

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
INSTITUTO PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL

“Efecto de residuos de coumafos sobre *Varroa destructor* Anderson & Trueman
en colonias de *Apis mellifera* L. de la Novena y Décima Región”

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

Daniela Andrea Reyes Coronata

VALDIVIA - CHILE
2007

PROFESOR PATROCINANTE

Miguel Neira C.

Ing. Agr.

PROFESORES INFORMANTES

Roberto Carrillo L.

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Claudia Dussaubat A.

Ing. Agr.

INSTITUTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD VEGETAL

A mi familia.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	<i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman	3
2.1.1	Ciclo de vida de <i>V. destructor</i>	4
2.2	Control químico de <i>V. destructor</i>	6
2.2.1	Uso de coumafos en el control de varroa	7
2.3	Resistencia a productos químicos	9
2.3.1	Tipos de resistencia	10
2.3.1.1	Resistencia por comportamiento	10
2.3.1.2	Resistencia morfológica	10
2.3.1.3	Resistencia fisiológica	10
2.3.2	Resistencia de varroa	12
2.3.2.1	Origen y frecuencia de la resistencia en varroa	13
2.3.2.2	Casos de resistencia de varroa	13
2.3.2.3	Resistencia de varroa a coumafos	13
2.4	Problemas de residuos y toxicidad	15
2.4.1	Estudios de residuos en cera y miel	19
2.4.1.1	Estudios de residuos en cera y miel realizados en Chile	21
2.4.2	Resultados obtenidos del proyecto Fondo SAG N° 64	22
2.4.2.1	Resultados de residuos en muestras de cera y miel	22
2.4.2.2	Resultados de encuestas a apicultores	24
3	MATERIAL Y MÉTODO	27
3.1	Ubicación del ensayo	27
3.2	Material del ensayo	28

Capítulo		Página
3.2.1	Materiales utilizados en la preparación de las cápsulas	28
3.2.2	Materiales utilizados en la recolección de las muestras	29
3.2.3	Materiales utilizados en etapa experimental en laboratorio	29
3.2.3.1	Material de laboratorio	29
3.2.3.2	Material biológico	29
3.3	Método	30
3.3.1	Determinación de los colmenares para obtención de ácaros	30
3.3.2	Determinación de las concentraciones	31
3.3.3	Preparación de las cápsulas	31
3.3.4	Etapas experimentales	32
3.3.4.1	Obtención de las muestras	32
3.3.4.2	Extracción de los ácaros	33
3.3.4.3	Colocación de los ácaros en cápsulas con distintas concentraciones de coumafós	34
3.3.4.4	Observación de resultados	35
3.3.5	Tratamiento de los resultados	35
3.3.6	Análisis estadístico	36
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
4.1	Efecto de las concentraciones de coumafós, probadas en el experimento, sobre la mortalidad de varroa.	37
4.2	Comparación de los resultados obtenidos en el experimento con antecedentes existentes.	40
4.3	Evaluación de la respuesta del ácaro a las distintas concentraciones según apiario de origen	42
4.4	Consideraciones generales	43
5	CONCLUSIONES	47
6	RESUMEN	48
	SUMMARY	49

Capítulo		Página
7	BIBLIOGRAFÍA	50
	ANEXOS	56

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Varroa destructor</i>	4
2	Efecto de coumafos en el sistema nervioso	8
3	Residuos de acaricidas en cera comercial en Suiza	20
4	Porcentaje de muestras de miel y cera con residuos de fluvalinato, flumetrina y coumafos	23
5	a. Concentraciones por región de residuos de fluvalinato, flumetrina y coumafos en muestras de cera, temporada 2004. b. Concentración de residuos por región de fluvalinato, flumetrina y coumafos en muestras miel, temporada 2004.	24
6	Porcentaje de apicultores según método utilizado para recambio de cera. Temporada 2004	25
7	Mapa de la IX y X Región indicando los lugares de muestreo	28
8	Diagrama de preparación de cápsulas	32
9	Trozo de panal de cría para obtención de muestras de varroa	33
10	Colocación de ácaros en cápsulas con distintas concentraciones de coumafos.	34
11	Traslado de ácaros a placa Petri	34
12	Promedio de la mortalidad corregida de <i>V. destructor</i> de tres concentraciones de coumafos	37
13	a. Porcentaje del total de muestras con presencia y ausencia de residuos de coumafos (n=101). b. Proporción de distintos rangos de contaminación de las muestras con presencia de residuos de coumafos (n=24).	40

Figura		Página
14	Mortalidad corregida de <i>V. destructor</i> por efecto de tres concentraciones de coumafos probadas en muestras provenientes de tres apiarios.	41
15	Promedio de la mortalidad corregida de <i>V. destructor</i> en muestras provenientes de tres apiarios.	43

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Protocolo de muestreo de cera y miel. Proyecto Fondo SAG N° 64	57
2	Tabla de distribución del porcentaje de apicultores que han observado enfermedades o enemigos de las abejas durante la temporada 2004.	57
3	Distribución del porcentaje de apicultores según productos que aplica para controlar enfermedades. Año 2004.	
4	Distribución del porcentaje de apicultores según uso de determinado método para recambio de cera. Año 2004.	58
5	Prueba de homogeneidad de varianza	59
6	Análisis de varianza	59
7	Pruebas de comparación múltiple	60
8	Mortalidad corregida con la fórmula de Schneider y Orelli.	60
9	Resultados presentados como $\arccos \sqrt{\text{mortalidad}}$	61

1 INTRODUCCIÓN

La detección en Chile del ácaro *Varroa destructor* ocurrida en marzo de 1992 en el sector denominado Agua Buena de San Fernando, significó un duro golpe a la actividad apícola nacional. Desde entonces comenzó una lucha interminable en contra de este ectoparásito, basada principalmente en aplicaciones artesanales, con productos que no han sido indicados para este fin. Esto lo realizan los propios apicultores quienes con el afán de disminuir costos optan por el uso de alternativas como tablillas de madera impregnadas con productos fitosanitarios que son aplicadas al interior de las colmenas.

La varroosis es una parasitosis externa que afecta a la abeja melífera en todos sus estadios de desarrollo (cría sellada, abierta e insecto adulto), y que actualmente está considerada como una de las enfermedades más graves, que causa, si no es convenientemente tratada, una alta mortalidad en las familias de abejas.

A nivel mundial existen variados estudios de resistencia de varroa a los distintos compuestos utilizados para su control, entre ellos se encuentra coumafos, que es una sustancia organofosforada con acción acaricida. En Chile este se emplea para el control de varroa a partir de un producto cuyo nombre comercial es Asuntol®, el cual no ha sido formulado para ser usado en abejas.

El uso continuo de acaricidas como el Asuntol® para el control de varroa, ha provocado una acumulación de residuos en la miel y cera, de lo cual ya existe evidencia en nuestro país, este es un factor que puede contribuir al surgimiento de resistencia entre algunas poblaciones de varroa.

Dado lo anterior, surge la siguiente hipótesis “la presencia de residuos de coumafos en la cera tiene un efecto selectivo sobre las poblaciones de *Varroa destructor*”.

El objetivo general de este estudio es establecer el efecto de los residuos de coumafos en parafina sólida como sustrato inerte similar a la cera de abejas, sobre la mortalidad de *V. destructor*.

Objetivos específicos:

- Medir el efecto de tres concentraciones de coumafos en parafina sólida como sustrato inerte similar a la cera de abejas sobre la mortalidad de *V. destructor*.
- Comparar los resultados obtenidos, en relación al efecto de los residuos de coumafos sobre la mortalidad de varroa, con antecedentes de estudios existentes.
- Evaluar la mortalidad de los ácaros según los apiarios de origen, una vez sometidos a tres concentraciones de coumafos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Varroa destructor* Anderson & Trueman.

Es un ectoparásito que se alimenta de la hemolinfa de su hospedero. La hembra se encuentra sobre abejas adultas y en desarrollo, mientras los estados inmaduros se encuentran sobre las pupas (CABRERA y DEL HOYO, 2004).

Varroa parasita dos especies de abejas *Apis cerana* Fab. y *Apis mellifera* L. Sobre *A. cerana* el ácaro no causa daños graves. Por el contrario la interacción *V. destructor* y *A. mellifera* no se encuentra en equilibrio y puede llegar a causar la muerte de la colonia (CABRERA y DEL HOYO, 2004).

Cuando la prevalencia del ácaro en la colmena es alta las abejas parasitadas al emerger de las celdas de cría presentan diversos tipos de malformaciones. Las más comunes se presentan en las alas, patas y abdomen. Otro de los efectos perjudiciales ocasionados es una disminución en la vida media de los hospederos (CABRERA y DEL HOYO, 2004). Las abejas adultas parasitadas por varroa se observan más agitadas debido al constante movimiento con el fin de desprenderse del ácaro (BARRIGA y NEIRA, 1988).

Las alteraciones que *V. destructor* puede ocasionar en forma indirecta están ligadas fundamentalmente a la acción inoculativa de diversos tipos de microorganismos. Se ha comprobado que el ácaro es capaz de inocular bacterias y diversos tipos de virus (CABRERA y DEL HOYO, 2004).

Varroa fue detectada en el país por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), en el año 1992, en la localidad de Agua Buena, VI región, y actualmente está presente en todo el país apícola chileno (NEIRA y MANQUIAN, 2005).

2.1.1 Ciclo de vida de *V. destructor*.

El individuo clave del ciclo de vida de varroa es la hembra adulta. Su vida alterna entre la fase reproductora y fase forética (Figura 1) (VANDAME *et al.*, 1998).

La varroa madre se reproduce exclusivamente en una celda de cría, generalmente después de un periodo forético. La entrada en la cría debe ocurrir a una edad de cría precisa, y constituye un punto crítico en la vida de varroa. Entrar demasiado temprano significa, para la futura varroa madre, un riesgo importante de ser detectada y retirada por las abejas antes de la operculación de la cría. Entrar tarde no le es posible, ya que la cría es operculada, es decir, herméticamente cerrada a toda entrada o salida (VANDAME y DE FELIPE, 2000).

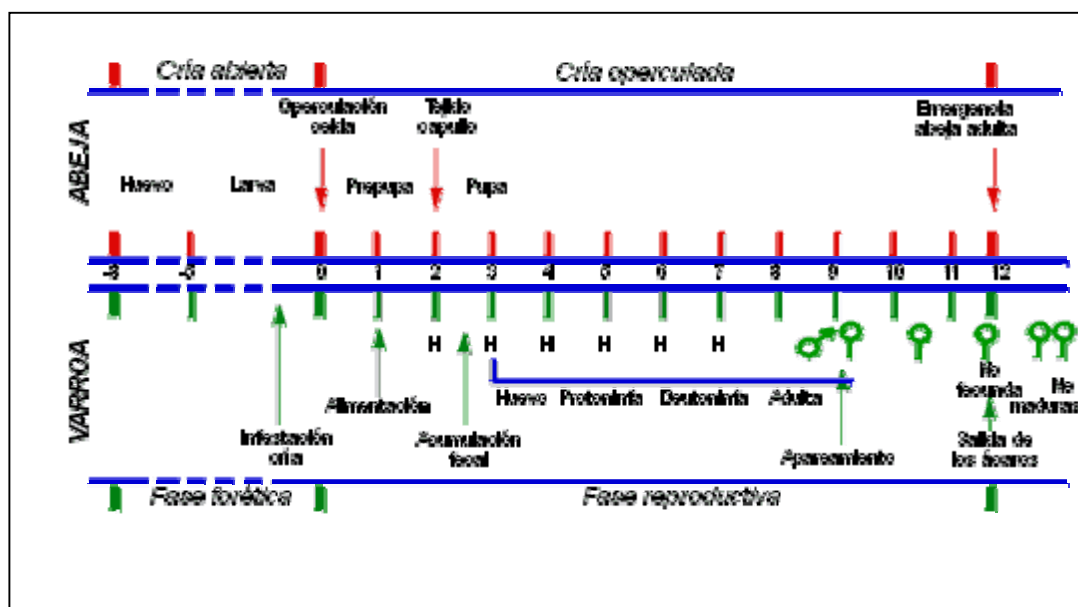


FIGURA 1 Ciclo de vida de *Varroa destructor*.

FUENTE: VANDAME y DE FELIPE, 2000.

Inmediatamente después de la operculación de la celda y durante 36 horas, la larva se alimenta, pues empieza a tejer su capullo. La primera alimentación de la larva constituye una señal para la varroa madre, quien sale de la fase inmóvil, sube sobre la larva y se alimenta por primera vez. Durante el tejido del capullo, la varroa madre se desplaza rápidamente sobre la larva, para evitar ser aplastada contra la pared de la celda, mientras empieza a alimentarse y a defecar (VANDAME y DE FELIPE, 2000).

Aproximadamente 60 horas después de que la celdilla ha sido operculada el ácaro pone el primer huevo, generalmente un macho. Los siguientes huevos son puestos a intervalos de 30 horas (FERNANDEZ y COINEAU, 2002).

Los mismos autores indican que los machos se generan a partir de un huevo no fecundado, mientras que las hembras lo hacen a partir de huevos fecundados.

El ciclo de varroa hembra se completa entre 6,2 a 8 días y entre 5,5 a 6,9 días para el macho (PELDOZA, 1992)

Cuando la celda es infestada por una sola varroa el apareamiento solo puede ocurrir entre el macho y sus hermanas. El macho se aparea con la primera hembra, tan pronto como llega a la fase adulta, y ello puede ser repetido hasta nueve veces; cuando la segunda hija llega a la madurez, el macho abandona a la primera hija para aparearse con ella. Si una tercera hija llegara a ser adulta se repite lo anterior (FERNANDEZ y COINEAU, 2002; Vandame, 1996 citado por EHIJOS, 2002).

La hembra varroa solo puede ser fecundada en la celda donde nace, luego una parte de su aparato genital se destruye imposibilitando todo apareamiento posterior (De Jong, 1993 citado por SCHMIDT, 2005).

Al nacer las obreras salen con ellas una o dos hijas fecundadas además de la hembra original. Las hijas fecundadas tan pronto como salen de la celda tratan de subir sobre las abejas y así se vuelven foréticas, mientras que la hembra original comienza a invadir una celdilla inmediatamente después de emerger (Boot *et al.* 1993 citados por EHIJOS, 2002 y CHILE, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO, 1994).

Las hembras inmaduras y el macho, privado de un aparato bucal que le permita alimentarse de las abejas, no sobrevivirán (VANDAME Y DE FELIPE, 2000).

El número de ciclos reproductivos que puede llegar a realizar una fundadora es en promedio de 1,26 en el transcurso de su vida y el número de descendientes hembras es de 0,34 a 1,82 en celdillas de obreras y de 2,7 en una de zángano. En las condiciones climáticas de la zona centro sur de nuestro país la población del ácaro

durante los meses de verano aumenta aproximadamente en 0,021 por día, eso significa que ella se duplica en solo 33 días (FERNANDEZ y COINEAU, 2002).

