

**Universidad Austral de Chile**  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Escuela de Agronomía



**Uso de *Bacillus thuringiensis* L. como agente de control de  
larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* L.  
(Lepidoptera: Pyralidae).**

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

**DANIEL EDUARDO ZAMORANO NEUMANN**

VALDIVIA-CHILE

2009

**PROFESOR PATROCINANTE**

Miguel Neira C.

Ing. Agr.

---

**PROFESORES INFORMANTES**

Andrea Báez M.

Dr. Economía Aplicada

Lic. Estadística

---

Claudia Dussaubat A.

Ing. Agr.

---

**INSTITUTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD VEGETAL**

## INDICE DE MATERIAS

Capitulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Producción apícola en Chile	3
2.2	Sanidad apícola	5
2.2.1	Galeriosis	7
2.2.1.1	Ciclo biológico de <i>Galleria mellonella</i> L.	8
2.2.1.2	Periodo de incidencia de la polilla	11
2.2.1.3	Efectos de <i>G. mellonella</i>	11
2.2.1.4	Detección de <i>G. mellonella</i>	13
2.2.1.5	Medidas de control y tratamiento	13
2.3	Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> L. (Bt) en Lepidópteros	15
2.3.1	Mecanismo de acción de <i>B. thuringiensis</i> L.	16
3	MATERIAL Y METODO	18
3.1	Material	18
3.1.1	Obtención del material	18
3.1.2	Insecticida biológico	19
3.2	Material de laboratorio	19
3.2.1	Material para la dieta	22
3.3	Metodología	22

3.3.1	Periodo experimental	23
3.3.2	Elaboración de cajas de crianza	23
3.3.3	Elaboración de la dieta para crianza y aplicaciones	24
3.3.4	Determinación del estadio larval	25
3.3.5	Diseño experimental	28
3.3.6	Descripción de los tratamientos	28
3.3.7	Método de aplicación	29
3.3.8	Determinación de la eficiencia del producto	29
3.4	Análisis estadístico de los datos observados	29
4	PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
4.1	Evaluación del efecto de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (Btk) sobre larvas de <i>Galleria mellonella</i>	31
4.2	Evaluación del efecto de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> sobre distintos estadios larvarios de <i>Galleria mellonella</i> en distintas dosis aplicadas	33
5	CONCLUSIONES	35
6	RESUMEN	36
	SUMMARY	37
7	BIBLIOGRAFIA	38
	ANEXOS	42

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Enfermedades o enemigos de las abejas observados por los apicultores en la temporada 2004, distribución en porcentaje	6
2	Distribución del número y porcentaje, nacional y regional, de apicultores que observaron polilla de la cera durante la temporada 2005	7
3	Tiempo de desarrollo de larvas de <i>G. mellonella</i> y su sobrevivencia, a diversas temperaturas	9
4	Dimensiones de la caja de crianza	23
5	Componentes para preparar un kilo de dieta	24
6	Determinación del tamaño de la cápsula cefálica del primer estadio larval de <i>G. mellonella</i>	26
7	Rango de tamaño de la cápsula cefálica correspondiente a cada estadio larval de <i>G. mellonella</i>	27
8	Descripción de las dosis de los tratamientos	28

**INDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Ciclo biológico de <i>G. mellonella</i> L.	10
2	Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
3	Cajas de crianza en laboratorio	19
4	Cámaras de crianza	21
5	Termohigrómetro	21
6	Productos para la elaboración de la dieta	22
7	Caja de crianza	23
8	Aspecto de la dieta en la caja de crianza (Placa Petri contiene huevos)	25
9	Placa con larvas sobre hielo para aletargar	26
10	Medición de la capsula cefálica con lupa (1R= 0,0333 mm)	27
11	Promedio de mortalidad de larvas en los distintos tratamientos	31
12	Porcentaje de mortalidad de larvas en distintos estadios larvales	34

**INDICE DE ANEXOS**

Anexo		Página
1	Porcentaje de mortalidad de larvas en los distintos tratamientos	43
2	Prueba de homogeneidad de varianza	47
3	Análisis de varianza	47
4	Pruebas de comparación múltiple	48

## 1 INTRODUCCION

No hay organismo que carezca de parásitos o enemigos, y ésta es una regla básica de la biología. Las abejas no son la excepción y hay diversos agentes patógenos, parásitos y enemigos que les pueden causar graves daños reduciendo los rendimientos de las colmenas y hasta en algunos casos provocar la pérdida total debido a ataques severos.

Chile, presenta grandes posibilidades de expansión en el rubro apícola, ya que sólo utiliza un 20% de su potencial; sin embargo, este desarrollo se ha visto frenado por la constante lucha que se tiene que ejercer para controlar las enfermedades y mantener alejados a los enemigos de las abejas, para mantener colmenas sanas y obtener así un producto de calidad para consumo humano.

*Galleria mellonella* L. es un lepidóptero que esta presente en cualquier parte del mundo donde se realiza el rubro apícola, demostrando ser un insecto bastante tolerante a las condiciones adversas de temperatura y humedad.

Nuestro país está en vías de transformarse en una potencia agroalimentaria y el negocio de la miel no queda al margen de este proceso; y es por eso que obtener un producto final libre de químicos, olores y sabores ajenos a lo natural adquiere suma importancia al momento de competir en el mercado internacional de la miel. Aunque este objetivo cada vez incorpora nuevas restricciones en las posibilidades de controlar algún parasito o enemigo que afecte la producción apícola.



La apicultura en Chile ha ido en incremento y modernizándose, pero junto con ello también han ido en aumento las enfermedades y enemigos naturales. Uno de los mayores problemas con significación económica es el ataque de las polillas de la cera (*Galleria mellonella*), las cuales causan daño a los materiales apícolas almacenados durante el periodo de receso de la actividad, principalmente a la cera, la cual representa entre un 30% y 50% del costo de cada colmena, Esto ha obligado a la protección de este material por medio de aplicaciones de productos químicos, golpes de frío o agentes biológicos, que no afecten las condiciones organolépticas e inocuidad de la miel.

Entre los agentes biológicos utilizados para controlar insectos se encuentran aislamientos de *Bacillus thuringiensis* (Bt), algunos de los cuales se han incorporado en la formulación de productos comerciales para ser aplicados en agricultura.

En esta investigación se plantea la hipótesis que *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) proveniente de un formulado comercial, es capaz de disminuir la población de *Galleria mellonella* L., agente causal de galeriosis en colonias de *Apis mellifera* L.

Como objetivo general se plantea determinar el efecto insecticida que causa un producto comercial, formulado en base a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, aplicado en larvas de *G. mellonella* criadas *in vitro*.

El objetivo específico que persigue este estudio es evaluar la acción insecticida del producto comercial sobre distintos instares larvales de *G. mellonella* en aplicaciones de diferentes concentraciones del producto.

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Producción apícola en Chile

La apicultura presenta una incidencia positiva en la protección del medio ambiente y en el bienestar de la población, propiciando el desarrollo de industrias y comercios relacionados con la alimentación, la salud y la belleza, generando un conjunto de productos y servicios (CENTRO DE DESARROLLO APICOLA NACIONAL, 2006 b).

En Chile se presenta un gran potencial para el desarrollo de la apicultura debido a su extensa flora melífera, la que se distribuye entre Copiapó (27° LS) por el norte y Coyhaique (47° LS) por el sur (LESSER, 2001).

Según LESSER (2001), la flora existente permitiría la instalación de 2,5 a 3 millones de colmenas. En la actualidad, sólo se utiliza aproximadamente un 16,6% de este potencial con familias apícolas en colmenas modernas y un 10% con familias apícolas rústicas y con productos de menor calidad. La mayoría de las colmenas se concentran en la zona centro-sur, donde predominan praderas de trébol y flora endémica que favorecen la obtención de néctar de buena calidad (LESSER, 2001).

Según el CENTRO DE DESARROLLO APICOLA NACIONAL (2006 a), Chile se perfila como una potencia agroalimentaria emergente, siendo el resultado de una adecuada combinación de potencialidades, políticas públicas e iniciativas de los sectores privados. En el contexto de un mercado apícola

mundial en expansión, la apicultura chilena, aún en proceso de desarrollo, quiere sumarse y contribuir a la consolidación del país como potencia agroalimentaria.

Los apicultores de Chile son parte de este proceso. La cara más conocida de su contribución es, sin duda, la expansión irregular pero sostenida de las exportaciones de miel natural durante los últimos años. La apicultura constituye además una actividad de tremendo valor social, actuando como complemento o como única alternativa productiva exitosa en sectores rurales vulnerables desde un punto de vista productivo, ambiental y social (CENTRO DE DESARROLLO APICOLA NACIONAL, 2006 a).

