



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

“Efecto del extracto de neem (*Azadirachta indica*) sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de *Varroa destructor*. ”

TESIS

(Idónea Comunicación de Resultados)
Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

P R E S E N T A

ISPA. Celina Tirado Piña

COMITÉ TUTORAL:

Director:

Dr. Héctor Castillo Juárez

Asesores:

Dr. Gabriel Otero Colina
Dra. Laura G. Espinosa Montaña

México, D. F. Septiembre 2010

CONTENIDO	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	4
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4. HIPÓTESIS.....	4
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
5.1. <i>Varroa destructor</i>	5
5.1.1. Origen y antecedentes de <i>Varroa destructor</i>	5
5.1.2. Biología de varroa.....	5
5.1.3. Características morfológicas de varroa.....	6
5.1.4. Ciclo de vida.....	6
5.1.5. Efecto de varroa sobre abejas.....	8
5.2. <i>Neem (Azadirachta indica)</i>	8
5.2.1. Antecedentes.....	8
5.2.2. Ingredientes activos.....	11
5.2.3. Efectos del neem sobre varroa y abejas.....	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
6.1. Extracción de aceite de neem.....	13
6.2. Prueba de repelencia con posibilidad de elección.....	16
6.3. Prueba de letalidad aguda en varroa y abejas.....	20

6.4.	Efecto de exposición del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa.....	22
6.5.	Diseño experimental y análisis estadístico.....	24
7.	RESULTADOS	25
7.1.	Prueba de repelencia con posibilidad de elección.....	25
7.2.	Prueba de toxicidad en varroas.....	27
7.3.	Prueba de toxicidad en abejas.....	29
7.4.	Efecto de exposición del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa.....	30
8.	DISCUSIÓN.....	31
8.1.	Prueba de repelencia con posibilidad de elección.....	31
8.2.	Prueba de toxicidad en varroas.....	33
8.3.	Prueba de toxicidad en abejas.....	33
8.4.	Efecto de exposición del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa.....	34
9.	CONCLUSIONES.....	35
10.	RECOMENDACIONES.....	36
11.	LITERATURA CITADA.....	37
12.	APÉNDICE.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de varroas sobrevivientes en lecturas tomadas a 24 y 48h, consecutivas a la aplicación de diferentes concentraciones de extracto de neem (<i>A. indica</i>).....	28
Cuadro 2. Número de abejas sobrevivientes a las 24h, a diferentes concentraciones de extracto de neem (<i>A. indica</i>).....	29
Cuadro 3. Efecto de concentración en cada uno de los intervalos de tiempo en el valor de repelencia (VR) de <i>Varroa destructor</i> . Prueba de repelencia con posibilidad de elección.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hembra adulta de <i>Varroa destructor</i> vista bajo microscopio compuesto.....	6
Figura 2. Flores del árbol de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	9
Figura 3. Izquierda, frutos maduros de neem; derecha, semillas.....	10
Figura 4.- Molino para separar semillas.....	14
Figura 5.- Zaranda para separación de cascarillas de semillas.....	15
Figura 6. Extractor de aceite de neem. A la izquierda se observan las piezas que componen el extractor (de arriba hacia abajo: émbolo, cilindro, malla, filtro y las dos piezas del receptor de aceite, todo de acero inoxidable). A la derecha se observa cómo debe quedar armado.....	15

Figura 7. Torre de pulverización de Burgerjon.....	19
Figura 8. Fotografía y esquema de la unidad experimental.....	20
Figura 9.- Prueba de toxicidad en varroas.....	21
Figura 10.- Prueba de toxicidad en abejas.....	22
Figura 11. Marco con coordenadas utilizado para tomar con precisión las lecturas de los tratamientos.....	24
Figura 12. Valor de repelencia en las primeras 72 h, correspondientes a diferentes concentraciones de extracto de neem.....	26
Figura 13. Promedio del número de hembras de varroa que se posaron sobre pupas de abejas tratadas (PA) y no tratadas (PB) con extracto de neem, en lecturas tomadas de 0.5 a 72 horas después de la aplicación....	27
Figura 14. Número de descendientes de hembras fundadoras de varroa consecutiva a la aplicación de tratamientos de extracto de neem.	30

RESUMEN

El ácaro *V. destructor* Anderson y Trueman (varroa), causante de la varroasis de las abejas (*Apis mellifera* L.), se considera a nivel mundial como la plaga de mayor importancia en la apicultura; el uso indiscriminado de productos químicos para su control ha generado resistencia en el ácaro. Una opción que se ha estado estudiando es el efecto de extracto de neem, *Azadirachta indica* A. Juss., que ha mostrado tener efectos de repelencia, antialimentarios y alteraciones en el desarrollo de numerosas plagas. Por este motivo se estudió el efecto del extracto oleoso de neem en el control de varroa. La investigación se encaminó a explorar los efectos que causa el neem a varroa, así como una evaluación sobre abejas adultas. En la primera parte de la investigación se extrajo el aceite de neem, posteriormente se realizaron pruebas de repelencia donde se trató a pupas de abejas por aspersión mediante la torre de pulverización de Burgerjon, con concentraciones de 2%, 4%, 8%, 16%, 32% y 64% de la solución madre de neem; se les incubó a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR, y se determinó la capacidad de las varroas para localizar y alimentarse de pupas con o sin tratamiento, en observaciones desde 30 min hasta 7 h. En la segunda parte, en pruebas de toxicidad en varroas y abejas adultas, se aplicaron las mismas concentraciones sobre hembras de varroas y abejas obreras adultas, por aspersión, incubadas a la misma temperatura y HR, provistas de alimento adecuado, y se registró su mortalidad a las 24 y 48 h. En la última etapa se asperjaron larvas de abejas próximas a ser operculadas, con las mismas concentraciones, se esperó a que fueran operculadas por las obreras adultas, se abrieron con mucho cuidado las celdas y se les introdujo una varroa hembra, se cerraron y después se incubaron con las mismas condiciones anteriormente mencionadas, se dejaron desarrollar, se sacaron antes de la emergencia de las abejas adultas, y entonces se contabilizó la descendencia de varroa en cada celda. En pruebas de repelencia, las concentraciones que mostraron el efecto repelente más consistente fueron 2%, 8% y 64%; sin relación directa entre concentración y efecto. En pruebas de toxicidad, la concentración que presentó mayor mortalidad en varroas fue la del

4%, que causó un 50% de mortalidad a las 48 h y fue significativamente diferente del testigo ($P < 0.05$). En toxicidad en abejas ninguna de las concentraciones mostró diferencias significativas contra el testigo a las 48 h. En pruebas de exposición de neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa, todas las concentraciones mostraron diferencias significativas contra el testigo ($P < 0.05$).

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

ABSTRACT

The mite *V. destructor* Anderson and Trueman (varroa), cause of the varroasis of the bees (*mellifera Apis L.*), considers itself at world-wide level like the plague of greater importance in the beekeeping; the indiscriminate chemical agent use for its control has generated resistance in the mite. An option that is had been studying is the effect of extract of neem, *Azadirachta indica* A. Juss., that has shown to have repellency effects, inhibition feeding and alterations in the development of numerous plagues. For this reason the effect of the oily extract of neem in the control of varroa studied. The investigation was directed to explore the effects that neem causes varroa, as well as an evaluation on adult bees. In the first part of the investigation the oil of neem was extracted, later were fulfilled repellency tests where it treated to pupas of bees by aspersion by means of the pulverization tower of Burgerjon, with concentrations of 2%, 4%, 8%, 16%, 32% and 64% of the mother liquor of neem; \pm was incubated to 32 °C and 70 to them \pm 10% HR, and the capacity of varroas was determined to locate and to feed themselves on pupas with or without treatment, in observations from 30 min to 7 h. In the second part, in adult tests of toxicity in varroas and bees, the same concentrations were applied on females of varroas and adult working bees, by aspersion, incubated to the same temperature and HR, provided of adapted food, and its 48 was registered mortality to 24 and h. In the last stage larvae of bees next sprinkled themselves to be offspring, with the same concentrations, was expected to that they were offspring by the adult workers, to open by far well-taken care of the cells and one was introduced to them varroa female, were closed and later they were incubated with the same conditions previously mentioned, were let develop, they removed before the emergency of the adult bees, and then the descendants of varroa in each cell were entered. In repellency tests, the concentrations

that showed the more consistent repulsive effect were 2%, 8% and 64%; without direct relation between concentration and effect. In toxicity tests, the concentration that presented/displayed major mortality in varroas was the one of 4%, that caused a 50% of mortality to 48 h and was significantly different from witness ($P<0.05$). In toxicity in bees no of the concentrations showed significant differences against the witness 48 h. In tests of exhibition of neem on the survival, reproduction and development of varroa, all the concentrations showed significant differences against witness ($P<0.05$).

DEDICATORIAS

A mi padre quien ha sido un gran ejemplo en mi vida, por estar a mí lado siempre en las buenas y malas, por su orientación, paciencia y por todos su consejos de vida, con todo mi cariño y admiración para ti **papito**.

A mi madre por su gran amor, por apoyarme, orientarme y por creer en mí, con todo mi cariño y respeto **mami**.

A mis queridos hermanos, por tenerme paciencia, por la confianza que existe entre nosotros, por soportar mi ausencia, por apoyarme, los quiero con toda mi alma y no pude tener mejores hermanos que ustedes: **Dora Luz, Abigail y José Javier**.

