

SHORT COMMUNICATION

Primera evaluación de campo de aplicación aérea con *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* en el desempeño de colonias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

Maria del Mar Leza*¹, Gregori Llado¹, Ana Belen Petro² and Ana Alemany¹

¹ Departamento de Biología. ² Departamento de Ciencias Matemáticas e Informática. Universidad de les Illes Balears. Ctra. de Valldemossa, km 7.5. 07122 Palma, Spain

Abstracto

Las poblaciones de abejas en todo el mundo están experimentando una disminución en el número de colonias, probablemente debido a una combinación de diferentes causas, como las enfermedades, la mala nutrición y las aplicaciones frecuentes de insecticidas para controlar las plagas. Estudios anteriores sobre el efecto del *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) en *Apis mellifera* L. dieron resultados diferentes. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de campo en aplicaciones aéreas de Btk en el rendimiento de las colonias de abejas, específicamente en la evolución porcentaje celda de cría, que puede ser utilizado como un indicador de la salud de la reina y la cría tasas de reproducción de desarrollo. Para lograrlo, la superficie de celda de cría fue fotografiada en cada muestreo, y los datos fueron analizados mediante un método basado en el software de tratamiento de imagen. Un total de 480 imágenes se examinaron a partir de dos grupos de cuatro colmenas núcleo en dos áreas, una que reciben la aspersión aérea con Btk y otro sin tratamiento. Un mixto diseño factorial se realizó para analizar los datos que mostraron que no hubo diferencias en el rendimiento de colonias entre los dos grupos de colonias ya sea antes del tratamiento, durante y al final del ensayo. Además, la relación de superficie de camada de BTK- tratado / sin tratar aumentado a lo largo del experimento. Por lo tanto, los resultados del presente estudio sugieren que Btk aérea aplicaciones no afectaron el desarrollo de cría de las abejas en condiciones naturales. Sin embargo más de campo Se requieren estudios para determinar un uso seguro de Btk en el control de plagas forestales.

Palabras clave adicionales: abejas; Btk; estudio de campo; Islas Baleares; manejo forestal; impacto.

La polinización es un proceso crucial para preservar la ecosistemas (Klein et al., 2007). Uno de los más eficaces polinizadores de flores silvestres y plantas cultivadas es la abeja melífera (*Apis mellifera* Linnaeus), que representa el 60-95% de la polinización en general en algunos zonas geográficas (Morse y Calderone, 2000). Hoy en día las poblaciones de abejas en todo el mundo han sido sometidos a pérdidas rápidas (Underwood y vanEngelsdorp, 2007; vanEngelsdorp et al, 2009.; Neumann y Carreck, 2010; Pohorecka et al., 2011). Algunos autores confirman que estas pérdidas se disparan por diferente combinación de causas, como las enfermedades (Varroa destructor, Nosema ceranae y el virus), la mala la nutrición y frecuentes aplicaciones de insecticidas a controlar las plagas (Miranda et al, 2003;. Cox-Foster & VanEngelsdorp, 2009; Higes et al., 2010).

En este estudio se evaluó el impacto del *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) en las abejas. Hay una falta de estudios desarrollados para evaluar el impacto de Btk aplicación aérea de *A. mellifera*, aunque hay algunos estudios desarrollados para evaluar el impacto en muchos grupos de animales, como lepidópteros no objetivo (Boulton, 2004), que no son objeto organismos del suelo (Addison y Barker, 2006) y pájaros cantores (Sopuck et al., 2002). El efecto sobre las abejas se han desarrollado en algunos f ield y de laboratorio estudios, aunque la mayoría de los experimentos ensayados la toxicología de Btk utilizado en cultivos genéticamente modificados (O'Callaghan et al, 2005;.. Duan et al, 2008). Estos estudios no mostraron ningún efecto adverso en *A. mellifera* (Malone y Pham-Delègue, 2001;. Hanley et al, 2003; Malone et al, 2004.; Porcar et al., 2008), sin embargo, algunos autores conf irmed una toxicidad de Btk en virtud condiciones controladas (Ramírez-Romero et al, 2005.; Brighenti y col., 2007). Vale la pena tener en cuenta que debe tener en cuenta que los resultados de campo utilizando Btk aérea aplicación difieren de los experimentos de laboratorio y algunos autores exigen más información sobre el efecto bajo condiciones de campo apícolas (Rose et al., 2007 Duan et al., 2008; Mommaerts et al., 2010). Por otro lado, es a menudo difícil extrapolar la aplicación aérea impacto de resultados de campo obtenido en los cultivos transgénicos.

