



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Agronomía  
Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

## **SUSCEPTIBILIDAD DE ABEJAS (*Apis mellifera* L.) A INSECTICIDAS NATURALES**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas

MICHELLE CONSUELO ALEJANDRA IUBINI ARAVENA  
CHILLÁN-CHILE  
2024

Profesor Guía: Gonzalo Silva Aguayo  
Dpto. de Producción Vegetal,  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Gonzalo Silva Aguayo  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

---

Dra. Marcela Rodríguez García  
Facultad de Ciencias Naturales y  
Oceanográficas  
Universidad de Concepción

---

Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel  
Posgrado en Fitosanidad-Entomología y  
Acarología  
Colegio de Postgraduados

---

Dr. Julio S. Bernal  
Department of Entomology  
Texas A&M University

Director de Programa

---

Dra. Macarena Gerding González  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	v
<b>RESUMEN.....</b>	vi
<b>SUMMARY.....</b>	vii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	1
<b>HIPÓTESIS.....</b>	6
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	6
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	6
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	7
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	11
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	18
<b>REFERENCIAS CITADAS.....</b>	18

## ÍNDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 1	Insecticidas evaluados en condiciones de laboratorio sobre <i>A. mellifera</i> .	26
Tabla 2	Concentraciones del ingrediente activo evaluadas en bioensayo de aplicación topical sobre obreras de <i>A. mellifera</i> .	27
Tabla 3	Concentraciones del ingrediente activo evaluadas en bioensayo de ingestión sobre obreras de <i>A. mellifera</i> .	28
Tabla 4	Concentración letal 50% (CL <sub>50</sub> ) y 90% (CL <sub>90</sub> ) de insecticidas naturales evaluados sobre <i>A. mellifera</i> mediante aplicación Topical luego de 24 horas de exposición.	29
Tabla 5	Concentración letal 50% (CL <sub>50</sub> ) y 90% (CL <sub>90</sub> ) de insecticidas naturales evaluados sobre <i>A. mellifera</i> mediante ingestión luego de 24 horas de exposición.	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Distribución de los tratamientos en el huerto de manzano en la Estación Experimental El Nogal.	31
Figura 2	Mortalidad (%) por toxicidad de contacto de Azadiractina (A), Abamectina (B), Piretrinas (C) y Virus de la poliedrosis múltiple nuclear de <i>Mamestra brassicae</i> (NPVs) (D) contra <i>Apis mellifera</i> .	32
Figura 3	Mortalidad (%) por toxicidad por ingestión de Azadiractina (A) y Abamectina (B) contra <i>Apis mellifera</i> .	33
Figura 4	Probabilidades de supervivencia de <i>A. mellifera</i> expuestas a hojas de manzano tratadas con agua, Abamectina y Piretrinas 2 horas antes del bioensayo de residualidad.	34
Figura 5	Probabilidades de supervivencia de <i>A. mellifera</i> expuestas a hojas de manzano tratadas con agua, Abamectina y Piretrinas 24 horas antes del bioensayo de residualidad.	35
Figura 6	Probabilidades de supervivencia de <i>A. mellifera</i> expuestas a hojas de manzano tratadas con agua, Abamectina y Piretrinas 48 horas antes del bioensayo de residualidad.	36
Figura 7	Porcentaje de preferencia de <i>A. mellifera</i> por alimento contaminado con insecticida y el control. T= Tratamientos.	37

## RESUMEN

*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), es uno de los polinizadores más importantes de los cultivos. Sin embargo, en los últimos años las densidades poblacionales de este insecto han disminuido debido a un fenómeno conocido como Síndrome del Colapso de las Colonias (SCC). El uso irracional de plaguicidas, entre otros factores, es considerado una de las causas del SCC. Sin embargo, la investigación en esta área se ha focalizado en los insecticidas sintéticos. Por tanto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar formulaciones comerciales de uso agrícola de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, virus de la polidrosis nuclear de *Mamestra brassicae* L. (NPVs), azadiractina (Neem), piretrinas y abamectina contra *A. mellifera*. En los bioensayos de contacto e ingestión la mayor toxicidad se obtuvo con abamectina con 100% de mortalidad en su dosis comercial. Las piretrinas en su dosis comercial ( $45 \text{ mg L}^{-1}$ ) presentaron una mortalidad de 53,2% mientras que NPVs no mostró mortalidad incluso aumentando la dosis 64 veces. En los bioensayos de repelencia aunque las abejas exhibieron una mayor preferencia por el testigo que por la dieta tratada no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos lo que indicaría que las abejas hicieron una elección al azar más que por alguna influencia del tipo de dieta. Se concluye que abamectina y las piretrinas son las más tóxicas contra abejas en su dosis comerciales y subletales tanto por contacto como ingestión.

## SUMMARY

The *Apis mellifera* L. is an important pollinator for numerous crops. However, in recent years, population density has declined due to a phenomenon known as Colony Collapse Disorder (CCD). The irrational use of pesticides, among other factors, is considered one of the causes of CCD. However, research in this area tends to focus primarily on synthetic insecticides. Hence, this research aimed to assess the toxicity of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, nuclear multiple polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae* L. (NPVs), azadirachtin (Neem), pyrethrins, and abamectin for agricultural use against *A. mellifera*. In contact and ingestion bioassays, the highest toxicity was obtained with abamectin with 100% mortality at its commercial dosage. Pyrethrins in their commercial dose (45 mg L<sup>-1</sup>) showed a mortality of 53.2%, while NPVs did not cause mortality at the commercial dosage, so we increased it 64 times. In repellency bioassays, although untreated bees exhibited a higher preference for control than treated diet, no significant differences between treatments were observed, indicating that the insects made their choice randomly rather than being influenced by the type of diet. We concluded that abamectin and pyrethrins are the most harmful to bees than NPVs, Neem, and *B. thuringiensis*, both in commercial and sublethal doses, by contact and ingestion toxicity.

## INTRODUCCIÓN

En el reino animal, los insectos son el grupo más diverso y se presume que constituyen una cantidad significativa de la biomasa terrestre (Zattara *et al.*, 2021), lo que aporta directamente a servicios esenciales para la función de los ecosistemas como el control biológico y la polinización, entre muchos otros. El proceso de polinización en particular es esencial para el mantenimiento de la viabilidad y diversidad genética de las plantas con flores, lo que determina su éxito reproductivo (Ollerton *et al.*, 2011). El aporte de este proceso sobre la producción alimentaria se estima en grandes porcentajes. Más del 75% de los servicios alimenticios son producidos por los insectos polinizadores (Nava-Bolaños *et al.*, 2022), mientras Williams (1996) estimó que los insectos son los responsables de alrededor del 84% de la polinización de los cultivos comerciales. Esto representa aproximadamente un tercio de la producción total de alimentos (Klein *et al.*, 2007). Entre los insectos polinizadores, los órdenes de mayor importancia son Hymenoptera, Lepidoptera, Diptera y Coleoptera, tales como, abejas, mariposas, polillas, moscas y escarabajos (Garibaldi *et al.*, 2012). No obstante, los himenópteros se consideran los polinizadores más eficaces (Stanley y Preetah, 2016). Entre estos últimos, las abejas productoras de miel del género *Apis* sp. (Superfamilia Apoidea), prestan servicios esenciales de polinización a los cultivos agrícolas (Yasuda *et al.*, 2017). La abeja Melífera *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) se destaca en este proceso y por los subproductos que genera para la humanidad. La historia de domesticación de esta especie originaria de África, se estima que en el año 2600 a.C. aproximadamente, en Egipto. Desde allí, se atribuye que la apicultura pasó a las posteriores civilizaciones occidentales, estableciéndose esta práctica durante la Edad Media en Europa, desde donde se extendió al resto del mundo (vanEngelsdorp y Meixner, 2010), por lo que actualmente es África el lugar donde actualmente se encuentran las únicas poblaciones de abejas nativas y silvestres (Stanley *et al.*, 2020). Actualmente la distribución de esta especie abarca prácticamente el mundo entero (Han *et al.*, 2012), debido al transporte deliberado que ha realizado el ser humano (vanEngelsdorp y Meixner, 2010). De esta forma *A. mellifera* es la especie polinizadora más domesticada a nivel mundial.

La reducción de los servicios de polinización puede afectar enormemente a las comunidades vegetales y las funciones más amplias de los ecosistemas (Yasuda et al., 2017). Esto sumado a que además de prestar servicios de polinización, las abejas melíferas proporcionan una serie de productos (miel, cera, polen, propóleos y jalea real) de importancia comercial (Winston, 1991).

En los últimos años se ha observado una disminución en las poblaciones de abejas melíferas en todo el mundo, lo que implicaría que la sostenibilidad del proceso de polinización, realizado por estas, se encuentra en riesgo, fenómeno que ha sido denominado Síndrome del Colapso de las Colonias o Colony Collapse Disorder (CCD) (Suryanarayanan y Kleinman, 2013). La Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas (SOLATINA), informaron que entre los años 2016 a 2018, la zona sufrió una pérdida media del 40%, con países como Colombia, Brasil, Chile y Bolivia los países más afectados reportando una pérdida de entre un 30 y 45 % (SOLATINA, 2020).

Una diversidad de factores ha contribuido al declive de las poblaciones de *A. mellifera*, pero entre los más importantes se encuentran, los cambios del uso de suelo, la pérdida de hábitat para forrajeo, los parásitos y enfermedades y el uso de insecticidas (Yasuda et al., 2017). Pese a todo, no se ha establecido una única causa, por lo que se infiere pueda ser un efecto multifactorial con acción acumulativa en la respuesta inmune de las abejas (Grillone et al., 2017). Entre las causas probables del CCD, el uso de insecticidas es uno de los factores más relevantes y estudiados (Del Sarto et al., 2012), debido a que en la agricultura son los más utilizados para proteger los cultivos (Belzunces et al., 2012). Existen estudios que sugieren que existen tres vías por las cuales las abejas entran en contacto con los insecticidas: (1) cuando las abejas recolectoras toman contacto directo con los plaguicidas aplicados en las plantas, muriendo rápidamente en campo, (2) cuando las abejas recolectoras trasladan el néctar, polen y agua contaminadas a la colmena, viéndose toda la colonia afectada por el material contaminado y (3) por una posible exposición de plaguicidas a través de la deriva de aspersión aérea (Abay et al., 2023). Actualmente, los insecticidas deben cumplir con ciertas condiciones para ser utilizados: i) ser selectivos, ii) tener menor efecto residual y iii)

tener nuevos modos de acción diferentes a los denominados “insecticidas de amplio espectro”. Entre los insecticidas sintéticos que cumplen estas condiciones estarían los insecticidas neonicotinoides, reguladores del crecimiento de insectos y diamidas. Pero aún así, los neonicotinoides actualmente están prohibidos en la mayoría de los países de la UE (Unión Europea), debido a su efecto nocivo sobre abejas y polinizadores en general (Laycock et al., 2014), ya que los residuos de este insecticida se translocan al polen y al néctar que recogen los recolectores (Henry et al. 2015). No obstante, son el grupo más utilizado para el control de plagas en países como Chile, donde no están restringidos (Jeshcke, 2021), por lo que las abejas melíferas y otros polinizadores en estos países sigue siendo un riesgo.