A todos mis maestros que contribuyeron a mi formación profesional, en especial al Dr. Gabriel Otero Colina, que me apoyó sin dudar de mí y quien me alentó a seguir y terminar este trabajo, cuando más necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud, fortaleza y entusiasmo para terminar este trabajo.

A la UAM Xochimilco, por haberme otorgado la oportunidad de estudiar en su casa.

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

Al Colegio de Postgraduados por permitirme trabajar en sus instalaciones y por ser una institución donde conocí personas que formaron parte de mi preparación como Maestra en Ciencias.

A los integrantes de mi Comité Tutorial: PhD. Héctor Castillo Juárez, Dr. Gabriel Otero Colina, Dra. Laura Guadalupe Espinosa Montaña, por sus acertadas observaciones, correcciones, sugerencias, valioso apoyo a esta investigación, por formar parte de mi preparación, por su amistad y paciencia.

Un especial agradecimiento a Edmundo, quien soporto mis innumerables malos ratos y que sin importar estuvo alentándome a seguir adelante.

A mis amigos de generación, Bety, Miriam, Xoch y Jorge, quienes me apoyaron y me dieron ánimos de seguir adelante.

A mis compañeros del COLPOS, Rebeca, Marilú y Nacho quien me apoyo en toda la metodología de mi tesis, de corazón gracias.

A todas las personas que estuvieron involucradas en mí formación académica y la culminación de una de mis etapas de mi vida.

Mil Gracias por estar en las buenas y malas...

1. INTRODUCCIÓN

La apicultura genera una importante cantidad de empleos y es la tercera fuente captadora de divisas del subsector ganadero, lo que evidencia su importancia dentro de la ganadería nacional. (Ortega y Ochoa, 2004). Esta actividad es fundamental para el mantenimiento de los ecosistemas y para el incremento de la productividad agrícola por la polinización de cultivos; alrededor de un 85% de esta polinización es llevada a cabo por la abeja melífera *Apis mellifera* L. (Ortega y Ochoa, 2004). Como otros animales domésticos, la abeja también sufre diversas enfermedades, la más importante y que representa pérdidas económicas para los apicultores de todo el mundo es la varroasis, causada por *Varroa destructor* (Anderson y Trueman, 2000., Sammataro *et al.*, 2000).

El ácaro *Varroa destructor* (al que en lo sucesivo se le llamará varroa, excepto donde se discute acerca de su origen y taxonomía) se introdujo a México alrededor de 1990 (Rodríguez *et al.*, 1992) y es el principal problema parasitario de la apicultura a nivel nacional y mundial. Esta parasitosis afecta a larvas y adultos de obreras y zánganos, a las que succiona la hemolinfa, ocasionándoles deformaciones en alas, patas y abdomen y predisponiéndolas a otras enfermedades (Moretto *et al.*, 1993).

El uso indiscriminado de productos químicos para controlar la varroasis ha favorecido la aparición de resistencia en muchos países (Thompson *et al.*, 2002). En México, las colonias infestadas con este ácaro son tratadas con productos químicos de síntesis, principalmente piretroides, entre los que podemos mencionar en especial Apistan® (fluvalinato) y Bayvarol® (flumetrina) (Otero-Colina, 2000). Aunque éstos tienen una alta eficacia y permiten un control adecuado, hay estudios que determinaron que algunas poblaciones del ácaro varroa ha desarrollado resistencia hacia ellos (Rodríguez-Dehaibes *et al.*, 2005).



Investigadores y apicultores de Italia y Francia han trabajado con métodos de control a base de moléculas naturales para el control de varroa, en particular con el empleo de ácido fórmico, ácido oxálico y timol, que tienen las ventajas de no contaminar la miel y tener un costo muy bajo; a este conjunto de métodos le llaman control alternativo (Vandame, 2000).

Los productos naturales de origen vegetal revisten gran importancia en la actualidad para el manejo de plagas; tal es el caso del árbol del neem *Azadirachta indica* A. Juss (*Meliaceae*), del cual se extrae gran diversidad de compuestos secundarios; de ellos la azadiractina es el de mayor importancia pues actúa como repelente, antialimentario y retarda el crecimiento de los insectos, entre otros efectos (Schmutterer, 1990; Mordue y Blackwell, 1993).

Las semillas de neem contienen componentes que controlan alrededor de 100 especies de insectos, ácaros, nemátodos y plagas de vegetales; sus principales formulaciones son extracto acuoso, aceite y polvo de semilla de neem (Lale y Abdulrahman, 1998). Debido a las características antes descritas, el árbol de neem adquirió gran importancia en los últimos 30 años; el principal motivo de su introducción a México y América Latina fue su utilización en el control de plagas agrícolas (Ramos, 2002).

De acuerdo con González-Gómez *et al.* (2006), un extracto de neem a concentración de 1.33% causó repelencia en varroa que llevó a la muerte de este ácaro por inanición, mientras que Sánchez (2006) determinó los efectos que extractos de neem causaron en el desarrollo de larvas de abejas y en su aceptación por parte de las obreras nodrizas. La concentración de 1.33% no causó efectos negativos en el desarrollo de las larvas de abejas, las que fueron aceptadas, alimentadas y operculadas por las obreras nodrizas. Por lo anterior se sugiere que el neem puede ser usado en colmenas para el control de varroa sin que cause daños importantes a las abejas; sin embargo es importante determinar los mecanismos de acción del neem y profundizar más sobre su efecto en el ácaro.



Los efectos subletales pueden ser útiles en el control de varroa; cualquier efecto en este ácaro que afecte su capacidad para encontrar a su huésped podría tener un valor práctico y de importancia para su control. Colin *et al.* (1994) desarrollaron un protocolo para evaluar los efectos subletales de aceites esenciales para controlar parásitos de las abejas.

En este trabajo se evaluó la repelencia y toxicidad del aceite del neem cosecha 2009, y sus efectos sobre la reproducción, supervivencia y desarrollo de varroa.



2. OBJETIVO GENERAL

2.1. Determinar la toxicidad aguda, la repelencia y las alteraciones en la fecundidad y el desarrollo de varroa causadas por neem (*Azadirachta indica*) de cosecha 2009, cuando es aplicado directamente sobre estos ácaros y cuando es aplicado en obreras que luego estos ácaros parasitan.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1. Evaluar la repelencia del aceite del neem en diferentes concentraciones sobre varroa, cuando el aceite es aplicado a pupas de abejas.

3.2. Evaluar la toxicidad aguda del neem sobre varroa.

3.3. Evaluar los efectos del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa, cuando este producto es aplicado sobre larvas de abejas próximas a ser operculadas y por lo tanto el ácaro es forzado a tomar contacto con él.

4. HIPÓTESIS

4.1. Existe repelencia del aceite de neem hacia varroa, la cual es directamente proporcional a la concentración de los extractos.

4.2. El aceite de neem es tóxico para el ácaro varroa.

4.3. El extracto del neem afecta la reproducción, supervivencia y desarrollo de varroa, cuando las pupas que le sirven como alimento son tratadas con dicho extracto.



5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. *Varroa destructor*

5.1.1. Origen y antecedentes de varroa

La varroasis es la principal parasitosis de las abejas, pues causa grandes pérdidas económicas en la apicultura. Ácaros del género *Varroa* y de especie indefinida fueron descubiertos en la isla de Java por Edward Jacobson y después descritos por Oudemans en 1904; se le llamó *Varroa jacobsoni* Oudemans, que parasitaba a su hospedante natural *Apis cerana*, hasta que Anderson y Trueman (2000) descubrieron que en realidad se trataba de por lo menos dos especies (*V. jacobsoni* y *V. destructor*). La última de ellas adquirió la capacidad de parasitar a la abeja occidental *Apis mellifera* y a partir de entonces se distribuyó rápidamente en gran parte del mundo (Oldroyd, 1999). Esta especie en un principio se confundió con *V. jacobsoni*. En 1999 *V. destructor* se distribuía en la mayoría de los países donde se practicaba la apicultura, con excepción de algunas partes de África, Hawaii y Australia (Rinderer *et al.*, 2001). Actualmente varroa se distribuye en todo el mundo (De Elis y Munn, 2005).

El ácaro *V. destructor* es considerado en la actualidad una plaga de gran importancia de *A. mellifera* ya que su presencia ha provocado muerte en muchas colonias de varias partes del mundo (Martin, 1998); estos daños se deben principalmente a que el comportamiento de defensa de *A. mellifera* contra *V. destructor* está menos desarrollado que el de *A. cerana* contra *V. jacobsoni* (Moretto y Leonidas, 2003).

5.1.2. Biología de varroa

Varroa afecta tanto a la cría como a las abejas adultas; prefiere a los zánganos pero puede también parasitar a las obreras. Las reinas son prácticamente inmunes (Santillán-Galicia *et al.*, 2002). En su ciclo de vida tiene dos fases, una forética y



otra reproductiva (Steiner, 1986); el ácaro adulto y todas sus etapas de desarrollo parasitan tanto a crías de obreras como de zánganos, alimentándose de su hemolinfa. Abejas adultas parasitadas por sólo un ácaro sufren una reducción de longevidad de hasta 50% (De Jong *et al.*, 1982). Las pupas parasitadas por cinco o más ácaros sufren pérdida de peso y posibles deformaciones (Henderson *et al.*, 1986).

5.1.3. Características morfológicas de varroa

La hembra adulta es de color marrón o café rojiza, de forma ovalada y plana (Fig. 1). Sus dimensiones son de 1 mm de largo por 1.6 mm de ancho. Los machos son de color pálido aperlado, miden 0.7 mm por 0.7 mm (Ifantidis, 1983).

