACAS y VIÑUELA, 1994) pero se emplearon placas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro en lugar de cajas desmontables, por no disponer de número suficiente de éstas.

Las placas se trataron bajo la torre de Potter (figura 3) a 50 kPa de presión, pulverizándose 1 ml de las soluciones insecticidas o agua, para conseguir un residuo de  $1,26 \pm 0,03 \text{ mg}/\text{cm}^2$ .



Fig. 3.—Torre de Potter.

Se dejaron secar a temperatura ambiente, se introdujeron los insectos y los huevos de *C. capitata* y se llevaron a la cámara de condiciones controladas.

En cada ensayo se trataron 40 L<sub>1</sub> (2 días de edad) por insecticida y el testigo, que se mantuvieron aisladas para evitar pérdidas por canibalismo.

El efecto de la azadiractina en *C. carnea* se midió evaluando el peso larvario a los 4 y 6 días tras tratar, la mortalidad a lo largo del desarrollo, los porcentajes de pupas y de adultos emergidos respecto a las pupas totales, la duración del desarrollo y las malformaciones observadas.

Para separar los estadios larvarios, se usó la anchura de la cápsula cefálica: L<sub>1</sub> = 0,35 mm; L<sub>2</sub> = 0,55 mm y L<sub>3</sub> = 0,85 mm.

También, y con el fin de contribuir a esclarecer el modo de acción de la azadiractina, se hicieron estudios de los músculos y la cutícula al microscopio electrónico de transmisión. Las larvas se prepararon según la técnica descrita por VIÑUELA y BUDIA (1994) y SMAGGHE *et al.* (1996).

### Análisis estadístico

Los datos se analizaron por medio de Análisis de Varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphic (STSC, 1987). Las diferencias significativas entre medias ( $P < 0,05$ ) se establecieron con el test LSD. Los porcentajes se transformaron en  $\text{arsen}\sqrt{x}$  antes del análisis, sólo si no eran normales (MILLIKEN y JOHNSON, 1984). Cuando el test F de ANOVA no fue significativo, se usó Bonferroni para separar las medias.

No se pudo estudiar la reproducción, porque no hubo emergencia de adultos en los tratados.

### RESULTADOS

La azadiractina resultó perjudicial para las larvas de *C. carnea*, siendo el efecto más drástico para la formulación aceitosa (Nee-mAzal-T/S).

A los cuatro días del tratamiento (figura 4), las larvas tratadas ya pesaban significati-

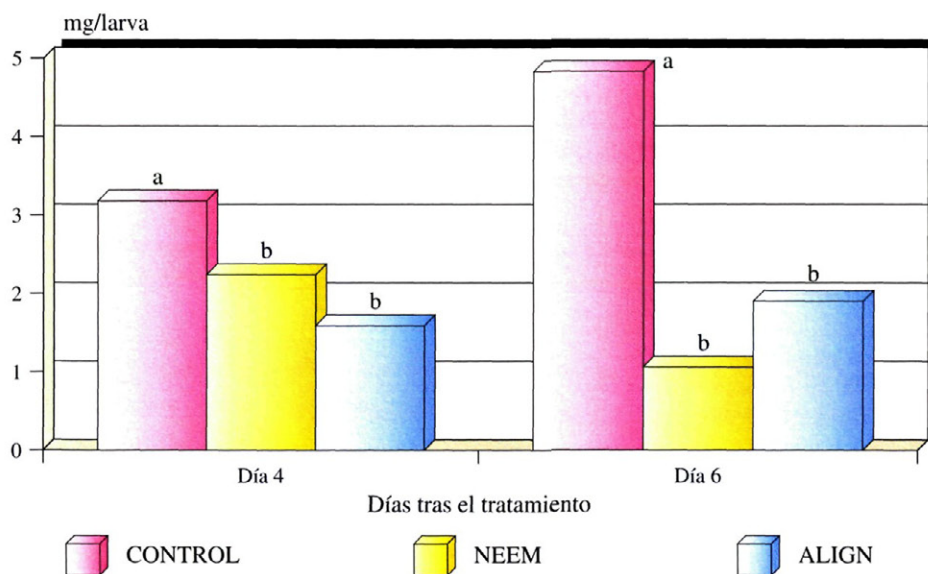


Fig. 4.—Comparación del peso de las larvas de *Chrysoperla carnea* en testigos y tratados con Align y NeemAzal-T/S a los 4 y 6 días después del tratamiento.