Con el fin de confirmar o rechazar si Btk aérea tratamiento afecta al rendimiento de colonias de abejas melíferas en condiciones ield f, analiza el presente ensayo la evolución del porcentaje de cada trama ocupada con cría [como un indicador de la salud de la reina y de cría desarrollo (Dai et al., 2012)], bajo el efecto de Btk tratamiento aérea, que se realiza con el propósito de el control de la procesionaria del pino *Thaumetopoea pityocampa* (Denis y Schiffermüller) en Ibiza (Islas Baleares, España).

Para este fin, ocho colmenas Langstroth núcleo eran situado en dos bosques de pino (de cuatro núcleos por línea) de Ibiza (572,56 kilómetros 2), isla del Mediterráneo Occidental.

Según Dai et al. (2012) Metodología, dos Se seleccionaron campos. Uno de los bosques se encuentra en un zona tratada con Btk (UTM: 31S 379.032 m E 4322751 m N), mientras que el segundo está en un tratamiento de zona de libre protegido y fue considerado como control (UTM: 31S 367720 m E 4321474 m N). Las dos zonas están separadas por unos 10 km, una insuperable distanciarse de un vuelo de la abeja, y también lo suficiente como para ser libre de la deriva del viento aerosol. Para asegurarse de que las poblaciones de abejas de todas las colmenas núcleo eran tan homogéneos como posibles reinas, hermanas de la misma línea de cría fueron criados mediante el uso de método Doolittle (Flores et al., 1998). Los marcos de todas las colonias se hicieron a partir cera de abejas orgánica y no recibieron ningún producto químico tratamiento.

A BACI (antes-después Control-Impact) diseño (Green, 1979) se llevó a cabo en este estudio. Las primeras Veces las medidas fueron tomadas el 25 de agosto de 2009, dos meses antes de que el tratamiento aplicado, que fue realizado en helicóptero el 20 de octubre de 2009. El producto aplicado fue Incursión 48 B, Kenogard SA, España (*B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, 11,8% p / v (11,8 · 106 de IU g⁻¹). Era un concentrado en suspensión (SC); 3,5 L ha⁻¹ de aplicaciones de ultra bajo volumen, la caída de diámetro: 100-125 micras). Al conocer el estado inicial, el heterogeneidad ambiental fue controlada. Primeros de cinco muestras fueron tomadas cada dos semanas, excepto la última toma de muestras, que se tomaron un mes más tarde, el 16 de diciembre 2009.

Ambas caras de todos los marcos fueron fotografiados en cada muestreo. Un total de 480 fotografías fueron tomadas y examinado. En cada muestreo se tomaron 80 fotos (10 imágenes por colmena). Cada fotografía digital fue procesados con el software de análisis de imagen SIG ArcGIS (ESRI), con el fin de calcular el porcentaje de celdas ocupadas con cría (cría abierta, así como cría de obreras) en relación con la superficie total de la enmarcar, como una medida efectiva de la abeja de eficiencia melancólico (Dai et al., 2012).

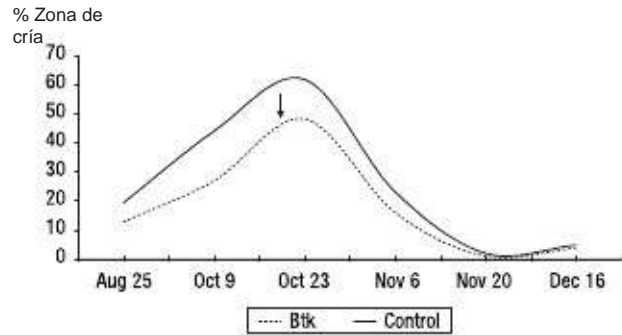


Figura 1. Evolución del área de cría porcentaje medio de las colmenas núcleo situados en los bosques de pinos, ya sea tratada con *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) o sin tratar, en un estudio realizado en 2009. La flecha indica el momento de aplicación del insecticida. processed with the Image Analysis Software SIG

Los datos se analizaron por un 2 x (6 x 4) factorial mixto diseñado con un factor entre (control / tratados grupos) y uno dentro factor (seis puntos temporales) en SPSS v 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). A nivel de $p < 0,05$ fue aceptado como significativo. Medios y desviaciones estándar se calcularon para variable.

Como se trata de programas en la fig. 1, el porcentaje de crías de ambos grupos de colmenas mostraron un fuerte paralelismo durante todo el experimento. No hay diferencias significativas entre los grupos se encontraron ($F = 2.59, p = 0.159$).

Durante los P rimeros tres muestreos de las crías eran aumentado. En el tercer muestreo (justo después de la Btk tratamiento) el área de cría se triplicó en los dos grupos (3,8 veces en colonias Btk y 3,2 veces en las colmenas de control).

En el cuarto de muestreo de tres colonias del sitio tratado (Btk1, Btk2 y Btk4) y todas las colonias de sitio de control comenzó a disminuir. En el muestreo f IFTH, la cría superficie era prácticamente inexistente en seis núcleos urticaria, tres de las colonias tratadas (Btk1, Btk2 y Btk4) y tres en la zona forestal de control (control 1, de control 2 y 4 de control). En realidad, en ambos grupos allí Se encontraron diferencias significativas entre el cuarto y quinto muestreo ($t = 4,573, p = 0,020$ en el grupo de control, y $t = 3,472, p = 0,040$ en el grupo tratado). Además de esta disminución drástica de cría, las nuevas células de la reina en todas las

Se observaron estas colmenas núcleo, así como la nueva enjambres de abejas en los árboles cercanos. Todos estos síntomas sugirieron que las colmenas núcleo habían perdido sus reinas debido a un proceso de enjambrazón natural.

Tabla 1. Porcentajes medios de cría de las colmenas analizadas durante el período de muestreo en 2009

	Porcentajes medios de cría Hives ¹					
	Antes del tratamiento			Después del tratamiento		
	Agosto 25	Octubre 9	Octubre 23	Nov. 6	Nov. 20	Dic. 16
Btk 18.08		8.2013.3111.78			0.45	1.18
Btk 216.95		53.9479.936.45			0.00	0.00
Btk 36.83		12.1227.8229.59			2.92	5.12
Btk 418.36		32.1370.8915.38			0.00	8.30
Btk (M ± SD)	12.56 ± 2.97	26.60 ± 10.51	47.99 ± 16.21	15.80 ± 4.95	0.84 ± 0.70	3.65 ± 1.90
C1	22.12	55.39	77.60	25.48	0.00	1.20
C2	21.39	47.11	60.39	15.98	0.00	0.00
C3	12.23	33.11	55.39	38.98	6.97	8.80
C4	20.39	39.17	53.21	11.40	0.00	8.35
C M ± SD	19.03 ± 2.30	43.70 ± 4.84	61.65 ± 5.53	22.96 ± 6.09	1.74 ± 1.74	4.59 ± 2.32
Ratio Btk / C	0.66	0.61	0.78	0.69	0.48	0.79

¹ Btk: *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*; M: significado; SD: desviación estándar; C: control (núcleos de colmenas no tratadas).

Aunque en control 4 había una camada baja porcentaje, se observó que todos ellos permanecieron en un estado de pupa, sin larvas jóvenes o viejos, que indica que no había reciente reina colocación. Curiosamente, en la última toma de muestras, cuatro de estas seis colonias fueron recuperados (Btk1, Btk4, control 1 y se observó de control 4) y un porcentaje de cría similares en los dos grupos de la colmena. Por otro lado, Btk y 3 control 3 se mantuvieron con el crecimiento normal (Tabla 1). Al final del ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de colmenas. Ninguna de las colmenas núcleo mostró ninguna enfermedad durante el ensayo, siendo las reservas de miel y de polen suficientemente para el desarrollo de las colonias. Por otra parte, si el porcentaje de crías de ambos grupos se comparan a través de la eficiencia de la relación Btk / control, se puede observar que, a pesar de que las colmenas Btk tenían una superficie inicial de cría más pequeñas que las de la grupo de control, la cría media razón aumentó durante todo el experimento: desde un valor inicial de 0,66 (12.56/19.03) para un final de 0,79 (3.65/4.59) (Tabla 1).

Así la cría grupo tratado había aumentado comparativamente a la cría grupo de control. Por desgracia, hemos encontrado muy pocas referencias en estudios de campo realizados en condiciones naturales, por lo que apenas podemos comparar los resultados. Algunos autores como Brighenti y col. (2007) han reportado algunas muertes tasa atribuida a Btk en pruebas de laboratorio que involucran directa pulverización o intoxicación alimentaria y Ramírez-Romero et al. (2005) concluyeron que las toxinas Bt pueden tener un antialimentarias efecto en altas concentraciones.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las aplicaciones de campo de insecticidas diferir de los experimentos de laboratorio. Por otra parte, estos datos están de acuerdo con el laboratorio mayoría estudios publicados sobre la base del efecto de Btk producen por la agricultura transgénica, que mostró que la Btk no afecta las poblaciones de abejas (Hanley et al, 2003.; Malone et al, 2004.; Babendreier et al, 2005.; O'Callaghan et al, 2005.; Duan et al, 2008.; Porcar et al., 2008). Además, los resultados del presente estudio son consistentes con trabajos previos llevados a cabo en Polen de maíz Bt (Dai et al., 2012), que mostró que el porcentaje de celdas de cría no difirió entre los los tratamientos Bt y no Bt. Por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo con otro estudio de campo realizado en EE.UU. que detectó efectos no significativas de la exposición al polen Bt en rendimiento colonia (Rose et al., 2007).

En resumen, la evolución entre los grupos de colonias era muy similar (fig. 1), sin ningún diferencia significativa a lo largo del experimento entre los grupos, y la cría significan relación eficiencia Btk / control aumentó durante todo el experimento. Así, los resultados del efecto de Btk tratamiento aérea (que se aplica contra la oruga procesionaria del pino forestal en Ibiza) sobre *A. mellifera* sugieren que la Btk hacer no afectar el desarrollo de cría de las abejas. Sin embargo, este es el primer ensayo realizado a evaluar el impacto de la aplicación aérea de las abejas, por lo se necesitan más estudios de campo para determinar un uso seguro de Btk en el control de plagas forestales.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a L. Núñez, J. Ferrer y J. Juan por su valioso apoyo. especial Se agradece a A. Palmer para el análisis estadístico, y de J. Ramón, A. González y F. San Juan, por razones técnicas apoyo. Inglés se ha mejorado gracias a J. Miró y D. G. Jones tipo de revisión. La financiación de este estudio fue proporcionada por el Gobierno Balear (Forestal, Salud y Seguridad).

Referencias

- Addison PJ, Barker GM, 2006. Effect of various pesticides on the non-target species *Microctonus hyperodae*, a biological control agent of *Listronotus bonariensis*. *Entomol Exp Appl* 119 (1): 71-79.
- Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Mulligan E, Bigler F, 2005. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 36: 585-594.
- Boulton TJ, 2004. Responses of nontarget lepidoptera to foray 48B *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on Vancouver Island, British Columbia, Canada. *Environ Toxicol Chem* 23 (5): 1297-1304.
- Brighenti DM, Carvalho CF, Andrade G, Brighenti CRG, Malfitano S, 2007. Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) to adults of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Ciênc Agrotec Lavras* 31 (2): 279-289.
- Cox-Foster D, VanEngelsdorp D, 2009. Saving the honeybee. *Sci Am* 300 (4): 40-47.
- Dai P, Zhou W, Zhang J, Cui HJ, Wang Q, Jiang WY, Sun JH, Wu YY, Zhou T, 2012. Field assessment of Bt cry1Ah corn pollen on the survival, development and behavior of *Apis mellifera* ligustica. *Ecotoxicol Environ Safety* 79: 232-237.
- Duan JJ, Marvier M, Huesing J, Dively G, Huang ZY, 2008. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE* 3(1): e1415. DOI: 10.1371/journal.pone.0001415.
- Flores JM, Ruíz JA, Ruz JM, Puerta F, Campano F, Padilla F, Bustos M, 1998. Cría controlada de abejas reinas de *Apis mellifera* ibérica. *Arch Zootec* 47: 347-350.
- Green RH, 1979. Sampling design and statistical methods for environmental biologists. John Wiley & Sons, NY, USA. 257 pp.
- Hanley AV, Huang ZY, Pett WL, 2003. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *J Apic Res* 42: 77-81.
- Higes M, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, Virginia González-Porto A, Meana A, Luis Bernal J, del Nozal M, Bernal J, 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol* 2 (2): 243-250.
- Klein AM, Vaissière BE, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Roy Soc B* 274: 303-313.
- Malone LA, Pham-Delègue MH, 2001. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32: 1-18.
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ, Christeller JT, 2004. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie* 35: 655-664.
- Miranda JE, Navickiene HMD, Nogueira-Couto RH, De Bortoli SA, Kato MJ, Bolzani VS, Furlan M, 2003. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie* 34: 409-415.
- Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagge G, 2010. Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag Sci* 66: 520-525.
- Morse, RA, Calderone NW, 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. Cornell University, Ithaca, NY. Available in <http://www.beeeculture.com/content/pollinationreprint07.pdf>. [15 May 2014].
- Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *J Apic Res* 49: 1-6.
- O'Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA, 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annu Rev Entomol* 50: 271.
- Pohorecka K, Bober A, Skubida M, Zdanska D, 2011. Epizootic status of apiaries with massive losses of bee colonies (2008-2009). *J Apic Sci* 55(1): 137-150.
- Porcar M, Gómez F, Gruppe A, Gómez-Pajuelo A, Segura I, Schrödere R, 2008. Hymenopteran specificity of *Bacillus thuringiensis* strain PS86Q3. *Biol Control* 45 (3): 427-432.
- Ramirez-Romero R, Chauvaux J, Pham-Delègue MH, 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36: 601-611.
- Rose R, Dively GP, Pettis J, 2007. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 38: 368-377.
- Sopuck L, Ovaska K, Whittington B, 2002. Responses of songbirds to aerial spraying of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Foray 48B (R)) on Vancouver Island, British Columbia, Canada. *Environ Toxicol Chem* 21(8): 1664-1672.
- Underwood R, vanEngelsdorp D, 2007. Colony collapse disorder: have we seen this before? *Bee Cult* 135: 13-18.
- VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen YP, Underwood R, Tapy DR, Pettis JS, 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLOS ONE* 4(8): e6481. DOI: 10.1371/journal.pone.0006481.