



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**DESARROLLO DE UN PRODUCTO A BASE DE  
NEEM (*Azadirachta indica*) PARA EL CONTROL  
DE *Varroa destructor***

**REBECA GONZÁLEZ GÓMEZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

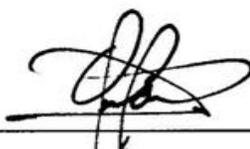
2010

La presente tesis titulada: **DESARROLLO DE UN PRODUCTO A BASE DE NEEM (*Azadirachta indica*) PARA EL CONTROL DE *Varroa destructor***, realizada por la alumna: **REBECA GONZÁLEZ GÓMEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

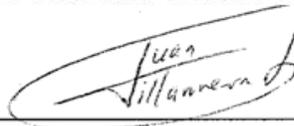
CONSEJO PARTICULAR

Consejero:



**Dr. Gabriel Otero Colina**

Asesor:



**Dr. Juan Antonio Villanueva Jiménez**

Asesora:



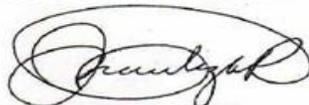
**Dra. María Teresa Santillán Galicia**

Asesora:



**Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia**

Asesor:



**Dr. José Antonio Santizo Rincón**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2010.

## **DESARROLLO DE UN PRODUCTO DE NEEM (*Azadirachta indica*) PARA EL CONTROL DE *Varroa destructor***

Rebeca González Gómez, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2010

Se estudió el efecto del extracto oleoso de neem (*A. indica*) en el control de *V. destructor*. La investigación estuvo encaminada a explorar los efectos que causa el neem tanto a *V. destructor* como a *Apis mellifera*, donde la colonia de abejas se observó como un superorganismo. En la primera parte de la investigación se corroboraron en laboratorio los efectos de toxicidad y repelencia del neem en el ácaro, observados en estudios previos; se observó que 2.64, 5.28, 10.56 y 21.12% de extracto de neem presentaron alta estabilidad en cuanto al efecto repelente; y 21.12% impidió que 98% de las varroas se posaran sobre pupas de abejas, lo que llevó a 100% de mortalidad de varroa en 72 h. La segunda etapa estuvo orientada a determinar los efectos del neem sobre abejas; se observó que con 21.12% de extracto oleoso de neem se ocasionó 100% de mortalidad a las primeras etapas de desarrollo de las abejas obreras (huevo y larvas de primer ínstar); sin embargo, con 2.64 y 5.28% del extracto la mortalidad fue mínima. Por otra parte, las larvas que alcanzaron el quinto ínstar fueron operculadas por las abejas nodrizas y sobrevivieron al tratamiento; sin embargo, tuvieron un atraso en el desarrollo, estimado en uno a dos días, cuando se les aplicó extracto al 21.12%. La postura de huevos por la abeja reina se mantuvo sin efectos negativos a las concentraciones evaluadas. Por último, se probó en campo la eficacia de *A. indica* sobre varroa. La máxima eficacia (85% de mortalidad de varroa) se registró con tres aplicaciones por aspersion del producto con 10.56% del extracto oleoso, en intervalos de cuatro días. Con ese tratamiento la población de abejas así como la cantidad de cría operculada de obreras y reservas de alimento (miel y polen) se mantuvieron sin cambio significativo. Sin embargo, se perdieron dos reinas.

**Palabras claves:** *Azadirachta indica*, *Apis mellifera*, control alternativo, abejas, desarrollo.

## DEVELOPMENT OF A NEEM-BASED PRODUCT TO CONTROL *Varroa destructor*

Rebeca González Gómez, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2010

The suitability of an oily neem (*Azadirachta indica*) extract to control *Varroa destructor* was studied. The research was aimed at exploring the effects caused by neem both to *V. destructor* and to honey bees (*Apis mellifera*), where the bee colony was taken as a superorganism. In a first step, repellency effects seen in a previous study were corroborated; neem extract at concentrations of 2.64, 5.28, 10.56 and 21.12% exhibited a long lasting repellent effect; neem extract at a concentration of 21.12% prevented that 98% varroa mites settled on bee pupae, resulting in 100% varroa mortality within 72 h. A second step was aimed at determining the effects of neem on honey bees; the development of bee larvae was affected when neem was applied at a concentration 21.12%, causing 100% mortality of bee eggs and first instar larvae. However, bee mortality was minimal at lower concentrations. On the other hand, larvae that had attained the fifth instar were capped by nurse bees and survived the treatment; however, their development had a delay, estimated in two days, after treatment with neem extract 21.12%. No negative effect was found on egg laying by queen bees with any neem concentration. The last step was aimed at testing the efficacy of neem against varroa and possible negative effects on the honey bee colony. The highest efficacy (85% varroa mortality) was recorded by spraying neem 10.56% with three applications, every four days. After this treatment there was no reduction in worker bee population, quantity of capped brood or food (honey and pollen) reserves. However, two queens were lost.

**Key words:** *Azadirachta indica*, *Apis mellifera*, alternative control, honey bees, development.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca nacional para la realización de los estudios de doctorado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por otorgarme la beca tesis, promoción 2007, para realizar parte de mi investigación.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, por ser la institución de mi formación doctoral.

A los integrantes de mi Consejo Particular: Dr. Gabriel Otero Colina, Dr. Juan Antonio Villanueva Jiménez, Dra. Mara Teresa Santillán Galicia, Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia y al Dr. José Antonio Santizo Rincón, por sus acertadas observaciones, correcciones, sugerencias y valioso apoyo a esta investigación.

Al Dr. Héctor De Bernardi de la Vequia, por la contribución en el modelo del extractor de aceite.

A todas las personas que estuvieron involucradas en mí formación académica y la culminación de este proyecto de vida.

## CONTENIDO

	Página
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	4
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	4
<b>HIPÓTESIS</b> .....	5
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	5
<b>CAPÍTULO I. REPELENCIA DEL EXTRACTO OLEOSO DE <i>Azadirachta indica</i> SOBRE <i>Varroa destructor</i></b> .....	9
Resumen.....	9
Abstract.....	10
1.1 Introducción.....	11
1.2. Materiales y métodos .....	12
1.2.1. Especímenes de ácaros hembras de varroa.....	12
1.2.2. Especímenes de cría de abejas obreras.....	13
1.2.3. Extracto oleoso de neem. ....	13
1.2.4. Administración de los extractos. ....	13
1.2.5. Prueba de repelencia con posibilidad de elección. ....	13
1.2.6. Prueba de repelencia sin posibilidad de elección. ....	14
1.2.7. Contenido de azadiractina en el extracto oleoso de neem.....	14
1.2.8. Diseño experimental y análisis estadístico.....	14
1.3. Resultados .....	15
1.3.1 Prueba de repelencia con posibilidad de elección .....	15
1.3.2. Prueba de repelencia sin posibilidad de elección .....	17
1.3.3. Contenido de azadiractina (AZA) en el extracto oleoso. ....	21
1.4. Discusión.....	21
1.5. Conclusiones.....	24
1.6. Literatura citada.....	24
<b>CAPÍTULO II. EXTRACTO OLEOSO DE NEEM (<i>Azadirachta indica</i>) SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE CRIA DE ABEJAS OBRERAS Y LA POSTURA DE LA ABEJA REINA</b> .....	31

Resumen.....	31
Abstract.....	32
2.1. Introducción.....	33
2.2. Materiales y métodos .....	35
2.2.1. Efecto del neem en la supervivencia y el desarrollo de las abejas obreras.....	35
2.2.2. Efecto de neem en la postura de la abeja reina.....	40
2.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	41
2.3 Resultados. ....	41
2.3.1. Efecto del neem en la supervivencia y el desarrollo de las abejas obreras.....	41
2.3.2. Efecto del neem en el desarrollo de las abejas obreras.....	45
2.3.3. Efecto del extracto oleoso de neem en la postura de la abeja reina. ....	46
2.4. Discusión.....	47
2.5. Conclusiones.....	50
2.6. Literatura citada.....	50
<b>CAPÍTULO III. EFECTO DEL EXTRACTO OLEOSO DE NEEM PARA EL CONTROL DE <i>Varroa destructor</i> Y LA CONDICIÓN DE COLONIAS DE ABEJAS (<i>Apis mellifera</i>).....</b>	<b>54</b>
Resumen.....	54
Abstract.....	55
3.1. Introducción.....	56
3.2. Materiales y métodos .....	58
3.2.1. Extracto de neem.....	59
3.2.2. Material biológico y administración del extracto de neem.....	59
3.2.3. Manejo del apiario.....	60
3.2.3.1. Etapa pre-tratamiento .....	60
3.2.3.1.1. Diagnóstico del estado inicial de las colmenas.....	60
3.2.3.1.2. Población de abejas obrera adultas y cantidad de cría operculada.....	60
3.2.3.1.3. Presencia de reina.....	61
3.2.3.1.4. Cantidad de reservas de alimento (miel y polen.....	61

3.2.3.1.5. Estimación de la caída natural de varroa. ....	61
3.2.3.2. Etapa de tratamiento .....	62
3.2.3.3. Etapa post-tratamiento.....	62
3.2.3.4. Determinación de la población total de ácaros y la efectividad de los tratamientos de neem contra varroa .....	63
3.2.3.5. Análisis estadístico .....	63
3.3. Resultados .....	64
3.3.1. Diagnóstico comparativo del estado de las colmenas pre- contra post- tratamiento.....	64
3.3.2. Efectividad de tratamientos de neem contra varroa .....	64
3.4. Discusión.....	67
3.5. Conclusiones.....	70
3.6. Literatura citada.....	70
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 2.1. Calendarización de toma de fotografías para registro de supervivencia y desarrollo de las abejas obreras. Los números en las filas 2, 3 y 4 marcan el avance, en días, del desarrollo en el que se encontraban las abejas a partir del día en que recibieron el extracto de neem (día cero). ....	40
Cuadro 2.2. Número de crías de abejas obreras sobrevivientes a la aplicación de diferentes concentraciones de extracto oleoso de neem ( <i>A. indica</i> ). ....	43
Cuadro 2.3. Número de crías de abejas obreras que fueron operculadas después de la aplicación del extracto oleoso de neem ( <i>A. indica</i> ) .....	45
Cuadro 2.4. Edad en días, de las pupas de abejas obreras, estimada por el color, extraídas 9 y 13 días después de la aplicación de extractos de neem ( <i>A. indica</i> ) .....	46
Cuadro 3.1. Estado pre-tratamiento de las colonias experimentales. ....	65
Cuadro 3.2. Estado post-tratamiento de las colonias experimentales.....	65
Cuadro 3.3. Efectividad de los tratamientos del extracto oleoso de neem evaluados en colmenas para el control de <i>Varroa destructor</i> .....	66

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.1. Valor de repelencia en las primeras 72 h, correspondientes a diferentes concentraciones de extracto oleoso de neem. Las intersecciones marcadas con diferente letra, tomadas en un mismo tiempo, son significativamente diferentes ( $\alpha \leq 0.05$ )..... 16
- Figura 1.2. Número de ácaros que se posaron sobre las pupas de abejas tratadas con extractos de neem en la prueba de repelencia con elección. Las intersecciones marcadas con diferente letra, tomadas en un mismo tiempo, son significativamente diferentes ( $\alpha \leq 0.05$ ). ..... 17
- Figura 1.3. Número de ácaros que se posaron sobre las pupas de abejas en la prueba de repelencia sin elección; luego de la aplicación de diferentes concentraciones del extracto oleoso de neem. Las intersecciones marcadas con diferente letra tomadas en un mismo tiempo son significativamente diferentes entre sí ( $\alpha \leq 0.005$ )..... 19
- Figura 1.4. Número de ácaros muertos en la prueba de repelencia sin posibilidad de elección a las A) 24, B) 48 y C) 72 h. Barras marcadas con diferente letra son significativamente diferentes entre sí ( $\alpha \leq 0.005$ ). ..... 20
- Figura 2.1. Niveles de desarrollo de la cría de obreras de *A. mellifera* seleccionados para la evaluación de los tratamientos..... 37
- Figura 2.2. Cambios morfológicos y de coloración durante el desarrollo de la pupa de obrera de *A. mellifera*, de acuerdo con Jay (1963) y Rembold *et al.* (1980)..... 39
- Figura 2.3. Número de huevos puestos por las abejas reinas después de la aplicación de los diferentes extractos oleosos de neem (*A. indica*) sobre panales. Barras marcadas con la misma literal no son diferentes estadísticamente (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). ..... 47
- Figura 3.1. Registro diario de la caída de varroa, luego de la aplicación de tratamientos de extractos de neem. Valores en una intersección (días) seguidos por la misma letra, no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). ..... 67

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La apicultura, o cría y aprovechamiento de las abejas (*Apis mellifera* L.) es una actividad con importancia económica en México, ya que permite generar gran cantidad de empleos y se ubica como la tercera fuente captadora de divisas del sector ganadero. En los últimos diez años 41,000 apicultores se han dedicado al cuidado y mantenimiento de aproximadamente 1.4 millones de colmenas. El producto principal de esta actividad es la miel, con una producción anual que osciló en torno a las 60,000 toneladas, y que ubica a nuestro país entre los cinco principales productores en el mundo (SIAP, [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)).

Sin embargo, la apicultura mexicana enfrenta dificultades, como las generadas por factores climáticos, comercialización, africanización de las colonias, enfermedades y parásitos. En relación con esto último, el parásito más relevante es el ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman (Anderson y Trueman, 2000) (en lo sucesivo, varroa), que se considera una de las plagas más importantes de las abejas en diversas áreas del mundo (Sammataro *et al.*, 2000). Los graves daños que este ácaro ocasiona a las abejas se atribuyen al gran potencial que tiene para incrementar su población, se conoce que existe una correlación directa entre el daño y el nivel de infestación del ácaro (Ball, 1993); además se le atribuye la transmisión de enfermedades ocasionadas por virus (Ball, 1985; Bowen *et al.*, 1999; Martin, 2001).

En el mercado existen pocos plaguicidas sintéticos para el control de varroa; principalmente, se dispone de piretroides. Su uso continuo ha generado la aparición de resistencia de los ácaros a esos productos en diferentes países (Milani, 1999; Elzen *et al.*, 1999a y b; Mathieu y Faucon, 2000; Thompson *et al.*,

2002). En México, Rodríguez-Dehaibes *et al.* (2005) observaron la generación de resistencia al piretroide flumetrina (Bayvarol®). La aparición de resistencia a plaguicidas por cualquier plaga obliga a los productores a utilizar dosis cada vez más altas; sin embargo, en la apicultura es improcedente aumentar dosis cuando la resistencia se presenta, pues con ello se puede causar mortalidad de abejas (Lodesani *et al.*, 1992; Imdorf *et al.*, 1995). Además, el uso habitual de acaricidas sintéticos en el proceso de producción ocasiona la contaminación de la miel y cera (Bogdanov *et al.*, 1988; Wallner, 1999).

Lo anterior muestra la necesidad de desarrollar métodos alternativos de control de varroa. Así, se propone que el uso de productos naturales es una de las opciones más viables, ya que por sus características, se espera que éstos sean inocuos para las abejas y no contaminen la colmena ni sus productos. Éste es el caso de los productos preparados a base de las semillas del árbol del neem *A. indica A. Juss.* El neem contiene terpenos que son los responsables de ejercer acción repelente, disuasión de la alimentación, perturbación en el crecimiento y desarrollo de la población de diversos artrópodos (Schmutterer, 1990).

Se tienen avances al respecto del posible uso del neem contra varroa. Se destacan los resultados de Melathopoulos *et al.* (2000a y 2000b), quienes observaron una reducción en las infestaciones de varroa y del ácaro traqueal *Acarapis woodi* Rennie como consecuencia de la aplicación de un tratamiento de neem mezclado con alimento y proporcionado a las abejas. Por su parte, Peng *et al.* (2000) observaron que un insecticida a base de neem, administrado como alimento mezclado con jarabe de azúcar, o en aplicación tópica, presentó

toxicidad aguda y redujo la proporción de hembras fecundas y la viabilidad de los huevos de varroa.

González-Gómez *et al.* (2006) aplicaron proporciones de 0.33, 0.66 y 1.32% de extracto oleoso de neem sobre varroa, pupas y adultos de abejas obreras y observaron que estas dosis no generaron efectos tóxicos; no obstante, las pupas tratadas con neem exhibieron un efecto repelente importante sobre varroa, que interfirió con la capacidad del ácaro para localizarlas y alimentarse de ellas.

La repelencia y otros efectos subletales de productos naturales pueden ser útiles en el control de varroa; por ejemplo, pueden aplicarse en dosis bajas que no ocasionan toxicidad aguda, pero que interfieren con la capacidad del ácaro para localizar a su huésped (Kraus *et al.*, 1994), lo que finalmente les causa la muerte. Colin *et al.* (1994) desarrollaron un protocolo para la búsqueda de efectos subletales para el control de parásitos de las abejas con productos vegetales, el cual ha sido base para el desarrollo del presente trabajo.