Los datos sobre la longevidad del ácaro, van desde 2-3 meses en períodos de actividad de cría, hasta cinco meses, en los períodos de nula actividad o baja actividad de la cría (Calatayud y Verdu (1995) citados por SCHMIDT, 2005).

2.2 Control químico de *V. destructor*.

DE LA SOTA y BACCI (2004) definen como un producto perfecto a aquel que no altera el funcionamiento interno de la colonia, que es práctica su aplicación, el que presenta mayor eficacia con la menor cantidad de aplicaciones, que no signifique un riesgo de contaminación de la miel y la cera, que no sea perjudicial para la salud humana y que sea de bajo costo.

Según Dietz (1988), citado por CADAGAN (1999) un acaricida para ser usado en el control de varroa debiera poseer importantes características tales como:

- Tener baja toxicidad para las abejas.
- Ser altamente tóxico para los ácaros.
- No ser tóxico para los humanos.
- Debería ser fácilmente aplicable y tener buena distribución en la colonia.
- Debería tener un amplio rango de aplicación.
- Debería no contaminar la miel o cera de las abejas.

Existen varios métodos para el control de la varroosis mediante diferentes productos con distintas formas de acción y elaborados con diferentes principios activos (DE LA SOTA y BACCI, 2004).

Para determinar el momento óptimo de aplicación de esos tratamientos, debemos tener en cuenta los factores que afectan su dinámica poblacional como: tasa reproductiva e infertilidad, tasa de mortalidad, migración entre colmenas y reinfestación.

Existen numerosos métodos de tratamientos, siendo el más común la fumigación de las colonias, luego la aplicación de los productos sólo en los marcos,

tiras fumígenas o asperjando las abejas directamente. Los acaricidas que se usan en estos tratamientos se han agrupado como acaricidas de primera generación, acaricidas de acción sistémica o de segunda generación y otros de acción por contacto o de tercera generación (Fredes 1993 citado por ROSAS, 1997).

El desencadenamiento del desarrollo de razas resistentes del ácaro a estos compuestos, debido a su uso repetido en la colmena es la principal desventaja del control químico de varroa (Calderone y Spivak, 1995 citado por CARAVIA, 1997).

2.2.1 Uso de coumafós en el control de varroa. Este ingrediente activo corresponde a un organofosforado (0,0-dietil-0-(3-clor-4-metil-7cumarinil)tiofosfato) con el que antiguamente la firma Bayer formulaba el producto comercial Perizin® para el control de la varroosis de las abejas. Este producto hace ya varios años que se retiró del mercado, sin embargo, hay otros productos veterinarios formulados con la misma droga aunque su uso está indicado para el control de pulgas y garrapatas en perros y gatos. Uno de ellos es el Asuntol® (polvo mojable a base del ester del ácido clorocumarintiofosfórico al 30 %.), que desde hace muchos años los apicultores lo usan en preparaciones artesanales (BACCI, s.f.). El uso de tablillas es el medio artesanal más utilizado por los apicultores, este no es recomendable por presentar alto riesgo de contaminación de la miel (MORIAMEZ, 1996).

Ante la insistencia del uso de tablillas, el SAG (1994), sugiere que éstas deberían ser puestas solamente en el piso de la colmena, atrás de la piquera para reducir el riesgo de contacto con el panal y la miel.

El problema de las formulaciones artesanales es que pueden llegar a ser tóxicas para las abejas, además pueden provocar que ácaros vivos sean expuestos a dosis más bajas que la letal, pudiendo generar resistencia, además existen riesgos para quienes preparan las formulaciones (SAG, 1994).

En los EE.UU. se ha registrado Check mite®, producto elaborado en base a coumafós, impregnado en tiras plásticas de liberación lenta (BACCI, s.f.). El coumafós es elaborado por la casa Bayer de Alemania y es formulado en tiras de plástico con

una concentración de 2.9 g de ingrediente activo; actúa por contacto. La tira de coumafós se coloca entre los panales de la zona central del nido de cría, de manera que las abejas puedan pasar sobre la superficie de la tira y de esta manera distribuir el producto a toda la colmena. El período de aplicación es antes del primer flujo nectarario o después de la cosecha de miel y debe mantenerse en la colmena por un período de seis semanas (CALDERON y ORTIZ, 2002).

El coumafós es la principal droga usada actualmente contra varroa en Estados Unidos, se encuentra en proceso de aprobación en Canadá y también es muy utilizada en Europa (MEDICI, 2005).

El efecto del principio activo en el sistema nervioso de las larvas consiste en que inhibe la acción de una enzima (la acetilcolinesterasa, AChE) que elimina la sustancia neurotransmisora acetilcolina (ACh). Las neuronas precisan este neurotransmisor para enviar impulsos a las células vecinas. En las neuronas receptoras hay receptores de ACh que reaccionan a la presencia de acetilcolina. Si el organismo deja de eliminar la sustancia neurotransmisora por la acción de coumafós, se produce la estimulación permanente y así se impide la transmisión de impulsos (BAYER, 2005).

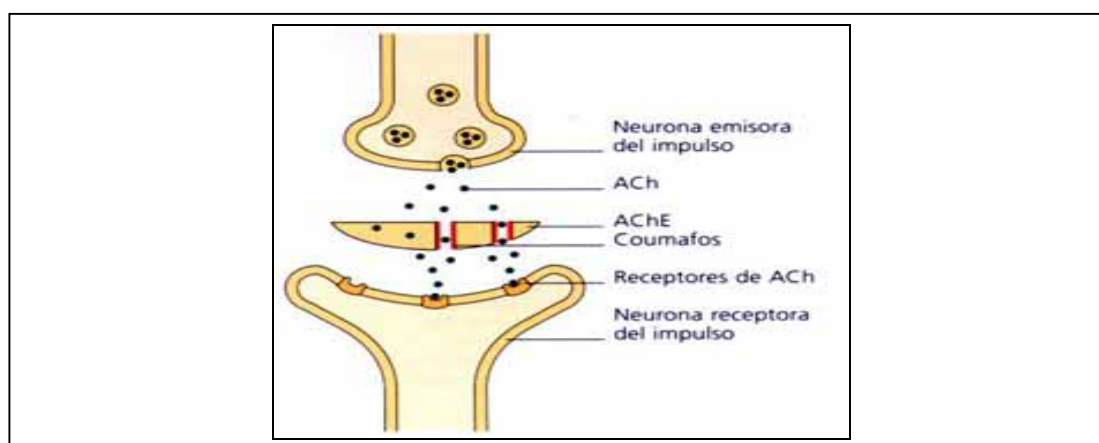


FIGURA 2 Efecto del coumafós en el sistema nervioso.

FUENTE: BAYER (2005).

La LD₅₀ (oral) en ratas para coumafos es de 100 mg/kg siendo de una toxicidad intermedia entre los organofosforados. Es casi insoluble en agua (1.5 ppm) y muy soluble en ésteres, cetonas e hidrocarburos aromáticos (Eto, 1979 y Ohkawa, 1982 citados por KLASSEN, 1995).

2.3 Resistencia a productos químicos.

Existen muchas definiciones de resistencia una de ellas es la siguiente: el desarrollo de una habilidad de una raza de insectos a tolerar dosis de tóxicos que son letales para la mayoría de la población. 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 (Brown, 1957; Lagunes y Villanueva, 1994, citados por SILVA, 2002).

A diferencia de la evolución de los caracteres morfológicos, los cuales requieren quizá miles de años de selección, la resistencia a insecticidas evoluciona en forma relativamente rápida y es principalmente un fenómeno bioquímico. Esta se basa en la selección de genes que codifican para las enzimas involucradas en la detoxificación de sustancias xenobióticas, o bien confieren insensibilidad en sus sitios de acción. Anteriormente existían dos teorías básicas con respecto al origen de los genes que confieren la resistencia. Estas se conocían como la teoría preadaptativa y la teoría postadaptativa. Hoy en día se da por aceptado que la correcta es la teoría preadaptativa (Georghiou, 1982; Lagunes y Villanueva, 1994, citados por SILVA, 2002).

Según Georghiou, 1987, citado por SILVA (2002) las consecuencias más importantes de la resistencia son:

- Aumento de los costos de control debido a aplicaciones más frecuentes y a la necesidad de cambiar a insecticidas de mayor costo.

- Abandono de cultivos debido a la falta de insecticidas eficientes en el control de las plagas clave.
- Aumento de los costos de investigación de nuevas moléculas insecticidas.
- El consumidor paga por un producto más caro de producir.

2.3.1 Tipos de resistencia. Según SILVA (2002) la resistencia se clasifica de acuerdo a tres mecanismos: por comportamiento, morfológica y fisiológica, las cuales se describen a continuación.

2.3.1.1 Resistencia por comportamiento: Algunas poblaciones de insectos desarrollan cambios en su comportamiento en respuesta a la presión de selección ejercida por un insecticida, las cuales evitan la exposición del insecto a las dosis letales del tóxico. La interrupción de la exposición al insecticida se puede deber a una acción irritante o bien a una acción repelente. En la acción irritante el individuo al tomar contacto con una pequeña concentración del acaricida escapa del área tratada. Mientras que la acción repelente consiste en que la plaga detecta al insecticida antes de entrar en contacto con él.

2.3.1.2 Resistencia morfológica: Se presenta cuando alguna característica morfológica ocasiona la resistencia, por ejemplo, una menor área de exposición al tóxico.

2.3.1.3 Resistencia fisiológica: Es el tipo de resistencia más importante y se divide en mecanismos de resistencia metabólicos y no metabólicos. El mecanismo metabólico es el medio de resistencia más común de los insectos y ácaros. Consiste principalmente en la degradación química de la sustancia activa en forma más rápida que el tiempo que requiere para penetrar en el organismo. El mecanismo no metabólico se refiere principalmente a cambios en la sensibilidad del sitio activo, en la tasa de penetración almacenamiento o excreción y en el comportamiento o forma de los insectos.

Según Georghiou (1994) citado por SILVA (2002). La resistencia fisiológica se puede dividir en dos mecanismos, los cuales se describen a continuación:

- Adición de un mecanismo de protección: Dentro de la adición de un mecanismo de protección, el mecanismo más importante es una penetración reducida en que el insecto puede disminuir la absorción del pesticida a través de la epidermis a causa de cambios en la estructura de fosfolípidos de la cutícula. También se pueden producir dos mecanismos más que son un mayor almacenamiento en los tejidos inertes, normalmente en tejido graso, y un aumento de la excreción. Cabe destacar que ninguno de estos mecanismos puede presentar altos niveles de resistencia por si solos. Por último existe un mecanismo que consiste en un mayor metabolismo el cual es dependiente de los niveles de enzimas que tenga la población. El mayor metabolismo consiste fundamentalmente en mecanismos enzimáticos de función oxidativa múltiple (FOM), reducción, hidrólisis y conjugaciones entre otros (SILVA, 2002, citando a Lagunes y Villanueva, 1994, McKenzie, 1996).

- Insensibilidad del sitio de acción (ISA): Según Hruska, 1997 citado por SILVA (2002) este tipo de resistencia es debido a cambios en el sitio donde actúa el insecticida. Debido a esta alteración del sitio de acción, el insecticida no se acopla y pierde el efecto sobre el estado fisiológico del insecto. La insensibilidad del sitio de acción consiste en tres mecanismos básicos que son una acetilcolinesterasa insensitiva, Kdr e insensibilidad a los ciclodienos.

Acetilcolinesterasa insensitiva: Este mecanismo se puede presentar en organofosforados y carbamatos. La resistencia se debe a que existen múltiples formas mutantes de la acetilcolina en la que el insecticida no puede acoplarse y no ejerce su acción.

Resistencia al derribo o Knockdown resistance (Kdr): Esta afecta tanto a organoclorados como a piretroides. Básicamente se produce por una disminución en la sensibilidad de los canales de sodio a estos compuestos.

Insensibilidad a los ciclodienos: Es específico para insecticidas de este grupo. Este mecanismo de resistencia es el resultado de alteraciones en el sitio activo que reconoce a estos compuestos, es decir en el componente acarreador de iones cloro del complejo GABA.

2.3.2 Resistencia de varroa. La resistencia es un fenómeno habitual en el tratamiento químico de cualquier plaga. En este caso, el contacto del ácaro con el mismo producto a través de sucesivas aplicaciones provocan que aparezcan progresivamente individuos que resisten cada vez más dosis de dicho producto (CALATAYUD, 2000).

Según CALATAYUD (2000) los factores que favorecen su aparición son:

- Aislamiento relativo de los ácaros: Cada colmena tiene su población de varroas relativamente aisladas.
- Extensión de la reproducción del ácaro a lo largo del año: Varroa se reproduce siempre que haya cría en la colmena.
- Elevada frecuencia de los tratamientos: A veces se realizan tratamientos innecesarios o se hacen de forma sistemática sin saber si el nivel de varroa lo exige.
- Dosificación y/o modo de empleo de los productos: Hay que respetar las dosis y realizar correctamente los tratamientos.

Los ácaros resistentes pueden pasar de una colmena a otra, o incluso de un colmenar a otro, mediante la deriva de zánganos y abejas o el pillaje (CALATAYUD, 2000).

Según CALATAYUD (2000) los factores que retrasan la aparición de resistencias son:

- Uso alternativo de dos productos en forma adecuada.
- Respetar las dosis y el modo de empleo.
- Realizar sólo los tratamientos necesarios: Suelen ser suficientes 1 o 2 tratamientos eficaces al año, dependiendo del nivel de explotación de las colmenas.
- Coordinación de los tratamientos en el tiempo y en el espacio: Tratar todas las colmenas de un área determinada al mismo tiempo.

2.3.2.1 Origen y frecuencia de la resistencia en varroa. La primera aplicación del acaricida es muy pequeña para causar una presión de selección muy alta pero como los pesticidas son usados frecuentemente se generan ácaros resistentes los cuales sobreviven a las aplicaciones del tratamiento y comienzan a dominar en la población. La migración de las colmenas causa una distribución más amplia y van dominando nuevos lugares (ELZEN *et al.*, 1999).

2.3.2.2 Casos de resistencia de varroa. Varios casos de resistencia han sido reportados en los últimos años: Fluvalinato en Italia (MILANI, 1995), Austria (MOOSBECKHOFER y TROUILLER, 1996), Francia, España y Estados Unidos (Marletto, 1993 y Loglio, 1993, citados por FERNANDEZ, 1998; HIGES *et al.*, 1998;); amitraz en Yugoslavia (Dujin *et al.*, 1991 citado por MILANI, 1999). Piretroides en el Reino Unido (THOMPSON *et al.*, 2002), coumafos en Italia (MILANI y DELLA VEDOVA, 1996; SPREAFICO *et al.*, 2001; Abed y Ducos, 1993 citado por THOMPSON *et al.*, 2002).

