



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

OFICINA DE PARTES 2 FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	20 JUL 2009
Hora	16 ²⁰
Nº Ingreso	6119

I. ANTECEDENTES GENERALES

- Código: FIA-PI-C-2004-1-P-017
- Nombre del Proyecto: Desarrollo de un acaricida biológico para el manejo no contaminante de *Varroa destructor* en colmenares comerciales.
- Región o Regiones de Ejecución: Metropolitana, VII, VIII y X regiones.
- Agente Ejecutor: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu.
- Agente(s) Asociado(s) (*Originalmente planteados en la propuesta y los efectivos*):
Originales: Universidad Austral de Chile, Colmenares Werner, Centro De Educación y Tecnología CET Yumbel, Agencia de Desarrollo Rural Ranquil, Asociación Gremial de Apicultores Región del Bio Bio, MIPAGRO.

Efectivos: Universidad Austral de Chile, Centro De Educación y Tecnología CET Yumbel, Asociación Gremial de Apicultores Región del Bio Bio.
- Coordinador del Proyecto: Marcos Gerding Paris.
- Costo Total (*Programado y Real*):
Costo Total programado:
Costo Real:
- Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total) (*Programado y Real*):
Aporte Programado :
Aporte Real:
- Período de Ejecución (*Programado y Real*):
Periodo programado: 1 diciembre de 2004 a septiembre de 2008.
Periodo Real: 1 diciembre de 2004 al 30 de septiembre de 2008.

II. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto comenzó el 1 de diciembre de 2004 con la instalación de un apiario experimental para la crianza de abejas y ácaros de *Varroa destructor* de manera de tener material biológico para realizar tanto evaluaciones de laboratorio como de terreno. Luego de evaluar sistemas de mantención del acaro en laboratorio, se realizaron estudios de crecimiento de hongos entomopatógenos a altas temperaturas considerando, que la temperatura del área de cría de la colmena que es donde los ácaros se reproducen preferentemente, puede alcanzar los 34 °C. De acuerdo a lo anterior, se evaluó el crecimiento a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35°C) de 100 aislamientos de hongos entomopatógenos de las especies *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* de los cuales 21 mostraron diferencias significativas en sus tasas de crecimiento a temperaturas de 30 y 35°C, 17 pertenecientes al género *Metarhizium* y 4 a *Beauveria*. Posteriormente se realizaron pruebas de patogenicidad sobre *Varroa destructor* demostrando diferencias en cuanto a efectividad sobre el acaro.

De los aislamientos evaluados se seleccionó Qu-M845 de *M. anisopliae* que produjo una mortalidad del 85% de ácaros en laboratorio.

En terreno al aplicar conidias de este aislamiento sobre las colmenas se produce una reducción del 67% de parasitismo por varroa. En tanto, que al aplicar tiras estampadas con 5×10^{11} conidias por colmenas en verano este producto presenta una eficacia del 74% similar a la obtenida con el tratamiento de ácido fórmico 79%.

Al evaluar el efecto del aislamiento nativo Qu-M845, sobre la viabilidad de las abejas en laboratorio no se detectó mortalidad significativa por hongo. Resultados de estudios de diferentes métodos de aplicación de una dosis de 5×10^{11} conidias por colmena sobre la actividad de las abejas y la oviposición de la reina en terreno, indican que no existen efectos negativos de este aislamiento sobre la colmena, cuando se aplica en verano, si se observó estrés y perturbación de las abejas cuando el hongo es aplicado pos cosecha y con altos niveles de infestación por varroa.

Los mejores resultados en caída de ácaros y disminución en el nivel de infestación de *Varroa* con el aislamiento nativo Qu-M845 de *M. anisopliae* fueron obtenidos espolvoreando las conidias sobre cada colmena en primavera.

Los resultados obtenidos han sido transferidos a apicultores e investigadores a través de charlas de difusión y presentaciones en congresos. También se han realizado publicaciones divulgativas y científicas.

III. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

Objetivo General

El objetivo propuesto es establecer una estrategia de manejo no contaminante de varroasis mediante la elaboración y uso de un bio acaricida para la producción limpia de miel. Este bioacaricida se basa en el uso de hongos entomopatógenos para lo cual se selecciono un aislamiento patogénico para Varroa e inocuo para las abejas, y que es altamente eficaz en terreno.