La investigación que ahora se presenta es la continuación de un trabajo (González-Gómez *et al.* 2006) en el que el aceite de neem fue evaluado para el control de varroa. En esta investigación se corroboró el efecto repelente del neem y se amplió la gama de concentraciones, se determinaron los posibles efectos del neem en la supervivencia y desarrollo de larvas y pupas de abejas, y se realizó un estudio de campo para evaluar la efectividad del neem en el control de varroa, en el que además se determinaron los posibles efectos del neem sobre la condición general de las colonias de abejas. Para evaluar la efectividad del neem en el control de varroa se toma a la colonia de abejas como una unidad y se parte del principio de que todas las acciones llevadas a cabo para el control

de varroa también afectan a las abejas; bajo este contexto se considera a la colonia de abejas como un superorganismo estructural. Este estudio atendió los siguientes objetivos e hipótesis:

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar los efectos del extracto oleoso de *A. indica* sobre varroa y abejas, en condiciones de laboratorio y campo.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar los efectos biológicos de concentraciones del extracto oleoso de neem en el desarrollo de las crías de obreras, así como en la aceptación y alimentación de las crías por las obreras nodrizas.
- Evaluar si la postura de huevos por la reina es alterada ante la presencia del extracto oleoso de semillas de neem.
- Corroborar en campo el efecto repelente y los posibles efectos tóxicos del extracto oleoso de neem sobre varroa, observados en laboratorio en estudio previo.
- Cuantificar el efecto de la aplicación de concentraciones de extracto oleoso de neem sobre la colmena, que incluye la población de obreras adultas, la cantidad de cría operculada, la presencia de reina y la cantidad de reservas de alimento (polen y miel).
- Cuantificar la efectividad de las concentraciones del extracto oleoso de neem, en el control de varroa.

## HIPÓTESIS

- Los efectos de algunas concentraciones del los extracto oleoso de las semillas de *A. indica* representan una alternativa para el control de *V. destructor*, debido a que provocan alteraciones en el comportamiento de este ácaro.
- Existe una menor susceptibilidad de las abejas, tanto en su condición de individuos aislados como en su condición de colonia, a los efectos negativos del extracto oleoso de neem, lo que puede ser explotado para el uso de este producto para el control de varroa en el interior de las colmenas.

## LITERATURA CITADA

- Anderson, D. L., y W. H. Trueman. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24(3):165-189.
- Ball, B. V. 1985. Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 24: 115-119.
- Ball, B. V. 1993. The damaging effects of *Varroa jacobsoni* infestation. In: Matheson, A. (ed.) *Living with Varroa*. International Bee Research Association, Cardiff, U. K. pp. 9-16.
- Bogdanov, S., V. Kilchenmann, y A. Imdorf. 1988. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research* 37(2):57-67.

- Bowen, W. P. L., S. J. Martin, y A. Gunn. 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 101-106.
- Colin, M. E., F. Ciavarella, G. Otero-Colina, y L. P. Belzunces. 1994. A method for characterizing the biological activity of essential oils against *Varroa jacobsoni*. In: Matheson, A. (ed.). *New Perspectives on Varroa*. International Bee Research Association, Cardiff U. K. pp. 109-114.
- Elzen, P. J., J. R. Baxter, M. Spivak, y W. T. Wilson. 1999a. Amitraz resistance in varroa: new discovery in North America. *American Bee Journal* 139(5): 362.
- Elzen, P. J., F. A. Eischen, J. R. Baxter, G. W. Elzen, y W. T. Wilson. 1999b. Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie* 30: 13-17.
- González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez, J. A. Pérez-Amaro, y R. M. Soto-Hernández. 2006. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Agrociencia* 40: 741-751.
- Imdorf, A., V. Kilchenmann, C. Maquelin, S. Bogdanov, B. Bachofen, y C. Berreta. 1995. Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud. and *Apis mellifera* L. in a laboratory test. *Apidologie* 26: 27-31.
- Kraus, B., N. Koeniger, y S. Fuchs. 1994. Screening of substances for their effects on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *Journal Apicultural Research* 33(1): 34-43.

- Lodesani, M., A. Pellacani, S. Bergomi, E. Carpana, T. Rabitti, y P. Lasagni. 1992. Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie* 23(3): 257-272.
- Martin, S. J. 2001. The role of varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modeling approach. *Journal of Applied Ecology* 38: 1082-1093.
- Mathieu, L., y J. P. Faucon. 2000. Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *Journal of Apicultural Research* 39(3-4): 155-158.
- Melathopoulos, A. P., M. L. Winston, R. Whittington, T. Smith, C. Lindberg, A. Mukai, y M. Moore. 2000a. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. *Journal of Economic Entomology* 93(2): 199-209.
- Melathopoulos, A. P., M. L. Winston, R. Whittington, H. Higo, y M. D. Le. 2000b. Field evaluation of neem and canola oil for the selective control of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae). *Journal of Economic Entomology* 93(3): 559-567.
- Milani, N. 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30: 229-234.
- Peng, C. Y. S., S. Trinh, J. E. Lopez, E. C. Mussen, A. Hung, y R. Chuang. 2000. The effects of azadirachtin on the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* and its

- host honey bee (*Apis mellifera*). Journal of Apicultural Research 39(3-4): 159-168.
- Rodríguez-Dehaibes, S. R., G. Otero-Colina, V. Pardo-Sedas, y J. A. Villanueva-Jiménez. 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. Journal of Apicultural Research 44(3):124-125.
- Sammataro, D., U. Gerson, y G. Needham. 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. Annual Review of Entomology 45: 519-548.
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology 35: 271-297.
- SIAP [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)]. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Consultado el 3 de julio de 2010.
- Thompson, H. M., M. A. Brown, R. F. Ball, y M. H. Bew. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the U. K. Apidologie 33:357-366.
- Wallner, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. Apidologie 30:235-248.

# CAPÍTULO I. REPELENCIA DEL EXTRACTO OLEOSO DE *Azadirachta indica* SOBRE *Varroa destructor*

## Resumen

Se evaluó la repelencia del extracto oleoso de semillas de neem (*Azadirachta indica*), obtenido en frío, sobre *Varroa destructor*. Se utilizó la torre Burgerjon para asperjar pupas de abejas obreras, en diluciones de 0.33, 0.66, 1.32, 2.64, 5.28, 10.56 y 21.12%. Las pupas asperjadas fueron incubadas a  $32 \pm 2$  °C y  $70 \pm 10$  % HR. Se monitoreó la capacidad de las hembras de *V. destructor* para localizar y alimentarse de pupas con o sin extracto de neem, desde 30 min hasta 72 h después de las aplicaciones. La repelencia más alta y estable se obtuvo con 2.64, 5.28, 10.56 y 21.12% del extracto crudo. La concentración más alta impidió que 98% de las varroas se posaran sobre pupas de abejas y llevó a 100% de mortalidad de varroa en 72 h, aparentemente por inanición.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, abejas, neem, varroa.

## REPELLENCY OF THE OILY EXTRACT OF *Azadirachta indica* ON *Varroa destructor*

### Abstract

A crude oil extract of neem seeds (*Azadirachta indica*) was evaluated for its repellence against *Varroa destructor*. A Burgerjon's tower was used to spray the extract onto worker bee pupae, in dilutions of 0.33, 0.66, 1.32, 2.64, 5.28, 10.56 and 21.12%. Sprayed pupae were incubated at  $32 \pm 2$  °C and  $70 \pm 10\%$  RH. The ability of *V. destructor* to locate and feed on treated and untreated pupae was monitored from 30 min to 72 h after the applications. The highest and most stable repellency was achieved with 2.64, 5.28, 10.56 and 21.12% of the neem crude extract. At the highest concentration, 98% of varroa mites were prevented to settle on bee pupae, resulting in 100% varroa mortality at 72 h.

**Key words:** bees, *Apis mellifera*, neem.

## 1.1 Introducción.

El ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman (2000) (en lo sucesivo, varroa) es una de las plagas más importantes de la abeja común (*Apis mellifera* L.) a nivel mundial (De Jong, 1990; Matheson 1993, 1995; Sammataro *et al.*, 2000). Existen pocos productos disponibles en el mercado para su control, entre los que destacan los acaricidas sintéticos, fluvalinato (Apistan<sup>®</sup>) y flumetrina (Bayvarol<sup>®</sup>), ambos pertenecientes al grupo toxicológico de los piretroides. En la actualidad hay una clara evidencia de que el uso excesivo de estos acaricidas en diversos países ha generado en varroa la capacidad de desarrollar resistencia hacia ellos (Elzen *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2002; Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 2005), los que, además, contaminan la cera y la miel (Bogdanov *et al.*, 1998; Wallner, 1999; Bernardini y Gardi, 2001).

Diferentes productos naturales, como los aceites esenciales, son conocidos por su actividad acaricida; aproximadamente 150 de ellos han sido evaluados mediante aplicación tópica, aspersion y evaporación sobre varroa (Imdorf *et al.*, 1999). Sus efectos subletales pueden ser útiles en el control de varroa, por la posibilidad de aplicarlos en dosis bajas e interferir con la capacidad del ácaro para localizar a su huésped (Kraus *et al.*, 1994). Colin *et al.* (1994) desarrollaron un protocolo para la búsqueda de efectos subletales para el control de parásitos de las abejas con productos vegetales.

Los productos fitoquímicos utilizados para el manejo de plagas tienen importancia actual; este es el caso del árbol de neem *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), del que se extraen varios terpenoides con ese fin. La azadiractina es el tetranotriterpenoide más importante entre ellos, ya que actúa como

repelente, antialimentario y retarda el crecimiento de los insectos, entre otros efectos (Schmutterer, 1990; [Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993].

Melathopoulos *et al.* (2000a, 2000b) observaron una reducción en las infestaciones de varroa y del ácaro traqueal *Acarapis woodi* Rennie, a consecuencia de la aplicación de un tratamiento de neem mezclado con alimento proporcionado a las abejas. Por su parte, Peng *et al.* (2000) observaron que un insecticida a base de neem, administrado como alimento mezclado con jarabe de azúcar, o en aplicación tópica, presentó toxicidad aguda y redujo la proporción de hembras fecundas, así como la viabilidad de los huevos de varroa.

González-Gómez *et al.* (2006) no notaron efecto tóxico agudo al aplicar 0.33, 0.66 y 1.32% de extracto oleoso de neem sobre varroa, pupas y adultos de abejas obreras; no obstante, las pupas tratadas con neem exhibieron un importante efecto repelente sobre varroa, interfiriendo con la capacidad por parte del ácaro para localizarlas y alimentarse de ellas. El presente trabajo se realizó como una continuación de la investigación anterior. Su objetivo fue determinar si a concentraciones más altas el efecto repelente del extracto crudo de neem se eleva y se vuelve más duradero.

## **1.2. Materiales y métodos**

**1.2.1. Especímenes de ácaros hembras de varroa.** Las varroas se extrajeron de celdas de zánganos con el método de trampeo desarrollado por Maul (1983), se colocaron en cajas Petri de polietileno y se les proporcionaron pupas de zánganos como alimento. Se mantuvieron en una incubadora a  $32\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $70\pm 10\%$  de HR. El bioensayo se llevó a cabo antes de 24 h.

**1.2.2. Especímenes de cría de abejas obreras.** Las pupas de abejas obreras correspondieron a los estados Pp y Pr (cuerpo blanco y ojos rosas a morado), de acuerdo con la clasificación de Jay (1963) y Rembold *et al.* (1980). Estas pupas se colectaron de forma manual de celdas operculadas, aproximadamente una hora antes del inicio de los bioensayos.

**1.2.3. Extracto oleoso de neem.** Las semillas de neem fueron recolectadas en el Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados, Mpio. de Manlio F. Altamirano, Veracruz, en agosto de 2006. El aceite se obtuvo prensando en frío 1.0 kg de semillas de neem, a temperatura no superior a 35°C, mediante un extractor de acero inoxidable, por aplicación de 1406 kg cm<sup>-2</sup> de presión. Posteriormente se almacenó a -3.0 °C (González-Gómez *et al.*, 2006).

**1.2.4. Administración de los extractos.** Los extractos de neem se asperjaron sobre pupas de abejas obreras mediante la torre de pulverización de Burgerjon (1956), la que se calibró para aplicar de 1 a 2 mg cm<sup>-2</sup> de las diferentes soluciones (Hassan, 1985); lo anterior se logró con la aplicación de 15 mL de la solución a una presión de 0.703 kg cm<sup>-2</sup>. Al concluir la aplicación se permitió la sedimentación de las gotas sobre los organismos durante un minuto adicional. Los tratamientos correspondieron a diluciones del extracto de neem a 1, 2, 4, 16, 32 y 64%, partiendo de una suspensión madre en una proporción 1:1:1 (p/p/p) del extracto oleoso, agua destilada y emulsionante (Tween 20<sup>®</sup>), lo que resultó en concentraciones de 0.33, 0.66, 1.32, 2.64, 5.28, 10.56 y 21.12% del extracto crudo original, respectivamente. Como testigo se usó agua destilada.

**1.2.5. Prueba de repelencia con posibilidad de elección.** Se utilizaron arenas de observación, conformadas por cajas Petri de polietileno que siguieron el

diseño utilizado por Colin *et al.* (1994). Las arenas cuentan con una zona cero (0), correspondiente al centro de la caja, y dos zonas principales (A y B), correspondientes a los dos extremos de la caja divididos por 0. Las zonas A y B contaron con tres subdivisiones (a, b y c), que delimitan dos áreas concéntricas a cada extremo de la caja. En la zona 0 se colocaron diez hembras adultas de varroa. En los extremos de la arena, correspondientes a las zonas Ac y Bc, se colocaron tres pupas de abejas obreras en cada una. En repelencia con posibilidad de elección sólo las pupas que se localizaron en la zona Ac recibieron tratamiento. Una vez que los ácaros se colocaron en la zona 0, se registraron las lecturas de su posición, transcurridos 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h.

**1.2.6. Prueba de repelencia sin posibilidad de elección.** Esta prueba tuvo el objeto de determinar el efecto repelente de los tratamientos en ausencia de una fuente de alimentación que no los hubiera recibido. Se siguió el procedimiento descrito en el inciso anterior, excepto que todas las pupas fueron tratadas con las soluciones correspondientes.

**1.2.7. Contenido de azadiractina en el extracto oleoso de neem.** La concentración de azadiractina (AZA) en el extracto de neem fue determinada por el Laboratorio de Alta Tecnología de Orizaba, S. C., Veracruz, México, mediante el método propuesto por Schneider y Ermel (1987), con el sistema modular HPLC con certificación ISO-9000 de Perkin Elmer. Se utilizó como estándar azadiractina A 95% (Sigma).

**1.2.8. Diseño experimental y análisis estadístico.**

El primer criterio de eficacia para evaluar la repelencia o atracción por parte de los tratamientos fue la posición de los ácaros sobre las zonas marcadas, los

cuales se transformaron en valores numéricos usando la fórmula propuesta por Colin *et al.* (1994). El valor extremo de 60 representa total atracción y el de 140 total repelencia; el valor intermedio de 100 se interpreta como la ausencia de efecto. Además, como criterios adicionales se contaron el número de ácaros sobre las pupas y ácaros muertos.

Los datos de las lecturas tomadas en tiempos sucesivos se analizaron con el procedimiento GLM del programa SAS (SAS, 2000), mediante un diseño experimental completamente al azar. La comparación de medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ).

### **1.3. Resultados**

#### **1.3.1 Prueba de repelencia con posibilidad de elección**

En la Figura 1.1 se presentan los valores de repelencia (VR) del extracto oleoso de neem en dependencia del tiempo. El testigo mostró VR que oscilaron entre 97 y 110.3. Los VR de las concentraciones 1, 2 y 4% tuvieron tendencias inconstantes, pues tanto en la primera hora como a partir de las 48 h no fueron significativamente diferentes del testigo; el principal efecto repelente se observó hasta las 24 h y fue más evidente a la concentración de 4%, con VR de alrededor de 120. En contraste, las concentraciones de 8, 16, 32 y 64% fueron significativamente diferentes con respecto al testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ) desde el inicio y hasta las 72 h, con valores de VR que fluctuaron entre 129 y 140. A medida que se aumentó la concentración el VR fue más alto y estable. Debe señalarse que las varroas sobrevivieron durante las 72 h en todos los tratamientos.

