

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA

'Evaluación de resistencia de *Varroa destructor* Anderson & Trueman  
(Mesostigmata: Varroidae) a fluvalinato en colmenas de *Apis mellifera*  
(Hym: Apidae) en Valdivia, Chile'

Tesis presentada como  
parte de los requisitos para  
optar al grado de Licenciado  
en Agronomía.

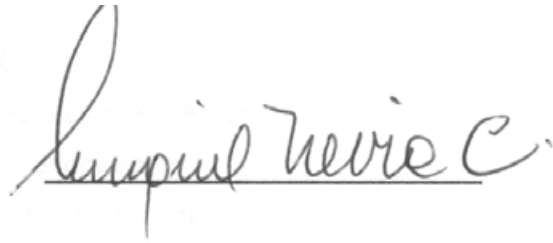
Paulina Cáceres Urrutia

VALDIVIA - CHILE

2007

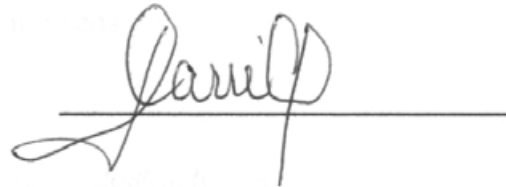
**PROFESOR PATROCINANTE**

Miguel Neira C.  
Ing.Agr.

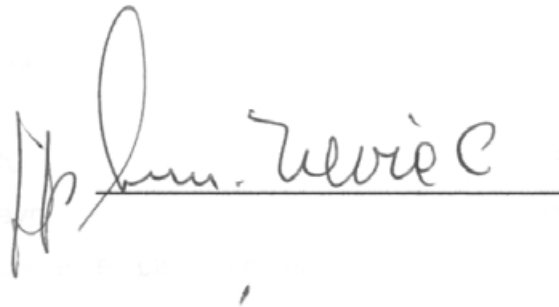
Handwritten signature of Miguel Neira C. in black ink, written over a horizontal line.

**PROFESORES INFORMANTES**

Roberto Carrillo LI.  
Ing.Agr., M. Sc., Ph. D.

Handwritten signature of Roberto Carrillo LI. in black ink, written over a horizontal line.

Claudia Dussaubat A.  
Ing.Agr.

Handwritten signature of Claudia Dussaubat A. in black ink, written over a horizontal line.

**INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL**

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo	Página
1      INTRODUCCIÓN	1
2      REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1    Importancia de <i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman. Daños directos e indirectos.	3
2.2    Uso de fluvalinato en el control de <i>V. destructor</i> .	4
2.2.1    Propiedades de la molécula de fluvalinato.	4
2.2.2    Fluvalinato como herramienta contra <i>V. destructor</i> .	5
2.2.3    Residuos de fluvalinato.	6
2.3    Resistencia a productos químicos.	7
2.3.1    Resistencia a acaricidas.	10
2.3.2    Resistencia a piretroides.	10
2.3.3    Caso de resistencia de <i>V.destructor</i> a fluvalinato.	11
2.3.4    Manejo de la resistencia.	14
3      MATERIAL Y MÉTODO	18
3.1    Fundamentos del ensayo.	18
3.2    Origen de los ácaros a emplear en el ensayo.	18
3.3    Materiales.	19
3.3.1    Materiales utilizados en la preparación de las cápsulas.	19
3.3.2    Materiales utilizados en el bioensayo.	20

3.4	Método.	21
3.4.1	Preparación de las cápsulas.	21
3.4.2	Bioensayo: toma de muestras y encapsulado de los ácaros.	22
3.5	Análisis estadístico.	24
3.5.1	Mortalidad.	24
3.5.2	Cálculo de la dosis letal.	25
3.5.3	Prueba Chi Cuadrado.	25
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS	26
4.1	Condición de los ácaros en las distintas etapas del experimento.	26
4.2	Susceptibilidad de los ácaros a fluvalinato.	29
5	CONCLUSIONES	33
6	RESUMEN	34
	SUMMARY	35
7	BIBLIOGRAFIA	36
	ANEXOS	42

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Porcentaje de ácaros normales (móviles), paralizados y muertos en diferentes momentos del experimento, provenientes de la localidad Santa Rosa.	26
2	Porcentaje de ácaros normales (móviles), muertos y paralizados en diferentes momentos del experimento, provenientes de la localidad Nontuelá.	27
3	DL50 y límites de confianza de fluvalinato sobre el ácaro <i>Varroa destructor</i> proveniente de las localidades de Santa Rosa y Nontuelá, evaluada a las 48 horas de haber recibido el tratamiento con fluvalinato.	30

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Ubicación de localidades muestreadas.	19
2	Cápsulas de parafina con fluvalinato selladas. ¶	22
3	Cápsulas con ácaros al momento de comenzar el tratamiento (izq.) y al ser trasladadas a Placa Petri luego de 6 horas (der.).	24
4	Porcentaje de ácaros paralizados a las 6, 24 y 48 horas, por tratamiento, provenientes de la localidad de Santa Rosa.	28
5	Porcentaje de ácaros paralizados a las 6, 24 y 48 horas, por tratamiento, provenientes de localidad de Nontuelá.	28
6	Porcentaje total de ácaros muertos (mortalidad corregida) a las 6, 24 y 48 horas, por tratamiento, provenientes de localidad de Santa Rosa.	29
7	Porcentaje de ácaros muertos a 6-24-48 horas, por tratamiento, en localidad de Nontuelá.	29

**ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo		Página
1	Número de ácaros muertos y porcentaje de mortalidad, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Santa Rosa.	43
2	Número de ácaros paralizados, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Santa Rosa.	43
3	Número de ácaros muertos y porcentaje de mortalidad, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Nontuelá.	44
4	Número de ácaros paralizados, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Nontuelá.	44
5	Cálculo DL50 Santa Rosa.	45
6	Cálculo DL50 Nontuelá.	47
7	Prueba de X2 para muestras provenientes de Santa Rosa.	49
8	Prueba de X2 para muestras provenientes de Nontuelá.	49

## 1. INTRODUCCIÓN

*Varroa destructor* Anderson & Trueman es la principal enfermedad de la abeja melífera en el mundo. Causa daños directos e indirectos a las colonias de abejas, disminuyendo su capacidad para elaborar todos los productos característicos de una colmena y realizar su importante labor de polinización.

En el intento de controlar esta plaga se ha recurrido a diversos métodos, incluyendo el combate químico. Entre los distintos acaricidas utilizados en su control, se ha destacado el piretroide fluvalinato, cuyas excelentes características lo convirtieron en la principal arma de los apicultores contra el ácaro. Sin embargo, después de un período de uso intensivo, comenzaron a observarse fallas en el control con este producto, así como también severas contaminaciones con el mismo en miel, polen, cera y propóleos.

Al examinar las poblaciones de varroa que no respondían adecuadamente al control químico con fluvalinato, se detectó la existencia de ácaros resistentes a este compuesto, presumiblemente como consecuencia de una fuerte presión de selección sobre el ectoparásito por el uso inadecuado del producto, lo que contribuyó a la expresión de caracteres de resistencia.

Los hechos que se reportan tienen origen en Europa y Estados Unidos, sin embargo, los mismos acontecimientos tuvieron lugar en Chile, por lo que es presumible la existencia de ácaros resistentes en el país. El presente estudio pretende dilucidar esta incógnita examinando una población que se sospecha resistente, por medio de la aplicación de un bioensayo validado en otros países con anterioridad.

La hipótesis y objetivos planteados se señalan a continuación:

Hipótesis: Poblaciones de la especie *Varroa destructor* Anderson & Trueman de Valdivia, Chile, presentan resistencia a fluvalinato.



## Objetivos:

Objetivo general: Establecer si las poblaciones de *Varroa destructor* Anderson & Trueman que habian sido tratadas anteriormente con el acaricida y utilizadas en el experimento son resistentes al piretroide fluvalinato.

Objetivo específico: Establecer el grado de susceptibilidad o resistencia de las poblaciones evaluadas por medio de la determinación de la dosis letal (DL).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importancia de *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Daños directos e indirectos.

*Varroa destructor* Anderson & Trueman es un ectoparásito que succiona hemolinfa afectando los estados inmaduros y adultos de abejas. La enfermedad es llamada varroosis y es considerada la más grave y peligrosa enfermedad apícola en el mundo (NEIRA *et al.*, 2001). Cualquier colonia infestada por el ácaro, de no ser tratada, morirá al cabo de un par de años (TROUILLER, 1998).

La gravedad de este ectoparásito radica en que parasita tanto a abejas adultas como a la cría. Hembras fecundadas del ácaro se posan sobre obreras y zánganos, ingresan a las celdas de cría unas horas antes del operculado y se reproducen sincrónicamente con el desarrollo de la abeja (Martin, 1994, citado por COLIN *et al.*, 1997).

Puede ocasionar daños por acción directa, tales como disminución de las proteínas presentes en la hemolinfa, disminución en la longevidad de las abejas y nacimiento de abejas debilitadas, no aptas para la cría ni para el pecoreo o recolección. Los daños por acción indirecta y como consecuencia de las pérdidas de proteínas, son que las abejas presentan menor resistencia a la acción de plaguicidas y al ataque de algunas micosis. Además puede actuar como vector o agente transmisor de otros patógenos tales como el virus de la parálisis aguda y de bacterias patógenas. Todo esto configura un cuadro en el cual la acción de varroa no es un mecanismo simple, sino que crea un conjunto de circunstancias negativas para el desarrollo de una familia de abejas (NEIRA *et al.*, 2001).

Respecto de su distribución mundial, varroa es el principal parásito de la abeja melífera en Europa, encontrándose distribuida en todo el mundo, salvo en Australia e Irlanda (HIGES *et al.*, 1998).

## 2.2 Uso de fluvalinato en el control de *Varroa destructor* Anderson & Trueman.

Sólo algunos acaricidas pueden ser aplicados a las abejas melíferas con bajo riesgo de dañar sus colonias. Las abejas son particularmente sensibles a productos tóxicos, por lo que un producto antiparasitario para el control de plagas en abejas debe ser altamente tóxico hacia el parásito, pero inocuo para la abeja y, al mismo tiempo, no debe constituir una amenaza para los consumidores de miel u otros productos de la colonia (WATKINS, 1997).

El control de *V. destructor* fue facilitado durante los años 80 con la creciente disponibilidad de productos acaricidas de alta efectividad y de fácil aplicación, tolerados por la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). Los acaricidas parecieron solucionar el problema causado por el ácaro (MILANI, 1999).

**2.2.1 Propiedades del fluvalinato.** El fluvalinato es un piretroide sintético usado contra polillas, escarabajos y hemípteros en cultivos como el algodón, cereales, vides, papas y árboles frutales, moscas e insectos en cultivos ornamentales. Su modo de acción es estomacal y por contacto. Se considera un compuesto de toxicidad moderada en mamíferos, es altamente tóxico para peces, y escasamente para las aves (CORNELL UNIVERSITY *et al.*, 1996).