En las últimas décadas se ha aprendido mucho de la interacción entre las abejas y las toxinas naturales de su entorno, por lo que, también es continuo el descubrimiento de nuevos compuestos activos que pueden utilizarse para controlar plagas de insectos (Aljedani, 2017). Actualmente, los bioinsecticidas se han consolidado como una opción frente a los insecticidas sintéticos, debido a que se asume que presentan bajo riesgo ambiental y toxicidad para mamíferos, alta selectividad de especies y bajo potencial de desarrollo de resistencia (Qu et al., 2022). Estos insecticidas generalmente son de origen natural y de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), se definen como “sustancias naturales derivadas de microorganismos, plantas o animales que controlan plagas (insecticidas bioquímicos y derivados), sustancias insecticidas producidas por plantas que contienen material genético agregado (protectores incorporados a las plantas (PIP)) y microorganismos y virus que controlan plagas (insecticidas microbianos)” (Qu et al., 2022). Entre las distintas clases de bioinsecticidas utilizados para el control de plagas, se encuentran las avermectinas, las cuales son una familia de lactonas macrocíclicas que se obtienen de la fermentación de la bacteria *Streptomyces avermitilis* (Yoon et al., 2004). Esta familia tiene una serie de derivados, siendo la ivermectina y Abamectina las más utilizadas en la agricultura (Li et al., 2022). En el ámbito agrícola la Abamectina es utilizada para el control de insectos y ácaros (Li et al., 2022) debido a que ejerce su acción tóxica a nivel del sistema nervioso, uniéndose a los receptores del ácido gamma-

aminobutírico (GABA), aumentando el flujo de iones de cloruro hacia las células e interrumpiendo la transmisión del impulso nervioso (Li *et al.*, 2022), provocando parálisis y la posterior muerte del insecto. Otro compuesto de origen microbial es *Bacillus thuringiensis* (Bt), que es una bacteria gram positiva formadora de esporas (De Maagd *et al.*, 1999), que posee dos fases de crecimiento, y en una de estas libera cristales proteicos que tienen propiedades tóxicas, que afectan a nivel de intestino medio, a lepidópteros, coleópteros, dípteros y nemátodos (Soberón y Bravo, 2008). Debido a su rápida degradabilidad en condiciones de campo y por su selectividad (Whalon y Wingerd, 2003) los productos que contienen esta bacteria se utilizan en varios sistemas agrícolas (Damalas y Koutroubas, 2018). Además de los mencionados, los bioinsecticidas incluyen productos elaborados a partir de virus, como el Nucleopoliedrovirus múltiple de *Mamestra brassicae* L., perteneciente a la familia Baculoviridae, y género *Alphabaculovirus*. Específicamente Baculoviridae es una familia de virus patógenos de insectos que han sido ampliamente utilizados para el control de plagas agrícolas, especialmente del orden Lepidoptera (Moscardi, 1999). Por último, entre los bioinsecticidas también se encuentran compuestos de origen botánico, como la Azadiractina, la cual es un derivado de las semillas del árbol de Neem (*Azadirachta indica* J; Meliaceae), un compuesto antialimentario, que además provoca alteraciones en la metamorfosis, fecundidad, e inhibe la ovoposición, efectos observados en 1962, donde las semillas de esta especie provocaron la inhibición de la alimentación de langostas (Rembold *et al.*, 1982). En este grupo también se encuentran las Piretrinas, oleoresina extraída y refinada de las flores del piretro (*Tanacetum cinerariifolium* T; Asteraceae) (Markham *et al* 2020). Su efecto insecticida consiste en provocar hiperexcitación neuronal la cual deriva en disparos sinápticos y despolarización constante (Gupta y Crissman, 2013). Esta oleoresina es ampliamente utilizada en ambientes domésticos y en el sector agrícola para el control de plagas, debido a sus potentes propiedades insecticidas y su rápida acción; además produce una baja toxicidad en plantas y mamíferos, con un mínimo impacto ambiental (Markham *et al* 2020).

A pesar de los beneficios del uso de bioinsecticidas, la percepción de seguridad de estos compuestos comenzó a descender con los primeros antecedentes de riesgos

en el ambiente y organismos no blanco, como los polinizadores. De acuerdo con Aljedani (2017), la Abamectina provoca de manera más rápida la muerte de *A. mellifera jemenitica* que el piretroide sintético deltametrina, además de afectar las células citotóxicas del mesenterón provocando trastornos digestivos. Por otra parte, Li *et al* (2022) determinaron que varios grupos de genes se ven influenciados negativamente por la exposición a Abamectina de *A. cerana cerana* y *A. mellifera ligustica*. En el caso del Neem, a pesar de su potencial, se asume que, para ser utilizados eficientemente, los productos derivados de este árbol deben presentar inocuidad o baja toxicidad para los organismos benéficos, como los polinizadores de los cultivos tratados. Sin embargo, estudios como el de Lopes-Amaral *et al* (2015), indicaron que larvas y abejas recolectoras reducían su tasa de supervivencia al ingerir alimento contaminado con Neem. De la misma forma, González-Gómez *et al* (2016) determinaron los efectos del aceite de Neem sobre la mortalidad y desarrollo de crías de abejas, ovoposición de la reina y rendimiento de la colonia, registrando que la mortalidad de las crías aumentaba cuando se incrementaban las concentraciones del aceite de Neem. En Bt, existen antecedentes que indican que este afecta a organismos no blanco, por lo que no se puede descartar que la exposición a este tipo de compuestos pueda afectar a las abejas y que una exposición frecuente de estas pueda presentar consecuencias negativas (Steinigeweg *et al.*, 2022). Lo anterior se demuestra en un estudio realizado por Steinigeweg *et al* (2022) en el que *B. thuringiensis* subespecie aizawai (cepa: ABTS-1857) inhibió el desarrollo de crías y redujo el porcentaje de abejas obreras emergidas. En cuando a las Piretrinas no se han realizado investigaciones. Sin embargo, He *et al* (2022) realizaron un estudio, para investigar los efectos de la exposición crónica a beta-cipermetrina, en el crecimiento de larvas de *A. cerana cerana* y *A. mellifera ligustica* reproducidas *in vitro*, obteniendo que la supervivencia de estas se vio significativamente afectada por este insecticida. Dado que beta-cipermetrina es un derivado sintético de las Piretrinas, y, presenta el mismo modo de acción, se podría inferir que las abejas podrían tener alguna reacción negativa frente a este compuesto de origen natural.

Finalmente, el conocimiento de efectos letales y subletales de los insecticidas sintéticos sobre polinizadores son muchos comparados con los que hay sobre estos mismos causados por Bioinsecticidas. La falta de antecedentes bibliográficos puede ser explicada debido a que inicialmente parecían inócuos frente a organismos no blanco. Sin embargo, actualmente, los pocos estudios al respecto señalan a que algunos de estos efectos letales y/o subletales sobre polinizadores existen, debido a lo cual, el desarrollo de estudios que aborden esto último es fundamental, e importante a la hora de transferir el conocimiento a productores y gestionar estrategias de manejo que apunten a una agricultura sostenible y tributen a la agenda 2030 de nuestro país

## **HIPÓTESIS**

Insecticidas naturales, autorizados en Chile para uso agrícola, provocan efectos nocivos sobre abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), debido a que por su origen, presentan mecanismos de acción similares a insecticidas sintéticos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos nocivos de bioinsecticidas comerciales para uso agrícola sobre *Apis mellifera*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar en laboratorio la toxicidad de formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaky, Nucleopoliedrovirus múltiple de Mamestra brassicae, Azadiractina, Abamectina y Piretrina en obreras adultas de *A. mellifera*.
- Evaluar el efecto repelente de formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaky, Nucleopoliedrovirus múltiple de Mamestra brassicae, Azadiractina, Abamectina y Piretrina en obreras adultas de *A. mellifera*.
- Evaluar la toxicidad por ingestión de formulaciones comerciales de Azadiractina y Abamectina en obreras adultas de *A. mellifera*.
- Evaluar el efecto residual de Abamectina y Piretrinas sobre obreras adultas de *A. mellifera*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Entomología y Acarología Agropecuaria y en la Estación Experimental “El Nogal”, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile.

**Insecticidas.** Se utilizaron formulaciones comerciales de los bioinsecticidas *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki (Dipel® WG), Virus de la poliedrosis múltiple nuclear de *Mamestra brassicae* (En Vivo SC®), Azadiractina (Neem-X®), Piretrinas (Tec Fort®) y Abamectina (Fast Plus). Los antecedentes detallados de cada insecticida se indican en la Tabla 1. Estos compuestos se seleccionaron debido a que son los bioinsecticidas más utilizados para el control de plagas en huertos frutales y hortalizas en Chile. Para obtener las concentraciones a evaluar en los bioensayos, se consideró como referencia la dosis comercial recomendada (DR) por el fabricante que se diluyó con agua destilada a la mitad, un cuarto y un octavo, con lo que se determinó una ventana de actividad biológica para la obtención de una ventana de respuesta entre 0 y 100% de mortalidad. En caso de no haber obtenido el intervalo de mortalidad esperado, se evaluaron más dosis intermedias o superiores.

**Material biológico.** Las abejas se obtuvieron de colonias ubicadas en la Estación Experimental “El Nogal” de la Universidad de Concepción, Campus Chillán. Con el objetivo de obtener insectos de edad conocida para los experimentos, siete días antes de cada bioensayo, se retiraron marcos de cría operculada de la colonia, que se trasladaron al Laboratorio de Entomología y Acarología Agropecuaria. Una vez en laboratorio, los marcos se mantuvieron en jaulas de tela de visillo, con bordes de madera, de 60 x 60 x 30 cm. en una cámara bioclimática (SHEL LAB, Model 2015-2E, Cornelius, Oregon, EE. UU.) en condiciones de  $28 \pm 5^\circ\text{C}$  de temperatura y  $90 \pm 5\%$  HR (humedad relativa) hasta la emergencia de los adultos.