Objetivos Específicos

Objetivo Especifico	Resultado
1. Seleccionar una o más cepas de hongos altamente patógenos a Varroa para la formulación del acaricida.	Selección del aislamiento Qu-M845 de <i>M. anisopliae</i> .
2. Determinar los efectos sobre el hospedero (mortalidad y comportamiento de las abejas) de las aislaciones seleccionadas para el control de Varroa.	Eficacia del 74% en terreno contra Varroa y sin efecto detrimental en la población de abejas.
3. Desarrollar un plan de manejo en el control de Varroa mediante el uso del acaricida biológico que no afecte la calidad de la miel.	Aplicación en primavera, con dosis de 5×10^{10} y 10^{11} conidias por colmena.
4. Desarrollar protocolo de producción del bioacaricida y promover la adopción de la tecnología desarrollada y el uso práctico del bioacaricida, fundamentalmente en pequeños apicultores y empresas.	Existe el protocolo de producción masiva de hongos entomopatógenos y se espera que la empresa BIOGRAM adopte la tecnología productiva. Se difundió la tecnología de uso entre apicultores desde la Región de O´Higgins hasta Los Lagos.

2. Metodología del Proyecto:

2.1 Establecimiento de las colmenas para el trabajo con *Varroa*.

Esta actividad se realizó en el Centro Regional de Investigación Quilamapu del INIA ubicado en Chillan.

El establecimiento de las colmenas se inició el año 2004 con la instalación de 20 familias a partir de las cuales se produjeron núcleos para aumentar el número de colonias. Estas colmenas fueron utilizadas para la crianza y mantención de *V. destructor* y de abejas, necesarias para los estudios de patogenicidad de diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos en laboratorio.

Luego, el 31 de septiembre de 2006 se adquirieron otras 60 colmenas que se utilizaron para evaluaciones en terreno del aislamiento seleccionado para el control de varroa.

A pesar de los trabajos de mantención y alimentación de las colonias, las inclemencias del tiempo durante el año 2007 diezmaron la población de abejas quedando finalmente con 50 colmenas para realizar los trabajos de evaluaciones en terreno. Posteriormente se compraron otras 30 colmenas que fueron usadas para las evaluaciones finales del proyecto.

En general, el manejo sanitario y nutricional de las colmenas se realizó en base a revisiones semanales durante el periodo estival y revisiones solo para alimentación en invierno la cual, se basó en fructosa y levadura de cerveza. Los núcleos más débiles fueron alimentados con harinilla de soya y jarabe de miel para la suplementación de proteína y carbohidratos. A partir de septiembre se colocaron alzas en las colmenas más fuertes y se eliminaron celdillas de reina, de manera de favorecer el desarrollo de las colmenas y evitar la enjambrazón.

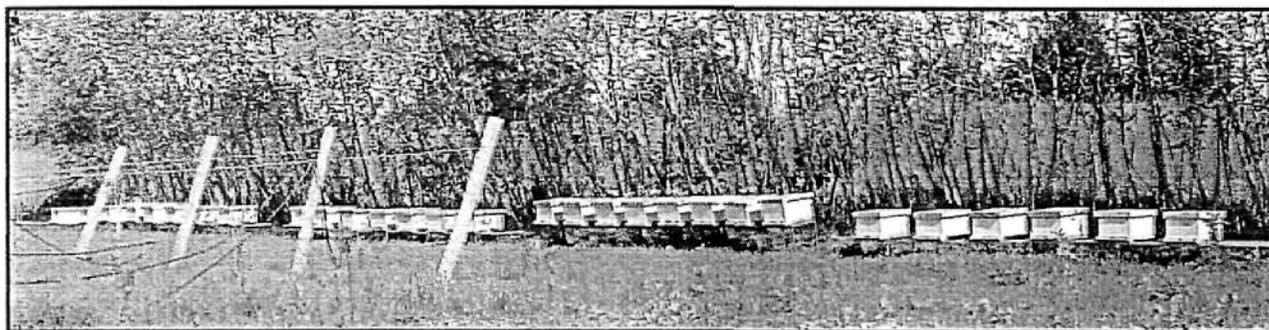


Foto 1. Apiario ubicado en la Estación Experimental Santa Rosa de INIA-Quilamapu (Año 2006).

2.2 Colecta de Varroa desde terreno.

Se realizaron prospecciones en colmenares comerciales de abejas para la detección y colecta de adultos de Varroa. Los ácaros colectados fueron trasladados a las colmenas mantenidas en Santa Rosa. Periódicamente se realizaron muestreos para estimar los niveles de infestación de Varroa.