vamente menos que los testigos ( $F_{2,27} = 10,8$ ; ANOVA y LSD) y el efecto se hizo aún más patente a los 6 días ( $F_{2,27} = 38,1$ ; ANOVA y LSD). Además mientras que los testigos incrementaron significativamente de peso del día 4 al día 6 ( $3,2 \pm 0,3$  y  $4,8 \pm 0,5$  mg respectivamente;  $F_{1,18} = 10,5$ ; ANOVA y LSD), los tratados con NeemAzal-T/S experimentaron una reducción significativa de este parámetro en el periodo ( $2,2 \pm 0,2$  y  $1,1 \pm 0,2$  mg;  $F_{1,18} = 14,4$ ; ANOVA y LSD), y los tratados con Align no lo modificaron ( $1,6 \pm 0,3$  y  $1,9 \pm 0,3$  mg;  $F_{1,18} = 0,5$ ; ANOVA y Bonferroni) (figura 5).

Ambas formulaciones de azadiractina afectaron muy seriamente el desarrollo de las crisopas, ya que como vemos en la figura 6, sólo los testigos fueron capaces de pupar en porcentajes importantes (75,8%) y llegar a adultos (63,6%). Las larvas tratadas con Align tardaron más tiempo en manifestar el daño y los porcentajes de  $L_2$  (96,9%) y  $L_3$  (46,9%) fueron notablemente superiores a los registrados en el NeemAzal-T/S (71,8% y 12,5% respectivamente). En esta última variante, no hubo ninguna pupa y en

el Align tan sólo un 3,1%, que además no formaron el capullo sedoso característico de la especie.

La distribución de la mortalidad a lo largo del tratamiento (figura 7) fue diferente en testigos y tratados. En los testigos la mortalidad más importante se dio en  $L_3$  (18,2%) y en pupa (18,2%). En la variante NeemAzal-T/S se dio por el contrario una mortalidad muy temprana y ya se registró mortalidad directa en el estadio tratado  $L_1$  (6,3%) y luego hubo valores importantes en la muda  $L_1$ - $L_2$  (21,9%), en  $L_2$  (59,4%) y en  $L_3$  (12,4%). El Align permitió que las larvas se desarrollaran algo más lejos y los porcentajes más elevados de mortalidad se registraron en  $L_2$  (43,8%) y  $L_3$  (43,8%), no habiendo prácticamente mortalidad entre mudas, aunque si muchos insectos con algunas malformaciones.

Por tanto, la mortalidad más importante se dió con las dos formulaciones de azadiractina en el estado larvario, pero el momento en que se produjo varió notablemente como vemos en la figura 8 en que se representa la mortalidad larvaria acumulada a lo largo del ensayo. Aquí se aprecia que no sólo la mortalidad lar-

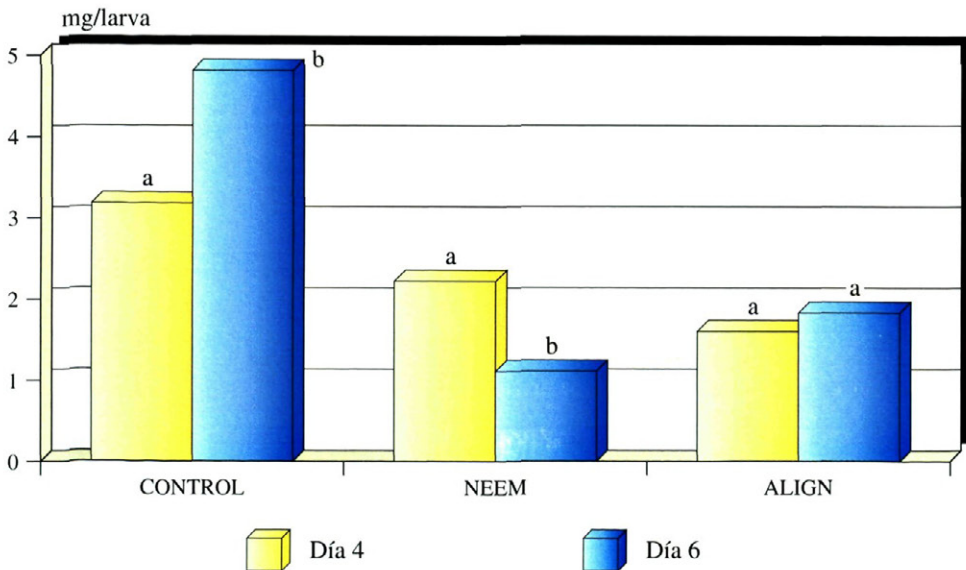


Fig. 5.—Evolución del peso larvario en testigos y tratados con Align y NeemAzal-T/S.