### Bioensayos

**Aplicación Topical.** En este bioensayo se utilizó la metodología de Del Sarto *et al* (2014), con modificaciones. Se evaluaron las concentraciones definidas en la

ventana biológica para cada insecticida (Tabla 2), además de un testigo al cual se le aplicó agua destilada. Por cada concentración se realizaron cinco réplicas de 15 abejas de 7 días de edad. Con el objetivo de disminuir la movilidad de las abejas, antes de la aplicación de los insecticidas, estas se ubicaron en un freezer a una temperatura de  $-15 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, y a continuación, se aplicó 2  $\mu\text{L}$  de cada concentración de insecticida con una micropipeta. Las aplicaciones se realizaron en la zona ventral del abdomen de las abejas. Luego, las abejas tratadas se trasladaron a frascos de plástico de 1L provistos de una tapa con dos perforaciones destinadas a la sujeción de dos jeringas de 20 mL, que contenían una dieta consistente en 5 mL de miel (70%) y 5 mL de agua destilada respectivamente, ofrecidas *ad libitum*. Además, para facilitar la movilidad de las abejas en el interior del frasco se incorporó dos abatelenguas de madera de 113 x 10 x 2 mm, dispuestos en forma de X. La mortalidad se registró 24 horas después de la aplicación y el criterio de mortalidad fue considerar como muerta aquella abeja que no reaccionada a un estímulo externo, que consistió en un toque con un pincel y/o si se encontraban volteadas (Del Sarto *et al.*, 2014).

**Ingestión.** En este bioensayo se utilizó las metodologías de Del Sarto *et al* (2014) y Phan *et al* (2020), con modificaciones. Se evaluaron los insecticidas más y menos tóxico de acuerdo con el bioensayo de aplicación topical, correspondiendo a Fast Plus (Abamectina) y Neem-X<sup>®</sup> (Azadiractina) en ocho y cinco dosis, respectivamente (Tabla 3), además de un testigo con agua destilada. Cada insecticida tuvo cinco réplicas de 15 abejas. El bioensayo consistió en ubicar las abejas en frascos de plástico de 1L de capacidad implementados de la misma manera descrita en el bioensayo anterior. Previamente a las abejas se les privó de alimento durante 4 horas y luego de este periodo se les suministró una jeringa de 20 mL con 5 mL, de una mezcla de miel (70%) más el insecticida para que se alimentaran *ad libitum* durante 4 horas. Pasado ese tiempo, se retiraron las jeringas y se les administró una dieta de 5 mL de miel (70%). La mortalidad se evaluó a las 24 horas y el criterio de mortalidad consistió en considerar como muerta aquella abeja que no reaccionaba a un estímulo externo, correspondiente a un toque con un pincel, y/o si se encontraban volteadas (Del Sarto *et al.*, 2014).

**Residualidad.** Se utilizó las metodologías de Husain *et al* (2014) y Abati *et al* (2023) con modificaciones. Se evaluaron las dosis comerciales de los insecticidas Tec Fort® (Piretrinas) y Fast Plus (Abamectina) debido a que presentaron la mayor toxicidad en laboratorio, junto con un testigo al cual se le aplicó agua. La primera parte del bioensayo se llevó a cabo en un huerto de manzanos, variedad Fuji de 8 años, ubicado en la Estación Experimental “El Nogal” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, Chile. El bioensayo consistió en bloques de tres árboles, distribuidos en tres hileras (Figura 1). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones de tres árboles cada una, de los cuales solo el central se evaluó utilizando los árboles laterales como protección para evitar la deriva. Las aplicaciones se realizaron con una Pulverizadora Levera de 50 litros de capacidad, y cada árbol se trató con un volumen de 2,6 L de solución. A las 2, 24 y 48 horas después de la aplicación (HDA) de los insecticidas, se recolectaron hojas al azar de los árboles tratados, que se almacenaron en bolsas de plástico, debidamente identificadas y trasladadas al Laboratorio de Entomología y Acarología. En laboratorio, las hojas se ubicaron en frascos de plástico de 1L de capacidad y para mantener la humedad de estas se mantuvo sus tallos en tubos Eppendorf de 1,5 mL con agua y agar al 2,0%. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento con 15 abejas por frasco. Las abejas, antes de ser inoculadas en los frascos, se ubicaron en un freezer a una temperatura de  $-15 \pm 2$  °C durante 5 minutos, para reducir su movilidad y agresión. Durante el transcurso del bioensayo, a las abejas se les suministró con jeringas de 20 mL una dieta de 5 mL de miel (70%) y 5 mL de agua destilada, ofrecida *ad libitum*. La mortalidad se evaluó 24, 48, 72 y 96 HDA de insecticidas a las hojas o hasta alcanzar un 50% de mortalidad en el testigo.

**Repelencia.** Este bioensayo se realizó con la metodología de Signoretti *et al* (2012), que registra el porcentaje de elección de los insectos, y se evaluaron solo las dosis comerciales recomendadas (DR) de los insecticidas (Tabla 2). Se utilizó un olfactómetro del tipo “Y”, conformado por un tubo de vidrio cuyos dos brazos laterales median 16,5 cm de largo y 3 cm de diámetro, conectados a un tubo central del mismo diámetro y dimensiones. Cada brazo se selló con un tapón de goma y conectó con una manguera plástica de 12,7 mm de diámetro a un matraz de vidrio

que contenía las fuentes de aroma (tratamiento o control). La fuente de aroma correspondiente al tratamiento contenía un algodón empapado con 20 mL de miel (70%) más la dosis comercial del insecticida, mientras que el control contenía un algodón empapado solamente con 20 mL de miel (70%). Cada brazo del tubo se conectó a una bomba de aire Super LB 1000 (Shanghai Luby Pet Industries Co., Shanghai, China) de una capacidad de 1,6 L min<sup>-1</sup> de flujo de aire que se filtró con carbón activado y humificó con un matraz que contenía agua destilada, y se reguló con medidores de flujo SHLLJ LZQ-6 (Yuyao Shunhuan Instruments Co., Shanghai, China), que proporcionaron un caudal constante de 1L de aire min<sup>-1</sup>. En cada brazo y base del tubo en forma de Y se trazaron líneas a una distancia de 7 cm del centro y luego se ubicaron individualmente 76 abejas, para posteriormente determinar el efecto repelente. Se observó el comportamiento durante cinco minutos desde que el insecto cruzó la línea umbral del tubo central y se registraron elecciones cuando un insecto cruzó la línea de uno de los dos brazos y permaneció allí durante al menos 20 segundos (Signoretto *et al* 2012). Las abejas que seleccionaron uno de los dos brazos durante cinco minutos fueron las únicas considerados en el bioensayo. Cada abeja se utilizó una sola vez para evitar el aprendizaje asociativo, y el tubo de vidrio se lavó entre réplicas, mientras que las conexiones con las fuentes de olor se alternaron en orden para minimizar el sesgo.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Los bioensayos de laboratorio se realizaron con un diseño experimental completamente al azar, mientras que el bioensayo de residualidad correspondió a un diseño experimental de bloques al azar. La mortalidad máxima aceptada en el testigo fue de 10% y los datos de los tratamientos de aplicación topical e ingestión se corrigieron con la fórmula de Abbott (1925). Los datos de aplicación topical e ingestión, se ajustaron a un modelo Probit (Finney, 1952) para estimar las concentraciones letales 50% (CL<sub>50</sub>) y 90%(CL<sub>90</sub>), utilizando el software PoloPlus. Los datos de residualidad se sometieron a un análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas y a una prueba de Tukey con un 95% de confianza ( $p \leq 0.05$ ). El análisis de residualidad se realizó con la prueba de supervivencia de Kaplan y Meier

(1958) con el software R. Los datos de repelencia se analizaron con una prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ), también con el software R.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Aplicación topical.** La mayor toxicidad por contacto se obtuvo con el tratamiento de Abamectina que, en su dosis comercial, la mitad y un octavo de esta, provocó un 100% de mortalidad de las abejas. Este insecticida incluso en la menor dosis evaluada (D1/64, 0,28 mg L<sup>-1</sup>) superó el 50% (57,89%) de mortalidad (Figura 2). Las Piretrinas, en su dosis comercial (D1.0, 45 mg L<sup>-1</sup>) ocasionaron una mortalidad de 53,19% (Figura 2), mientras que el NPVs en su dosis recomendada, no provocó mortalidad, teniendo que aumentarse ocho (C8.0, 408 mg L<sup>-1</sup>) y 128 (C128, 6528 mg L<sup>-1</sup>) veces esta para obtener una mortalidad de 8,45% y 90,14%, respectivamente (Figura 2). Por otra parte, *B. thuringiensis* y Azadiractina incluso con 32X y 64X de la dosis comercial, respectivamente, no superaron el 10% de mortalidad; por tanto, no se realizó un análisis Probit con estos dos últimos insecticidas, clasificándose como los menos tóxicos para abeja.

Al analizar las CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> (Tabla 4) se observa que el insecticida menos tóxico es NPVs (CL<sub>50</sub>= 2393 mg L<sup>-1</sup>), seguido por las Piretrinas (CL<sub>50</sub>= 39,82 mg L<sup>-1</sup>), mientras que el de mayor toxicidad es Abamectina con una CL<sub>50</sub>= 0,221 mg L<sup>-1</sup> y CL<sub>90</sub>= 0,77 mg L<sup>-1</sup>. Además, los límites fiduciales no se traslapan, lo que significa que los tratamientos son significativamente diferentes (Robertson y Presley, 1996). Igualmente, con base en la razón de toxicidad (TR<sub>50</sub>) Abamectina fue 180 y 10832 veces más tóxico para *A. mellifera* que las Piretrinas y NPVs, respectivamente. Al respecto, Del Sarto *et al* (2014) evaluaron tópicamente Abamectina y deltametrina (piretroide) sobre *A. mellifera* obteniendo que Abamectina fue moderadamente tóxica para *A. mellifera* incluso más que deltametrina. Estos resultados concuerdan con la presente investigación, ya que en su dosis comercial Abamectina fue altamente tóxica para las abejas, incluso en dosis subletales. Por otra parte, Stanley *et al* (2015) al evaluar deltametrina, obtuvieron que este insecticida en su dosis comercial provocó la muerte del 100% de las abejas 48 h después de la aplicación, lo que no concuerda con este trabajo, ya que las Piretrinas en su dosis comercial

provocaron un 53,19% de mortalidad de las abejas. Sin embargo, los resultados obtenidos sí concuerdan con Besard *et al* (2010) quienes evaluaron la dosis comercial de Abamectina y bifentrina, también piretroide, sobre *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae), los cuales resultaron altamente tóxicos y eliminaron al 100% de los abejorros. Si bien en su dosis comercial la Piretrina no provocó el 100% de mortalidad, sí se obtuvo esa mortalidad con Abamectina. En cuanto a Azadiractina, Demiozer *et al* (2022) evaluaron durante 15 días la mortalidad provocada por Nimbecidina (Azadiractina), en su dosis comercial, sobre *B. terrestris* obteniendo una mortalidad significativamente mayor en comparación al control. Lo anterior no concuerda con este estudio, ya que, si bien solo se evaluó la mortalidad 24 horas después de la aplicación, la toxicidad de Azadiractina, en su dosis comercial, no superó el 2,0% de mortalidad. Por otra parte, Mommaerts *et al* (2010) evaluaron Dipel (*B.thuringiensis* subsp. kurstaki) y Xentari (*B. thuringiensis* subsp. aizawai) en sus dosis máximas recomendadas para aplicación en campo sobre *B. terrestris*, obteniendo que estos insecticidas no superaron el 5,0% de mortalidad de abejorros, lo cual concuerda con el presente estudio, ya que Dipel no superó el 8,0% de mortalidad en su dosis comercial. En cuanto a NPVs, se podría inferir que no resultó tóxico para las abejas debido a que para que ejerza su acción este compuesto debe ser ingerido, lo que no ocurre con una aplicación topical. Un motivo de la diversidad de resultados puede deberse a que no hubo un control íntegro de la edad de las abejas, siendo posible que, en el grupo seleccionado para realizar el bioensayo, se encontraran abejas de distintos días de eclosión, y considerando los valores de heterogeneidad y lo planteado por Amdam *et al* (2007) y Rueppell *et al* (2008), cabe la posibilidad que las abejas de mayor edad, hubieran experimentado un descenso de sus niveles de vitelogenina, debido a que se prepararon para transformarse en obreras recolectoras, lo que puede provocar un estrés fisiológico e incrementar la susceptibilidad de las abejas. Lo anterior justifica el motivo por el cual se evaluó la mortalidad solo hasta las 24 horas, ya que, pasado ese periodo de tiempo, la mortalidad del testigo superaba el 10% aceptado para este tipo de experimentos.