En primavera, los porcentajes de infestación de las colmenas que sobrevivieron el invierno no superaron el 2%, lo que hizo difícil la colecta de material para algunos ensayos por lo que fue necesario coleccionar panales infectados desde colmenas de otros apiarios y traspasarlos a las colmenas más fuertes para aumentar la población de varroa.

2.3 Mantención colonia de Varroa.

Se realizó un muestreo periódico de las colmenas para evaluar la infestación por el acaro. De acuerdo al grado de parasitismo encontrado, las colmenas fueron sometidas a inoculaciones periódicas de varroas colectadas desde los apiarios prospectados. A su vez, las colmenas más débiles se fusionaron con aquellas más fuertes de manera de mantener la colmena y la crianza de varroa.

2.4 Incremento de Varroa en colmenas de producción.

Para lograr una mayor población de varroa en las colmenas se introdujeron marcos con celdillas de zángano en las cámaras de cría de manera de estimular la postura de estos y utilizarlos como cebos.

Para homogenizar los grados de infestación entre las colmenas y evitar la mortandad absoluta de las familias se coleccionaron panales con cría de abejas desde las colmenas sanas y fueron introducidos en aquellas familias infestadas.

2.5 Evaluación de sobre vivencia de Varroa en laboratorio sobre diferentes sustratos.

Esta actividad se comenzó a desarrollar a comienzos de primavera del año 2005.

Pupas de zánganos fueron coleccionadas desde celdillas recién operculadas y traspasadas a tubos plásticos de 1 mL (Eppendorf®) tapados con un trozo de algodón hidrófilo.

Luego, varroas en estado forético fueron coleccionadas y ubicadas sobre las pupas incubadas en los tubos (Foto 2).

Se colocó una varroa por pupa y fueron incubadas en cámara con temperatura de 25 y 30°C. Diariamente se evaluó la emergencia de zánganos y sobre vivencia de varroa. Para cada tratamiento se utilizaron 10 pupas como unidad experimental y tres repeticiones.

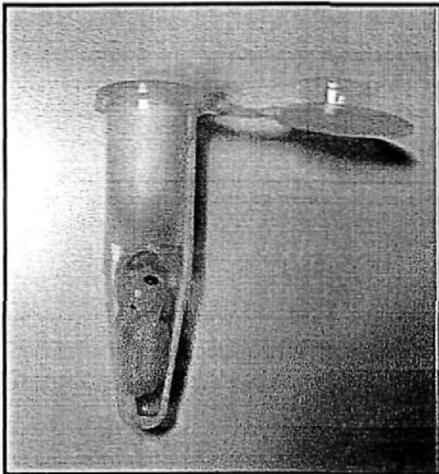


Foto 2. Pupa de zángano incubada en tubo eppendorf.

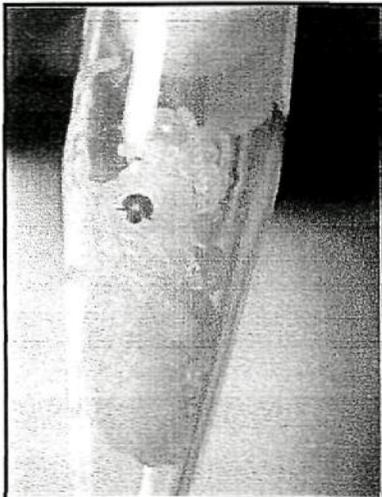


Foto 3. Pupa de zángano parasitada con varroa.

2.6 Evaluación de patogenicidad de aislaciones de Beauveria sobre adultos de varroa.

Previo a este estudio, se realizó la evaluación del crecimiento de 50 aislamientos de *B. bassiana* a temperaturas de 30 y 35 °C. De acuerdo a lo anterior, se seleccionaron siete cepas por su resistencia térmica a estas condiciones, las cuales son similares a las encontradas en el nido de cría que es donde preferentemente se desarrolla el acaro *V. destructor* (Chandler *et al.*, 2001).

Los aislamientos utilizados, se produjeron mediante siembras en placas de Petri, con agar papa dextrosa, y se incubaron a 25°C hasta la esporulación del hongo. Las conidias se cosecharon desde la superficie del cultivo, realizando una suspensión en agua destilada estéril más 1% de humectante Tween 80 al 0,1%, y se llevaron a un agitador mecánico para disgregar las conidias. La concentración de conidias se

determinó utilizando una cámara de recuento Neubauer (BOECO, Neubauer, Alemania).