Para los apicultores que exportan volúmenes importantes de producto, el mercado nacional no les resulta atractivo debido a su reducido tamaño; por otro lado, la comercialización en el mercado interno formal no es motivadora para los pequeños productores, fundamentalmente por sus mayores costos de implementación y por la demora en los pagos, los que por lo general se concretan de 30 a 90 días (CHILE; ODEPA, 2004).

La apicultura exhibe fortalezas desde el punto de vista agroecológico, calidad de productos, situación arancelaria y desarrollo organizativo, que la sitúa en condición ventajosa frente a una demanda mundial creciente, tanto en cantidad como en diversidad de productos. Sin embargo, se necesita avanzar en varios ámbitos fundamentales que aún son deficitarios, tales como normativa, manejo sanitario y la implementación de un sistema de trazabilidad y calidad, entre otros (CENTRO DE DESARROLLO APICOLA NACIONAL, 2006 a).

De acuerdo a NEIRA (2006), para desarrollar la apicultura en Chile es necesario revertir la actual proporción existente entre colmenas rústicas y

modernas, propiciando un aumento de las últimas mediante la aplicación de políticas de transferencia tecnológica y de fomento e incentivo económico, de la mano con una legislación apícola que incorpore los efectos del uso potencial de áreas de importancia melífera, sanidad apícola, trashumancia y calidad tipificada de los principales productos que se obtienen de las abejas.

## **2.2 Sanidad apícola**

Según NEIRA (2006), el costo de la sanidad apícola es bastante menor a los beneficios que se obtienen. Para lograr tener una explotación apícola eficiente y productiva, es necesario contar con colmenas sanas y un manejo adecuado a la zona geográfica donde éstas se localizan.

La sanidad es uno de los factores más importantes para obtener una buena producción en cualquier actividad agropecuaria. En la apicultura ocurre de la misma forma, existiendo un gran número de enfermedades y enemigos que afectan a las abejas, debilitando las poblaciones en las colmenas; por esto, es necesario que el apicultor las conozca y pueda ser capaz de prevenirlas o controlarlas, con el uso de técnicas de manejo (NEIRA, 2006).

En la mayoría de los países del mundo donde se concentra la producción apícola, existe de alguna forma un reglamento para la tenencia, manejo, prevención y tratamiento de enfermedades. *La mayoría de los autores consultados* coinciden en señalar que a la hora de enfrentar la lucha o el control contra las enfermedades, es preferible contar con un productor con una alta calificación a nivel técnico y en especial con una clara conciencia del rol del apicultor, que disponer de una legislación referente a las enfermedades (CORNEJO y ROSSI, 1975).

Además de los microorganismos, existe una gran cantidad de otras plagas y enemigos que pueden atacar las colonias de abejas (Cuadro 1 y 2). Entre los insectos, posiblemente el más común es la polilla de la cera (*G. mellonella*) (DADANT e HIJOS, 1975)

**CUADRO 1 Enfermedades o enemigos de las abejas observados por los apicultores en la temporada 2004, distribución en porcentaje.**

Enfermedad / Enemigo	% SI	% NO
Varroosis	99,1	0,9
Chaqueta amarilla	66,5	33,3
Polilla de la cera	43,6	56,4
Nosemosis	30,8	69,2
Cria tiza	30,8	69,2
Piojo	10,3	89,7
Acaropiosis	8,5	91,5
Loque europea	1,7	98,3
Loque americana	0	100
Otras	14,5	85,5
NOTA: n = 117		

FUENTE: Modificado de UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE (2006a)

**CUADRO 2 Distribución del número y porcentaje, nacional y regional, de apicultores que observaron polilla de la cera durante la temporada 2005**

Región	Observó polilla de la cera en la temporada 2005				Total	
	SI		NO			
	n	%	n	%	n	%
IV	21	72	8	28	29	100
V	6	27	16	73	22	100
VI	21	64	12	36	33	100
VII	14	37	24	63	38	100
VIII	32	63	19	37	51	100
IX	14	40	21	60	35	100
X	11	23	36	77	47	100
RM	1	4	26	96	27	100
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>43</b>	<b>162</b>	<b>57</b>	<b>282</b>	<b>100</b>

FUENTE: UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE, (2006b)

**2.2.1 Galeriosis.** Según ROOT (1976), existirían varias especies de polillas cuyas larvas atacan los panales de las abejas. Estos insectos pueden lograr que familias de abejas migren de su colmena por la presencia de “malos olores”. Muchas veces se cree que todo el daño es causado por las polillas; sin embargo, hay casos en que una enfermedad previa ha debilitado la colmena y las polillas ganan cada vez más espacio causando mayor daño dentro de ella.

El daño se concentra sobre los panales de cría y cualquier material de cera que ha sido privado de la protección de las abejas; el desarrollo de la polilla se ve beneficiado a temperaturas cercanas a los 30° C. Las colonias

vigorosas rara vez permiten que las larvas de polilla se alimenten a sus expensas; aún así, en las colonias más fuertes se puede encontrar una larva de polilla mayor cavando sus galerías debajo de los opérculos de celdas de cría en pleno desarrollo (ROOT, 1976).

Según Nielsen y Brister (1977), citado por MORSE y FLOTTUM (1997), durante los meses cálidos, cuando la población de *G. mellonella* es abundante, los apicultores del sur de los Estados Unidos comúnmente observan zonas donde las obreras y zánganos no han podido abandonar sus celdas, al encontrarse atrapadas entre los hilos de seda, hilados en forma de tuberías por *G. mellonella* en su recorrido por la base de las celdas. La disección de los panales permite constatar la presencia de abejas afectadas, revelando de una a tres larvas de *G. mellonella* en el fondo de la mayoría de las celdas, condición se conoce como Galeriosis (MORSE y FLOTTUM, 1997)

**2.2.1.1 Ciclo biológico de *Galleria mellonella* L.** Esta especie de lepidóptera se distribuye ampliamente en todo el mundo, excepto en climas muy fríos y en las grandes altitudes (ROOT, 1976).

Según NEIRA (2006), el ciclo biológico de *G. mellonella* (Figura 1) varía de acuerdo a las condiciones de temperatura, pudiendo ser de 30 a 60 días con temperaturas óptimas que van desde los 26° a 38° C, o de 5 meses con temperaturas más bajas. Del ciclo se distinguen las siguientes etapas: huevo, larva, pupa y adulto.

CARDOSO *et al.* (2007), establecen que la duración o desenvolvimiento de los estadios larvales guarda una relación inversa con la temperatura, de modo que a medida que ésta aumenta la duración del estadio es menor (Cuadro 3), aunque cabe hacer notar que estos valores son más bajos que los consignados en otros trabajos. Además de lo anterior, también se observó una

mayor sobrevivencia de las larvas a medida que aumenta la temperatura; así, a 32 °C se registra un 96,6 % de sobrevivencia (Cuadro 3).

**CUADRO 3** Tiempo de desarrollo de larvas de *G. mellonella* y su sobrevivencia, a diversas temperaturas.

Temperatura (°C)	Larva	
	Desarrollo (días)	Sobrevivencia (%)
22	40,4 ± 3,00	78,3 ± 20,44
27	27,2 ± 1,78	89,2 ± 6,02
32	23,4 ± 1,30	96,6 ± 4,11

FUENTE: Adaptado de CARDOSO *et al.* (2007).

Las larvas jóvenes presentan coloración blanco grisáceo, únicamente con patas torácicas; en cambio, las más viejas son compactas, de color gris manchado, tamaño mayor a 25 mm y con ocho pares de patas. Su desarrollo depende de la temperatura y alimentación disponible, con un rango promedio de 28 – 85 días a 35° C (ROOT, 1976).