El fluvalinato es prácticamente insoluble en agua y tiene una fuerte tendencia a unirse a partículas del suelo. Por esta razón es poco probable que contamine el agua del suelo, aunque los metabolitos de fluvalinato pueden ser lixiviados. No sufre hidrólisis bajo condiciones ambientales normales de temperatura y pH. Tampoco experimenta fotodegradación en el suelo, pero si en una solución acuosa, donde tiene una vida media de 0,6 a 1 día (CORNELL UNIVERSITY *et al.*, 1996).

La cantidad de un químico letal para la mitad (50%) de los animales experimentales tratados con tal material se conoce como la dosis letal cincuenta, o DL50. La DL50 oral para fluvalinato en ratas es de 261 a 282

Se puede encontrar bajo los siguientes nombres distintivos: Apistan, Klartan, Mavrik Aqua Flow, Spur, Taufluvalinato y Yardex. De todos ellos, Apistan es una formulación para uso apícola, mientras que el resto de los productos comerciales son usados para el control de plagas en la agricultura (TSIGOURI *et al.*, 2001).

**2.2.2 Fluvalinato como herramienta contra *V. destructor*.** El fluvalinato es altamente efectivo contra varroa. Ha sido utilizado extensivamente por los apicultores a través de todo el mundo para el control de la varroosis desde 1988 (TSIGOURI *et al.*, 2001). Una característica destacable de la molécula de fluvalinato, presentada en la formulación de Apistan, es su alta selectividad hacia *V. destructor* comparada con su inocuidad sobre las abejas (WATKINS, 1997).

El método de uso apropiado consistió en la aplicación de Apistan, formulado como tiras impregnadas con fluvalinato, las que se insertan entre los marcos de la colmena por un período de 6 a 8 semanas, durante el cual las abejas pasan por sobre las tiras y luego dispersan el fluvalinato a través de la colonia. Los ácaros son así expuestos al contacto residual del fluvalinato (ELZEN *et al.*, 1998).

A través de todo el mundo se comenzaron a realizar aplicaciones no autorizadas de las formulaciones agrícolas emulsificables en agua, donde los apicultores aplicaron fluvalinato, ya sea asperjando suspensiones acuosas o utilizando tablillas artesanales, que han sido obtenidas sumergiendo las tablillas en suspensiones acuosas de formulaciones agrícolas de fluvalinato (TSIGOURI *et al.*, 2001).

No cabe duda que muchos de estos tratamientos eliminan a los ácaros, pero se realizan muy pocos chequeos del porcentaje de eficacia logrado con ellos; si un gran número de ácaros cae se asume que el tratamiento ha sido efectivo. En realidad, el porcentaje de eficacia puede no haber sido óptimo y la administración de una dosis muy alta o muy baja puede acarrear problemas, ya

sea dejando residuos en los productos de la colmena o en la selección de resistencia de los ácaros, respectivamente (WATKINS, 1997).

Estudios reportan que altas dosis de fluvalinato causan desórdenes en la oviposición de las reinas y disminución de su peso, así como finalmente la pérdida de éstas; también afectan la competitividad sexual de los zánganos (HAARMANN *et al.*, 2002).

**2.2.3 Residuos de fluvalinato.** Cuando las formulaciones agrícolas comenzaron a ser usadas por los apicultores, la concentración de residuos se vio fuertemente afectada por la dosis variable de fluvalinato aplicado por colonia. Es así que los residuos de fluvalinato comenzaron a aparecer en miel, cera y propóleos (BOGDANOV *et al.*, 1998; WALLNER, 1999).

El fluvalinato se fija preferentemente en la cera debido a su alta liposolubilidad, y sus residuos no son degradados en los procesos de manufactura de cera estampada, incrementándose de año en año. Al reciclar la cera contaminada con residuos, luego de derretirla presenta una concentración 1,7 veces mayor que en los marcos originales (punto de fusión de la cera: 61 a 64 °C (SILLARD, 2002)). Las altas temperaturas no afectan la concentración de los acaricidas. Cuando los residuos han alcanzado condiciones de alta concentración, son traspasados a la miel por difusión. Con 1 mg/kg de fluvalinato en la cera, se esperan 0,4 µg/kg en la miel. Mientras los tratamientos sean más reiterativos y más prolongados, mayores serán los residuos. Estudios prolongados en cera de abeja demuestran que cuando comienza a usarse un acaricida, rápidamente aparecen residuos en la cera, mientras que cuando deja de usarse, tardan bastante en desaparecer (BOGDANOV *et al.*, 1998; WALLNER, 1999).

El proyecto Fondo SAG N° 71, desarrollado entre los años 1999 y 2002 por la Universidad Austral de Chile, reporta un 100% de las muestras de miel analizadas el año 2002 contaminadas con residuos de fluvalinato, mientras que

para la cera el porcentaje de muestras contaminadas con el mismo producto fue de un 80% (UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, 2003).

### **2.3 Resistencia a productos químicos.**

Una definición de resistencia es: “la habilidad de un organismo de tolerar dosis tóxicas de una sustancia que sería letal para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie”. Otros la definen como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia, sobrevivir a la exposición que para otros sería letal. Otra definición para este fenómeno señala que la resistencia a plaguicidas es la selección, en una población de organismos, de un carácter genético heredable que se refleja en una falta de control a la dosis mínima originalmente efectiva. Por lo tanto, el fenómeno no sólo se trata de tolerancia metabólica sino que también cambios de morfología y comportamiento que se deben tener en cuenta al momento de evaluar esta situación (MILANI, 2001).

Este es un fenómeno evolutivo natural que ha sido descrito desde principios del siglo veinte. Ya en 1914 Melander puso la primera voz de alerta al entregar los primeros antecedentes de casos de resistencia de Escama de San José (*Quadraspidiotus perniciosus*) al polisulfuro de calcio (WATKINS, 1997; Lagunas y Villanueva, 1994, y Rodríguez, 1996, citados por SILVA, 2002). A diferencia de muchos fenómenos evolutivos, este tiene gran importancia práctica y económica (MILANI, 2001). En este proceso natural, ciertos individuos de una población experimentan mutaciones espontáneamente, seguido de la selección de dichos individuos y su descendencia resistente en presencia del pesticida. Mientras mayor sea el número de generaciones que se desarrollen en presencia del pesticida, mayor será la presión de selección y la proporción de individuos resistentes aumenta (MILANI, s.f.).

Los genes de resistencia pueden estar presentes en la población incluso antes que ocurra la exposición al pesticida (ELZEN *et al.*, 1999). Es así

que la resistencia depende de la presencia de variabilidad hereditaria en la tolerancia a un pesticida y de la selección de los genotipos que poseen un grado de tolerancia lo suficientemente alto para sobrevivir a los tratamientos (MILANI, 2001). La selección implica una sobrevivencia y reproducción distinta para aquellos genotipos dotados de una mayor tolerancia. Un malentendido común es que la resistencia se adquiere gradualmente, como resultado de cambios en varios locus, cada uno de ellos contribuyendo levemente para lograr una mayor tolerancia, en un proceso que ocurre en distintas localidades, más o menos de la misma forma. En realidad, grandes expresiones de resistencia pueden ocurrir luego de un cambio genético en un solo locus; en poblaciones naturales, en la mayoría de los casos la resistencia es un carácter monofactorial (Roush y McKenzie, 1987, citados por MILANI, 2001). Así, la resistencia tiende a ser un fenómeno de todo o nada; se origina en uno o unos pocos lugares y luego se dispersa a otros (Milani, 2000, citado por MILANI, 2001).

La única manera de detener el avance en la resistencia es interrumpir el uso del pesticida por un período de tiempo y posiblemente también el uso de los compuestos relacionados (ELZEN *et al.*, 1999).

No hay una definición clara de lo que es un ácaro resistente, pero podría decirse que es aquel capaz de sobrevivir y reproducirse en contacto con un tratamiento acaricida estándar (MILANI, s.f.).

Los organismos que poseen sensibilidades extremas en cualquier población usualmente existen como una pequeña proporción dentro de una población normal. Además, generalmente existe un costo unido a esta posesión de características inusuales y es común que los “strains” resistentes tengan una capacidad metabólica o reproductiva menos eficiente que lo normal. Los “strains” resistentes se mantendrán en minoría, a menos que ocurra algo que favorezca la expresión de la resistencia, por sobre las desventajas metabólicas o reproductivas. Cuando se produce una presión de selección continua, los ácaros resistentes pasarán a constituir una gran proporción de la población y pueden eventualmente evolucionar hacia un

“strain” dominante. Donde exista tal población resistente, la molécula hacia la cual los organismos han desarrollado resistencia no puede seguir siendo utilizada con efectividad por sí sola, pero puede ser incorporada en un programa de rotación de productos usando otros pesticidas con diferentes modos de acción (WATKINS, 1997).

Los genotipos resistentes pierden sus ventajas en ausencia de pesticidas, perdiendo la resistencia después de un tiempo. Esto ocurre a distinta velocidad dependiendo del pesticida (Denholm y Rowland, 1992; Roush y McKenzie, 1987, citados por MILANI, 2001). A menudo presentan reducción de tamaño y asimetría, posiblemente debido a desbalances en algunos procesos fisiológicos. Por ejemplo, la producción de una gran cantidad de enzimas detoxificantes (en algunos casos, 3-4% del total de proteínas del cuerpo) inútiles, si no perjudiciales, en la ausencia de pesticidas. La desventaja asociada con la resistencia explica por qué en muchos insectos y ácaros los alelos resistentes son inicialmente escasos (Devonshire y Moores, 1982, citados por MILANI, 2001).

WATKINS (1997) menciona cuatro principales mecanismos de resistencia:

- Resistencia debida a cambios en el comportamiento, reduciendo la probabilidad de que la plaga entre en contacto con el agente.
- Menor penetración del pesticida debido a engrosamiento de la cutícula, observado en ácaros e insectos.
- Capacidad de degradación y eliminación acelerada del tóxico, a veces llamada resistencia metabólica, la que puede deberse a la posesión de enzimas en mayor concentración o con mayor actividad.
- Modificación del sitio de acción del tóxico puede ocasionar una menor sensibilidad del sistema nervioso.

Se conocen otros mecanismos bioquímicos que confieren resistencia; los siguientes son los más comunes: mayor detoxificación debida a (i) sustituciones de aminoácidos dentro de enzimas, que hace a la enzima más activa contra el pesticida; (ii) elevados niveles de alguna enzima; reducida



afinidad de la molécula objetivo; reducida absorción del pesticida; “secuestro” del acaricida por moléculas no-objetivo (MILANI, 2001).