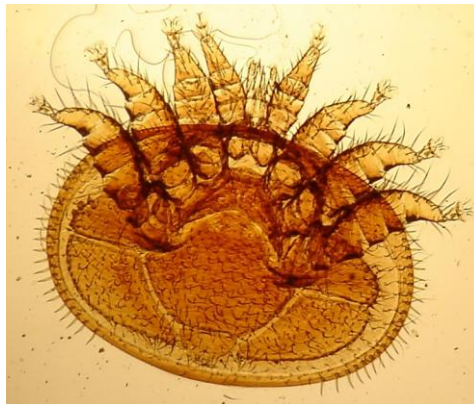


Figura 1. Hembra adulta de *Varroa destructor* vista bajo microscopio compuesto.

5.1.4. Ciclo de vida

Estos ácaros prefieren a la cría de zánganos para su reproducción, por el tiempo de operculación que es mayor que el de las obreras (Martin, 1994); sin embargo, cuando no existen zánganos parasitan obreras. La hembras adultas empiezan el ciclo de reproducción cuando entran en una celda que contiene una larva de obrera o de zángano con 5 a 5.5 días de edad; más de una hembra adulta podría



entrar en una celda (Henderson *et al.*, 1986). Una vez en el interior, la hembra adulta se sumerge en el alimento de la larva acumulado en el fondo de la celda; aquí sólo consume restos de ese alimento. Cuando la celda es operculada y el alimento es consumido por la abeja inmadura, el ácaro comienza a alimentarse de la hemolinfa de la pupa o larva de obrera o zángano en desarrollo (De Jong *et al.* 1982). Una hembra pone su primer huevo a las 60 h después que la celda fue operculada y los subsecuentes cada 30 h; el primer huevo da origen a un macho y los subsecuentes a hembras (Martin, 1994).

Después de eclosionar del huevo, un ácaro pasa por los estadios de protoninfa y deutoninfa, antes de ser adulto. El tiempo de desarrollo de un huevo a un adulto es diferente de macho a hembra; 5.5 y 7.5 días, respectivamente. La duración de los estadios es 1.5 días como huevo, 1.5 a 2.5 días como protoninfa, y 3 a 3.5 días como deutoninfa (Martin, 1998).

Si sólo entró una hembra adulta (fundadora) a la celda, las hembras hijas serán fecundadas por el único macho disponible, que es su hermano. Pero si entraron dos o más hembras fundadoras, sus hijas se podrán aparear con cualquiera de los machos disponibles en la celda. Cuando las abejas adultas emergen de sus celdas liberan a las hembras adultas de ácaros que había dentro de las celdas, mientras que los machos y todas las hembras que no completaron su desarrollo mueren. El contacto entre abejas permite la infestación de nuevos hospederos.

Los machos tienen un aparato bucal adaptado a la transferencia del esperma, o espermadáctilo, que limita su capacidad para perforar la cutícula de las pupas de abejas para alimentarse; sin embargo, se pueden alimentar de la hemolinfa de las abejas a través de los orificios que dejan las varroas hembras (Donzé y Guerin, 1994).

Fuera de la celda las hembras de varroa llevan a cabo su fase forética; una vez que estos ácaros salen de las celdas, se desplazan por si mismos y suben al cuerpo de las abejas adultas, donde ubican la unión de los segmentos



abdominales; esto porque de ahí se alimentan por ser una membrana suave (De Jong, 1990).

5.1.5. Efecto de varroa sobre abejas

Varroa causa distintos tipos de daño a las abejas; tanto la hembra fundadora como su descendencia perforan la cutícula de las prepupas y pupas de las abejas para absorber su hemolinfa. Con ello les causan deformaciones en alas, patas y abdomen, y las predisponen a otras enfermedades (Moretto y Leonidas, 2003).

Las hembras de varroa se pueden alimentar de abejas adultas pero los daños principales lo hacen a las crías en sus celdas operculadas, pues dentro de las celdas ocurren la reproducción y el desarrollo de los estadios inmaduros de varroa (Moretto y Leonidas, 2003).

Las abejas que fueron parasitadas durante su etapa de pupa normalmente sobreviven, aunque estén débiles y su longevidad se reduzca. Cuando una celdilla contiene más de un ácaro, aparecen daños visibles en las abejas adultas, como alas malformadas y abdómenes más pequeños, así como pérdida de peso corporal (De Jong *et al.* 1982). El daño acumulado a lo largo de varios años y las poblaciones crecientes de varroa causan una alta mortalidad en las abejas y

5.2. Neem (*Azadirachta indica*)

5.2.1. Antecedentes

Algunos insecticidas sintéticos usados los últimos 40 años en ambientes agrícola, forestal y doméstico no han cumplido los requerimientos para un manejo integrado de plagas; por esta razón, el problema de resistencia a pesticidas se ha incrementado y por otro lado ha crecido el interés por el desarrollo de insecticidas botánicos. En los últimos 20 años se han estudiado extractos y componentes del



árbol de neem (*Azadirachta indica*), el cual tiene una especial atracción para entomólogos alrededor del mundo (Schmutterer, 1990).

El neem es originario de la India, es una de las fuentes más ricas de metabolitos secundarios en la naturaleza. Pertenece a la familia de las meliáceas (Fig. 2); es originario del sur y sureste de Asia, pero hoy también se produce en áreas tropicales y subtropicales de África, América y Australia. En los últimos años ha sido introducido en algunas ciudades, principalmente para reforestación y producción de madera en áreas secas, pero también como árbol de sombra en avenidas y para producción de insecticidas naturales (Schmutterer, 1990).



Figura 2. Flores del árbol de *Azadirachta indica* A. Juss.

El neem o margosa, también llamado lila, es un árbol de hojas perennes, de rápido crecimiento que puede alcanzar alturas hasta de 25 metros; crece principalmente en climas donde la precipitación anual oscila entre los 400 y 800 mm, y hay una estación seca. El neem también puede tolerar severas sequías y superficies pobres, incluso suelos salinos (Schmutterer, 1990).



Los frutos del neem son la fuente más importante de los ingredientes que afectan a insectos; estos frutos sólo se producen una vez al año y en ocasiones dos, son ovalados, de un largo aproximado de 1.4-2.4 cm, cuando están maduros su color es amarillento y el grano café (Fig. 3). Es importante mencionar que las hojas también pueden ser usadas para el control de insectos (Schmutterer, 1990).



Figura 3. Izquierda; frutos maduros de neem, derecha; semillas.

En los últimos años se han dado avances en investigaciones sobre la parte química del neem; asimismo, se ha logrado un progreso considerable en el conocimiento de la actividad biológica y las aplicaciones medicinales de esta planta, a la que se le considera una valiosa fuente de productos naturales únicos para el desarrollo de medicinas contra varias enfermedades y también para productos industriales como bioinsecticidas, jabones y pastas dentales, entre otros (Biswas *et al.*, 2002).

En estudios preliminares llevados a cabo por Naumann e Isman (1996), se determinó el efecto de productos a base de neem como bioinsecticidas en larvas de abejas. Éstas son difíciles de manipular y mantener fuera de sus celdas, porque son dependientes de las adultas nodrizas para su cuidado y alimentación; por lo tanto, aplicaron neem directamente a las larvas en sus nidos y examinaron el porcentaje de mortalidad de las larvas causado por diferentes dosis de neem,



así como los efectos sobre longevidad de las sobrevivientes a la edad adulta. En dichos estudios no se encontraron efectos significativos sobre mortalidad de larvas ni deformaciones.

En México se ha probado que el neem es efectivo contra plagas como la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). El efecto que causa en esta plaga es antialimentario y de repelencia, así como la inhibición de su oviposición y muda (Rodríguez, 1998).

5.2.2. Ingredientes activos

Aunque el neem tiene varios principios activos que explican sus efectos sobre insectos, el de mayor importancia es la azadiractina (AZ). Ésta se encuentra en las semillas del neem; sin embargo, la cantidad de este componente puede variar considerablemente por el ambiente y posibles razones genéticas. El mayor rendimiento que se ha obtenido fue de 10 g/kg de semillas (Schmutterer, 1990). La azadiractina puede servir como antialimentario, antioviposicional, regulador del crecimiento, reductor de la fecundidad, y causa trastornos en el crecimiento y reducción de salud en insectos (Schmutterer, 1990). La azadiractina es un terpenoide, su primera fórmula estructural fue hecha en 1972 (Kraus y Page, 1995). La azadiractina está formada por un grupo de isómeros estrechamente relacionados denominados de la A a la G (AZ A a G). AZ A es el componente más importante en términos de cantidad de extracto de neem de semillas, pero AZ E es valorado como el más efectivo en la regulación del crecimiento de insectos (Schmutterer, 1990).

El aceite de neem podría clasificarse como ácido farmacéutico, también puede ser utilizado en el tratamiento de niños que sufren deficiencias nutricionales, como cicatrizante de heridas, en cosméticos y plaguicidas, entre otros. La mayoría de los ácidos grasos del neem poseen una notable actividad frente a bacterias y virus (Gosse *et al.*, 2005).