**Ingestión.** Al igual que en el bioensayo de aplicación topical, Abamectina provocó una mortalidad de 100% en su dosis comercial (C1.0, 18 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 5) mientras que en la menor dosis evaluada (C1/128, 0,14 mg L<sup>-1</sup>) se registró un 20,5% de abejas muertas (Figura 5). En contraparte, Azadiractina en su dosis comercial presentó un 1,4% de abejas muertas, por lo cual se debió aumentar la dosis 64 veces (1024 mg L<sup>-1</sup>) para alcanzar una mortalidad máxima de 58,5% (Figura 3). Al analizar las CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> (Tabla 5) se comprueba que el insecticida menos tóxico es Azadiractina (CL<sub>50</sub>=800,37 mg L<sup>-1</sup>). Además, los límites fiduciales no se traslapan, por lo que ambos tratamientos son significativamente diferentes (Robertson y Presley, 1996), y de acuerdo con la razón de toxicidad al 50% (TR<sub>50</sub>), Abamectina es 3620 veces más tóxico para *A. mellifera* que Azadiractina.

Los resultados obtenidos concuerdan con Del Sarto *et al* (2014) quienes concluyeron que el insecticida más tóxico al ser ingerido por *A. mellifera* es Abamectina. Sin embargo, la heterogeneidad (1,74), de los resultados obtenidos implica que estos poseen alta dispersión y en consecuencia son poco representativos. Al igual que en la aplicación topical, la heterogeneidad de los datos se pudo deber a la manipulación del material biológico o a su edad. En el caso de la Azadiractina, el valor de heterogeneidad fue de 0,662, lo cual indica que los datos son menos dispersos y por tanto más representativos. De acuerdo con Aljedani (2017), quien evaluó la toxicidad por ingestión de Abamectina sobre *A. mellifera jemenatica*, suministrando 0,1 ppm de insecticida y evaluando la toxicidad en distintos tiempos obtuvo que el 50% de los insectos tardan 21 h en morir y el 90% 130 h. Si bien en el presente estudio no se hizo el mismo experimento, la concentración evaluada por Aljedani (2017) es similar a la concentración 1/128 (0,14 mg L<sup>-1</sup>) con la que se obtuvo una mortalidad de 20,55% a las 24 h, lo cual no coincide con este autor. Sin embargo, en aquel estudio los insectos evaluados eran obreras obtenidas en campo, a diferencia de la presente investigación en que se utilizaron obreras con pocos días de eclosión. Lopes-Amaral *et al* (2015) suministraron una dieta con distintas concentraciones de Azadiractina, obteniendo que, a mayor dosis del insecticida, mayor era la mortalidad, lo cual concuerda con el presente estudio. Igualmente, en un estudio realizado por Libardoni *et al* (2021), la tasa de

supervivencia de las abejas luego de 144 h de consumido alimento contaminado con Dipel (*B. thuringiensis*), fue de 80%. Si bien en el presente trabajo solo se evaluó hasta las 24 h, la tasa de supervivencia de las abejas luego de consumir alimento contaminado con la dosis comercial de este insecticida fue de casi un 99%, lo cual no concuerda con el estudio mencionado.

Tal como se mencionó en el bioensayo anterior, el aumento de la concentración de la hormona juvenil y el descenso de la concentración de vitelogenina en las abejas de mayor edad, que implican un mayor nivel de estrés fisiológico y como consecuencia una mayor susceptibilidad, podría explicar la alta heterogeneidad en los datos obtenidos con Abamectina.

**Residualidad.** En todos los tratamientos se produjo una reducción de la longevidad de las abejas en comparación con el control. A su vez, mientras menor fue el tiempo entre la aplicación del insecticida y el contacto con las abejas, menor fue la supervivencia de estas.

**2 horas después de la aplicación:** Las abejas expuestas a las hojas de manzano después de 2 h de ser tratadas con Piretrinas presentaron una supervivencia de 96% a las 24 h, y tras 120 h de exposición continuó vivo un 31% (Figura 4). Sin embargo, no se registró diferencia significativa respecto al control ( $p= 0,0572$ ). Las abejas expuestas a hojas tratadas con Abamectina, mostraron una supervivencia a las 24 h de 8%, y tras 48 h de exposición la tasa de supervivencia fue de 0% (Figura 4), encontrándose diferencias significativas entre el control, que sobrevivió un 82,7%, y este insecticida ( $p\leq 0,05$ ).

**24 horas después de la aplicación:** Las abejas expuestas a las hojas tratadas con Piretrinas, 24 h después de la aplicación, tuvieron un 90,6% de supervivencia a las 24 h, y tras 120 h de exposición continuó vivo un 49,3% (Figura 5). Además, no se observó diferencia significativa con el control ( $p= 0,9893$ ). Pero, cuando las abejas se expusieron a las hojas tratadas con Abamectina, la supervivencia de estas a las 24 h fue de 53,3%, y tras 96 h de exposición la tasa de supervivencia fue nuevamente de 0% (Figura 5), registrándose diferencia significativa respecto al control (77,3%) y este tratamiento ( $p\leq 0,05$ ).

**48 horas después de la aplicación:** La supervivencia a las 24 h de las abejas expuestas a Piretrinas fue de 76% y tras 96 h de exposición continuó vivo un 33% (Figura 6), sin encontrarse diferencia significativa respecto al control ( $p= 0,469$ ). En el caso de Abamectina, la supervivencia a las 24 h fue de 92%, y tras 96 h continuó vivo un 30,7% (Figura 6), encontrándose diferencia significativa con el control ( $p= 0,0173$ ), que presentó un 54,7% de sobrevivencia, pero no con las Piretrinas ( $p= 0,9185$ ).

Abati *et al* (2023) evaluaron la toxicidad residual sobre obreras de *A. mellifera* del piretroide beta-ciflutrina, obteniendo en comparación con el control, una reducción en la longevidad de las abejas tratadas. Considerando que beta-ciflutrina es una versión sintética de las Piretrinas, con el mismo modo de acción, pero con una mayor residualidad, su actividad concuerda con lo obtenido en este estudio. Sin embargo, estos autores obtuvieron diferencias significativas con el control, cuando las abejas fueron expuestas a hojas tratadas con beta-ciflutrina el día del bioensayo, encontrándose casi todas las abejas muertas después de 18h de exposición. Lo anterior no concuerda con este trabajo, ya que no hay diferencias significativas entre el control y las Piretrinas, y 24 h después de la exposición a las hojas tratadas con Piretrinas el 96% de las abejas continuaron vivas. Lo anterior se puede deber a que los compuestos sintéticos tienen mayor residualidad, a diferencia de los productos naturales, cuya residualidad es menor debido a que se degradan más rápido por efecto de la luz y temperatura (Aylara *et al.*, 2023).

En contraparte, Mubin *et al* (2024) evaluaron el efecto residual de Abamectina en condiciones de laboratorio sobre *Tetragonula laeviceps* S. (Hymenoptera: Apidae), registrando la mortalidad 48 horas después de la exposición, obteniendo que Abamectina en su dosis comercial provoca una mortalidad de 13,3% de las abejas, y a medida que aumentó la dosis se incrementó la mortalidad. Estos datos no concuerdan con la presente investigación, debido a que Abamectina no presentó diferencia significativa con el control y las Piretrinas. Lo anterior se puede deber a que, a pesar de utilizar árboles como barrera, de igual manera los correspondientes al testigo pudieron verse expuestos a la deriva de los insecticidas, lo que explicaría

que entre el testigo y el tratamiento con Piretrinas no se encontraran diferencias significativas.

**Repelencia.** Con la sola excepción de NPVs, todos los tratamientos restantes fueron repelentes. El que presentó mayor actividad fue *B. thuringiensis*, con 63,16% de preferencia por el control versus un 36,84% por el alimento contaminado (Figura 10). En Azadiractina, el 51,32% de las abejas prefirió el control y el 48,68% el alimento contaminado, mientras que con Abamectina y Piretrinas el 53,95% prefirió el control y el 46,05% el alimento contaminado. NPVs presentó un efecto atrayente en las abejas, con un 55,26% de preferencia por el alimento contaminado y un 44,74% que prefirió el control (Figura 10). Sin embargo, la cercanía de los valores para ambos tratamientos se puede explicar con la prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) que indicó que el insecto no fue atraído ni repelido significativamente por la fuente de alimento tratada con diferentes insecticidas, por lo que la elección tomada por *A. mellifera* fue de manera aleatoria ( $p= 0,1338$ ). Además, esta prueba también mostró que existen diferencias significativas entre los resultados de *B. thuringiensis* y NPVs ( $p= 0,01346$ ).