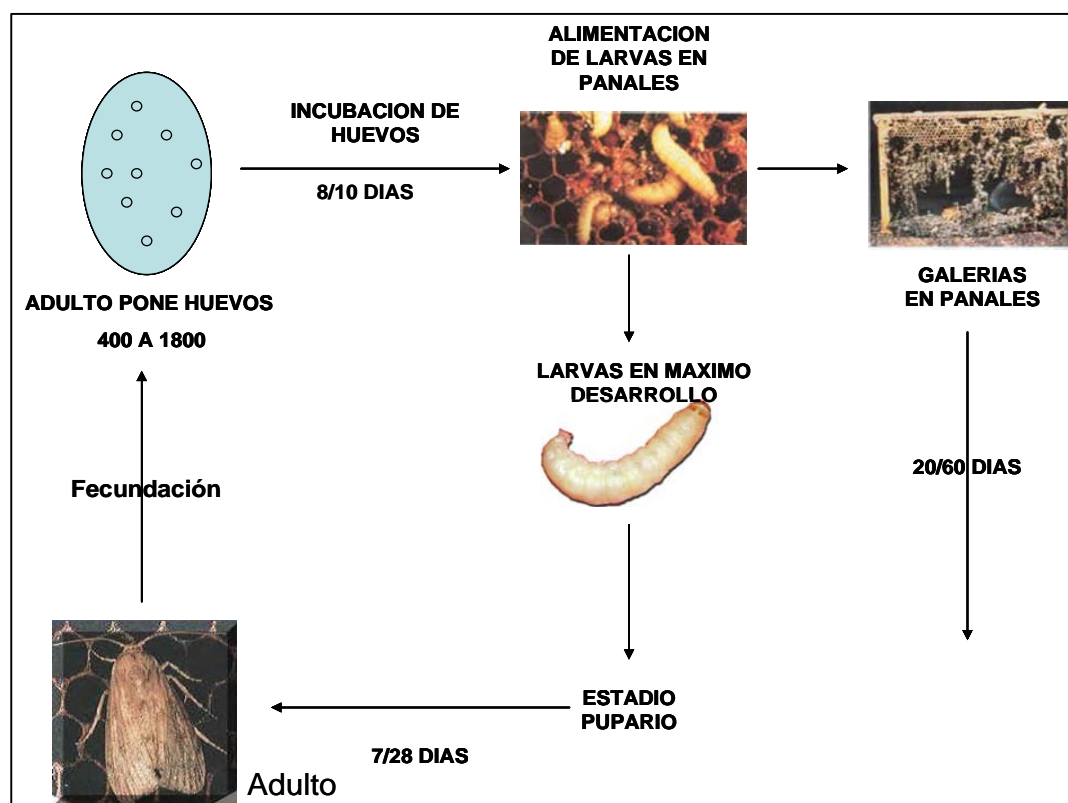
Las hembras ponen alrededor de 400 a 1.800 huevos en un periodo de hasta 15 días. De estos huevos surgen larvas que se introducen en las celdas vacías de los panales; éstas se desarrollan alimentándose principalmente de cera, formando galerías al interior de los panales. Al llegar a su máximo desarrollo, abandonan los panales y se dirigen a los laterales y cabezales del panal y hacia la entretapa, donde construyen su capullo para transformarse en pupas (KLAASSEN, 2005).

Los huevos tienen forma elíptica, poseen una superficie lisa y presentan una coloración blanco-crema; con temperaturas óptimas, el tiempo de



incubación es de 10 días. La hembra pone sus huevos en grupos de a 5 o 30 en cualquier grieta de los marcos o en alzas de la colmena, presenta una vida corta de entre 7 a 15 días (NEIRA y MANQUIAN, 2004).

Una vez que eclosiona el huevo, nace una larva de 25 a 30 mm de longitud; característicamente éstas presentan la cabeza rojiza y una coloración amarillo-grisácea con dos manchas en el primer anillo del tórax. Esta etapa se puede extender de 1 a un máximo de 5 meses (NEIRA y MANQUIAN, 2004). La larva desarrollada busca y acondiciona el lugar donde iniciará su estado de pupa, en el cual permanecerá alrededor de 20 días inmovilizada en el interior de un capullo de color blanco de 2,5 cm de longitud (NEIRA y MANQUIAN, 2004).



**FIGURA 1** Ciclo biológico de *G. mellonella*.

FUENTE: Adaptado de NEIRA y MANQUIAN (2004).

**2.2.1.2 Periodo de incidencia de la polilla.** La actividad de las polillas comienza en primavera y continúa gran parte del verano, aunque en países tropicales puede continuar desarrollándose durante todo el año. Las polillas adultas depositan sus huevos preferentemente en lugares oscuros, con poca ventilación o en colmenas débiles, presentando preferencia por los panales viejos y oscuros (CORNEJO, 1993).

Las actividades destructivas de la polilla de la cera son mayoritariamente severas en zonas tropicales y subtropicales (Morse, 1957b; citado por MORSE y FLOTTUM, 1997). Según ROOT (1976), en climas cálidos los panales sin protección por las abejas son destruidos en corto tiempo por el ataque de polillas de la cera, siendo los más afectados los núcleos para crianza de reinas por su baja población de abejas; en cambio en zonas de climas fríos prácticamente no aparece la polilla de la cera, y si lo hace es en verano o en un ambiente cálido de almacenaje de materiales.

**2.2.1.3 Efectos de *G. mellonella*.** De acuerdo al CENTRO DE EDUCACION Y TECNOLOGIA (1988), la polilla de la cera se alimenta de la cera de las colmenas, causando destrucción de los panales; además, al depositar sus huevos en las grietas de los marcos o alzas de la colmena, contribuye a su deterioro. En su fase larvaria, *G. mellonella* destruye en forma significativa los panales de cera; la larva se desplaza en dirección a los panales donde encuentra su alimento, consistente principalmente en cera. Además, perfora galerías que recubre con una “tela” secretada por ella misma, dando al panal un aspecto característico (NEIRA, 2006).

De acuerdo a NEIRA (2006), este lepidóptero causa grandes daños a los apicultores cada año, los que se concentran principalmente sobre materiales que han sido almacenados sin ninguna protección contra las polillas. Cuando los ataques son severos, las colonias de abejas pueden abandonar la colmena;

sin embargo, cuando se enfrenta a poblaciones normales de abejas dentro de una colonia, éstas no son capaces de causar daño económico, ya que las abejas las expulsan fuera de la colmena.

La hembra oviposita sus huevos en la colmena, luego las larvas que han eclosionado se alimentan de cera, miel, polen o néctar (NEIRA, 2006). Estas se alimentan sobre porciones aisladas de los panales, reuniéndose gradualmente una masa de telillas, desde las cuales comienzan a prolongar sus galerías por el resto del panal en búsqueda de alimento, consistente en primeras heces y exuvias de las pupas que forran las celdas con o sin polen (ROOT, 1976).

Según ARTIGAS (1994), *G. mellonella* consume vorazmente cera desde panales almacenados como en la colmena misma. La cera almacenada por periodos prolongados en lugares oscuros y temperados queda totalmente destruida. En las colmenas infestadas las larvas de *G. mellonella* consumen cera más rápido de lo que las abejas pueden reconstruir, obligándolas a abandonar la colmena. La presencia de este insecto en el país obliga a fumigar la cera destinada a exportación.

Las abejas adultas no se ven afectadas por las polillas de la cera (LLORENTE, 2004); sin embargo, el material almacenado como alzas, marcos y panales de cera sí lo son, al igual que aquellas colmenas que por causas ajenas al parásito tienen baja población de abejas, presentando el material afectado un aspecto inconfundible. Por otro lado, los excrementos y restos de seda producidos por larvas de *G. mellonella* bajan la calidad de la cera, obligando al apicultor a fundirla; sin embargo, este procedimiento constituye sólo una solución parcial al problema, ya que parte de estos desechos logran traspasar los filtros (ARTIGAS, 1994).

**2.2.1.4 Detección de *G. mellonella*.** De acuerdo a VASQUEZ, C; DUSSAUBAT, C; MANQUIAN, N. y NEIRA, M (2006), para que la producción de una colmena se mantenga en condiciones óptimas a través del tiempo es necesario que exista un balance entre varios factores, entre ellos: calidad de reina, alimentación, espacio en el interior de la colmena y condiciones sanitarias adecuadas. Para lograr esto, es necesario contar con un plan de profilaxis tendiente a evitar la presencia de enfermedades y enemigos de las abejas, el que debe incluir monitoreo, revisión de la colmena y recomendaciones de manejo.

La presencia de polillas adultas, larvas en distintos estados de desarrollo, ninfas, deyecciones y cuadros afectados, son signos evidentes de la presencia de este enemigo de las abejas (LLORENTE, 2004).

**2.2.1.5 Medidas de control y tratamiento.** Existen varias formas de combatir lepidópteros (polillas), encontrándose métodos técnicos, físicos, biológicos y químicos (Burges, 1978; Charriere & Imdorf, 1997; Feldlaufer, *et. al*, 1998; Kochansky, 2002; citado por NEIRA, 2006).

De acuerdo con NEIRA (2006), el contar con colonias fuertes y vigorosas sería el aspecto de mayor importancia, y para lograrlo habría que desechar el material en mal estado, sean pisos, marcos o panales, de modo de mantener un nivel adecuado de higiene dentro de la colonia. Junto a lo anterior, se debería almacenar el material en lugares ventilados, y si fuere necesario utilizar rejillas excluidoras de reina en las pilas de alzas en almacenaje; además, se debería retirar los panales afectados por polillas y colocarlos en colmenas fuertes para que éstas los limpien y reparen.