**2.3.1 Resistencia a acaricidas.** Los ácaros en general han mostrado tener una capacidad extraordinaria para generar resistencia. Generaciones cortas unidas a grandes poblaciones conducen al desarrollo de esta característica, especialmente si son expuestas repetidamente a un acaricida (EISCHEN, 1995). La aparición de resistencia a los acaricidas causa serios problemas, debido a que sólo un pequeño número de compuestos son aptos para el control de ácaros, por lo que la solución no es fácil, como lo sería si se pudiera cambiar el ingrediente activo utilizado (MILANI, 1999).

Los acaricidas sintéticos modernos tienen un modo de acción muy específico, razón por la cual leves cambios en el sitio de acción pueden provocar altos niveles de resistencia (Hemingway y Ranson, 2000; Plapp, 1975, citados por MILANI, 2001).

En el caso de varroa se ha reportado un aumento en la resistencia a varios acaricidas ampliamente usados. La resistencia es un problema preocupante, ya que existen pocos ingredientes activos disponibles; la estrategia de cambiar de ingrediente activo cada vez que se presente resistencia es una causa perdida, pues no se puede esperar disponer de una nueva droga cada 4-5 años. En realidad, todos los acaricidas disponibles en la actualidad fueron introducidos antes de 1985 (Milani, 1993, citado por MILANI, 2001).

**2.3.2 Resistencia a piretroides.** Los piretroides poseen una combinación única de propiedades deseables, las que incluyen una excepcional actividad insecticida, baja toxicidad para los mamíferos, rápida biodegradación, y una pequeña o nula cantidad de residuos persistentes (ABERNATHY y CASIDA, 1973; PLAPP, 1976).

Los piretroides actúan sobre el sistema nervioso del organismo. En insectos, rápidamente producen signos de intoxicación, indicativos de alteraciones nerviosas, como pérdida de coordinación, convulsiones y, finalmente, parálisis (SODERLUND y BLOOMQUIST, 1989). Dentro de la ruta metabólica que experimentan la mayoría de los piretroides, el primer paso es la detoxificación oxidativa. Tal metabolismo puede ser bloqueado fácilmente por sinergistas (sustancias que aumentan la actividad de otras sustancias; en este caso del acaricida) antioxidantes. También existen piretroides que son metabolizados por esterasas, que al igual que los anteriores, pueden ser acompañados por sinergistas (PLAPP, 1976) con el propósito de evitar su metabolización y favorecer su acción tóxica.

En 1973, Farnham identificó cuatro genes distintos que confieren resistencia a piretroides, uno de ellos fue un gen perteneciente al cromosoma III, idéntico al que confiere resistencia para DDT. El segundo fue un gen del mismo cromosoma, que codifica para una reducida penetración. Dos genes más fueron identificados, uno en el cromosoma V, que es suprimible por *sesamex* (sinergista inhibidor de oxidasas microsomas), y otro en el cromosoma II, el cual no es afectado por sinergistas (ABERNATHY y CASIDA, 1973; PLAPP, 1976).

En cuanto al nivel de resistencia presente en la actualidad hacia este grupo de insecticidas-acaricidas, se reportan 23 casos de insectos y ácaros a través del mundo resistentes específicamente al grupo de los piretroides, entre los cuales se encuentra *varroa*. Para fluvalinato, la misma situación se indica para 10 especies distintas (WHALON, 2003a; WHALON, 2003b).

**2.3.3 Resistencia de *V.destructor* a fluvalinato.** La resistencia de *V. destructor* a fluvalinato fue descrita primero en Italia (Marletto, 1993 y Loglio, 1993, citados por FERNANDEZ, 1998), luego en el sur de Francia (Faucon, 1994, citado por FERNANDEZ, 1998), posteriormente en Austria (MOOSBECKHOFER y TROUILLER, 1996). FERNANDEZ (1998) da cuenta además de la disminución de la eficacia del fluvalinato en Argentina, y HIGES *et al.* (1998), denuncian la presencia de poblaciones de *varroa* resistentes a

fluvalinato en España. En los Estados Unidos también se han encontrado poblaciones del ácaro que no responden al tratamiento con Apistan (Baxter *et al.*, 1998, citado por PETTIS *et al.*, 1998). La misma situación se describe en Egipto (ABOU-ZAID, 1992), en Suiza (HILLESHEIM, 1996) y en Israel (MOZES-KOCH, 2000). Asimismo, en el Reino Unido se ha detectado un significativo incremento en la tolerancia a fluvalinato en numerosos apiarios (THOMPSON *et al.*, 2002).

El desarrollo de resistencia a fluvalinato se relaciona con el número de generaciones de varroa expuestas al químico. Cada vez que una nueva generación es tratada, algunos ácaros sobreviven por varias razones; algunos son afortunados y no reciben una dosis letal, y otros nacieron con factores genéticos que los capacitan para sobrevivir al fluvalinato. Estos pocos individuos están capacitados ya sea para metabolizar el fluvalinato en productos inofensivos, o para evitar la dosis letal por medio de un sistema de evasión activa. En otras palabras los individuos no se acostumbran lentamente al fluvalinato, sino que nacen con esta habilidad (EISCHEN, 1998).

Con cada generación sucesivamente expuesta a fluvalinato, la mayoría de los individuos susceptibles son eliminados de la población, permaneciendo aquellos que muestran resistencia. Estos se reproducen entre ellos y, de esta forma, el nivel de resistencia se eleva (EISCHEN, 1998).

Por medio de bioensayos se ha podido determinar una DL50 de 25 ppm para ácaros normales susceptibles a fluvalinato, y una DL50 promedio de 9200 ppm para aquellos resistentes; una razón de resistencia de 370, indicando un “strain” del ácaro verdaderamente resistente. Donde se han examinado ácaros resistentes al fluvalinato los valores son siempre similares, lo que indica que el “strain” evolucionó una vez y luego se dispersó (WATKINS, 1997).

La movilidad de una población de varroa entre colmenas (deriva, pillaje, trashumancia, zánganos, transacciones comerciales, etc.) facilita la difusión de poblaciones resistentes. La gran movilidad de este parásito está ampliamente

sustentada por la espectacular rapidez en su expansión por el mundo entero (HIGES *et al.*, 1998).

Los mismos autores señalan que la administración del principio activo de forma artesanal (tablillas) a pesar de resultar "económica", puede facilitar la aparición de ácaros resistentes porque:

- a) la dilución de los productos de uso agrícola se realiza de forma subjetiva y personal sin atender a una posología estandarizada en la mayoría de los casos;
- b) la elección de las maderas utilizadas para fabricar las tablillas depende de la disponibilidad local, existiendo en general grandes diferencias en la capacidad de absorción entre las distintas maderas utilizadas. Influye también negativamente la gran variabilidad en los tamaños y por ello en la cantidad de materia activa retenida;
- c) el número de tablillas colocadas en la colmena, el tiempo de permanencia de las mismas en su interior, así como los períodos estacionales en los que se realizan los tratamientos, suelen alejarse de lo que sería "recomendable".

Esta no es la primera vez que varroa desarrolla resistencia hacia un producto químico. Años atrás, Smirnov (1978) notó que en Japón varroa se hizo resistente a phenothiazina y tetradifon luego de 5-10 años de uso. En algunos apiarios de Tailandia, Wongsiri *et al* (1987) reportaron que varroa era resistente a la combinación de polvo de azufre con naftaleno, pero no a coumaphos. Varroa en Japón y Yugoslavia se ha vuelto aparentemente resistente a chlorodifon (EISCHEN, 1995). Asimismo, en Italia se han reportado incrementos en la tolerancia a coumaphos, acaricida que comenzó a utilizarse luego de la aparición de resistencia a fluvalinato (SPREAFICO *et al.*, 2001).

Respecto de posibles desventajas asociadas con la resistencia por parte de este ácaro, se examinó la morfometría de poblaciones de varroa susceptibles y resistentes a fluvalinato, en las cuales no se observó reducción de tamaño o asimetría (MILANI, 1996). En cuanto a su habilidad reproductiva,

al parecer no existen desventajas asociadas a la posesión de resistencia, como lo indica un estudio realizado en Texas, Estados Unidos (MARTIN *et al.*, 2003).

Los mecanismos de resistencia involucrados en este caso parecen estar relacionados con algún mecanismo de detoxificación. En parte se debe a un aumento en la actividad detoxificante de las monoxigenasas del citocromo P450 (enzimas detoxificantes que hacen al fluvalinato casi inofensivo para las abejas) pero esto no explica totalmente el fenómeno. El mecanismo es comprendido sólo parcialmente, pues otros factores podrían tener algún rol y la resistencia podría ser un carácter poligénico. El uso de inhibidores de las monoxigenasas como sinergistas, tales como el piperonil butóxido, causaría que el fluvalinato fuera también tóxico para las abejas (HILLESHEIM *et al.*, 1996; MILANI, 1999). Por lo anterior, se afirma que la resistencia a fluvalinato observada en *V. destructor* es, al menos en parte, de naturaleza metabólica (WATKINS, 1997).

Existen reportes de experimentos en los Estados Unidos que difieren en cuanto al mecanismo de resistencia citado, ya que en experimentos con sinergistas han comprobado que el mecanismo no correspondería a una mayor actividad de las monoxigenasas, ni tampoco a una detoxificación por la vía glutathion transferasa (BELL *et al.*, 1999).

**2.3.4 Manejo de la resistencia.** El manejo de la resistencia a pesticidas es la ciencia y el arte de mantener la frecuencia de genes de resistencia a niveles tolerables. Su motivación es aumentar la vida útil de los pesticidas, no garantizar una utilidad ilimitada de ellos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002). Se ha llevado a cabo trabajo tanto empírico como teórico para desarrollar técnicas que eviten la aparición de resistencia en insectos o ácaros. Las tácticas de “altas dosis” apuntan a eliminar los alelos más resistentes por medio del uso de una dosis lo suficientemente alta para matar a los individuos heterocigotos, quienes se supone que están dotados de un menor nivel de resistencia. Una táctica de “alta dosis” parece ser poco apropiada para *V. destructor*, en cuyas poblaciones no se produce mezcla de razas y muestran un alto grado de homocigosis (MILANI, 1999).

En el caso de *V. destructor*, las tácticas más apropiadas podrían ser aquellas destinadas a preservar los ácaros susceptibles (tácticas de moderación) evitando una muerte excesiva de los ácaros, disminuyendo la presión de selección sobre los ácaros resistentes. El éxito de estas técnicas depende del balance entre la presión de selección resultante de la aplicación de acaricidas y las desventajas asociadas a la resistencia que ocasionaría la disminución de la frecuencia de los genes de resistencia durante el intervalo entre tratamientos (MILANI, 1999).