Barbosa *et al* (2015) evaluaron la repelencia en distintas concentraciones de Azadiractina y con la dosis comercial obtuvieron una repelencia de 7,0%, lo cual no concuerda con este estudio, en que se obtuvo un 51,32% de repelencia. Además, cuando se evaluó la toxicidad de este insecticida por aplicación topical e ingestión, se registró que no provocaban la muerte de las abejas en sus dosis comerciales por lo que, se puede inferir que, si se aplica en campo, aunque las abejas se vean atraídas por las flores contaminadas, no habría un efecto nocivo en estas. Por otra parte, Havstad *et al* (2019) evaluaron la repelencia de los piretroides, lambda-cihalotrina y alfa-cipermetrina, en condiciones de campo durante 7 días, obteniendo una repelencia de 40% y 17% respectivamente, lo cual tampoco concuerda con el presente estudio en que se obtuvo una repelencia de 53,95%. Si bien, las condiciones en que ambas investigaciones se realizaron difieren de la presente investigación, ambos estudios arrojaron que la repelencia no es alta, por lo que un porcentaje indeterminado de abejas seleccionarán al azar las flores o el alimento contaminado. Tal como se demostró en los bioensayos de aplicación topical y

residualidad, las abejas al verse expuestas a las Piretrinas podrían intoxicarse, ya sea al entrar en contacto con las flores contaminadas en campo o bien en la colonia a medida que transcurre el tiempo. Mubin *et al* (2024) evaluaron el efecto repelente de Abamectina sobre *T. laeviceps*, obteniendo que las abejas son más atraídas por la miel que por el insecticida; sin embargo, al mezclar el insecticida con miel, aumentaba la atracción por el insecticida hasta un 66,67%. Este último antecedente, si bien difiere con lo obtenido en el presente estudio, en que las abejas fueron atraídas por Abamectina en un 46,05%, indica que la miel es quien las atrae y no el insecticida. En campo, las abejas al visitar las flores buscan una fuente de alimento que son el néctar y polen, y si bien estos componentes no son similares a la miel, si son necesarios para la elaboración de esta, la cual utilizan como reserva de alimento. Con base en lo anterior, y teniendo en cuenta los antecedentes y resultados obtenidos, las abejas no distinguen si las flores están contaminadas o no con Abamectina, por lo que se verían expuestas al insecticida si este fuera aplicado a las flores; además teniendo en consideración los resultados de aplicación topical, ingestión y residualidad, es probable que las abejas mueran en campo al verse expuestas a los residuos de este insecticida o en la colmena debido a la residualidad del insecticida.

Los resultados con *B. thuringiensis* señalan que las abejas son atraídas en un 63,16% por el alimento sin contaminar, por lo que son repelidas por el alimento contaminado con Bt. Considerando su baja toxicidad, los resultados indicarían que, si bien existe un riesgo bajo, si las abejas consumen este insecticida, esta posibilidad es aún menor debido a que las abejas no se sienten atraídas por las flores contaminadas con Bt. Por otra parte, NPVs tampoco fue evaluado por ingestión; sin embargo, al tener un modo de acción similar a Bt, se puede asumir que también tendría un efecto nocivo en las abejas si estas lo ingieren. A diferencia de Bt, los resultados indican que NPVs es atrayente para las abejas, con un 55,26% de preferencia, por lo que, si este insecticida es aplicado en campo, las abejas se verían mayormente expuestas puesto que serían atraídas por las flores contaminadas.

## CONCLUSIÓN

El presente trabajo contribuye con información acerca de la toxicidad directa, sobre la especie polinizadora *A. mellifera*, de los bioinsecticidas más utilizados en Chile. De los resultados obtenidos se puede concluir:

- Los bioinsecticidas cuyos compuestos activos son Abamectina y Piretrinas son los más nocivos para las abejas, tanto en sus dosis comerciales como en dosis subletales, y sus diversas formas de exposición (toxicidad, ingestión, residualidad y repelencia)
- Azadiractina y *B. thuringiensis* son los compuestos menos tóxicos para las abejas en todas las formas de exposición (toxicidad, ingestión y repelencia)
- Aunque, NPVs no es tóxico para las abejas, se debe considerar que resultó un compuesto atrayente para más de la mitad de los adultos usados.

Finalmente, se debe señalar que, los resultados obtenidos por este estudio son importantes de considerar a la hora de establecer estrategias de manejo de plagas. La transferencia de estos resultados a productores y tomadores de decisiones del sector en el futuro próximo es muy relevante para poder tributar a los ODS (Objetivos de Desarrollo Sostenible). Principalmente al ODS12, para la Producción y Consumo Responsable; y al ODS 15, para la Vida de Ecosistemas Terrestres.

## REFERENCIAS CITADAS

- Abati, R., G. Libardoni, G. Osowski, E. de Souza Vismara, F.M. Costa-Maia, E.R. Lozano, P.F. Adami and M. Potrich. 2023. Residual effect of imidacloprid and beta-cyfluthrin on Africanized *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) workers. *Apidologie*. 54(3): 26. <https://doi.org/10.1007/s13592-023-01005-z>
- Abay, Z., A. Bezabeh, A. Gela and A. Tassew. 2023. Evaluating the Impact of Commonly Used Pesticides on Honeybees (*Apis mellifera*) in North Gonder of Amhara Region, Ethiopia. *Journal of Toxicology*. 2023(1): 2634158. <https://doi.org/10.1155/2023/2634158>
- Aljedani, D.M. 2017. Effects of abamectin and deltamethrin to the foragers honeybee

- workers of *Apis mellifera jemenitica* (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. Saudi Journal of Biological Sciences. 24(5): 1007-1015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.007>
- Amdam, G.V., K.A. Nilsen, K. Norberg, M.K. Fondrk and K. Hartfelder. 2007. Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. The American Naturalist. 170(1): 37-46.
- Ayilara, M.S., B.S. Adeleke, S.A. Akinola, C.A. Fayose, U.T. Adeyemi, L.A. Gbadegesin, R.K. Omole, R.M. Johnson, Q.O. Uthman and O.O. Babalola. 2023. Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. Frontiers in Microbiology. 14: 1040901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>
- Belzunces, L.P., S. Tchamitchian and J.L. Brunet. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. Apidologie. 43: 348-370. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0134-0>
- Besard, L., V. Mommaerts, J. Vandeven, X. Cuvelier, G. Sterk and G. Smagghe. 2010. Compatibility of traditional and novel acaricides with bumblebees (*Bombus terrestris*): a first laboratory assessment of toxicity and sublethal effects. Pest Management Science. 66(7): 786-793. <https://doi.org/10.1002/ps.1943>
- Damalas, C.A. and S.D. Koutroubas. 2018. Current status and recent developments in biopesticide use. Agriculture. 8(1): 13. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010013>
- de Maagd, R.A., D. Bosch and W. Stiekema. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. Trends in Plant Science. 4(1): 9-13. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(98\)01356-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(98)01356-9)
- Del Sarto, M.C.L., E.E. Oliveira, R.N.C. Guedes and L.A.O. Campos. 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. Apidologie, 45:

626-636. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0281-6>

Demirozer, O., A. Uzun and A. Gosterit. 2022. Lethal and sublethal effects of different biopesticides on *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 53(2): 24. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00933-6>

Garibaldi, L.A., C.L. Morales, L. Ashworth, N.P. Chacoff y M.A. Aizen. 2012. Los polinizadores en la agricultura.

González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J.A. Villanueva-Jiménez, M.T. Santillán Galicia, C.B. Peña-Valdivia and J.A. Santizo-Rincón. 2016. Effects of neem (*Azadirachta indica*) on honey bee workers and queens, while applied to control *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*. 55(5): 413–421. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1260239>

Grillone, G., D. Laurino, A. Manino and M. Porporato. 2017. Toxicity of thiametoxam on in vitro reared honey bee brood. *Apidologie*. 48: 635-643. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0506-6>

Gupta, R.C. and J.W. Crissman. 2013. Agricultural chemicals. In Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Academic Press. 1349-1372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00042-X>

Havstad, L.T., J.I. Øverland, S. Valand and T.S. Aamlid. 2019. Repellency of insecticides and the effect of thiacloprid on bumble bee colony development in red clover (*Trifolium pratense* L.) seed crops. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 69(5): 439-451. <https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1596301>

He, Q., Q. Yang, Q. Liu, Z. Hu, Q. Gao, Y. Dong, J. Xiao, L. Yu and H. Cao. 2022. The effects of beta-cypermethrin, chlorbenzuron, chlorothalonil, and pendimethalin on *Apis mellifera* ligustica and *Apis cerana cerana* larvae reared in vitro. *Pest Management Science*. 78(4): 1407-1416. <https://doi.org/10.1002/ps.6757>

Henry, M., N. Cerrutti, P. Aupinel, A. Decourtye, M. Gayrard, J.F. Odoux, A. Pissard,

- C. Rünge and V. Bretagnolle. 2015. Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1819), 20152110. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2110>
- Husain, D., M. Qasim, M. Saleem, M. Akhter and K.A. Khan. 2013. Bioassay of insecticides against three honeybee species in laboratory conditions. *Cercetari Agronomice in Moldova*. 47(2): 69–79. <https://doi.org/10.2478/cerce-2014-0018>
- Jeschke, P., R. Nauen, M. Schindler and A. Elbert. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(7): 2897-2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>
- Klein, A.M., B.E. Vaissiere, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *P. Roy. Soc. B. Biol. Sci.* 274: 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Laycock, I., K.C. Cotterell, T.A. O’Shea-Wheller and J.E. Cresswell. 2014. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 100: 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.027>
- Li, G., H. Zhao, D. Guo, Z. Liu, H. Wang, Q. Sun, Q. Liu, B. Xu and X. Guo. 2022. Distinct molecular impact patterns of abamectin on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 232: 113242. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113242>
- Libardoni, G., P.M.O.J. Neves, R. Abati, A.R. Sampaio, F.M. Costa-Maia, E. de Souza Vismara, E.R. Lozano and M. Potrich. 2021. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*. 11(1): 3482. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82874-1>

- Lopes-Amaral, R., M. Venzon, S. Martins Filho and M.A.P. Lima. 2015. Does ingestion of neem-contaminated diet cause mortality of honey bee larvae and foragers?. *Journal of Apicultural Research*. 54(4): 405–410. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1159821>
- Markham, T.E., A.C. Kotze, P.J. Duggan and M.R. Johnston. 2020. Reduction Chemistry of Natural Pyrethrins and Preliminary Insecticidal Activity of Reduced Pyrethrins. *Australian Journal of Chemistry*. 74(4):268-281. <https://doi.org/10.1071/CH20302>
- Mommaerts, V., K. Jans and G. Smagghe. 2010. Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Management Sciences*. 66(5): 520-525. <https://doi.org/10.1002/ps.1902>
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of Baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 257–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257>
- Mubin, N., R. Nurvaidah, N.R. Kusdiandini and B.H. Audia. 2024. Effect of abamectin and profenofos insecticide on stingless bee, *Tetragonula laeviceps* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 1346: 012027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1346/1/012027>
- Nava-Bolaños, A., L. Osorio-Olvera y J. Soberón. 2022. Estado del arte del conocimiento de biodiversidad de los polinizadores de México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 93. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.3948>
- Ollerton, J., R. Winfree and S. Tarrant. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*. 120(3): 321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Phan, N.T., N.K. Joshi, E.G. Rajotte, M.M. López-Uribe, F. Zhu and D.J. Biddinger.