En algunos países se combaten con pulverizaciones de una solución de *B. thuringiensis*, el cual causa la muerte de larvas de polillas (CORNEJO, 1993).

Según el CENTRO DE EDUCACION Y TECNOLOGIA (1988), para combatir a la polilla cuando se encuentra dentro de la colmena, se debería retirar los panales afectados por las larvas de la polilla y remplazarlos por nuevos. Los panales afectados se funden y los marcos y alzas se desinfectan con azufre en polvo.

De acuerdo a DADANT e HIJOS (1975), el método más sencillo de control sería el mantener colonias fuertes que resistan la invasión de las polillas, o almacenar el material vacío en cámaras de frío. Cuando no se dispone de cámaras o no existen épocas frías en los sectores apícolas, se puede recurrir a la fumigación con dibromuro de etileno o usar preparaciones de esporas de Bt en láminas de cera estampada, con lo cual se logra que las larvas jóvenes de la polilla, al alimentarse de ésta, sean severamente susceptibles. Según Ali *et. al.*, (1973); Cantwell, Lehnert y Fowler, (1972); citados por DADANT e HIJOS (1975), las esporas de Bt no afectarían a las larvas ni al estado adulto de la abeja melífera.

Aún no se ha logrado desarrollar un método de control eficaz para este parásito. Aunque existen variados, estos aun son imperfectos y se necesitan muchos estudios adicionales para encontrar métodos de control efectivos (Ali, *et. al.*, 1973, Burges 1977, 1978, Cantwell y Smith 1970) citado por (LEBEDEVA, *et. al.*, 2002).

Existe un concentrado de *B. thuringiensis* dispersado en agua, que se encuentra poco disponible en forma comercial en los Estados Unidos, que se utiliza para la protección de panales almacenados. Esta formulación previene el ataque de larvas de *G. mellonella* sobre estos materiales, con la ventaja de que no afecta el sabor de la miel producida en panales previamente tratados con este producto (Cantwell y Shieh, 1981; citados por MORSE y FLOTTUM, 1997).

Según Vandenberg y Shimanuki, (1990a); citados por MORSE y FLOTTUM, (1997), los panales tratados con Bt y almacenados a 30° C por 2 a 4 meses, presentaron daño leve o moderado frente a larvas de *G. mellonella*.

### **2.3 Uso de *Bacillus thuringiensis* L. (Bt) en Lepidópteros.**

En el año 1901 Ishiwata entrega los primeros reportes sobre la presencia de una bacteria cristalífera que causaba enfermedad y muerte a larvas de algunos insectos. Tiempo después, en Alemania, Berliner determinó que un bacilo esporulante y cristalífero, denominado Bt, sería el causante de la muerte de larvas de *Anagasta khuniella* (FERNANDEZ, 2002).

De acuerdo a la WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999), se han aislado muchas subespecies de Bt a partir de insectos muertos o moribundos, la mayoría pertenecientes a los órdenes *Coleóptera*, *Díptera* y *Lepidóptera*, así como también del suelo, de superficies foliares y de otros hábitats. Las subespecies de Bt activas frente a lepidópteros se asocian fundamentalmente con el suelo y superficies foliares.

Según LLORENTE (2004), para el control biológico se utiliza Bt, el cual no causa efecto sobre las abejas. Las larvas de polilla que lo ingieren sufren de destrucción del epitelio intestinal, siendo efectivo tanto sobre material almacenado como en colmenas activas. No actúa sobre polillas adultas.

Se ha observado mortalidad en abejas melíferas (*Apis mellifera*) tras la exposición a Btt (Bt subsp. *thuringiensis*) y Btk en crecimiento vegetativo; sin embargo, el efecto no parece guardar relación con las esporas o los PCI (Cristal de proteína insecticida). En los estudios de laboratorio y de campo, Btg (Bt subsp. *galleriae*) no mostró efectos adversos sobre las abejas melíferas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Según FERNANDEZ (2002), "Bt presenta un cristal parasporal de forma bipiramidal, romboide, cuadrado o amorfo, de naturaleza proteínica, que es el responsable de la capacidad insecticida; su toxicidad es muy variada y depende del tipo de cristal"

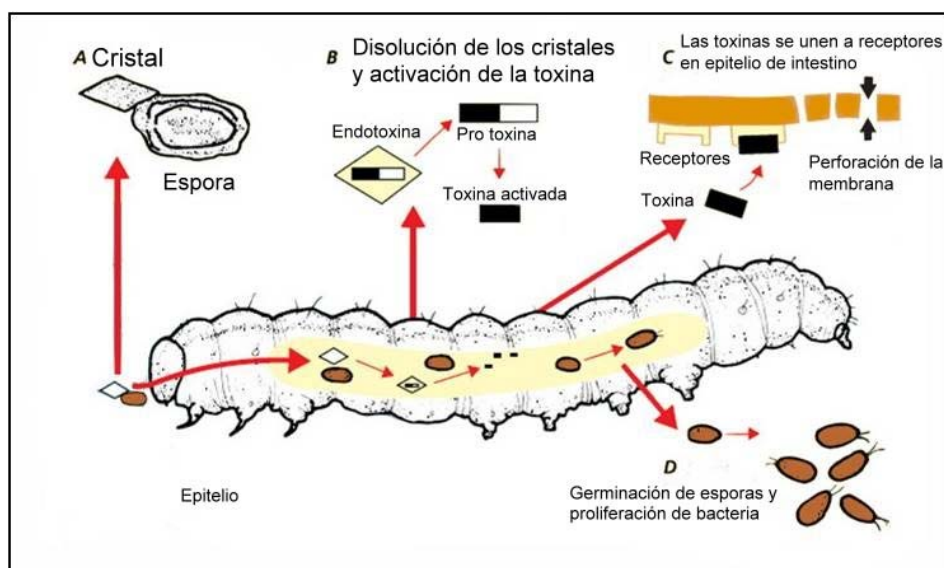
**2.3.1 Mecanismo de acción de *B. thuringiensis* L.** El insecto ingiere en su alimentación las esporas o PCI de Bt, las que, producto del pH alcalino en el intestino del insecto se desintegran; luego, el cristal parasporal libera la toxina, la que se asocia a receptores de la membrana intestinal formando poros que rompen la pared, produciéndose una alteración del balance iónico, que finalmente conduce a la parálisis intestinal y el insecto deja de alimentarse. Tiempo después se produce una infección por la multiplicación de las bacterias y luego ocurre la muerte de las larvas (FERNANDEZ, 2002).

Según WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999), Bt produce cristales paraesporales, que son tóxicos, especialmente para especies de larvas de insectos que pertenecen al orden Coleóptera, Díptera y Lepidóptera. El cristal está formado por diferentes PCI. Los cristales presentan variadas formas (bipiramidales, cuboides, romboides planos, esféricos o compuestos por dos tipos de cristales).

*B. thuringiensis* subsp. *berliner* es el bioinsecticida más utilizado; este produce grandes inclusiones cristalíferas proteínicas durante su esporulación, las que contienen delta endotoxinas o proteínas Cry, que son responsables de la muerte de insectos u otras especies en algunos ecotipos de Bt (TAMEZ, *et. al.*, 2005).

El efecto de Bt puede ser resumido en las siguientes etapas (Figura 2): 1) ingestión de esporas de Bt y PCI; 2) solubilización del PCI en el intestino; 3) activación del PCI por proteasas; 4) unión del PCI activado para receptores

específicos en la membrana celular del intestino; 5) inserción de la toxina en la membrana celular y formación de poros y vías en la membrana celular del intestino, seguido por la destrucción de las células epiteliales (Cooksey, 1971; 1971 de Norris; Fast, 1981; Huber & Lüthy, 1981; Lüthy & Ebersold, 1981; Smedley & Ellar, 1996); y 6) la germinación de más esporas de Bt seguido de una septicemia que aumenta la mortalidad (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).



**FIGURA 2 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*.**

FUENTE: WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999).

De acuerdo a WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999), formulaciones comerciales de Bt pueden aplicarse como insecticidas al follaje, el suelo, el medio acuático o instalaciones de almacenamiento de alimentos. Tras aplicar una subespecie de Bt a un ecosistema, las células vegetativas y las esporas pueden persistir en concentraciones gradualmente decrecientes durante semanas, meses o años como un componente de la microflora natural. Sin embargo, las PCI pierden su actividad biológica en horas o días.



### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Material

A continuación se describirán los materiales utilizados para la realización de este estudio.