Para mantener el control del ácaro con tratamientos de eficacia reducida, la terapia química podría integrarse con técnicas de control no químicas y diferentes acaricidas podrían aplicarse durante distintas épocas del año, cada una actuando durante un período de tiempo restringido. Otra opción sería utilizar diferentes ingredientes activos en años consecutivos. Una programación de tratamientos basada en rotación de acaricidas de grupos sin resistencia cruzada ha sido propuesta para distintas plagas de ácaros en huertos (MILANI, 1999).

Estas medidas podrían conjugarse con la selección de “strains” de abejas donde las poblaciones de *V. destructor* se incrementen en menores proporciones, haciendo innecesarios tratamientos altamente efectivos y evadiendo la selección de “strains” resistentes del ácaro (MILANI, 1999). Varios investigadores han observado que existen colonias de abejas donde la reproducción del ácaro es suprimida (HARBO y HOOPINGARNER, 1995), y se ha reportado que ya existen reinas seleccionadas para esta deseable característica, las que son capaces de expresar un alto nivel de resistencia al ácaro y además son capaces de traspasar esta cualidad a su descendencia. Es así que la producción y distribución de estas reinas podría ser una forma efectiva de insertar genes benéficos en las colonias comerciales de abejas melíferas (HARBO y HARRIS, 2001).

Algunos grupos de investigadores a través del mundo, además, han observado que es posible seleccionar grupos de abejas que son capaces de

suprimir la reproducción de los ácaros, y, aparentemente, obtener resistencia a varroa por medio del traspaso de herencia genética específica relacionada con el comportamiento higiénico (NOEL *et al.*, 2002).

HIGES *et al.*, (1998) señalan que es imprescindible la detección precoz de resistencia con el fin de aplicar estrategias que impidan su potenciación y difusión. Entre éstas se encuentran:

- Espaciar los tratamientos aplicándolos durante el tiempo estrictamente necesario.
- Respetar la posología de los tratamientos.
- Realizar los tratamientos acaricidas de manera coordinada en todos los colmenares de una determinada zona, con el fin de evitar el riesgo de reinfestación.
- Utilizar sustancias alternativas, métodos biotécnicos, etc.

Por su parte, ELZEN *et al.*, (1999) recomiendan de igual forma aplicar los tratamientos sólo durante el tiempo recomendado por el fabricante; señalan que el uso de tiras artesanales con el producto Mavrik ® es ilegal y además controversial en términos de resistencia y, finalmente, destacan que la industria apícola requiere desesperadamente otro acaricida que tenga un modo de acción distinto al fluvalinato, es decir, no un piretroide. Esto se ha logrado en varios estados de los Estados Unidos donde se aprobó el registro de coumaphos, un organofosforado. Anteriormente, la urgente necesidad de aprobar el uso de un nuevo producto en los Estados Unidos se registra repetidamente en la literatura (EISCHEN, 1995; EISCHEN, 1998; ELZEN *et al.*, 1998; PETTIS *et al.*, 1998).

La rotación de químicos con distintos modos de acción ha mostrado ser efectiva en el combate de la resistencia en otros artrópodos. La rotación de químicos de diferentes clases, con diferentes modos de acción, es una forma aceptada de manejar la resistencia (ELZEN *et al.*, 1999).

Por su parte, LINDBERG *et al.*, (2000) señalan que aunque es posible que en el futuro se descubra otro producto altamente selectivo y potencialmente registrable como el fluvalinato, lo más sensato parece ser que los apicultores deberán aprender a trabajar con tratamientos menos selectivos, ya que aunque el fluvalinato es ideal para el manejo de varroa, su amplia resistencia requiere el desarrollo de tratamientos alternativos, y a la fecha la mayoría de ellos son de menor selectividad.

Un enfoque un tanto distinto es el que presenta DELAPLANE (1998), quien propone reducir el número de tratamientos químicos a un número mínimo y más efectivo para lograr el control. Esto involucra el uso de un umbral económico, el que se define como el nivel de ácaros en la colonia en el cual las abejas aún pueden tolerar a los ácaros, pero sobre el cual pueden ocurrir daños serios y posiblemente irreparables para la colonia. Al realizar un tratamiento sólo cuando se alcanza el umbral, los apicultores pueden eliminar tratamientos químicos innecesarios y costosos, reducir el número total de tratamientos, y minimizar la presión de selección sobre los ácaros resistentes. Hasta que los apicultores cuenten con otro acaricida, abejas resistentes a varroa, o métodos de control culturales, el uso de Apistan asociado a umbrales económicos parece ser la mejor alternativa para manejar a varroa.

Respecto de la reversión en la resistencia a fluvalinato, se ha observado en colonias que presentaban resistencia que, luego de cinco años sin tratamiento con fluvalinato, aún existe una porción de la población de ácaros que manifiesta resistencia al ingrediente activo. Esto comprueba que en este caso casi no existen desventajas adaptativas asociadas a la resistencia, como es usual cuando la resistencia se debe a las monoxigenasas. Asimismo, se aprecia que se requieren muchas generaciones del ácaro para que se pueda apreciar la reversión del fenómeno (MILANI y VEDOVA, 2002).



### 3. MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Fundamentos del ensayo.

Se implementó un bioensayo que permitió medir la resistencia de *Varroa destructor* Anderson & Trueman a fluvalinato, a través de la capacidad para tolerar dosis que son letales para la mayoría de los individuos de una población normal, y para tal propósito se aplicó la metodología propuesta por MILANI (1995).

Este bioensayo permite medir la susceptibilidad al fluvalinato de una población de ácaros de *Varroa destructor*. Se basa en el contacto controlado de los ácaros con una concentración conocida de fluvalinato en el interior de una cápsula. La dosis efectiva contactada por los ácaros depende de la duración del contacto, de sus movimientos, de la concentración del ingrediente activo y de la superficie de contacto.

#### 3.2 Origen de los ácaros a emplear en el ensayo.

El ensayo se realizó con ácaros provenientes de colmenas infestadas de las siguientes localidades:

- (a) Valdivia: Estación experimental de la Universidad Austral de Chile, ubicada en fundo Santa Rosa, donde las colmenas se encuentran libres de aplicaciones de fluvalinato, al menos durante los últimos 4 años, desde su adquisición en 1999.
- (b) Nontuelá: Colmenar que ha recibido tratamientos con tablillas de fluvalinato en temporadas anteriores (2000, 2001), donde el apicultor ha manifestado su inquietud frente a las fallas en el control de la enfermedad.

Las muestras fueron tomadas en marzo de 2003. En ambas localidades, se extrajeron muestras de todas aquellas colmenas que evidenciaran presencia del ácaro. La ubicación de las localidades muestreadas se puede apreciar en la figura 1.



- Calefactor con agitador magnético (Cenco).
- Recipiente de acero inoxidable, para baño María.
- Recipientes de acero inoxidable, para derretir parafina a baño María.
- Termómetro (sensibilidad 1°C, rango -20 a 110 °C).
- Ventosas.
- Vasos precipitados de 100 ml.
- Varilla de vidrio para agitar.
- Pipetas.
- Micropipetas.

### **3.3.2 Materiales utilizados en el bioensayo.**

- Caja térmica de aislapol.
- Botellas con agua caliente.
- Papel absorbente.
- Cámara incubadora ( $33 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $70 \pm 10\%$  HR).
- Trozo de polietileno para sellar cámara incubadora (conservación de humedad relativa).
- Termómetro – higrómetro.
- Lupa binocular marca Carl Zeiss. Aumentos 5 x 8 x 2.
- Fuente de luz fría marca Carl Zeiss. Modelo KL1500 LCD.
- Pinceles finos.
- Alfileres.
- Pinzas.
- Cuchillo.
- Placas Petri de 20 cm diámetro.
- Cápsulas de vidrio recubiertas de parafina con fluvalinato (Mavrik Aquaflow ®) en distintas concentraciones.
- Muestras de cría operculada, para la obtención de varroas y larvas vivas, estas últimas para alimentar a los ácaros por 48 horas.
- Ácaros de varroas adultas, extraídas de muestras de cría operculada.

### 3.4 Método.

El método de preparación de las cápsulas y de ejecución del bioensayo se describirá por separado.

#### 3.4.1 Preparación de las cápsulas.

- Se utilizaron seis concentraciones distintas de fluvalinato, y para cada una de ellas se prepararon 6 cápsulas. Por lo tanto, se realizaron 6 tratamientos, cada uno con 6 repeticiones.
- Las concentraciones correspondieron a 0, 12, 117, 190, 572 y 1254 ppm, expresadas como concentración de fluvalinato en parafina. Ellas fueron verificadas por medio del método desarrollado por SILLARD (2002), donde se realiza una extracción del fluvalinato desde cera de abejas y la concentración de fluvalinato en cera se verifica mediante cromatografía.
- Se derritieron cuarenta y ocho gramos de parafina (Reutter, punto de fusión 58-60°C) en un recipiente metálico a baño María a  $60 \pm 5$  °C. Luego se añadió el fluvalinato (Mavrik Aquaflow ®) necesario para cada concentración, disuelto en 4 ml de hexano y 2 ml de acetona. Al testigo (0 ppm) sólo se le añadió hexano y acetona.
- La mezcla se mantuvo a baño María durante 100 minutos, homogeneizándola con un agitador magnético. Este tiempo también estuvo destinado a la evaporación del hexano.
- Después de evaporarse el hexano, se retiró el agitador magnético, se mantuvo la mezcla a baño María y se acercaron los discos de vidrio a la parafina sujetándolos con una ventosa, con objeto de impregnar una cara del disco de vidrio con la mezcla. A continuación se superpuso el anillo de metal sobre uno de los discos antes que la parafina solidificara.
- Se ensamblaron cápsulas hechas de 2 discos de vidrio (60 mm de diámetro) y 1 anillo de acero inoxidable (55 mm diámetro interno, 5 mm altura). La cápsula se ensambló formando una cámara cuyo interior se encontraba cubierto de parafina impregnada con fluvalinato (Mavrik Aquaflow ®) en una determinada concentración.

- Las cápsulas se mantuvieron abiertas por al menos 24 hr a temperatura ambiente, para permitir que el hexano continuara evaporando. Posteriormente, fueron almacenadas en una cámara a  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $70 \pm 10\%$  HR hasta el momento de su utilización. Las cápsulas fueron utilizadas hasta 1 mes luego de ser preparadas.

En la figura 2 se observan las cápsulas de parafina con fluvalinato selladas. Se muestran las cápsulas para los seis tratamientos aplicados.