varia total en los tratados fue mucho más alta que en los testigos (100% en NeemAzal-T/S; 96,9% en Align y 18,2% en los testigos),

sino que durante la primera mitad del ensayo en la variante NeemAzal-T/S hubo muchas más larvas muertas que en el Align.

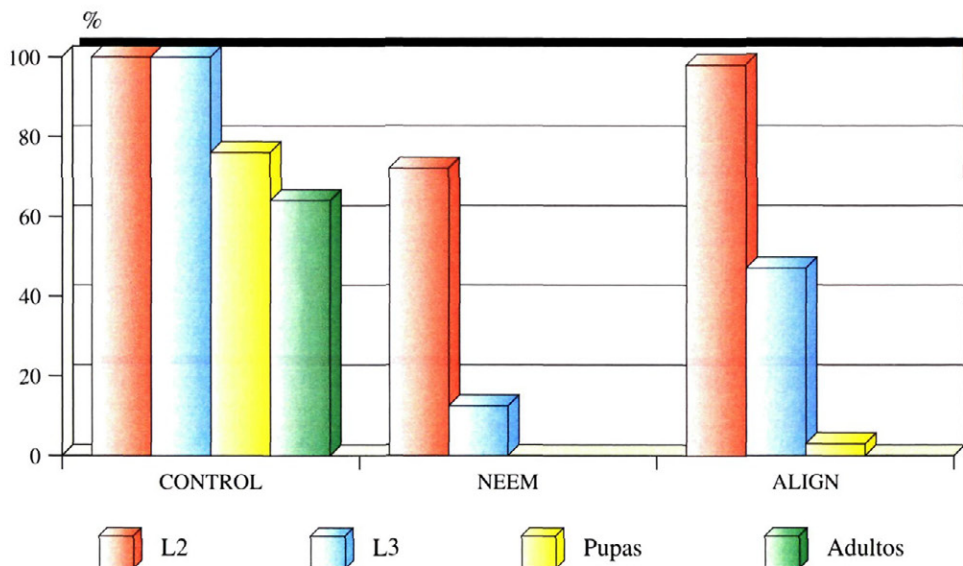


Fig. 6.-Proporción de los diferentes estadios y estados de desarrollo en *Chrysoperla carnea* testigos y tratados con Align y NeemAzal-T/S.

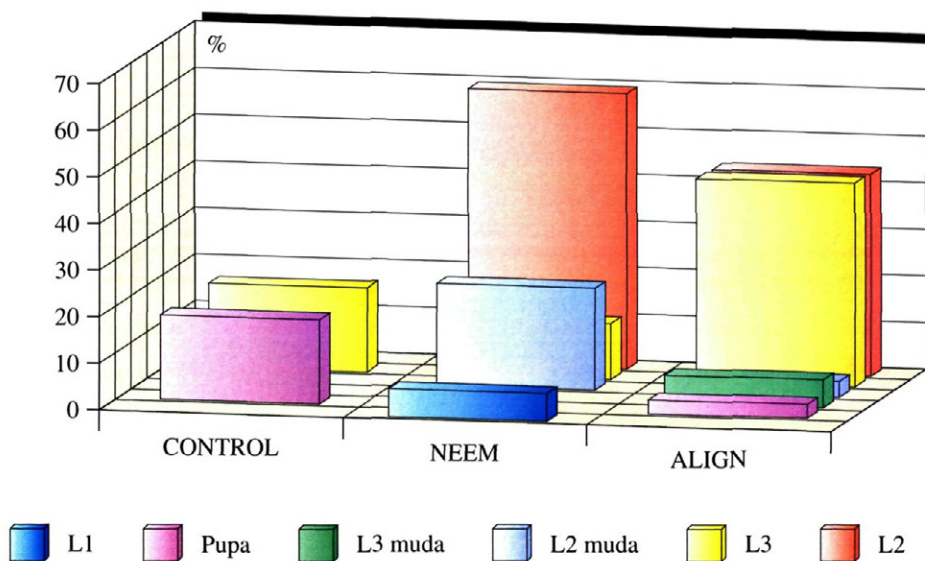


Fig. 7.-Distribución de la mortalidad en *Chrysoperla carnea* testigos y tratados con las dos formulaciones de azadiractina (Align y NeemAzal-T/S).