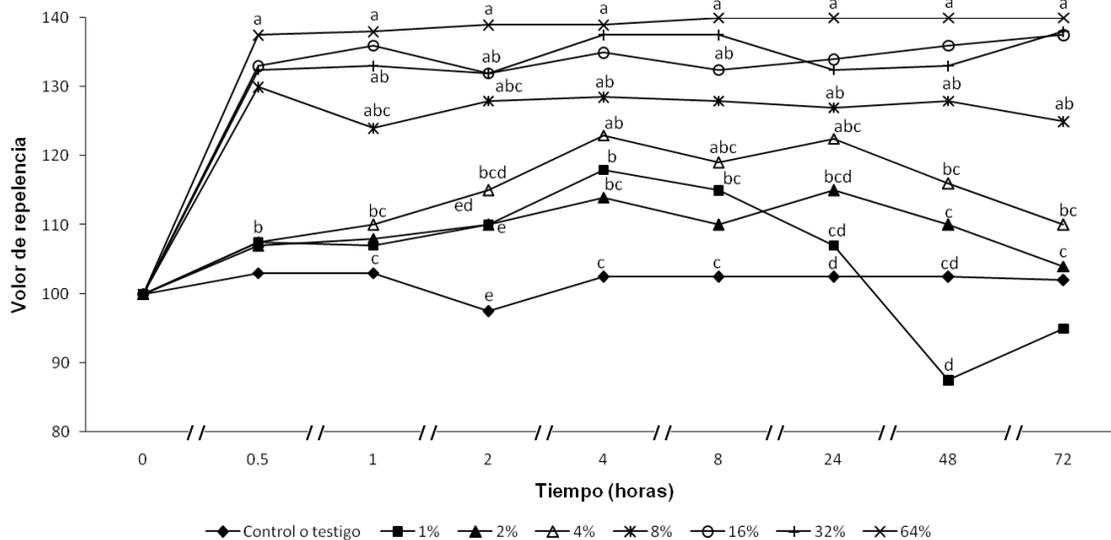


Figura 1.1. Valor de repelencia en las primeras 72 h, correspondientes a diferentes concentraciones de extracto oleoso de neem. Las intersecciones marcadas con diferente letra, tomadas en un mismo tiempo, son significativamente diferentes ( $\alpha \leq 0.05$ ).

La Figura 1.2 muestra el número de varroas que se posaron sobre las pupas de abejas en dependencia de la concentración del extracto de neem y del tiempo, en la prueba de repelencia con posibilidad de elección. En el testigo, después de la primera hora, cuatro o más ácaros se desplazaron de la zona cero hacia las pupas. Conforme las concentraciones de neem fueron progresivamente más altas, el número de varroas que se posaron sobre las pupas tratadas con extractos de neem fue cada vez menor (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ); las concentraciones de 16, 32 y 64%, fueron significativamente diferentes del testigo en todas las lecturas, con menos varroas y más estables en el tiempo, donde el número de hembras de varroas que se posaron sobre las pupas fluctuó de 0 a 0.25.

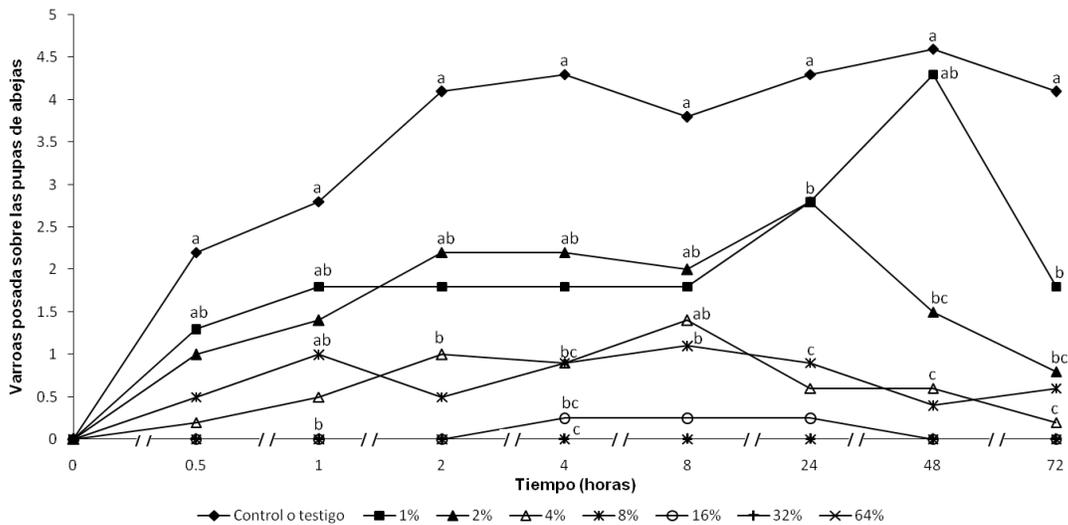


Figura 1.2. Número de ácaros que se posaron sobre las pupas de abejas tratadas con extractos de neem en la prueba de repelencia con elección. Las intersecciones marcadas con diferente letra, tomadas en un mismo tiempo, son significativamente diferentes ( $\alpha \leq 0.05$ ).

### 1.3.2. Prueba de repelencia sin posibilidad de elección

La Figura 1.3 muestra el número de varroas que se posaron sobre las pupas de abejas, en dependencia de la concentración del extracto y del tiempo, en la prueba de repelencia sin posibilidad de elección. El número de varroas en el testigo fue cercano a 10 (que fue el número de varroas colocadas en la zona cero), lo que evidencia la capacidad de estos ácaros para localizar a las pupas y alimentarse de ellas. Este número contrasta con  $\approx 4$  individuos observados en el testigo de la prueba de repelencia con posibilidad de elección; lo anterior se atribuye a que sólo se contaron las varroas que se posaron sobre pupas tratadas, ignorando a las que estaban sobre las pupas no tratadas.

Las siete concentraciones del extracto de neem probadas disminuyeron significativamente el número de varroas que se posaron sobre las pupas; sin

embargo, en las lecturas tomadas a 4, 8 y 24 h en la concentración de 1% de extracto de neem no hubo diferencias ( $\alpha \leq 0.05$ ) con respecto al testigo. El número de varroas que se posaron sobre pupas disminuyó inversamente con la concentración del extracto. A grandes rasgos se aprecian dos grupos: las concentraciones menores (1, 2, 4 y 8%) donde el número de varroas sobre las pupas osciló entre tres y seis, y las concentraciones mayores (16, 32 y 64%), el número de varroas sobre las pupas fluctuó entre cero y dos. En todos los tratamientos se aprecia una reducción en el número de varroas sobre las pupas a partir de las 24 h, momento en que da inicio la mortalidad de que estos ácaros.

El número de varroas muertas en la prueba sin posibilidad de elección se muestra en la Figura 1.4. Los valores incluidos corresponden a las 24, 48 y 72 h; debe señalarse que antes de ese tiempo todas las hembras de varroa estaban vivas. En el testigo todas las varroas sobrevivieron hasta el final del estudio. El coeficiente de correlación entre concentración y mortalidad fue positivo y significativo en todos los tiempos evaluados ( $r=0.859, 0.612$  y  $0.586$  a 24, 48 y 72 h, respectivamente ( $\alpha \leq 0.05$ ), lo que indica una fuerte asociación entre las variables; además la mortalidad se inicia para todas las concentraciones a las 24 horas. Cabe señalar que con el tratamiento de 1% de extracto, la mortalidad fue igual al testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ), incluso hasta las 72 h, mientras que con las concentraciones entre 8 y 64% la mortalidad alcanzó 100% a partir de las 48 h.

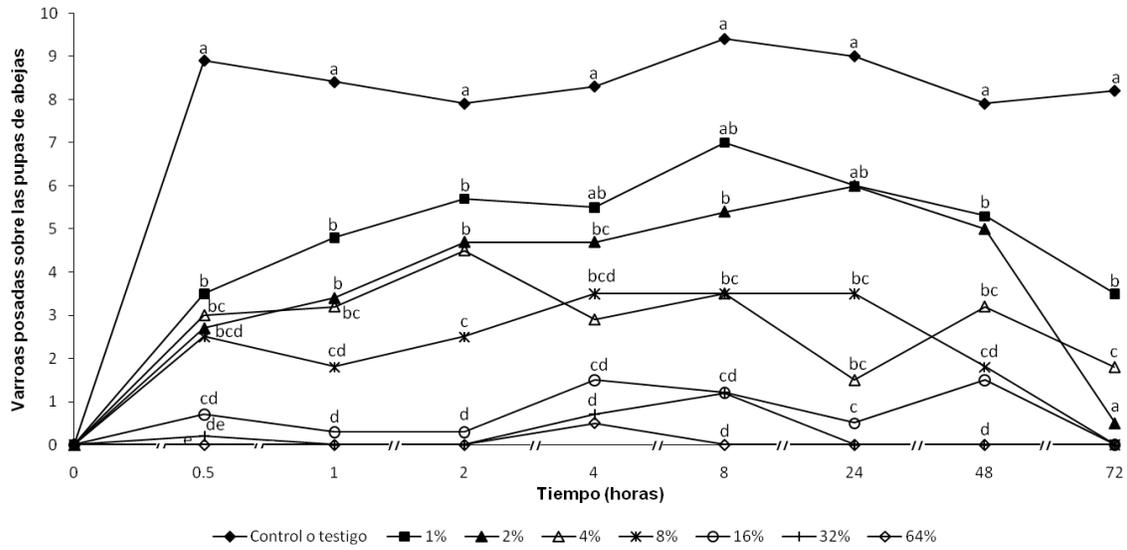


Figura 1.3. Número de ácaros que se posaron sobre las pupas de abejas en la prueba de repelencia sin elección; luego de la aplicación de diferentes concentraciones del extracto oleoso de neem. Las intersecciones marcadas con diferente letra tomadas en un mismo tiempo son significativamente diferentes entre sí ( $\alpha \leq 0.005$ ).

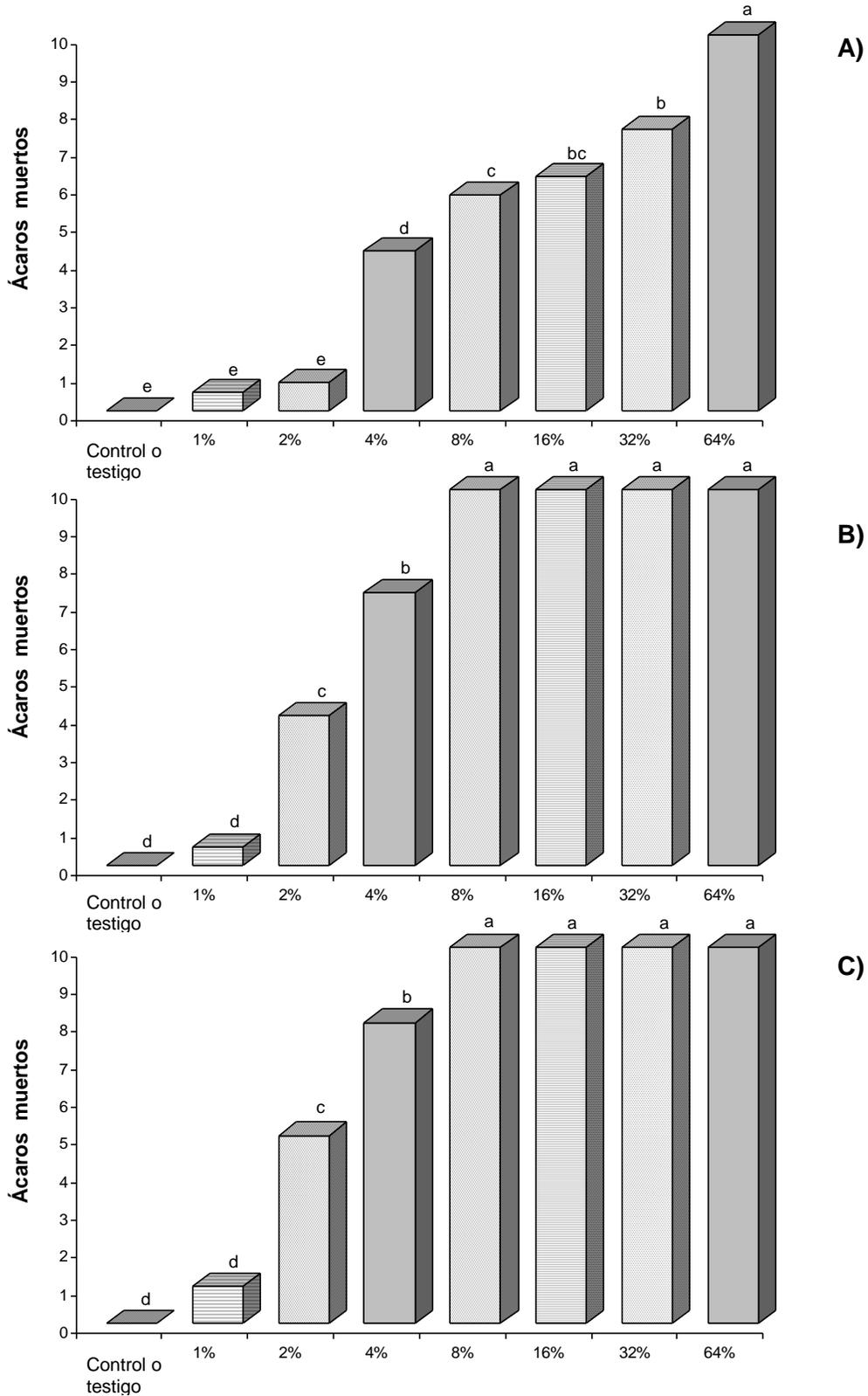


Figura 1.4. Número de ácaros muertos en la prueba de repelencia sin posibilidad de elección a las A) 24, B) 48 y C) 72 h. Barras marcadas con diferente letra son significativamente diferentes entre sí ( $\alpha \leq 0.005$ ).

### **1.3.3. Contenido de azadiractina (AZA) en el extracto oleoso.**

El extracto oleoso de neem cosecha 2006 presentó una concentración de 2,200 mg l<sup>-1</sup> de azadiractina (AZA). El efecto de repelencia y mortalidad de ácaros fueron generados por las concentraciones más altas, correspondientes a 58.08, 116.16, 232.32 y 464.64 mg l<sup>-1</sup> de AZ; con 8, 16, 32 y 64% del extracto aplicadas en forma respectiva.

### **1.4. Discusión.**

El efecto repelente de los extractos de neem sobre varroa tiene dos componentes importantes, la intensidad y la duración. Asimismo, por tratarse de un extracto vegetal crudo de composición indeterminada y variable, la consistencia en los resultados de una cosecha a otra tiene gran relevancia.

Colin *et al.* (1994) calcularon VR de 124 sobre varroa con la aplicación de extractos de *Thymus vulgaris* L., mientras que González-Gómez *et al.* (2006) obtuvieron VR entre 128 y 139, cercanos a la total repelencia, con extractos de neem cosechado en 2003, del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Lo anterior muestra que el efecto repelente del extracto crudo de neem sobre varroa fue mayor que el ocasionado por *T. vulgaris*, como lo sugieren Imdorf *et al.* (1999).

La interferencia de los extractos de neem en la capacidad de varroa para localizar las pupas de abejas, posarse sobre ellas, o ambas, fue evidenciada con los resultados de la prueba de repelencia sin posibilidad de elección (Figura 3). Aun en ausencia de una fuente de alimento, un número reducido de varroas alcanzó a posarse sobre las pupas y alimentarse de ellas. Así, se sugiere que la

elevada tasa de mortalidad de varroa con las concentraciones más elevadas del extracto de neem estuvo asociada al hecho que de estos ácaros fueron incapaces de encontrar su fuente de alimento (Figura 4); es muy probable que murieron por inanición, como se postuló en nuestro estudio previo (González-Gómez *et al.*, 2006). Los aceites esenciales de otras plantas (*Salvia officinalis* L. y *Chenopodium* spp.) evaluados por Colin *et al.* (1994) también provocaron altos niveles de mortalidad de varroa (90%) 16 h después de la aplicación.

La duración del efecto repelente de los extractos de neem es de gran importancia para su uso potencial en el manejo de esta plaga. Varroa parasita tanto abejas adultas como crías; sin embargo, la reproducción sólo ocurre dentro de las crías operculadas (Ifantidis, 1983; Martin, 1994, 1995). Además, de acuerdo con Ifantidis (1988) y Boot *et al.* (1992), las larvas de abejas son atractivas para las hembras de varroa sólo durante las 24 h que preceden a su operculación; un tratamiento con neem en ese periodo las protegería de ser parasitadas. Sin embargo, en una colonia de abejas es común encontrar larvas de todas las edades, por lo que al disiparse el efecto repelente del neem las varroas sobrevivientes estarían en posibilidades de localizar celdas con cría de edad apropiada e introducirse en ellas para iniciar el ciclo parasitario. Por ello, la estrategia de combate podría consistir en llevar a cabo aplicaciones repetidas de extractos de neem o usar las concentraciones con efecto repelente más duradero. En el presente estudio éstas fueron las que contenían más de 116 mg l<sup>-1</sup> de AZA (16, 32 y 64% del extracto).