2020. A new ingestion bioassay protocol for assessing pesticide toxicity to the adult Japanese orchard bee (*Osmia cornifrons*). Scientific Reports. 10(1): 9517. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66118-2>
- Qu, M., H. Merzendorfer, B. Moussion and Q. Yang. 2022. Bioinsecticides as future mainstream pest control agents: Opportunities and challenges. Frontiers of Agricultural Science and Engineering. 9: 82-97. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2021404>
- Rembold, H., G.K. Sharma, C. Czoppelt and H. Schmutterer. 1982. Azadirachtin: A potent insect growth regulator of plant origin. Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 93(1-5): 12-17. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1982.tb03564.x>
- Rueppell, O., R. Linford, P. Gardner, J. Coleman and K. Fine. 2008. Aging and demographic plasticity in response to experimental age structures in honeybees (*Apis mellifera* L). Behavioral Ecology and Sociobiology. 62: 1621-1631. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0591-7>
- Signoretti, A.G.C., M.F.G.V. Peñaflor and J.M.S. Bento. 2012. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae), female moths respond to herbivore-induced corn volatiles. Neotropical Entomology. 41: 22-26. <https://doi.org/10.1007/s13744-011-0003-y>
- Soberón, M. and A. Bravo. 2008. Avoiding insect resistance to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. ISB News Report.
- Stanley, D.A., S.M. Msweli and S.D. Johnson. 2020. Native honeybees as flower visitors and pollinators in wild plant communities in a biodiversity hotspot. Ecosphere. 11(2): e02957. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2957>
- Stanley, J. and G. Preetha. 2016. Pesticide toxicity to pollinators: Exposure, toxicity and risk assessment methodologies. Pesticide Toxicity to Non-target Organisms: Exposure, Toxicity and Risk Assessment Methodologies. 153-228.

- Stanley, J., K. Sah, S.K. Jain, J.C. Bhatt and S.N. Sushil. 2015. Evaluation of pesticide toxicity at their field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through laboratory, semi-field and field studies. *Chemosphere*, 119: 668-674. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.039>
- Steinigeweg, C., A.T. Alkassab, S. Erler, H. Beims, I.P. Wirtz, D. Richter and J. Pistorius. 2022. Impact of a microbial pest control product containing *Bacillus thuringiensis* on brood development and gut microbiota of *Apis mellifera* worker honey bees. *Microbial Ecology*. 85(4): 1300-1307. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02004-w>
- Suryanarayanan, S. and D.L. Kleinman. 2013. Be (e) coming experts: The controversy over insecticides in the honey bee colony collapse disorder. *Social Studies of Science*. 43(2): <https://doi.org/10.1177/0306312712466186> 215-240.
- vanEngelsdorp, D. and M.D. Meixner. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S80-S95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>
- Whalon, M.E. and B.A. Wingerd. 2003. Bt: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54(4): 200-211. <https://doi.org/10.1002/arch.10117>
- Williams, I.H. 1996. Aspects of bee diversity and crop pollination in the European Union.
- Winston M.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press.
- Yasuda, M., Y. Sakamoto, K. Goka, T. Nagamitsu and H. Taki. 2017. Insecticide susceptibility in Asian honey bees (*Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae)) and implications for wild honey bees in Asia. *Journal of Economic Entomology*. 110(2): 447-452. <https://doi.org/10.1093/jee/tox032>

Yoon, Y.J., E.S. Kim, Y.S. Hwang and C.Y. Choi. 2004. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 626-634. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1491-4>

Zattara, E.E. and M.A. Aizen. 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth*, 4(1): 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Insecticidas evaluados en condiciones de laboratorio sobre *A. mellifera*.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Concentración ingrediente activo	Clasificación grupo IRAC*
FAST PLUS	Abamectina	18 g L <sup>-1</sup>	6. Moduladores alostéricos del canal de cloro regulado por glutamato
NEEM-X <sup>®</sup>	Azadiractina	4,0 g L <sup>-1</sup>	UN. Compuestos de modo de acción desconocido
DIPEL <sup>®</sup> WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki	64 g Kg <sup>-1</sup>	11. Disruptores microbianos de las membranas digestivas de insectos
EN VIVO SC <sup>®</sup>	Virus de la poliedrosis múltiple nuclear de <i>Mamestra brassicae</i>	281,88 g L <sup>-1</sup>	31. Baculovirus
TEC FORT <sup>®</sup>	Piretrinas	22,5 g L <sup>-1</sup>	3. Moduladores del canal de sodio

\*IRAC= "The Insecticide Resistance Action Committee". The IRAC mode of action classification online (IRAC International, 2024) ([www.irc-online.org](http://www.irc-online.org))

Tabla 2. Concentraciones del ingrediente activo evaluadas en bioensayo de aplicación topical sobre obreras de *A. mellifera*.

Ingrediente activo	Concentraciones (mg L <sup>-1</sup> )							
	C1/64	C1/32	C1/16	C1/8	C1/2	DR*1.0		
Abamectina	0.28	0.56	1.125	2.25	9	18		
Azadiractina	DR*1.0	C2.0	C4.0	C8.0	C16	C32	C64	
	16	32	64	128	256	512	1024	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki	DR*1.0	C2.0	C4.0	C8.0	C16	C32		
	64	128	256	512	1024	2048		
Nucleopoliedrovirus (NPVs)	DR*1.0	C2.0	C4.0	C8.0	C16	C32	C64	C128
	51	102	204	408	816	1632	3264	6528
Piretrinas	C1/32	C1/8	C1/2	DR*1.0	C2.0	C4.0		
	1.4	5.6	22.5	45	90	180		

\*DR= Dosis comercial recomendada por el fabricante.

Tabla 3. Concentraciones del ingrediente activo evaluadas en bioensayo de ingestión sobre obreras de *A. mellifera*.

Ingrediente activo	Concentraciones (mg L <sup>-1</sup> )							
	<b>1/128</b>	<b>C1/64</b>	<b>C1/32</b>	<b>C1/16</b>	<b>C1/8</b>	<b>C1/4</b>	<b>C1/2</b>	<b>DR*1.0</b>
Abamectina	0.14	0.28	0.56	1.125	2.25	4.5	9	18
Azadiractina	<b>DR*1.0</b>	<b>C8.0</b>	<b>C16</b>	<b>C32</b>	<b>C64</b>			
	16	128	256	512	1024			

\*DR= Dosis comercial recomendada por el fabricante.

Tabla 4. Concentración letal 50% (CL<sub>50</sub>) y 90% (CL<sub>90</sub>) de insecticidas naturales evaluados sobre *A. mellifera* mediante aplicación Topical luego de 24 horas de exposición.

Ingrediente activo	b ±EE <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	CL <sub>90</sub> (LC 95%) <sup>b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	TR <sub>50</sub> <sup>c</sup>
Abamectina	2,365 ± 0,388	0,221 (0.109-0.311)	0,77 (0.582-1.242)	1.0
Nucleopoliedrovirus (NPVs)	2,011 ± 0,243	2393,9 (1844.4-3088.5)	10386 (6983.9-20505)	10832
Piretrinas	1,411 ± 0,29	39,82 (8.85-67.05)	322,2 (156.1-7292.9)	180

<sup>a</sup> Valor de pendiente. <sup>b</sup> Concentración letal al 50% y 90% de efectividad con límites fiduciales al 95% de probabilidad. <sup>c</sup> Toxicidad relativa al 50% de mortalidad.

Tabla 5. Concentración letal 50% (CL<sub>50</sub>) y 90% (CL<sub>90</sub>) de insecticidas naturales evaluados sobre *A. mellifera* mediante ingestión luego de 24 horas de exposición.

Ingrediente activo	b ±EE <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	CL <sub>90</sub> (LC 95%) <sup>b</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	TR <sub>50</sub> <sup>c</sup>
Abamectina	2,098 ± 0,207	0,233 (0,166-0,3)	0,949 (0,725-429)	1,0
Azadiractina	2,093 ± 0,402	800,37 (631,88-1103,34)	3278,05 (1990,14-9370,63)	3621

<sup>a</sup>Valor de pendiente. <sup>b</sup>Concentración letal al 50% y 90% de efectividad con límites fiduciales al 95% de probabilidad.

<sup>c</sup>Toxicidad relativa al 50% de mortalidad.

## INDICE DE FIGURAS

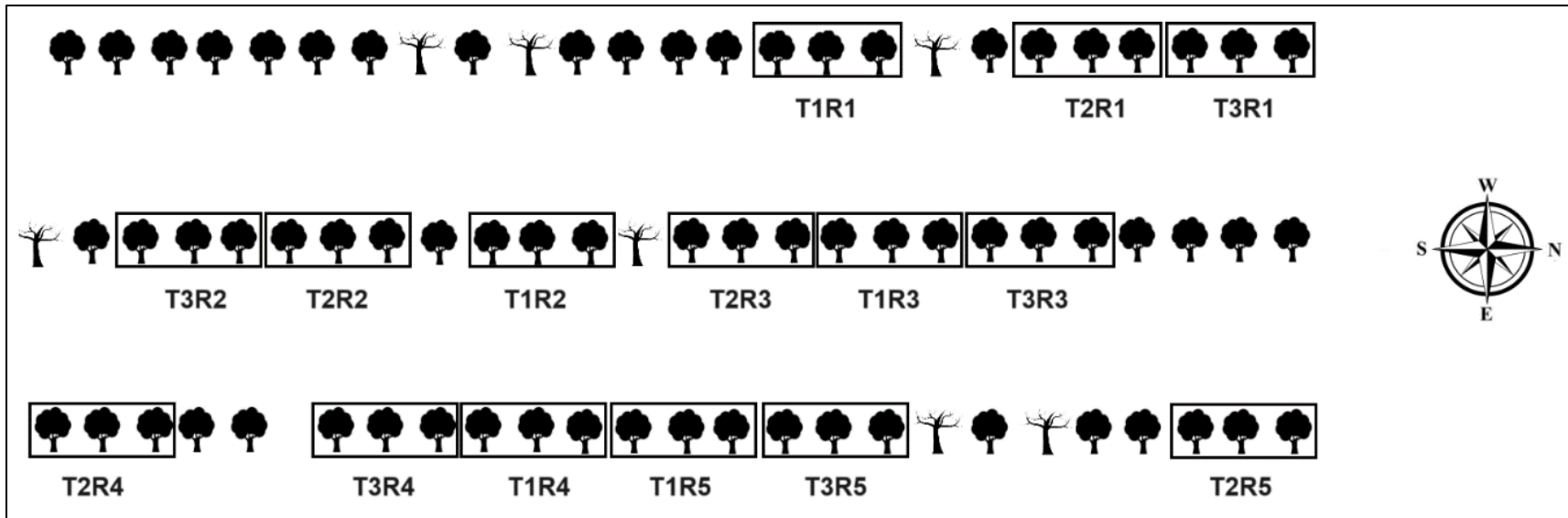


Figura 1. Distribución de los tratamientos en el huerto de manzano en la Estación Experimental El Nogal. T= Tratamiento, R= Repeticiones.