MILANI y DELLA VEDOVA (2002) realizaron un estudio de la proporción de ácaros resistentes a fluvalinato en una población que no había sido tratada con piretroides entre 2 a 5 años, concluyeron que la proporción de ácaros resistentes declina cuando se deja de usar el ingrediente activo por algunos años, esto puede deberse a que los genotipos resistentes tienen algunas desventajas en la ausencia del pesticida por un desbalance en la regulación de los procesos fisiológicos.

Los mismos autores exponen que mientras más generaciones de varroa se originen al año más rápido disminuye la proporción de ácaros resistentes (en una población que no había sido tratada con piretroides).

2.3.2.3 Resistencia de varroa a coumafos. La resistencia de un ácaro a un organofosforado (OP) puede presentarse por dos vías. Primero la sustancia que actúa entre las neuronas cambia ligeramente su estructura, por lo que el OP no es compatible con ella. Si el OP no se acopla la sustancia sigue libre y conduce normalmente el impulso nervioso, por lo que el ácaro no muere y, por lo tanto, sería resistente (ELZEN *et al.*, 1999).

La segunda vía es que enzimas en la hemolinfa u otro tejido del ácaro rompan el OP antes que este ejerza su acción entre impulsos nerviosos. Por lo que el ácaro en este caso también sobreviviría y por lo tanto sería resistente. Un ácaro puede tener el primer tipo de resistencia, el segundo o ambos (ELZEN *et al.*, 1999).

Desde la propagación de varroas resistentes a fluvalinato el organofosforado coumafos fue ampliamente usado para el control de varroa en Italia y los países cercanos. En 1995 pruebas de campo en el norte de Italia indicaban una disminución en el control de varroa de 36 a 80 % en colonias tratadas con coumafos. El año 1996 pruebas de laboratorio de muestras tomadas en Italia indicaron un incremento en la tolerancia de las varroas a coumafos, la mortalidad a DL_{95} (determinada por ácaros susceptibles) disminuyó en un 50%. En 1999 poblaciones de *V. destructor* aumentaron 20 veces su DL_{50} , lo que provocó grandes pérdidas como consecuencia de la falta de control del ácaro (MILANI, s.f. (a) y MILANI, 1999).

SPREAFICO *et al.*, (2001) estudiaron cuatro poblaciones de varroas, dos de ellas resultaron ser susceptibles a coumafos, la tercera presentó un aumento en la tolerancia ($DL_{50} = 12,6 \mu\text{g/g}$ a las 24 horas) finalmente la cuarta mostró un considerable aumento en la DL_{50} ($>200 \mu\text{g/g}$ a las 24 horas).

MILANI, (s.f)(a) destaca que las poblaciones de varroa disminuyeron de 20 a 50 veces su susceptibilidad a coumafos. Este estudio confirmó que las poblaciones de varroa fueron resistentes a la dosis de Perizin® recomendada.

THOMPSON *et al.*, (2002) dicen que la toxicidad de coumafos que expresaron sus resultados en el Reino Unido es similar a la reportada por MILANI y DELLA VEDOVA (1996) y SPREAFICO *et al.*, (2001) en Italia, para ácaros susceptibles (9.8-12.2 mg/kg) y en ácaros resistentes la DL_{50} fue de 21.5-554 mg/kg, un valor bajo. Esto confirma que no existe resistencia cruzada o resistencia múltiple a coumafos en los ácaros que provienen de colonias resistentes a fluvalinato.

LODESANI y COSTA (2005) señalan que los primeros reportes de resistencia a coumafos se hicieron en Italia en 1997, actualmente se ha reportado resistencia a coumafos en Suiza y Estados Unidos pocos años después que se comenzaron a utilizar acaricidas con este ingrediente activo.

Los mismos autores señalan que la resistencia se ha generado principalmente por tratamientos con coumafos en más de una oportunidad por año, lo que causa un exceso de homocigotos en los ácaros.

2.4 Problemas de residuos y toxicidad.

La lucha química contra plagas acarrea consigo el problema de la posible aparición de residuos del producto empleado. Hay que tener en cuenta que todos los plaguicidas dejan residuos en mayor o menor medida y que por lo tanto, para preservar la imagen de la miel como producto natural, se deben respetar al máximo las indicaciones de los tratamientos a aplicar (CALATAYUD, 2000).

Quizás el mayor problema con respecto a los residuos, es que la mayoría de los acaricidas utilizados contra varroa son solubles en la cera: fluvalinato, amitraz y organofosforados (coumafos y clorfenvinfos). Esto quiere decir que en la cera pueden acumularse cantidades crecientes de estos productos y poco a poco pasar a contaminar la miel. Aunque se han detectado residuos de alguno de estos productos en miel, se mantienen a niveles relativamente bajos porque son poco solubles en ella. Pero esto no quiere decir que no pueden aumentar estos niveles en algún momento, principalmente si los tratamientos de reciclado de la cera no eliminan estos contaminantes (CALATAYUD, 2000).

Estudios desarrollados en Grecia, revelaron que residuos de coumafos pueden ser encontrados en miel, pero solo a niveles no peligrosos para la salud humana; sin embargo, residuos en cera fueron altos para coumafos. En miel, las cantidades de coumafos disminuyeron en un 92 % después de 3 meses de almacenamiento. Los residuos en cera parecieron ser más estables (Thrasyvoulou, 1988 citado por KLASSEN, 1995).

Según BOGDANOV (2004) los principales contaminantes de la cera son los productos químicos utilizados por los apicultores, mientras la contaminación ambiental es mucho menos importante. Expone los datos de un estudio realizado en Suiza buscando residuos de 96 pesticidas muy comunes en el cual sólo se hallaron trazas. Señala que la cera se contamina básicamente por los acaricidas lipófilos usados contra varroa, en rangos que van desde los 0,5 a los 10 ppm.

Estudios de seguimiento realizados durante cinco años, llevan a concluir que la concentración de acaricidas aumenta con el número de aplicaciones del producto, pero decrece muy lentamente cuando se deja de aplicar el acaricida. La vida media de un acaricida en la cera es de cinco años, y el tiempo en desaparecer totalmente depende de la concentración inicial (BOGDANOV, 2004).

Wallner (1995) citado por SILLARD (2002), apunta que mientras más frecuente es el uso de pesticidas en la colmena, es más alto el riesgo que puedan detectarse residuos en los productos de la abeja, como miel, propóleos y cera, argumentando en favor de la existencia de cuatro mecanismos básicos por los cuales se presentan residuos en la miel después del uso de acaricidas: mal uso de medicamentos, por ejemplo cuando se emplean durante el flujo de néctar, como también una dosis perjudicial con la consecuencia que más pesticida penetre en las colonias innecesariamente.

Otro mecanismo de contaminación, es el uso de pesticidas utilizados normalmente durante el período de alimentación, con la consecuencia que los alimentos de invierno algunas veces son contaminados con acaricidas. En primavera las abejas al reponer su alimento sobre restos contaminados del alimento invernal provocan una contaminación de la miel de primavera por penetración de residuos (Wallner, 1995 citado por SILLARD, 2002).

Otra forma de contaminación depende del proceso de desorperculación. En este proceso varias partículas que contienen residuos, pueden penetrar la miel durante el proceso de extracción y de esta manera contaminarla (Wallner, 1995 y Wallner, 1999 citado por SILLARD, 2002).

La última forma de contaminación que señala Wallner (1995) citado por SILLARD (2002), es la migración de residuos de la cera a la miel. Estudios de laboratorio indican que algunos pesticidas como el bromopropilato, coumafos y en menor cantidad el fluvalinato pueden migrar a la miel, estos pesticidas presentan enlaces débiles en la cera y sus residuos pueden ser detectados en la miel. Los pesticidas con baja tendencia a migrar como el fluvalinato y la flumetrina se acumulan muy fácilmente en la cera y pueden conducir, en menor grado, sus residuos a la miel.

Por otra parte Otero, s.f. citado por DUSSAUBAT (2002) expone que diversos factores participan en la cantidad de residuos que se pueden acumular y en su localización en la colmena. Estos incluyen la dosis y forma de administración, la estabilidad del ingrediente activo y su relación con el pH y la humedad del producto apícola, la composición química del plaguicida, particularmente concerniente a su afinidad con los lípidos, el tiempo en que se realiza la aplicación y la forma de extracción de los productos.

La principal vía de paso del ingrediente activo hacia la cera, es por contacto con las abejas que acumulan el producto sobre sus cuerpos. Una vez en la cera, éste pasa hacia otros productos apícolas, de tal manera que en condiciones de alta concentración de residuos en la cera luego de varios años de aplicación, el ingrediente activo pasaría a la miel por difusión (Wallner, 1999 citado por DUSSAUBAT, 2002).

Wallner (1999) citado por SILLARD (2002), indica que la cera contaminada es una fuente significativa de residuos en la miel debido a que no ocurre una degradación natural de los acaricidas en la cera. De todo lo anterior se deduce que la calidad de la cera también tiene influencia en la calidad de la miel.

Con respecto a la regulación de residuos de varroocidas en cera de abejas Wallner (1995) citado por SILLARD (2002) expone que oficialmente, los residuos no están regulados en el mundo, la única excepción la posee USA que indica un límite no oficial de 6 ppm.

Según MEDICI (2005) cuando recién se probó el coumafos en USA se le quiso tratar como un medicamento de “tolerancia cero”, esto es que no se permitirían residuos de más de 0.001 ppm (1 ppb) en mieles. Algunos apicultores se quejaron ya que las mieles provenientes de colmenas tratadas con tiras de Check Mite presentaron residuos de coumafos de 0.01 a 0.015 ppm. Además se cuestionó que otros productos alimenticios que se consumían en mayor volumen que la miel tenían niveles de tolerancia al coumafos mayores (1 ppm en carne; 0.5 ppm en leches y 0.1 ppm en huevos). Todo esto llevó a que se aunara el criterio con Europa con un límite máximo de 0.1 ppm. Para la Comunidad Económica Europea el Límite Máximo de Residuos (MRL) permitido para esta droga en mieles es de 0.1 ppm, que es el límite máximo en la concentración del residuo tolerado para ser aceptable como alimento.

Por otro lado Martin, 1999 citado por SILLARD (2002) expone que varios países como Alemania, Holanda e Italia tienen sus propios límites máximos. En algunos casos se especifica una sustancia en particular y en otros casos existe un límite general de 10 µg/kg ó 50 µg/kg

La reglamentación sanitaria en Chile indica que la miel debe estar libre de sustancias extrañas (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS, 1997), pero no estipula los residuos de pesticidas de ninguna clase por tanto se adopta para este objeto los límites máximos establecidos y continuamente revisados por las Reuniones Conjuntas de FAO/OMS (Schmidt, 1979; citado por SILLARD, 2002).

Según Wallner (1999), citado por SILLARD (2002), desde que grandes cantidades de cera de abejas son procesadas para fines farmacéuticos o por las industrias de alimentos y cosmetológicas, los residuos de pesticidas se han transformado en un problema. Agrega que varias industrias han creado su propio Límite Máximo Interno (LMI) para considerar que la contaminación de la cera de abejas es aceptable.

Para garantizar que no exista migración de residuos de la cera a la miel, Wallner (1999), citado por SILLARD (2002), señala que los residuos en la cera deben estar bajo 1ppm.

En cuanto a toxicidad, un estudio de alimentación en abejas con jarabe azucarado en varias dosis demostró que coumafos es el más tóxico, con una gran mortalidad de abejas; luego le siguió el amitraz, siendo fluvalinato el menos tóxico (Jedruszuk y Wael, 1992 citados por KLASSEN, 1995).

HAARMANN *et al.* (2002) señalan que tratar las colonias con coumafos durante el desarrollo de la reina impacta negativamente a ésta provocando una disminución de su peso y una disminución en el peso de los ovarios.

2.4.1 Estudios de residuos en cera y miel. En Suiza BOGADANOV *et al.* (1998) realizaron un estudio sobre los residuos de acaricidas en algunos productos de las abejas, los ingredientes activos de los acaricidas estudiados fueron bromopropilato, coumafos, fluvalinato y flumetrina. Estudiaron los niveles de contaminación de bromopropilato, coumafos y fluvalinato en opérculos de cría, de miel, y en muestras de miel tomadas después del tratamiento. Además midieron los niveles de contaminación de cera reciclada y propóleo para los cuatro ingredientes activos antes mencionados.

Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: los niveles de acaricidas encontrados en los diferentes productos de la colonia, después de ser tratados con los distintos acaricidas, decrecen en el siguiente orden: opérculos de cría > opérculos de miel > alimento dulce ≥ miel. Estos resultados indican que todos los acaricidas son muy lipofílicos, siendo el menos lipofílico coumafos.

Los resultados de los niveles de contaminación en los opérculos de cría indican que la mayor contaminación ocurre con bromopropilato seguido por coumafos y fluvalinato. Los niveles de contaminación encontrados en los opérculos de cría son directamente proporcional con la cantidad de ingrediente activo administrado durante el tratamiento para fluvalinato y bromopropilato, esta tendencia no se presenta en el caso de coumafos y puede explicarse por una degradación de éste. Por otro lado, la

solución de Perizin® utilizada fue derramada entre los opérculos y es muy probable que no haya quedado bien distribuida.

Los niveles de contaminación de la cera comercial en Suiza, se presentan en la Figura 3. Desde que se registró Apistan y Bayvarol en 1991 los niveles de bromopropilato fueron decreciendo lentamente porque el producto comercial que lo contiene "Folvex" prácticamente nunca más se usó para el control de varroa. Los niveles de coumafos se mantienen casi constantes en el tiempo con una leve disminución a partir del año 1994. Por el contrario los niveles de contaminación de fluvalinato aumentaron rápidamente a partir de los dos primeros años de uso de Apistán. No se encontraron niveles de contaminación de flumetrina (límite de detección 0.25 mg/kg).