5.2.3. Efectos del neem sobre varroa y abejas

Investigaciones realizadas por Peng *et al.* (2000) presentan avances del efecto del neem sobre varroa. Mediante la aplicación de extracto de neem adicionado a jarabe de azúcar y administrado a las abejas como alimento, se alcanzó entre 50% y 90% de mortalidad de varroa. En el mismo trabajo se observó que una aplicación tópica de 0.5 μ L de azadiractina entre 100 y 500 ppm (intervalo de concentraciones para aplicar en campo contra insectos fitófagos) al cuarto ínstar larval, no afectó el desarrollo de la abeja.

Por su parte, Schenk *et al.* (2001) mencionan que las abejas adultas son relativamente inmunes al neem, por lo que los tratamientos con este producto para el control de parásitos y patógenos de abejas pueden ser explorados. Por su parte, Whittington *et al.* (2000) mencionan que los tratamientos con neem deben ser modificados en su temporada de aplicación debido a que encontraron cierta mortalidad de la cría y pérdida de reinas en sus ensayos.

Naumann e Isman (1996), en una investigación sobre los efectos tóxicos de insecticidas a base de neem sobre larvas de abejas, cuando aplicaron un producto rico en azadiractina, con 5 ppm del producto, no observaron deformaciones en pupas ni adultos.

Otro estudio de importancia es el de González-Gómez *et al.* (2006), quienes determinaron que el extracto de neem tiene la capacidad de repeler a las varroas a grado tal que al parecer les causa la muerte por inanición. Por esta razón es de gran importancia seguir evaluando sus efectos.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, así como en el apiario localizado en dicho Campus. Para efectos de trabajo, el estudio se dividió en cuatro etapas que se muestran a continuación:

- Extracción de aceite de neem
- Prueba de repelencia de neem sobre varroa con elección
- Toxicidad aguda de neem sobre varroa
- Efecto del neem sobre la reproducción y el desarrollo de varroa.

6.1. Extracción de aceite de neem

Se extrajo aceite de semillas de neem cosechadas en julio y agosto de 2009, en una plantación establecida en el Colegio de Postgraduados, el cual está ubicado en el municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz. El primer paso fue recolectar toda la fruta madura posible, la que se dejó fermentar durante 20 a 30 días; luego se despulpó la fruta para recuperar la semilla, mediante un arnero o cernidor, donde a través de un tallado y abundante agua se eliminó la pulpa. Luego del despulpe se dejó secar la semilla ya limpia en un lugar sombreado y seco durante 25 días. El siguiente paso fue descascarillar la semilla con ayuda de un molino (Fig. 4), ya que el material útil es la semilla y no la cascarilla (endocarpio); la cascarilla se eliminó mediante un aparato de aire zaranda (Fig. 5) y se recuperaron 6.3 kg de semilla sin endocarpio.

Para finalizar la primera etapa, la extracción de aceite de semillas de neem se realizó con un extractor de acero inoxidable con forma de cilindro, dentro del cual



se pone la semilla molida y se le oprime con ayuda de una prensa hidráulica por un émbolo del mismo material, para después recuperar el aceite extraído en un recipiente con ayuda de un embudo (Fig. 6). Se procuró que el recipiente fuera oscuro y permaneciera fresco para evitar la degradación del aceite; para esto se tapó con papel aluminio y se introdujo dentro de otro recipiente más grande con agua tratando de mantener el aceite lo más fresco posible.



Figura 4. Molino para separar semillas.





Figura 5. Zaranda para separación de cascarillas de semillas.

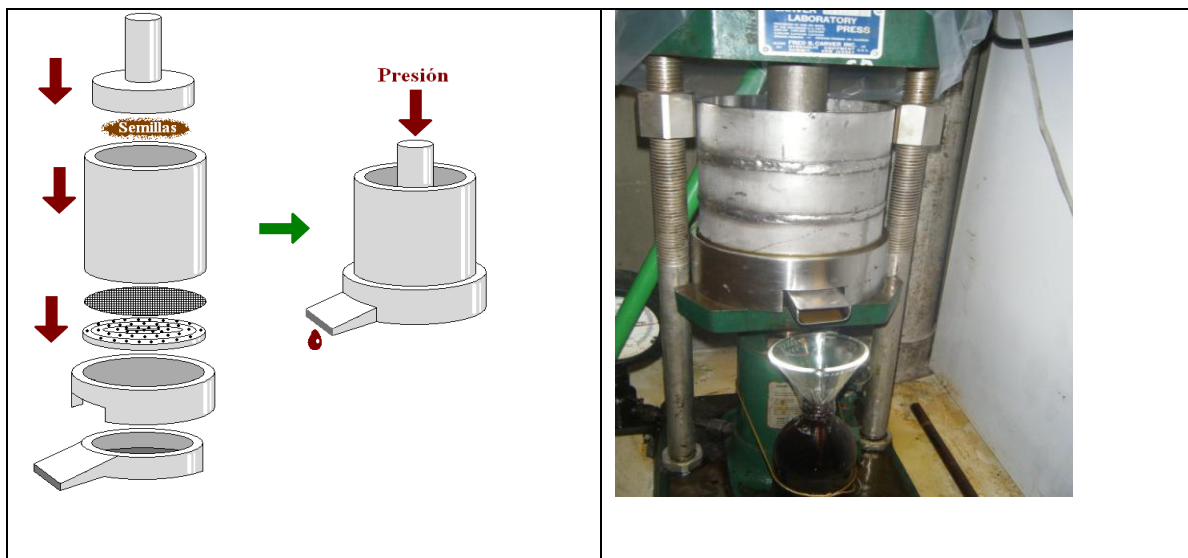


Figura 6. Extractor de aceite de neem. A la izquierda se observan las piezas que componen el extractor (de arriba hacia abajo: émbolo, cilindro, malla, filtro y las dos piezas del receptor de aceite, todo de acero inoxidable). A la derecha se observa cómo debe quedar armado.



Una vez que se obtuvo el aceite puro, se hizo una suspensión con agua destilada y Tween 20[®] como coadyuvante (emulsionante) en proporciones de 1:1:1 (peso: peso: peso), a la que se le llamó suspensión madre de neem. De esta suspensión se extrajeron alícuotas para hacer las diluciones a 2%, 4%, 8%, 16%, 32% y 64% de neem necesarias para los bioensayos.

6.2. Prueba de repelencia con posibilidad de elección

Estos bioensayos se hicieron con el objetivo de determinar si los extractos de neem de la cosecha 2009 conservaban las propiedades de repelencia detectadas por González-Gómez (2005) y confirmadas por Sánchez (2006), por lo que se siguió básicamente el mismo método empleado en dichos estudios, como se describe a continuación.

Para disponer de los ejemplares de varroa necesarios para los bioensayos (hembras adultas), se realizaron trabajos de campo para coleccionar en forma rápida a estos ácaros en colmenas infestadas. Para ello se seleccionaron colonias “fuertes”, con seis o más panales cubiertos con cría operculada; en cada una de ellas, a manera de trampa, se colocó un panal con cera estampada con celdas del tamaño de la cría de machos (zánganos), de manera que la reina se viera estimulada a poner huevos no fecundados que resultaran en zánganos, los cuales son preferidos por varroa para parasitarlos (Maul, 1983). Las colmenas que se eligieron para ello fueron alimentadas con jarabe de azúcar en concentración 2:1 (azúcar: agua), para simular la entrada de néctar y estimular la ovipostura por parte de la reina. Cuando las abejas obreras habían sellado con cera (operculado) las celdas que contenían las larvas maduras de zánganos, los panales fueron retirados de las colmenas e incubados a 31°C y 50-70% de humedad relativa, luego de lo cual las celdas operculadas fueron abiertas cuidadosamente después de ocho a nueve días, para coleccionar a las hembras adultas de varroa que se usaron en los bioensayos.



Los ejemplares de varroa que se colectaron fueron confinados en cajas Petri en cuyas tapas había orificios de ventilación cubiertos con malla, para prevenir su escape. Se les proporcionaron pupas de zánganos como alimento y se les mantuvo a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ y 40-60% de humedad relativa, por un máximo de 24 h antes de la realización de los bioensayos. Para designar a las 10 varroas que se usaron en dichos bioensayos se llevó a cabo una selección al azar de la siguiente manera: se dibujó una cuadrícula enumerada por debajo de la caja Petri que contenía a las varroas previamente colectadas, se seleccionó al azar un número que correspondiera con uno de los cuadrantes enumerados debajo de la caja Petri y se extrajeron las varroas de esa zona hasta completar las 10 necesarias para cada unidad experimental.

Se aplicó extracto de neem a pupas de abejas de tres a cinco días de edad (de ojos rosa a ojos morados), por aspersion, en diluciones de 2%, 4%, 8%, 16%, 32% y 64%, más un testigo al que se aplicó agua destilada. Se utilizó el método de aspersion mediante una torre de nebulización de Burgerjon (1956) (Fig. 7) con el fin de que la aspersion sobre las pupas fuera lo más uniforme posible. La torre de Burgerjon funciona con un compresor de aire que ayuda a la nebulización del producto en gotas de $15 \mu\text{m}$ de diámetro, aproximadamente, según el tipo de boquilla. La torre se calibró con el propósito de aplicar de 1 a 2 mg/cm^2 de las suspensiones, cantidad que recomienda la Organización Internacional de Control Biológico (Hassan, 1985); lo anterior se logró con la aplicación de 15 mL de la solución a una presión de 10 Lb/pulgada^2 ó 0.703 kg/cm^2 , y después se dejó un minuto más para permitir la sedimentación del producto sobre las pupas.