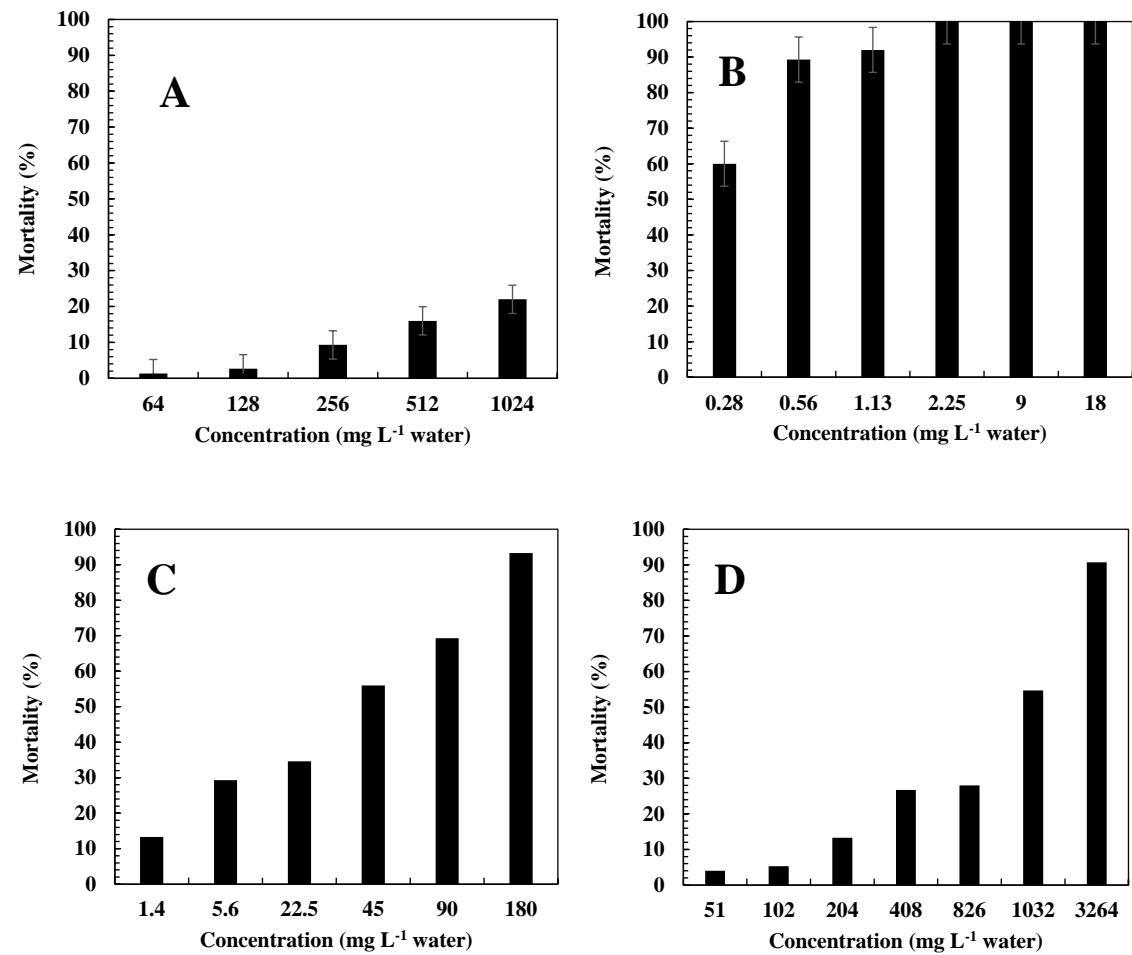


Figura 2. Mortalidad (%) por toxicidad de contacto de Azadiractina (A), Abamectina (B), Piretrinas (C) y Virus de la poliedrosis múltiple nuclear de *Mamestra brassicae* (NPVs) (D) contra *Apis mellifera*.

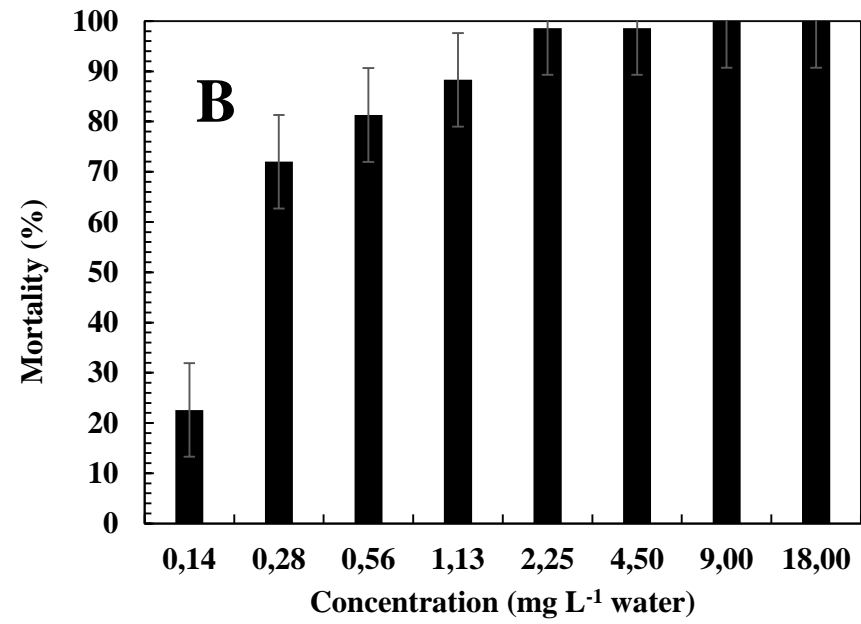
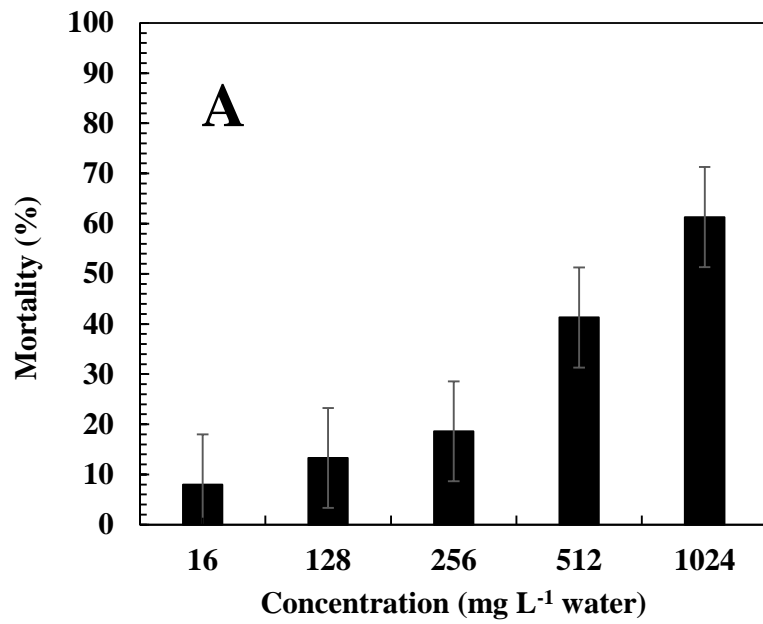


Figura 3. Mortalidad (%) por toxicidad por ingestión de Azadiractina (A) y Abamectina (B) contra *Apis mellifera*.

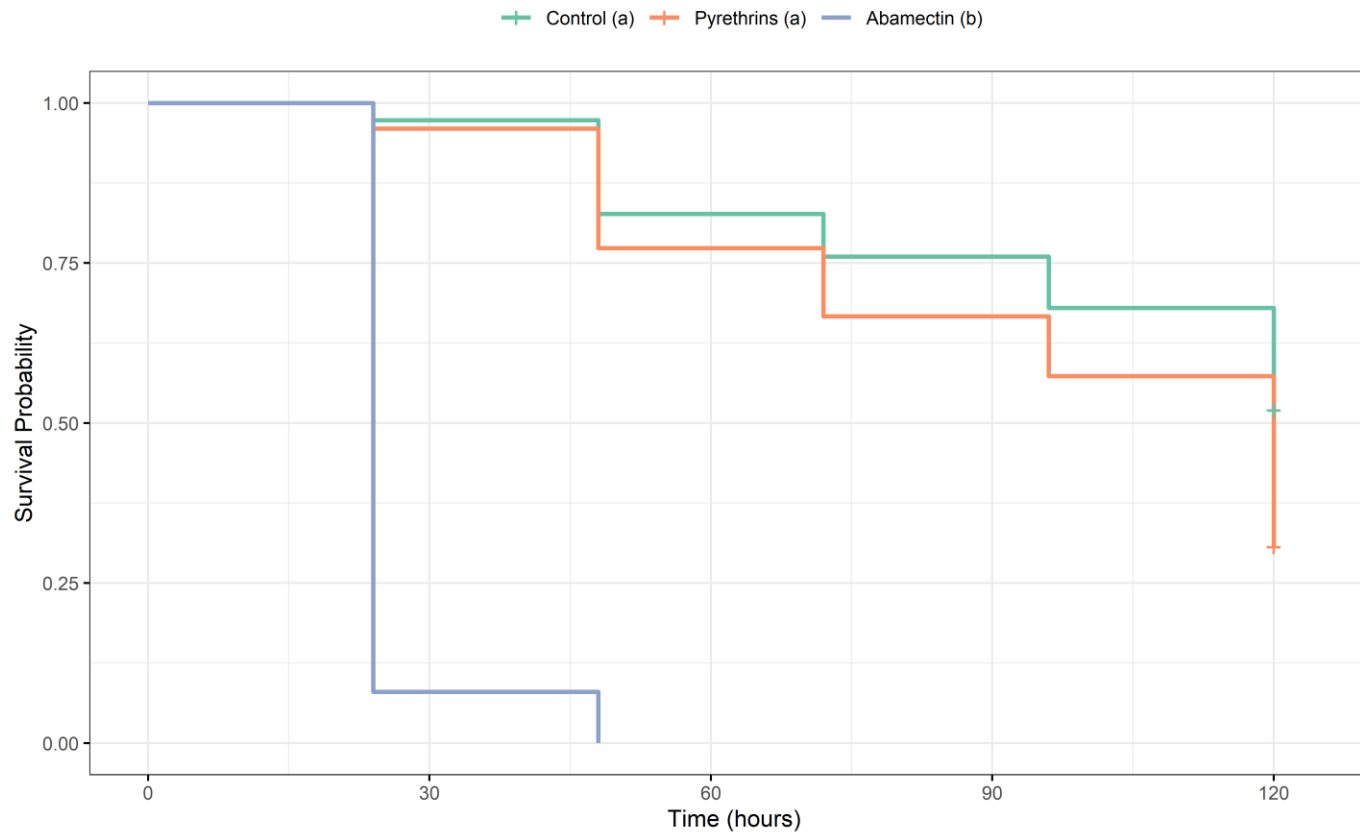


Figura 4. Probabilidades de supervivencia de *A. mellifera* expuestas a hojas de manzano tratadas con agua, Abamectina y Piretrinas 2 horas antes del bioensayo de residualidad. Valores con letras distintas indican que presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