**Figura 2.** Cápsulas de parafina con fluvalinato selladas.

#### **3.4.2 Bioensayo: toma de muestras y encapsulado de los ácaros.**

- Las muestras de cría operculada se extrajeron de marcos de cría infestados con varroa. Se cortaron trozos del panal de cría de tamaño variable, definido por la cantidad de cría operculada presente, y delimitados por los alambres de ensamblaje del marco.
- Las muestras se envolvieron en papel absorbente y se transportaron prontamente al laboratorio.
- Para el transporte de las muestras al laboratorio, se dispuso de una caja térmica entibiada con botellas de agua caliente (la temperatura al interior de la caja fue de  $35 \pm 5^\circ\text{C}$ ), con el propósito de mantener las muestras vivas y en buen estado hasta su llegada al laboratorio, donde fueron introducidas de inmediato en la cámara incubadora a  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $70 \pm 10\%$  HR.
- El día posterior a la extracción de las muestras, éstas fueron examinadas para la obtención de los ácaros. La extracción de los ácaros se realizó desoperculando las celdas e inspeccionando la cría. Para realizar los ensayos, sólo se seleccionaron los ácaros que provenían de celdillas de

larvas o pupas poco pigmentadas con objeto de distinguir las madres de las hijas, pues, de acuerdo al autor del método, sólo son útiles para el test las primeras. El autor indica también que sólo se utilicen ácaros que provengan de cría, debido a que los resultados obtenidos a partir de ácaros provenientes de abejas adultas son muy variables.

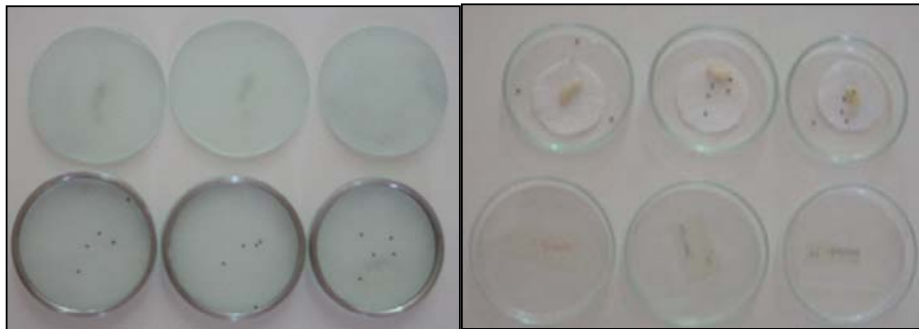
- Se rechazaron los ácaros anormales: dañados, impregnados de fluido larvario, pegados al alimento larvario, apoyados sobre su parte dorsal y que realizaban movimientos irregulares. Esta selección es fundamental a fin de efectuar el test sobre una población de ácaros en estado físico óptimo.
- Los ácaros normales encontrados en celdas de cría se extrajeron cuidadosamente con la ayuda de un pincel y un alfiler, y se depositaron en una placa Petri, en presencia de cría de obrera recientemente operculada. Luego de 30 minutos, esta placa se llevó a la cámara incubadora y se utilizó una nueva para seguir acumulando los ácaros.
- Una vez recolectado un número suficiente de ácaros, cinco hembras adultas de varroa se introdujeron a cada cápsula. Las cápsulas se llevaron a la cámara incubadora y permanecieron en ella durante un tiempo de 6 hr.
- Luego de 6 hr del encapsulado, los ácaros de cada cápsula se transfirieron a una placa Petri limpia (60 mm diámetro) con 1 larva de obrera tomada de celda operculada. Estas placas fueron devueltas a la cámara incubadora.
- Los ácaros se observaron bajo una lupa a las 6 hr (al transferirlos a la placa Petri), 24 hr y 48 hr luego de la introducción a la cápsula. Con ayuda de un pincel y un alfiler se colocaron sobre sus patas y se estimularon mecánicamente repetidas veces, tocándolos suavemente con el costado del alfiler. Aplicado el estímulo, se observó su reacción y se clasificaron en las siguientes categorías:
  - I. Ácaros móviles: cuando se movían al ponerlos sobre sus patas y estimularlos, aunque a veces sus movimientos habían sido afectados por el tratamiento en un grado variable, y sus movimientos eran más o menos descoordinados.
  - II. Ácaros paralizados: cuando podían mover 1 o más apéndices, pero no podían desplazarse.

- III. Ácaros muertos: cuando no reaccionaron a la estimulación repetida.
- IV. Ácaros dañados o perdidos: no se consideraron.

Los ácaros perdidos o muertos accidentalmente (por ejemplo, aplastados con los anillos de acero) no fueron incluidos en los resultados.

Tan sólo la proporción de ácaros muertos después de 48 hr, del total de ácaros no dañados ni perdidos, se utilizó para el cálculo de la DL 50.

En la figura 3 se pueden observar las cápsulas de parafina con fluvalinato con 5 hembras adultas de varroa en cada una, justo antes de ser selladas; a la derecha, las Placas Petri con hembras de varroa luego de ser extraídas de la cápsula para su observación, junto a una larva viva de abeja.



**Figura 3.** Cápsulas con ácaros al momento de comenzar el tratamiento (izq.) y al ser trasladadas a Placa Petri luego de 6 horas (der.)

### 3.5 Análisis estadístico.

Los datos de mortalidad obtenidos fueron evaluados utilizando la transformación probit y el test de Chi cuadrado (BUSVINE, 1971; MILANI, 1995; GERDING *et. al*, 2000).

**3.5.1 Mortalidad.** De acuerdo al método de MILANI (1995), para cada concentración de fluvalinato se registró la mortalidad obtenida luego de 48 horas del encapsulado. Este valor corresponde al porcentaje de individuos

mueritos, respecto del total de individuos por cápsula. Las cápsulas testigo entregaron el valor de mortalidad natural. La determinación de este valor es importante puesto que será utilizado para modificar todos los datos, aplicando la siguiente fórmula (fórmula de Abbot):

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{(\text{Mortalidad observada} - \text{Mortalidad natural})}{(1 - \text{Mortalidad natural})} \quad (3)$$

**3.5.2 Cálculo de la DL.** Se determinó la dosis letal para el 50% de los individuos de una población (DL50). Los resultados de mortalidad corregida se analizaron mediante un test probit, el cual permitió calcular la DL50. Este valor fue interpolado luego de una transformación probit de los resultados (BUSVINE, 1971; MILANI, 1995; GERDING *et. al*, 2000).

**3.5.3 Prueba Chi Cuadrado.** El método probit asume que la población bajo prueba es bastante homogénea, por lo cual se determinó el nivel de heterogeneidad presente mediante un test Chi cuadrado (BUSVINE, 1971; MILANI, 1995).



## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Condición de los ácaros en las distintas etapas del experimento.

Al momento de transferir los ácaros desde las cápsulas a las placas Petri un gran porcentaje de ellos se veía afectado por el tratamiento, presentando principalmente una condición de parálisis. Esta condición aumentó a medida que la concentración de fluvalinato a la que fueron expuestos fue mayor. A las 6 horas, una gran proporción de los individuos se mostraban paralizados, y pocos de ellos estaban muertos. A las 24 horas, los ácaros expuestos a las menores concentraciones mostraban una evidente recuperación, aumentando el porcentaje de ácaros normales respecto de las observaciones realizadas a las 6 horas. En ese mismo momento, se observaron porcentajes importantes de mortalidad en las mayores concentraciones. Finalmente, en la última observación (48 horas) la condición de los ácaros fue muy clara, ya que los ácaros se apreciaban móviles o muertos

**Cuadro 1. Porcentaje de ácaros normales (móviles), paralizados y muertos en diferentes momentos del experimento, provenientes de la localidad Santa Rosa. (n: normal; p: paralizado; m: muerto).**

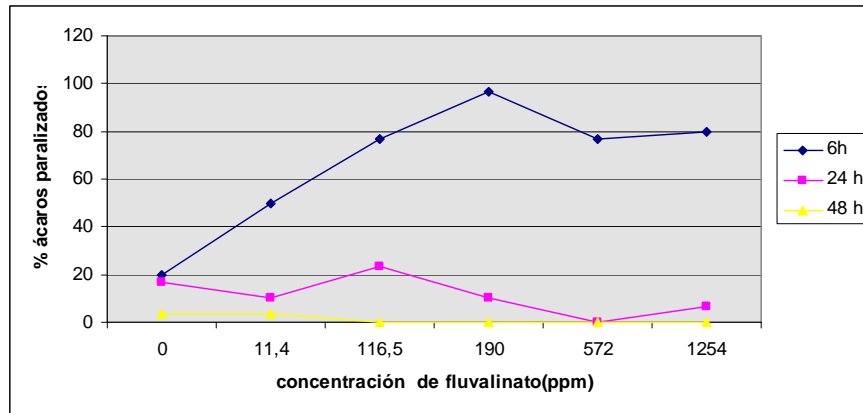
Concentración Fluvalinato (ppm)	Localidad Santa Rosa								
	6hr			24hr			48hr		
	n	p	m	n	p	m	n	p	m
0	83	17	0	83	17	0	90	0	10
11	33	43	23	67	10	23	33	0	67
117	3	77	20	10	27	63	10	0	90
190	0	93	7	0	10	90	0	0	100
572	0	77	23	0	0	100	0	0	100
1254	3	80	17	0	7	93	0	0	100

**Cuadro 2. Porcentaje de ácaros normales (móviles), muertos y paralizados en diferentes momentos del experimento, provenientes de la localidad Nontuelá. (n: normal; p: paralizado; m: muerto).**

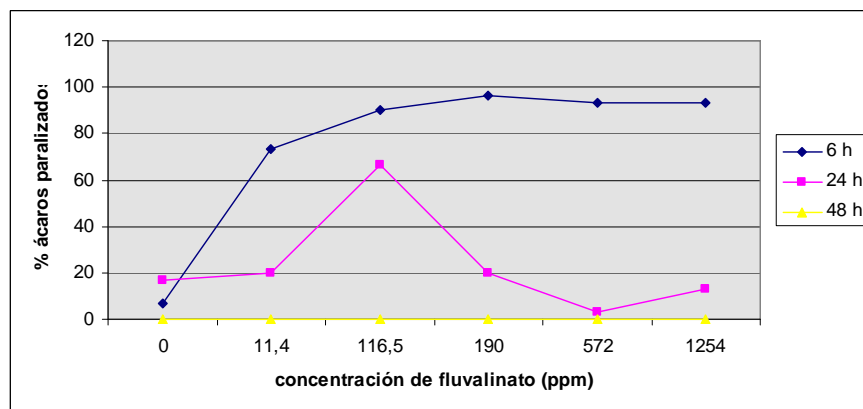
Concentración de fluvalinato (ppm)	Localidad Nontuelá								
	6hr			24hr			48hr		
	n	p	m	n	p	M	n	p	m
0	93	7	0	77	17	7	77	0	23
11	27	73	0	50	20	30	23	0	77
117	3	90	7	3	67	30	7	0	93
190	0	93	7	0	20	80	0	0	100
572	0	93	7	0	3	97	0	0	100
1254	0	93	7	0	13	87	0	0	100

A las 48 horas, en los tratamientos con dosis mayores a 117 ppm, el porcentaje total consistió prácticamente sólo de ácaros muertos, mientras que a las 6 horas, la mayor fracción correspondió a ácaros paralizados. La misma situación se observó para los individuos de ambas localidades, como se aprecia en los cuadros 1 y 2 (en anexos 1 y 3 se indica número de ácaros muertos por tratamiento para las tres mediciones).