Las pupas tratadas fueron colocadas inmediatamente después en arenas de observación preparadas con cajas Petri de plástico de 8 cm de diámetro, con tapa provista de un orificio de ventilación. Cada caja estaba dividida en dos zonas principales (A y B), y cada zona formada por tres subdivisiones (a, b y c) (Fig. 8); la zona cero correspondió al centro de la caja, en la cual se colocaron 10 hembras de varroa, mientras que en los extremos de la caja, zonas (Ac y Bc) se colocaron



tres pupas de abejas obreras (cuerpo blanco y ojos de rosa a morados), en cada una, como se muestra en la Figura 8. Sólo las pupas colocadas en la zona Ac habían sido tratadas previamente por aspersión de 15 mL de las concentraciones antes mencionadas. Se hicieron cuatro repeticiones por tratamiento y se tomaron cuatro lecturas de la ubicación de los ácaros a 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h después de la aspersión con extracto de neem; en ellas se cuantificó la tendencia de dichos ácaros a desplazarse de una zona a otra. El bioensayo realizado corresponde a la prueba de repelencia con posibilidad de elección, de acuerdo con el método propuesto por Colin *et al.* (1994) y retomado por González-Gómez *et al.* (2006).

Para determinar numéricamente si existió repelencia o atracción por los extractos, se usó la siguiente fórmula (Colin *et al.*, 1994):

$$VR = 100 + \{(Ba + 2Bb + 3Bc + 4Pb) - (Aa + 2Ab + 3Ac + 4Pa)\} 10/S$$

Donde:

VR = Valor de repelencia

Aa = número de ácaros sobre la zona Aa

Ab = número de ácaros sobre la zona Ab

Ac = número de ácaros sobre la zona Ac

Pa = número de ácaros sobre las pupas del lado A (tratadas)

Ba = número de ácaros sobre las zona Ba

Bb = número de ácaros sobre las zona Bb

Bc = número de ácaros sobre las zona Bc

Pb = número de ácaros sobre las pupas del lado B (no tratadas)

S = número de ácaros sobrevivientes al momento de la observación



La citada notación da un valor promedio superior a la posición de un parásito sobre una pupa (x 4) o en inmediata proximidad (x 3), en contraste con una posición más alejada de las pupas o más central (x 2 ó x 1). Si todas las varroas permanecen sobre la zona del centro o hay un reparto equitativo sobre ambas zonas, los valores de A se contrarrestan con los de B. Si todos los ácaros permanecen sobre las pupas de la zona B, los valores de A serán de cero y los de B serán de 40. El número 100 tiene por función desplazar el origen y facilitar el análisis estadístico; entonces, los valores fluctúan entre 60 y 140; es decir, desde una fuerte atracción hasta una total repelencia, respectivamente. El factor $10/S$ sirve para compensar la mortalidad de los ácaros al momento de la observación.



Figura 7. Torre de pulverización de Burgerjon



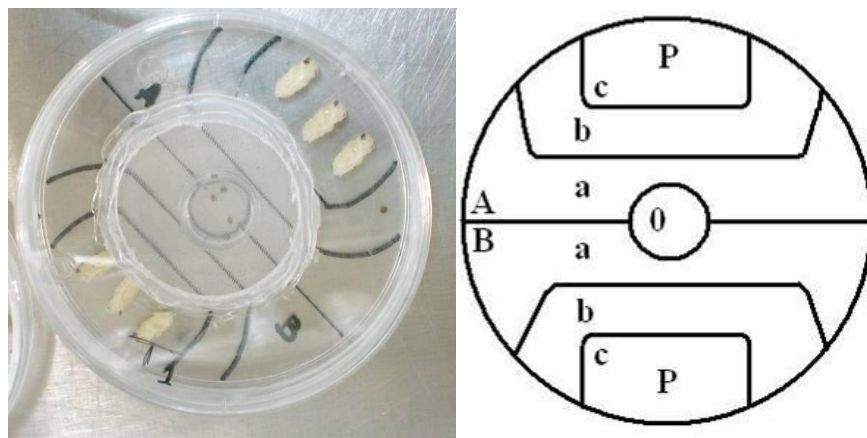


Figura 8. Fotografía y esquema de la unidad experimental.

Como variable de respuesta en la prueba de repelencia con posibilidad de elección se usaron los valores o índices de repelencia, calculados como se explicó arriba, correspondientes a las lecturas tomadas a 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 y 72 h. Estos valores se compararon mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey bajo un diseño completamente al azar. Asimismo, se contabilizó el número de varroas encontradas sobre las pupas tratadas (lado A) tanto en los tratamientos como en el testigo, con el fin de confirmar la repelencia, para después realizar un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey.

6.3. Prueba de letalidad aguda en varroa y abejas

Se colectaron hembras adultas de varroa por el método de panal trampa con cera estampada con celdas “zanganeras” como se describió arriba. A partir de la suspensión madre de neem se prepararon diluciones 2%, 4%, 8%, 16%, 32% y 64%. Para la aplicación en varroa, grupos de 10 hembras adultas se colocaron en una caja Petri (14 cm diámetro) con el fondo cubierto con un círculo de papel filtro, y enseguida se les aplicaron las suspensiones por aspersion mediante la torre de



pulverización de Burgerjon. Al terminar la aplicación se transfirieron las varroas a cajas Petri (8 cm de diámetro) tratadas con una capa de fluón (politetrafluoro etileno) en las paredes laterales, para impedir que escaparan. Luego se adicionaron pupas de abejas de ojos rosas a violeta como alimento, y se les incubó a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR. Paralelamente a los tratamientos hubo grupos testigo, a los que se aplicó agua destilada.

Para la prueba de toxicidad aguda en abejas, se colectaron abejas adultas sacudiendo los panales. Las abejas, antes de la pulverización, se anestesiaron con CO_2 durante 15 segundos. Se seleccionaron grupos de 30 obreras adultas, y se aplicaron los mismos tratamientos que con los ácaros. Enseguida las abejas fueron transferidas a jaulas de madera y malla de hierro galvanizado, de $15 \times 15 \times 15$ cm (Fig. 10), y les incubó a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR, agregándoles agua y pasta de azúcar como alimento. Tanto para varroas como para abejas, la aplicación de cada dilución de extracto de neem, así como los testigos, se realizó en cuatro repeticiones; las lecturas de mortalidad se registraron a las 24 y 48 h.



Figura 9.- Prueba de toxicidad en varroas.





Figura 10. Prueba de toxicidad en abejas.

6.4. Efecto de exposición del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa

En una primera etapa, se examinaron colmenas con la finalidad de identificar panales con abundantes larvas de abejas obreras próximas a ser operculadas; es decir larvas grandes, de instares 4 y 5 (según Rembold *et al.*, 1980), de aproximadamente 6-7 días de edad, y de ellas se identificaron manchones uniformes para posteriormente aplicarles tratamiento con extracto de neem. Se eligieron panales con manchones de larvas de la edad anotada, y a cada panal se le suministró una de las siguientes concentraciones de extracto de neem: 0% (testigo tratado con agua destilada), 2%, 4%, 8%, 16%, 32% y 64%, todas por aspersión mediante la torre de Burgerjon y mediante el método descrito con anterioridad. Cada tratamiento (concentración) tuvo cuatro repeticiones (panales).



Después de la aplicación de neem, los panales se regresaron a las colmenas de donde habían sido retirados, llevando un control de días. Aproximadamente dos días después de que las larvas de abejas habían sido operculadas se sacaron los panales; con mucho cuidado se abrieron 15 celdas por cada repetición y en cada una se introdujo una varroa hembra adulta; entonces se cerraron y se llevaron a una incubadora, simulando las condiciones de la colonia. En ésta permanecieron hasta dos días antes de la fecha estimada de emergencia de las obreras adultas; es decir, se retiraron a los 19-20 días después de que la reina puso los huevos y se colocaron en un congelador a -21°C , donde permanecieron hasta el momento en que se examinaron.

Para la identificación de la porción de panal que había recibido un tratamiento y tenía larvas de abejas de edad apropiada, se marcó esta área con la ayuda de un marco (Fig. 10) de madera dividido en cuadrantes de 5 x 5 cm marcado con coordenadas; este marco también se utilizó como referencia para la aplicación de cada tratamiento de neem en larvas y para la tomar lectura de los datos.

La variable de respuesta de los tratamientos aplicados fue el número de descendientes de las varroas introducidas en las celdas previamente tratadas con extracto de neem a las concentraciones anotadas, así como el estado de desarrollo de esos descendientes. Para determinar lo anterior se procedió a abrir las celdas donde se habían colocado las varroas y antes que nada identificar si estaba la varroa fundadora; cumplido lo anterior, con mucho cuidado y con ayuda de un microscopio y una lámpara de luz fría, se extrajeron y cuantificaron todos los descendientes de la cada varroa hembra y se colocaron por separado en pequeñas cápsulas de plástico con ácido láctico, para identificar los estados de desarrollo de los ejemplares presentes en cada celda. Se inició por el testigo y se continuó con los tratamientos a concentraciones crecientes.

Posteriormente y con la ayuda del microscopio, se colocaron los individuos encontrados de cada celda en una cápsula de plástico, se identificó la composición de la familia de varroa; es decir, cuántos huevos, protoninfas,



deutoninfas y adultos había en cada celda parasitada artificialmente por varroa. Para identificar si el experimento tuvo éxito en cuanto al trabajo, en el testigo se tuvo que haber observado desarrollo de varroa, que fue el caso.