**3.1.1 Obtención del material.** El ensayo se realizó con larvas de *G. mellonella* y un insecticida biológico, cuya composición base consta de un 85% de sólidos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, esporas y toxinas activas de lepidópteros, y un 15% de otros constituyentes.

Las larvas para el ensayo se obtuvieron a partir de huevos proporcionados por INIA Quilamapu, ubicado en la localidad de Chillán. Estos fueron recolectados directamente desde su laboratorio de crianza y trasladados a la Universidad Austral de Chile para ser incubados en un laboratorio acondicionado especialmente para ello. La cantidad de huevos recolectados, equivalentes a 1,5 g, permitió la preparación de 6 cajas de crianza de larvas con sus respectivas dietas (Figura 3):



**FIGURA 3 Cajas de crianza en laboratorio.**

**3.1.2 Insecticida biológico.** El insecticida biológico utilizado corresponde a un producto comercial de la empresa Certis cuya composición es de un 85% de toxinas activas de Btk y 15% de otros constituyentes, destinado principalmente a otros tipos de lepidópteros. Este se obtuvo como muestra gratis, de 2,5 kg aproximadamente, la cual fue enviada a Chile desde USA.

### **3.2 Material de laboratorio.**

En laboratorio se utilizaron los siguientes materiales o instrumentos:

- 2 Cámaras con ambiente controlado (Figura 4)
  - Cámara con control de T<sup>o</sup> (refrigerador adaptado)
  - Cámara con control de T<sup>o</sup> y fotoperiodo; con control OSAKA OF33
- 2 Balanzas digitales
  - (Beste min 5g; max 30kg)
  - (Ficculab v-200; min 0,01g, max 200g)
- 1 Lupa (Carl Zeiss 3.2x)

- 1 Termohigrómetro digital (Veto) (Figura 5), (Rango sensible de 0,1°C)
- 1 Hervidor de agua (Hasta 1,8L)
- Cajas plásticas (de 25cm x 40cm aproximadamente)
- Malla de acero (Tamizado pequeño)
- Placas Petri (20 Medianas y 35 Grandes)
- 1 Vaso precipitado
- 1 Probeta (250mL)
- Pipetas (5mL y 10mL)
- 3 Rociadores pequeños (3 mL)
- 2 Palanganas plásticas (Medianas)
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Guantes
- Mascarillas
- Cinta de papel engomada
- Jeringas (3mL)
- Pinzas
- Tubos Falcón (30mL y 50mL)
- Lápiz marcador
- Hielo escarchado
- Etanol de 95°
- Cloro 4,9% (Clorinda<sup>MR.</sup>)
- Jabón desinfectante
- Agua destilada



**FIGURA 4** Cámaras de crianza.



**FIGURA 5** Termohigrómetro.

**3.2.1 Material para la dieta.** Para la dieta se utilizaron los siguientes productos (Figura 6):

- Nestum miel (Nestlé<sup>MR.</sup>)
- Nestum 5 cereales (Nestlé<sup>MR.</sup>)
- Azúcar granulada (Iansa<sup>MR.</sup>)
- Glicerina líquida (Munnich Pharma Medical)
- Agua destilada
- Vitaminas Pantiban<sup>MR.</sup> (Laboratorio Pharma)
- Germen de trigo (Mi tierra)



**FIGURA 6** Productos para la elaboración de la dieta.

### 3.3 Metodología

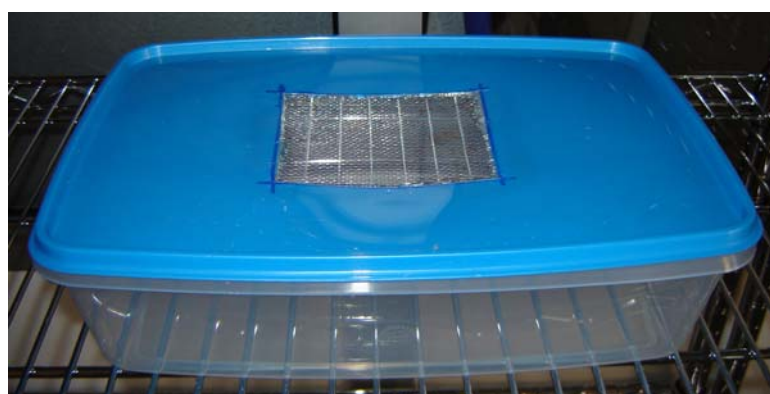
Para evaluar los objetivos propuestos de esta investigación se utilizaron las siguientes metodologías.

**3.3.1 Periodo experimental.** El trabajo de laboratorio se inició en marzo de 2007. Con el montaje del sistema de crianza en dependencias del laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. La crianza de huevos y la recolección de larvas se efectuó desde el 18 de junio del 2007 hasta el 9 de septiembre del 2007,

**3.3.2 Elaboración de cajas de crianza.** Las cajas de crianza pueden ser de plástico grueso o de latón; en este caso se optó por las plásticas. En la tapa de cada caja se abrió una ventana rectangular, la que se cubrió con una malla metálica de espaciado pequeño adherida con silicona caliente (Cuadro 4; Figura 7). Estas cajas se utilizaron para 1 kg de dieta y 0,25 g de huevos.

**CUADRO 4 Dimensiones de la caja de crianza.**

Caja	
35,5 cm	Largo
25,5 cm	Ancho
9,0 cm	Alto
Tapa	
1,0 cm	Largo
15,5 cm	Rejilla respiradero
9,0 cm	Ancho respiradero



**FIGURA 7 Caja de crianza.**

**3.3.3 Elaboración de la dieta para crianza y aplicaciones.** Se adoptó la dieta utilizada en el laboratorio de crianza del INIA Quilamapu (Chillán), la cual corresponde a una adaptación de fórmula descrita por SINGH y MOORE, 1985.

La dieta se preparó de la siguiente forma: En un recipiente se disolvió azúcar con agua destilada recién hervida, a la cual se agregó glicerina y vitaminas, agitando constantemente. En un recipiente independiente se mezclaron los dos tipos de Nestum y el germen de trigo; luego se mezclaron ambos preparados, hasta obtener una mezcla ligosa y medianamente dura (Figura 8). En el Cuadro 5 se consignan las cantidades de cada uno de los componentes utilizados para preparar un kilo de dieta.

**CUADRO 5 Componentes para preparar un kilo de dieta.**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>
Nestum 5 cereales	187	g
Nestum miel	187	g
Germen de trigo	120	g
Azúcar granulada	148	g
Glicerina líquida	219	cc
Jarabe Pantiban	1,2	ml
Agua destilada	138	cc



**FIGURA 8** Aspecto de la dieta en la caja de crianza. (Placa Petri contiene huevos)

**3.3.4 Determinación del estadio larval.** Una vez incubados los huevos en la cámara de crianza a una temperatura promedio de 27°C hasta el estadio de larva, se procedió a separar el grupo de larvas al que se aplicará el producto comercial. Previamente fue necesario identificar con exactitud el estadio larval en que se encuentran, para así realizar el ensayo sobre un mismo estadio.

Para la determinación de cada estadio, se utilizó la Ley de Dyar, que establece que el crecimiento de las partes esclerotizadas de instares sucesivos sigue una progresión geométrica si durante los mismos no hay crecimiento. Las larvas de Lepidóptera cumplen con la ley de Dyar, ya que el incremento del tamaño de la cápsula cefálica en los instares sucesivos de sus larvas es de tipo geométrico exponencial (DYAR, 1890).

Para poder determinar el ancho de la cápsula cefálica de cada larva se aletargaron con hielo (Figura 9); luego se midió con una lupa provista de ocular graduado ajustado de acuerdo al aumento utilizado en la medición. Para ello se desarrolló la fórmula de la raíz cuadrada que se aplica a lepidópteros en el estadio más pequeño (descrita por Dyar), a partir de la cual se pueden



determinar los estadios restantes, hasta el sexto que correspondería a *G. mellonella*.



**FIGURA 9** Placa con larvas sobre hielo para aletargar.

Primero se estima el valor en mm de cada R (Corresponde a la graduación incorporada en el ocular) (Figura 10) por medio de una tabla de ajuste dada por el aumento de la lupa, siendo en este caso de 15 R= 0,5 mm. Luego se midieron larvas pequeñas con un aumento 3,2X, siendo su promedio igual a 7 R, lo que por regla de tres (Cuadro 6) nos indica una equivalencia a 0,233 mm, correspondiendo esta medida al estadio uno de *G. mellonella*. Posteriormente, este valor se multiplicó por la raíz cuadrada de dos (Cuadro 7) obteniéndose el estadio dos y así sucesivamente hasta el sexto estadio.