En las figuras 4 y 5 se comprueba que a las 48 horas la condición de los ácaros fue muy clara ya que, como se dijo antes, los ácaros se apreciaban móviles o muertos. Es por esto que en ambas figuras a las 48 horas no se observan ácaros paralizados (ver en anexos 2 y 4 número de ácaros paralizados por tratamiento para las tres mediciones).



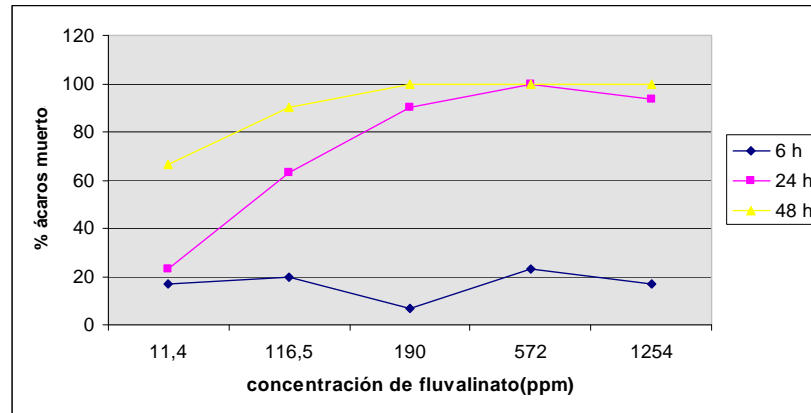
**Figura 4. Porcentaje de ácaros paralizados a las 6, 24 y 48 horas, por tratamiento, provenientes de la localidad de Santa Rosa.**



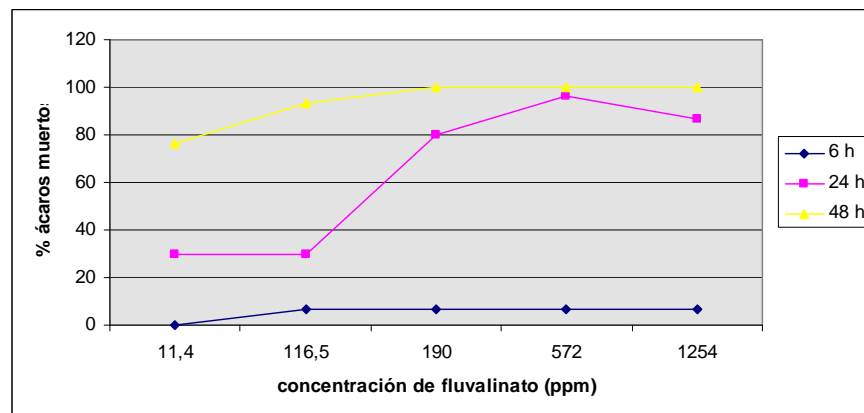
**Figura 5. Porcentaje de ácaros paralizados a las 6, 24 y 48 horas, por tratamiento, provenientes de localidad de Nontuelá.**

En cuanto a los ácaros muertos debido al tratamiento, el porcentaje observado es muy distinto a las 6 y 48 horas. Sin embargo, la suma del porcentaje de ácaros muertos y paralizados a las 6 horas es muy similar al porcentaje de ácaros muertos a las 48 horas.

La mortalidad natural observada en las cápsulas testigo fue utilizada para corregir la mortalidad observada en las distintas concentraciones de fluvalinato. En las figuras 6 y 7 se muestra el porcentaje de mortalidad corregida a las 6, 24 y 48 horas.



**Figura 6. Porcentaje total de ácaros muertos (mortalidad corregida) a las 6, 24 y 48 horas, por tratamiento, provenientes de localidad de Santa Rosa.**



**Figura 7. Porcentaje de ácaros muertos a 6-24-48 horas, por tratamiento, en localidad de Nontuelá.**

Los incrementos en la mortalidad hasta las 48 horas, concuerdan con el experimento conducido por MILANI (1995), donde se indica que a las 48 horas es el momento adecuado para evaluar la susceptibilidad de los ácaros a fluvalinato, debido a que el efecto sobre ellos tiende a estabilizarse.

#### **4.2 Susceptibilidad de los ácaros a fluvalinato.**

La toxicidad de fluvalinato a *Varroa destructor* se midió mediante la prueba de dosis letal 50 (DL50), usando la transformación probit. En el cuadro 3 se presentan los valores de DL50 para ambas localidades.

Los cálculos de las DL50 y pruebas de X2 para ambas localidades se entregan en los anexos 5 al 7.

**Cuadro 3. DL50 y límites de confianza de fluvalinato sobre el ácaro *Varroa destructor* proveniente de las localidades de Santa Rosa y Nontuelá, evaluada a las 48 horas de haber recibido el tratamiento con fluvalinato.**

Localidad	DL50 (ppm)	Límites de confianza (95%)
Santa Rosa	7,0	2,8 – 17,3
Nontuelá	4,8	1,6 – 14,6

Estos resultados indican una clara susceptibilidad de *Varroa destructor* de ambas localidades a fluvalinato, ya que las DL50 son bastante inferiores a las que se reportan en la literatura para ácaros susceptibles. MILANI (1995) indica una DL50 de 15,9 a 18,5 ppm de fluvalinato para poblaciones susceptibles, y TROUILLER (1998), por su parte, reporta un valor de 25 ppm para el mismo tipo de individuos. El mayor valor en la DL50 indicado por TROUILLER, al parecer se debió a la presencia de un pequeño porcentaje de ácaros resistentes, ya que un año después se detectó la aparición de resistencia entre los mismos ácaros.<sup>1</sup>

La mayor susceptibilidad de las poblaciones de varroa provenientes de Santa Rosa y Nontuelá, evidenciada por una menor DL50, puede deberse al tipo de formulación del plaguicida usado en el experimento. En el método original, MILANI (1995) utilizó fluvalinato puro mezclado con parafina al preparar las cápsulas, mientras que en este caso se utilizó la formulación Mavrik Aquaflo, formulación comercial que contiene una serie de otros componentes, los cuales podrían haber causado un incremento en la mortalidad.

Los componentes básicos de una formulación comercial de un plaguicida son: ingrediente activo, solvente orgánico, emulsificante, dispersante,

<sup>1</sup> MILANI, N. 2004, mar 29. Resultados experimentos. Correo personal. <norberto.milani@uniud.it> (29 mar 2004).

coadyuvante, diluyente sólido, sinergista, activador, humectante, tensoactivo/detergente, estabilizador (ESPINOSA, 2003). Es posible que en alguna medida estos componentes hayan sido incorporados a la parafina junto con el fluvalinato en la preparación de las cápsulas, y por ello hayan contribuido a una mayor toxicidad del tratamiento. La literatura indica que de utilizarse formulaciones comerciales y no sólo el ingrediente activo en un bioensayo, debe tomarse en cuenta que el envejecimiento de los co- formulantes y del mismo ingrediente activo puede afectar los resultados del experimento (MILANI, 2001).

Además, la menor DL50 de la localidad de Nontuelá podría deberse a que estos ácaros fueron encapsulados con una semana de desfase respecto de los de Santa Rosa, exponiéndose así a cápsulas en cierto grado más tóxicas. En su experimento, MILANI (1995) reporta que la mortalidad aumenta y la DL50 disminuye a mayor tiempo transcurrido desde la preparación de las cápsulas con fluvalinato. En su caso, indica que las cápsulas deben descartarse luego de transcurrido 1 mes desde su preparación. El autor indica que, al parecer, a medida que las cápsulas envejecen se produce un enriquecimiento de la superficie de la parafina con el ingrediente activo, y menciona también que este proceso sería más rápido al usar una parafina más “dura” (con mayor punto de fusión) como ocurrió en este caso, ya que el punto de fusión de la parafina utilizada correspondió a 58-60 °C, mientras que el de la utilizada por MILANI fue de 46-48 °C.

Los resultados obtenidos indican una susceptibilidad similar para varroa en ambas localidades, y relación dosis- mortalidad semejante. Por lo anterior, corresponde descartar la presencia de resistencia en *V. destructor* provenientes de Nontuelá y Santa Rosa, rechazando la hipótesis de que los ácaros de la especie *V. destructor* presentan resistencia a fluvalinato, al menos para los colmenares ubicados en las localidades estudiadas.

Las fallas en el control de varroa con fluvalinato en el colmenar de Nontuelá, podrían obedecer a varias razones. La primera de ellas es que para el control de la enfermedad se utilizaron tablillas impregnadas con fluvalinato,

en las cuales, aunque se sigue un procedimiento estándar en su preparación, no hay certeza de la dosis efectiva que se aplica a los ácaros mediante su uso (HIGES *et al.*, 1998). Es por esto que las fallas en el control podrían deberse incluso a la aplicación de dosis muy bajas de fluvalinato, y no a la presencia de ácaros resistentes.

Sin embargo, de acuerdo a información obtenida por el proyecto SAG 71<sup>2</sup> sobre el colmenar de Nontuelá, los análisis realizados a mieles y ceras indican un contenido de 11,2 ppb de fluvalinato en miel y 207,8 ppm de fluvalinato en cera (muestras tomadas el 2001). Estos niveles implican la aplicación de elevadas dosis de fluvalinato a las colmenas, por lo tanto las fallas en el control de varroa indicadas por el apicultor no obedecerían a bajas dosis.

Por lo tanto, una vez que se ha descartado la presencia de ácaros resistentes y la aplicación de bajas dosis, puede suponerse que las fallas en el control reportadas podrían deberse a otras prácticas de manejo del colmenar que no fueron documentadas en el presente estudio, tales como: oportunidad de los tratamientos, focos de reinfestación de varroa por apiarios cercanos no controlados, entre otras.

---

<sup>2</sup> UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. 2003. Informe final Proyecto Fondo SAG 71. Datos no publicados.

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones y metodología empleada en el presente estudio, es posible concluir lo siguiente:

- Las poblaciones de *Varroa destructor* Anderson & Trueman no presentan resistencia a fluvalinato en los colmenares de estudio ubicados en las localidades de Nontuelá y Santa Rosa.
- Las dos poblaciones de *V.destructor* fueron sensibles a fluvalinato, ya que las DL50 determinadas fueron inferiores a las encontradas en poblaciones sensibles documentadas por otros autores.
- La ineficacia reportada en el control de *V.destructor* en el colmenar de Nontuelá no obedeció a la presencia de ácaros resistentes, debiendo considerarse otros tipos de factores para explicar el fracaso en el manejo de esta plaga.
- La metodología empleada permite un rápido análisis del grado de susceptibilidad o resistencia de *V.destructor*.