La variación en la estabilidad del efecto repelente de los extractos de neem de cosechas diferentes se considera normal por tratarse de un plaguicida vegetal

(Perez *et al.*, 2007). Esto es debido a que estos productos presentan variabilidad en el tipo y concentración de sus compuestos (Rodríguez *et al.* 2003), atribuidos a factores como época del año, ubicación geográfica y estado fenológico en el que se recolecta el tejido fuente del fito-insecticida (Ermel *et al.* 1987; Sidhu *et al.* 2003). González-Gómez *et al.* (2006) observaron diferencias en el efecto repelente de los extractos de neem cosechados en 2002 y 2003 en el mismo sitio, y de ellos los de 2003 mostraron los efectos superiores. En el presente estudio, los extractos correspondientes a la cosecha de 2006 tuvieron efectos claramente inferiores a los obtenidos por González-Gómez *et al.* (2006) con las mismas concentraciones de los extractos; sin embargo, la mayor eficacia de los extractos; es decir, repelencia total y duración mayor del efecto (72 h), se obtuvo con las concentraciones más altas.

El extracto oleoso de neem utilizado en esta investigación tenía concentraciones de AZA que oscilaron entre 58.08 y 464.64 mg l<sup>-1</sup>, en las diluciones de 8 y 64%, respectivamente. Se ha observado que concentraciones similares de AZA no causan efectos negativos a las abejas; al respecto, Larson (1990) e Isman (1995) observaron que las abejas obreras adultas en contacto con AZA en una concentración de 20 mg l<sup>-1</sup> permanecían sin efectos negativos. Por su parte, Naumann *et al.* (1994) determinaron que la AZA en concentración de 150 mg l<sup>-1</sup> aplicada en campo para el control de plagas de canola no repele el pecoreo de las abejas, y además que éstas no adquieren cantidades detectables de AZA. Naumann e Isman (1996) encontraron que aplicaciones al cuarto ínstar larval de un producto a base de neem (Neem EC), en concentraciones de 100, 250 o 500 mg l<sup>-1</sup> de AZA no presentan efectos significativos sobre la longevidad

del adulto sobreviviente. El extracto de neem en las concentraciones seleccionadas en el presente estudio se encuentra en el rango reconocido por estos autores, por lo que podría resultar seguro para su uso sobre abejas, aunque es recomendable realizar estudios de campo para confirmar esta hipótesis.

### **1.5. Conclusiones.**

Se observó un efecto repelente in vitro de extracto oleoso de neem que impidió que hembras adultas de varroa localizaran a pupas de abejas y se alimentaran de ellas. La repelencia más alta y estable se obtuvo con 2.64, 5.28, 10.56 y 21.12% del extracto crudo.

La concentración de extracto de neem de 21.12% aplicada sobre pupas de abejas impidió que 98% de las varroas se posaran sobre ellas y llevó a 100% de mortalidad de varroa en 72 h, aparentemente por inanición.

### **1.6. Literatura citada.**

Anderson, D. L., y W. H. Trueman. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24(3):165-189.

Bernardini, M., y T. Gardi. 2001. Influence of acaricide treatments for varroa control on the quality of honey and beeswax. *Apitalia* 28:21-24.

Bogdanov, S., V. Kilchenmann, y A. Imdorf. 1988. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research* 37(2):57-67.

- Boot, W. J., J. N. M. Calis, y J. Beetsma. 1992. Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* 16:295-301.
- Burgerjon, A. 1956. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized fluids. *Annals of Applied Biology* 39:1-28.
- Colin, M. E., F. Ciavarella, G. Otero-Colina, y L. P. Belzunces. 1994. A method for characterizing the biological activity of essential oils against *Varroa jacobsoni*. In: Matheson, A. (ed.). *New Perspectives on Varroa*. International Bee Research Association, Cardiff U. K. pp. 109-114.
- De Jong, D. 1990. Mites: *Varroa* and other parasites of brood. pp. 200-218. In: Morse, R. A., y R. Nowogrodzki (eds.), *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York. USA.
- Elzen, P. J., F. A. Eischen, J. R. Baxter, G. W. Elzen, y W. T. Wilson. 1999. Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie* 30: 13-17.
- Ermel, K., E. Pahlich, y H. Schmutterer. 1987. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations and its dependence on temperature, relative humidity and light. pp 171-187. In: Schmutterer, H., y Ascher, K. R. S. (eds.), *Proceedings, Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other Tropical Plants*. 3<sup>rd</sup> International Neem Conference, 10-15 July, 1986, Nairobi, Kenya. German Agency for Technical Cooperation: Eschborn, Germany.

- González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez, J. A. Pérez-Amaro, y R. M. Soto-Hernández. 2006. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Agrociencia* 40: 741-751.
- Hassan, S. A. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *EPPO Bulletin* 15: 214-255.
- Ifantidis, M. D. 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *Journal of Apicultural Research* 22(3):200-206.
- Ifantidis, M. D. 1988. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. *Apidologie* 19(4):387-396.
- Imdorf, A., S. Bogdanov, O. R. Ibañez, y N. Calderone. 1999. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie* 30(1-3):209-228.
- Isman, M. B. 1995. The effects of neem on Lepidoptera. pp. 299-318. In: Schmitterer, H. (ed.). *The neem tree Azadirachta indica* A. Juss. and other Meliaceae plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry, and other purposes. Weinheim, New York, USA.
- Jay, S. C. 1963. The development of honeybees in their cells. *Bee World* 43(4):119-122.

- Kraus, B., N. Koeniger, y S. Fuchs. 1994. Screening of substances for their effects on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *Journal of Apicultural Research* 33(1): 34-43.
- Larson, R. O. 1990. Commercialization of the neem extract Margosam-O in USDA collaboration. pp. 23-28. In: Locke, J. C., and R. H. Lawson (eds.). *Proceedings, Neem's Potential in Pest Management Programs*. United States Department of Agriculture Neem Workshop. No. 86. USDA. Agricultural Research Service; Beltsville, M. D., U.S. A.
- Martin, S. J. 1994. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* 18(2):87-100.
- Martin, S. J. 1995. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* 19(2):199-210.
- Matheson, A. 1993. World bee health report. *Bee World* 74:176-212.
- Matheson, A. 1995. World bee health update. *Bee World* 76:31-39.
- Maul, V. 1983. *Varroa* elimination mittels brutbeschränkung auf bannwaben neue ergebnisse zur wirksamkeit des verfahrens. *Apidologie* 14: 260-261.
- Melathopoulos, A. P., M. L. Winston, R. Whittington, T. Smith, C. Lindberg, A. Mukai, y M. Moore. 2000a. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari:

- Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. *Journal of Economic Entomology* 93(2): 199-209.
- Melathopoulos, A. P., M. L. Winston, R. Whittington, H. Higo, y M. D. Le. 2000b. Field evaluation of neem and canola oil for the selective control of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae). *Journal of Economic Entomology* 93(3): 559-567.
- Mordue (Luntz), A. J., y A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39(11): 903-924.
- Naumann, K., R. W. Currie, y M. B. Isman. 1994. Evaluation of the repellent effects of a neem insecticide on foraging honey bees and other pollinators. *The Canadian Entomologist* 126: 225-230.
- Naumann, K., y M. B. Isman. 1996. Toxicity of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticide to larval honey bees. *American Bee Journal* 136(7): 518-520.
- Peng, C. Y. S., S. Trinh, J. E. Lopez, E. C. Mussen, A. Hung, y R. Chuang. 2000. The effects of azadirachtin on the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* and its host honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 39(3-4): 159-168.
- Perez, F., G. Silva, M. Tapia, y R. Hepp. 2007. Variacion anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42(5):633-639.

- Rembold, H., J. P. Kremer, y G. M. Ulrich. 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11(1): 29-38.
- Rodríguez, C., G. Silva, y J. Vendramim. 2003. Insecticidas de origen vegetal. pp. 87-112. In: Silva, G., y R. Hepp (eds.). Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción/Fundación para la Innovación Agraria. Chillan, Chile.
- Rodríguez-Dehaibes, S. R., G. Otero-Colina, V. Pardo-Sedas, y J. A. Villanueva-Jiménez. 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research* 44(3):124-125.
- Sammataro, D., U. Gerson, y G. Needham. 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annual Review of Entomology* 45: 519-548.
- SAS Institute. 2000. PROC User's manual, version 8.1. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35: 271-297.
- Schneider, B. H., y K. Ermel. 1987. Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. pp. 161-170. In: Schmutterer, H., y K. R. S. Ascher (eds.), Proceedings, Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other Tropical Plants. 3<sup>rd</sup> International Neem Conference, 10-15 July 1986,

Nairobi, Kenya. German Agency for Technical Cooperation: Eschborn, Germany.

Sidhu, O. P., V. Khumar, y H. M. Behl. 2003. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:910-915.

Thompson, H. M., M. A. Brown, R. F. Ball, y M. H. Bew. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the U. K. Apidologie 33:357-366.

Wallner, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. Apidologie 30:235-248.

## **CAPÍTULO II. EXTRACTO OLEOSO DE NEEM (*Azadirachta indica*) SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y DESARROLLO DE CRIA DE ABEJAS OBRERAS Y LA POSTURA DE LA ABEJA REINA**

### **Resumen**

Se aplicó extracto oleoso de neem (*Azadirachta indica*) en concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64% con respecto a una solución madre formada por extracto: emulsionante: agua destilada en proporciones 1:1:1, por aspersion sobre panales de abejas con crías de diferente edad. Se cuantificó su efecto en la supervivencia y tiempo de desarrollo de las crías, así como en la respuesta de las abejas obreras para alimentarlas y opercularlas. Se observó 100% de mortalidad de huevos con la dilución 64%, pero fue mínima a concentraciones menores. Las larvas que alcanzaron el quinto ínstar fueron operculadas y sobrevivieron al tratamiento, pero a la concentración más alta (64%) tuvieron atraso de uno a dos días en el desarrollo. Se aplicó extracto de neem sobre panales vacíos para determinar si se inhibía la postura de huevos por la abeja reina; con los tratamientos evaluados no hubo diferencia estadística con respecto al control o testigo; sin embargo, se observó una ligera reducción de la ovipostura a concentraciones mayores (32%) de extracto de neem.

**Palabras clave:** azadiractina, *Apis mellifera*, apicultura, operculación.

**OILY EXTRACT OF NEEM (*Azadirachta indica*) ON THE SURVIVAL AND  
DEVELOPMENT OF WORKER BEE LARVAE AND EGG LAYING OF THE  
QUEEN BEE**

**Abstract**

Oily neem (*Azadirachta indica*) extract was applied at concentrations of 1, 2, 4, 8.16, 32 and 64% from a stock solution consisting of extract: emulsifier: water in proportions 1:1:1, spray on honeycombs with bee brood of different ages to determine their effect on survival and development time of offspring, and the response of worker bees to feed and operculate them. It was noted 100% mortality of eggs with 64% dilution, but it was minimal at lower concentrations. Larvae reaching the fifth instar were capped and survived the treatment, but had a one-two days delay in development cost in (64%). Neem extract was applied on empty combs to determine whether it inhibited egg laying by the queen bee. No treatment resulted in a statistical difference compared with the control, but there was a slight reduction in oviposition at the highest concentrations of neem extract.

**Key words:** azadirachtin, *Apis mellifera*, bee-capping.

## 2.1. Introducción

El árbol del neem (*Azadiracta indica* A. Juss.) es reconocido por su actividad insecticida. Se le atribuyen propiedades de toxicidad, repelencia, inhibición de la alimentación y alteraciones en el desarrollo de diversas plagas, como insectos, ácaros y nematodos, por lo que se han desarrollado diversos extractos formulados para el control de numerosas plagas (Schmutterer, 1990).

El neem contiene una variedad amplia de sustancias responsables de su efecto como plaguicida. Se considera que su principal ingrediente activo es la azadiractina [Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993], aunque esto ha sido cuestionado por Gauvin *et al.* (2003), quienes indican que es la mezcla de limonoides la que permite un efecto insecticida completo.

Las abejas melíferas pueden hacer contacto con el árbol de neem o con sus productos en diversas formas. Sus flores atraen a las abejas obreras, quienes obtienen néctar y en menor medida polen (Crane *et al.*, 1984). Por otra parte, los extractos de neem son aplicados para el control de plagas agrícolas en cultivos polinizados por abejas, las que pueden tomar polen y néctar contaminados y llevarlos a la colmena, con lo que llegaría a ocurrir intoxicación de las abejas que consumen esos productos (Naumann *et al.*, 1994; Naumann e Isman, 1996). En contraste, en los mismos trabajos se postula que como plaguicida agrícola el neem no tiene efectos negativos sobre las abejas a concentraciones útiles para el control de otros insectos, y que las abejas obreras transportan cantidades mínimas de neem al interior de las colmenas.

La efectividad de productos a base de neem ha sido probada para el control de parásitos de las abejas melíferas, como los ácaros *Varroa destructor* Anderson y Trueman y *Acarapis woodi* Rennie, los hongos patógenos *Paenibacillus larvae* White y *Ascosphaera Apis* (Maassen ex Claussen) Olive y Spiltoir, y el protozoario *Nosema apis* Zander (Liu, 1995 a y b; Melathopoulos *et al.*, 2000 a y b; Peng *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2001). En dichos trabajos se han obtenido resultados diversos pero se ha observado que los productos probados son tóxicos para las abejas o les causan alteraciones en el desarrollo.

En el uso de productos naturales para el control de plagas se ha propuesto el aprovechamiento de sus efectos subletales (Colin *et al.*, 1994). Esto se puede conseguir mediante la aplicación de dosis bajas de ingredientes activos, lo cual representa disminución de costos, contaminación de los productos alimenticios (productos de las abejas), efectos ambientales y mortalidad de las abejas.

González-Gómez *et al.* (2006) demostraron un efecto repelente de extractos de neem sobre *V. destructor* (en lo sucesivo, varroa), aplicados a bajas concentraciones. Además no se observó toxicidad aguda sobre abejas adultas, lo cual contrasta con otros estudios y evidencia que el neem puede tener más usos. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los efectos del extracto oleoso de neem sobre la supervivencia y el desarrollo de la cría de abejas obreras, así como en la postura de la reina, simulando condiciones naturales de la colonia de abejas.

## 2.2. Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en el apiario e instalaciones del Laboratorio de Acarología del Programa de Postgrado en Fitosanidad, del Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, municipio de Texcoco, Estado de México.

El aceite crudo se obtuvo de las semillas de neem recolectadas en agosto de 2006 en el Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados, municipio de Manlio F. Altamirano, Veracruz. El aceite se obtuvo por prensado en frío de las semillas de neem, a temperatura no superior a 35 °C, con un extractor de acero inoxidable, con aplicación de 1406 kg cm<sup>-2</sup> de presión, y se almacenó a -3 °C (González-Gómez *et al.*, 2006). Se determinó la concentración de azadiractina de este aceite en el Laboratorio de Alta Tecnología de Orizaba, S. C., mediante el método oficial de la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos de América (EPA) (Schneider y Ermell, 1987), a través del sistema modular HPLC con certificación ISO-9000 de Perkin Elmer.

**2.2.1. Efecto del neem en la supervivencia y el desarrollo de las abejas obreras.** Se seleccionaron 32 colonias al azar y de cada una de ellas se eligió un panal de la cámara de cría con larvas de abejas obreras de distintas edades. Los siguientes niveles de desarrollo fueron identificados: nivel 1, formado por huevos y larvas de primer ínstar; nivel 2, formado por larvas de segundo y tercer ínstar; y nivel 3, formado por larvas de cuarto a quinto ínstar (Figura 2.1).

Se seleccionaron porciones de panal de cámara de cría que contenían larvas de abejas obreras de cada uno de los tres niveles de edad, con un mínimo de 90 huevos o larvas cada uno. En cada panal estuvieron presentes los tres

niveles de edad. Las porciones de panal (tamaño 5 x 5 cm) se marcaron mediante una cuadrícula de cordón sujeta a un marco de madera del tamaño de un bastidor de cámara de cría Jumbo o Dadant (42 x 27 cm); el marco se dividió en coordenadas para facilitar el registro de los sitios seleccionados.

En los panales se aplicó extracto oleoso de neem mediante la torre de pulverización de Burgerjon (1956), de 1 a 2 mg cm<sup>-2</sup> (promedio 1.7 mg cm<sup>-2</sup>) cantidad determinada por la Organización Internacional de Control Biológico (Hassan, 1985). Esto se logró con la aplicación de 15 ml del producto a una presión de 0.703 kg cm<sup>-2</sup>, al término de la aplicación se esperó un minuto para permitir la sedimentación de las gotas sobre los organismos.

Una suspensión madre en una proporción 1:1:1 (peso) de extracto oleoso: emulsionante (Tween 20<sup>®</sup>): agua destilada fue preparada; los tratamientos correspondieron a la aplicación de diluciones del 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64% de la suspensión madre, y el control o testigo, al que se le aplicó agua destilada. González-Gómez *et al.* (2006) demostraron que el Tween 20<sup>®</sup> no tuvo efecto tóxico ni repelente sobre varroa ni sobre abejas a ninguna de las concentraciones administradas, por lo que se omitió su evaluación como control o testigo. Se contó con cuatro repeticiones por tratamiento, con un total de 32 panales.