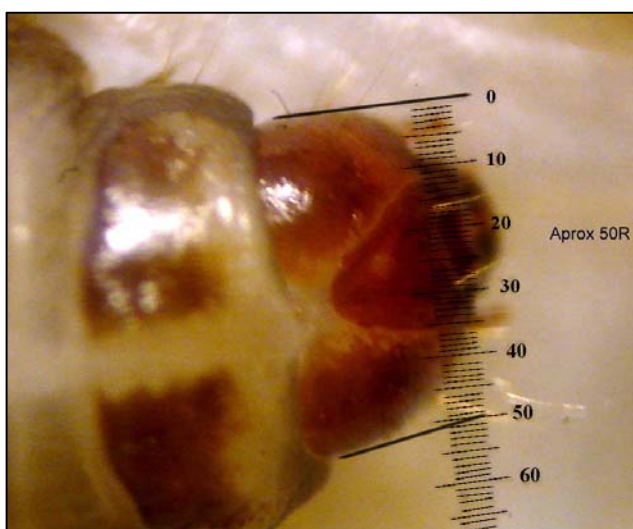
**CUADRO 6** Determinación del tamaño de la cápsula cefálica del primer estadio larval de *G. mellonella*.

R	Medida	Unidad
15	0,5	mm
7	x	mm
	X =0,233	mm

**CUADRO 7** Rango de tamaño de la cápsula cefálica correspondiente a cada estadio larval de *G. mellonella*.

Estadio Larval	Medida CF Inicial	Multiplicado $\sqrt{2}$	Medida CF Final
1	0,233 mm	X 1,414	0,329 mm
2	0,330 mm	X 1,414	0,465 mm
3	0,466 mm	X 1,414	0,658 mm
4	0,659 mm	X 1,414	0,931 mm
5	0,932 mm	X 1,414	1,317 mm
6	1,318 mm	X 1,414	1,863 mm

CF: Capsula Cefálica  
 $\sqrt{2} = 1,414213562$



**FIGURA 10** Medición de la cápsula cefálica con lupa (1R= 0,0333mm).

**3.3.5 Diseño experimental.** Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar, que incluyó 4 tratamientos con distintas concentraciones de Bt y 3 repeticiones como mínimo para cada tratamiento. Cada repetición correspondió a una placa Petri con 10 larvas en el mismo estadio.

**3.3.6 Descripción de los tratamientos.** Los tratamientos consistieron en diferentes dosis de Bt descritas en el Cuadro 8, de producto preparado; además, se aplicó como testigo un tratamiento basado solamente en agua.

Cada tratamiento se aplicó para los estadios larvales 3, 4, 5 y 6, excluyéndose el 1 y 2, ya que ambos son de tamaño demasiado pequeño y las larvas mueren fácilmente al ser manipuladas con los instrumentos disponibles en el laboratorio.

En los tratamientos y repeticiones se ocuparon placas Petri de 154 cm<sup>2</sup> con 50 g de dieta y 10 larvas vivas en el mismo estadio larval en cada placa.

**CUADRO 8 Descripción de las dosis de los tratamientos.**

Tratamiento	Dosis	
T0	Agua	
T2	0,0084	mg/cm <sup>2</sup>
T3	0,0168	mg/cm <sup>2</sup>
T4	0,0448	mg/cm <sup>2</sup>
T5	0,0897	mg/cm <sup>2</sup>

El tratamiento T2 corresponde a una dosis baja del producto, T3 a una intermedia, T4 a la más recomendada y T5 al doble de la dosis utilizada en el tratamiento T4.

**3.3.7 Método de aplicación.** El producto se aplicó a la concentración requerida diluido en agua. Se utilizó un asperjador pequeño de 3 mL, con el cual se roció sobre las placas Petri preparadas con 50 g de dieta, tratando de asperjar la mayor superficie posible.

Las larvas expuestas al producto en los tratamientos fueron criadas en el laboratorio bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad. Antes de someterlas a los tratamientos se determinó su estadio larval, desechándose a aquellas que presentaban algún tipo de daño por efecto de manejo o manipulación.

**3.3.8 Determinación de la eficiencia del producto.** Para determinar la eficiencia del producto se evaluó la mortalidad de las larvas expuestas durante 9 días; ésta se determinó realizando un recuento de cada placa, contabilizándose aquellas larvas que presentaban signos de sequedad o aparecían muertas. Posteriormente se utilizó el factor de corrección de Schneider y Orelli, (formula 3.1) el cual es utilizado en ensayos con pesticidas (BAKR, 2002).

$$\% \text{ de mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}) \times 100}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \quad (3.1)$$

### **3.4 Análisis estadístico de los datos observados.**

Los datos de mortalidad obtenidos para cada estadio y posteriormente corregidos según Schneider y Orelli, fueron sometidos a la prueba de contraste de Bartlett para determinar si presentaban homogeneidad de varianza. Al no detectarse homogeneidad de varianza se corrigieron los datos utilizando la fórmula  $\text{Log}_{10}(x+1)$ , sometiéndolos a un nuevo análisis con la prueba de Barlett (Anexo 2). Una vez corregidos, estos se sometieron a un análisis de varianza

(ANDEVA); con la finalidad de detectar diferencias estadísticas significativas se aplicó un test de Tukey a los tratamientos (LEVIN y LEVIN, 1999).

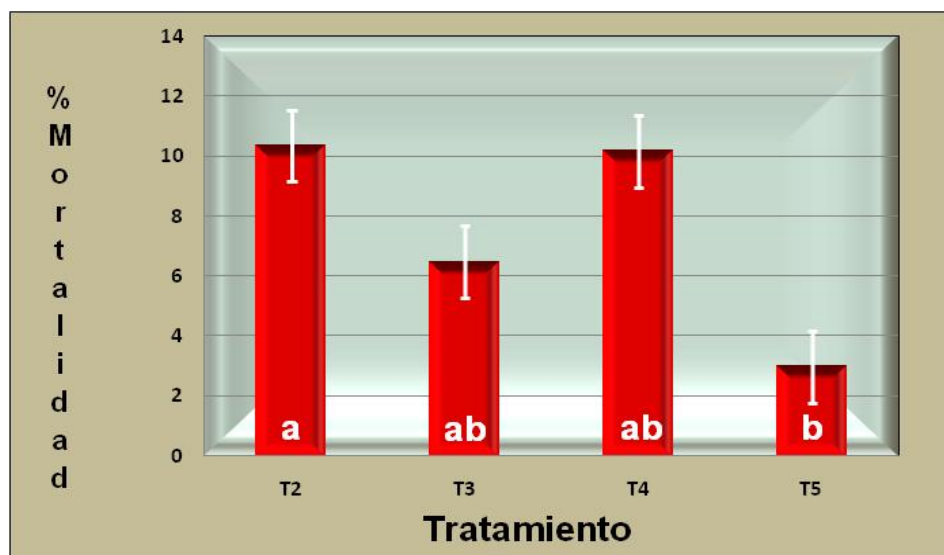
Para todas las pruebas se trabajó con el programa STATGRAPHIC PLUS 5.1.

## 4 PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en el ensayo para el parámetro porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella*, con distintas concentraciones del producto comercial y en distintos estadios larvarios (Anexo 1).

### 4.1 Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) sobre larvas de *Galleria mellonella*.

Los resultados obtenidos en la medición de este parámetro se presentan en la (Figura 11).



-Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas al 5%. TUKEY

**FIGURA 11 Promedio de mortalidad de larvas en los distintos tratamientos.**

En la Figura 11, se aprecia que ninguno de los tratamientos aplicados produjo un efecto insecticida significativo, ya que ninguno de estos supera el 12 % de mortalidad, con lo cual se rechaza la hipótesis planteada al comienzo; sin embargo, hay que tomar en consideración que en el ensayo no se incluyeron los estadios 1 y 2 ya que presentaban un tamaño pequeño y no pudieron sobrevivir al trabajo en el laboratorio, y principalmente en estos estadios es donde el producto o la mayor parte de las recomendaciones de insecticidas concuerdan en que el efecto sería mayor.

Al comparar estos resultados con la información disponible para productos insecticidas se desprende que, para poder aceptar la hipótesis sobre control en estas larvas de Lepidóptera, se consideraría aceptable un control sobre el 75% de mortalidad.

El ANDEVA muestra que existe diferencia significativa y la prueba de Tukey (HSD) para los distintos tratamientos (Anexo 4), muestra las diferencias que existen entre las distintas dosis, los únicos tratamientos que tienen diferencias estadísticas son el tratamiento 2 (0,84 kg/ha) con el 5 (8,97 kg/ha).