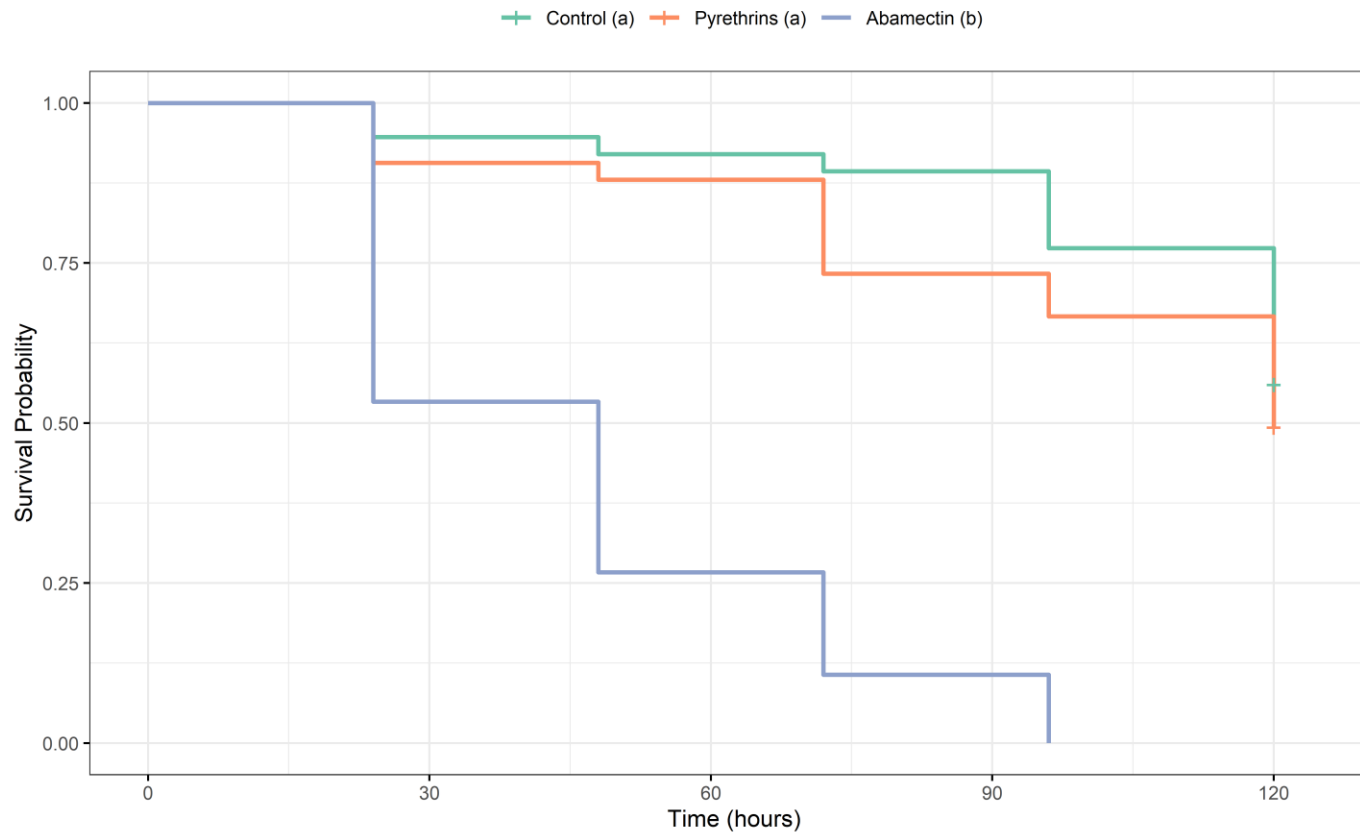


Figura 5. Probabilidades de supervivencia de *A. mellifera* expuestas a hojas de manzano tratadas con agua, Abamectina y Piretrinas 24 horas antes del bioensayo de residualidad. Valores con letras distintas indican que presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

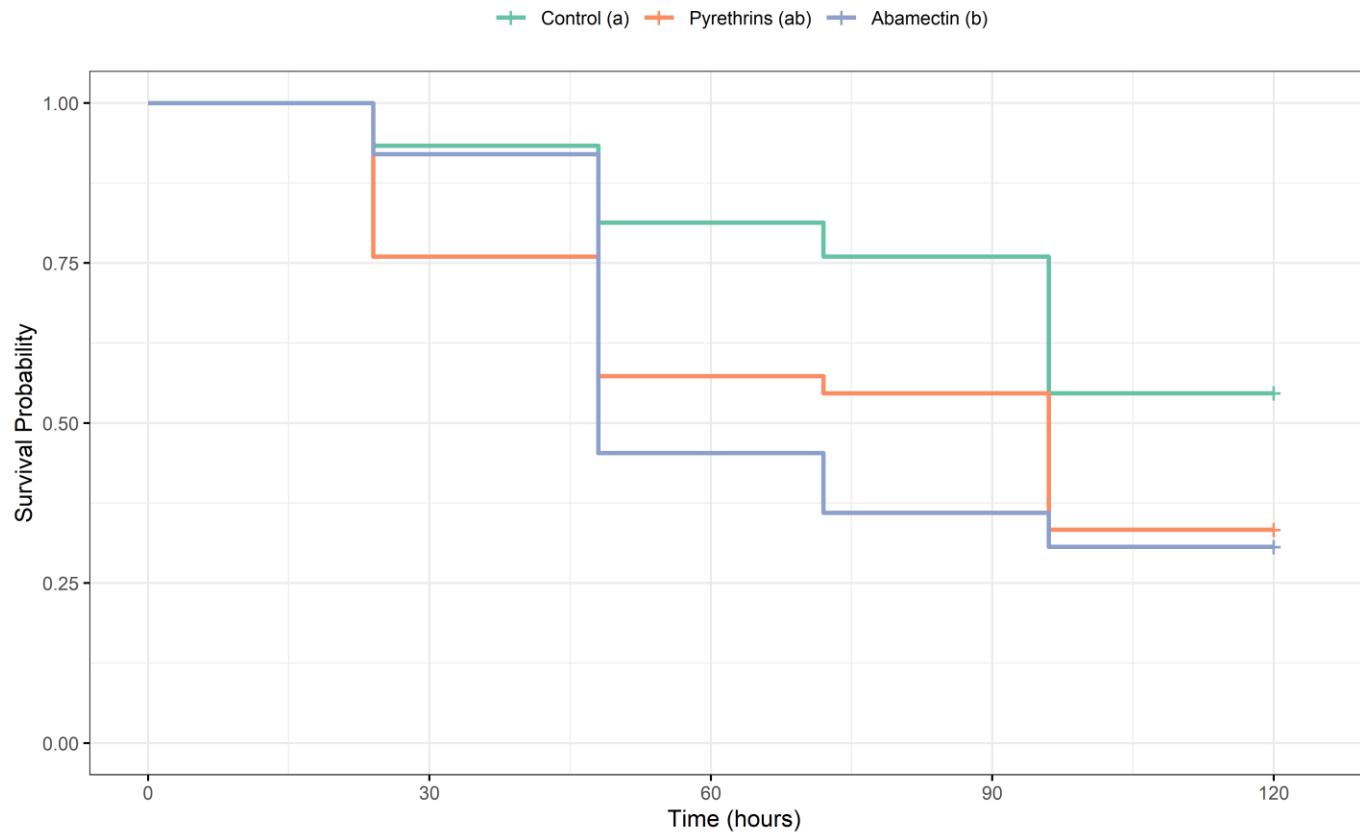


Figura 6. Probabilidades de supervivencia de *A. mellifera* expuestas a hojas de manzano tratadas con agua, Abamectina y Piretrinas 48 horas antes del bioensayo de residualidad. Valores con letras distintas indican que presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

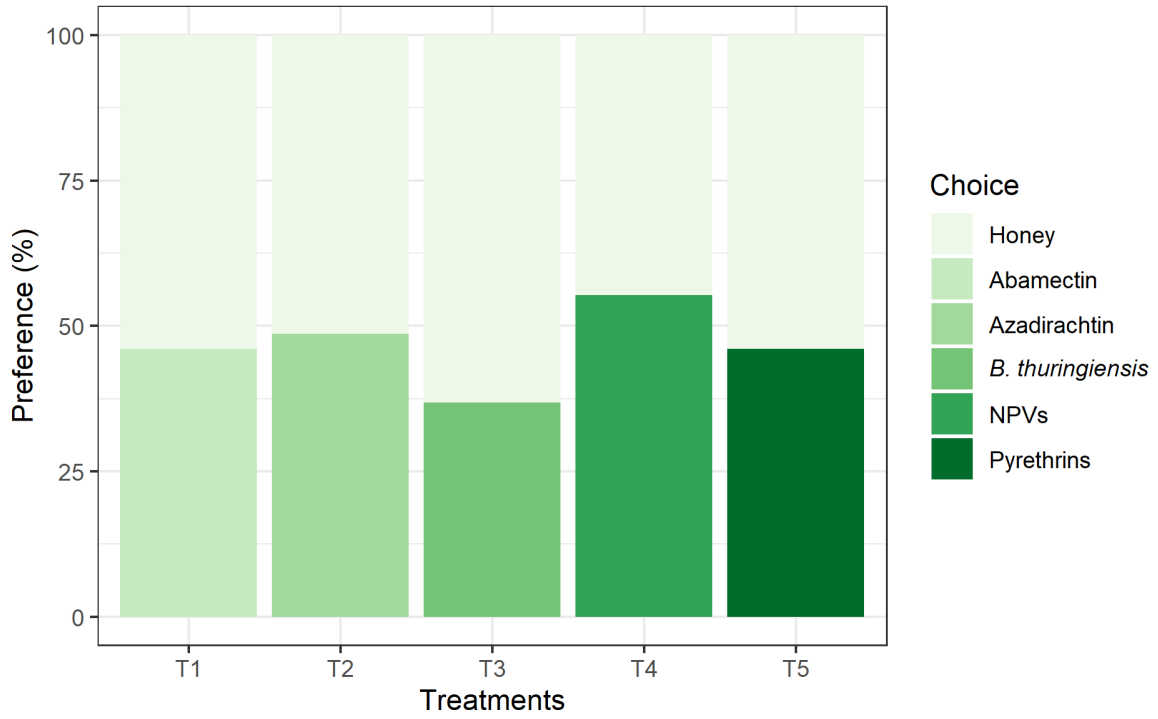


Figura 7. Porcentaje de preferencia de *A. mellifera* por alimento contaminado con insecticida y el control. T= Tratamientos.