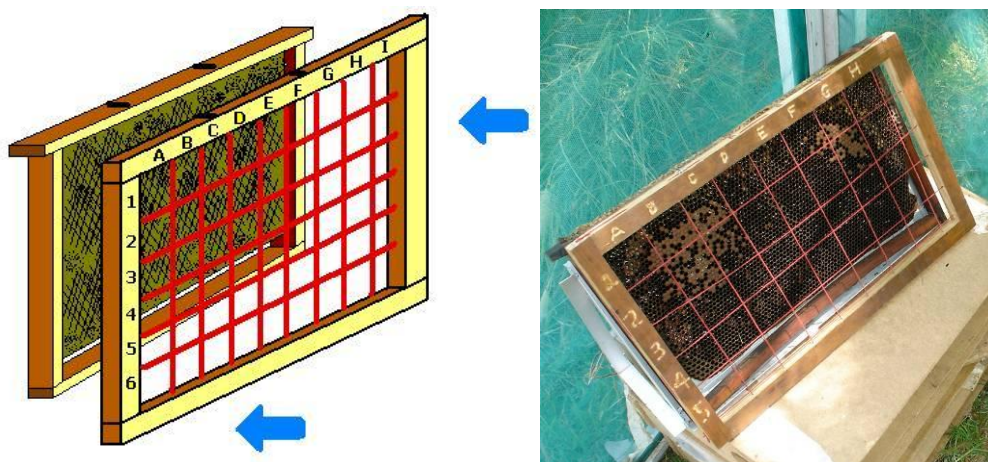


Figura 11. Marco con coordenadas utilizado para tomar con precisión las lecturas de los tratamientos.

6.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Con el fin de determinar la repelencia o atracción del extracto de neem cosecha 2009, los valores de repelencia resultantes de la aplicación de la fórmula propuesta por Colin *et al.* (1994) en tiempos sucesivos se analizaron con el procedimiento GLM del programa SAS (SAS, 2000), esto mediante un diseño experimental completamente al azar. La comparación de medias de los tratamientos se realizó mediante una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).



7. RESULTADOS

7.1. Prueba de repelencia con posibilidad de elección

La variación a lo largo del tiempo de los valores de repelencia aparece en la Fig. 11. En las primeras lecturas de 30 y 1 h, no existieron diferencias entre tratamientos y el testigo, pero a partir de la tercera lectura hubo varios tratamientos que se separaron significativamente del testigo; estos fueron los tratamientos del 2%, 16%, 32% y 64%, y también estos tratamientos mostraron valores consistentemente más altos de VR. En general, el efecto de las concentraciones más altas de extracto de neem fue estable hasta los 72 h. Por su parte, el testigo osciló siempre constantemente en VR alrededor de 100, lo cual muestra que los ácaros se manejaron apropiadamente. Por otra parte, el experimento no mostró una asociación entre la concentración y el valor de repelencia.

Para la variable de respuesta del número de varroas posadas sobre pupas en los lados A y B (Fig. 12), se observó que a medida que aumentó la concentración de neem, el número de varroas posadas sobre las pupas de abejas colocadas en el lado A (tratadas) fue menor, y llegó prácticamente a cero en el tratamiento con 64% de extracto de neem. En esta variable se observa una asociación entre la concentración del extracto y el número de varroas posadas sobre pupas tratadas.



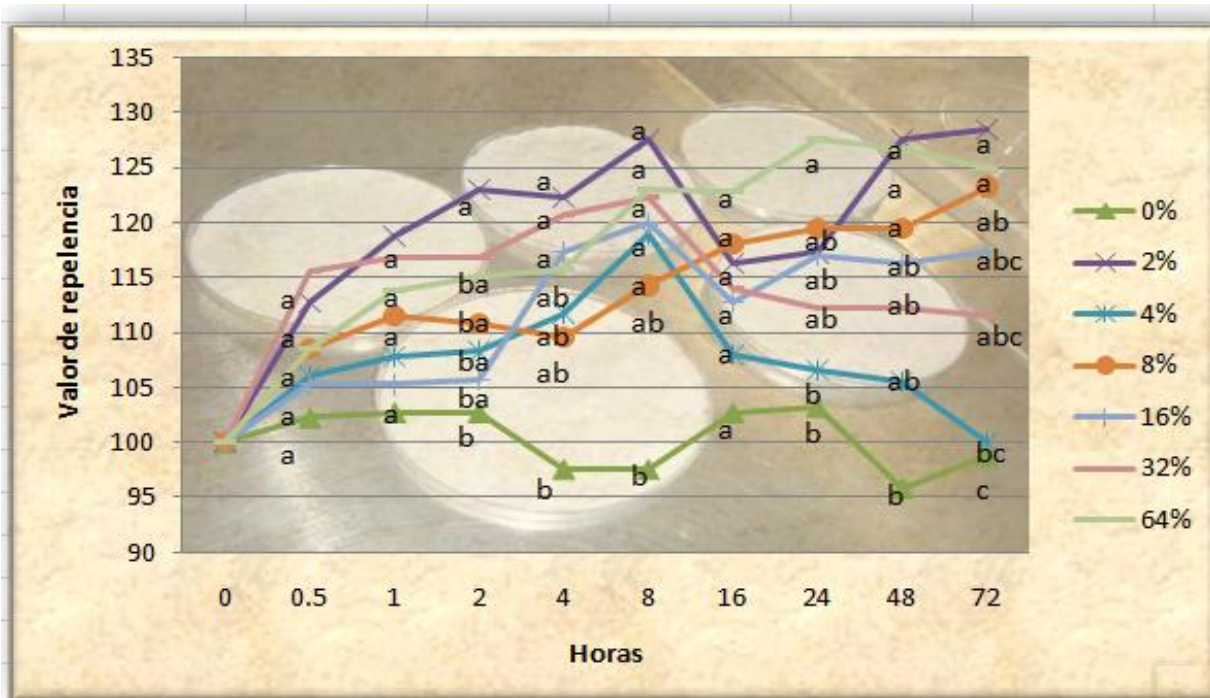


Figura 12. Valor de repelencia en las primeras 72 h, correspondientes a diferentes concentraciones de extracto de neem. Literales diferentes indican diferencias significativas entre concentraciones a un mismo tiempo de lectura ($P < 0.05$).



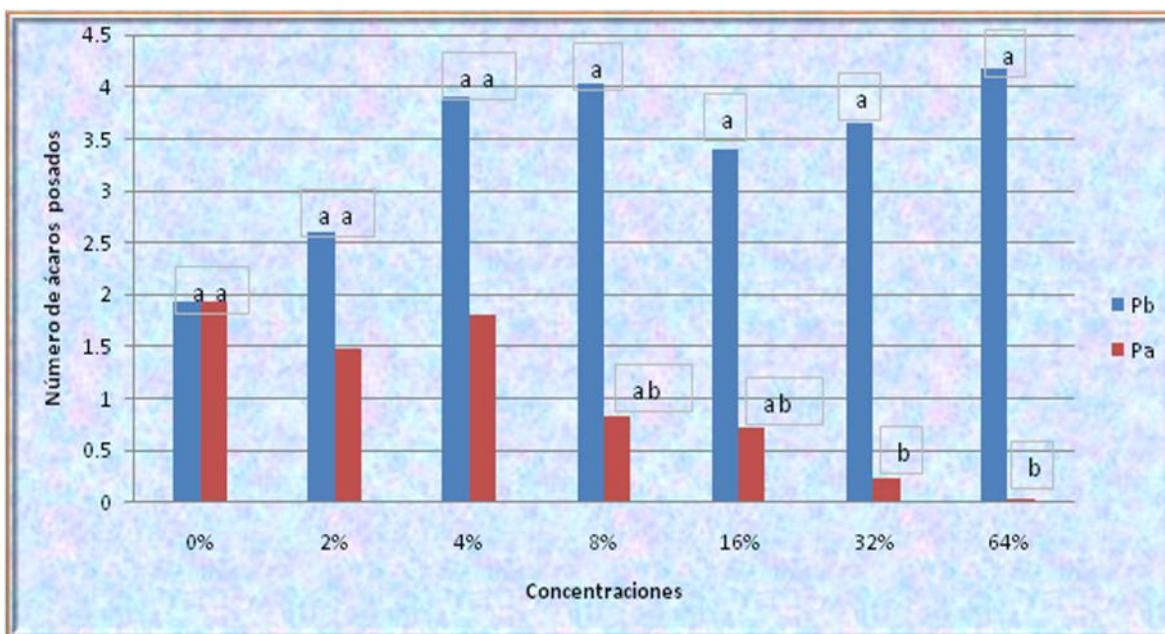


Figura 13. Promedio del número de hembras de varroa que se posaron sobre pupas de abejas tratadas (PA) y no tratadas (PB) con extracto de neem, en lecturas tomadas de 0.5 a 72 h después de la aplicación. Literales diferentes indican diferencias significativas entre pupas tratadas y no tratadas con respecto a cada concentración ($P < 0.05$).

7.2. Prueba de toxicidad en varroas

En la evaluación de toxicidad, el testigo presentó casi un 100% de supervivencia 24 h después de la aplicación de los tratamientos, mientras que a las 48 h se observó una ligera mortalidad en todos, incluyendo el testigo. Se observó que en las dosis más altas hubo una mortalidad significativamente mayor que la del testigo ($P < 0.05$).y su valor máximo fue de 50% a las 48 h (Cuadro 1).



Cuadro 1. Número de varroas sobrevivientes en lecturas tomadas a 24 y 48h, consecutivas a la aplicación de diferentes concentraciones de extracto de neem (*A. indica*). Literales diferentes indican diferencias significativas entre filas ($P < 0.05$).

Concentración de neem	Número de varroas		Número de varroas	
	Lectura 24 horas		Lectura 48 horas	
TESTIGO				
0%	9.75	a	9.5	a
2%	9.5	a	9.5	a
4%	6.5	a	5	b
8%	8.75	a	8.5	ab
16%	6.5	a	6	ab
32%	9.25	a	8.75	ab
64%	7.5	a	6.5	ab



7.3. Prueba de toxicidad en abejas

Los resultados de la prueba de toxicidad en abejas obreras aparecen en el Cuadro 2. Sólo la concentración 8% fue diferente del testigo. En la lectura de 48 h, la mortalidad aumentó incluyendo la del testigo y ningún tratamiento fue diferente del testigo. A ninguna de las concentraciones hubo una asociación entre concentración y letalidad.

Cuadro 2. Porcentaje de abejas sobrevivientes a las 24 h, a diferentes concentraciones de extracto de neem (*A. indica*)

Concentración de neem	Porcentaje de abejas		Porcentaje de abejas	
	Lectura 24 horas		Lectura 48 horas	
TESTIGO	98.38	bc	92.58	ab
2%	100	c	98.33	b
4%	94.18	ab	92.54	ab
8%	88.43	a	83.6	a
16%	95.84	abc	95.84	ab
32%	98.24	bc	95.62	ab
64%	98.24	bc	97.43	ab



7.4. Efecto de exposición del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa

El número de descendientes producidos por las hembras fundadoras de todos los tratamientos con extracto de neem fue significativamente menor que en el testigo ($P < 0.05$). La reducción en el número de descendientes producidos fue mayor a medida que aumentaron las concentraciones del extracto de neem, pero no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En el testigo, el número de descendientes fue muy cercano al 2, lo que se considera dentro de los límites normales, mientras que en los tratamientos de 32 y 64%, la gran mayoría de las hembras fundadoras (95%) no tuvieron ningún descendiente.

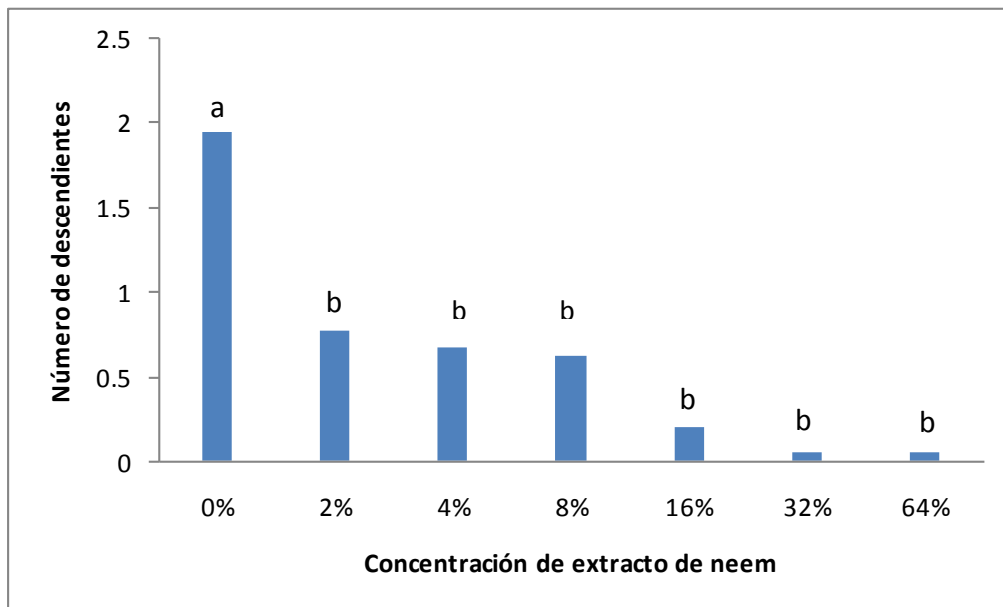


Figura 14. Número de descendientes de hembras fundadoras de varroa consecutiva a la aplicación de tratamientos de extracto de neem. Literales iguales significan que no hubo diferencia significativa entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$)



8. DISCUSIÓN

8.1. Prueba de repelencia con posibilidad de elección

El VR observado en el caso del testigo tuvo un promedio de 100.36, lo que concuerda con los datos de González (2005) y con Colin *et al.* (1994), quienes siempre tuvieron VR de alrededor de 100 en el testigo, lo que muestra que las hembras de varroa se distribuyen uniformemente en las arenas de observación.

Para el aceite de neem a diferentes concentraciones el efecto repelente varió, pero a partir de la segunda hora la concentración del 2% mostró un VR promedio de 121.53, obteniendo su VR más alto, 128.50, a las 72 h. González-Gómez *et al.* (2006) encontraron para la concentración del 2% de las cosechas 2002 y 2003 de neem un VR máximo de 132, mayor que el resultado obtenido en esta tesis, pero en contraste dichos autores observaron una reducción del efecto de repelencia en todas las concentraciones al paso del tiempo. En los resultados obtenidos en esta tesis, se mantuvo un efecto constante al paso de tiempo a excepción de la concentración del 4%.

González Gómez *et al.* (2006) encontraron que para la evaluación de cosecha 2003, el 4% fue la concentración que mayor repelencia presentó, misma que alcanzó hasta un 139 de VR en su mayor valor; en cambio, en esta evaluación, la que presentó mayor VR fue 128.50 y fue por la concentración del 2%.

Colin *et al.* (1994) encontraron que el extracto de *Thymus vulgaris* tuvo el VR más alto, 124 a las 24 h, el cual disminuyó con el tiempo. Estos valores contrastan con los obtenidos en esta investigación, que fue de 117.25 a las 24 y aumentó a las 72 h a 128.50.

González (2010) observó en su evaluación de aceite de neem, hasta las 24 h, mostró su principal efecto repelente; estos datos difieren de nuestra evaluación, ya que a la segunda hora el tratamiento de 2% de neem mostró un importante VR, de 123. Para los casos de 2 y 64%, mostraron valores constantes a lo largo de las



lecturas y a las 72 h fueron diferentes del testigo; en cambio González (2010) encontró que 8, 16, 32 y 64% fueron diferentes del testigo.

La variación en la intensidad del efecto repelente de los extractos de neem en cosechas sucesivas, o en distintos experimentos, se considera normal, ya que es una consecuencia inevitable del uso de productos naturales, en este caso el extracto de neem, cuya composición es indeterminada. Es bien conocido que la composición de los extractos vegetales varía de una cosecha a otra, incluso de una etapa fenológica a otra o dependiendo del método de extracción usado (Ermel *et al.*, 1987).

En cuanto a la prueba de repelencia contabilizando únicamente el número de varroas encontradas sobre las pupas tratadas, se observó una total preferencia sobre las pupas no tratadas a partir del 2%, pero hubo mayor número de varroas sobre pupas no tratadas en las concentraciones de 4, 8 y 64%. González-Gómez *et al.* (2006) observaron igual una preferencia por las pupas no tratadas igual que Sánchez (2006), quien encontró preferencia por las pupas no tratadas en cosechas de neem 2004 y 2006.

González (2010) encontró que 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 varroas que se posaron sobre las pupas tratadas fue de 0 a 0.25. En cambio, nuestros resultados sólo la del 32 y 64% mostraron de 0.025 a 0.225 varroas posadas en pupas tratadas, respectivamente, mientras que 16% mostró mayor número de ácaros posados sobre pupas tratadas.

Colin *et al.* (1994) evaluaron la efectividad de *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Anona* spp. y *Chenopodium* spp. Estos autores observaron un efecto de repelencia que impidió que las hembras varroa se posaran sobre las pupas de abejas.



8.2. Prueba de toxicidad en varroas

En la evaluación de extracto de neem cosecha 2009, no se mostró un efecto de toxicidad en varroas; sin embargo, a la concentración de 4% a las 48 h, se observó una mortalidad del 50% de varroas. En pruebas realizadas por González-Gómez *et al.* (2006), aun la dilución más alta de neem (50%) no ocasionó mortalidad de varroa. Por su parte, Melathopoulos *et al.* (2000), al probar aceite de neem por aplicación tópica, observaron 45% de mortalidad de varroa, mientras que Colin *et al.* (1994) determinaron que *S. officinalis* y *Chenopodium* spp. causaron un 90% de mortalidad de varroa 16 h después de la aplicación.

8.3. Prueba de toxicidad en abejas

Para este caso, no se mostró mortalidad en abejas diferentes del testigo, a excepción del 8% en la lectura de 24 h, que mostró menor número de abejas sobrevivientes, con valor de 88.43%. Los datos concuerdan con los que obtuvieron González Gómez *et al.* (2006), quienes no encontraron mortalidad significativamente diferente de la del testigo, con concentraciones de 2 y 4%.

Naumann *et al.* (1994) encontraron que el extracto de semillas de neem es un insecticida seguro cuando al momento de usarlo hay abejas melíferas presentes, los tratamientos que ellos usaron no repelieron las abejas. Por otro lado, Crane *et al.* (1984) mencionan que las abejas 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 proporción polen.