En este caso los bajos porcentajes de mortalidad observados podrían estar relacionados a la susceptibilidad de *G. mellonella* frente a las toxinas de Bt. Según RINCON, MENDEZ e IBARRA (2006), la susceptibilidad de una especie de lepidóptero a las toxinas de *B. thuringiensis*, depende directamente del tipo de toxinas que contenga cada cepa, ya que se sabe que existe una gran gama de proteínas Cry, con más de 250 diferentes genes que las codifican

Según CARRERAS, BRAVO y SANCHEZ (2003), es crítico para la actividad insecticida la unión de las toxinas activadas a receptores localizados en la microvellosidad de las células epiteliales intestinales del insecto objetivo. La unión de las toxinas a los receptores es importante para la especificidad;

varios estudios avalan la correlación directa entre la toxicidad y la unión al receptor.

Las proteínas Cry son producidas como protoxinas que requieren ser procesadas por proteasas presentes en los insectos objetivos, para poder liberar fragmentos tóxicos, que interaccionan con proteínas receptoras presentes en el intestino del insecto, para causar parálisis del intestino medio (SOBERON y BRAVO, 2007)

Por otra parte BRAVO (2008), señala que Btk no produce la toxina Cry1C, a la cual *G. mellonella* sería sensible, por lo que sería esperable obtener bajos porcentajes de mortalidad con este lepidóptero.

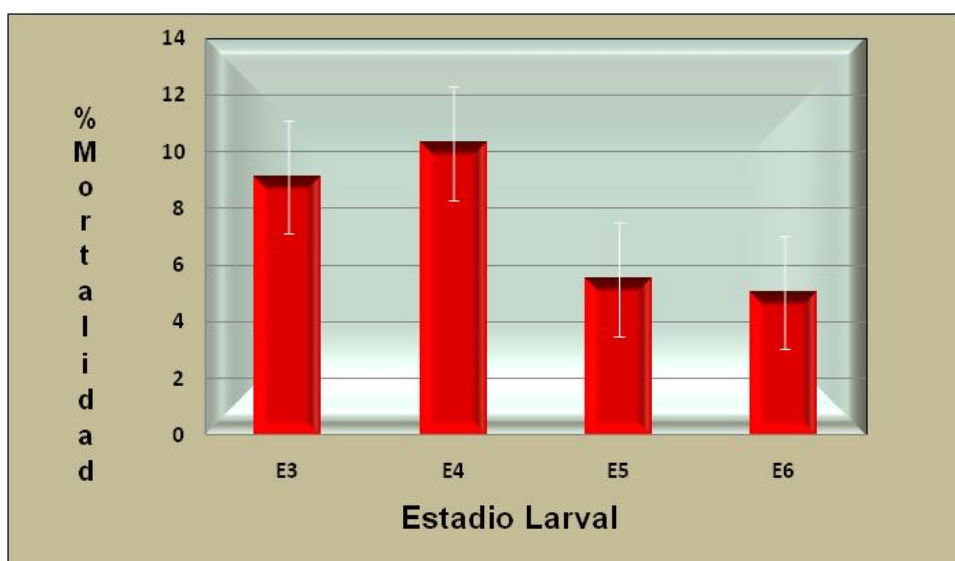
SOBERON y BRAVO (2007), afirman que para tener éxito con las toxinas Cry se debe poner atención a las características celulares y fisiológicas de cada orden de insectos las cuales son muy diferentes, por ejemplo el pH del intestino, los tipos celulares, la composición proteínica de las microvellosidades del intestino en el estado larvario, la dieta de los insectos etc. Estos factores sin duda deben influenciar el éxito de utilización de las toxinas Cry para cada orden de insectos.

#### **4.2 Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* sobre distintos estadios larvarios de *Galleria mellonella* en distintas dosis aplicadas.**

En los estadios mostrados en la Figura 12, se observa que la mortalidad presenta una tendencia a decaer a medida que se acerca al estadio adulto, lo cual es corroborado con la literatura ya que existiría una relación entre estadio y efecto del producto.



Según SOBERON y BRAVO (2007), la reducida permanencia activa en el ambiente de la toxina hace necesario conocer la biología y comportamiento de la plaga que se quiere controlar, ya que una toxina puede ser activa para los estadios larvarios, pero disminuir su efecto o incluso no ser tóxica para los adultos.



**FIGURA 12** Porcentaje de mortalidad de larvas en distintos estadios larvales.

Sin embargo al realizar el ANDEVA (Anexo 3) los resultados indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los estadios tratados. Estos resultados pueden explicarse con los fundamentos expresados en el punto anterior, los cuales hacen referencia a los receptores del insecto objetivo y los tipos de toxinas generados por Btk.

La mortalidad presente podría explicarse por la acción de otras toxinas producidas por Btk las cuales podrían presentar un efecto menor en *G. mellonella*.

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación y según las condiciones en la cual fue llevada a cabo, se puede concluir:

- Durante el ensayo no se pudo trabajar con los estadios 1 y 2, los cuales según la literatura son los más afectados a la hora de utilizar productos de control, por lo que se hace necesario implementar equipamiento adecuado para el trabajo de precisión con larvas de pequeño tamaño, y la utilización de productos quimiotractores o quimiorrepulsores para esta especie.
- El producto aplicado en distintas dosis sobre diferentes estadios larvarios, no produjo efecto significativo en la disminución de la población de larvas de *G. mellonella* criada en laboratorio, no superando el 12% de mortalidad, con lo cual se rechaza la hipótesis planteada.
- Se hace necesario realizar investigaciones con técnicas como PCR y RT-PCR, para poder caracterizar tanto los tipos de toxinas de Btk como los receptores presentes en larvas de *G. mellonella*, para comprobar su toxicidad.

## 6 RESUMEN

El presente trabajo pretende determinar la efectividad de un producto comercial, basado en *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, para disminuir la población de *Galleria mellonella*, agente causal de galeriosis en colonias de *Apis mellifera*, determinando las concentraciones de aplicación más efectivas en el control de larvas de *G. mellonella* criadas in vitro, además evaluar la acción insecticida sobre distintos instares larvales de *G. mellonella*.

La metodología utilizada consiste en la crianza de larvas de la polilla de la cera (*G. mellonella*) en laboratorio, con una dieta en base a cereales, y mantenidas en una cámara de crianza a una temperatura promedio de 27°C. La efectividad estará dada por la mortalidad de larvas en cada tratamiento y estadio larval.

El producto aplicado, en sus distintas dosis utilizadas y diferentes estadios larvarios, no produjo efecto significativo en la disminución de la población de larvas de *G. mellonella* criada en laboratorio, no superando el límite de 12% de mortalidad.

## SUMMARY

This work aims to determine the effectiveness of a commercial product based on *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, to reduce the population of *Galleria mellonella*, causative agent of galeriosis in colonies of *Apis mellifera*, determining concentrations of the most effective in controlling larvae of *G. mellonella* reared in vitro, further evaluate the action insecticide on different larval instars of *G. mellonella*.

The methodology used is rearing larvae of the wax moth (*G. mellonella*) in the laboratory, with a diet based on cereals, and held in a rearing chamber at a temperature averaged 27°C. The effectiveness will be given by the mortality of larvae in each treatment and larval stage.

The product applied in different doses used and different larval stages, produced no significant effect in reducing the population of larvae of *G. mellonella* bred in the laboratory, not exceeding the limit of 12% mortality.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- ARTIGAS, J. 1994. Entomología económica. Universidad de Concepción. Chile. Vol I. 943p.
- BAKR, E. 2002. Fórmula de corrección Schneider y Orelli. (<http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm>). 15 .feb. 2008
- BRAVO, A. 2008. Instituto de Biotecnología UNAM, Conversación correo electrónico. 6 ago. 2008.
- CARDOSO, A; DE LA PRATA, M; FURLONG, J y PREZOTO, F. 2007. Exigencias térmicas de estadios inmaduros de *Galleria mellonella* L. (Lepidóptera : Pyralidae). Ecology, Behavior and Bionomics. *Neotropical Entomology*. 36(5):657-661p.
- CARRERAS, B; BRAVO, A y SANCHEZ, J. 2003. Unión *in vitro* DE LAS  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* al epitelio intestinal medio de *Manduca sexta*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Santiago de las Vegas, Habana, Cuba. Instituto de Biotecnología, UNAM, México. Protección Vegetal. 18(1):28-31p.
- CENTRO DE DESARROLLO APICOLA NACIONAL. 2006 a. Chile apícola sumándose a una potencia agroalimentaria emergente. Chile. 12 p.