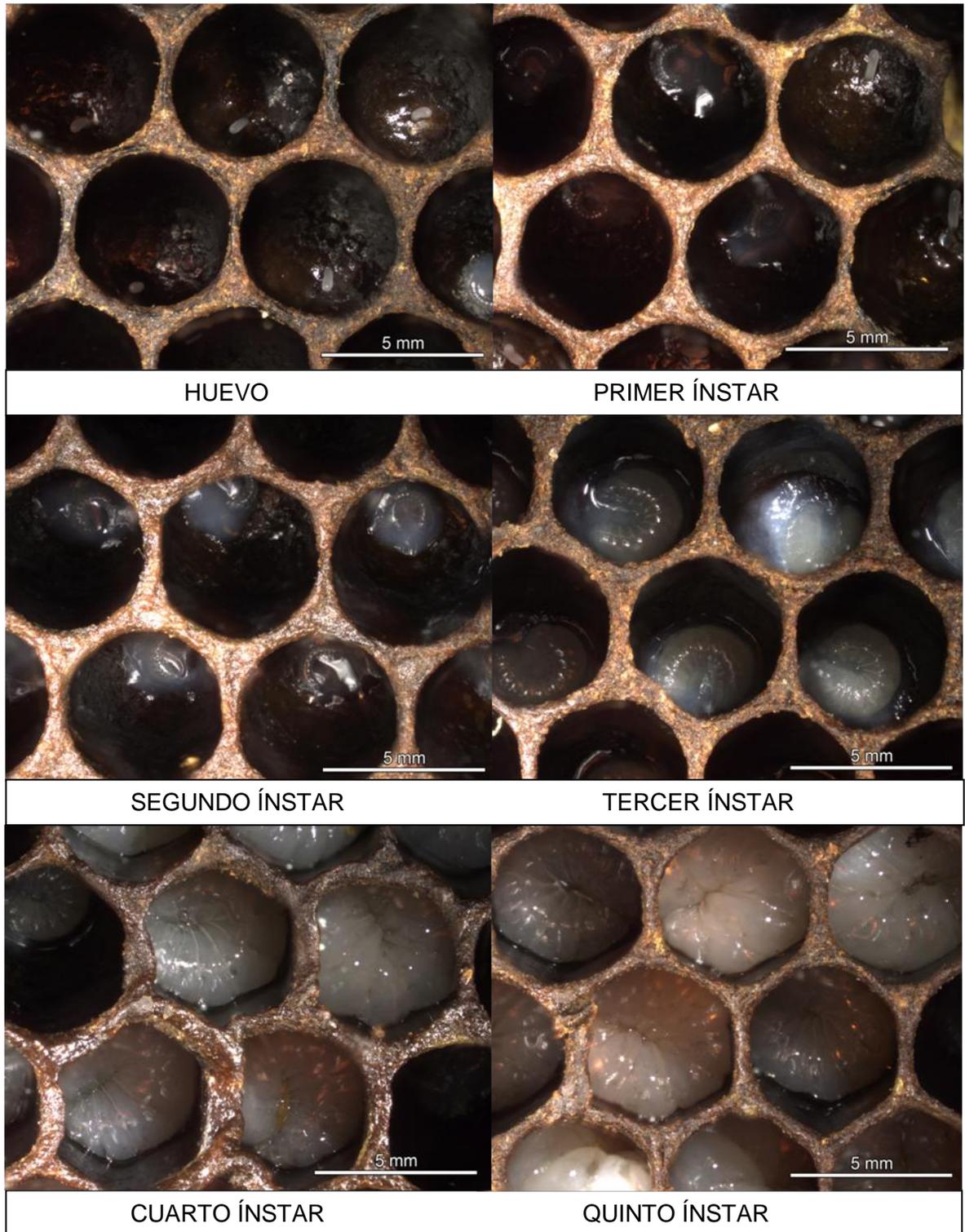


Figura 2.1. Niveles de desarrollo de la cría de obreras de *A. mellifera* seleccionados para la evaluación de los tratamientos.

Una vez tratados con el extracto de neem a las diluciones anotadas, los panales fueron colocados en las colonias de donde habían sido retirados. El día de la aplicación del extracto se identificó como día 0 (cero). En los días 1, 3, 6, 9 y 13 se registró el número de huevos o larvas sobrevivientes, en las porciones de panal previamente seleccionadas, ubicadas mediante la cuadrícula descrita. En el tiempo estimado, de acuerdo al desarrollo de las larvas, se registró si éstas habían sido operculadas (selladas con cera) por las obreras, mediante la toma de fotografías digitales y su posterior análisis con el programa Image Tool®.

Una vez operculadas las crías, se cortó cuidadosamente el opérculo de cinco celdas y las pupas en su interior fueron retiradas. Se determinó la supervivencia y se estimó el avance en su desarrollo por su coloración, de acuerdo con la descripción dada por Jay (1963) y Rembold *et al.* (1980) (Figura 2.2). De acuerdo con los autores mencionados y por su color, a cada pupa se le asignó un número que correspondía a la edad en días estimada a partir del inicio de la pupación.

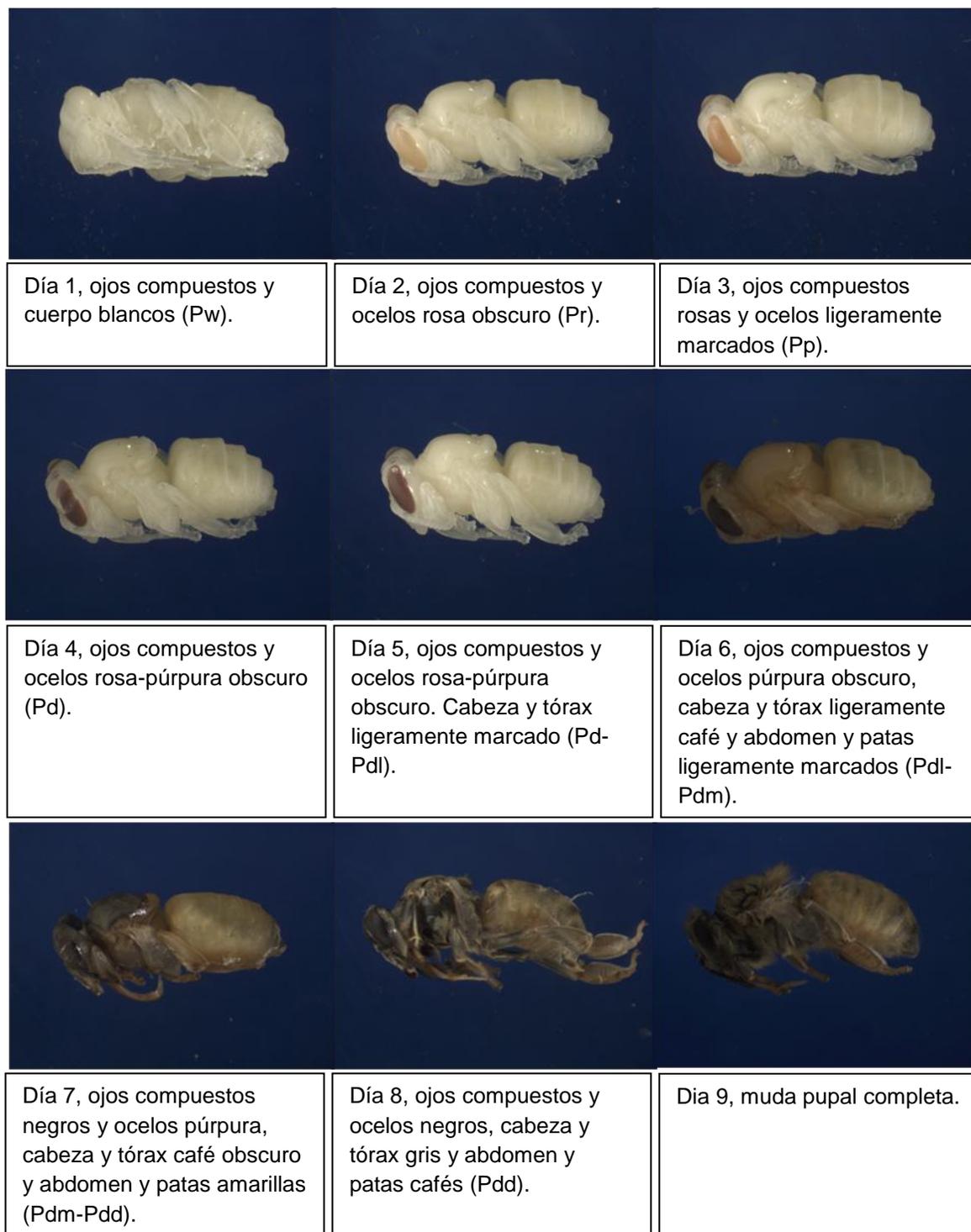


Figura 2.2. Cambios morfológicos y de coloración durante el desarrollo de la pupa de obrera de *A. mellifera*, de acuerdo con Jay (1963) y Rembold *et al.* (1980).

La fase de huevo de las abejas obreras dura tres días; la larva, de 5 a 5.5 días antes de que la celda sea operculada y de 11 a 12 días dentro de la celda operculada. En suma, como larva, prepupa y pupa, la duración es de 21 ó 22 días, posterior a los cuales emerge una abeja adulta (Jay, 1963). La toma de la fotografías se realizó inmediatamente antes de la aplicación de los tratamientos (día 0) y en los días 3, 6, 9 y 13 después de la aplicación de extracto de neem (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Calendarización de toma de fotografías para registro de supervivencia y desarrollo de las abejas obreras. Los números en las filas 2, 3 y 4 marcan el avance, en días, del desarrollo en el que se encontraban las abejas a partir del día en que recibieron el extracto de neem (día cero).

	Toma de foto																			
	0	1		3		6		9				13								
Nivel 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Nivel 2	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Nivel 3	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21						

\* Nivel 1, de huevos a larvas de primer ínstar; nivel 2, de larvas de segundo a tercer instar; nivel 3, de larvas de cuarto a quinto ínstar. \*Día identificado para la ocurrencia de la operculación, según el ínstar a observar.

**2.2.2. Efecto de neem en la postura de la abeja reina.** Se utilizaron colonias con reinas del mismo origen y edad, en plena postura; con población similar (diez espacios entre panales completos de obreras adultas) y abundantes reservas de alimento. Se aplicaron los extractos de neem sobre los panales con cera estampada y celdas de tamaño “estándar” construidas para la cría de obreras. Estos panales no tenían cría, miel ni polen. Se usaron las diluciones 0 (testigo, únicamente agua destilada), 8, 16 y 32 % de la suspensión madre, a cinco panales por dilución; en cada uno de ellos se confinó a una abeja reina en una

jaula excluidora, construida con dos mallas de hierro galvanizado (de cinco hilos por pulgada), sujetas a marcos de madera y sostenidas con ligas de goma, cada una a un lado de un panal. Por el espacio entre los hilos de la malla, las abejas obreras podían entrar y salir libremente de la jaula excluidora pero la abeja reina, por su tamaño mayor, quedó confinada dentro de ella. Los panales con jaulas fueron colocados dentro de las mismas colmenas de donde las reinas habían sido tomadas; las reinas fueron confinadas en ellos por 24 h y después de ese periodo se les liberó, luego de lo cual se contabilizó el número de huevecillos depositados en cada panal tratado.

### **2.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico.**

Se utilizó un diseño completamente al azar; los valores de supervivencia de huevos, larvas y pupas, edad estimada de las pupas determinada por su color y de huevecillos puestos por las reinas, fueron sometidos a análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey.

## **2.3 Resultados.**

El aceite crudo de neem presentó una concentración de azadiractina (AZA) de 2,200 mg l<sup>-1</sup>. Por lo tanto, las diluciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64% a partir de la suspensión madre correspondieron a 7.26, 14.52, 29.04, 58.08, 116.16, 232.32 y 464.64 mg l<sup>-1</sup> de AZA, respectivamente.

### **2.3.1. Efecto del neem en la supervivencia y el desarrollo de las abejas obreras.**

En el Cuadro 2.2 se presentan los efectos del extracto oleoso de neem a diferentes concentraciones en la supervivencia de la cría a lo largo del tiempo.

En el nivel 1, que corresponde a huevos y larvas de primer ínstar, el efecto del neem en concentraciones de 1 a 4% no presentó diferencias significativas con respecto al testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ); sin embargo, con las concentraciones de 8 y 32% la supervivencia fue significativamente menor. Con la concentración mayor, de 64%, la supervivencia de huevos y larvas de primer ínstar se redujo a cero; 24 h después de la aplicación del extracto de neem todas las celdas observadas estaban vacías, ya que las abejas obreras retiraron todos los ejemplares del nivel 1.

En el nivel 2, que incluye las larvas de segundo y tercer ínstar, se observó que a las concentraciones de 1 a 32% de extracto no hubo diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) con respecto al testigo, pero sí a la concentración de 64%. Por su parte, en el nivel 3, de larvas de cuarto a quinto ínstar, ninguno de los tratamientos fue diferente del testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ).

Durante el período de observación, la abeja reina fue poniendo huevos en las celdas que quedaron vacías por la muerte y eliminación de los huevos tratados con extracto de neem. Éstos no fueron tomados en cuenta en la evaluación de mortalidad de cría consecutiva a la aplicación de neem. Su presencia indica que el efecto residual fue de corta duración; la mortalidad de cría, observada a las concentraciones más elevadas, afectó sólo al nivel 1 (huevo y larvas de primer ínstar) y la reina rápidamente los repuso con la postura de huevos, lo que contrarresta el efecto del extracto.

Cuadro 2.2. Número de crías de abejas obreras sobrevivientes a la aplicación de diferentes concentraciones de extracto oleoso de neem (*A. indica*).

Nivel 1		Período de observación									
Tratamientos	0	1	3	6	9	13					
Control o testigo	90 ± 0 a	83.50 ± 1.3 a	80.75 ± 0.7 a	76.00 ± 0.9 a	69.75 ± 1.1 a	65.75 ± 1.6 a					
1%	90 ± 0 a	81.00 ± 0.4 ab	80.00 ± 0.7 ab	73.50 ± 1.1 ab	71.75 ± 1.3 a	67.75 ± 1.3 a					
2%	90 ± 0 a	83.00 ± 0.7 a	81.75 ± 0.4 a	75.50 ± 1.5 a	71.50 ± 1.1 a	64.25 ± 2.0 ab					
4%	90 ± 0 a	79.00 ± 1.4 ab	75.25 ± 0.2 abc	71.75 ± 1.0 abc	69.25 ± 0.2 a	61.25 ± 1.2 ab					
8%	90 ± 0 a	76.50 ± 2.7 ab	73.50 ± 2.3 bc	68.25 ± 1.1 bc	62.25 ± 1.3 b	58.50 ± 1.1 bc					
16%	90 ± 0 a	74.00 ± 0.5 bc	70.75 ± 1.7 cd	66.50 ± 2.3 c	61.00 ± 0.9 b	54.25 ± 0.4 cd					
32%	90 ± 0 a	68.75 ± 1.2 c	66.00 ± 0.9 d	59.00 ± 1.0 d	55.50 ± 0.8 c	51.75 ± 2.1 d					
64%	90 ± 0 a	0 ± 0 d	0 ± 0 e	0 ± 0 e	0 ± 0 d	0 ± 0 e					

Nivel 2		Período de observación									
Tratamientos	0	1	3	6	9	13					
Control o testigo	90 ± 0 a	86.50 ± 0.6 a	86.00 ± 0.4 a	82.75 ± 1.0 a	81.00 ± 1.2 a	79.50 ± 1.0 a					
1%	90 ± 0 a	85.00 ± 0.4 ab	84.50 ± 0.2 ab	81.75 ± 0.6 a	80.50 ± 0.2 ab	79.50 ± 0.2 a					
2%	90 ± 0 a	84.00 ± 0.4 ab	83.75 ± 0.4 ab	79.25 ± 1.8 a	78.50 ± 1.5 ab	77.25 ± 1.3 ab					
4%	90 ± 0 a	84.25 ± 1.6 ab	82.75 ± 1.1 ab	81.00 ± 0.5 a	80.25 ± 0.4 ab	78.25 ± 0.6 a					
8%	90 ± 0 a	82.75 ± 1.1 ab	82.50 ± 0.9 ab	80.25 ± 0.6 a	78.00 ± 1.0 ab	76.75 ± 1.0 ab					
16%	90 ± 0 a	85.25 ± 0.4 ab	84.50 ± 0.6 ab	84.00 ± 0.8 a	78.50 ± 1.3 ab	77.25 ± 1.0 ab					
32%	90 ± 0 a	83.75 ± 1.4 ab	82.75 ± 1.5 ab	80.75 ± 1.4 a	78.00 ± 1.0 ab	73.25 ± 0.8 bc					
64%	90 ± 0 a	81.75 ± 1.0 b	81.25 ± 0.7 b	80.50 ± 0.5 a	75.75 ± 1.1 b	70.50 ± 0.5 c					

Nivel 3		Período de observación									
Tratamientos	0	1	3	6	9	13					
Control o testigo	90 ± 0 a	87.75 ± 0.6 a	85.75 ± 0.2 a	85.25 ± 0.2 a	84.25 ± 0.4 a	84.25 ± 0.4 a					
1%	90 ± 0 a	86.75 ± 0.4 a	85.25 ± 0.2 a	85.00 ± 0.0 a	83.75 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a					
2%	90 ± 0 a	86.00 ± 0.4 a	85.25 ± 0.2 a	85.25 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a					
4%	90 ± 0 a	86.25 ± 0.2 a	85.00 ± 0.0 a	84.50 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a					
8%	90 ± 0 a	86.25 ± 0.2 a	85.00 ± 0.0 a	84.50 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a					
16%	90 ± 0 a	86.00 ± 0.4 a	84.75 ± 0.2 a	84.50 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a	83.75 ± 0.2 a					
32%	90 ± 0 a	85.75 ± 0.4 a	84.75 ± 0.2 a	84.25 ± 0.2 a	83.25 ± 0.4 a	83.25 ± 0.4 a					
64%	90 ± 0 a	86.00 ± 0.4 a	84.75 ± 0.2 a	84.25 ± 0.2 a	83.25 ± 0.4 a	83.25 ± 0.4 a					

\* Valores en la misma columna seguidas por la misma literal no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). Nivel 1, huevos a larvas de primer ínstar, nivel 2: larvas de segundo ínstar a tercer ínstar y nivel 3: larvas de cuarto a quinto ínstar.