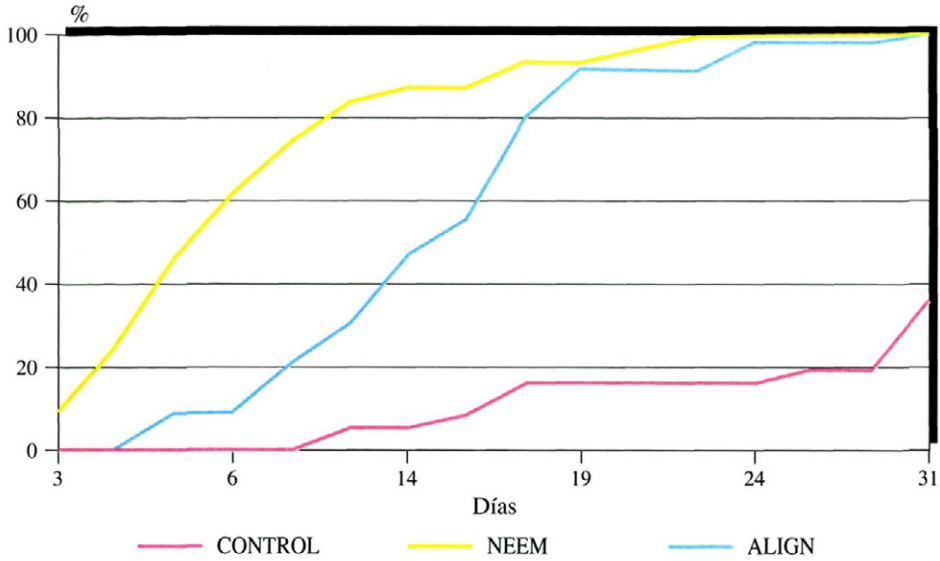


Fig. 8.—Mortalidad larvaria acumulada en testigos y tratados con Align (0,15%) y NeemAzal-T/S (0,3%).

Ambas formulaciones de azadiractina provocaron un retraso en el desarrollo de *C. carnea*, como se puede ver en el cuadro 1. Mientras que en los testigos a los 6 días tras tratar había ya un 99,9% de L<sub>3</sub>, en los tratados fue cuando apareció este estadio por primera vez. La primera pupa en los tes-

tigos apareció a los 10 días tras tratar y en la variante Align a los 14 días, mientras que en el NeemAzal-T/S ningún insecto alcanzó el estado pupal. A los 21 días tras tratar ya habían salido todos los adultos del testigo (el primero apareció a los 18 días), mientras que en el NeemAzal-T/S todas las larvas es-

Cuadro 1.—Efectos sobre el desarrollo de *Chrysoperla carnea* de dos formulaciones de azadiractina, Align (0,15%) y NeemAzal-T/S (0,3%), aplicadas vía contacto residual a larvas de primer estadio

Días tras tratar L <sub>1</sub>	Etapas del desarrollo		
	Testigo	Align	NeemAzal-T/S
1	Primera L <sub>2</sub>	Primera L <sub>2</sub>	Primera L <sub>2</sub>
3	100% L <sub>2</sub>	N.º máximo L <sub>2</sub> (96,9%)	N.º máximo L <sub>2</sub> (71,8%)
5	Primera L <sub>3</sub>	—	—
6	99,9% L <sub>3</sub>	Primera L <sub>3</sub>	Primera L <sub>3</sub>
10	100% L <sub>3</sub>	—	—
	Primeras pupas (51,5%)	37,5% L <sub>3</sub>	N.º máximo L <sub>3</sub> (12,5%)
13	—	N.º máximo L <sub>3</sub> (46,9%)	—
14	—	Primera y única Pupa	—
18	Primer Adulto	—	—
19	33,3% Adultos	—	—
21	N.º máximo Adultos (63,6%)	—	Todo muerto
31	—	Todo muerto	—

taban muertas. En la variante Align, tardaron algo más en morir y alguna larva L<sub>3</sub> permaneció viva sin pupar hasta 31 días después de tratar.