## 6. RESUMEN

*Varroa destructor* Anderson & Trueman es la principal enfermedad de la abeja melífera en el mundo. Entre los acaricidas utilizados en su control, se ha destacado el piretroide fluvalinato. Después de un uso intensivo, se detectaron fallas en el control y severas contaminaciones en los productos de la colmena. Al examinar las poblaciones que no respondían al control, se detectó la existencia de ácaros resistentes, presumiblemente como consecuencia de una fuerte presión de selección y del uso inadecuado del producto. El presente estudio pretendió determinar la presencia de ácaros resistentes, por medio de la aplicación de un bioensayo. El objetivo planteado fue establecer si las poblaciones de *V.destructor* utilizadas en el experimento eran resistentes al piretroide fluvalinato. Para lograr este objetivo se implementó un bioensayo que permitió medir la resistencia de *V.destructor* a fluvalinato, aplicando la metodología propuesta por MILANI (1995). Este test de laboratorio se basa en el contacto controlado de los ácaros con una concentración conocida de fluvalinato en el interior de una cápsula. Se emplearon ácaros provenientes de colmenas infestadas de las localidades Valdivia y Nontuelá. En el bioensayo se utilizaron seis concentraciones del acaricida (0, 12, 117, 190, 572 y 1254 ppm). Como conclusiones del ensayo se puede indicar que en las dosis probadas, no se comprobó resistencia de los ácaros al fluvalinato. Los niveles de susceptibilidad encontrados superaron aquellos detectados por MILANI (1995) en sus experimentos. La mayor susceptibilidad de los ácaros examinados se puede atribuir a la toxicidad del acaricida empleado en el experimento. En el método original, se utilizó fluvalinato puro, mientras que en este caso se utilizó Mavrik Aquaflow, formulación comercial que contiene una serie de otros componentes.

## SUMMARY

The main disease of the honey bee in the world is *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Among the acaricides used for control, the pyrethroid fluvalinate showed outstanding performance. After intensive use, faults in control and severe contaminations in products of the beehive were detected. When examining the populations that did not respond to control, the existence of resistant mites was detected, presumably as a result of a strong selection pressure and inadequate use of the product. The present study tried to determine the presence of resistant mites, by means of the application of a bioassay. The main objective was to establish if the populations of *V.destructor* in the experiment were resistant to fluvalinate. The bioassay allowed to measure the resistance of *V.destructor* to fluvalinate, applying MILANI's methodology (1995). This laboratory test is based on the controlled contact of the mites with a well known concentration of fluvalinate inside a capsule. Mites from beehives infested in Valdivia and Nontuelá were used. Six concentrations of fluvalinate were used (0, 12, 117, 190, 572 and 1254 ppm). A conclusion of the test is that in the proven doses, resistance of the mites to fluvalinate was not verified. The levels of susceptibility surpassed those detected by MILANI (1995) in his experiments. The greater susceptibility of the examined mites can be attributed to the toxicity of the acaricide used in the experiment. In the original method, it was used pure fluvalinate, whereas in this case Mavrik Aquaflow was used, commercial formulation that contains a series of other components.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ABERNATHY, C. y CASIDA, J. 1973. Pyrethroid insecticides: Esterase cleavage in relation to selective toxicity. *Science (USA)* 179: 1235-1236.
- ABOU-ZAID, M. 1992. Evaluation of the role of some chemical compounds for controlling *Varroa jacobsoni* Oudemans in Egypt. *Minufiya Journal of Agricultural Research (Egipto)* 17 (3): 1465-1470.
- BELL, D., GLOOR, S. y CAMAZINE, S. 1999. Biochemical mechanisms of fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* mites. *American Bee Journal (USA)* 139 (4): 308-309.
- BOGDANOV, S., KILCHEMANN, V. e IMDORF, A. 1998. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research (Reino Unido)* 37 (2): 57-67.
- BUSVINE, J. 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. 2<sup>a</sup> ed. London, Commonwealth Agricultural Bureaux. 345 p.
- COLIN, M., VANDAME, R., JOURDAN, P. y DI PASQUALE, S. 1997. Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in mediterranean apiaries of France. *Apidologie (Francia)* 28: 375-384.
- CORNELL UNIVERSITY; OREGON STATE UNIVERSITY; UNIVERSITY OF IDAHO; UNIVERSITY OF CALIFORNIA AT DAVIS AND MICHIGAN STATE UNIVERSITY. 1996. Fluvalinate. In: Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles (On Line). <<http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/fluvalin.htm>> (1 dic. 2003)

- DELAPLANE, K. 1998. Varroa Control: Timing is Everything. American Bee Journal (USA) 138 (8): 575 - 576.
- EISCHEN, F. 1995. Varroa Resistance to Fluvalinate. American Bee Journal (USA) 135 (12): 815 - 816.
- 1998. Varroa's response to Fluvalinate in the Western U.S. American Bee Journal (USA) 138 (6): 439 - 440.
- ELZEN, P.J., EISCHEN, F.A., BAXTER,J., PETTIS, J., ELZEN, G.W. y WILSON, W.T. 1998. Fluvalinate Resistance in *Varroa jacobsoni* From Several Geographic Locations. American Bee Journal (USA) 138 (8): 674 - 676.
- ELZEN, P.J., BAXTER,J.R., EISCHEN, F.A. y WILSON, W.T. 1999. Pesticide Resistance in Varroa Mites: Theory and Practice. American Bee Journal (USA) 139 (3): 195 - 196.
- ESPINOZA, J. 2003. Manual Técnico. Muestreo para el control de la calidad de plaguicidas agrícolas. (On Line) < <http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/bpa/normtec/varios/42.pdf>> (20 oct. 2007)
- FERNANDEZ, N. 1998. Disminución de la eficacia en el control de la varroasis en Argentina. Vida Apícola (España) 91: 17 – 27.
- GERDING, M., FRANCE, A. y CISTERNAS, E. 2000. Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* Var. *anisopliae* sobre *Otiorhynchus sulcatus* Fab. (Coleoptera: Curculionidae). Agricultura Técnica (Chile) 60 (3): 216 – 223.
- HAARMANN,T., SPIVAK, M., WEAVER, D., WEAVER, B. y GLENN, T. 2002. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees

- (Hymenoptera: Apidae) in two comercial queen rearing operations. *Journal of Economic Entomology (USA)* 95 (1): 28-35.
- HARBO, J. y HARRIS, J. 2001. Resistance to *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) when mite resistant queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) were free-mated with unselected drones. *Journal of Economic Entomology (USA)* 94 (6): 1319-1323.
- HARBO, J. y HOOPINGARNER, R. 1995. Resistance to varroa expressed by honey bees in the USA. *American Bee Journal(USA)* 135 (12): 827.
- HIGES, J., LLORENTE, J. y SANZ, A. 1998. Varroa. Sensibilidad al fluvalinato. *Vida Apícola (España)* 89: 41- 45.
- HILLESHEIM, E. 1996. First data on resistance mechanisms of *Varroa jacobsoni* (Oud.) against tau-fluvalinate. *Experimental and Applied Acarology (Holanda)* 20 (5) : 283-296.
- HILLESHEIM, E. , RITTER, W. y BASSAND, D. 1996. First data on resistance mechanisms of *Varroa jacobsoni* (Oud.) against tau-fluvalinate. *Experimental and Applied Acarology (Holanda)* 20: 283-296.
- LINDBERG, C., MELATHOPOULOS, A. y WINSTON, M. 2000. Laboratory Evaluation of Miticides to Control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Parasite. *Journal of Economic Entomology (USA)* 93(2): 189 – 198.
- MARTIN, S., ELZEN, P. y RUBINK, W. 2003. Effect of acaricide resistance on reproductive ability of the honey bee mite *Varroa destructor*. *Experimental and Applied Acarology (Holanda)* 27 (3): 195 – 207.
- MILANI, N. s.f. Protocolo del test de toxicidad CL 50 de tau-fluvalinato en *Varroa jacobsoni*. Barcelona, España. Esteve veterinaria. 9 p.

- 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* (Francia) 26 (5): 415 – 429.
- 1996. Examination of the morphometry of populations of *Varroa jacobsoni* Oudemans resistant and susceptible to t-fluvalinate. *Redia* (Italia) 59(1): 47-56.
- 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* (Francia) 30: 229 – 234.
- 2001. The resistance to chemotherapy in parasites and pathogens of the honeybee. In: Proceedings of Euroconference on molecular mechanisms of disease tolerance in honeybees. (ed.) Bee Research Institute at Dol, Checoslovaquia. pp. 117 – 131.
- y VEDOVA, G. 2002. Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. *Apidologie* (Francia) 33 (4): 417 – 422.
- MOOSBECKHOFER, R. y TROUILLER, J. 1996. Apistan resistant varroa mites found in Austria. *Bienenvater* (Alemania) 117 (10): 372-373. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstracts 1998/08-2000/07.
- MOZES-KOCH, R. 2000. First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. *Experimental and Applied Acarology* (Holanda) 24(1): 35-43.
- NEIRA, M., CARRILLO, R., MUNDACA, N. y MANQUIAN, N. 2001. Apuntes Prácticos de Apicultura. Universidad Austral de Chile. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.
- NOEL, B., AMRINE, J. y KOVACS, A. 2002. Integrated pest management combined with mite resistant queens to combat acaricide resistant varroa. *American Bee Journal* (USA) 142 (9): 672 – 674.

- PETTIS, J., SHIMANUKI, H. y FELDLAUFER, M. 1998. An assay to detect fluvalinate resistance in *Varroa mites*. *American Bee Journal (USA)* 538-541.
- PLAPP, F. 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annual Review of Entomology (USA)* 21: 179-197.
- RODRÍGUEZ, J., GUZMÁN, P. y SILVA, G. 2002. Manejo de la resistencia a insecticidas. *In*. Memorias del Simposio Internacional "Manejo Racional de Insecticidas". Chillán, Nov. 28 – 29. 2002. Universidad de Concepción. 122 -144.
- SILLARD, S. 2002. Residuos de fluvalinato en cera de abejas de colmenares de la décima región. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 78 p.
- SILVA, G. 2002. Resistencia a los Insecticidas. *In*. Memorias del Simposio Internacional "Manejo Racional de Insecticidas". Chillán, Nov. 28 – 29. 2002. Universidad de Concepción. 90 - 109.
- SODERLUND, D. y BLOOMQUIST, J. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology (USA)* 34: 77-96.
- SPREAFICO, M., EORDEGH, F., BERNARDINELLI, I. y COLOMBO, M. 2001. First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie (Francia)* 32: 49 – 55.
- THOMPSON, H., BROWN, M., BALL, R. y BEW, M. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. *Apidologie (Francia)* 33 (4): 357-366.