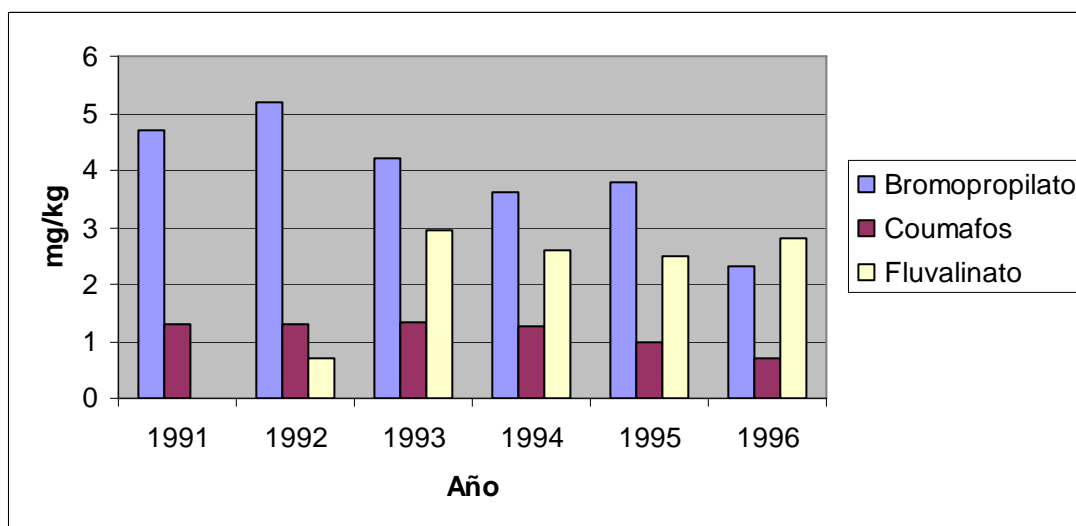


FIGURA 3 Residuos de acaricidas en cera comercial en Suiza.

FUENTE: BOGDANOV *et al.*, (1998).

BOGDANOV *et al.*, (1998) exponen que los resultados de los niveles de contaminación por acaricidas en la cera comercial generalmente son más bajos que los encontrados en los opérculos de cría, las concentraciones de acaricidas no decrecen durante el proceso de reciclaje de cera, estos permanecen estables. Por otro lado al fundir la cera vieja se junta la cera de distintos tipos: cera de opérculos de miel (que se

encuentran en mayor cantidad) con cera de opérculos de cría y restos de cera del panal, lo que explica por qué la cera comercial posee niveles más bajos de contaminación de acaricidas que los encontrados en ese estudio en opérculos de cría.

Así también GARCÍA (2006) indica que la cera de opérculos tiene en promedio un 20-25% de los residuos que contiene la cera proveniente de panales de cría. Esto indica que hasta que no se pueda controlar bien el tema de residuos en cera habría que evitar para la fabricación de cera estampada la utilización de cera utilizada en los panales de cría.

FRIES *et al.* (1998) realizaron un estudio de los efectos de la contaminación de acaricidas en la cera de las abejas sobre *V. jacobsoni* (actualmente *V. destructor*). Estudió los efectos de amitraz, coumafos y fluvalinato en la mortalidad y fertilidad de las varroas. Los resultados revelaron que los efectos sobre las varroas dependen del tipo y concentración del acaricida. Mientras fluvalinato afecta a las varroas en concentraciones cercanas a 100 ppm, una concentración de coumafos de 10 ppm produce un 33% de mortalidad de varroas, el autor indica que estos resultados discrepan a los obtenidos por MILANI y DELLA VEDOVA (1996) que obtuvieron niveles de mortalidad más altos, esto se explicaría porque la difusión de coumafos es más rápida en parafina que en cera de abeja que es la que se utilizó en ese estudio.

El mismo autor indica que fue una sorpresa no encontrar efectos subletales en las varroas.

2.4.1.1 Estudios de residuos en cera y miel realizados en Chile. El año 1999 comenzó el primer estudio sobre residuos en miel y cera en Chile, este se llevó a cabo dentro del marco del proyecto “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” (UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, 2003).

El año 2003 se inició la ejecución del segundo proyecto apícola que lleva por título “Contribución a la sustentabilidad de la apicultura chilena, entre las Regiones IV

y X, a partir del monitoreo de residuos de miel y cera, para incrementar su inocuidad y competitividad de acuerdo a las exigencias de los mercados de destino” (UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (UACH), 2005)¹

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Austral de Chile. Estos resultados constituyen la primera aproximación a la situación real de residuos en miel y cera del país, sin embargo, ya está claro que la situación es crítica dado que las técnicas analíticas que permitieron pesquisar los residuos responden a los estándares internacionales.

2.4.2 Resultados obtenidos del proyecto Fondo SAG N° 64. A continuación se presentan algunos de los resultados obtenidos en este proyecto, correspondientes a la temporada 2004.

2.4.2.1 Resultados de residuos en muestras de cera y miel. Un alto porcentaje de muestras de miel y cera, sobre el 80% (n=115), presentaron residuos de fluvalinato y flumetrina, en tanto los porcentajes de muestras con residuos de coumafos fueron menores, sin embargo, la metodología de extracción de este analito utilizada se encuentra en revisión. El protocolo de muestreo se puede revisar en el Anexo 1.

¹ UACH, 2005. Proyecto apícola fondo SAG n° 64. Informe técnico financiero período: 16 de marzo al 15 de julio 2005. Datos no publicados.

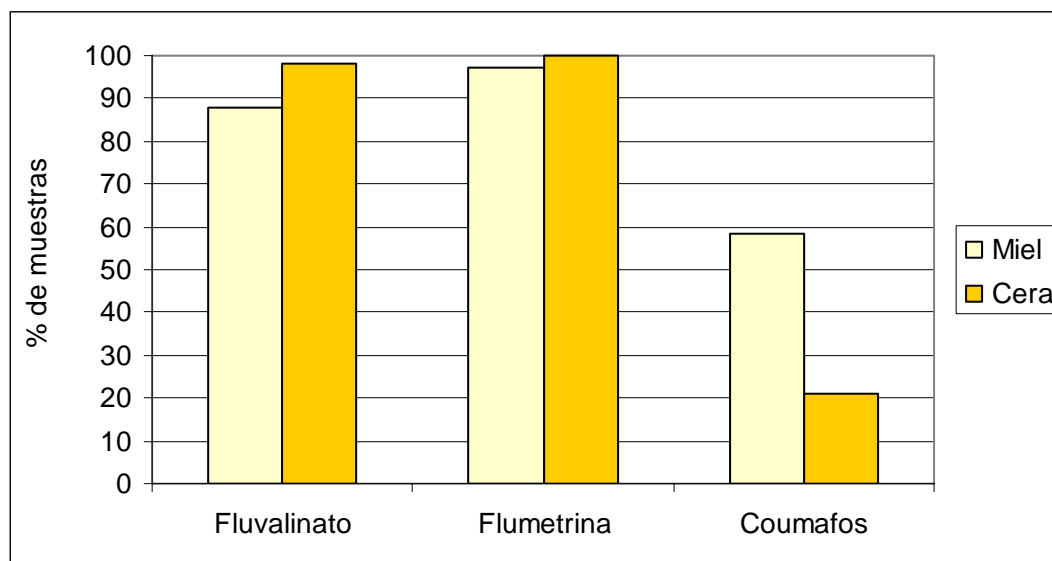


FIGURA 4 Porcentaje de muestras de miel y cera con residuos de fluvalinato, flumetrina y coumafos.

FUENTE: UACH, 2005¹.

Al revisar las concentraciones de estos 3 ingredientes activos es posible observar claras diferencias entre regiones principalmente en coumafos (Figura 5). En el caso de la miel, la región con concentraciones más altas de este último analito corresponde a la VIII Región, en tanto en cera, la V Región es la que presenta mayores concentraciones que el resto.

Los rangos de coumafos detectados en cera y miel fueron: cera: 0,003 - 10 ppm, con un promedio de 1,636 ppm, el límite mínimo de detección fue de 0,003 ppm, y en miel de 0,0003 – 4,052 ppm, con un promedio de 0,207 ppm, con igual límite de detección.

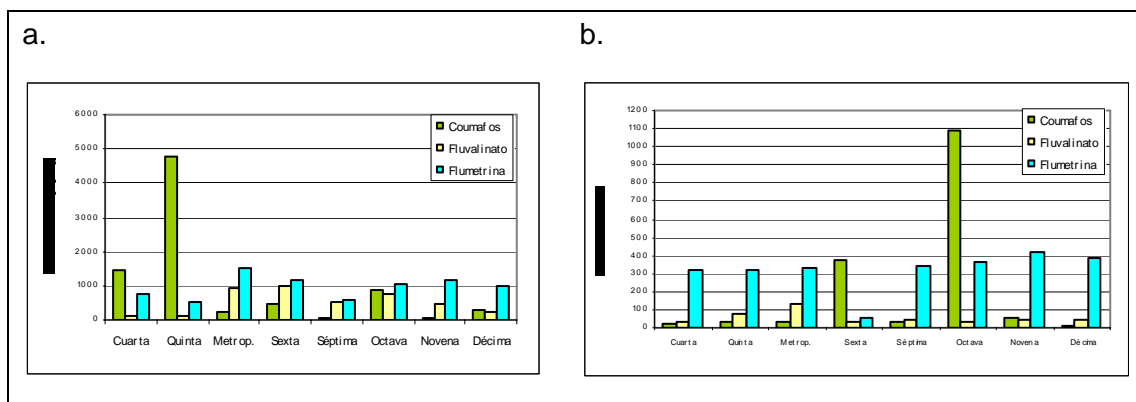


FIGURA 5 a. Concentraciones por región de residuos de fluvalinato, flumetrina y coumaf os en muestras de cera, temporada 2004.

b. Concentración de residuos por región de fluvalinato, flumetrina y coumaf os en muestras miel, temporada 2004.

FUENTE: UACH, 2005¹.

2.4.2.2 Resultados de encuesta a apicultores. Dentro del proyecto se realizó una encuesta a los apicultores muestreados, algunos resultados de ésta se presentan a continuación.

El 99,1% de los apicultores encuestados (n=117) dice haber reconocido presencia de varroa en sus colmenas en la temporada apícola 2004. En Anexo 2 se puede observar la tabla de distribución del porcentaje de apicultores según enfermedades o enemigos de las abejas observados por el apicultor en la temporada 2004.

En el Anexo 3 se observa la tabla de distribución del porcentaje de apicultores según productos que aplica para controlar enfermedades, Hay que destacar que el 17,8 % de los apicultores reconoce aplicar Asuntol® en sus colmenas para control de enfermedades.

Sobre el recambio de cera realizado por los apicultores sus respuestas llevaron a concluir lo siguiente: el recambio de cera se realiza en su mayoría dentro de las recomendaciones más aceptadas, que corresponde a un tercio cada temporada o cada dos temporadas. Sin embargo, la debilidad del sistema radica en el procesamiento de la cera de recambio, ya que la mayoría de las opciones que ofrecen los estampadores no permite conocer la calidad ni origen de la cera transada.

La Figura 6 muestra el método utilizado para recambio de cera por los apicultores. Además se adjunta la tabla de distribución del número y porcentaje de apicultores según método habitual de recambio de cera (Anexo 4). El método con más frecuencia (56,8% de los apicultores reconoce hacerlo) es mandar a estampar y recibir cera de origen desconocido.

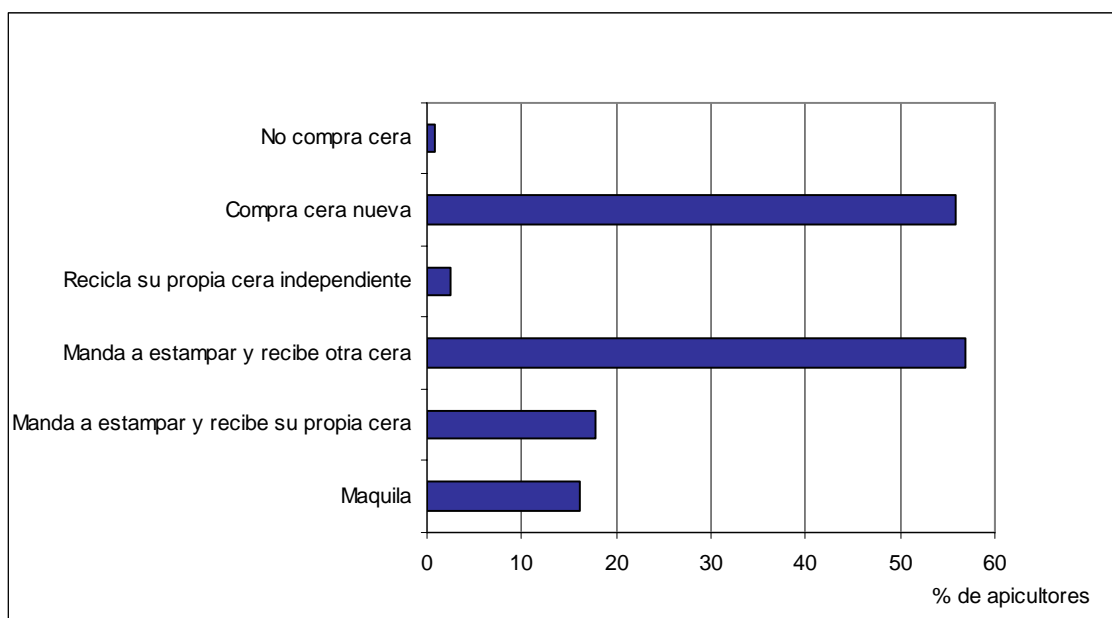


FIGURA 6 Porcentaje de apicultores según método utilizado para recambio de cera (n= 118). Temporada 2004.

FUENTE: UACH, 2005¹.

Los niveles de coumafos encontrados y el manejo de cera que evidencia el estudio mencionado son dos factores que favorecen la aparición de resistencia de varroa.

Por otra parte NAMDAR y QUEZADA (2006) indican que una de las amenazas a la apicultura nacional es que los países a los cuales Chile exporta miel y otros productos de la colmena están incrementando y endureciendo sus exigencias de inocuidad y calidad.

Así también señala que el boom exportador de la miel chilena se debió a la combinación de dos factores: el retroceso de la oferta de los principales proveedores mundiales (China y Argentina) y los niveles de calidad exhibidos por la miel chilena que le dio ventajas comparativas para ocupar nuevos espacios de mercado.

Sin embargo, estas ventajas en cierta medida se están desdibujando. Por un lado la reciente alerta sanitaria notificando la detección de antibióticos (sulfonamida) en mieles chilenas exportadas a Italia, empaña la imagen de inocuidad y calidad que éstas habían logrado generar en los mercados externos y, por otra parte, la recuperación y reinserción en los mercados mundiales de China y Argentina, junto con la emergencia de nuevos competidores como Brasil, India y Vietnam genera claramente un escenario de mayor competencia para Chile. Esta situación obliga a plantearse una estrategia productiva y comercial que contrarreste estos fenómenos (NAMDAR y QUEZADA, 2006).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Ubicación geográfica del ensayo.

Los apiarios que fueron muestreados para este estudio pertenecen a apicultores que participaron en el “Proyecto fondo SAG N° 64 año 2004”.

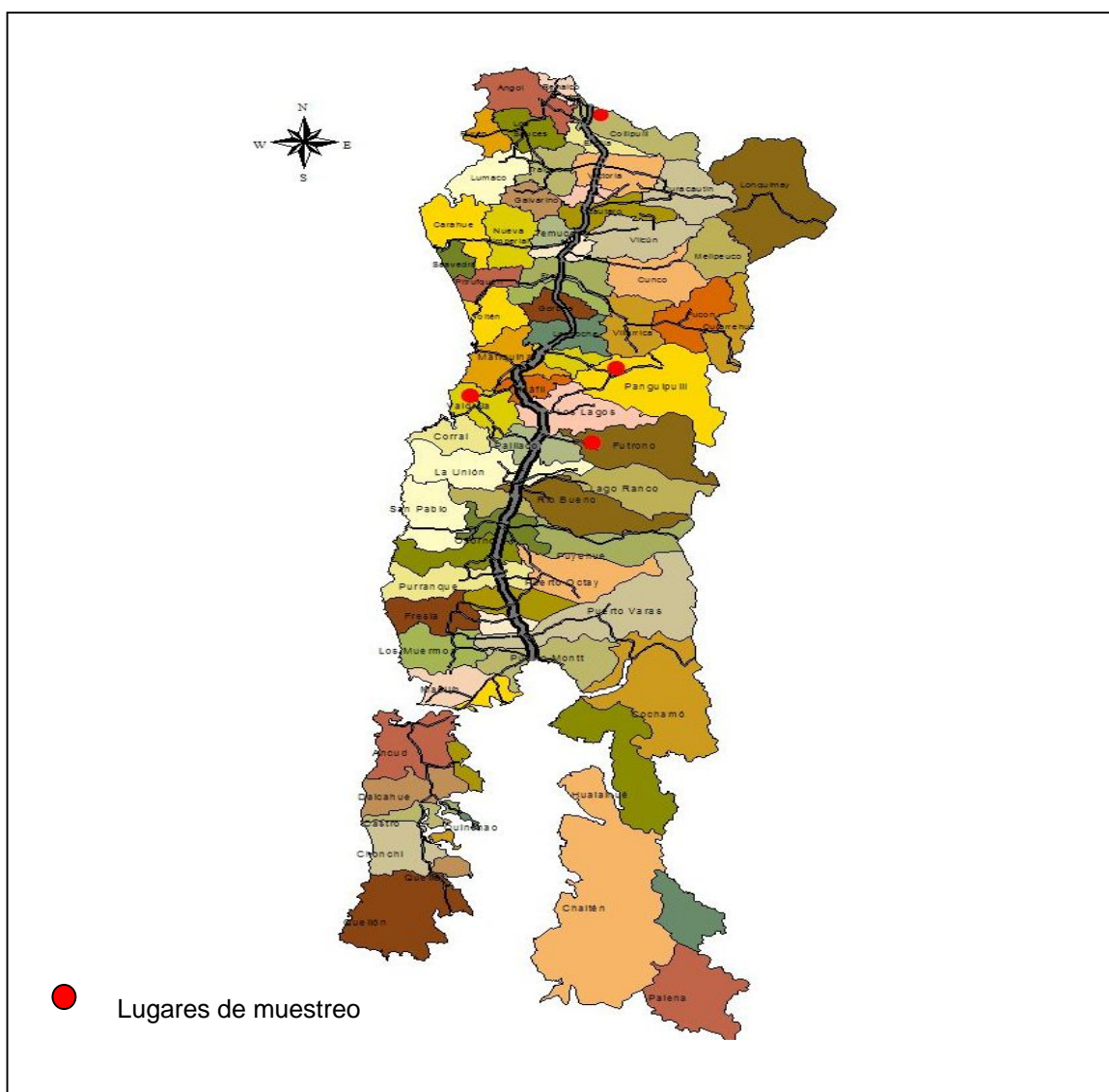


FIGURA 7 Mapa de la IX y X Región indicando los lugares de muestreo del ensayo.

Los apiarios muestreados se encuentran en tres localidades distintas (Figura 9):

Apiario 1: localidad de Futrono, X Región.

Apiario 2: localidad de Panguipulli, X Región.

Apiario 3: localidad de Collipulli, IX Región.

La extracción de los ácaros y su posterior estudio, así como la preparación de los materiales utilizados para el ensayo se realizó en los Laboratorios de Fitoquímica y Entomología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, situada en la ciudad de Valdivia, X Región.

3.2 Material del ensayo.

El material utilizado se detalla a continuación.

3.2.1 Materiales utilizados en la preparación de las cápsulas.

- Asuntol (coumafos al 30%).
- Parafina sólida.
- Hexano calidad analítica.
- Frasco ámbar hermético.
- Discos de vidrio de 60 mm de diámetro.
- Anillos de acero inoxidable de 55 mm de diámetro interno y 5 mm de altura.
- Refrigerador.
- Ventosas.
- Balanza electrónica, sensibilidad 100 mg (Sartorius).
- Calefactor con agitador magnético (Cenco).
- Recipiente de acero inoxidable, para baño María.
- 4 Recipientes de acero inoxidable para derretir cera a baño María.
- Termómetro (sensibilidad 1°C, rango -20 a 110°C).
- Vaso precipitado 100 mL.
- Varilla de vidrio para agitar.
- Pipetas.
- Micropipetas.

3.2.2 Materiales utilizados en la recolección de muestras.

- Mochila aislante.
- 3 Guateros.
- Cuchillo.
- Alcohol.
- Algodón.
- Papel absorbente.
- Traje apícola (buzo blanco, guantes, velo).
- Ahumador.
- Acículas de pino (combustible).
- Palanca Root.

3.2.3 Materiales utilizados en etapa experimental en laboratorio. Estos se clasificaron en material de laboratorio y material biológico.

3.2.3.1 Material de laboratorio.

- Cámara incubadora ($33 \pm 1^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR).
- Termómetro – higrómetro.
- 1 Lupa binocular marca Carl Zeiss.
- Fuente de luz fría marca Carl Zeiss. Modelo KL 1500 LCD.
- Placas Petri 20 cm de diámetro.
- Placas Petri 60 mm de diámetro.
- Parafilm.
- Cápsulas de vidrio recubiertas de parafina con coumafos en distintas concentraciones.
- 4 Pinceles finos.
- Alfileres.
- Pinzas.
- Trozos de polietileno para cerrar cámara incubadora (conservación de humedad relativa).

3.2.3.2. Material biológico.

- Ácaros de varroas adultas extraídos de cría operculada.

- Larvas de obrera recientemente operculadas.

3.3 Método.

Se realizó la metodología basada en MILANI (s.f) (b) en el protocolo del test CL₅₀ de Tau-fluvalinato en *V. destructor*. Este test permite medir la susceptibilidad de *V. destructor* al ingrediente activo utilizado.

Esta prueba se basa en el contacto controlado de los ácaros con una concentración conocida del ingrediente activo (en el caso de este estudio se utilizó el ingrediente activo coumafos) 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.

3.3.1 Elección de los colmenares para obtención de ácaros. Los ácaros probados fueron extraídos de tres colmenares, dos de ellos de la X Región de los sectores de Panguipulli y Futrono y el otro de la IX Región de la localidad de Collipulli. Los colmenares pertenecen a apicultores que participan en el “Proyecto fondo SAG N° 64 año 2004”, y se eligieron por presentar altos niveles de infestación de varroa entre los meses de enero y febrero de 2006.

3.3.2 Determinación de las concentraciones a evaluar. Se probaron 4 concentraciones: 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm. Estas fueron establecidas a partir de los valores medios de residuos de coumafos en muestras de cera de la IV a X regiones, analizadas dentro del “Proyecto fondo SAG N° 64, año 2004” (UACH, 2005¹). El procedimiento fue el siguiente: se calculó la media de estos resultados (2 ppm) que se designó como el tratamiento 2, este valor (2 ppm) se aumentó en dos puntos para obtener la dosis del tratamiento 3 (4 ppm) y para el valor máximo (tratamiento 4) se le sumaron 4 puntos (6 ppm).

Se expusieron 30 ácaros por tratamiento, y el tratamiento 1 o testigo (0 ppm) indicó la mortalidad natural.

Los tratamientos se detallan a continuación:

Tratamiento 1 = 0 ppm

Tratamiento 2 = 2 ppm

Tratamiento 3 = 4 ppm

Tratamiento 4 = 6 ppm

3.3.3 Preparación de las cápsulas. Se trabajó a partir de una solución madre de coumafos en hexano de 20 mg/mL. Se preparó añadiendo 2 g de coumafos (8.04 g de Asuntol) en un vaso precipitado de 100 mL. Esta solución se conservó en un frasco ámbar hermético, fuera del alcance de radiaciones UV, en un refrigerador. A partir de esta solución se hicieron diluciones para obtener las concentraciones requeridas.

Para la preparación de las cápsulas se pesaron 40 g de parafina en un recipiente. Luego ésta se fundió poniéndola en un recipiente a baño María ($60 \pm 5^\circ\text{C}$), añadiendo 20 mL de la solución de coumafos en la parafina fundida. Se mantuvo la mezcla a baño María durante 100 minutos, homogeneizándola con un agitador magnético para que se evaporara el hexano.

Después de evaporarse el hexano, se mantuvo la mezcla a baño María y se acercaron los discos a la superficie de la misma sujetándolos con una ventosa, para impregnar una cara del disco con la mezcla. A continuación se puso un aro de metal sobre el disco antes que la parafina solidificara (esta acción solo se hizo en el 50% de los discos).

Se guardaron las cápsulas abiertas a temperatura ambiente durante 24 horas, para evaporación de residuos de hexano. Posteriormente las cápsulas se conservaron cerradas en una estufa incubadora a $33 \pm 1^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR, imitando la temperatura y humedad que se encuentra en las colmenas. Estas cápsulas fueron utilizadas entre 1-12 días después de su preparación (MILANI y DELLA VEDOVA, 1996).

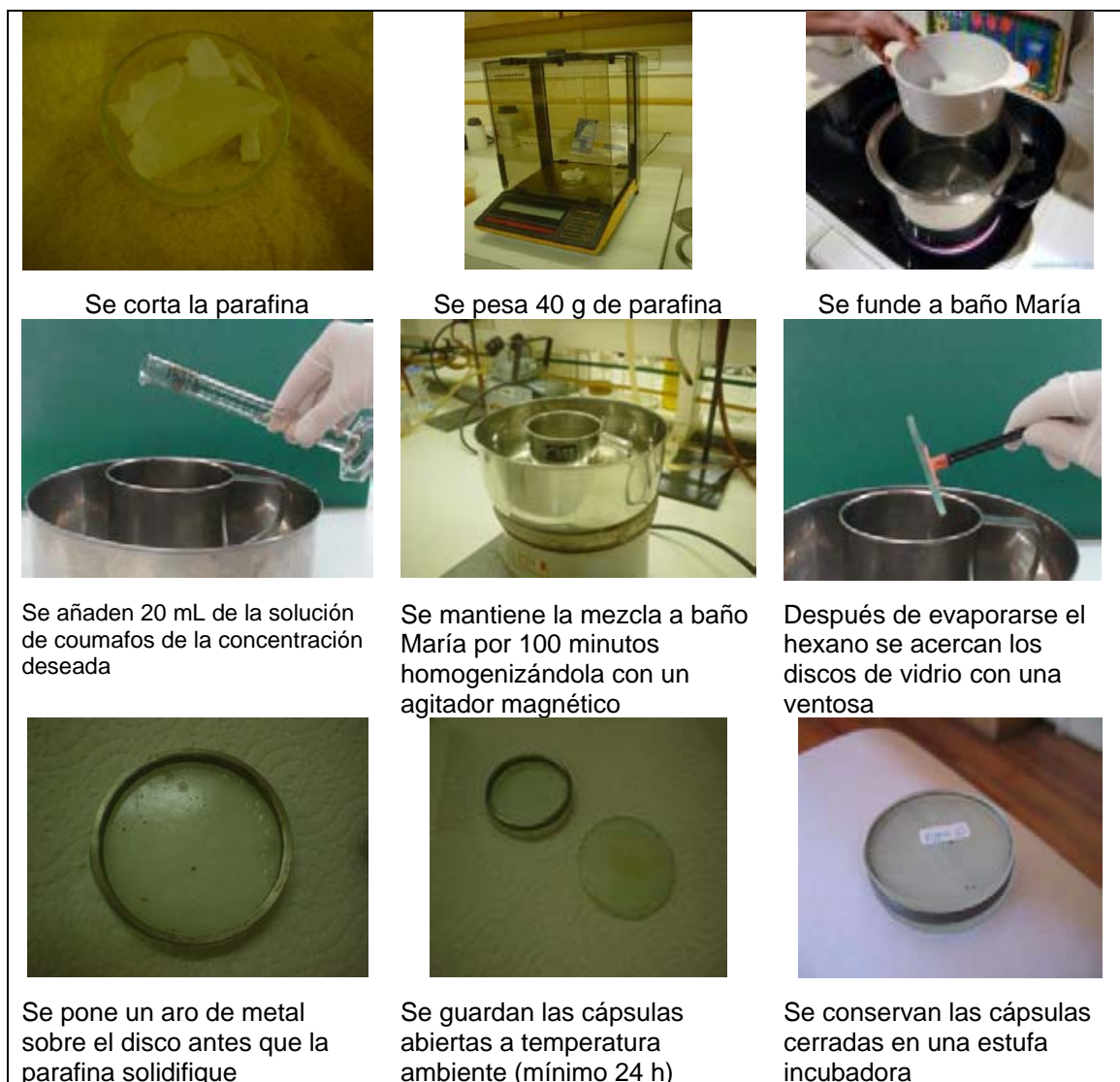


FIGURA 8 Diagrama de preparación de las cápsulas.

3.3.4 Etapa experimental. Se realizaron cuatro tratamientos, correspondientes a cuatro dosis de coumafos (0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm).

Cada tratamiento tuvo 6 repeticiones, se evaluaron 5 ácaros por repetición, por lo tanto 30 ácaros por concentración.

3.3.4.1 Obtención de las muestras. Se extrajeron muestras de cría operculada de marcos de cría infestados con varroa, de los apiarios seleccionados. Se cortaron trozos

de panal de cría de tamaño variable definido por la cantidad de cría operculada presente (Figura 11). Las muestras se envolvieron en papel absorbente y se trasladaron rápidamente a laboratorio. Para el transporte de las muestras al laboratorio, se dispuso de una caja térmica entibiada con botellas con agua caliente, o una mochila aislante con guateros con agua caliente para mantener la temperatura constante; al llegar al laboratorio fueron puestas en la cámara incubadora a $33 \pm 1^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR.

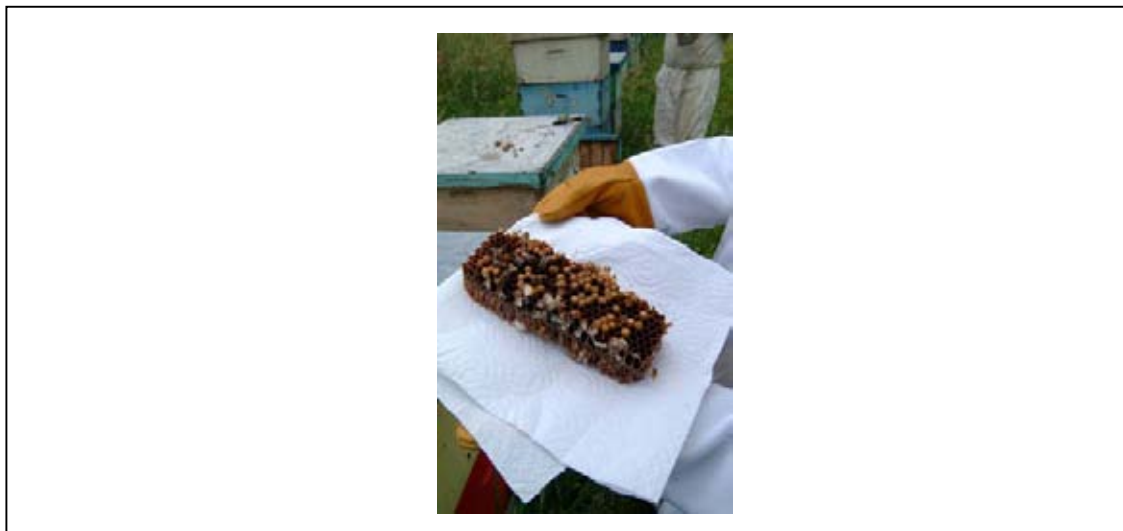


FIGURA 9 Trozo de panal de cría para obtención de muestras de varroa

3.3.4.2 Extracción de los ácaros. Esta se realizó desoperculando las celdas e inspeccionando la cría. Solo se seleccionaron los ácaros que provenían de larvas o ninfas poco pigmentadas a objeto de distinguir las madres de las hijas, pues solo son útiles para la prueba las primeras. Esta extracción se realizó, cuando fue posible, el mismo día de la toma de muestras, o bien al día siguiente, a primera hora. Para esto los ácaros siempre se manipularon con un pincel o con un alfiler.

Se rechazaron los ácaros anormales (dañados impregnados con fluido larvario, pegados al alimento larvario, los apoyados sobre su parte dorsal y que realizaron movimientos irregulares). Se pusieron inmediatamente los ácaros en cápsulas Petri con presencia de cría de obrera recientemente operculada. Se puso cada 30 minutos la cápsula Petri en la estufa incubadora ($33 \pm 1^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR), evitando de esta forma el enfriamiento de los ácaros.

3.3.4.3 Colocación de los ácaros en cápsulas con distintas concentraciones de coumafos. Se colocaron los ácaros antes de tres horas desde su extracción. Se introdujeron 5 ácaros por cápsula, utilizando un pincel distinto para cada concentración (Figura 10).



FIGURA 10 Colocación de los ácaros en cápsulas con distintas concentraciones de coumafos

Las cápsulas se dejaron en la estufa incubadora por seis horas exactas a $33 \pm 1^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$ HR. Seis horas después de su colocación, los ácaros se transfirieron a una placa Petri limpia y seca en presencia de larvas de obrera recientemente operculadas (una larva por cada cinco ácaros) (Figura11).



FIGURA 11 Traslado de ácaros a una placa Petri en presencia de larvas de obrera recientemente operculadas

Las placas Petri se pusieron a continuación en la estufa incubadora a la temperatura y humedad antes mencionada. Estas fueron selladas con parafilm.

3.3.4.4 Observación de resultados. Se observaron los ácaros a las 24 y 48 horas de su contacto con parafina sólida con distintas concentraciones de coumafós. Los ácaros se observaron con una lupa binocular y con la ayuda de pinzas se estimularon mecánicamente tres veces, clasificándolos en:

- ácaros muertos: no presentaron ninguna reacción al estímulo,
- ácaros paralizados: pudieron mover ciertos apéndices pero no fueron capaces de desplazarse,
- ácaros móviles: se desplazaron espontáneamente cuando fueron estimulados,
- ácaros dañados o perdidos: no fueron tomados en consideración.

La proporción de ácaros muertos después de 48 horas del total de ácaros no dañados ni perdidos se utilizó para el cálculo de mortalidad.

3.3.5 Tratamiento de los resultados. Los datos de cada repetición obtenidos a las 48 horas de encapsulados los ácaros fueron corregidos con la fórmula de Schneider y Orelli (Bakr, 2002 citado por SCHMIDT, 2005).

$$M.C = \frac{(M.O - M.N)}{(100 - M.N)} * 100 \quad (3.1)$$

Donde:

M.C= Mortalidad corregida (%)

M.O= Mortalidad observada (%)

M.N = Mortalidad natural (%)

Los porcentajes obtenidos de la fórmula citada anteriormente fueron expresados como raíz de arco seno.

3.3.6 Análisis estadístico Cuando los datos son proporciones o porcentajes de una distribución binomial, las diferencias con una distribución normal son más acusadas para valores pequeños o grandes de las proporciones, por lo que se realiza una transformación basada en arcoseno de \sqrt{p} , donde p varía entre 0 y 1, es decir si los datos son del estilo 12,5 % los valores p tienen que ser transformados a 0.125 (WINER, 1971 y MORALES, 2005).

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statgraphics plus 5.1.

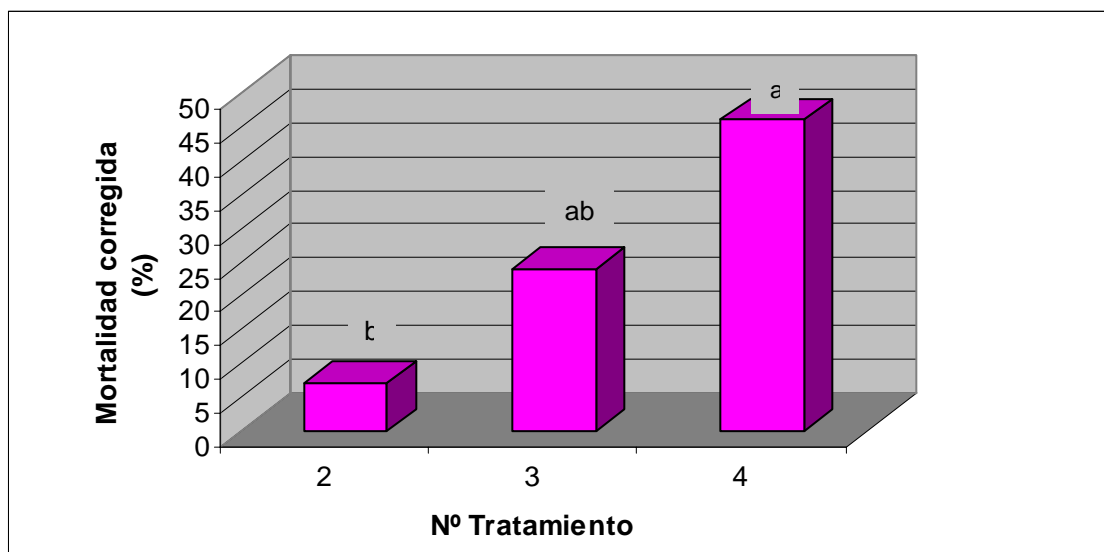
Se probó la homogeneidad de varianza de los datos y posteriormente se realizó un análisis de varianza multifactorial, considerando como variable dependiente la mortalidad y variables independientes (factores) las concentraciones de coumafos y los apiarios de origen de las muestras, luego el test Tukey (HSD) con un 95% de confianza, para el factor que resultó estadísticamente significativo.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se expondrán los resultados obtenidos en este trabajo de acuerdo a la metodología planteada.

4.1 Efecto de las concentraciones de coumafos, probadas en el experimento, sobre la mortalidad de varroa.

Como se puede observar en el gráfico (Figura 12) ninguno de los tratamientos probados superó el 50% de mortalidad.



-Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas.

FIGURA 12 Promedio de la mortalidad corregida de *V. destructor* de tres apiarios, por efecto de tres concentraciones de coumafos.

Esto indicaría que ceras con niveles de residuos como los estudiados presentarían uno de los cuatro factores enumerados a continuación que favorecen la aparición de resistencia: la subdosificación del producto.

Como indica CALATAYUD (2000) dentro de los factores que favorecen la aparición de resistencia se encuentra el aislamiento relativo de los ácaros, esto ocurre porque cada colmena tiene su población de varroas relativamente aisladas, al aplicar un acaricida mueren las varroas susceptibles quedando sólo para reproducirse las resistentes, por lo que no existe combinación genética de varroas resistentes con varroas susceptibles. De este modo cada vez que se repite la aplicación del ingrediente activo se beneficia la aparición de resistencia.

El segundo factor que indica el autor es la extensión de la reproducción del ácaro a lo largo del año. Éste no es muy importante en la zona centro-sur de Chile debido a los meses de bajas temperaturas que impiden la presencia de crías durante las estaciones de otoño e invierno y consecuentemente imposibilita la reproducción de las varroas.

Por otro lado si existiese resistencia esto sería una desventaja ya que como exponen MILANI y DELLA VEDOVA (2002) a mayor cantidad de generaciones de varroa por año más rápido disminuye la proporción de ácaros resistentes si se deja de utilizar el ingrediente activo.

Muchas veces los apicultores realizan tratamientos innecesarios o hechos de forma sistemática sin tomar en cuenta si el nivel de infestación lo exige. Por otro lado no realizan una correcta dosificación y/o modo de empleo de los productos, provocando una presión de selección muy alta en la población. Estos dos puntos son también incluidos por el autor como factores que favorecen la aparición de resistencia.

Además como indican los resultados del “Proyecto fondo SAG N° 64” el 17,8% de los apicultores encuestados admite aplicar Asuntol®, un producto que no ha sido recomendado para uso en abejas y que además lo utilizan en concentraciones variables en tablillas artesanales. Se realiza de esta forma el cuarto factor expuesto por CALATAYUD (2000) que favorece la aparición de resistencia.

De acuerdo a la información contenida en el análisis de varianza multifactorial (Anexo 6) es posible señalar que las dosis de coumafós, probadas en este estudio,

tienen un efecto significativo en la mortalidad de las varroas. La prueba de Tukey (HSD) para los distintos tratamientos (Anexo 7), muestra las diferencias que existen entre las distintas dosis. No existe diferencia entre el tratamiento 2 y 3, el tratamiento 3 y 4 son similares entre ellos, los únicos tratamientos que tienen diferencias estadísticas son el tratamiento 2 con el 4.

Sin embargo como se discutió anteriormente, las tres dosis estarían beneficiando la aparición de resistencia ya que sus niveles de mortalidad son muy bajos.

Otros de los factores que favorecen la aparición de resistencia en varroa están relacionados con sus características biológicas y de reproducción (FERNANDEZ y COINEAU, 2002). Como las hembras se acoplan generalmente con su hermano, excepto cuando la celda está plurinfestada y exista presencia de machos de otra descendencia, el pool genético es reducido. Además el macho proviene de un huevo haploide por lo que su aporte en la variabilidad genética es aún menor.

En las condiciones climáticas de la zona centro sur de Chile la población del ácaro durante los meses de verano aumenta aproximadamente en 0,021 por día, eso significa que ella se duplica en solo 33 días. Por otro lado el alto número de generaciones que se producen al año beneficia la aparición de resistencia por mutaciones por parte de los ácaros.

Otro factor de la biología de varroa que favorece indirectamente la resistencia es el tiempo que pasa dentro de la celdilla de cría operculada mientras ocurre su ciclo reproductivo, este punto impide la muerte de las varroas por algún tratamiento hecho a la colmena durante este período, debiendo repetirse los tratamientos o necesitando la aplicación de productos que tengan efecto de acción más prolongado aumentando el tiempo de contacto de los ácaros con el producto y número de aplicaciones de los acaricidas.

4.2 Comparación de los resultados obtenidos en el experimento con antecedentes existentes.

Como se observa en la Figura 13a, de las 101 muestras provenientes desde la IV a X regiones analizadas en el proyecto fondo SAG N° 64, durante el 2004, el 24% de ellas presentó residuos de coumafos en la cera y de éstas el 84% tuvo valores iguales o menores a 2 ppm (Figura 13b).

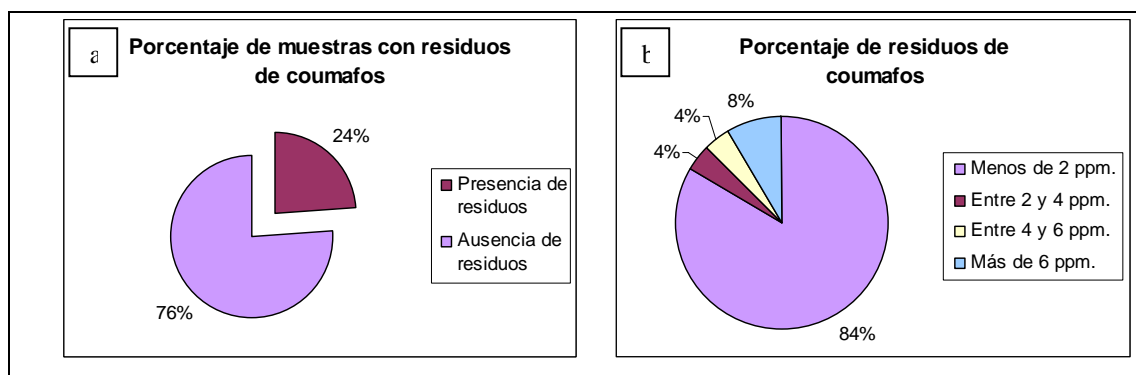


FIGURA 13 a. Porcentaje del total de muestras con presencia y ausencia de residuos de coumafos (n=101).

b. Proporción de distintos rangos de contaminación de las muestras con presencia de residuos de coumafos (n=24).

FUENTE: UACH, 2005¹

Esto es importante al considerar que, de los resultados obtenidos en este estudio, la muestra de varroa obtenida del apiario n° 2, con el tratamiento 2 (dosis 2 ppm) produjo un 0% de mortalidad y en los otros dos apiarios (1 y 3) hubo, en el mismo tratamiento, menos de 10% de mortalidad (Figura 14). Esto significa que las varroas están siendo expuestas a concentraciones en las cuales no mueren o su porcentaje de mortalidad es bajo 10%, estas dosis son bajas pero al estar las varroas expuestas permanentemente a ellas se crea una presión de selección que tiene como resultado la ineficacia del producto sobre el parásito.

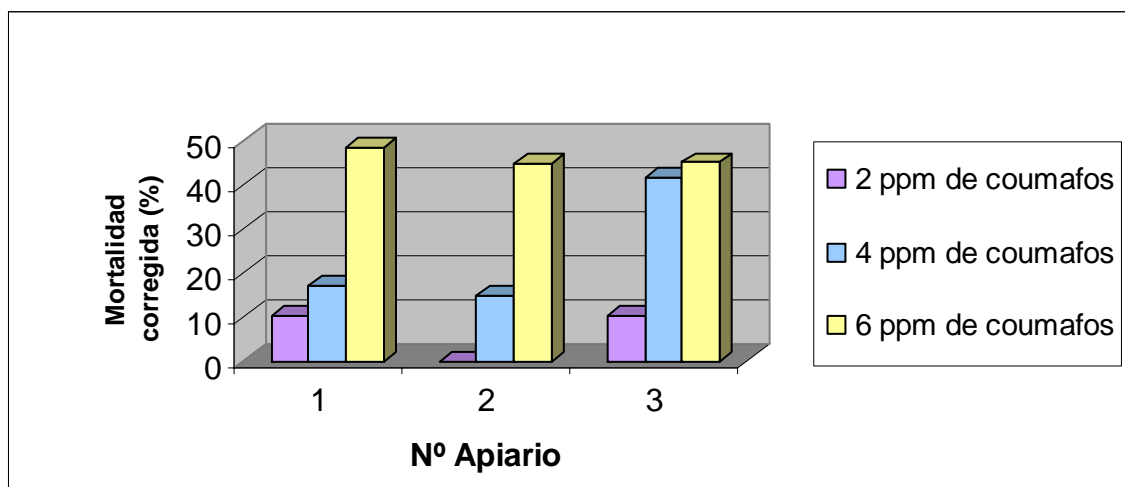


FIGURA 14 Mortalidad corregida de *V. destructor* por efecto de tres concentraciones de coumafos en muestras provenientes de tres apiarios.

Por otra parte resultados obtenidos por FRIES *et al.* (1998) en un estudio de los efectos de la contaminación de acaricidas en la cera de abeja sobre *V. jacobsoni*, en Suecia, no concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que él expone que concentraciones de coumafos de 10 ppm producen un 33% de mortalidad de varroas, mientras que los resultados obtenidos en este estudio demuestran que concentraciones de 6 ppm producen entre 44 y 48 % de mortalidad dependiendo del apiario de origen, esto indicaría que de haber resistencia de las varroas a coumafos ésta se presentaría a menores concentraciones.

La posible razón de esta discordancia puede deberse a que en Chile se ha utilizado coumafos como ingrediente activo de productos utilizados para el control de varroa hace mucho menos tiempo que en Europa, el año 1992, cuando recién fue detectada varroa en nuestro país (NEIRA y MANQUÍAN, 2005), en Europa ya se había detectado residuos de coumafos en cera comercial (aproximadamente 1,3 mg/kg de miel) (BOGDANOV *et al.*, 1998) por lo que las varroas han estado expuestas a este ingrediente activo en Chile por mucho menos tiempo y serían más susceptibles, por lo tanto habría una mortalidad más alta a menor concentración del ingrediente activo.

Referente a la concentración del acaricida en la cera BOGDANOV (2004) señala que ésta aumenta con el número de aplicaciones del producto, pero decrece muy lentamente cuando se deja de utilizar el acaricida, siendo la vida media de un acaricida en la cera de 5 años pero el tiempo en desaparecer totalmente depende de la concentración inicial.

Además BOGDANOV *et al.*, (1998) señalan que los resultados de los niveles de contaminación por acaricidas en la cera comercial generalmente son más bajos que los encontrados en los opérculos de cría. Así también GARCÍA (2006) indica que la cera de opérculos tiene en promedio un 20-25% de los residuos que contiene la cera proveniente de panales de cría. Esto nos haría suponer que las varroas estarían expuestas a concentraciones más altas que las obtenidas en los resultados del “proyecto fondo SAG nº 64”, donde las muestras fueron obtenidas del tercio central de cualquiera de los marcos centrales del alza mielaria (Anexo 1).

4.3 Evaluación de la respuesta del ácaro a las distintas concentraciones según apiario de origen.

La Figura 15 muestra los promedios de mortalidad corregida por apiario, se puede observar una pequeña diferencia entre ellas la cual no es estadísticamente significativa.

El ANDEVA (Anexo 7) muestra que no hay diferencias en la mortalidad de las varroas en los distintos apiarios muestreados. Esto podría deberse a la forma de recambio de cera que realizan los apicultores como exponen los resultados del proyecto fondo SAG Nº 64, donde la debilidad del sistema radica en el procesamiento de la cera de recambio, ya que la mayoría de las opciones que ofrecen los estampadores no permite conocer la calidad ni origen de la cera transada. En la mayoría de los casos (56,8%) los apicultores reconocen mandar a estampar su cera y recibir una distinta, solo un 17,8 % reconoce mandar a estampar y recibir su propia cera y un 2,5% estampa su cera independientemente (Anexo 4).

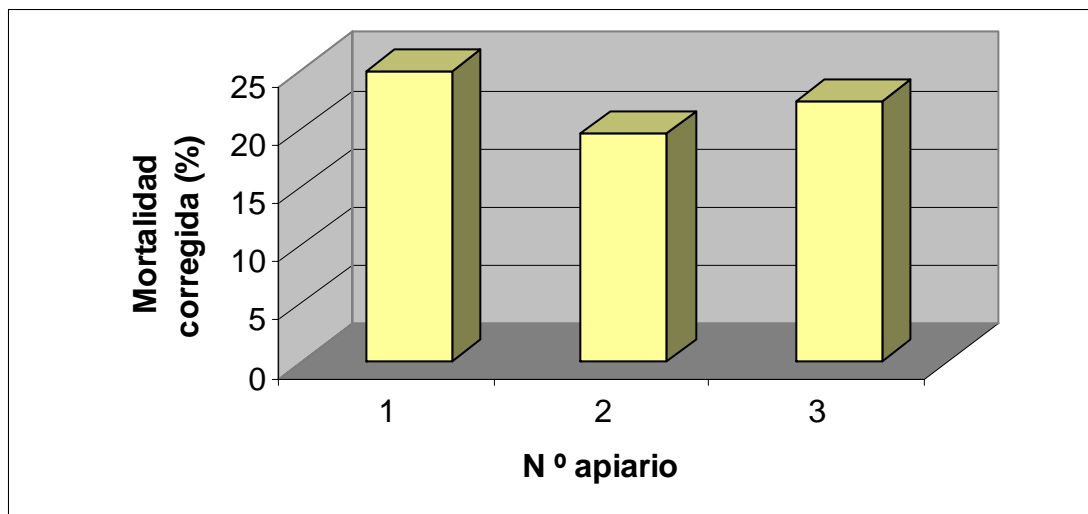


FIGURA 15 Promedio de la mortalidad corregida de *V. destructor* en muestras provenientes de tres apiarios.

Esta forma de procesamiento lleva a una mezcla de ceras de distinto origen con la consecuente contaminación de ceras sin residuos de pesticidas, con residuos de distintos ingredientes activos de los acaricidas utilizados por otros apicultores. Lo anterior explicaría que distintas poblaciones de varroas (de apiarios diferentes) estarían expuestas a bajas concentraciones de los acaricidas aún cuando el apicultor no los utilice en sus colmenas, pudiendo generar de esta forma resistencia en las poblaciones de varroa.

El problema mayor es que, como expone CALATAYUD (2000), el acaricida se degrada lentamente por lo que las cantidades acumuladas en la cera serán cada vez mayores, aumentando año tras año, mientras se siga utilizando el producto, lo cual favorece la aparición de formas resistentes.

4.4 Consideraciones generales.

En nuestro país se ha utilizado el Asuntol® (i.a coumafos) para controlar la varroosis en aplicaciones en forma artesanal como tablillas, preparando éstas en forma casera sin ningún tipo de control en la dosificación y modo de empleo, esto lo realizan

los apicultores para disminuir los costos de manejo de sus colmenas. Puede que este tipo de control por algún tiempo tenga éxito y que los apicultores sólo vean los beneficios actuales sin considerar las consecuencias que esto tiene en un futuro cercano.

Los distintos tratamientos acaricidas disminuyen las poblaciones de varroa, pero presentan la desventaja de contaminar los productos de las colmenas y seleccionar poblaciones de ácaros resistentes.

Como indican ELZEN *et al.* (1999) la primera aplicación del acaricida es muy pequeña para causar una presión de selección muy alta pero si consideramos las bajas dosis que aplicación tras aplicación se van acumulando y aumentando en la cera tendríamos una rápida respuesta de defensa del ácaro al acaricida minimizando su efecto, esto implicaría utilización de dosis cada vez más altas que tendrían como consecuencia niveles de contaminación mayores.

La principal vía de paso del ingrediente activo hacia la cera, es por contacto con las abejas que acumulan el producto sobre sus cuerpos. Una vez en la cera, éste pasa hacia otros productos apícolas, de tal manera que en condiciones de alta concentración de residuos en la cera luego de varios años de aplicación, el ingrediente activo pasaría a la miel por difusión (Wallner, 1999 citado por DUSSAUBAT, 2002).

Así también Wallner (1995), citado por SILLARD (2002) indica que algunos pesticidas pueden migrar a la miel, estos pesticidas presentan enlaces débiles en la cera y sus residuos pueden ser detectados en miel.

Por otra parte CALATAYUD (2000) indica que aunque se han encontrado residuos de acaricidas en miel se mantienen a niveles relativamente bajos porque son poco solubles en ella. Pero esto no significa que no puedan aumentar estos niveles en algún momento, principalmente si los tratamientos de reciclado de la cera no eliminan estos contaminantes.

Wallner (1995), citado por SILLARD (2002) señala que para garantizar que no exista migración de residuos de la cera a la miel estos deberían estar en concentraciones bajo 1 ppm, por otra parte los resultados del proyecto fondo SAG N° 64 indican que el 33% de las muestras que presentaron residuos de coumafos en cera poseen valores sobre 1 ppm.

El mismo autor indica que la cera contaminada es una fuente significativa de residuos en la miel debido a que no ocurre una degradación natural de los acaricidas en la cera.

Thrasyvoulou (1988) citado por KLASSEN (1995) indica que las cantidades de coumafos en miel disminuyen en un 92% después de tres meses de almacenamiento, mientras que los residuos en cera permanecen por mucho más tiempo.

Según MEDICI (2005) para la Comunidad Económica Europea el Límite Máximo de Residuos (MRL) permitido para coumafos en mieles es de 0.1 ppm, que es el límite máximo en la concentración del residuo tolerado para ser aceptable como alimento, por otro lado el rango de residuos encontrados en muestras de miel en el proyecto fondo SAG N° 64 es de 0,003 a 4,052 ppm con un promedio de 0,207 ppm, lo que demuestra que la exportación de miel desde nuestro país hacia Europa está seriamente amenazada sino se comienza rápidamente a tener conciencia de lo que esto significa y a evitar al máximo las posibilidades de contaminación de la cera, que es la que posteriormente contamina la miel.

GARCÍA (2006) indica que a medida que crecen los controles sobre residuos en miel a nivel internacional el riesgo de no tener control sobre los residuos que podría tener la cera estampada aumenta. Cada día se agregan nuevas sustancias a la rutina de mediciones en miel y a su vez constantemente aparecen nuevas metodologías y tecnologías que logran detectar cantidades cada vez menores de residuos de las sustancias actualmente medidas.

El dinamismo del comercio mundial de la miel se inscribe claramente en los profundos cambios de los hábitos de consumo, donde lo natural y saludable constituye

una variable cada vez más apreciada por los consumidores, y donde lo inocuo y seguro se pone como una exigencia insoslayable (NAM DAR y QUEZADA, 2006).

De acuerdo a lo señalado anteriormente hay que tener presente que si en el futuro la apicultura pretende sustentarse mayoritariamente en la producción y exportación de miel y otros subproductos de las colmenas hay que protegerlos y mantener su aptitud para los mercados más exigentes, asegurándose de usar la cera de mejor calidad.

Además, hay que tomar conciencia de que la miel es de consumo humano. Hoy, la miel ha ganado un cierto espacio en el mercado mundial de alimentos, el cual se debe fundamentalmente, a su característica de producto natural e inocuo.

Por otro lado la cera de abejas es ampliamente utilizada en artesanía e industria. La presencia de residuos en la cera y la evaluación de riesgos para el hombre y las abejas, es un tema de actualidad. La relevancia de este asunto es aún mayor si se piensa que la cera es ampliamente utilizada en cosméticos y fármacos.

CALATAYUD (2000) indica que todos los acaricidas dejan residuos en mayor o menor medida y, por lo tanto, para preservar la imagen de la miel como producto natural se deben respetar al máximo los tratamientos a aplicar.

NAM DAR y QUEZADA (2006) señalan que además del fuerte aumento de las exigencias de inocuidad y calidad de los productos apícolas se agudiza la competencia comercial como consecuencia del reingreso de China y Argentina y de la aparición de nuevos competidores en el mercado mundial.

5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio es posible concluir lo siguiente:

- Las dosis de coumafos probadas, 2, 4 y 6 ppm, tienen efecto selectivo sobre las poblaciones de varroas estudiadas.
- La dosis de 6 ppm presentó el porcentaje de mortalidad más alto, representando junto con las otras dos concentraciones estudiadas, dosis subletales que favorecerían la aparición de resistencia.
- En Chile existen antecedentes de ceras con niveles de residuos menores o iguales a los valores estudiados, por lo tanto, se estaría exponiendo permanentemente a poblaciones de varroas a concentraciones que favorecerían la aparición de resistencia.
- La mortalidad corregida de las varroas provenientes de tres apiarios distintos, expuestas a las concentraciones estudiadas no mostró diferencias estadísticas, lo que indicaría niveles similares de resistencia al pesticida, atribuible a que, en general, existe un deficiente manejo de la cera.

6 RESUMEN

Se estudió si los residuos de coumafos en cera de abeja, como consecuencia de aplicaciones de Asuntol® en forma artesanal, tienen un efecto selectivo sobre las poblaciones de *Varroa destructor*. Se utilizó la metodología propuesta por MILANI, (s.f.) (b) en el protocolo del test CL₅₀ de Tau-fluvalinato en varroa. El test mide la susceptibilidad de varroa al ingrediente activo utilizado; se basa en el contacto controlado de los ácaros con una concentración conocida del ingrediente activo en el interior de una cápsula con parafina sólida como sustrato similar a la cera de abejas. Los ácaros probados fueron extraídos de tres apiarios: dos de la X Región de los sectores de Panguipulli y Futrono y uno de la IX Región, de la localidad de Collipulli. Se probaron 4 tratamientos, los cuales tenían concentraciones de coumafos de 0, 2, 4 y 6 ppm. El tratamiento de 0 ppm indicó la mortalidad natural. Se analizaron 30 ácaros por tratamiento, divididos en 6 cápsulas. Fue evaluado el porcentaje de mortalidad de varroa a las 48 horas después del contacto de los ácaros en la parafina sólida con distintas concentraciones de coumafos. Los resultados de mortalidad se corrigieron mediante la fórmula de Schneider y Orelli y se transformaron aplicando arcoseno \sqrt{p} para realizar ANDEVA para tratamientos y apiarios v/s mortalidad. Se concluyó que las concentraciones de coumafos probadas en el experimento tienen un efecto selectivo sobre las poblaciones de varroas estudiadas. En comparación con estudios de otros países el bajo nivel de resistencia determinado se debería a lo reciente de la introducción de coumafos para el control de varroosis en el país. Dado antecedentes de ceras chilenas que presentan concentraciones de coumafos similares a las estudiadas, es posible decir que, poblaciones de varroas están siendo expuestas permanentemente a concentraciones que favorecen la aparición de resistencia. La mortalidad de las varroas en los distintos apiarios no mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que indicaría niveles similares de resistencia al pesticida, atribuible a que, en general, el manejo de la cera es deficiente.

SUMMARY

This work researches the possibility of coumaphos residues in bee wax due to the rustic application of Asuntol® having a selective effect on *Varroa destructor* population. To perform this research, the method proposed by MILANI (s.f) (b) on the Tau-flavalinato CL 50 test on *V. destructor* was used. This test allows the measurement of the susceptibility of *V. destructor* to the active ingredient used based on the controlled contact of mite with a known concentration of the active ingredient inside a capsule with solid paraffine as a substrate similar to bee wax. The tested mite were extracted from three hives: two from the Panguipulli and Futrono areas (10th Region) and the third from the Collipulli area (9th Region). Four treatments were tested. These had 0, 2, 4 and 6 ppm. The 0 ppm treatment showed natural mortality. 30 mite were analyzed divided into six capsules in each treatment. The percentage of varroa mortality was evaluated 48 hours after the mite had contact with the solid paraffine with different concentration of coumaphos. The mortality results were corrected using the Schneider and Orelli formula. The data was transformed applying \sqrt{p} arcsine to perform ANOVA for treatments and apiaries v/s mortality. It was concluded that the concentrations of coumaphos tested have a selective effect on the varroa populations studied. In comparison to research studies in other countries, the low level of resistance observed is due to the recent introduction of coumaphos in the control of varroa mite in Chile. Given that Chilean bee waxes present similar levels of coumaphos to those studied, it can be said that populations of varroa are being permanently exposed to concentrations that favor the appearance of resistance. The mortality of varroa in the different apiaries did not show statistically significant differences, which indicates similar resistance levels to the pesticide caused by a deficient handling of the wax.

7 BIBLIOGRAFÍA

- BACCI, M. s.f. Tratamientos y productos para el control de Varroa. Senasa. (On Line) <http://www.sada.org.ar/Articulos/Tecnicos/tratamientos_y_productos.htm> (15 oct. 2005).
- BARRIGA, J. y NEIRA, M. 1988. *Varroa jacobsoni*, peligro potencial para las abejas en Chile. In Seemann, P. y Neira, M. (eds.). Tecnología de la producción apícola. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. pp: 31-46.
- BAYER, 2005. El pequeño escarabajo de las colmenas (*Aethina tumida*). (On Line) <<http://www.bayerconosur.com/noticias/tema14-3.asp>> (25 nov. 2005).
- BOGDANOV, S. 2004. Cera de abeja: calidad e importancia para la apicultura. Vida Apícola (España)126: 50.
- BOGDANOV, S. KILCHENMANN, V y IMDORF, A. 1998. Acaricide residues in some bee products. Journal of apicultural research (Inglaterra) 37 (2): 57-67.
- CABRERA, C. y DEL HOYO, M. 2004. Varroa un problema con solución. Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires. Argentina. 7p.
- CADAGAN, C. 1999. Aplicación invernal de aceites esenciales para el control de *Varroa jacobsoni* Oud. en *Apis mellifera*. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 97 p.
- CALATAYUD, F. 2000. Virosis y Varroosis. Curso de apicultura de Callosa d'En Sarriá. 12 p.

- CALDERON, R y ORTIZ, R. 2002. Productos acaricidas utilizados en el control del ácaro *Varroa destructor*. Boletín de parasitología. (On Line) <<http://www.proteconet.go.cr/salud/websaludanimal/boletin%20parasitologia/bolet%c3%ADn%203-3.pdf>> (7 nov.2006).
- CARAVIA, L. 1997. Determinación de residuos de fluvalinato en miel, producto del control estival de *Varroa jacobsoni* Oud, con acaricidas aplicados en el alza mielaria. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 81 p.
- CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 1997. Reglamento sanitario de los alimentos. Diario oficial N°35.764. Título XVII. De los azúcares y de la miel, Párrafo III, Artículo 394. 32 p.
- CHILE, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG), 1994. Control de la varroosis de las abejas. Boletín técnico. Departamento de protección Pecuaria. Proyecto Control de Varroosis FAO/SAG. Boletín 1. 20 p.
- DE LA SOTA, M y BACCI, M. 2004. Manual de procedimientos para enfermedades apícolas. Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires. Argentina. 46 p.
- DUSSAUBAT, C. 2002. Determinación de residuos de fluvalinato en mieles de la X Región de Los Lagos, Chile. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 99 p.
- EHIJOS, V. 2002. Niveles de infestación del ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman, sobre abejas adultas y crías en apiarios relacionados con APICOOP en la Décima Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 90 p.

- 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* 139 (3): 195 - 196.
- FERNANDEZ, N. 1998. Disminución de la eficacia en el control de la varroosis en Argentina. *Vida Apícola (España)* 91: 17 – 27.
- FERNANDEZ, N y COINEAU, Y. 2002. Varroa. El verdugo de las abejas. Conocerlas bien para combatir las mejor. España. Atlantica. 239 p.
- FRIES, I., WALLNER, K. y ROSENKRANZ, P. 1998. Effects on *Varroa jacobsoni* from acaricides in beeswax. *Journal of Apicultural Research (Inglaterra)* 37(2): 85-90.
- GARCÍA, N. 2006. Riesgos contaminantes en la cera. (On Line) <<http://www.apicultura.entupc.com/nuestrarevista/nueva/notas/riesgos-contam-cera.htm>> (13 sept. 2006).
- 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 commercial queen rearing operations. *Environmental Entomology (USA)* 95 (1): 28-35.
- HIGES, J., LLORENTE, J. y SANZ, A. 1998. Varroa. Sensibilidad al fluvalinato. *Vida Apícola (España)* 89: 41- 45.
- KLASSEN, R. 1995. Control de *Varroa jacobsoni* Oud. con acaricidas aplicados a fines de invierno, en la Décima Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 97 p.
- LODESANI, M y COSTA, C. 2005. Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World (Inglaterra)* 86 (4): 102-109.

- MEDICI, S., 2005. Para muchos el antivarroa de la temporada, ventajas del coumafos en la cura otoñal. (On Line) <<http://www.apicultura.entupc.com/nuestrarevista/nueva/notas/cumafos05.htm>> (13 sept. 2006).
- MILANI, N. s.f. (a) The resistance to chemotherapy in parasites and pathogens of the honeybee. Dipartimento di biologia applicata alla difesa delle piante, Università di Udine. Italia. 17p.
- MILANI, N. s.f. (b) Protocolo del test de toxicidad CL 50 de tau-fluvalinato en *Varroa jacobsoni*. Barcelona, España. Esteve veterinaria. 9 p.
- MILANI, N. 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* (Francia) 26: 415 – 429.
- MILANI, N. 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* (Francia) 30: 229 – 234.
- MILANI, N. y DELLA VEDOVA, G. 1996. Determination of the LC₅₀ in the mite *Varroa jacobsoni* of the active substances in Perizin and Cekafix. *Apidologie* (Francia) 27: 175 – 184.
- MILANI, N. y DELLA VEDOVA, G. 2002. Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated whit pyretroids. *Apidologie* (Francia) 33: 417 – 422.
- MOOSBECKHOFER, R. y TROUILLER, J. 1996. Apistan resistant varroa mites found in Austria. *Bienenvater* 117 (10): 372-373. (Original no consultado).
Compendiado en CAB Abstracts 1998/08-2000/07.
- MORALES, E. 2005. Diseño experimental a través del análisis de varianza y modelo de regresión lineal. Consultora Carolina. Valdivia, Chile. 248 p.

- MORIAMEZ, D. 1996. Infestación de colmenas de *Apis mellifera* L. por *Varroa jacobsoni* Oudemans, en la comuna de La Unión, X Región de Los Lagos. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 74 p.
- NAMDAR, M y QUEZADA, X. 2006. Documento síntesis del “Diagnóstico y agenda estratégica de la cadena apícola en Chile”. Centro nacional de desarrollo apícola. 44 p.
- NEIRA, M y MANQUIAN, N. 2005. Apuntes Prácticos de Apicultura. Universidad Austral de Chile. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. 88p.
- PELDOZA, J. 1992. Varroasis de las abejas. Presencia en Chile. El Campesino (Chile). 8 (123): 48-58.
- ROSAS, L. 1997. Aplicación otoñal de aceites esenciales y ácido fórmico para el control de *Varroa jacobsoni* Oud. en *Apis mellifera* L. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 85 p.
- SCHMIDT, V. 2005. Evaluación del producto comercial Bienenwohl como control de *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 128 p.
- SILLARD, S. 2002. Residuos de fluvalinato en cera de abejas de colmenares de la Décima Región. Tesis Lic. Alim. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 86 p.
- SILVA, G. 2002. Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Chillán, Chile. pp: 239-259.

- 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.
- UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, 2003. Informe técnico final. Proyecto fondo SAG nº 71. 14p.
- VANDAME, R. y DE FELIPE, M. 2000. Control alternativo de varroa en apicultura. (On Line) <http://www.beekeeping.com/articulos/control_varroa/index.htm> (25 oct 2006)
- VANDAME, R., COLIN, M y OTERO, G. 1998. Ensayos con abejas europeas y africanizadas en México. *Biología del ácaro. Vida Apícola (España)* 88: 45-50.
- WINER, B. 1971. Design and analysis of factorial experiments. In: *Statistical principles in experimental design*. Internacional student edition. 2° ed. pp. 309-428.

ANEXOS

ANEXO 1 Protocolo de muestreo de cera y miel. Proyecto Fondo SAG N° 64

Los resultados que se presentan corresponden a muestras de miel y cera de la temporada apícola 2004. El muestreo responde al protocolo establecido por el proyecto el cual determina que la muestra de miel y cera proviene del tercio central de cualquiera de los marcos centrales del alza mielaria, de la colmena central del apiario.

La muestra de panal fue recepcionada en laboratorio donde se realizó la separación de miel y cera por gravedad, posteriormente la cera fue llevada a baño de ultrasonido con el fin de eliminar restos de miel y a continuación filtrada para separar impurezas y residuos de exubias de las crías.

ANEXO 2 Tabla de distribución del porcentaje de apicultores que han observado enfermedades o enemigos de las abejas durante la temporada 2004.

Enfermedad	SI %	No %
Varroasis	99,1	0,9
Nosemosis	30,8	69,2
Cría tiza	30,8	69,2
Piojo	10,3	89,7
Loque americana	0	100
Polilla de la cera	43,6	56,4
Acaropiosis	8,5	91,5
Loque europea	1,7	98,3
Chaqueta amarilla	66,5	33,3
Otra enfermedad	14,5	85,5

n = 118

FUENTE: UACH, 2005¹

ANEXO 3 Distribución del porcentaje de apicultores según productos que aplica para controlar enfermedades. Año 2004.

Producto	SI %	No %
Mavrick o klartan en tablillas	59,3	40,7
Asuntol	17,8	82,2
Bayvarol	20,3	79,7
Fumagilín B	16,9	83,1
Acido fórmico	33,9	66,1
Timol	11,0	89,0
Acido oxálico	25,4	74,6
Otro producto	21,2	78,8

n = 118

FUENTE: UACH, 2005¹

ANEXO 4 Distribución del porcentaje de apicultores según el método usado para recambio de cera. Temporada 2004.

Método para recambio de cera	SI %	No %
A maquila	16,1	83,9
Manda a estampar y recibe su propia cera	17,8	82,2
Manda a estampar y recibe otra cera	56,8	43,2
Recicla su propia cera independiente	2,5	97,5
Compra cera nueva	55,9	44,1
No compra	0,8	99,2

n = 118

FUENTE: UACH, 2005¹

ANEXO 5 Prueba de homogeneidad de varianza.

Mortalidad y tratamiento.		
Prueba de Bartlett's :	2,78745	p-valor: 0,0807641
Mortalidad y apiario.		
Prueba de Bartlett's :	1,10452	p-valor: 0,783489

ANEXO 6 Análisis de varianza.

Variable dependiente: $\arcsen \sqrt{\text{mortalidad corregida}}$

Factores: A: apiario
B: tratamientos (dosis)

Fuente de variación	SC	GL	CM	F-calculado	P- valor
Factores:					
A: apiario	220,548	2	110,274	2,37	0,2094
B: tratamientos	1375,13	2	687,565	14,78	0,0142*
Error	186,07	4	46,519		
Total	1781,76	8			

* Indica diferencias estadísticamente significativas.

ANEXO 7 Pruebas de comparación múltiple.

Prueba de Tukey (HSD) para tratamientos (95%) v/s arcosen $\sqrt{\text{mortalidad}}$

Tratamientos	Nº observaciones	Promedio	Grupo
2	3	12,29	b
3	3	28,9839	ab
4	3	42,5127	a
Contraste	Diferencia	Limite +/-	
2-3	-16,6939	19,844	
2-4	* -30,2227	19,844	
3-4	-13,5288	19,844	

Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas.

* Indica diferencias estadísticamente significativas.

ANEXO 8 Mortalidad corregida con la fórmula de Schneider y Orelli.

Apiario	Dosis (ppm)	Mortalidad corregida (%)
1	2	10
1	4	17
1	6	48
2	2	0
2	4	15
2	6	44
3	2	10
3	4	41
3	6	45

ANEXO 9 Resultados presentados como arcosen $\sqrt{\text{mortalidad corregida}}$.

Apiario	Dosis (ppm)	Mortalidad
1	2	18,43
1	4	24,35
1	6	43,85
2	2	0
2	4	22,78
2	6	41,55
3	2	18,43
3	4	39,81
3	6	42,13