La azadiractina aplicada via contacto residual produjo diversas malformaciones en las larvas de *C. carnea* y algunas tenían las mandíbulas torcidas (figura 9), el intestino



Fig. 9.—Larva L<sub>2</sub> de *Chrysoperla carnea* con las mandíbulas asimétricas tras haber aplicado Align (0,15%) vía contacto residual a larvas L<sub>1</sub>.



Fig. 10.—Tegumento de una larva testigo de *Chrysoperla carnea* bajo el microscopio electrónico de transmisión (x 7.000).

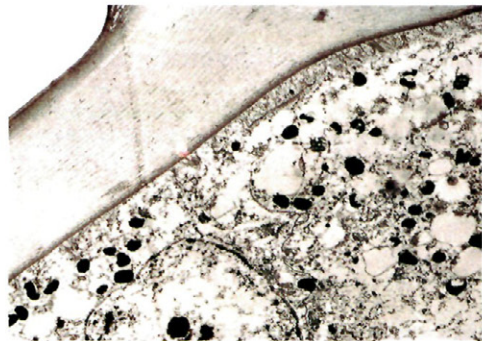


Fig. 11.—Epidermis de una larva de *Chrysoperla carnea* tratada con Align (0,15%) mostrando abundantes inclusiones de cuerpos densos a los electrones (microscopio electrónico de transmisión x 7.000).



Fig. 12.—Desorientación de microfibrillas en el tegumento de una larva tratada con NeemAzal-T/S (0,3%) (microscopio electrónico de transmisión x 30.000).



parcialmente fuera por lo que se pegaban a la placa de vidrio y no eran capaces de liberarse, una melanización anormal, restos de la exuvia adheridos al final del cuerpo, una menor movilidad, movimientos descoordinados y una menor talla que los testigos. También aparecieron formas intermedias cuando las crispas murieron en la muda y pupas sin capullo en porcentajes muy superiores a los registrados en los testigos.

Bajo el microscopio electrónico, el tegumento de los testigos (figura 10) y de los tratados fue muy diferente. En la variante Align se observaron abundantes inclusiones de cuerpos densos a los electrones en las células epidérmicas (figura 11), y en el NeemAzal-T/S una desorientación de las láminas de la cutícula (figura 12).

En los músculos también se detectaron anomalías y mientras que los testigos te-

nían las fibras densas y las mitocondrias funcionales (figura 13), los tratados con Align tenían las fibras muy ralas y alguna mitocondria parcialmente afectada (figura 14) y los tratados con NeemAzal-T/S tenían éstas últimas prácticamente inoperantes y vacías (figura 15).

## DISCUSIÓN

Los plaguicidas cuya materia activa es azadiractina no suelen tener acción por contacto o ésta es muy baja, por lo que en general se considera que causan efectos despreciables en los enemigos naturales y se pueden usar por tanto en programas de manejo integrado de plagas (IPM) (SCHMUTTERER, 1995).

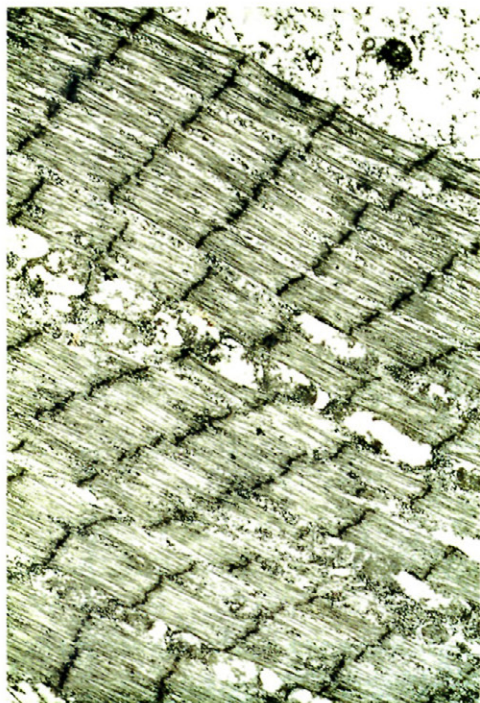


Fig. 13.—Corte longitudinal de los músculos de una larva testigo de *Chrysoperla carnea* (microscopio electrónico de transmisión x 4.400).

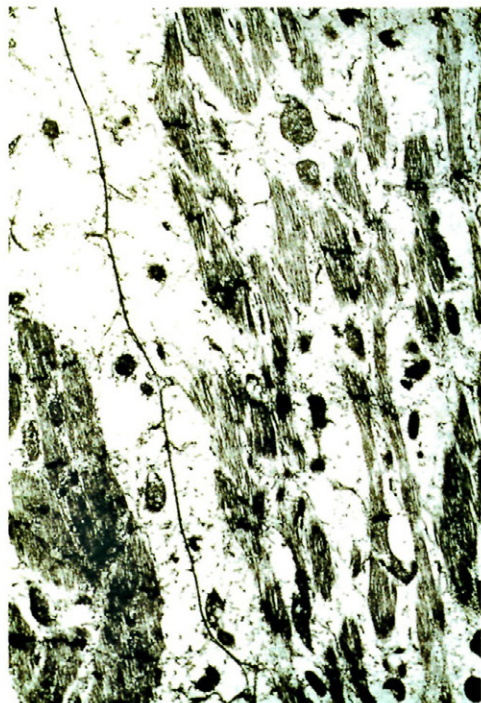


Fig. 14.—Músculos de una larva tratada con Align (0,15%), mostrando fibras ralas y mitocondrias parcialmente afectadas (microscopio electrónico de transmisión x 4.400).



Fig. 15.—Mitocondrias vacías en los músculos de una larva tratada con NeemAzal-T/S (0,3%) (microscopio electrónico de transmisión x 3.000).

En nuestros ensayos sin embargo, las dos formulaciones estudiadas, la aceitosa NeemAzal-T/S y el Align, causaron diversos efectos perjudiciales en el depredador *C. carnea* aplicados via contacto residual en laboratorio a larvas L<sub>1</sub>. El efecto fue más drástico en el caso del NeemAzal-T/S, aunque el Align parece tener una buena acción por contacto (RUIZ *et al.*, 1996), pero en ambos casos la práctica totalidad de los insectos murieron en estado larvario y en ningún caso hubo emergencia de adultos.

Estos resultados negativos en laboratorio, no implican que la azadiractina no se pueda usar conjuntamente con este depredador en campo. En primer lugar la azadiractina es un compuesto que controla fundamentalmente los estadios juveniles de los insectos y para *C. carnea* se ha visto que ni los adul-

tos tratados en laboratorio (RUIZ *et al.*, 1996), ni los huevos (SCHMUTTERER, 1995) son afectados, por lo que bastaría con aplicar el producto en un momento en el que la población del depredador no estuviera mayoritariamente en estado larvario.

En segundo lugar, el que una formulación tenga efectos muy negativos en laboratorio, no quiere decir que se comporte igual en campo. Así por ejemplo para el NeemAzal-T/S se ha visto que aplicado en campo a la dosis máxima recomendada, es inocuo para las crisopas (VIÑUELA *et al.*, 1996). El que una formulación de azadiractina sea más tóxica en laboratorio que en campo para un enemigo natural, era de esperar, ya que las placas Petri no ofrecen refugios a los insectos que se ven forzados a permanecer en contacto con los residuos y éstos además no se degradan probablemente a la misma velocidad que en campo, donde se ha visto que la persistencia del producto es limitada (SUNDARAM *et al.*, 1997).

El crecimiento de las larvas de *C. carnea* se vio inhibido tras entrar en contacto con los residuos de azadiractina y hubo una notable reducción en el tamaño de las mismas respecto al testigo, visible ya a los 4 días después de tratar, que era más acusada en el caso del NeemAzal-T/S.

Esta ausencia de ganancia de peso se ha citado en varias especies pero en tratamientos via ingestión (MEISNER *et al.*, 1991; BURBALLA *et al.*, 1995), porque los insectos ven modificado su comportamiento alimentario y dejan de comer del alimento tratado tras entrar en contacto con él (efecto antiapetitivo primario) (SCHMUTTERER, 1985).