TROUILLER, J. 1998. Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe. *Apidologie* (Francia) 29 (6): 537-546.

TSIGOURI, A., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. y THRASYVOULOU, A. 2001. Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Management Science* (Reino Unido) 57: 467-471.

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS. 2003. Proyecto Fondo SAG Nº 71, Informe Final, Resumen Consolidado: "Acciones sanitarias de prospección, control y vigilancia como bases para un programa de estrategias de manejo integrado de enfermedades en abejas para incrementar la producción de miel en la región de la Araucanía y de Los Lagos". Valdivia. 14 p.

WALLNER, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* (Francia) 30 (2-3): 235-248.

WATKINS, M. 1997. Resistance and its relevance to beekeeping. *Bee World* (Reino Unido) 78 (1): 15 – 22.

WHALON, M. 2003a. Resistant Pest Management: Arthropod Database. (On Line) <[http://www.pesticideresistance.org/DB/pesticides.php?pageNum\\_rstPesticides=11&totalRows\\_rstPesticides=3338formulationid=137](http://www.pesticideresistance.org/DB/pesticides.php?pageNum_rstPesticides=11&totalRows_rstPesticides=3338formulationid=137)> (5 mar. 2004).

WHALON, M. 2003b. Resistant Pest Management: Arthropod Database. (On Line) <[http://www.pesticideresistance.org/DB/pesticides.php?pageNum\\_rstPesticides=11&totalRows\\_rstPesticides=3338formulationid=174](http://www.pesticideresistance.org/DB/pesticides.php?pageNum_rstPesticides=11&totalRows_rstPesticides=3338formulationid=174)> (5 mar. 2004).



**ANEXOS**

**ANEXO 1. Número de ácaros muertos y porcentaje de mortalidad, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Santa Rosa.**

Concentración de fluvalinato	Total de ácaros	Ácaros muertos			Porcentaje de mortalidad (%)		
		6h	24h	48h	6h	24h	48h
0	30	0	0	3	0	0	10
11,4	30	5	7	20	16,67	23,33	66,67
116,5	30	6	19	27	20	63,33	90
190	30	2	27	30	6,67	90	100
572	30	7	30	30	23,33	100	100
1254	30	5	28	30	16,67	93,33	100

**ANEXO 2. Número de ácaros paralizados, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Santa Rosa.**

Concentración de fluvalinato	Total de ácaros	Ácaros paralizados		
		6h	24h	48h
0	30	6	5	1
11,4	30	15	3	1
116,5	30	23	7	0
190	30	29	3	0
572	30	23	0	0
1254	30	24	2	0

**ANEXO 3. Número de ácaros muertos y porcentaje de mortalidad, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Nontuelá.**

Concentración de fluvalinato	Total de ácaros	Ácaros muertos			Porcentaje de mortalidad (%)		
		6h	24h	48h	6h	24h	48h
0	30	0	2	4	0	6,67	23,33
11,4	30	0	9	23	0	30,00	76,67
116,5	30	2	9	28	6,67	30,00	93,33
190	30	2	24	30	6,67	80,00	100
572	30	2	29	30	6,67	96,67	100
1254	30	2	26	30	6,67	86,67	100

**Anexo 4. Número de ácaros paralizados, por concentración de fluvalinato, para muestras provenientes de Nontuelá.**

Concentración de fluvalinato	Total de ácaros	Ácaros paralizados		
		6h	24h	48h
0	30	2	5	0
11,4	30	22	6	0
116,5	30	27	20	0
190	30	29	6	0
572	30	28	1	0
1254	30	28	4	0

**ANEXO 5. Cálculo DL50 Santa Rosa.**

El cálculo de la DL50 se realizó utilizando la transformación probit de acuerdo a BUSVINE (1971).

**Primera iteración.**

I	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x							
Concentración Fluvalinato (ppm)	Número De Ácaros	Porcentaje Mortalidad 48 h	Porcentaje Mortalidad Corregida	Log Dosis X	Probit Empirico (valor tabla)	Probit Esperado (y = a+b*x) Y	Working Probit (valor tabla) y	Weighting coefficient	Weight (ii*ix) W	WX	Wy	SWX^2 (wx*x)	SWY^2 (wy*y)	SWXY (wx*y)	Y1	(Y-Y1)
0	30	10														
11,4	30	66,67	62,97	1,0569	5,33	5,33	5,33	0,616	18,48	19,53	98,49	20,64	524,97	104,10	5,3	0,03
116,5	30	90	88,89	2,0663	6,23	6,23	6,22	0,37	11,1	22,94	69,02	47,39	429,98	142,61	6,5	-0,2
190	30	100	100,00	2,2788		6,42	6,94	0,302	9,06	20,65	62,88	47,05	403,63	143,28	6,7	-0,3
572	30	100	100,00	2,7574		6,85	7,34	0,154	4,62	12,74	33,91	35,13	232,16	93,51	7,3	-0,4
1254	30	100	100,00	3,0983		7,15	7,59	0,092	2,76	8,55	20,95	26,49	149,78	64,90	7,7	-0,5

**Segunda Iteración.**

Working Probit (valor tabla) y	Weighting coefficient	Weight (ii*ix) W	WX	Wy	SWX^2 (wx*x)	SWY^2 (wy*y)	SWXY (wx*y)	Y1	(Y-Y1)
5,33	0,616	18,48	19,53	98,49	20,64	524,94	104,10	5,3	0,0
6,15	0,269	8,07	16,68	49,65	34,46	305,45	102,59	6,6	-0,1
7,17	0,208	6,24	14,22	44,74	32,40	320,79	101,95	6,9	-0,1
7,68	0,076	2,28	6,29	17,51	17,34	134,48	48,28	7,5	-0,2
8,03	0,031	0,93	2,88	7,47	8,93	59,97	23,14	7,9	-0,3

## Tercera iteración

Working Probit (valor tabla) y	Weighting coefficient	Weight (ii*ix)  W	WX	Wy	SWX^2 (wx*x)	SWY^2 (wy*y)	SWXY (wx*y)	Y1	(Y-Y1)
5,33	0,616	18,48	19,53	98,49	20,64	524,94	104,10	5,3	0,0
6,1	0,238	7,14	14,75	43,54	30,49	265,49	89,96	6,6	0,0
7,3	0,154	4,62	10,53	33,91	23,99	248,91	77,27	6,9	0,0
7,8	0,050	1,50	4,14	11,78	11,40	92,43	32,47	7,5	-0,1
8,2	0,019	0,57	1,77	4,68	5,47	38,42	14,50	8,0	-0,1

## Cálculo DL50

A	3,89
B	1,32
Ecuación de regresión	$y = a + b * x$
Para y	5
$X = (y-a)/b$ X= log dosis	0,8443
DL50	7,0
Varianza (V)	0,041
Límites de confianza	2,8 - 17,3

**ANEXO 6. Cálculo DL50 Nontuelá.**

**Primera iteración.**

i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x							
Concentración Fluvalinato (ppm)	Número De Ácaros	Porcentaje Mortalidad 48 h	Porcentaje Mortalidad Corregida	Log Dosis X	Probit Empirico (valor tabla)	Probit Esperado (y = a+b*x) Y	Working Probit (valor tabla) y	Weighting coefficient	Weight (ii*ix) W	WX	Wy	SWX^2 (wx*x)	SWY^2 (wy*y)	SWXY (wx*y)	Y1	(Y-Y1)
0	30	23,33														
11,4	30	76,67	69,57	1,0569	5,52	5,5	5,52	0,581	17,43	18,42	96,14	19,47	530,68	101,61	5,5	0,02
116,5	30	93,33	91,30	2,0663	6,34	6,3	6,36	0,336	10,08	20,83	64,13	43,04	406,59	132,52	6,6	-0,2
190	30	100,00	100,00	2,2788		6,5	7,01	0,269	8,07	18,39	56,57	41,91	368,42	128,91	6,8	-0,2
572	30	100,00	100,00	2,7574		6,9	7,34	0,154	4,62	12,74	33,91	35,13	234,03	93,51	7,3	-0,4
1254	30	100,00	100,00	3,0983		7,2	7,59	0,092	2,76	8,55	20,95	26,49	150,37	64,90	7,7	-0,4

**Segunda iteración.**

Working Probit (valor tabla) y	Weighting coefficient	Weight (ii*ix) W	WX	Wy	SWX^2 (wx*x)	SWY^2 (wy*y)	SWXY (wx*y)	Y1	(Y-Y1)
5,52	0,581	17,43	18,42	96,14	19,47	530,27	101,61	5,3	0,2
6,32	0,238	7,14	14,75	45,09	30,49	284,80	93,18	6,6	0,0
7,26	0,18	5,4	12,31	39,20	28,04	284,62	89,34	6,9	-0,1
7,68	0,076	2,28	6,29	17,51	17,34	134,48	48,28	7,5	-0,2
8,03	0,031	0,93	2,88	7,47	8,93	59,97	23,14	7,9	-0,2

## Tercera iteración

Working Probit (valor tabla) y	Weighting coefficient	Weight (ii*ix) W	WX	Wy	SWX^2 (wx*x)	SWY^2 (wy*y)	SWXY (wx*y)	Y1	(Y-Y1)
5,50	0,616	18,48	19,53	101,69	20,64	559,56	107,48	5,3	0,0
6,3	0,238	7,14	14,75	45,09	30,49	284,80	93,18	6,6	0,0
7,3	0,154	4,62	10,53	33,91	23,99	248,91	77,27	6,9	0,0
7,8	0,050	1,50	4,14	11,78	11,40	92,43	32,47	7,5	-0,1
8,2	0,019	0,57	1,77	4,68	5,47	38,42	14,50	8,0	-0,1

## Cálculo DL50

A	4,15
B	1,25
Ecuación de regresión	$y = a + b * x$
Para y	5
$X = (y-a)/b$ X= log dosis	0,68566
DL50	4,8
Varianza (V)	0,060
Límites de confianza	1,6 - 14,6

**ANEXO 7. Prueba de  $X^2$  para muestras provenientes de Santa Rosa.**

La prueba de  $X^2$  se utilizó para comprobar la homogeneidad de la muestra.

$X^2$ calculado	GL	$X^2$ tabla
3,0507	3	7,8

Por lo tanto la muestra es homogénea.

**ANEXO 8. Prueba de  $X^2$  para muestras provenientes de Nontuelá.**

$X^2$ calculado	GL	$X^2$ tabla
1,9128	3	7,8

Por lo tanto la muestra es homogénea.