Adultos de varroa en estado forético fueron colectadas desde las colmenas infestadas y traspasadas a cámaras plásticas con papel absorbente en su base (Foto 4).

El inóculo consistió de una suspensión de 10^7 conidias mL^{-1} , aplicada sobre las varroas mediante una torre de pulverización Potter. Como control se utilizaron varroas tratadas con una solución de agua destilada con Tween 80. Inmediatamente después de tratadas, las varroas inoculadas fueron colocadas sobre pupas de zángano según metodología descrita anteriormente. Diariamente se registro la mortalidad de varroa. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 4 aislamientos de *B. bassiana* seleccionados por su capacidad de crecer a 30 y 35 °C, con tres repeticiones por aislamiento, utilizando 10 varroas como unidad experimental. La mortalidad de varroas y la micosis sobre estas se evaluaron diariamente desde el primer día de tratadas.

Los aislamientos de Beauveria evaluados se mencionan a continuación en el cuadro 1.

Cuadro 1. Aislamientos de *Beauveria bassiana* (Qu-B) seleccionados para el estudio de patogenicidad sobre *Varroa destructor*.

Aislamientos	Tasa de crecimiento (mm día^{-1})		Origen Geográfico
	30°C	35°C	
Qu-B249	0,93 (0,97) ¹	0,057 (0,35)	Cañete, Región del Bio Bio
Qu-B303	0.56 (0,6)	0,5 (0,98)	Valle de Lluta, Región de Arica y Parin
Qu-B323	1,99 (0,97)	0,086 (0,92)	Río Chaca, Región de Arica y Parinacota
Qu-B389	1,73 (0,97)	0,017 (0,89)	Curepto, Región del Maule
Qu-B392	1,79 (0,98)	0	Cañete, Región del Bio Bio
Qu-B910	1,87 (0,97)	0,4 (0,6)	Isla de Pascua
Qu-B916			Isla de Pascua

1 Coeficiente de correlación de la regresión (R^2)

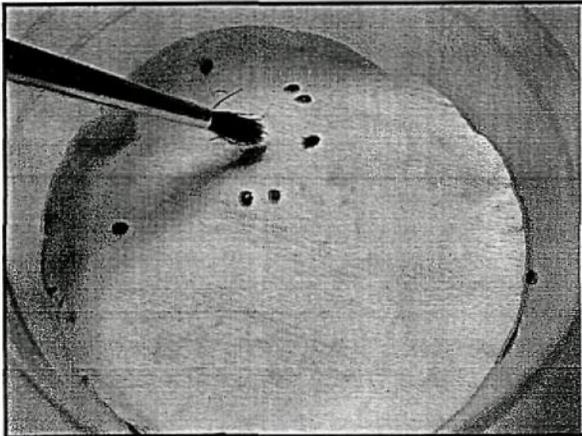


Foto 4. Preparación de Varroa para su posterior inoculación con HEP.

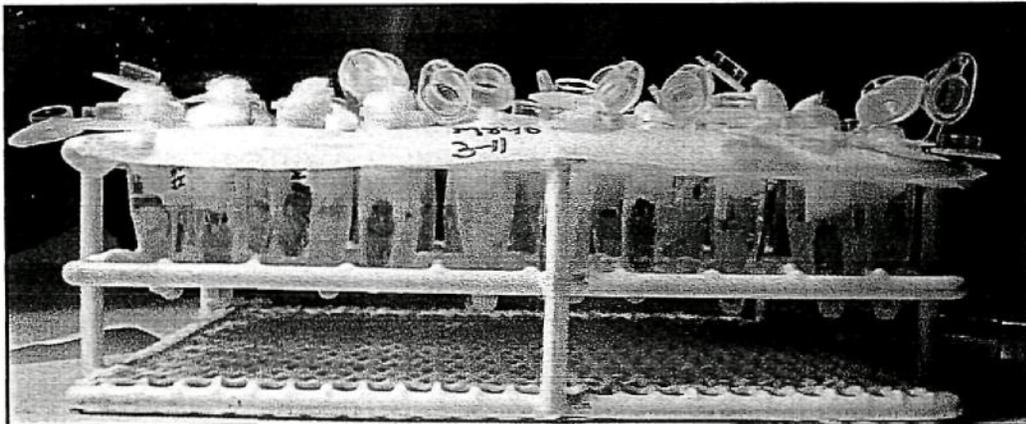


Foto 5. Mantención de zénganos y ácaros inoculados con HEP en laboratorio.

2.7 Evaluación de patogenicidad de aislaciones de *Metarhizium* sobre adultos de varroa.

En total se evaluaron 54 aislamientos de *Metarhizium*. En una primera etapa se evaluaron 39 aislamientos seleccionados al azar y luego se evaluaron 14 seleccionados por su crecimiento a temperaturas de 30 y 35°C. Estos se cultivaron en placas de Petri con agar papa dextrosa y a partir de los cultivos se extrajeron conidias para preparar suspensiones líquidas con una concentración de 10^7 conidias mL^{-1} que fueron aplicadas sobre las varroas mediante una torre de pulverización. Las varroas inoculadas fueron traspasadas a tubos con pupas de zénganos y diariamente se evaluó la mortalidad y esporulación del hongo sobre los cadáveres.

Los aislamientos evaluados y su origen se mencionan en el siguiente cuadro (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Qu-M) seleccionados para el estudio de patogenicidad sobre *Varroa destructor*.

Aislamientos	Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹)		Origen Geográfico
	30°C	35°C	
Qu-M38	2,59 (0,97) ¹	1,38 (0,9)	Desconocido
Qu-M82	2,53 (0,97)	1,03 (0,99)	El Carmen, Región del Bio Bio
Qu-M150	2,76 (0,92)	0,98 (0,98)	Lago Chapo, Región de Los Lagos
Qu-M151b	2,49 (0,95)	1,22 (0,97)	Río Chamiza, Región de Aysén
Qu-M203			Osorno, Región de Los Lagos.
Qu-M204	1,2 (0,96)	0,05 (0,87)	Osorno, Región de Los Lagos.
Qu-M219			Desconocido
Qu-M233	2,54 (0,98)	1,24 (0,89)	Osorno, Región de Los Lagos.
Qu-M256	1,03 (0,98)	1,38 (0,92)	Cañete, Región del Bio Bio
Qu-M271	1,19 (0,97)	1,11 (0,9)	Coihueco, Región del Bio Bio
Qu-M280			Osorno, Región de Los Lagos.
Qu-M285	3,67 (0,94)	1,58 (0,91)	Lago Puyehue, Región de Los Lagos
Qu-M326	0,35 (0,97)		San Vicente, Melipilla, Región de
Qu-M327			Vicuña, Región de Coquimbo
Qu-M354	2,62 (0,94)	1,36 (0,91)	Cañete, Región del Bio Bio
Qu-M363	2,77 (0,97)	0,58 (0,7)	Pinto, Región del Bio Bio
Qu-M426			Puyehue, Región de Los Lagos
Qu-M428			Puyehue, Región de Los Lagos
Qu-M436	0,28 (0,93)	0,13 (0,88)	Región del Bio Bio
Qu-M437			Huape, Región del Bio Bio
Qu-M448	2,56 (0,97)	1,24 (0,9)	Huape, Región del Bio Bio
Qu-M469			Termas de Chillán, Región del Bio
Qu-M482	0,32 (0,94)	0,14 (0,93)	Región del Bio Bio
Qu-M485			Desconocido
Qu-M489a	0,39 (0,97)	0,04 (0,92)	Osorno, Región de Los Lagos
Qu-M490			Osorno, Región de Los Lagos
Qu-M497			Osorno, Región de Los Lagos
Qu-M510			Desconocido
Qu-M517			Parral, Región del Maule
Qu-M518	2,91 (0,97)	1,98 (0,93)	Sta. Barbara, Region del Bio Bio
Qu-M520			Región del Bio Bio
Qu-M532	0,3 (0,93)	0	Región del Bio Bio
Qu-M540			Sta. Barbara, Región del Bio Bio
Qu-M549	0,1 (0,94)	0	Región del Bio Bio
Qu-M553			Pto. Varas, Región de Los Lagos
Qu-M554			Río Bueno, Región de Los Ríos
Qu-M556	0,32 (0,97)	0	Purranque, Región de Los Lagos



Qu-M559			Osorno, Región de Los Lagos.
Qu-M594			Región del Bio Bio
Qu-M596			Región del Bio Bio
Qu-M608	0,33 (0,95)	0	Osorno, Región de Los Lagos.
Qu-M750			Desconocido
Qu-M789	0,28 (0,99)	0	Desconocido
Qu-M823			Desconocido
Qu-M824	2,73 (0,96)	1,26 (0,98)	El Carmen, Región del Bio Bio
Qu-M826			Desconocido
Qu-M836	2,02 (0,96)	1,18 (0,96)	Villa Alegre, Región del Maule
Qu-M845	2,91 (0,97)	2,17 (0,9)	Antuco, Región del Bio Bio
Qu-M857	0,33 (0,97)	0	Portezuelo, Región del Bio Bio
Qu-M863	0,17 (0,98)	0	Villa Alegre, Región del Maule
Qu-M984	0,32 (0,9)	0,35 (0,9)	Quillota, Región de Valparaíso
Qu-M957			Desconocido

1 Coeficiente de correlación de la regresión (R^2)

2.8 Evaluación de causas de muerte de varroa en cámaras húmedas.

Las varroas muertas en las pruebas anteriores se removieron a cámaras húmedas y se incubaron a 25°C para observar el posible desarrollo de micelio y conidias.

Los signos de patogenicidad de los aislamientos aplicados sobre varroa fueron registrados diariamente identificando mediante microscopio la especie de hongo presente en los cadáveres.

El principal criterio para seleccionar los aislamientos fue la esporulación ya que con ello se confirma que los ácaros murieron a causa del aislamiento aplicado y no por otras causas.

2.9 Estudio de dosis letal y determinación del tiempo letal con aislaciones de *Metarhizium*.

Se evaluaron los aislamientos Qu-M489 y Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* los que fueron multiplicados en placas Petri, con agar papa dextrosa e incubado a 25°C hasta la esporulación del hongo. Las conidias de cada aislamiento se cosecharon desde la superficie del cultivo, mediante suspensión en agua destilada estéril con el humectante Tween 80 al 0,1% y fueron disgregadas en un agitador mecánico. La concentración de conidias se determinó en una cámara de recuento Neubauer. Se utilizaron suspensiones de 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias mL^{-1} , para cada aislamiento, las que se aplicaron a las varroas mediante aspersion utilizando el sistema de pulverización de Torre de Potter. Como control se utilizaron varroas tratadas con agua destilada y Tween 80. Posteriormente cada varroa se incubo sobre pupas mantenidas en tubos plásticos de 1mL.

El diseño experimental utilizado fue completo al azar con 10 varroas como unidad experimental, 5 tratamientos y 5 repeticiones para cada aislamiento.

La mortalidad de varroas se registró diariamente desde el primer día de tratadas.

La evaluación del porcentaje de mortalidad, a distintas concentraciones de inóculo, se realizó el día 9 post inoculación, ya que ese día se alcanzó el 95% de mortalidad en uno de los tratamientos.

Las curvas de mortalidad de varroas, inoculados con Qu-M489 y Qu-M845, fueron expresadas como porcentaje de mortalidad a distintas concentraciones.

La curva de mortalidad a diferentes concentraciones se ajustó a una curva sigmoidea, la que se comprobó con la prueba de chi-cuadrado para bondad de ajuste. Esta curva posteriormente se linearizó mediante transformación probit, asumiéndose normalidad, con el fin de calcular la concentración letal del 50% de la población (CL50), a través de su ecuación de regresión (Alves *et al.*, 1998).



Foto 6. Incubación de *Varroa* sobre pupa de zángano.

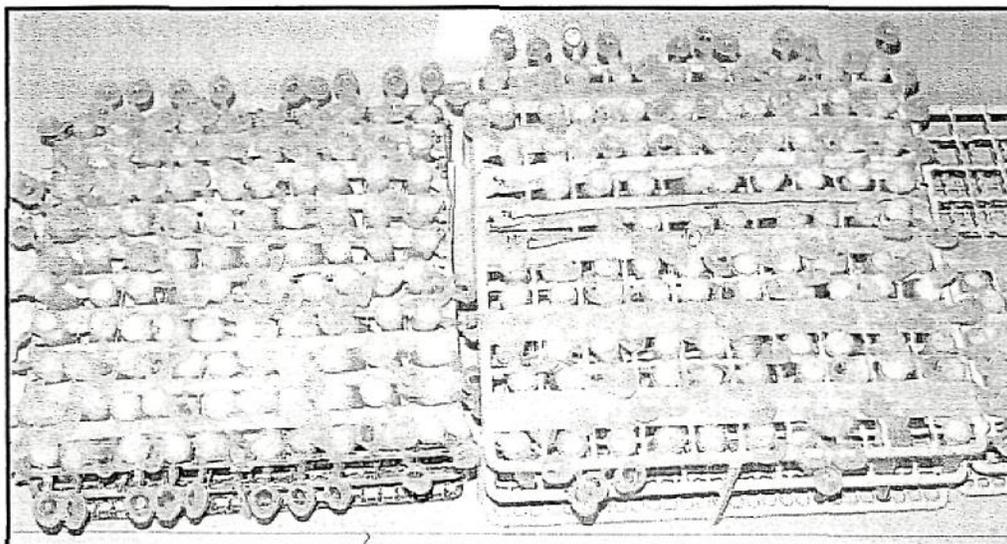


Foto 7. Establecimiento de ensayo de estudio de dosis y tiempo letal del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* sobre *Varroa destructor*.

2.10 Determinación tiempo letal con aislaciones de Metarhizium.

El TL50 se calculó a partir de las observaciones de mortalidad acumulada a través del tiempo con la CL90 del aislamiento Qu-M845.

2.11 Crianza de abejas fuera de la colmena.

Para esta actividad se utilizaron trozos de panal de aproximadamente 25 X 25 cm con crías de abejas en todas las edades y con 20 abejas nodrizas para el cuidado de las crías (Foto 8). Estos fueron mantenidos en cajas de madera de 30x30x30 cm con una ranura a lo largo de la base sobre la cual se colocó un papel blanco con vaselina (Foto 9).

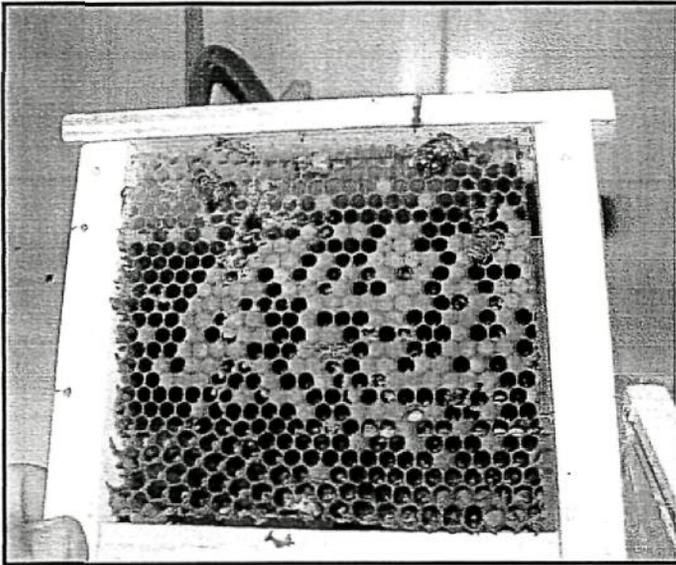


Foto 8. Trozo de panal con cría de abejas a punto de nacer.

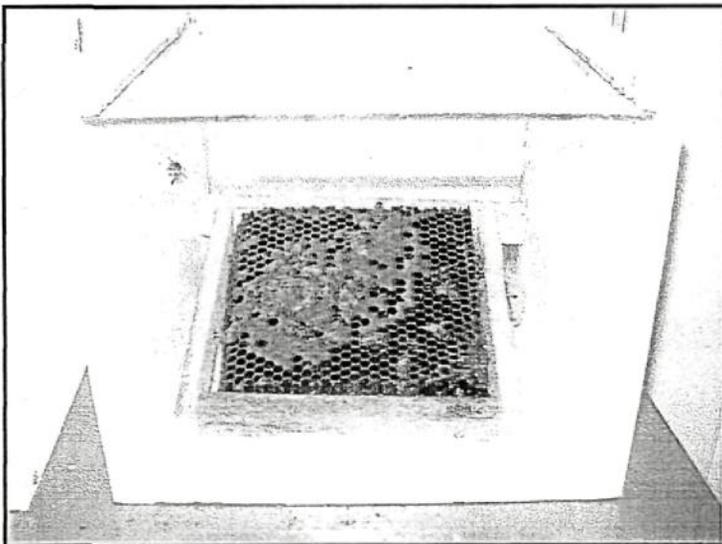


Foto 9. Incubación de panal con crías.

Las abejas fueron mantenidas en una sala de incubación a temperaturas de 25 a 30 °C y oscuridad.

Para la alimentación se utilizó miel, polen granulado y agua hervida fría.

La evaluación de mortalidad de abejas se realizó diariamente retirando el papel con vaselina y contando los individuos muertos.