El número de crías de abejas que fueron operculadas después de la aplicación de los tratamientos se observa en el Cuadro 2.3. En los niveles de

edad 2 y 3, ninguna de las concentraciones del extracto oleoso de neem resultó en diferencias significativas con respecto al testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ), y lo mismo ocurrió para las concentraciones bajas del extracto (1 a 4%) en el nivel 1. Sin embargo, con concentraciones altas (8 a 16%) sí se presentaron diferencias estadísticas con respecto al testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ). Como se notó con anterioridad en el estudio de supervivencia de abejas, en el nivel 1 se presentó menor supervivencia y dicho efecto también se reflejó en la operculación, ya que había menos cría que las obreras podían opercular.

El número de crías no operculadas (Cuadro 2.3) incluye a las que murieron en etapas tempranas de desarrollo, que llegó a 100% en el nivel 1 con la concentración de 64%; aquí todas las larvas que estaban vivas fueron operculadas en el tiempo previsto, de acuerdo al desarrollo normal de las abejas (Jay, 1963).

Cuadro 2.3. Número de crías de abejas obreras que fueron operculadas después de la aplicación del extracto oleoso de neem (*A. indica*)

Tratamientos	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
<b>Control o testigo</b>	69.75 ± 1.11 a	82.75 ± 1.03 a	85.75 ± 0.25 a
<b>1%</b>	71.75 ± 1.31 a	81.75 ± 0.63 a	85.25 ± 0.25 a
<b>2%</b>	71.50 ± 1.19 a	79.25 ± 1.89 a	85.25 ± 0.25 a
<b>4%</b>	69.25 ± 0.25 a	81.00 ± 0.58 a	85.00 ± 0.00 a
<b>8%</b>	62.25 ± 1.31 b	80.25 ± 0.63 a	85.00 ± 0.00 a
<b>16%</b>	61.00 ± 0.91 b	80.75 ± 0.48 a	84.75 ± 0.25 a
<b>32%</b>	55.50 ± 0.87 c	80.75 ± 1.49 a	84.75 ± 0.25 a
<b>64%</b>	0 ± 0 d	80.50 ± 0.50 a	84.75 ± 0.25 a

\* Valores en la misma columna seguidas por la misma literal no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). Nivel 1, huevos a larvas de primer ínstar, nivel 2: larvas de segundo ínstar a tercer ínstar y nivel 3: larvas de cuarto a quinto ínstar.

### 2.3.2. Efecto del neem en el desarrollo de las abejas obreras.

En el Cuadro 2.4 se exhiben los efectos del neem en las posibles alteraciones con respecto a la edad en días de desarrollo de las pupas de las abejas obreras. En el día 9, con concentraciones de 1 a 32%, no hubo diferencias significativas con respecto al testigo (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). Sin embargo, en los niveles de edad 1 y 2 se presentó una reducción de la edad esperada de las pupas tratadas con neem con concentración de 64%. Para el día 13, de igual forma las concentraciones menores no ocasionaron un retraso en la edad de la cría de abejas obreras con respecto al testigo (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). En este día de observación el efecto de la concentración mayor, 64%, también produjo una reducción en la edad de las abejas.

Cuadro 2.4. Edad en días, de las pupas de abejas obreras, estimada por el color, extraídas 9 y 13 días después de la aplicación de extractos de neem (*A. indica*)

Tratamientos	Huevecillos	Larvas 1	Larvas 2
<b>Día 9</b>			
<b>Control o testigo</b>	1.375 ± 0.24 a	4.375 ± 0.24 a	6.375 ± 0.24 a
<b>1%</b>	1.125 ± 0.13 a	4.125 ± 0.13 a	6.375 ± 0.24 a
<b>2%</b>	1.125 ± 0.13 a	4.125 ± 0.13 a	6.250 ± 0.25 a
<b>4%</b>	1 ± 0 a	3.750 ± 0.25 a	6.000 ± 0.00 ab
<b>8%</b>	1 ± 0 a	3.500 ± 0.29 a	6.125 ± 0.31 ab
<b>16%</b>	1 ± 0 a	3.500 ± 0.29 a	6.125 ± 0.13 ab
<b>32%</b>	1 ± 0 a	3.500 ± 0.29 a	5.250 ± 0.14 b
<b>64%</b>	-	3.250 ± 0.00 b	4.750 ± 0.25 c
<b>Día 13</b>			
<b>Control o testigo</b>	3.625 ± 0.24 a	6.625 ± 0.24 a	8.625 ± 0.24 a
<b>1%</b>	3.250 ± 0.25 a	6.625 ± 0.24 a	8.625 ± 0.24 a
<b>2%</b>	3.250 ± 0.25 a	6.250 ± 0.25 ab	8.500 ± 0.20 ab
<b>4%</b>	3.625 ± 0.25 a	6.125 ± 0.13 ab	8.375 ± 0.24 ab
<b>8%</b>	3.625 ± 0.24 a	5.875 ± 0.13 ab	8.375 ± 0.24 ab
<b>16%</b>	3.375 ± 0.24 a	5.750 ± 0.14 ab	8.000 ± 0.29 ab
<b>32%</b>	3.125 ± 0.24 a	5.500 ± 0.20 b	7.750 ± 0.32 ab
<b>64%</b>	-	5.375 ± 0.24 b	7.375 ± 0.31 b

\* Valores en la misma columna seguidas por la misma literal no son diferentes estadísticamente (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ). Nivel 1, huevos a larvas de primer instar, nivel 2: larvas de segundo a tercer instar y nivel 3: larvas de cuarto a quinto instar.

### 2.3.3. Efecto del extracto oleoso de neem en la postura de la abeja reina.

En la Figura 2.3 se presenta el número de huevos puestos por las abejas reinas en un período de 24 h, posterior a su exposición con diferentes concentraciones de neem. No se observaron diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ )

con respecto al testigo; sin embargo, es notoria la reducción en el número de huevos depositados por la abeja reina con las concentraciones mayores. Ninguna de las abejas reinas murió durante el período de evaluación.

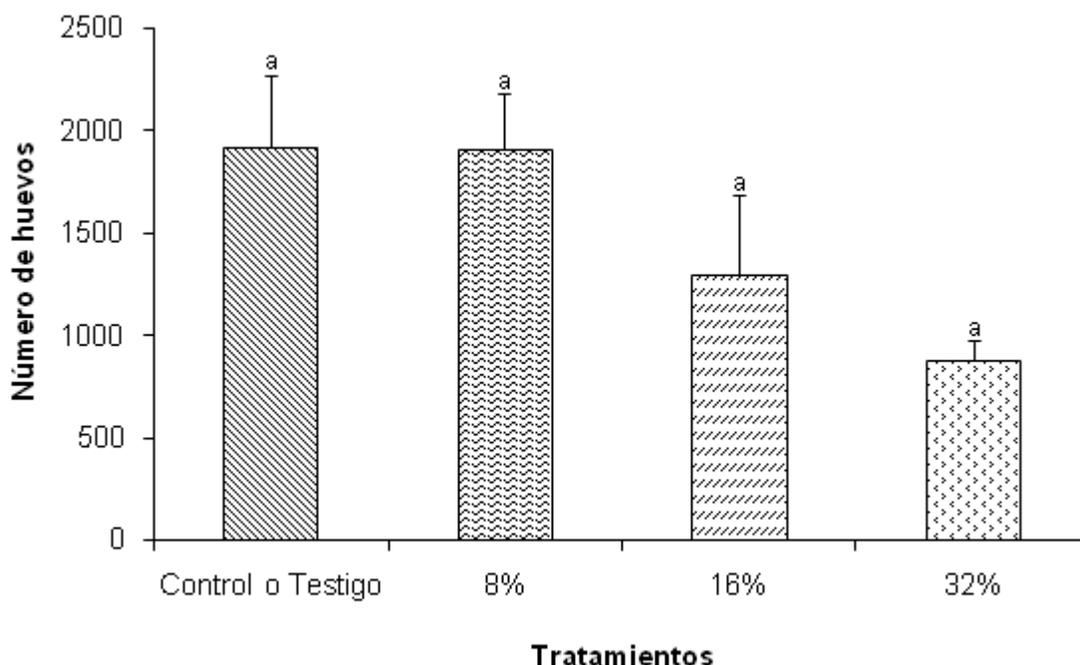


Figura 2.3. Número de huevos puestos por las abejas reinas después de la aplicación de los diferentes extractos oleosos de neem (*A. indica*) sobre panales. Barras marcadas con la misma literal no son diferentes estadísticamente (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ).

## 2.4. Discusión

La supervivencia de las larvas de abejas disminuyó conforme aumentó la concentración de neem aplicada, donde el estado de desarrollo más susceptible fue el huevo. Resultados similares fueron documentados por Naumann e Isman (1996) y Peng *et al.* (2000). La mortalidad observada en el testigo, sobre todo en el nivel 1 de desarrollo, no fue mayor a la observada por Winston (1987) en condiciones normales de cría.

Naumann e Isman (1996), al aplicar tópicamente 5  $\mu\text{l}$  de un extracto a base de neem que contenía entre 0.25 y 250 pg de azadiractina, a larvas de abejas del primer ínstar, observaron aproximadamente 75% de mortalidad a la dosis más alta. Sin embargo, la mortalidad no fue significativamente diferente del testigo sobre larvas de cuarto ínstar expuestas a 0.25 y 5 ng de azadiractina. En el presente estudio se aplicó un promedio de 1.7  $\text{mg cm}^{-2}$  de extracto de neem, sobre una superficie del fondo de una celda de abeja de 0.198  $\text{cm}^2$ , por lo que la cantidad de producto que cada larva de abeja recibió fue cercana a 0.3604 mg, lo que corresponde a 2.61, 5.23, 10.46, 20.93, 41.86, 83.72 y 167.45 pg de azadiractina por abeja. Estos valores son de orden similar a los aplicados por Naumann e Isman (1996) quienes, con la dosis más alta, observaron 100% de mortalidad de huevos.

Todas las celdas en las que se aplicó extracto de neem a 64% estaban vacías 24 h después, lo que se atribuye a canibalismo por parte de las abejas obreras (Winston, 1987). Con la información obtenida en el presente estudio es imposible determinar si ocurrió canibalismo porque los huevos estaban ya muertos, o si las obreras rechazaron y eliminaron huevos por estar tratados con neem.

González-Gómez *et al.* (2006) determinaron que la concentración 4% de extracto de neem produce repelencia en *V. destructor*, que interfiere en el establecimiento de estos ácaros en larvas de abejas, e impide que reinicien su ciclo reproductivo y que finalmente mueran, al parecer de inanición. En un trabajo posterior (González-Gómez *et al.*, en prensa), concentraciones mayores a 8%

tuvieron resultados similares. Dichas concentraciones de extracto de neem son el punto de partida para el desarrollo de un plaguicida (o repelente) a base de neem, por lo que no se espera que se deba aplicar a concentración de 64% (464.64 mg l<sup>-1</sup> de AZ). El efecto negativo del neem, expresado en mortalidad de huevos, se puede evitar, simplemente usando las concentraciones menores.

Debido a que se hizo una sola aplicación de neem en cada colonia, las abejas recibieron el tratamiento correspondiente en un gradiente de edades. Cuando lo recibieron en edad temprana, ocurrió un ligero pero no significativo atraso en su desarrollo, mientras que cuando lo recibieron en etapa más avanzada del desarrollo larval el atraso en el desarrollo se hizo más evidente y estadísticamente significativo. No hay antecedentes sobre estudios en los que se evalúe el efecto del neem en la velocidad de desarrollo de abejas, por lo que la presente es una aportación original. Dado que las pupas estaban vivas al momento de ser extraídas de sus celdas, se cuestiona si el atraso en su desarrollo, estimado en un máximo de dos días, realmente tiene consecuencias negativas para el desarrollo de la colonia o únicamente las abejas toman más tiempo del previsto para emerger como adultas.

Ninguna de las abejas reinas murió durante el tratamiento y no se encontraron antecedentes acerca del efecto del neem en la postura de la reina. Melathopoulos *et al.* (2000b) observaron mortalidad de reinas como resultado de la aplicación de neem. Sin embargo, los datos no son comparables porque en el presente trabajo el neem fue aplicado sobre el panal, y no sobre la reina o en toda la colmena.

## 2.5. Conclusiones

El efecto negativo de la aplicación de extracto oleoso de neem a dilución de 64% fue alto, pues ocasionó 100% de mortalidad a la fase de huevo y larvas de primer instar; sin embargo, la susceptibilidad fue mínima a concentraciones menores a 32%. Las larvas que alcanzaron el quinto instar fueron operculadas y sobrevivieron a la aplicación del extracto oleoso de neem, pero tuvieron un atraso en el desarrollo estimado en uno a dos días.

Por otra parte, el efecto del extracto oleoso de neem no produjo efectos negativos en la postura normal de la abeja reina a las concentraciones aplicadas.

## 2.6. Literatura citada

- Burgerjon, A. 1956. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized fluids. *Annals of Applied Biology* 39:1-28.
- Colin, M. E., F. Ciavarella, G. Otero-Colina, y L. P. Belzunces. 1994. A method for characterizing the biological activity of essential oils against *Varroa jacobsoni*. In: Matheson, A. (ed.). *New Perspectives on Varroa*. International Bee Research Association, Cardiff U. K. pp. 109-114.
- Crane, E., P. Walker, y R. Day. 1984. *Directory of important world honey sources*. International Bee Research Association. 384 pp.
- Gauvin, M. J., A. Bélanger, R. Nébié, y B. Guy. 2002. *Azadiractha indica*: L'azadirachtine est-elle le seul ingrédient actif?. *Phytoprotection* 84:115-119.

- González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez, J. A. Pérez-Amaro, y R. M. Soto-Hernández. 2006. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Agrociencia* 40: 741-751.
- González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J.A. Villanueva-Jiménez, R. Vandame, y C. B. Peña-Valdivia. Repellency of the oily extract of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*. En prensa.
- Hassan, S. A. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *EPPO Bulletin* 15: 214-255.
- Jay, S. C. 1963. The development of honeybees in their cells. *Bee World* 43(4):119-122.
- Liu, T. P. 1995a. A possible control of chalkbrood and *Nosema* diseases of the honey bee with neem. *American Bee Journal* 135: 195-198.
- Liu, T. P. 1995b. Controlling tracheal mites in colonies of honey bees with neem (Margosan-O) and flumethrin (Bayvarol). *American Bee Journal* 135: 562-566.
- Melathopoulos, A. P., M. L. Winston, R. Whittington, T. Smith, C. Lindberg, A. Mukai, y M. Moore. 2000a. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari:

- Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. *Journal of Economic Entomology* 93(2): 199-209.
- Melathopoulos, A. P., M. L. Winston, R. Whittington, H. Higo, y M. D. Le. 2000b. Field evaluation of neem and canola oil for the selective control of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae). *Journal of Economic Entomology* 93(3): 559-567.
- Mordue (Luntz), A. J., y A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39(11): 903-924.
- Naumann, K., R. W. Currie, y M. B. Isman. 1994. Evaluation of the repellent effects of a neem insecticide on foraging honey bees and other pollinators. *The Canadian Entomologist* 126: 225-230.
- Naumann, K., y M. B. Isman. 1996. Toxicity of a Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticide to larval honey bees. *American Bee Journal* 136(7): 518-520.
- Peng, C. Y. S., S. Trinh, J. E. Lopez, E. C. Mussen, A. Hung, , y R. Chuang. 2000. The effects of azadirachtin on the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* and its host honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 39(3-4): 159-168.
- Rembold, H., J. P. Kremer, y G. M. Ulrich. 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11(1): 29-38.
- Schenk, P., A. Imdorf, y P. Fluri. 2001. Effects of neem oil on Varroa mites and bees. *American Bee Journal* 141(12):878-879.

- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology 35: 271-297.
- Schneider, B. H., y K. Ermel. 1987. Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. pp. 161-170. In: Schmutterer, H., y K. R. S. Ascher (eds.), Proceedings, Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other Tropical Plants. 3<sup>rd</sup> International Neem Conference, 10-15 July 1986, Nairobi, Kenya. German Agency for Technical Cooperation: Eschborn, Germany.
- Whittington, R; M. L. Winston, A. P. Melathopoulous, y H. A. Higo. 2000. Evaluation of botanical oils, neem, thymol and canola spray to control *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). American Bee Journal 140:567–572.
- Winston, M. L. 1987. The biology of the honey Bee. Harvard University Press Cambridge, Massachusetts, USA. 281p.

### **CAPÍTULO III. EXTRACTO OLEOSO DE NEEM EN EL CONTROL DE *Varroa destructor* Y LA CONDICIÓN DE COLONIAS DE ABEJAS (*Apis mellifera*)**

#### **Resumen**

Se aplicó una suspensión de extracto oleoso de neem (*Azadirachta indica* L.) en el interior de colmenas pobladas por abejas (*Apis mellifera* L.) para el control del ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman. Las aplicaciones se hicieron por aspersión, en diluciones 16 y 32% de una suspensión madre (extracto de neem: emulsionante: agua destilada, 1: 1: 1), de una a tres aplicaciones por colmena. Se registró una mortalidad máxima de 85% de *V. destructor*, proporcional a la concentración y al número de aspersiones. Ninguno de los tratamientos causó reducción de la población de abejas, cría operculada de obreras ni reservas de miel y polen. Sin embargo, se perdió una abeja reina en el tratamiento de 16% con una aplicación, y otra en el de 32% con tres aplicaciones.

**Palabras clave:** *Azadirachta indica*, toxicidad, repelencia, control.

## **EFFECT OF OILY EXTRACT OF NEEM FOR THE CONTROL OF *Varroa destructor* AND CONDITION OF HONEY BEES (*Apis mellifera*) COLONIES**

### **Abstract**

A suspension of oily extract of neem (*Azadirachta indica* L.) was sprayed inside hives populated by honey bees (*Apis mellifera* L.) to control *Varroa destructor* Anderson and Trueman. One to three spray applications per hive were made at 16 and 32% dilutions of a suspension (neem extract: emulsifier: distilled water, 1: 1: 1). There was a mortality rate of *V. destructor* proportional to the concentration and number of applications, with maximum value of 85%. None of the treatments caused reduction in the population of bees, worker bee brood or honey and pollen reserves. However, one queen bee was lost after the treatment of 16% with one application, and another queen after treatment of 32% with three applications.

**Key words:** *Azadirachta indica*, toxicity, repellency, control.

### 3.1. Introducción

La cría y aprovechamiento de las abejas (*Apis mellifera* L.) es una actividad económica importante en México; en los últimos diez años se han explotado entre 1 y 1.4 millones de colmenas. El principal producto que se obtiene es la miel, de la que se han cosechado anualmente entre 50 y 60,000 t en el mismo periodo, lo que ubica a nuestro país entre los cinco principales productores en el mundo (SIAP, [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)).

El ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman (en lo sucesivo, varroa) es un parásito de las abejas melíferas que ha sido considerado el problema sanitario principal de estos insectos a nivel mundial (Ruttner, 1983). Se diseminó por el mundo a partir de su origen en el Asia tropical, hasta llegar a México, donde fue detectado por primera vez en 1992 (Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 1992). A partir de su ingreso al país e igual que en otros países, se ha dependido del uso regular de plaguicidas para su control. Para ello se cuenta sólo se cuenta con tres ingredientes activos disponibles comercialmente en México: fluvalinato, flumetrina y amitraz (con nombres comerciales Apistan<sup>®</sup>, Bayvarol<sup>®</sup> y Colmesán<sup>®</sup>, respectivamente), a los que se suman productos alternativos como el ácido fórmico y el timol. El uso obligado de plaguicidas para el control de varroa ha representado aumento en costos de producción, contaminación de la miel, mortalidad de abejas y, recientemente, el desarrollo de resistencia a los plaguicidas usados (Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 2005; 2010, en prensa).

En la búsqueda de plaguicidas alternativos, de bajo impacto ambiental y de baja toxicidad para mamíferos, se ha reconocido el árbol del neem (*Azadirachta indica* L.). De este árbol se obtiene una gran variedad de ingredientes con

actividad insecticida. La azadiractina es considerado el tetranortriterpenoide más relevante (Schmutterer, 1990). A los extractos de neem se han atribuido propiedades tóxicas, de repelencia, de inhibición de alimentación y reproducción, así como de alteraciones en el desarrollo de numerosas plagas, como insectos, ácaros y nematodos [Mordue (Luntz) y Blackwell, 1993].

En un experimento de laboratorio, Peng *et al.* (2000) probaron un producto formulado a base de neem y otro a base de azadiractina purificada, con concentraciones entre 6 y 162 mg l<sup>-1</sup> de azadiractina, para el control de varroa. Agregaron estos productos a jarabe de azúcar, ofrecido a las abejas como alimento, o lo aplicaron tópicamente, por aspersion y en todo el estudio se evaluó el efecto de la aplicación continua o repetida de neem sobre varroa y abejas. Los resultados mostraron disminución del consumo de jarabe con neem por las abejas, mortalidad de larvas de abejas y de hembras de varroa, así como reducción en la fecundidad de este ácaro. Las concentraciones letales de cada forma de aplicación fueron similares para ambas especies, o incluso superiores en varroa.

En un experimento de campo, Whittington *et al.* (2000) probaron tratamientos de neem para el control de varroa, mediante seis aplicaciones por aspersion de extracto oleoso de neem diluido a 5%, con intervalos de cuatro días entre aplicaciones. Observaron aproximadamente 90% de mortalidad de este ácaro, pero la población de las abejas obreras adultas y su cría se redujo aproximadamente 75%, y se observó 50% de mortalidad de reinas.

El aprovechamiento de efectos subletales de plaguicidas vegetales es una opción importante a explorar en el control de varroa. En relación con esto, Colin

*et al.* (1994) desarrollaron un protocolo para la evaluación de repelencia de aceites esenciales para el control de este ectoparásito. Al seguir dicho protocolo, González-Gómez *et al.* (2006) demostraron que extractos de neem repelen a las hembras adultas de varroa y les impiden localizar las pupas de abejas, lo que termina causando la muerte de estos ácaros. En el capítulo I se presentan los resultados de seguimiento, donde concentraciones de 4, 8 y 16% de extracto de neem, equivalentes a 29.04, 58.08, 116.16 mg l<sup>-1</sup> de azadiractina, resultaron efectivas por su efecto repelente sobre varroa. Estos valores representan un punto de partida para definir concentraciones de extracto de neem a aplicar en colmenas; las concentraciones citadas son similares a las aplicadas por Peng *et al.* (2000), quienes usaron entre 6 y 152 mg l<sup>-1</sup> de azadiractina, aunque dichos autores hicieron aplicación continua, mientras que González-Gómez *et al.* (*op. cit.*) hicieron sólo una aplicación.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la efectividad de dos dosis del extracto oleoso de neem, aplicado por aspersion repetidamente en colmenas, para el control de varroa, y determinar los posibles efectos negativos de la aplicación de dicho extracto sobre la condición de las colonias de abejas.

### **3.2. Materiales y métodos**

La evaluación de la efectividad acaricida del extracto oleoso de neem se realizó en una zona de clima templado que correspondió a un apiario situado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en Montecillo, municipio de Texcoco, Estado de México (19°27'57.34" N, 95°54'32.87" W, 2237 msnm).

### **3.2.1. Extracto de neem.**

El aceite crudo se obtuvo de las semillas de neem recolectadas en el Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, en el municipio de Manlio F. Altamirano, Veracruz, en agosto de 2006. El aceite se obtuvo mediante prensado de semilla sin endocarpio, a temperatura menor que 35 °C y con un extractor de acero inoxidable, por aplicación de 1406 kg cm<sup>-2</sup> de presión; el extracto se almacenó a -3 °C hasta su utilización (González-Gómez *et al.*, 2006). Se determinó la concentración de azadiractina del extracto oleoso en el Laboratorio de Alta Tecnología de Orizaba, S. C., en un sistema modular HPLC (certificación ISO-9000 de Perkin Elmer), de acuerdo con la metodología oficial de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (Environmental Protection Agency: EPA) (Schneider y Ermell, 1987).

### **3.2.2. Material biológico y administración del extracto de neem.**

Se utilizó un apiario con 45 colmenas infestadas naturalmente con varroa, de las que se seleccionaron 35, completamente al azar. La unidad experimental quedó conformada por una colonia alojada en una colmena tipo Jumbo (Dadant) de dimensiones estándar, con diez panales en la cámara de cría y sin alzas. Se preparó una suspensión madre formada por extracto oleoso de neem, emulsionante (Tween 20<sup>®</sup>) y agua destilada en proporciones 1:1:1 (peso: peso: peso) y a partir de ella se prepararon las diluciones de 16 y 32% (5.33 y 10.67% del extracto crudo de neem, equivalentes a 10.56 y 21.12 mg l<sup>-1</sup> de azadiractina, respectivamente). En cada colmena se hicieron una, dos o tres aplicaciones de

una de las tres concentraciones con intervalos de cuatro días. Se contó con un control o testigo al que se aplicó agua destilada. Cada tratamiento se hizo con cinco repeticiones, cada una representada por una colmena.

La administración del producto se realizó sobre las caras de todos los panales de cada colmena mediante un aspersor manual con capacidad de 5 L, equipado con una boquilla tipo abanico de acero inoxidable Cat. XR Teejet 80015VS, que se calibró con el propósito de aplicar de 1 a 2 mg cm<sup>-2</sup> (Hassan, 1985) de las diferentes soluciones. Se aplicaron aproximadamente 2.5 g en cada cara de los panales, equivalente a 50 g por colmena. Con esto se trató de aplicar en promedio 1.7 mg cm<sup>-2</sup>, la misma cantidad de solución por unidad de superficie usada por González-Gómez *et al.* (2006).

### **3.2.3. Manejo del apiario.**

La investigación de campo se realizó en las tres etapas que a continuación se describen:

#### **3.2.3.1. Etapa pre-tratamiento**

**3.2.3.1.1. Diagnóstico del estado inicial de las colmenas.** Antes de iniciar con la aplicación de los tratamientos se realizó un reconocimiento del estado general de las colmenas, con la finalidad de evaluar las condiciones en que se encontraban y al mismo tiempo estimar la población de varroa. Se evaluaron las siguientes variables:

#### **3.2.3.1.2. Población de abejas obrera adultas y cantidad de cría operculada.**

Para estimar el número de abejas y la cantidad de cría de una colonia se utilizó el método propuesto por Jeffree (1951), quien presenta un juego de fotografías

de caras de panales sobre los cuales se encuentran cantidades conocidas de obreras adultas (150, 300, 450, 600, 750, 900, 1200, 1500 obreras), y otro juego de fotografías con cantidades conocidas de celdas operculadas (125, 275, 550, 750, 900, 1350, 1550 y 1800 celdas). En el momento de realizar el diagnóstico inicial de cada colonia se tomó una fotografía de la cara de cada panal; éstas se compararon con las fotografías de Jeffre (*op. cit.*) y con ello se estimó la cantidad de obreras adultas y cría operculada de cada cara. Los valores de cada cara se sumaron para obtener la población estimada de adultas y cría por colonia.

**3.2.3.1.3. Presencia de reina.** En el momento de la inspección se confirmó la presencia de la reina, y si no se le pudo observar, se consideró que estaba presente si en la colmena había huevos de reciente postura, los que se reconocen por su posición perpendicular con respecto al fondo de la celda (Winston, 1987). A la presencia de reina en las colmenas experimentales se le asignó un valor de uno y su ausencia un valor de cero.

**3.2.3.1.4. Cantidad de reservas de alimento (miel y polen).** Se estimó visualmente la cantidad de reservas encontradas en cada panal de la colmena; para ello se midió la superficie de los panales ocupada por miel o polen, se sumaron las superficies parciales ocupadas y se expresaron en número de panales o sus fracciones por colmena.

**3.2.3.1.5. Estimación de la caída natural de varroa.** Para determinar el grado de infestación por varroa previo al experimento, en el piso de cada colmena y a través de la piquera se colocó una charola de aluminio de 45 x 30 cm, impregnada con una capa delgada de vaselina sólida blanca y sin olor, para coleccionar y contar las varroas que habían caído en ella, presumiblemente por

muerte natural. Las charolas fueron retiradas todos los días e inmediatamente fueron remplazadas por charolas limpias, para continuar con el recuento de varroas, durante siete días.

Sobre cada charola iba siempre colocada una malla de hierro galvanizado con ocho hilos por pulgada cuadrada y sujeta a un marco de madera con 6 mm de espesor; esta malla tenía la función de evitar que las abejas obreras retiraran a las varroas muertas presentes en las charolas.

### **3.2.3.2. Etapa de tratamiento**

A partir de etapa, para evitar la conducta higiénica de las abejas y tener un mayor control de la cantidad de varroas y abejas muertas, en cada colmena se colocó una charola de aluminio cubierta por malla, como las previamente descritas, también se colocó un reductor de piquera (pieza de malla criba de 8 X 8 cuadros por pulgada cuadrada sujeta a un marco de madera de 2 cm de espesor), con tres orificios en la parte superior, de tamaño suficiente como para que cualquier abeja obrera pudiera entrar y salir; este reductor se colocó en la entrada de la colmena para evitar que las abejas obreras retiraran abejas muertas de la colmena.

### **3.2.3.3. Etapa post-tratamiento**

Al concluir la aplicación de los productos de prueba, fue cuantificada nuevamente la población de abejas obreras adultas, la cantidad de cría operculada, la presencia de reina y la cantidad de reservas de alimento (miel y polen). En todos los casos se siguió el mismo procedimiento que en la etapa pre-tratamiento. Para determinar el número de varroas que sobrevivieron a los productos aplicados, se insertaron dos tiras de Apistan<sup>®</sup> (i. a. fluvalinato) por

colmena, entre los panales 3 y 4, así como los y 6 y 7, donde permanecieron dos semanas, como tratamiento químico. Se registró la caída de varroas cada siete días (durante 14 días), en charolas de aluminio, como se describió previamente.

**3.2.3.4. Determinación de la población total de ácaros y la efectividad de los tratamientos de neem contra varroa.** La población total o nivel de infestación por varroas se obtuvo con la suma de la cantidad de ácaros muertos por efecto de los tratamientos aplicados más el número de ácaros muertos con el tratamiento con Apistan<sup>®</sup>. Para determinar la eficacia de los tratamientos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de eficiencia} = \frac{\text{Núm. de ácaros muertos por tratamiento}}{\text{Total de la población}} \times 100$$

#### **3.2.3.5. Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y posteriormente la prueba de Tukey de comparación múltiple de medias ( $\alpha \leq 0.05$ ), con el apoyo del programa "Statistical Analysis System" (SAS, FOR WINDOWS<sup>™</sup>); para los datos expresados en porcentaje se usó la transformación arco seno.

### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Diagnóstico comparativo del estado de las colmenas pre- contra post-tratamiento.**

En el Cuadro 3.1 se presentan los valores iniciales de población de abejas obreras adultas, cantidad de cría operculada, presencia de reina y cantidad de miel y polen. En ninguna de estas variables se presentó diferencia significativa ( $\alpha \leq 0.05$ ), lo que indicó que las colonias utilizadas en la presente investigación mostraron condiciones similares al inicio del experimento.

Una vez que se aplicaron los tratamientos evaluados, se realizó un análisis para conocer el estado general de cada colonia (Cuadro 3.2). Se observó que las variables fueron significativamente iguales entre las colonias, lo cual incluyó las colmenas control o testigo. Se observó variación de la cantidad de crías operculadas y en las reservas (miel y polen); sin embargo, las variaciones también se observaron en las colonias control o testigo. Fue notable que se perdieran dos reinas; la primera en una colmena que recibió una aplicación de extracto de neem a 16%, la otra, donde recibió tres aplicaciones a 32%.

#### **3.3.2. Efectividad de tratamientos de neem contra varroa**

La efectividad de los extractos oleosos de neem, expresada en porcentaje de mortalidad de varroa, se exhibe en el Cuadro 3.3. Todos los tratamientos evaluados presentaron diferencias significativas con respecto al control o testigo ( $\alpha \leq 0.05$ ) y la efectividad fue proporcional tanto al número de aplicaciones como a la concentración del extracto de neem.