8.4. Efecto de exposición del neem sobre la supervivencia, reproducción y desarrollo de varroa

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que hubo una diferencia entre todos los tratamientos con concentraciones crecientes de neem con respecto al testigo; se observó que a mayor concentración menor reproducción de ácaros varroa en celdas tratadas con extracto de neem. Estos datos concuerdan con Peng *et al.* (2000), quienes encontraron que a mayor concentración de azadiractina, disminuye la fecundidad de los ácaros varroa. Es importante mencionar que estos autores realizaron aplicaciones tópicas. También dichos autores muestran que la reproducción de varroa se ve afectada en cuanto aumenta la concentración de azadiractina.



9. CONCLUSIONES

- ✓ En condiciones de laboratorio, se observó un efecto repelente del extracto oleoso de neem que impidió que las hembras adultas de varroa localizaran a pupas de abeja y se alimentaran de ellas. La repelencia más alta y estable fue de la concentración del 2%. Por lo tanto se concluye que el extracto de neem cosecha 2009 muestra repelencia pero este efecto no es directamente proporcional a las concentraciones.
- ✓ La concentración de 64% de extracto de neem aplicada sobre pupas de abejas fue la que permitió que menos ácaros se posaran sobre ellas.
- ✓ A las concentraciones utilizadas de extracto de neem, no hubo efecto tóxico significativo sobre varroas y abejas, sólo con la del 4% se observó un 50% de mortalidad en varroas a las 24 h. Para abejas, la concentración del 8% se postula que provocó que un 11.6% de las abejas se murieran a las 24 h.
- ✓ La aplicación del extracto de neem en pupas que luego fueron parasitadas por varroa afectó la supervivencia, la reproducción y el desarrollo de este ácaro; a mayor concentración de neem fue menor la reproducción de varroa.



10. RECOMENDACIONES

- Se propone que se evalúen formulaciones y métodos de aplicación de neem, para recomendar alternativas viables a apicultores.
- Identificar formulaciones de aceites y desarrollar tecnologías de aplicación, esto encaminado a la reducción de costos laborales y protección al ambiente.
- Otro punto importante es investigar el efecto de la adicción de emulsionantes y neem; es decir, si éstos aumentan la eficacia de los tratamientos o bien si la combinación de dos o más aceites esenciales aumenta la eficacia en los tratamientos.



11. LITERATURA CITADA

Anderson, D. L., W. H. Trueman. 2000. *Varroa jacobsoni* is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24: 165-89.

Biswas, K., I. Chattopadhyay, R.K. Banerje, U. Bandyopadhyay. 2002. Biological activities and medical properties of neem (*Azadirachta indica*) *Current Science* 82 (11):1336-1334.

Burgerjon, A. 1956. Pulverisation et poudrage au laboratoire par des preparations pathogenes insecticides. *Annals des Epiphyties* 4: 675-684.

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

Crane, E., P. Walker., R. Day. 1984. *Directory of important world honey sources*. Int. Bee research association, London. 348 pp.

De Elis J. Munn P. 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86(4): 88-101.

De Jong, D., P. H. De Jong, S. Goncalves. 1982. Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 21: 165-167.

De Jong, D. 1990. Mites: *Varroa* and other parasites of brood. En: *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. Edited by: Morse, R.A., y R. Nowogrodzki. Cornell University Press, Ithaca, New York. pp. 200-218.



Donzé, G., P. M. Guerin, 1994. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34: 305-319.

Donzé G., P. Fluri, A. Imdorf. 1998. A look under the cap: the reproductive behaviour of varroa in the capped brood of the honey bee. *American Bee Journal* 138 (7) 528-533.

Ermel, K., E. Pahlich, H. Schmutterer. 1987. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations and its dependence on temperature, relative humidity and light. pp 171-187. En: Schmutterer, H., y Ascher, K. R. S. (eds.), *Proceedings, Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss) and other Tropical Plants. 3rd International Neem Conference, 10-15 July, 1986, Nairobi, Kenya.* German Agency for Technical Cooperation: Eschborn, Germany.

González Gómez R. 2005. Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* A. Juss contra *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. Mex. 74pp.

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. 2010. Desarrollo de un producto a base de neem (*Azadirachta indica*) para el control de *varroa destructor*. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. Mex.

Gossé, B., Amisa. R.A., Anoch, Adjé, Felix., Bobélé Niamké Florence. 2005. Analysis of components of neem (*Azadirachta indica*) oil by diverse



chromatographic techniques. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 28:2225-2233.

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.

Henderson C. E., J. Steiner., A. Byron. 1986. *Varroa jacobsoni* life cycle. *American Bee Journal*. 126 (2): 117:119.

Ifantidis, M. D. 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *Journal Apicultural Research*. 23: 200-206.

Kraus, B., E. R. Page Jr. 1995. Effect of vegetable oil on *Varroa jacobsoni* and honey bee colonies. *Bee Science*. 3 .(4): 157-161.

Lale N.E.S., H.T. Abdulrahman. 1998. Evaluation of neem (*Azadirachta Indica A. Juss*) seed oil neem powder for the management of *Callosobruchus maculates*(F)(Coleoptera Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*. 35: 135-143.

Martin, S. J. 1994. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental & Applied Acarology* 18: 87-100.

Martin, S.J. 1998. A population model for the ectoparasitic *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological Modeling*, 109: 267-281

Maul, V. 1983. *Varroa* elimination Mittels Brutbeschränkung auf bennwaben neue Ergebnisse zur des verfahrens. *Apidologie* 14: 260-261.



Melathopoulos, A.P., M.L. Winston, R. Whittington, T. Smith, C. Lindberg, A. Mukai, and M. Moore. 2000. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mites parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acaripis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. *Journal of Economic Entomology* 93(2): 199-209.

Mordue J. A., A. Blackwell. 1993. Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology*. 39: 903-924.

Moretto, G., L. S. Goncalves, D. De Jong. 1993. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Brazilian Journal Genetics* 16: 71-77.

Moretto, G., J. de M. Leonidas. 2003. Infestation and distribution of the mite *Varroa destructor* in colonies of Africanized bees. *Braz. J. Biol.* 63 (1): 83-86.

Naumann, K. e M. Isman. 1996. Toxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) insecticide to larval honey bees. *American Bee Journal*. 136 (7): 518 – 520.

Nauman, K., R. W. Currie, 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.

Oldroyd, B. P. 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends and Research in Evolutionary Ecology* 14:312-315.

Ortega R. C., Ochoa. 2004. La producción de miel en México, modernidad y tradición. *Claridades Agropecuarias* 128: 3-13.



Otero-Colina, G. 2000. Estrategias para el control de Varroa en México. Memoria el XIV Seminario Americano de Apicultura. Octubre 28-30, Tampico, Tam.

Peng, C., 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.

Ramos, B. C. 2002. Azadiractina en frutos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en diferentes etapas fenológicas en Córdoba, Ver. Tesis maestría en ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. Mex. 80p.

Rembold, H., J.P. Kramer., M. Ulrich. 1980. Characterization of post embryonic stages of the honey bee *Apis mellifera*. Apidologie 11 (1):28-38.

Rinderer T. E, L.I De Gúzman, G.T. Delatte, J.A. Stelzer, V.A. Lancaster, V. Kuznetsov L. Beman, R. Watts, y J.V. Harris. 2001. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bee from far eastern Rusia. Apidologie 32: 1-14.

Rodríguez-Dehaibes, S.R., G. Otero-Colina, V. Pardo Sedas, 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, D. A. 1998. Adaptabilidad del árbol de margosa (*Azadirachta indica* A. Juss.), en la zona centro de Veracruz y su utilidad en el combate de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei* Ferr). Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Programa: Agroecosistemas Tropicales. Altamirano, Veracruz. 186 p.



Rodríguez, D. S. R., M. J. Moro, G. Otero-Colina. 1992. Varroa found in México. American Bee Journal 132(11): 728-729.

Sammataro, D., U. Gerson, G. Needham. 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. Annual Review of Entomology 45: 519-548.

Sánchez G., J. A. 2006. Repelencia de un extracto de neem sobre *Varroa destructor* y su efecto sobre la supervivencia y desarrollo de crías de abejas. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo.56-75.

Santillán-Galicia M.T., G. Otero-Colina, C. Romero-Vera, y J. Cibrián Tovar. 2002. *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) infestation in queen, worker and drone brood of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). The Canadian Entomologist 134(3): 381-390.

Statistical Analysis System SAS User's Guide. 2000. Statistics version 8.1. SAS Inc. Cary.North Carolina, USA.

Schenk, P., A. Imdorf., P. Fluri. 2001. Effect of neem oil on varroa mites and bees. American Bee Journal. 98 (3.): 878-880.

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology 35: 271-97.

Steiner J. 1986. Sex discrimination based on external structures in nymphal and adult *Varroa jacobsoni* mites (Acarina: Varroidae). Entomologia Generalis. 14(2) 133: 138.

Sumpter D.J.T., S.J. Martin. 2004. The Dynamics of virus epidemics in Varroa – infested honey bee colonies. Journal of Animal Ecology.73: 51-63.



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

Vandame, R. 2000. Control Alternativo de *Varroa* en Apicultura. El Colegio de la Frontera Sur – Proyecto 'Abejas de Chiapas'. Edición 2.2. Consulta en línea el 11 de mayo de 2010.

<http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/sanidad/varroa/Control%20alternativo%20Varroa%202002.PDF>.

Whittington, R., M. L. Winston, A.P. Melathopoulos, H.A. Higo. 2000. Evaluation of the botanical oils neem, thymol, and canola sprayed 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.