En nuestros ensayos sin embargo, las larvas de *C. carnea* dejan de comer del alimento, que no está tratado, tras entrar en contacto con residuos de azadiractina en el cristal. Parece haberse manifestado por tanto, un efecto antiapetitivo secundario causado por mecanismos de retroalimentación internos (SCHMUTTERER, 1985) ya que la azadiractina afecta a los quimiorreceptores del insecto y modifica por tanto sus respuestas gustativas y olfativas (WILLIAMS y MANSINGH, 1996).

A los efectos antiapetitivos secundarios, contribuyen también diversos efectos directos de la azadiractina (MORDUE y BLACKWELL, 1993), como pueden ser las alteraciones en músculos y tegumento que observamos en nuestras larvas bajo el microscopio electrónico y que probablemente contribuyeron a la reducción en su movilidad y a la descoordinación de sus movimientos.

Otros factores que pueden haber contribuido en nuestro caso a la falta de alimentación, son las mandíbulas distorsionadas, la imposibilidad de las larvas de liberarse totalmente de la exuvia que permanecía adherida al final de su cuerpo limitando su movilidad, o la expulsión de su intestino que hacía que los insectos quedaran pegados al cristal porque no tenían fuerzas para liberarse.

Finalmente, tanto el NeemAzal-T/S como el Align aplicados vía contacto residual provocaron un retraso en el desarrollo de las larvas de *C. carnea*. Este efecto ha sido citado en muchas otras especies de insectos tras la ingestión de azadiractina (BURBALLA *et al.*, 1995; ADÁN *et al.*, 1998) y se ha atribuido en parte a efectos antiapetitivos, pero también se ha observado cuando el compuesto se aplicaba a pupas (PASCUAL *et al.*, 1990) y

una de las razones parece ser la reducción significativa que provoca en los niveles de ecdisteroides (MARCO *et al.*, 1990).

En nuestro caso, tanto los efectos antiapetitivos como la interferencia de la azadiractina con el sistema hormonal interno de los insectos, podrían haber contribuido a los efectos observados en el depredador.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean dar las gracias a las compañías Trifolio (Lahnau, Alemania) y Sipcarn Inagra (Valencia, España) por las muestras de NeemAzal-T/S y Align. Este trabajo fue financiado por la Comunidad de Madrid (Proyecto 06M/022/96), el Ministerio de Educación y Cultura de España (Acción Integrada España-Alemania HA1996-0020) y la DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst). M. González agradece a la Comunidad de Madrid, las becas recibidas. Agradecemos al Centro de Microscopia Luis Bru (Univ. Complutense, Madrid) las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

## ABSTRACT

VOGT, H.; GONZÁLEZ, M.; ADÁN, A.; SMAGGHE, G. y VIÑUELA, E., 1998: Side-effects of azadirachtin, via residual contact, in young larvae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens). *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(1): 67-78.

Two formulations of azadirachtin, applied via residual contact in laboratory at the highest field recommended concentrations: 0.3% NeemAzal-T/S and 0.15% Align, were highly toxic to the first-instar larvae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens). The oily formulation, NeemAzal-T/S caused a more severe effect, but in both cases the pesticides disrupted larval development inducing high larval mortality along the different instars and preventing pupation and adult emergence. Other effects observed were: development delay, inhibition of weight gain and several moult deficiencies: distorted mandibles, abnormal melanization, gut extrusion, inability of complete shedding off the old cuticle, desorientated movements and a lesser mobility. Under the transmission electron microscope, several malformations became apparent: inclusion of electron-dense bodies, distorted microfibrils, alterations of mitochondria and a lesser density of muscle fibers.

**Key-words:** *Chrysoperla carnea*, larvae, azadirachtin, Align, NeemAzal-T/S, side-effects, residual contact.

## REFERENCIAS

- ADÁN, A.; SORIA, J.; DEL ESTAL, P. y VIÑUELA, E., 1998: Acción diferencial de dos formulaciones de azadiractina sobre los estados de desarrollo de *Ceratitis capitata* (Wied). *Bol. San. Veg. Plagas* (en prensa).
- BARRETT, K. I.; GRANDY, N.; HARRISON, E. G.; HASSAN, S. y OOMEN, P., ed., 1994: *Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods*. SETAC-EUROPE. U.K. 51 pp.
- BIGLER, F., 1988: A laboratory method for testing side-effects of pesticides on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Steph). *IOBC/WPRS Bull. XI*(4): 71-77.
- BUDIA, F. y VIÑUELA, E., 1996: Effects of cyromazine on adult *Ceratitis capitata* on mortality and reproduction. *J. Econ. Entomol.* **89**(4): 826-831.
- BURBALLA, A.; SARASÚA, M. J. y AVILLA, J., 1995: Alimentación, mortalidad y desarrollo de *Cydia pomonella* (L.) y de *Cacoecimorpha pronubana* (Hübner) sobre dieta con extracto de neem incorporado. *Bol. San. Veg. Plagas* **21**: 425-437.
- ERMEL, K. y KLEEBERG, H., 1995: Commercial products. En: *The neem tree* 375-384. Schmutterer H. ed. VCH. Weinheim.
- JACAS, J. y VIÑUELA, E., 1994: Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor*, a parasitoid of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Biocontrol Scien. & Technol.* **4**: 147-154.
- MARCO, M. P.; PASCUAL, N.; BELLÉS, X.; CAMPS, F. y MESSEGUER, A., 1990: Ecdysteroid depletion by azadirachtin in *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Biochem. & Physiol.* **38**: 60-65.
- MEISNER, J.; MELAMED-MADJAR, V. y NEMNY, N. E., 1991: Effect of Margosan-O on the growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Int. Pest Control* **34**: 52-53.
- MILLIKEN, G. A. y JOHNSON, D. E., 1984: *Analysis of messy data*, vol. I: designed experiments. Van Nostrand Reinhold, New York. 473 pp.
- MORDUE (LUNTZ), A. J. y BLACKWELL, A., 1993: Azadirachtin, an update. *J. Insect Physiol.* **39**: 903-924.
- MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J.; NASIRUDDIN, M. y WALKER, E., 1996: Differential thresholds of azadirachtin for feeding deterrence and toxicity in locusts and an aphid. *Entomol. exp. appl.* **80**: 69-72.
- PASCUAL, N.; MARCO, M. P. y BELLÉS, X., 1990: Azadirachtin induced imaginal moult deficiencies in *Tenebrio molitor*. *J. Stored Prod. Res.* **26**: 53-59.
- RUIZ, A.; PRADES, J.; CANO, F. J. y ABRIL, E., 1996: Align, un bioinsecticida de origen vegetal, biodegradable, compatible con el medio ambiente y los enemigos naturales de las plagas. *Actas II congreso SEAE*. Pamplona 1996 (en prensa).
- SCHMUTTERER, H., 1985: Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions? *Zeitschrift Angewandte Entomologie* **100**: 468-475.
- SCHMUTTERER, H., 1995: Side-effects on beneficials and other ecologically important non-target organisms. Introduction. En: *The neem tree* 495-517. Schmutterer H. ed. VCH. Weinheim.
- SMAGGHE, G.; VIÑUELA, E.; BUDIA, F. y DEGHEELE, D., 1996: In vivo and in vitro effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: an ultrastructural approach. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **32**: 121-134.
- STSC, 1987: *Statgraphics user's guide*, version 5.0 Graphic software system. STSC Rockville, MD.
- SUNDARAM, K. M. S.; SUNDARAM, A.; CURRY, J. y SLOANE, L., 1997: Formulation selection and investigation of azadirachtin-A persistence in some terrestrial and aquatic components of a forest environment. *Pestic. Sci.* **51**: 74-90.
- VAN DER NAT, J. M.; VAN DER SLUIS, W. G.; DE SILVA, K. T. D. y LABADIE, R. P., 1991: Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *J. Ethnopharmacology* **35**: 1-24.
- VIÑUELA, E. y BUDIA, F., 1994: Ultrastructure of *Ceratitis capitata* (Wied) larval integument and changes induced by the IGI cyromazine. *Pestic. Biochem. Physiol.* **48**: 191-201.
- VIÑUELA, E.; HÄNDEL, U. y VOGT, H., 1996: Evaluación en campo de los efectos secundarios de dos plaguicidas de origen botánico, una piretrina natural y un extracto de neem, sobre *Chrysoperla carnea* (Stephens). *Bol. San. Veg. plagas* **22**: 97-106.
- WILLIAMS, L. A. D. y MANSINGH, A., 1996: The insecticidal and acaricidal actions of compounds from *Azadirachta indica* and their use in tropical pest management. *Integrated Pest Manag. Rev.* **1**: 133-145.

(Recepción: 20 enero 1998)

(Aceptación: 20 febrero 1998)