Cuadro 3.1. Estado pre-tratamiento de las colonias experimentales.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE ABEJAS OBRERAS	NÚMERO DE CELDAS CON CRIA OPERCULADA	PRESENCIA DE REINA	NÚMERO DE PANALES LLENOS DE MIEL	NÚMERO DE PANALES LLENOS DE POLEN
<b>Control o testigo</b>	29700 ± 94.87 a	7780 ± 344.09 a	1 ± 0.00 a	2.1 ± 0.24 a	0.225 ± 0.25 a
<b>16% una aplicación</b>	29580 ± 203.47 a	7785 ± 253.80 a	1 ± 0.00 a	2.0 ± 0.27 a	0.200 ± 0.03 a
<b>16% dos aplicaciones</b>	29520 ± 203.47 a	7890 ± 291.29 a	1 ± 0.00 a	1.9 ± 0.10 a	0.200 ± 0.03 a
<b>16% tres aplicaciones</b>	29520 ± 261.53 a	7920 ± 307.35 a	1 ± 0.00 a	1.8 ± 0.12 a	0.175 ± 0.05 a
<b>32% una aplicación</b>	29520 ± 180.00 a	7905 ± 327.05 a	1 ± 0.00 a	1.8 ± 0.12 a	0.200 ± 0.03 a
<b>32% dos aplicaciones</b>	29520 ± 180.00 a	7720 ± 229.73 a	1 ± 0.00 a	2.0 ± 0.27 a	0.200 ± 0.03 a
<b>32% tres aplicaciones</b>	29520 ± 203.47 a	7950 ± 280.85 a	1 ± 0.00 a	1.9 ± 0.10 a	0.200 ± 0.03 a

El hecho de que todos los valores estén seguidos por la letra a indica que no se observó diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ).

Cuadro 3.2. Estado post-tratamiento de las colonias experimentales.

TRATAMIENTO	NÚMERO DE ABEJAS OBRERAS	NÚMERO DE CELDAS CON CRIA OPERCULADA	PRESENCIA DE REINA	NÚMERO DE PANALES LLENOS DE MIEL	NÚMERO DE PANALES LLENOS DE POLEN
<b>CONTROL O TESTIGO</b>	29460 ± 60.00 a	7110 ± 259.04 a	1.0 ± 0.00 a	2.350 ± 0.19 a	0.475 ± 0.03 a
<b>16% una aplicación</b>	29280 ± 203.47 a	7135 ± 283.35 a	0.8 ± 0.20 a	2.200 ± 0.20 a	0.350 ± 0.07 a
<b>16% dos aplicaciones</b>	28980 ± 224.50 a	7280 ± 241.92 a	1.0 ± 0.00 a	2.050 ± 0.50 a	0.325 ± 0.08 a
<b>16% tres aplicaciones</b>	28800 ± 300.00 a	7270 ± 266.39 a	1.0 ± 0.00 a	1.925 ± 0.11 a	0.325 ± 0.08 a
<b>32% una aplicación</b>	28620 ± 180.00 a	7215 ± 249.82 a	1.0 ± 0.00 a	2.100 ± 0.24 a	0.300 ± 0.08 a
<b>32% dos aplicaciones</b>	29040 ± 146.97 a	7020 ± 243.46 a	1.0 ± 0.00 a	1.900 ± 0.10 a	0.350 ± 0.07 a
<b>32% tres aplicaciones</b>	28620 ± 180.00 a	7130 ± 234.04 a	0.8 ± 0.20 a	1.725 ± 0.179 a	0.225 ± 0.05 a

El hecho de que todos los valores estén seguidos por la letra a indica que no se observó diferencia significativa entre tratamientos (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ).

Cuadro 3.3. Efectividad de los tratamientos del extracto oleoso de neem evaluados en colmenas para el control de *Varroa destructor*.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PORCENTAJE DE EFECTIVIDAD</b>	
<b>Control o testigo</b>	8.00 ± 0.07	a
<b>16% una aplicación</b>	50.4 ± 0.93	b
<b>16% dos aplicaciones</b>	73.0 ± 3.06	c
<b>16% tres aplicaciones</b>	72.6 ± 0.54	c
<b>32% una aplicación</b>	68.0 ± 0.84	c
<b>32% dos aplicaciones</b>	79.6 ± 0.12	d
<b>32% tres aplicaciones</b>	85.2 ± 0.25	e

Valores seguidos por diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, ( $\alpha \leq 0.05$ ))

La Figura 3.1 muestra el número de varroas que fueron colectadas en las charolas de aluminio luego de la aplicación del los tratamientos de neem. En todos los casos fue evidente que un día después de cada aplicación se presentó un incremento (pico) en la caída de varroa; los picos fueron menos pronunciados después de la segunda y tercera aplicaciones, lo que se asocia con un descenso en la población total de varroa en las colmenas y resultado de de las aplicaciones.

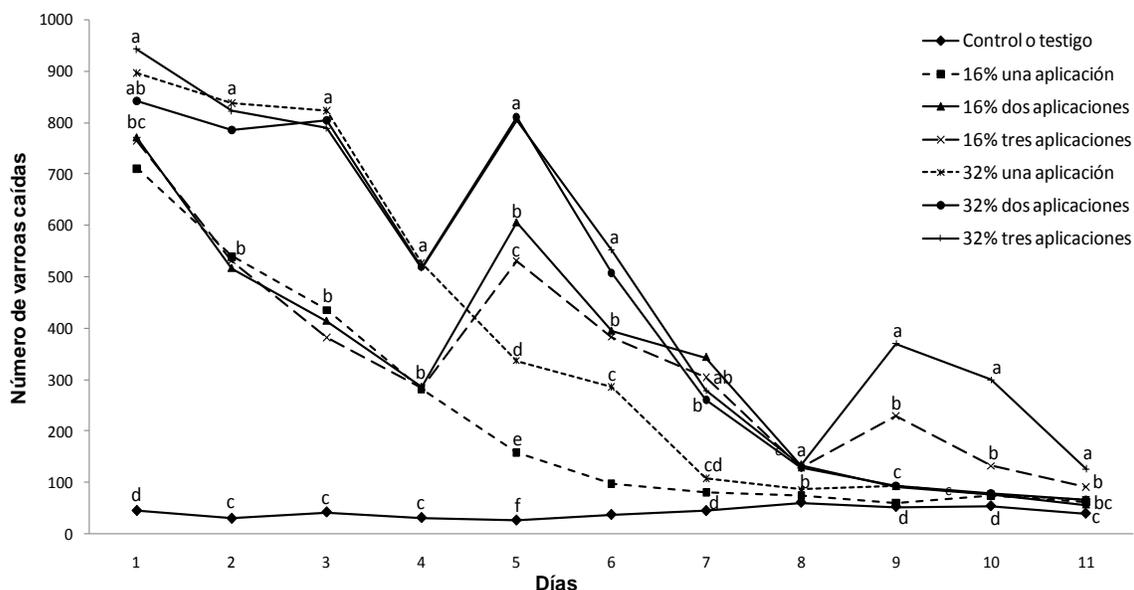


Figura 3.1. Registro diario de la caída de varroa, luego de la aplicación de tratamientos de extractos de neem. Valores en una intersección (días) seguidos por la misma letra, no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha \leq 0.05$ ).

### 3.4. Discusión

En experimentos previos para evaluar la efectividad de extractos de neem o azadiractina purificada para el control de varroa, se obtuvieron resultados poco prometedores, porque se observaron concentraciones letales mayores en varroa que en abejas (Peng *et al.*, 2000), o porque se observó alta mortalidad de obreras o de reinas (Whittington *et al.* 2000). En contraste, en el presente trabajo se registró un porcentaje de efectividad de 85% con tres aplicaciones de extracto de neem al 32% de la suspensión madre (equivalente a  $21.12 \text{ mg l}^{-1}$  de azadiractina). Este resultado supera los niveles de efectividad de tratamientos con ácido fórmico, que normalmente oscilan alrededor de 70% (Feldlaufer *et al.*, 1997). La mortalidad de abejas atribuible a los extractos de neem fue despreciable (excepto por la muerte de dos reinas), lo que contrasta con el 75%

observado por Whittington *et al.* (2000). Por todo esto, el presente trabajo muestra que el neem tiene un potencial considerablemente mayor que el postulado en estudios previos para el control de varroa, cuando se usa directamente en colmenas. Este efecto refleja su alta efectividad y sus reducidos efectos negativos en las abejas. Un factor adicional es su baja toxicidad para mamíferos (Schmutterer, 1990), el cual debe ser tomado en cuenta como carácter positivo.

El trabajo de Peng *et al.* (2000) estuvo dirigido a evaluar los efectos de la aplicación continua de neem sobre las abejas y varroa, básicamente mediante su administración en jarabe de azúcar, ofrecido a las abejas como alimento, por lo que la cantidad de neem ingerida por las abejas se acumuló y llegó a ser muy alta. Por su parte, Whittington *et al.* (2000) aplicaron 400 ml de suspensión de neem por colmena en un total de seis aplicaciones, literalmente empaparon a las abejas y a los panales en cada aplicación, por lo que la perturbación fue intensa y los daños colaterales podrían atribuirse, al menos en parte, al intenso manejo y a la cantidad de líquido aplicado a las colmenas. En el presente trabajo se aplicaron 50 g de suspensión de neem por colmena, en un máximo de tres aplicaciones, lo que significa menos manejo, costos más bajos y menor mortalidad de abejas, tanto obreras como reinas y su cría.

La propuesta de Colin *et al.* (1994) de explotar las propiedades subletales de productos vegetales para el control de varroa encuentra resultados sobresalientes en el presente trabajo. No hay forma de determinar si la mortalidad observada de varroa se deba a toxicidad aguda, a repelencia o a otro efecto en el interior de la colmena, pero el hecho de que se hayan aplicado

concentraciones bajas de extracto de neem, con el soporte dado por González-Gómez *et al.* (2006 y en revisión), hace suponer que la muerte de las varroas se deba a la interferencia del neem en el comportamiento de los ácaros para la localización de larvas de abejas, lo que les impide iniciar ciclos reproductivos y finalmente les causa la muerte. En contraste, los picos de caída de varroas que se observan en la Figura 3.1 sugieren un efecto inmediato, posiblemente de toxicidad.

Un inconveniente del método desarrollado es que la aplicación por aspersión requiere manejo intenso, lo que aumenta los costos de control, así como los riesgos para los apicultores y personas o animales que se encuentren cerca de los apiarios. Colin y Faucon (1984) utilizaron un aparato de pulverización (Phagogen) que emite gotas muy finas a 40°C aproximadamente. Dicho aparato permite aplicar volúmenes bajos de plaguicidas, como el requerido en el presente estudio; las aplicaciones se hacen desde la piquera, por lo que no se necesita abrir las colmenas y se consigue una distribución homogénea de los productos en el interior. Los inconvenientes del Phagogen son su gran tamaño, costo alto y que requiere de suministro eléctrico para operar. Un aspersor térmico portátil llamado Fureto que aplica plaguicidas de manera similar al Phagogen está disponible comercialmente en México; dicho aparato no se probó durante el presente estudio pero es una línea de trabajo que debe seguirse para optimizar la aplicación de neem por aspersión en colmenas.

### 3.5. Conclusiones

El tratamiento de colmenas con extracto oleoso de neem resultó en mortalidad de varroa que se incrementó en relación directa con la concentración y con el número de aplicaciones. El porcentaje máximo de mortalidad de varroa fue obtenido con tres aplicaciones por aspersión de extracto de neem a 32%.

Ninguno de los tratamientos con el extracto de neem evaluados causó reducción en la población de abejas, cría operculada de obreras ni de las reservas de miel y polen. Sin embargo, debido a la pérdida de dos abejas reinas con el tratamiento con 16% de extracto de neem en una aplicación, y con el tratamiento de 32%, en tres aplicaciones, se sugiere corroborar estos resultados en ensayo nuevo.

### 3.6. Literatura citada

Colin, M. E., F. Ciavarella, G. Otero-Colina, y L. P. Belzunces. 1994. A method for characterizing the biological activity of essential oils against *Varroa jacobsoni*. In: Matheson, A. (ed.). New Perspectives on Varroa. International Bee Research Association, Cardiff U. K. pp. 109-114.

Colin, M. y J. Faucon. 1984. El tratamiento de la varroosis con aerosol caliente. Vida Apícola, 12: 29-31.

Feldlaufer, M. F., J.S. Pettis, J.P. Kochansky, y H. Shimanuki. (1997) A gel formulation of formic acid for the control of parasitic mites of honey bees. American Bee Journal 137: 661-662.

- González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez, J. A. Pérez-Amaro, y R. M. Soto-Hernández. 2006. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Agrociencia* 40: 741-751.
- González-Gómez R., G. Otero-Colina, J.A. Villanueva-Jiménez, R. Vandame, C.B. Peña-Valdivia, y J. A. Santizo-Rincón. Repellency of the oily extract of *Azadirachta indica* (Sapindales: Meliaceae) against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* (en revisión).
- Hassan, S. A. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *EPPO Bulletin* 15: 214-255.
- Jeffree, E. P. 1951. A photographic presentation of estimated numbers of honeybees (*Apis mellifera* L.) on combs in 14 x 8 ½ inch frames. *Bee World* 32 (12):89-93.
- Mordue (Luntz), A. J., y A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology* 39(11): 903-924.
- Peng, C. Y. S., S. Trinh, J. E. Lopez, E. C. Mussen, A. Hung, y R. Chuang. 2000. The effects of azadirachtin on the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* and its host honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 39(3-4): 159-168.
- Rodríguez-Dehaibes, S. R., M.J. Moro, y G. Otero-Colina. 1992. *Varroa* found in Mexico. *American Bee Journal* 132 (11): 728-729.

- Rodríguez-Dehaibes, S.R., G. Otero-Colina, V. Pardo-Sedas, y J. A. Villanueva-Jiménez. 2005. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research* 44(3): 124-125.
- Rodríguez-Dehaibes, S. R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez y P. Corcuera. 2010 (en prensa). Susceptibility of *Varroa destructor* (Gamasida: Varroidae) to four pesticides used in three Mexican apicultural regions under two different management systems. *International Journal of Acarology*.
- Ruttner, F. 1983. Varroatosis in honey bees: Extent of infestation and effects. Present status and need: *Proceedings of a Meeting of the EC. Experts' Group Wageningen*. In: R. Cavalloro (Ed.), Commission of the European Communities, A. A. Balkema press, pp. 7-13.
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35: 271-297.
- Schneider, B. H., y K. Ermel. 1987. Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. pp. 161-170. In: Schmutterer, H., y K. R. S. Ascher (eds.), *Proceedings, Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss) and other Tropical Plants*. 3<sup>rd</sup> International Neem Conference, 10-15 July 1986, Nairobi, Kenya. German Agency for Technical Cooperation: Eschborn, Germany.

- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Consultado el 3 de julio de 2010.
- Whittington, R; M. L. Winston, A. P. Melathopoulous, y H. A. Higo. 2000. Evaluation of botanical oils, neem, thymol and canola spray to control *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). American Bee Journal 140:567–572.
- Winston, M. L. 1987. The biology of the honey bee. Harvard University Press Cambridge, Massachusetts, USA. 281p.

## CONCLUSIONES GENERALES

La información que se generó en la presente investigación del extracto oleoso de neem (*A. indica*) como producto alternativo para el control de *V. destructor* y efectos sobre *A. mellifera*, nos permite conocer con un panorama más amplio el potencial que tiene el neem para controlar a esta plaga. Algunos de los datos obtenidos concuerdan con otros autores que han evaluado el neem; sin embargo, otros difieren. Por otra parte, los resultados dan la pauta para establecer las siguientes conclusiones:

La repelencia más alta y estable sobre varroa se obtuvo con las concentraciones 2.64, 5.28, 10.56 y 21.12% del extracto oleoso de neem; la concentración más alta presentó 100% de mortalidad de varroa en 72 h, ya que impidió que 98% de las varroas se posaran sobre pupas de abejas.

El desarrollo de la cría de abejas obreras ante la presencia del extracto oleoso de neem a la concentración más alta, 21.12%, ocasionó 100% de mortalidad a la fase de huevo y larvas de primer ínstar; sin embargo, la susceptibilidad fue mínima a concentraciones menores a 10.56%. Las larvas que alcanzaron el quinto ínstar fueron operculadas y sobrevivieron al tratamiento, pero tuvieron un atraso en el desarrollo de uno a dos días.

Por otra parte, el efecto del extracto oleoso de neem no produjo un efecto negativo en la postura normal de la abeja reina a las concentraciones aplicadas.

La máxima eficacia del extracto oleoso de neem en el control de varroa se registró con tres aplicaciones de la concentración al 10.56% en intervalos de cuatro días por colmena, con valor máximo de 85%. Además, no se observó

reducción en la población de abejas, cría operculada de obreras ni reservas de alimento (miel y polen).

Es prometedora la utilización del extracto oleoso del neem en el control de varroa; sin embargo, se requiere desarrollar un método de aplicación del producto formulado a base del extracto oleoso, que permita una fácil aplicación del producto, que maximice el tiempo empleado por el apicultor y la eficacia en el control de dicho ácaro.