- CENTRO DE DESARROLLO APICOLA NACIONAL. 2006 b. Diagnóstico y agenda estratégica de la cadena apícola en Chile. Chile. 44 p.
- CENTRO DE EDUCACION Y TECNOLOGIA. 1988. Un colmenar para la familia. Cetal. 72 p.
- CORNEJO, L. 1993. Apicultura practica en América Latina. Servicios agrícolas de la FAO. Roma. Bull. 105. 169 p.
- CORNEJO, L. y ROSSI, C. 1975. Enfermedades de las abejas, su profilaxis y prevención, segunda edición. Argentina, Hemisferio Sur. 238 p.
- CHILE; ODEPA. 2004. Situación y perspectivas del mercado de la miel. <<http://www.sitec.cl/Doc/El%20mercado%20de%20la%20miel%20NOVIEMBRE%202004%20.doc>> (22 de Septiembre del 2006).
- DADANT E HIJOS. 1975. La colmena y la abeja melífera. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 936 p.
- DYAR, H.G. 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. Psyche. 5:420-422.
- FERNANDEZ, O. 2002. Manejo Integrado de plagas y agroecología. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Costa Rica. 64: 110-115.
- KLASSEN, R. 2005. Introducción a la apicultura. Material de curso: Colmenares Klaassen. Chile. 46p.

- LEBEDEVA, K; VENDILO, N; PONOMAREV, V; PLETNEV, V. y MITROSHIN, D. 2002. Identificación de feromona de la polilla de la cera *Galleria mellonella* desde las diferentes regiones de Rusia. IOBC wprs. Bull. 25. 5p.
- LESSER, R. 2001. Manual de apicultura moderna. 3ª edición. Universitaria. Chile. 211 p.
- LEVIN, J y LEVIN, W. 1999. Fundamentos de estadística en la investigación social. , México Oxford University Press. 305p.
- LLORENTE, J. 2004. Las enfermedades y enemigos de las abejas. Material curso: Las abejas y la apicultura, Universidad de Oviedo. España. pp. 116-117.
- MORSE, R. y FLOTTUM, K. 1997. Honey bee pests, predators, and diseases. 3ª edition. Published by the A.I.ROOT Company. Medina, Ohio, U.S.A. 706 p.
- NEIRA, M. 2006. Sanidad apícola, principales enfermedades y enemigos de las abejas en Chile. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 138 p.
- NEIRA, M. y MANQUIAN, N. 2004. Apuntes prácticos de apicultura. Material curso: Apicultura básica (PSVE 232). Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. 111 p.
- RINCON, M; MENDEZ, J. y IBARRA, J. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). Folia Entomológica Mexicana. 45(2): 157-164.

- ROOT, A. 1976. ABC y XYZ de la apicultura. 10ª edición. Argentina. A. I. Root Company 670 p.
- SINGH, P. y MOORE, R. 1985. Handbook of insect rearing. Elsevier science publishing company inc. New York, U.S.A. vol. II. 301-305 p.
- SOBERON, M; y BRAVO, A. 2007. Una ventana al que hacer científico. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología. Cuernavaca Morelos. México. 303-314p.
- TAMEZ, P; IRACHETA, M, PEREYRA, B; GALAN, L; GOMEZ, R; TAMEZ, R. y RODRIGUEZ, C. 2005. Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros, ciencia Universidad autónoma de Nueva León. México (UANL). Vol. VIII, 4: 477-482.
- UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. 2006a. Avance de resultados (15 de julio 2006), Proyecto apícola Fondo SAG N° 64. Encuesta apícola temporada 2004. 23p.
- UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. 2006b. Avance de resultados (15 de julio 2006), Proyecto apícola Fondo SAG N° 64. Encuesta apícola temporada 2005. 23p.
- UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE. 2006. Agenda apícola 2007. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Austral Temuco. Valdivia, Chile. 110 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1999. Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Environmental health criteria. Genova. 217: 105 p.



**ANEXOS**

**ANEXO 1 Porcentaje de mortalidad de larvas en los distintos tratamientos.**

Estadio larval	Tratamiento	Larvas Vivas	Larvas Muertas	% Mortalidad
3	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	9	1	10
	Testigo	9	1	10
3	2	9	1	10
	2	9	1	10
	2	8	2	20
3	3	8	2	20
	3	9	1	10
	3	10	0	0
3	4	8	2	20
	4	8	2	20
	4	9	1	10
	4	9	1	10
	4	8	2	20
	4	9	1	10
	4	9	1	10
3	5	10	0	0
	5	10	0	0
	5	10	0	0
	5	9	1	10
4	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	9	1	10
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	9	1	10

(Continúa)

## Continuación Anexo 1

Estadio larval	Tratamiento	Larvas Vivas	Larvas Muertas	% Mortalidad
4	2	9	1	10
	2	8	2	20
	2	9	1	10
	2	7	3	30
	2	8	2	20
	2	9	1	10
4	3	10	0	0
	3	10	0	0
	3	9	1	10
	3	10	0	0
	3	10	0	0
	3	9	1	10
	3	8	2	20
	3	6	4	40
4	4	8	2	20
	4	9	1	10
	4	10	0	0
	4	9	1	10
	4	10	0	0
	4	10	0	0
	4	6	4	40
	4	5	5	50
	4	9	1	10
4	5	10	0	0
	5	10	0	0
	5	9	1	10
	5	9	1	10
	5	10	0	0
	5	9	1	10
5	Testigo	9	1	10
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	9	1	10
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	9	1	10
	Testigo	9	1	10

(Continúa)

## Continuación Anexo 1

Estadio larval	Tratamiento	Larvas Vivas	Larvas Muertas	% Mortalidad
5	2	7	3	30
	2	8	2	20
	2	9	1	10
	2	10	0	0
	2	10	0	0
	2	10	0	0
	2	10	0	0
	2	10	0	0
	2	8	2	20
5	3	9	1	10
	3	8	2	20
	3	8	2	20
	3	10	0	0
	3	10	0	0
	3	9	1	10
	3	10	0	0
	3	10	0	0
	3	9	1	10
	3	10	0	0
	3	10	0	0
5	4	8	2	20
	4	7	3	30
	4	10	0	0
	4	10	0	0
	4	9	1	10
	4	10	0	0
	4	9	1	10
	4	8	2	20
	4	9	1	10
	4	9	1	10
	4	9	1	10
	4	10	0	0
5	5	10	0	0
	5	10	0	0
	5	9	1	10
	5	10	0	0
	5	10	0	0
	5	10	0	0

(Continúa)

## Continuación Anexo 1

Estadio larval	Tratamiento	Larvas Vivas	Larvas Muertas	% Mortalidad
6	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	10	0	0
	Testigo	9	1	10
	Testigo	9	1	10
6	2	10	0	0
	2	9	1	10
	2	8	2	20
	2	10	0	0
	2	10	0	0
	2	8	2	20
6	3	9	1	10
	3	10	0	0
	3	10	0	0
	3	9	1	10
	3	10	0	0
	3	9	1	10
6	4	10	0	0
	4	9	1	10
	4	9	1	10
	4	8	2	20
	4	10	0	0
	4	10	0	0
6	5	9	1	10
	5	10	0	0
	5	9	1	10

**ANEXO 2 Prueba de homogeneidad de varianza.**

<b>Mortalidad y Tratamiento.</b>		
Prueba de Bartlett:	1,01063	P-valor = 0,78404
<b>Mortalidad y Estadio.</b>		
Prueba de Bartlett:	1,00863	P-valor = 0,832816

**ANEXO 3 Análisis de varianza.**

Variable dependiente:  $\text{Log}_{10}$  (mortalidad corregida + 1)

Factores: A: Estadio  
B: Tratamientos (Dosis)

Fuente	SC	GL	CM	F- calculado	P-valor
Factores					
A Estadio	1,85716	3	0,619049	2,10	0,1057
B Tratamiento	2,89438	3	0,964792	3,27	0,0247*
INTERACCIONES					
AB	1,96708	9	0,218565	0,74	0,6701
Residuos	26,828	91	0,294813		
<b>TOTAL</b>	<b>33,9771</b>	<b>106</b>			

\* Indica diferencias estadísticamente significativas.

**ANEXO 4 Pruebas de comparación múltiple.**

Prueba de Tukey (HSD) para tratamientos (95%) v/s  $\text{Log}_{10}$  (mortalidad corregida + 1).

<b>Tratamientos</b>	<b>Nº observaciones</b>	<b>Media</b>	<b>Grupo</b>
5	19	0,367636	b
3	30	0,562776	ab
4	34	0,790184	ab
2	24	0,837577	a

Letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas.