



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

**RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN
DE UNA POBLACIÓN DE ABEJAS
(*Apis mellifera* L.) A
IMIDACLOPRID**

RUBÉN SANTILLÁN CASTILLO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: “**Respuesta a la exposición de una población de abejas (*Apis mellifera* L.) a Imidacloprid**” realizada por el alumno: **Rubén Santillán Castillo** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. FERNANDO CASTILLO GONZÁLEZ

ASESOR

DR. IGNACIO BENÍTEZ RIQUELME

ASESOR

DR. FERNANDO UTRERA QUINTANA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2022

RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN DE UNA POBLACIÓN DE ABEJAS (*Apis mellifera* L.) A IMIDACLOPRID

Rubén Santillán Castillo, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

El uso de insecticidas en la agricultura representa un riesgo para la supervivencia de *Apis mellifera* L., especie clave para mantener la biodiversidad del planeta. Un mecanismo para contrarrestar los efectos negativos, es el desarrollo de colmenas tolerantes a los neonicotinoides. El objetivo de este estudio fue determinar, mediante la Dosis Letal Media (DL_{50}), las diferencias en la mortalidad de varias colmenas de *Apis mellifera*, tomadas al azar del apiario experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, expuestas a cuatro dosis (0.01 a 1.0 $mL \cdot L^{-1}$) del insecticida Confidor® (i.a., imidacloprid), valorada en dos temporadas y la influencia de un coadyuvante comercial.

En Montecillo, Texcoco, Edo. de Méx., en el periodo 2020 - 2021, se asperjaron 15 abejas euro-africanas coetáneas por colmena, por dosis de insecticida, con y sin coadyuvante, seleccionadas de 10 colmenas del apiario experimental del Colegio de Postgraduados. Se registró, durante 72 h, la mortalidad de los insectos. La dosis superior del insecticida, correspondiente a la recomendación para uso agrícola del fabricante (1.0 $mL \cdot L^{-1}$), resultó extremadamente mortal (más del 80% de mortalidad promedio de ambas temporadas). Se identificó una colmena que mostró mayor tolerancia con menor porcentaje promedio de mortalidad y mayor DL_{50} , estimada ésta mediante la regresión de la mortalidad sobre la dosis, en la temporada otoño – invierno (26.3%; $DL_{50}=1 mL \cdot L^{-1}$) y otra colmena tolerante en la temporada primavera – verano (46.92%; $DL_{50}=0.09 mL \cdot L^{-1}$).

La adición de un coadyuvante no afectó de forma biológica significativa la mortalidad de las abejas. La DL_{50} fue variable entre colmenas de ambas temporadas, lo cual permite esperar respuesta de selección en estudios posteriores; además, las lecturas alrededor de las 20 h posteriores a la exposición y las dosis 0.033 y 0.066 $mL \cdot L^{-1}$ permitieron, de manera más clara, observar diferencias significativas en la mortalidad entre las colmenas; niveles que serían recomendables en futuras investigaciones.

Palabras clave. *Apis mellifera*, dosis letal media, imidacloprid, neonicotinoides, tolerancia.

RESPONSE TO THE EXPOSURE OF A POPULATION OF BEES (*Apis mellifera* L.) TO IMIDACLOPRID

Rubén Santillán Castillo, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Use of insecticides in agriculture represents a risk for the survival of *Apis mellifera* L., a key species for maintaining the planet's biodiversity. A mechanism to counteract the negative effects is the development of neonicotinoids-tolerant hives. The main objective of this study was to determine, by means of the Median Lethal Dose (LD₅₀), the differences in the mortality of several *Apis mellifera* hives, taken randomly from the experimental apiary of Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, exposed to four doses (0.01 to 1.0 mL·L⁻¹) of the Confidor® insecticide (i.a., imidacloprid), assessed in two seasons and the influence of a commercial adjuvant.

In Montecillo, Texcoco, Edo. de Méx., in 2020 – 2021 period, 15 contemporary Euro-African bees were sprayed per hive, per dose of insecticide, with and without adjuvant, selected from 10 hives of the experimental apiary of Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Insect mortality was recorded through 72 h. The higher dose of the insecticide, corresponding to the manufacturer's recommendation for agricultural purposes (1.0 mL·L⁻¹), was extremely fatal (greater than 80% of average mortality from both seasons). One hive was identified to show greater tolerance with a lower average percentage of mortality and higher LD₅₀, estimated by regression of mortality on the dose, in the autumn-winter 2020 season (26.3%; LD₅₀=1 mL·L⁻¹) and another hive in the spring-summer 2021 season (46.92%; LD₅₀=0.09 mL·L⁻¹).

The addition of an adjuvant did not affect bee mortality in a biologically significant way. The LD₅₀ was variable between hives of both seasons, which allows us to expect a selection response in subsequent studies; in addition, readings around 20 h after exposure and doses 0.033 and 0.066 mL·L⁻¹ allowed, in a better way, to detect significant differences in the mortality of the hives. These ranges of time and dose would be useful in future research.

Keywords. *Apis mellifera*, median lethal dose, imidacloprid, neonicotinoids, tolerance.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su bendición a lo largo de mi vida; abriendo o cerrando puertas, es la forma en la que me muestra el camino, y ha tenido a bien guiarme a través de ésta.

A mi madre, por su inmenso apoyo, sabiduría e ímpetu, a pesar de las circunstancias. Este logro no hubiera sido posible sin ella.

A mi padre, por su esfuerzo, sustento y consejo, quien decidió posponer su jubilación para, en caso necesario, poder apoyarme durante la realización de este proyecto.

Al Colegio de Postgraduados, campus Montecillo y al PREGEP–Genética, por permitirme estudiar un posgrado. Asimismo, al CONACyT, por financiar mis estudios de maestría. A todos los profesores que participaron en mi formación durante estos dos años, llenos de aprendizaje y descubrimiento, y a la Lic. Martha Patricia Campos Palacios, por su amabilidad, disposición y ayuda en la Coordinación del PREGEP–Genética.

Al Dr. Fernando Castillo González, por su atinada dirección y apoyo otorgados en el proceso de elaboración de esta tesis; por nunca reservarse sus conocimientos.

Al Dr. Fernando Utrera Quintana, por su atinada dirección y apoyo brindados tanto en el campo, como en lo escrito. Gracias por permitirme aprender más de aquello que me apasiona.

Al Dr. Ignacio Benítez Riquelme, por sus valiosas sugerencias para fortalecer este trabajo.

Al Dr. Gabriel Otero Colina, por su apoyo como sinodal y sobre todo por la disposición que mostró al ayudar y prestar su equipo y laboratorio para la realización de este proyecto.

A la Dra. Martha Hernández Rodríguez y al Dr. Ricardo Lobato Ortiz, por el apoyo, ánimos y la disposición que mostraron al ayudar y prestar su equipo y laboratorio para la realización de este proyecto.

A Eusebio Felipe Altamirano López, encargado del apiario en el campus Montecillo, quien prestó sus manos, tiempo y esfuerzo para apoyar la realización del experimento.

A Sandra Edith Xochipa Pérez, Ilse Anai Casarrubias Bonilla, Lucía de la Natividad Villegas Bello, Paola Ramos López, Alexis Pastrana Vivar, Alejandra Villalvazo Hernández, Mayra Alcántar Acosta y Esly Arista Carmona, quienes tomaron parte conmigo en el laboratorio y en el apiario, soportando con estoicismo y espíritu de servicio y aprendizaje, las inclementes horas que este trabajo invistió sobre nosotros. Muchas gracias, no lo habría logrado sin ustedes.

A MIS PADRES

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	5
2.1. Objetivo General.....	5
2.2. Objetivos Específicos	5
2.3. Hipótesis	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. Selección de Colmenas e Incubación.....	7
3.2. Unidades Experimentales y Estudios Preliminares	9
3.3. Aplicación del Insecticida	10
3.4. Diseño Experimental.....	10
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1. Experimento otoño – invierno 2020; 7 colmenas.....	12
4.2. Experimento primavera – verano 2021; 7 colmenas	22
4.3. Otoño – invierno 2020 y primavera – verano 2021 juntos.....	31
4.4. Dos temporadas; cuatro colmenas	40
V. CONCLUSIONES	49

VI.	RECOMENDACIONES	51
VII.	LITERATURA CITADA	52
	ANEXOS	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Nombre de la colmena y asignación numérica para este estudio	8
Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de siete colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporada o-i. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020	13
Cuadro 3. Porcentaje mortalidad de abejas en cada colmena, promedio de cinco dosis, 21 lapsos de lectura, con y sin coadyuvante. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020	15
Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de siete colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2020	16
Cuadro 5. Dosis letales medias (DL_{50}) de siete colmenas.....	21
Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de siete colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporada p-v. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2021.....	23
Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de abejas en cada colmena, promedio de cinco dosis, 21 lapsos de lectura, con y sin coadyuvante. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2021	24

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de siete colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2021.....	25
Cuadro 9. Dosis letales medias (DL ₅₀) de siete colmenas.....	30
Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de 10 colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporadas p-v y o-i. Montecillo, Edo. Méx. 2020-2021.	32
Cuadro 11. Porcentaje mortalidad de abejas en cada colmena, promedio de todas las colmenas y lapsos, cinco dosis con y sin coadyuvante. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020-2021.....	33
Cuadro 12. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de 10 colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2020-2021	34
Cuadro 13. Dosis letales medias (DL ₅₀) de 10 colmenas	39
Cuadro 14. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de cuatro colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporadas o-i y p-v. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020-2021.....	41

Cuadro 15. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de cuatro colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2020-2021.....	44
Cuadro 16. Comparación de Medias del Experimento otoño – invierno 2020.....	55
Cuadro 17. Comparación de Medias del Experimento primavera - verano 2021....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidad experimental	9
Figura 2. Mortalidad (%) de abejas acumulada a través del tiempo por colmena. Promedios de todas las dosis con y sin coadyuvante; temporada otoño – invierno.....	18
Figura 3. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con uso de DAP Plus; promedios de todos los lapsos.....	19
Figura 4. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con ausencia de DAP Plus; promedios de todos los lapsos.....	20
Figura 5. Mortalidad (%) de abejas acumulada a través del tiempo por colmena. Promedios de todas las dosis con y sin coadyuvante; temporada primavera – verano.....	26
Figura 6. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con uso de DAP Plus (arriba) y ausencia de DAP Plus (abajo); promedios de todos los lapsos.	28
Figura 7. Mortalidad (%) a través del tiempo por dosis aplicada en $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$; promedios con y sin aplicación de coadyuvante.....	29
Figura 8. Mortalidad (%) de abejas acumulada a través del tiempo por colmena. Promedios de todas las dosis con y sin coadyuvante; datos de las temporadas otoño – invierno y primavera – verano.....	35

Figura 9. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con uso de DAP Plus (arriba) y ausencia de DAP Plus (abajo); promedios de todos los lapsos.	37
Figura 10. Interacción “Temporada x DAP x Dosis x Tiempo”, presentada de forma gráfica; ambas temporadas. Dosis en título de cada gráfico.	38
Figura 11. Interacción “Temporada x Colmena x DAP x Dosis”, presentada de forma gráfica. Temporada (Tx) y DAP en título de cada gráfico.....	45
Figura 12. Interacción “Temporada x DAP x Dosis x Tiempo”, presentada de forma gráfica. Temporada (Tx) y DAP en título de cada gráfico; dosis en mL·L ⁻¹	47

I. INTRODUCCIÓN

Las abejas (*Apis* sp.) son un género de insectos de la familia Apidae: Hymenoptera; integrada por aproximadamente 6,000 especies. En este género se encuentran algunas de las especies más valiosas del planeta, pues intervienen en la polinización de al menos un cuarto de millón de especies vegetales de importancia ambiental, social y agrícola. El 75% de los cultivos alimenticios del mundo depende, al menos parcialmente, de la zoopolinización (ONU, 2021).

Los himenópteros forman parte de un extenso grupo de especies con amenaza de extinción. Existen evidencias de que la actividad humana es la responsable de esto y, en parte, la propia agricultura codependiente de las mismas (Gill *et al.*, 2012). Una de las causas por las que las abejas desaparecen es la aplicación de agroquímicos, en especial los insecticidas para el control de plagas agrícolas, particularmente el grupo de los neonicotinoides que, para muchos autores, representa una de las más serias amenazas para la fauna insectil benéfica.

Es urgente que la humanidad aprenda a convivir con los diversos factores del ambiente que lo rodea, conservar y ampliar áreas naturales y valorar de manera conveniente a las demás especies que conforman los ecosistemas, abejas incluidas, con el fin de evitar su extinción. Por lo anterior, surge la necesidad de impulsar investigaciones que se enfoquen en evitar o reducir la muerte de polinizadores, uno de los cuales es *Apis mellifera* L. Algunas de las amenazas más importantes que encara esta especie son: la presencia de enfermedades causadas por hongos, ácaros y

otros parásitos (Moritz *et al.*, 2010); pérdida de hábitat y recursos florales (Foley *et al.*, 2005); y la exposición a plaguicidas que merman sus poblaciones, interfieren con la obtención de su alimento y contaminan sus panales (Fischer *et al.*, 2014; Blacquièrre *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012).

Uno de los insecticidas que con frecuencia se utilizan en los sistemas convencionales de producción agrícola es el Imidacloprid, que pertenece al grupo de los neonicotinoides (Cresswell, 2011). Éstos actúan sobre el sistema nervioso de los insectos como moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina; es decir, se unen al sitio receptor de la acetilcolina, lo que provoca una serie de síntomas desde hiperexcitación hasta letargia y parálisis. La acetilcolina, es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso central del insecto (IRAC, 2021).

Este insecticida se aplica al suelo, semillas, madera y pastos, así como en tratamientos foliares en numerosas especies vegetales e incluso en granos almacenados. Es sistémico, con particular efectividad contra insectos chupadores y tiene efecto residual prolongado (Bayer, 2021).

El imidacloprid, pese a sus virtudes como plaguicida, es tóxico para las abejas y otros insectos benéficos (Whitehorn *et al.*, 2012 y Arena y Sgolastra, 2014), pues disminuye sus poblaciones (de crianza y silvestres) sea por contacto directo o por ingesta de éste. El polen de plantas tratadas con este insecticida, que las abejas transportan y procesan para elaborar su alimento, resulta contaminado con este

ingrediente activo y por sus propiedades sistémicas y residuales, deteriora la función cerebral del insecto, efecto que es acumulativo (Gill *et al.*, 2012).

Por el peligro que representa este tipo de insecticidas para las abejas (y la producción de miel), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus iniciales en inglés) declaró en el año 2013 a tres insecticidas neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxam y clotianidina) como “un riesgo para las abejas silvestres y melíferas”, con el respaldo de 1,500 estudios científicos. México no es ajeno a este problema; el uso de insecticidas en los cultivos (entre ellos los neonicotinoides y organofosforados) forma parte de los factores que han causado la pérdida de colonias de abejas en varias regiones agrícolas de importancia apícola, en especial en aquellas del norte de México (SENASICA-UNAM, 2018).

Los coadyuvantes agrícolas, como el DAP Plus®, se adicionan a la aplicación de agroquímicos para mejorar tanto su actividad como facilitar su aplicación. Existen escasos registros de investigaciones relacionadas con la aplicación de agroquímicos en polinizadores que incluyan coadyuvantes. Mayer *et al.* (1998) y Mayer y Lunden (1999) mencionan que la adición de un coadyuvante a aerosoles insecticidas generó resultados variables según el coadyuvante y las especies de abejas. No se conocen investigaciones que incluyan un coadyuvante a imidacloprid en estudios de toxicidad ni de dosis letal media.

La dosis letal media (DL_{50}) es la cantidad de una sustancia que mata al 50% de individuos después de un tiempo determinado (IUPAC,1997). Este valor permite

identificar los grados de tolerancia/susceptibilidad de una población a esa sustancia. La DL_{50} suele calcularse, según el objetivo del estudio, plaguicida, método de aplicación, vía de administración y dosis, después de algunos minutos o bien 12, 24, 48 ó 72 h después de la aplicación; el lapso queda a criterio de cada investigador (Mayer y Lunden (1999); Medrzycki *et al.*, 2013; Díaz, 2015).

Las colmenas que se incluirán en este estudio provienen del apiario del Colegio de Postgraduados, fundado hace más de 30 años dentro de un área agrícola, dentro de la cual, debido a la naturaleza misma de una institución de investigación agrícola, se han utilizado agroquímicos en áreas cercanas al mismo, por lo que las abejas han sido expuestas a agroquímicos desde hace años, lo cual podría representar una ventaja para los fines de esta investigación. Las abejas dentro de este apiario tienen parte de su origen en abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*), tal como lo demostró Urbina *et al.* (2019) al evaluar el origen materno de esta población a través de su ADN_{mt} .

Se espera encontrar al menos una colmena que muestre un mayor grado de tolerancia al insecticida, medido a través de la mortalidad de las abejas asperjadas con éste, así como corroborar la alta mortalidad de aquellas abejas expuestas a $1.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de Confidor®. También se prevé encontrar un lapso alrededor de las 12, 24, 48, o 72 h que permita suficiente información para un análisis estadístico preciso de los datos, tal que se encuentren diferencias significativas en sobrevivencia de los insectos y que, además, el coadyuvante incremente de forma significativa la mortalidad de éstos.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo General

Determinar si existen diferencias en la mortalidad de abejas expuestas a Imidacloprid (Confidor ®) según la colmena (genotipo) y la influencia de otras variables en dicha respuesta (tiempo, DAP Plus, dosis, temporada).

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Encontrar la DL_{50} de diversas colmenas
- 2) Medir la influencia de un coadyuvante en la mortalidad
- 3) Corroborar que la dosis mínima recomendada es letal
- 4) Identificar los lapsos en los que se debe evaluar mortalidad de las abejas para detectar diferencias entre colmenas
- 5) Conocer si existen diferencias entre la mortalidad de abejas de dos temporadas

2.3. Hipótesis

- Existen diferencias entre la mortalidad de abejas de diferentes colmenas y entre diferentes dosis de insecticida después de un tiempo de exposición específico.
- La tasa de sobrevivencia de abejas expuestas a dosis subletales de Imidacloprid es significativamente menor en comparación a la de aquellas que no fueron expuestas.

- Las abejas son altamente sensibles a la exposición de imidacloprid ($<100\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$).
- La mortalidad de las abejas expuestas a Imidacloprid es influenciada por diversas variables.
- La adición de un coadyuvante/acidificante a la mezcla administrada aumenta la mortalidad de las abejas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó desde julio del año 2020 hasta junio del 2021, dividido en dos temporadas: otoño – invierno y primavera – verano, en la unidad de manejo apícola experimental del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México (19°27'18" N y 98°54'26" O), cuya temperatura media anual es 15.9 °C y precipitación media anual de 686 mm; altitud de 2,250 msnm; prevalece un clima templado subhúmedo con lluvias en verano.

3.1. Selección de Colmenas e Incubación

Se seleccionaron al azar 10 colmenas de abejas euroafricanas con ascendencia de las subespecies *mellifera* y *scutellata* dentro del apiario experimental del PREGEP-Genética del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Texcoco, Edo. de México, identificadas con los números 016, 023, 036, 054, 083, 103, 119 para la temporada otoño-invierno y 016, 032, 036, 049, 103, 104 y 119 para la temporada primavera-verano (Cuadro 1). Las características de cada colmena fueron las siguientes: reina joven y sana, con rasgos genotípicos y fenotípicos deseables; colmena fuerte, sin síntomas de loque americana (*Paenibacillus* sp.) o europea (*Melissococcus* sp.); bastidores con suficiente cría operculada, próxima a emerger; cámaras de cría con alimento: polen, miel o jarabe y torta proteica.

Cuadro 1. Nombre de la colmena y asignación numérica para este estudio

Colmena	ID de la colmena en apiario	
	Otoño-invierno 2020	Primavera-verano 2021
1	016	016
2	036	036
3	103	103
4	119	119
5	023	-
6	054	-
7	083	-
8	-	032
9	-	049
10	-	104

A fin de homogeneizar la edad de las abejas en el estudio, se colocó un bastidor por cada colmena, con suficiente cría de abeja operculada (pupas) próxima a nacer, en un portanúcleo de madera (pino) con malla de metal (0.2 x 0.2 mm) dentro de una incubadora refrigerada para pruebas de BOD marca “Thermo Cientific” modelo “PRECISION” y se utilizó un termómetro de sonda “YSI TELE-THERMOMETER” para medir la temperatura (T°) interna; ésta se mantuvo a $34^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se usó un higrómetro digital marca “EXTECH instruments” para registrar la humedad relativa (HR) dentro de la incubadora y para mantenerla sobre el 50% se colocó una bandeja con agua. De esta manera se proporcionaron la temperatura y HR que prevalecen en una cámara de cría en campo, y para propiciar la emergencia uniforme de abejas adultas. Cada bastidor permaneció en la incubadora dos o tres días previos a cada experimento.

3.2. Unidades Experimentales y Estudios Preliminares

Cada unidad experimental (UE) consistió en: 15 abejas (en promedio) de cada colmena; una cámara ventilada (jaula) hecha de un vaso de plástico de 300 mL, con perforaciones (60 agujeros de 4 mm de diámetro) con unión a una caja Petri de 100 x 15 mm por una liga de hule, semejante al diseño propuesto por Medrzycki *et al.* (2013); y un tubo eppendorff de 2 mm perforado, lleno con jarabe de azúcar refinada (Figura 1).



Figura 1. Unidad experimental

Se condujeron cuatro ensayos preliminares para calibrar el proceso experimental. En el primero, para determinar que las cámaras no fueran letales por sí mismas, se colocaron 15 abejas dentro de una cámara ventilada, cuyo diseño se describió en el párrafo anterior y se mantuvieron en observación durante 72 h con tres repeticiones. Del segundo al cuarto ensayo, en cada uno se evaluaron tres dosis menores a $1.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (dosis mínima recomendada con fines agrícolas en campo por el fabricante) con el objetivo de determinar las dosis apropiadas para registrar la

mortalidad durante 72 h después de la exposición de las abejas al insecticida y calcular la DL_{50} . Las dosis del segundo ensayo fueron 1.00, 0.66 y 0.33 $mL \cdot L^{-1}$; las del tercero, 0.33, 0.22 y 0.11 $mL \cdot L^{-1}$; y las del cuarto, 0.11, 0.066 y 0.033 $mL \cdot L^{-1}$; cada ensayo incluyó la dosis sin insecticida como testigo.

3.3. Aplicación del Insecticida

Se colocó el producto Confidor® en atomizadores calibrados con cinco dosis: 1.00, 0.066, 0.033, 0.011 y 0 $mL \cdot L^{-1}$, con y sin acidificante/coadyuvante DAP Plus®, por lo que se prepararon 10 soluciones. Se aplicó una solución por cámara, lo que generó 70 UE, testigos incluidos, en 10 tratamientos con aplicación de agroquímicos en 7 colmenas por repetición. Se contabilizó el número de abejas muertas post-aspersión al cabo de 16 lapsos: 5 y 30 min, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h por cada UE. En cada lapso se registró también el comportamiento cualitativo de las abejas con base en las sugerencias de Medrzycki *et al.* (2013): sin efecto visible, con desorientación, espasmos, parálisis, otro; y las combinaciones de estos efectos.

3.4. Diseño Experimental

Se analizaron los datos colectados de la temporada otoño – invierno del 2020 mediante un Diseño Experimental Bloques al Azar (BCA), con siete genotipos (colmenas), cinco dosis, dos condiciones de coadyuvante, 21 lapsos de tiempo de lectura y tres repeticiones, el cual arrojó 4,410 tratamientos.

Para interpretar las tendencias de la mortalidad a través de la dosis del insecticida y del avance del tiempo, se aplicó un análisis de regresión con el modelo

cuadrático $y = \beta_0 + \beta_1(x) + \beta_1(x^2)$, sobre los niveles de los factores “dosis” y “tiempo”, donde “y” es la variable respuesta en términos de letalidad. Posteriormente se hizo un análisis únicamente con los datos de la segunda temporada, se sustituyeron tres de los genotipos de la primera temporada; éste último conservó el diseño experimental, las fuentes de variación con sus niveles y el modelo estadístico y de regresión del primero.

A continuación, se hizo un análisis uniendo los datos de ambas temporadas, de forma similar al segundo análisis; se generó 8,820 tratamientos producto de la combinación factorial de 14 colmenas (10 genotipos), cinco dosis de insecticida, dos niveles de acidificante/coadyuvante, 21 lapsos y tres repeticiones. Finalmente, se tomó únicamente los cuatro genotipos que se incluyeron en ambas temporadas, se añadió la variable “temporada” al modelo y se corrió un análisis para observar el comportamiento de cuatro colmenas en dos temporadas, y la influencia de las fuentes de variación antes descritas; se generó un análisis de varianza con 5,040 tratamientos.

Debido a que algunas UE variaron ligeramente del 15 como número de individuos, se calculó el porcentaje del número de abejas muertas (M) entre el número de abejas inicial por cámara (C) $[(M/C) \times 100]$ a través del tiempo. El análisis de varianza se realizó mediante el procedimiento GLM realizando la transformación al arcoseno de la raíz de M/C ($\arcsen\sqrt{(M/C)}$) para tener mejor respaldo en las pruebas de significancia estadística, utilizando el programa SAS versión 9.4. La separación de medias fue por medio de la prueba de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los ensayos preliminares, en el primero se concluyó que las cámaras ventiladas que se elaboraron no son letales para las abejas, pues de las cinco repeticiones, sólo en una murió una abeja al cabo de 72 h. El segundo ensayo preliminar permitió calibrar las dosis del insecticida que se utilizaron en la investigación. Excepto por la dosis $0.033 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, todas las dosis que se probaron fueron letales pues ninguna abeja sobrevivió a las 72 h posteriores a la exposición del producto.

4.1. Experimento otoño – invierno 2020; 7 colmenas

En el experimento formal que se estableció en otoño-invierno del 2020 con siete colmenas, cinco dosis del insecticida Confidor®, con y sin coadyuvante (DAP) en el que se tomaron lecturas sobre la mortalidad en varias ocasiones hasta las 72 h después de la aplicación, se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre colmenas, entre dosis de insecticida y entre tiempos de lectura, así como significancia ($p \leq 0.01$) para las interacciones para dos factores, excepto DAP x Tiempo; de las interacciones para tres factores, sólo hubo significancia para Colmena x DAP x Dosis (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de siete colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporada o-i. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020

Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios
Bloque	2	8.80 ***
Colmena	6	1.44 ***
DAP	1	0.09
Dosis	4	45.55 ***
Tiempo	20	47.49 ***
Colmena*DAP	6	0.08
Colmena*Dosis	24	0.47 ***
Colmena*Tiempo	120	0.07 ***
DAP*Dosis	4	0.24 **
DAP*Tiempo	20	0.02
Dosis*Tiempo	80	1.37 ***
Colmena*DAP*Tiempo	120	0.02
Colmena*DAP*Dosis	24	0.14 ***
Colmena*Dosis*Tiempo	480	0.04
DAP*Dosis*Tiempo	80	0.02
Error	2954	0.045

$\alpha = 0.05$ *, **, ***: significativos al 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente;

$R^2 = 0.89$; C. V. = 22%. Análisis aplicado sobre la transformación $\arccoseno\sqrt{(M/C)}$

Nota: o=otoño; i= invierno.

FACTORES SIMPLES

Se encontró que las colmenas se comportan de manera diferente a algunas dosis, es decir, unas mueren en mayor proporción que otras a la misma dosis, en el

mismo lapso. Lo mismo ocurre con relación al tiempo: abejas de algunas colmenas mueren antes que otras, a las mismas dosis de insecticida. Las dosis del insecticida propician desigual mortalidad a través del tiempo, como es de esperarse.

DAP

El uso de coadyuvante no presentó diferencias estadísticas en el porcentaje de abejas muertas (Sin DAP, 34.1%^a vs. Con DAP, 35.4%^b). Por tanto, este estudio demuestra la escasa influencia del coadyuvante en la mortalidad de *Apis mellifera* cuando se usa el insecticida en cuestión, un aspecto poco explorado en este tipo de investigaciones.

Colmena

En el Cuadro 3, se observa que la Colmena 6 (ID 054) presentó mayor tolerancia al insecticida que las demás, por lo que se recomendaría criar y seleccionar reinas de esta colmena u otras que se puedan detectar en estudios posteriores para transferir la característica deseada a otras y seleccionar nuevamente con base en la tolerancia, a fin de obtener, al cabo de varias generaciones, colmenas tolerantes al ingrediente activo probado en este estudio. Se plantea la hipótesis, además, que una colmena tolerante a imidacloprid podría ser tolerante a otros insecticidas del mismo grupo por efecto de resistencia cruzada. Las colmenas 4 (ID 119) y 2 (ID 036) fueron las que presentaron menor tolerancia (Cuadro 3). También se puede observar que aquellas colmenas con menor porcentaje de mortalidad, son aquellas cuyas abejas fueron más longevas.

Cuadro 3. Porcentaje mortalidad de abejas en cada colmena, promedio de cinco dosis, 21 lapsos de lectura, con y sin coadyuvante. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020

Colmena	Media con testigos (%)	Media sin testigos (%)
6 (ID 054)	26.3 a	32.6 a
1 (ID 016)	31.9 b	37.4 b
7 (ID 083)	32.2 b	40.6 b
3 (ID 103)	33.7 b	41.0 b
5 (ID 023)	38.4 c	44.3 c
4 (ID 119)	39.5 c	45.3 c
2 (ID 036)	41.6 c	47.8 c

DMS con testigos = 3.7%; DMS sin testigos = 4.3%

Sin testigos: se omitió el tratamiento con 0 mL·L⁻¹ de insecticida.

Dosis

En el Cuadro 4 se observa que las abejas que recibieron la dosis mínima de Confidor® recomendada por el fabricante para controlar plagas en campo (1.0 mL·L⁻¹), murieron antes de las primeras tres horas después de la exposición; se demuestra la extrema mortalidad de las abejas que provoca esta dosis, lo que concuerda con lo encontrado por Eden (2020) cuando asperjó 0.3 g de i.a.·mL⁻¹ de Confidor® 350 SC, y observó 93.25% de mortalidad después de 3 h de la exposición en prueba de contacto. La relación entre dosis y mortalidad fue evidente; pues en promedio de colmenas, tiempos de lectura y presencia de coadyuvante, a menor dosis, mayor sobrevivencia (Cuadro 4). También se observaron efectos subletales de las abejas sobrevivientes,

tales como: daño en las funciones motoras, incapacidad de vuelo, desorientación, parálisis parcial y completa.

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de siete colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2020

Dosis (mL•L⁻¹)	Media (%)
1.00	75.10 a
0.066	36.37 b
0.033	35.91 b
0.011	20.68 c
0.00	12.80 d

DMS = 2.9%

Tiempos de lectura

Se encontraron (mediante prueba de medias) al menos cinco horarios que pudieran ser apropiados para toma de datos, en los cuales se observaron diferencias significativas entre colmenas: 9, 12, 18, 24 y 30 h. Las primeras oportunidades de lectura fueron estadísticamente no diferentes debido a que en el periodo de 5 min a 1.5 h no hay, en promedio, mortalidad de abejas, por lo que se consideran no apropiadas para este fin.

Las observaciones posteriores a las 60 h de iniciado el experimento, son igualmente diferentes; esto se debe a que hay algunas colmenas que, a ciertas dosis,

no sobreviven después este lapso mientras que otras mantienen una dinámica de mortandad observada en el resto del experimento.

INTERACCIONES

Interacción de dos factores

Colmena x Tiempo: Al graficar la mortalidad de las colmenas sobre tiempo, se observa una mayor separación de las líneas de tendencia entre las 25 y las 45 h, por lo que debe considerarse especialmente este horario como recomendable para valorar la obtención de respuestas cuando la expresión de la mortalidad es más variable entre colmenas (Figura 2), además del lapso alrededor de las 20 h antes descrito.

Triple Interacción

La significancia de la interacción de los factores colmena, DAP y dosis, indica que las combinaciones de colmenas con dosis pueden presentar diferente tendencia cuando son sometidas a la aplicación del coadyuvante DAP, entre otras posibilidades, de la combinación de dos factores con respecto a los niveles del tercero. Gráficamente, se observó la interacción entre la dosis y la colmena, por separado con y sin DAP, como se muestra a continuación (Figuras 3 y 4).

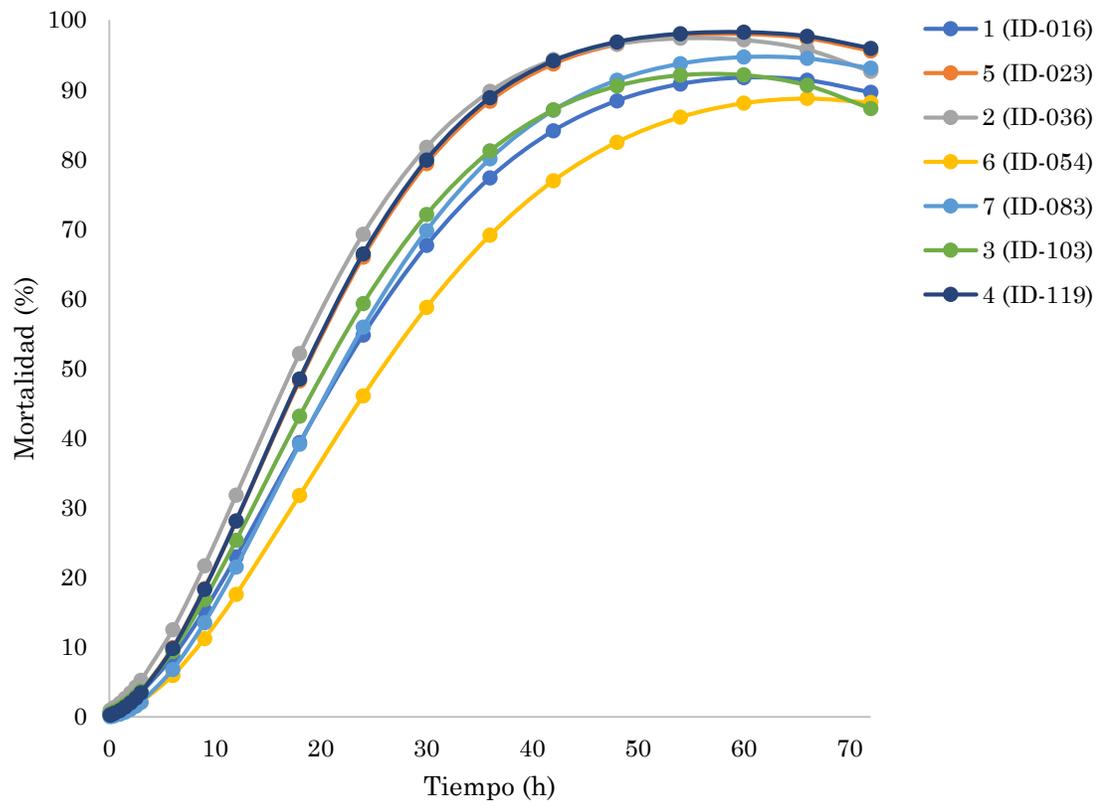


Figura 2. Mortalidad (%) de abejas acumulada a través del tiempo por colmena. Promedios de todas las dosis con y sin coadyuvante; temporada otoño – invierno.

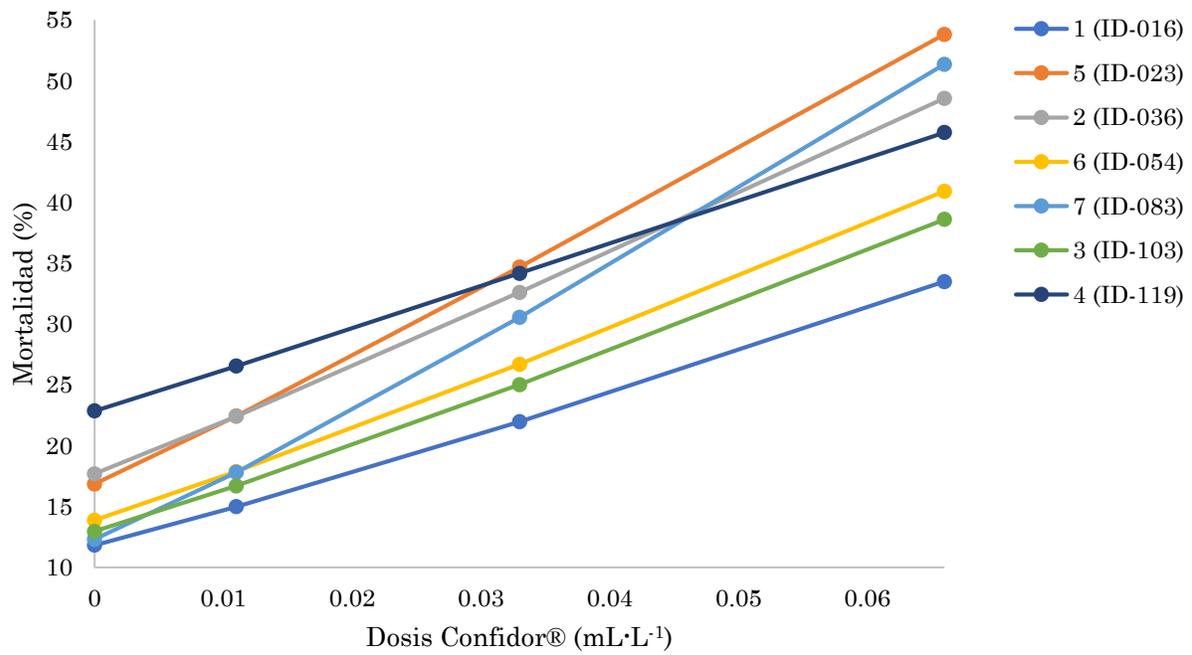


Figura 3. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con uso de DAP Plus; promedios de todos los lapsos.

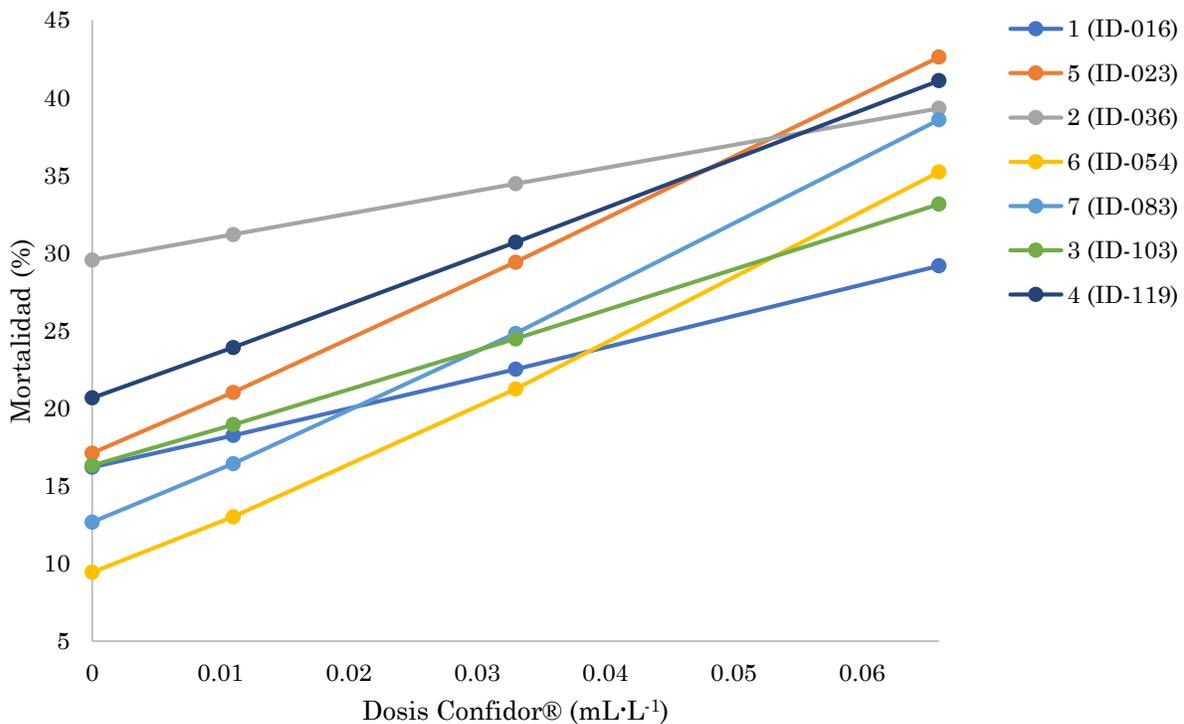


Figura 4. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con ausencia de DAP Plus; promedios de todos los lapsos.

Se encontró que la mortalidad de las colmenas se comporta diferente si son tratadas con DAP Plus®, pues las pendientes de las líneas son mayores en aquellas colmenas sometidas a los tratamientos con el coadyuvante; además, hay puntos de cruce entre las líneas que varían según el tratamiento, la variación más evidente se observó en las colmenas 6 (ID 054), 7 (ID 083) y 2 (ID 036). Se observó mayor magnitud de respuesta en los tratamientos con DAP (mayor mortalidad).

En la comparación de medias para los factores con interacción triple (Anexo 1), excluyendo los testigos, las combinaciones que exhibieron menor porcentaje de mortalidad fueron: en la dosis con 0.011 mL·L⁻¹, las colmenas 6 (ID 054) sin DAP y 1

(ID 016) con DAP; con 0.033 mL·L⁻¹, la 1 (ID 016) sin DAP; con 0.066 mL·L⁻¹, la 6 (ID 054) y 1 (ID 016), ambas sin DAP; y con 1.0 mL·L⁻¹, la 6 (ID 054) con y sin DAP.

DOSIS LETAL MEDIA

Se reportan las dosis letales medias con ajuste a un modelo cuadrático, por colmena, al 0.5 de proporción de abejas sobrevivientes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Dosis letales medias (DL₅₀) de siete colmenas

Colmena	Dosis letal al 0.5 de M/C (mL·L ⁻¹)	Tiempo de alcance de DL ₅₀ en horas
6 (ID 054)	1.001	26.150
1 (ID 016)	0.112	21.851
7 (ID 083)	0.071	21.173
3 (ID 103)	0.094	19.907
5 (ID 023)	0.066	18.368
4 (ID 119)	0.075	18.135
2 (ID 036)	0.078	16.651

La Colmena 1 (ID 054) exhibió la mayor DL₅₀ (1.0 mL·L⁻¹) y tardó el mayor lapso de tiempo (26 horas con 9 minutos) en alcanzar dicha mortalidad, en comparación con las otras colmenas.

4.2. Experimento primavera – verano 2021; 7 colmenas

En la primera evaluación se pudo tener la prueba de siete colmenas; para robustecer la información se condujo otro experimento en el siguiente año, 2021, ahora en el ciclo primavera – verano. Se procuró incorporar a las mismas colmenas; sin embargo, por diferentes causas (las colmenas 5 (ID 023) y 6 (ID 054) enjambraron, y se perdieron como colmenas de la misma reina) sólo cuatro de ellas se incluyeron en este experimento; se eligieron otras tres colmenas, con los mismos criterios descritos en Materiales y Métodos.

La información de esta evaluación y su interpretación se muestra a continuación. Del análisis de varianza (Cuadro 6), se observó consistencia con respecto al experimento conducido en el ciclo otoño – invierno del 2020. Significancia estadística ($p \leq 0.01$) para los factores simples: Colmenas, Dosis de imidacloprid, coadyuvante DAP y tiempos de lectura. De las interacciones entre dos factores, todas fueron significativas, con excepción de DAP x Tiempo; de las interacciones entre tres factores, Colmena x DAP x Dosis y Colmena x Dosis x Tiempo fueron significativas ($p \leq 0.01$).

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de siete colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporada p-v. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2021.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios
Bloque	2	4.27 ***
Colmena	6	4.07 ***
DAP	1	1.05 ***
Dosis	4	88.32 ***
Tiempo	15	37.82 ***
Colmena x DAP	6	0.13 ***
Colmena x Dosis	24	0.28 ***
Colmena x Tiempo	90	0.16 ***
DAP x Dosis	4	0.18 ***
DAP x Tiempo	15	0.04
Dosis x Tiempo	60	2.05 ***
Colmena x DAP x Tiempo	90	0.01
Colmena x DAP x Dosis	24	0.12 ***
Colmena x Dosis x Tiempo	360	0.04 **
DAP x Dosis x Tiempo	60	0.03
Error	2813	0.03

$\alpha = 0.05$ *, **, ***: significativos al 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente;

$R^2 = 0.93$; C. V. = 29%. Análisis aplicado sobre la transformación $\arccoseno\sqrt{(M/C)}$.

Nota: p=primavera; v= verano.

FACTORES SIMPLES

Colmena

En este experimento, las colmenas 8 (ID 032) y 3 (ID 103) presentaron mayor tolerancia al insecticida que las demás, por lo que se recomienda criar y seleccionar reinas de esta colmena y otras que se puedan detectar en estudios posteriores para transferir la característica deseada a otras y seleccionar nuevamente con base en la tolerancia, a fin de obtener, al cabo de varias generaciones, colmenas tolerantes al ingrediente activo probado en este estudio. Las colmenas 1 (ID 016), 4 (ID 119) y 2 (ID 036) fueron las menos tolerantes (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de abejas en cada colmena, promedio de cinco dosis, 21 lapsos de lectura, con y sin coadyuvante. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2021

Colmena	Media con testigos (%)	Media sin testigos (%)
8 (032)	46.92 a	56.87 a
3 (103)	50.14 a	61.09 b
9 (049)	54.36 b	64.42 b
10 (104)	61.20 c	71.07 c
1 (016)	68.01 d	75.98 d
4 (119)	68.44 d	76.94 d
2 (036)	69.84 d	79.63 d

DMS con testigos = 3.26%; DMS= sin testigos = 3.66%

Dosis

Al igual que en el experimento anterior, las abejas que recibieron la dosis mínima de Confidor® recomendada por el fabricante para controlar plagas en campo ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), murieron dentro de las primeras tres horas después de la exposición, lo que demostró una vez más la extrema mortalidad de las abejas a esta dosis.

La relación entre dosis y mortalidad se conservó como en el experimento pasado: a mayor dosis, mayor mortalidad (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de siete colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2021.

Dosis (mL L^{-1})	Media (%)
1.00	75.91 a
0.066	43.83 b
0.033	32.95 c
0.011	27.30 d
0.00	8.64 e

DMS = 1.8%

Tiempos de lectura

Al igual que con el experimento de otoño – invierno, se encontraron (mediante prueba de medias) al menos varios horarios apropiados para toma de datos, en los

cuales se observaron diferencias significativas entre colmenas: 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 h; esto se confirma al graficar la mortalidad de las colmenas a través del tiempo, pues se observó una mayor separación de las líneas de tendencia entre las 20 y las 60 h (Figura 5). Las primeras observaciones fueron estadísticamente diferentes debido a que en el periodo de 5 min a 1 h no hay, en promedio, mortalidad de abejas, por lo que no se consideran apropiadas para este fin.

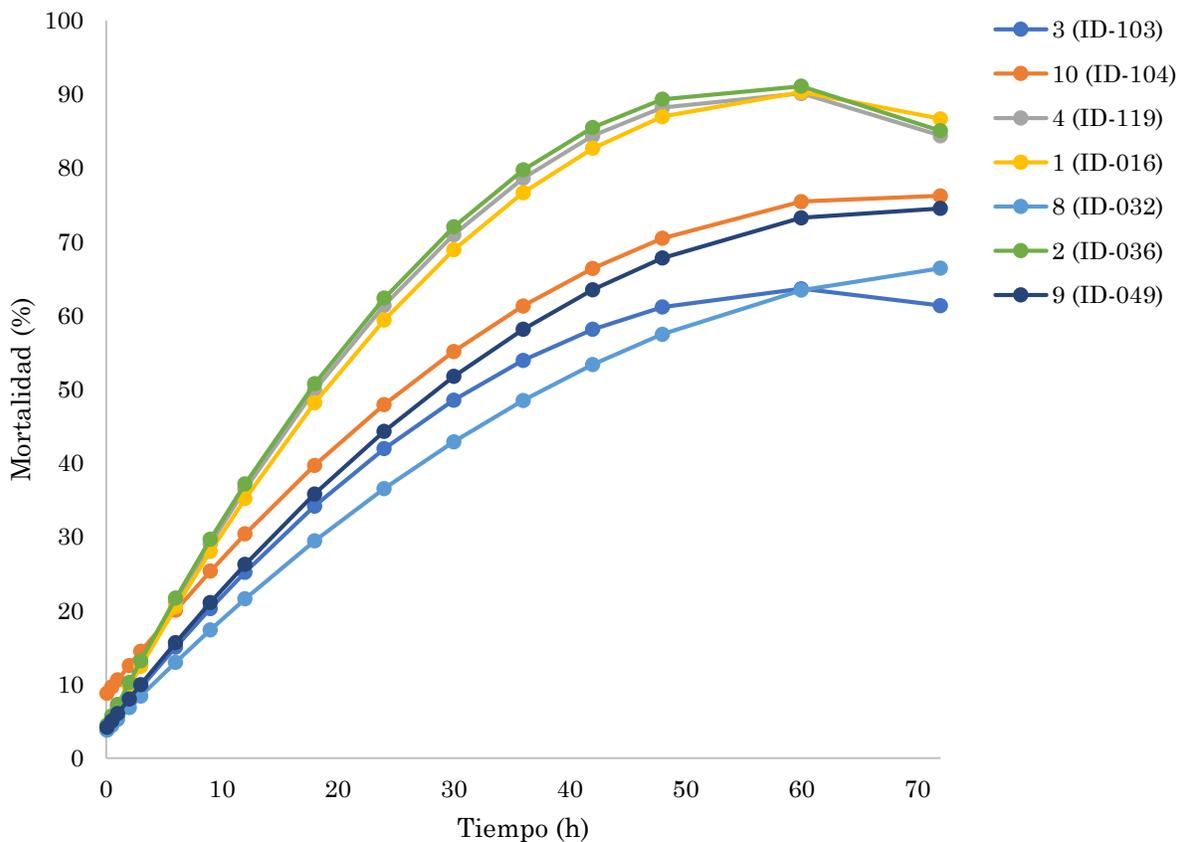


Figura 5. Mortalidad (%) de abejas acumulada a través del tiempo por colmena. Promedios de todas las dosis con y sin coadyuvante; temporada primavera – verano.

INTERACCIONES

Interacción de dos factores

Colmena x Tiempo: Al graficar la mortalidad de las colmenas sobre tiempo, se observa una mayor separación de las líneas de tendencia entre las 25 y las 60 h, por lo que debe considerarse especialmente este horario como recomendable para valorar la obtención de respuestas cuando la expresión de la mortalidad es más variable entre colmenas (Figura 72), además del lapso alrededor de las 20 h antes descrito.

Triple Interacción

Colmena x DAP x Dosis: La significancia de la interacción de los factores Colmena, DAP y Dosis, indica que estos se interrelacionan en cuanto a su efecto sobre la mortalidad de las abejas. Lo mismo ocurre con la interacción Colmena x Dosis x Tiempo. La interacción significativa de tres factores implica que la interacción entre dos de ellos no es constante para los niveles del tercer factor.

Se observó el efecto de la interacción Colmena x DAP x Dosis al considerar la relación entre la dosis y la mortalidad, cuando se comparan los datos con DAP, contra aquellos donde no se aplicó, como se muestra a continuación (Figura 6).

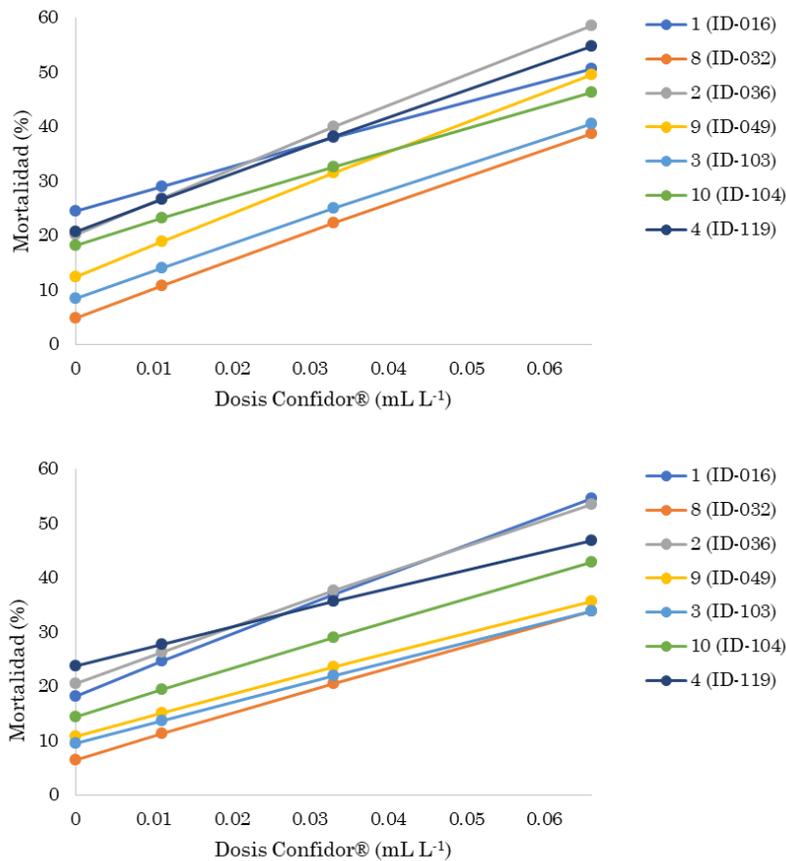


Figura 6. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con uso de DAP Plus (arriba) y ausencia de DAP Plus (abajo); promedios de todos los lapsos.

Se encontró que la mortalidad de las colmenas se comporta diferente si son tratadas con DAP Plus, pues las pendientes de las líneas son diferentes en aquellas colmenas sometidas a los tratamientos con el coadyuvante. Además, hay puntos de cruce entre las líneas que varían según el tratamiento, la variación más evidente se observó en las colmenas 4 (ID 119), 1 (ID 016) y 9 (ID 049).

Colmena x Dosis x Tiempo: Gráficamente, se observó el efecto de la interacción Colmena x Dosis x Tiempo al considerar la relación entre el tiempo y la

mortalidad, cuando se comparan entre sí los datos de cada dosis aplicada, como se muestra a continuación (Figura 7).

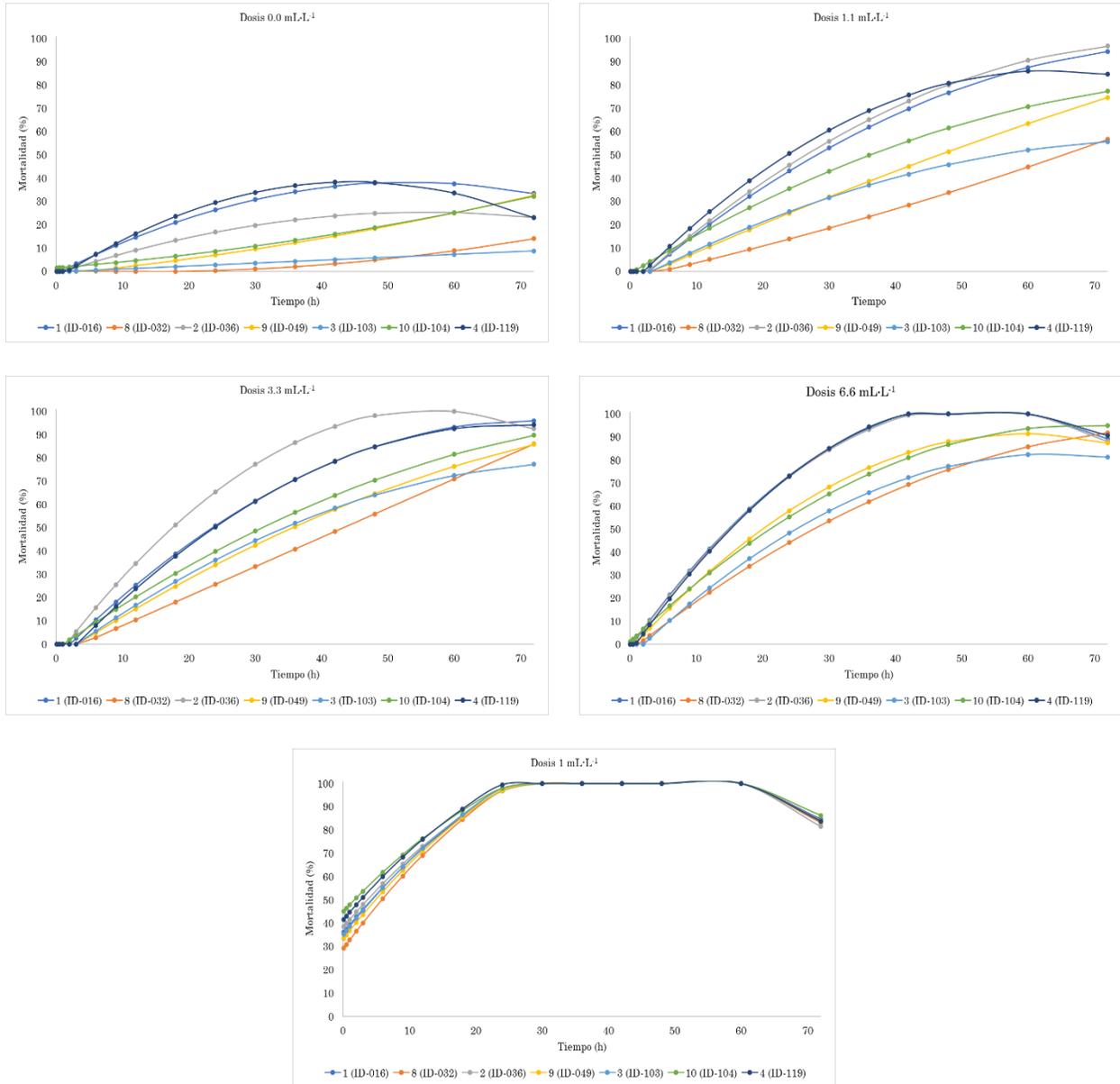


Figura 7. Mortalidad (%) a través del tiempo por dosis aplicada en mL·L⁻¹; promedios con y sin aplicación de coadyuvante.

DOSIS LETAL MEDIA

Se reportan las dosis letales medias con ajuste a un modelo cuadrático, por colmena, al 0.5 de proporción de abejas muertas. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Dosis letales medias (DL₅₀) de siete colmenas

Colmena	Dosis letal al 0.5 de M/C (mL•L⁻¹)	Tiempo de alcance de DL₅₀ en horas
3 (ID 103)	0.099	31.513
10 (ID 104)	0.080	25.640
4 (ID 119)	0.064	18.058
1 (ID 016)	0.060	18.921
8 (ID 032)	0.099	37.768
2 (ID 036)	0.054	17.644
9 (ID 049)	0.083	28.522

Se observó que las colmenas 032 y 103 fueron aquellas que exhibieron una mayor DL₅₀. La colmena 103 además, demostró poseer el promedio de mortalidad más bajo de las siete colmenas evaluadas en esta temporada (Cuadro 7).

4.3. Otoño – invierno 2020 y primavera – verano 2021 juntos

La información conjunta de las evaluaciones en ambas temporadas, otoño – invierno 2020 y primavera – verano 2021, se analizó de dos maneras; en la primera se consideró a la información generada por la valoración de las 10 colmenas, cuatro de las cuales se pudieron evaluar en ambas temporadas y de las seis restantes, tres se evaluaron en la primera temporada y otras tres, diferentes, en la segunda temporada (Cuadro 1). Mediante el análisis de varianza se generaron resultados consistentes con los análisis por temporada individual: alta significancia estadística para las fuentes de variación de factores simples ($p \leq 0.01$); para las interacciones de dos factores se observó el mismo grado de significancia, con excepción de DAP x Tiempo; y para la interacción de tres factores sólo dos de ellas fueron altamente significativas: Colmena x DAP x Dosis y Colmena x Dosis x Tiempo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de 10 colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporadas p-v y o-i. Montecillo, Edo. Méx. 2020-2021.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios
Bloque	5	5.59 ***
Colmena	9	2.98 ***
DAP	1	0.81 ***
Dosis	4	86.40 ***
Tiempo	20	68.43 ***
Colmena x DAP	9	0.15 ***
Colmena x Dosis	36	0.73 ***
Colmena x Tiempo	165	0.16 ***
DAP x Dosis	4	0.25 ***
DAP x Tiempo	20	0.06
Dosis x Tiempo	80	2.40 ***
Colmena x DAP x Tiempo	165	0.02
Colmena x DAP x Dosis	36	0.13 ***
Colmena x Dosis x Tiempo	660	0.06 ***
DAP x Dosis x Tiempo	80	0.03
Error	6231	0.041

$\alpha = 0.05$ *, **, ***: significativos al 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente;

$R^2 = 0.91$; C. V. = 33%. Análisis aplicado sobre la transformación $\arccoseno\sqrt{(M/C)}$

Nota: p=primavera; v= verano; o=otoño; i=invierno.

Las comparaciones entre medias para la interpretación de las significancias de muestran a continuación.

FACTORES SIMPLES

Colmena

En este análisis conjunto de ambos experimentos, las colmenas 8 (ID 032), 6 (ID 054), 9 (ID 049) y 3 (ID 103) presentaron mayor tolerancia al insecticida que las demás. Las colmenas 2 (ID 036), 4 (ID 119) y 5 (ID 023) fueron las menos tolerantes (Cuadro 11). Dichos resultados concordaron con lo encontrado en los análisis individuales de ambas temporadas.

Cuadro 11. Porcentaje mortalidad de abejas en cada colmena, promedio de todas las colmenas y lapsos, cinco dosis con y sin coadyuvante. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020-2021

Colmena	Media (%)
2 (ID 036) ¹	41.8 a
4 (ID 119) ¹	39.9 a
5 (ID 023)	38.4 ab
1 (ID 016) ¹	35.9 bc
10 (ID 104)	33.0 cd
7 (ID 083)	32.2 d
3 (ID 103) ¹	28.7 e
9 (ID 049)	26.8 e
6 (ID 054)	26.3 e
8 (ID 032)	20.4 f

¹ Colmenas evaluadas en ambas temporadas.
DMS = 3.5%

Dosis

La relación entre dosis y mortalidad de este experimento conjunto, se presenta a continuación (Cuadro 12):

Cuadro 12. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de 10 colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2020-2021

Dosis (mL•L ⁻¹)	Media (%)
1.00	80.1 a
0.066	37.2 b
0.033	29.9 c
0.011	19.1 d
0.00	7.9 e

DMS = 2%

Tiempos de lectura

Una gráfica del porcentaje de mortalidad a través del tiempo para las 10 colmenas incluidas en este estudio se presenta a continuación (Figura 8):

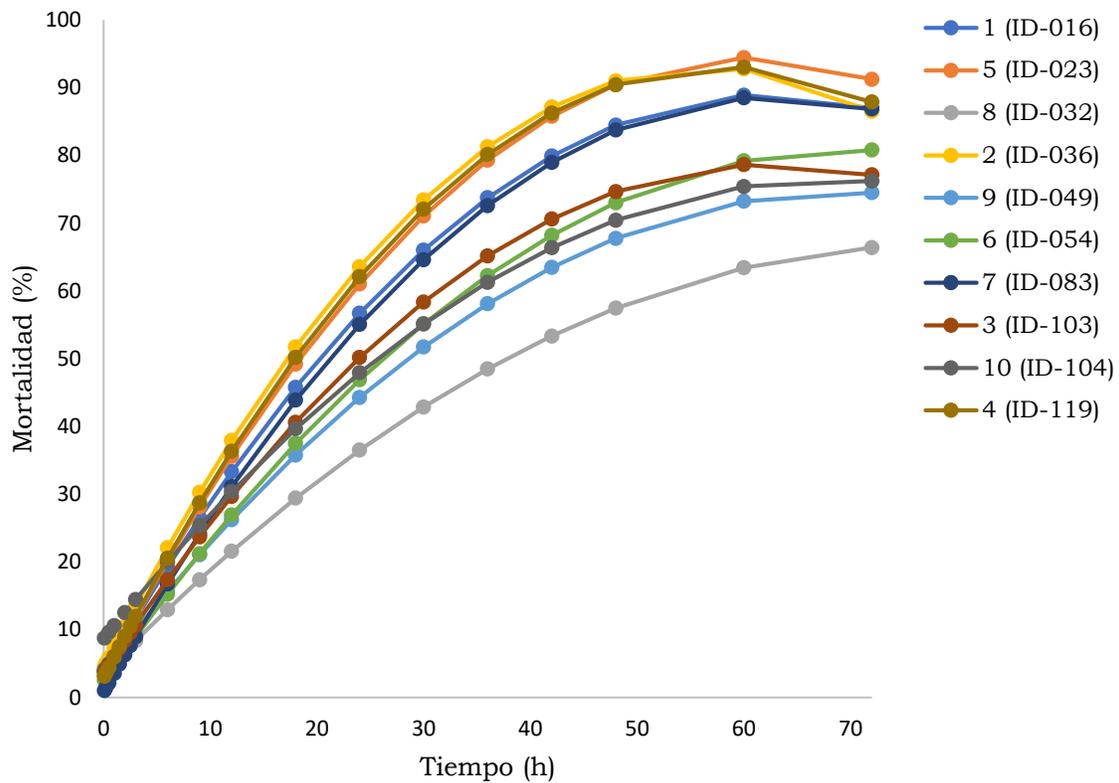


Figura 8. Mortalidad (%) de abejas acumulada a través del tiempo por colmena. Promedios de todas las dosis con y sin coadyuvante; datos de las temporadas otoño – invierno y primavera – verano.

INTERACCIONES

Al igual que en los dos experimentos anteriores, la significancia de la interacción de los factores colmena x DAP x dosis y de colmena x dosis x tiempo indica que estos se interrelacionan en cuanto a su efecto sobre la mortalidad de las abejas. La interacción significativa de tres factores implica que la interacción entre dos de ellos no es constante para los niveles del tercer factor.

Triple Interacción

Colmena x DAP x dosis: Se observó el efecto de la interacción colmena x DAP x dosis al considerar la relación entre la dosis y la mortalidad, cuando se comparan los datos con DAP, contra aquellos donde no se aplicó.

Al igual que en los dos experimentos anteriores, la mortalidad de las colmenas se comporta diferente si son tratadas con DAP Plus. Existen puntos de cruce entre las líneas que varían según el tratamiento, la variación más evidente se observó en las colmenas 9 (ID 049), 1 (ID 016), 7 (ID 083) y 3 (ID 103). Las colmenas 8 (ID 032), 9 (ID 049) y 3 (ID 103) muestran, en ambas gráficas, los porcentajes de mortalidad más bajos (Figura 9).

Colmena x dosis x tiempo: El efecto de la interacción colmena x dosis x tiempo se observó al considerar la relación entre el tiempo y la mortalidad, cuando se comparan entre sí los datos de cada dosis aplicada, tal como se hizo en el experimento anterior (Figura 10).

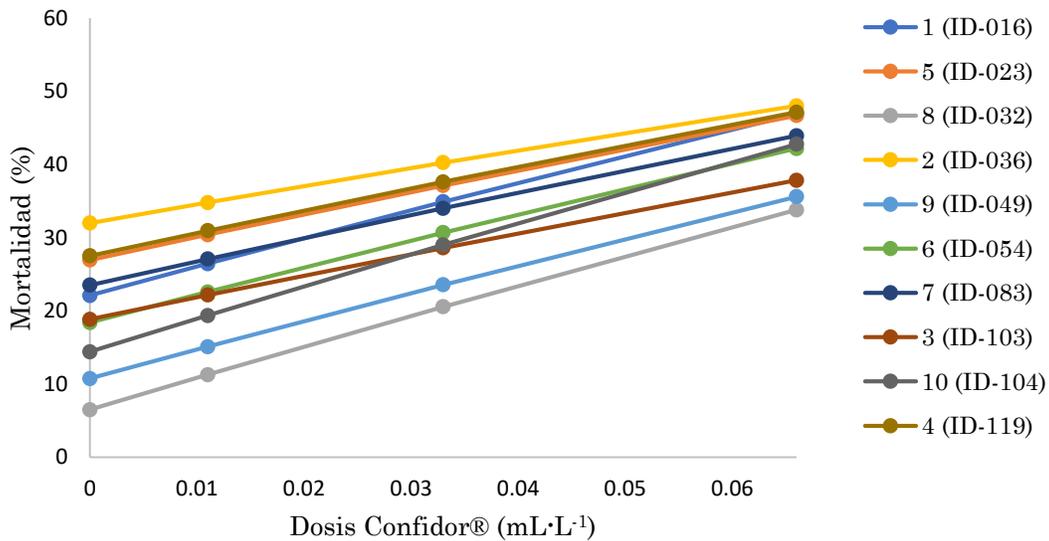
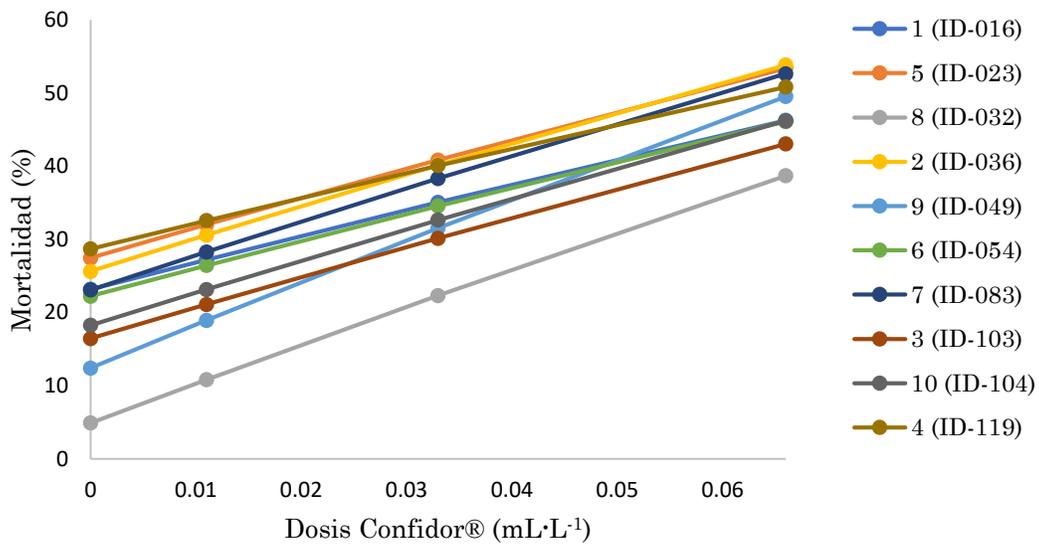


Figura 9. Mortalidad (%) según la dosis de insecticida por colmena, con uso de DAP Plus (arriba) y ausencia de DAP Plus (abajo); promedios de todos los lapsos.

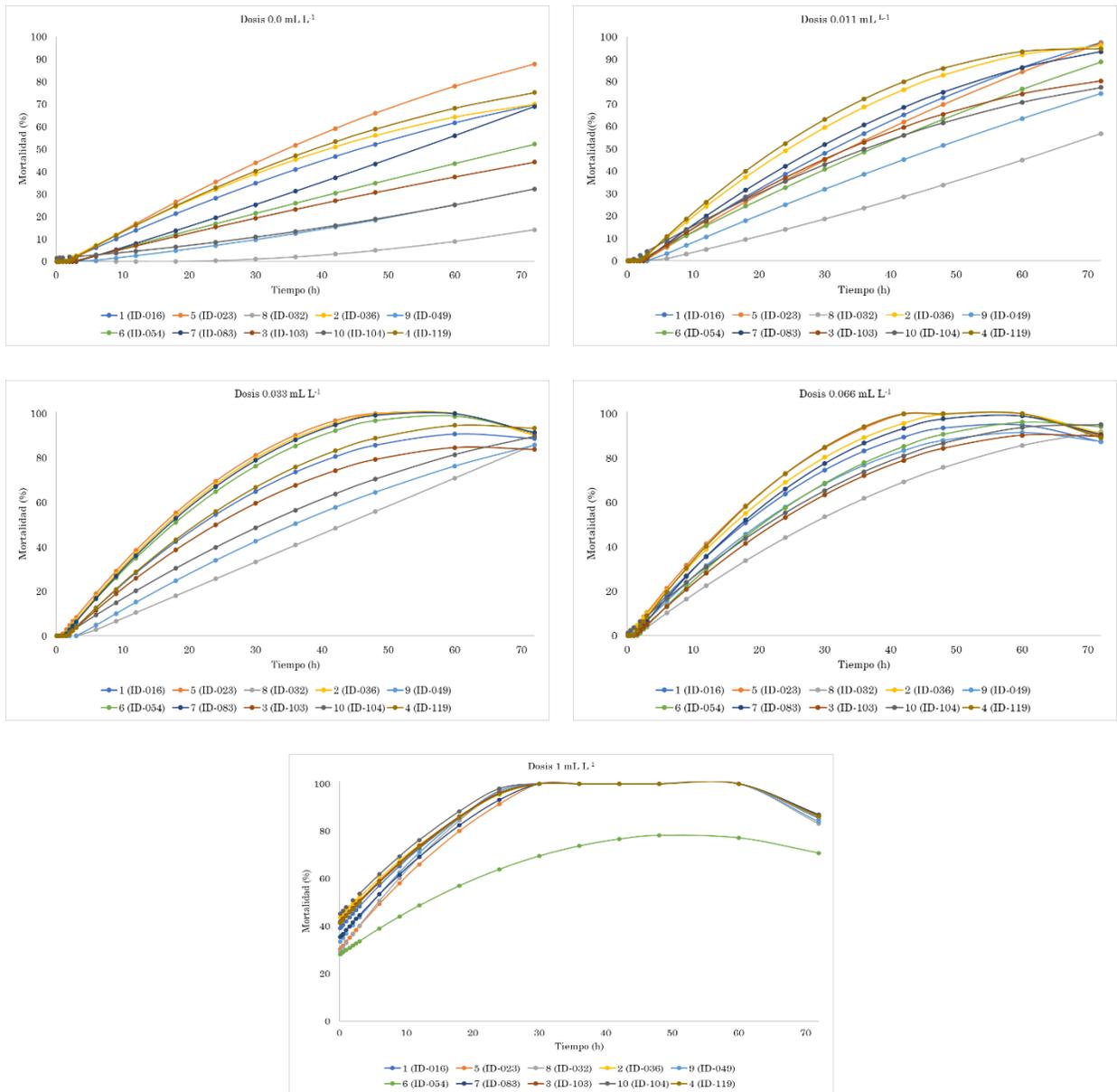


Figura 10. Interacción “Temporada x DAP x Dosis x Tiempo”, presentada de forma gráfica; ambas temporadas. Dosis en título de cada gráfico.

DOSIS LETAL MEDIA

Se reportan las dosis letales medias con ajuste a un modelo de regresión lineal–cuadrático, por colmena, al 0.5 de proporción de abejas muertas. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Dosis letales medias (DL₅₀) de 10 colmenas

Colmena	Dosis letal al 0.5 de M/C (mL•L⁻¹)	Tiempo de alcance de DL₅₀ en horas
3 (ID 103) ¹	0.096	23.867
10 (ID 104)	0.080	25.640
4 (ID 119) ¹	0.069	17.902
1 (ID 016) ¹	0.076	20.205
5 (ID 023)	0.066	18.368
8 (ID 032)	0.099	37.768
2 (ID 036) ¹	0.063	17.180
9 (ID 049)	0.083	28.522
6 (ID 054)	1.001	26.151
7 (ID 083)	0.071	21.173

¹ Colmenas evaluadas en ambas temporadas.

4.4. Dos temporadas; cuatro colmenas

De la información conjunta obtenida de los experimentos en las dos temporadas: otoño – invierno 2020 y primavera – verano 2021, se consideró sólo la generada por las cuatro colmenas que pudieron valorarse en los dos experimentos. Se analizó como una serie de dos experimentos (temporadas), lo cual permitió la comparación entre colmenas muestreadas en dos condiciones ambientales, y la información estuvo balanceada, es decir, las colmenas presentaron el mismo número de observaciones, de acuerdo con el diseño de tratamientos. Hubo diferencia altamente significativa entre temporadas ($p \leq 0.01$); el mismo grado de significancia para factores simples, con excepción del coadyuvante (DAP) que no presentó significancia. Para las interacciones entre dos factores hubo alta significancia ($p \leq 0.01$) excepto para DAP x Tiempo, que fue no significativa. De las interacciones para tres factores las significativas ($p \leq 0.01$) fueron: Temporada x Colmen x Tiempo, Temporada x Colmena x Dosis, Temporada x Dosis x Tiempo, Colmena x DAP x Dosis y Temporada x DAP x Dosis ($p \leq 0.05$). De las interacciones para cuatro factores, las significativas ($p \leq 0.01$) fueron: Temporada x Colmena x DAP x Dosis, y Temporada x DAP x Dosis x Tiempo. No hubo significancia para la interacción entre los cinco factores.

Cuadro 14. Cuadrados medios del análisis de varianza para la mortalidad de abejas melíferas (euroafricanas) en la prueba de cuatro colmenas, cinco dosis de insecticida Confidor® con y sin coadyuvante (DAP) con registros a diferentes tiempos, temporadas o-i y p-v. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 2020-2021.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios
Temporada	1	1.99***
Bloque (Temporada)	4	3.13
Colmena	3	3.27***
DAP	1	0.12
Dosis	4	57.27***
Tiempo	20	46.38***
Temporada x Colmena	3	1.69***
Temporada x DAP	1	0.27**
Temporada x Dosis	4	1.02***
Temporada x Tiempo	15	0.10***
Colmena x DAP	3	0.13**
Colmena x Dosis	12	0.31***
Colmena x Tiempo	60	0.12***
DAP x Dosis	4	0.22***
DAP x Tiempo	20	0.02
Dosis x Tiempo	80	1.52***
Temporada x Colmena x DAP	3	0.02
Temporada x Colmena x Tiempo	45	0.08***
Temporada x Colmena x Dosis	12	0.19***
Temporada x Dosis x Tiempo	60	0.15***
Temporada x DAP x Tiempo	15	0.02
Temporada x DAP x Dosis	4	0.1*
Colmena x DAP x Tiempo	60	0.03
Colmena x DAP x Dosis	12	0.12***

Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios
Colmena x Dosis x Tiempo	239	0.04
DAP x Dosis x Tiempo	80	0.03
Temporada x Colmena x DAP x Dosis	12	0.16***
Temporada x Colmena x DAP x Tiempo	45	0.01
Temporada x DAP x Dosis x Tiempo	120	0.09***
Colmena x DAP x Dosis x Tiempo	234	0.02
Temporada x Colmena x DAP x Dosis x Tiempo	354	0.02
Error	2806	0.034

$\alpha = 0.05$ *, **, ***: significativos al 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente;

$R^2 = 0.94.5$; C. V. = 28%. Análisis aplicado sobre la transformación $\text{arcoseno}\sqrt{(M/C)}$.

Nota: p=primavera; v= verano; o=otoño; i=invierno.

La interpretación de acuerdo con las comparaciones entre medias para los niveles de cada factor, o mediante la comparación de las tendencias lineales para las interacciones se presentan a continuación.

FACTORES SIMPLES

Temporada

El anterior análisis expuso que la temporada tiene un efecto significativo en la mortalidad de las abejas de al menos una de las cuatro colmenas incluidas en este análisis; sin embargo, no hubo diferencia en la comparación de medias individual de las temporadas (64.56%a, temporada o-i vs 65.03%a, temporada p-v). Además, la significancia de la interacción de los factores temporada x colmena x DAP x dosis y de temporada x DAP x dosis x tiempo, indica que estos se interrelacionan en cuanto

a su efecto sobre la mortalidad de las abejas. La interacción significativa de cuatro factores implica que la interacción entre dos de ellos no es constante para los niveles del tercer, ni del cuarto factor.

DAP

El uso de coadyuvante no presentó diferencias estadísticas en el porcentaje de abejas muertas (Sin DAP, 64.39%a *vs.* Con DAP, 65.23%a).

Colmena

En este experimento, la colmena 3 (ID 103) presentó mayor tolerancia al insecticida, mientras que la colmena 2 (ID 036) fue la más susceptible.

Dosis

La relación entre dosis y mortalidad de este experimento conjunto, se presenta a continuación (Cuadro 15):

Cuadro 15. Porcentaje de mortalidad de abejas en promedio por dosis. Promedio de cuatro colmenas, con y sin coadyuvante, y a través de 21 tiempos de lectura (72 h). Montecillo, Texcoco, Edo Méx. 2020-2021

Dosis (mL•L ⁻¹)	Media (%)
1.000	74.2 a
0.066	44.2 b
0.033	39.95 c
0.011	32.18 d
0.000	19.03 e

DMS = 1.7%. Comparación de medias de Tukey sobre la relación M/C

INTERACCIONES

Interacción Cuádruple

Temporada x Colmena x DAP x Dosis: El efecto de la interacción temporada x colmena x DAP x dosis se observó al considerar la relación entre la dosis y la mortalidad, cuando se comparan ente sí los datos de cada temporada, comparando a su vez aquellos en donde se incluyó DAP contra aquellos donde no se incluyó (Figura 11).

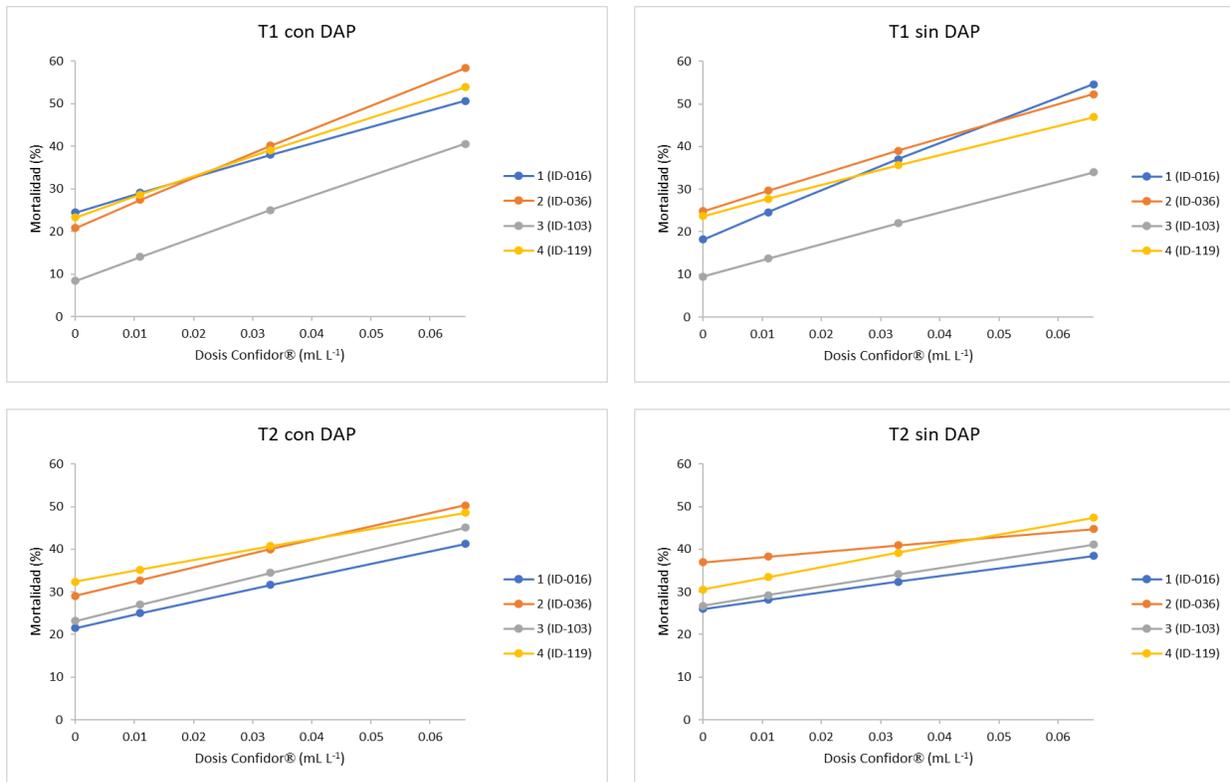


Figura 11. Interacción “Temporada x Colmena x DAP x Dosis”, presentada de forma gráfica. Temporada (Tx) y DAP en título de cada gráfico.

Al comparar los gráficos por temporadas (T), se observó mayor variación en la primera debido únicamente a la influencia de la colmena 3 (ID 103). En general, además, hubo mayor mortalidad de abejas en la T1 (otoño-invierno) y la diferencia entre mortalidad por dosis se acentuó. En la T1 la colmena 3 (ID 103) exhibió menor mortalidad, mientras que, en la T2, fue la colmena 1 (ID 016) la que obtuvo menor mortalidad. Al comparar los gráficos por la presencia del coadyuvante, se observaron pocas diferencias en mortalidad, sin embargo; se puede remarcar la tendencia diferente de la colmena 1 (ID 016) en la T1. En la T2, las colmenas siguieron las

mismas tendencias, excepto por la colmena 2 (ID 036), que mantuvo su línea de mortalidad con poca variación, alrededor del 40% en el promedio de todas las dosis.

Temporada x DAP x Dosis x Tiempo: El efecto de la interacción temporada x DAP x dosis x tiempo se observó al considerar la relación entre la mortalidad y el tiempo, cuando se comparan entre sí los datos de cada temporada, comparando a su vez aquellos en donde se incluyó DAP contra aquellos donde no se incluyó (Figura 12).

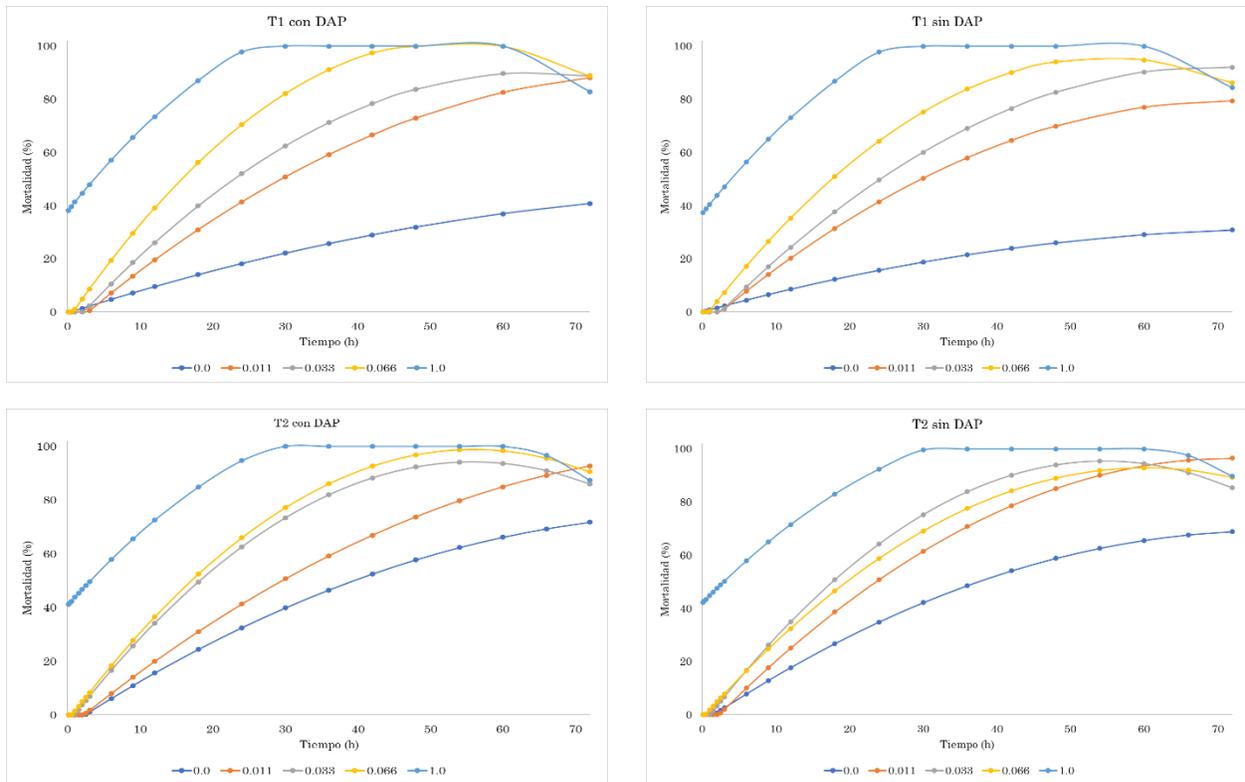


Figura 12. Interacción “Temporada x DAP x Dosis x Tiempo”, presentada de forma gráfica. Temporada (Tx) y DAP en título de cada gráfico; dosis en mL·L⁻¹.

Bovi *et al.* (2018) obtuvieron una dosis letal media de 0.03 ± 0.02 μg de i.a./abeja, al igual que daño en las funciones motoras de abejas africanizadas expuestas a dosis subletales de imidacloprid. Por otro lado, da Costa *et al.* (2015) reportan una DL_{50} de 2.41 ng/abeja en 24 h y 1.29 ng/abeja en 48 h cuando se aplica imidacloprid en abejas meliponas. Suchail *et al.* (2000) observan una DL_{50} de 24 ng/abeja entre 24 y 48 h después de la exposición por contacto a imidacloprid en *A. mellifera mellifera*. Considerando las equivalencias, para esta letalidad, la colmena 1 (ID 054) tuvo una DL_{50} de 47.1 μg de i.a./abeja 26 h después de la exposición. La colmena 5 (ID 23) presentó una DL_{50} de 3.08 μg de i.a./abeja 18h después de la

exposición. Blacquièrè *et al.* (2012) reportan diversas DL₅₀ que van desde los 4 hasta los 104 ng i.a./abeja.

La gran variedad de resultados, la forma en que se reportan, métodos y enfoques (contacto e ingestión) para calcular la DL₅₀ dificulta el comparar los resultados obtenidos en este experimento; sin embargo, se pueden contrastar los resultados con los encontrados por da Costa *et al.* (2015), quienes encontraron una DL₅₀ similar que la observada en las colmenas en esta investigación.

Los resultados aportan un avance hacia metas mayores no abordadas en este estudio: desarrollar mediante selección, colmenas de abejas tolerantes al imidacloprid y, por efecto de resistencia cruzada, al resto de los neonicotinoides. En cada experimento se encontró un gran número de ácaros muertos, por lo que, con base en estas observaciones, se plantea erigir experimentos que prueben su actividad acaricida y se sugiera una alternativa para el control de *Varroa destructor*, al incluir aspersiones esporádicas del plaguicida en el manejo de un apiario tolerante; y abordar también, mediante el método anterior descrito, una solución a la colonización de abejas africanizadas a los apiarios.

Se ubican dosis y tiempos de lectura en rangos más dirigidos, que pudieran ser útiles en la calibración de un tratamiento y tiempos de lectura más adecuados para valorar un número mayor de colmenas que permitan incorporar la tolerancia al insecticida como criterio en la selección de reinas.

V. CONCLUSIONES

La dosis mínima del insecticida ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) recomendada por el fabricante de Confidor® para control de plagas, es extremadamente letal para las colmenas evaluadas (promedio de mortalidad de 80.2% de ambas temporadas). La interacción de los factores Colmena, coadyuvante DAP y Dosis del insecticida, indica que estos tres se interrelacionan en cuanto a su efecto sobre la mortalidad de las abejas; lo mismo sucede con la interacción de los factores Colmena, Dosis y Tiempo. La interacción entre las colmenas a través del tiempo (Colmena x Tiempo) y a través de las dosis (Colmena x Dosis) con y sin el uso de coadyuvante, demuestra que ciertas colmenas exhiben mayor sensibilidad al imidacloprid que otras, en diferentes lapsos y diferentes dosis; también varía el comportamiento si se adiciona el coadyuvante.

Las dos cuádruples interacciones del último experimento (cuatro colmenas valoradas en dos temporadas a las dosis del insecticida con o sin coadyuvante) indican que la variable respuesta es extremadamente sensible a los cambios en el ambiente.

Se encontró que, de todos los lapsos evaluados, las lecturas entre las 20 y las 60 h son ideales para observar diferencias significativas en la mortalidad de las colmenas, con especial énfasis alrededor de las 20 h, debido a que es alrededor de este horario cuando las colmenas alcanzan su DL_{50} .

Además de la dosis superior ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) administrada en ésta investigación, las dosis 0.066 y $0.033 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, permitieron observar diferencias claras en la mortalidad

promedio de todas las colmenas, por lo que se recomienda incluir estas dosis en estudios posteriores

La adición de un coadyuvante no afecta de forma biológica significativa la mortalidad de las abejas, pero en este estudio se encontró que el ambiente influyó significativamente en la variable respuesta de cada colmena al combinarse con otras fuentes de variación.

La colmena 054 demostró ser la más tolerante a la dosis superior y poseer la DL_{50} más alta en la temporada otoño – invierno. La colmena 032 fue la más tolerante en la temporada primavera – verano.

Finalmente, se observó que hay variación genética entre colmenas para tolerancia al insecticida imidacloprid, lo cual permite esperar respuesta de selección.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el experimento para incluir más colmenas en él.
- Así mismo, aumentar el tamaño de muestra de cada colmena, aumentaría la precisión de los resultados obtenidos en experimentos posteriores.
- No añadir un coadyuvante como fuente de variación en experimentos subsiguientes; esto con el fin de mantener el experimento con un tamaño manejable, pero cumpliendo la primera y segunda recomendación.
- Debido a que en ocasiones la DL_{50} , calculada mediante la regresión de la curva de mortalidad por dosis, resultó mayor a la dosis $0.066 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, se recomienda sustituir la dosis $0.033 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ por una dosis mayor, i.e.: $0.99 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, con el objetivo de aumentar la precisión de este cálculo.

VII. LITERATURA CITADA

- Arena, M., and F. Sgolastra (2014)** A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23: 324-334. DOI: 10.1007/s10646-014-1190-1.
- Bayer de México S.A. de C.V., División CropScience (2021)** Ficha Técnica de Confidor®350SC.
<https://www.micultivo.bayer.com.mx/docbase/archivosProducto/Confidor-Ficha-tecnica.pdf>. (Consulta: julio 2021).
- Bovi, T. S., R. Zaluski, and O. Orsi R. (2018)** Toxicity and motor changes in Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90: 239-245. doi.org/10.1590/0001-3765201820150191.
- Blacquièrre, T., G. Smagghe, C. A. Van Gestel, and V. Mommaerts (2012)** Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21(4): 973-992. DOI 10.1007/s10646-012-0863-x.
- Cresswell, J. E. (2011)** A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20: 149-157. DOI 10.1007/s10646-010-0566-0.
- da Costa, L. M., T. C. Grella, R. A. Barbosa, O. Malaspina, and C. F. Nocelli R. (2015)** Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 62(4): 578-582. DOI: 10.13102/sociobiology.v62i4.792.
- Díaz, M. (2015)** Efecto de seis plaguicidas sobre mortalidad en dos especies de abejas: *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae). Tesis. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Zamorano, Honduras. 16 p.
- Eden R., B. A. (2020)** Pesticidas comerciales en la mortalidad de *Apis mellifera* L. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía. Tesis de Licenciatura. Perú, Lima. 176 p.
- Fischer, J, T. Müller, A.-K. Spatz, U. Greggers, B. Grünewald, and R. Menzel (2014)** Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS ONE* 9(3): 1-10 e91364. DOI: 10.1371/journal.pone.0091364.
- Foley, J. A., R. DeFries, G. P. Asner, C. Barford, G. Bonan, S. R. Carpenter, ... and P. K. Snyder (2005)** Global consequences of land use. *Science* 309(5734): 570-574. DOI:10.1126/science.1111772.
- Gill, R. J., O. Ramos-Rodriguez, and N. Raine. E. (2012)** Combined pesticide exposure severely affects individual and colony level traits in bees. *Nature* 491: 105-108. DOI:10.1038/nature11585.

- Henry, M., M. Beguin, F. Requier, O. Rollin, J. F. Odoux, P. Aupinel, and A. Decourtye (2012)** A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336(6079): 348-350. DOI: 10.1126/science.1215039
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (2021)** Clasificación del Modo de Acción de Insecticidas y Acaricidas IRAC. 6ª edición. IRAC, España. 18 p.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1997)** Compendium of Chemical Terminology “Gold Book”. McNaught, A. D. and Wilkinson (Comps.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp: 1549-1570. DOI.org/10.1351/goldbook.
- Mayer, D. F., G. Kovacs, and J. D. Lunden (1998)** Field and laboratory tests on the effects of cyhalothrin on adults of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *Journal of Apicultural Research* 37: 33-37. DOI.org/10.1080/00218839.1998.11100952.
- Mayer, D. F., and J. D. Lunden (1999)** Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *Journal of Apicultural Research* 38(3-4): 191-197. DOI.org/10.1080/00218839.1999.11101009.
- Medrzycki, P., H. Giffard, P. Aupinel, P. Aupinel, L. P. Belzunces, M. P. Chauzat ... and C. Vidau (2013)** Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): 1-60. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.14
- Moritz, R.F., J. de Miranda, I. Fries, Y. Le Conte, P. Neumann, and R.J. Paxton (2010)** Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41(3): 227-242. DOI: 10.1051/apido/2010010.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas) (2021)** Dependemos de la supervivencia de las abejas. Mayo 20. <https://www.un.org/es/observances/bee-day>. (Consulta: julio 2021).
- SENASICA-UNAM (2018)** Estudio de algunos de los factores que influyen en la pérdida de colonias de abejas en diferentes estados de importancia apícola de la república mexicana, ejercicio 2017. Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos 13 p.
- Suchail S., D. Guez, and L. P. Belzunces (2000)** Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 19(7): 1901-1905. doi.org/10.1002/etc.5620190726.

Urbina R., R. A., F. Utrera Q., F. Castillo G., M. Livera M., I. Benítez R., A. E. Villa M., J. E. Hernández H. e H. V. Silva R. (2019) Valoración del origen africanizado en la integración de una población experimental de *Apis mellifera* L. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42(2): 111-118.

Whitehorn P. R., S. O'connor, F. L. Wakers, and D. Goulson (2012) Neonicotinoid pesticide reduces bumblebee bee colony growth and queen production. *Science* 336: 351-352. DOI: 10.1126/science.1215025.

ANEXOS

Cuadro 16. Comparación de Medias del Experimento otoño – invierno 2020

Colmena	DAP	Dosis	Mortalidad media (%)	Clasificación Tukey					
083	Sin DAP	100	84.80						A
036	Con DAP	100	84.57						A
016	Con DAP	100	83.42						A
103	Con DAP	100	81.96						A
103	Sin DAP	100	81.82						A
036	Sin DAP	100	81.20						A
119	Sin DAP	100	81.16						A
083	Con DAP	100	80.27						A
016	Sin DAP	100	79.92						A
023	Sin DAP	100	77.80						A
119	Con DAP	100	76.63						A
023	Con DAP	100	71.63						A
054	Sin DAP	100	51.26						B
023	Con DAP	6.6	50.62						B
054	Con DAP	100	50.17						B
083	Con DAP	3.3	47.56		C				B
036	Con DAP	6.6	47.41		C				B
119	Con DAP	6.6	46.54		C				B
036	Sin DAP	3.3	46.33		C				B D
023	Con DAP	3.3	46.26		C				B D
083	Con DAP	6.6	43.36		C	E			B D
023	Sin DAP	6.6	42.44	F	C	E			B D
119	Sin DAP	6.6	41.24	F	C	E			B D
023	Sin DAP	3.3	39.93	F	C	E			B D
054	Con DAP	3.3	39.77	F	C	E			B D
036	Con DAP	3.3	39.20	F	C	E			B D
054	Sin DAP	3.3	39.05	F	C	E			B D
036	Sin DAP	6.6	37.58	F	C	E			B D G
103	Con DAP	6.6	37.00	F	C	E			B D G
083	Sin DAP	6.6	36.53	F	C	E			B H D G
054	Con DAP	6.6	36.47	F	C	E			B H D G
036	Sin DAP	1.1	36.15	F	C	E			B H D G
119	Con DAP	3.3	35.61	F	C	E	I		B H D G
119	Sin DAP	3.3	35.55	F	C	E	I		B H D G
083	Sin DAP	3.3	32.77	F	C	E	I		J H D G
103	Sin DAP	3.3	32.76	F	C	E	I		J H D G
016	Con DAP	6.6	32.71	F	C	E	I		J H D G
119	Con DAP	1.1	32.50	F	C	E	I		J H D G
016	Con DAP	3.3	32.42	F	C	E	I		J H D G
103	Con DAP	3.3	32.41	F	C	E	I		J H D G
103	Sin DAP	6.6	32.34	F	C	E	I		J H D G
054	Sin DAP	6.6	30.33	F	K	E	I		J H D G
016	Sin DAP	6.6	29.07	F	K	E	I		J H L G
119	Sin DAP	1.1	28.50	F	K	M	E		I J H L G
054	Con DAP	1.1	28.05	F	K	M	E		I J H L G
016	Sin DAP	3.3	27.96	F	K	M	E		I J H L G
103	Sin DAP	1.1	27.15	F	K	M	N		I J H L G
016	Sin DAP	1.1	23.33	O	K	M	N		I J H L G
036	Con DAP	1.1	23.19	O	K	M	N		I J H L G
036	Sin DAP	0.0	22.63	O	P	K	M		N I J H L G
083	Con DAP	1.1	22.45	O	P	K	M		N I J H L G

Colmena	DAP	Dosis	Mortalidad media (%)	Clasificación Tukey
119	Con DAP	3.3	32.79	F C E G D H
016	Con DAP	3.3	32.33	F C E G D H
103	Con DAP	6.6	32.26	F C E G D H
119	Sin DAP	1.1	31.18	F E G D H
032	Con DAP	6.6	29.49	F E G H
016	Sin DAP	3.3	28.97	F E G H
036	Con DAP	1.1	28.75	F E G H
016	Con DAP	1.1	27.23	F I G J H
104	Sin DAP	3.3	26.78	F I G J H
049	Sin DAP	6.6	26.33	I G J H
119	Con DAP	1.1	25.98	I G J H
036	Sin DAP	1.1	25.24	I G J H
119	Sin DAP	3.3	25.08	I G J H
104	Con DAP	1.1	24.68	I G J H
032	Sin DAP	6.6	22.95	I G J H
016	Sin DAP	1.1	22.08	I G J H
104	Con DAP	3.3	21.95	I K G J H
049	Con DAP	3.3	21.34	I K G J H
103	Sin DAP	3.3	20.45	L I K G J H
103	Sin DAP	6.6	19.71	L I K J
049	Con DAP	1.1	17.03	L I K M J
104	Sin DAP	1.1	15.36	L K M J
016	Con DAP	0.0	15.34	L K M J
103	Con DAP	3.3	14.46	L N K M J
049	Sin DAP	3.3	14.23	L N K M J
032	Sin DAP	3.3	13.73	L N K M J
032	Con DAP	3.3	13.43	L N K M J O
119	Con DAP	0.0	12.82	L N K M O
103	Con DAP	1.1	10.91	L N K M O
103	Sin DAP	1.1	10.73	L N K M P O
036	Sin DAP	0.0	10.05	L N K M P O
119	Sin DAP	0.0	9.96	L N M P O
016	Sin DAP	0.0	9.17	N M P O
049	Sin DAP	1.1	8.83	N M P O
032	Sin DAP	1.1	6.12	N Q P O
032	Con DAP	1.1	5.86	N R Q P O
104	Con DAP	0.0	5.80	N R Q P O
036	Con DAP	0.0	4.29	S R Q P O
104	Sin DAP	0.0	3.73	T S R Q P
049	Sin DAP	0.0	2.52	T S R Q
049	Con DAP	0.0	1.93	T S R Q
103	Con DAP	0.0	1.00	T S R
032	Sin DAP	0.0	0.75	T S
032	Con DAP	0.0	0.35	T S
103	Sin DAP	0.0	0.15	T