2.12 Evaluación de patogenicidad de aislaciones seleccionadas de *Metarhizium* sobre abejas.

Se realizaron dos ensayos para evaluar el efecto de aplicaciones de hongo sobre abejas mantenidas en diferentes condiciones (laboratorio y terreno).

Ensayo de laboratorio.

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio del Centro Tecnológico de Control Biológico (CTCB) del Centro Regional de Investigación Quilamapu.

1. Estudio de Concentración letal en abejas.

Se colectaron panales con cría sellada de abejas, desde los apiarios ubicados en el campo experimental Sta. Rosa.

Los panales fueron colocados en una cámara a 35°C hasta la emergencia de las abejas. Luego 50 abejas nodrizas de 1 a 2 días de edad fueron traspasadas a una caja de vidrio y madera de 20x20x24 cm., con un panal con cera estampada de 81 cm² y un receptáculo para la alimentación de las abejas.

Los tratamientos consistieron en cinco concentraciones de inóculo: 0 (testigo), 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ conidias mL⁻¹ del aislamiento Qu-M845, que fueron mezcladas con jarabe de miel que se suministró a las abejas utilizando un recipiente plástico.

La preparación del inóculo se realizó con agua destilada y las concentraciones fueron determinadas a través de la cámara de Neubauer; el jarabe de miel fue preparado con agua hervida, en proporciones de 70% de miel y 30% de agua.

El diseño experimental fue un completo al azar con cinco tratamientos y cinco repeticiones cada uno.

Diariamente se evaluó la mortalidad de abejas para cada tratamiento. Las abejas muertas de cada repetición y tratamiento fueron colectadas cada 24 h., y puestas en cámara húmeda para determinar el agente causal.

Para evaluar la mortalidad en el tiempo se utilizó el test de Friedman, la separación de grupos se efectuó con el test de Conover-In man y la mortalidad de los tratamientos a un mismo periodo de tiempo se evaluó con el test de Kruskal-Wallis, todos ellos con un nivel de significancia de P<0,05.

Ensayo de terreno.

1. Efecto del Método de aplicación

En febrero de 2009, se realizó un ensayo de terreno para evaluar el efecto del método de aplicación de conidias del aislamiento Qu-M845 sobre el comportamiento de pecoreo de abejas de colmenas tratadas con hongo.

Colmenas con similar estado sanitario y nutricional fueron tratadas con una dosis de 5 x 10¹¹ conidias por colmena aplicadas con dos métodos: 1) espolvoreo de conidias con

espolvoreador manual y 2) conidias estampadas en papel absorbente con goma arábica. Estos tratamientos fueron comparados con colmenas sin tratar (testigo) y con un tratamiento de ácido fórmico al 85% (v/v) que fue diluido al 70% (v/v) en agua destilada según lo recomendado por Felipe y Vandamme (2002).

Las evaluaciones consistieron en medir el tráfico de abejas en la piquera para lo cual se contó el número de abejas que entraban y salían desde la colmena, por un periodo de cinco minutos y cada dos días. Con el fin de reducir la abertura que se encuentra entre el piso y la cámara de cría y facilitar las mediciones se dispuso de un listón de madera con dos aberturas de 2 x 2 cm, en cada entrada. Para observar el crecimiento de la colonia, las colmenas se pesaron antes y después del ensayo.

Los tratamientos con hongo consistieron de sólo una aplicación.

El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones.

La evaluación del tráfico de las colmenas (entrada y salida de abejas) fueron graficados y se les calculó el área bajo la curva de tráfico a través del tiempo por medio del programa "Origin ®" y los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, con el software Statistical Analysis System (SAS, $P < 0.05$) y se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

2.13 Incubación de abejas muertas en cámara húmeda.

Las abejas muertas encontradas en cada ensayo fueron retiradas e incubadas en placas plásticas desinfectadas (cámaras húmedas), con papel absorbente humedecido y a temperatura ambiente de 25°C.

2.14 Establecimiento de apiario para ensayo y aplicación de *Metarhizium* en colmenas.

1. Cultivo y obtención de conidias del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*.

Conidias del aislamiento Qu-M845 fueron sembradas en placas de Petri, con agar papa dextrosa e incubadas a 25°C por 20 días aproximadamente, hasta la esporulación del hongo. Las conidias se cosecharon desde la superficie del cultivo con un asa bacteriológica y fueron sembradas en medio líquido estéril contenido en matraces de 500 mL. La preparación del medio se realizó mezclando 1 L de agua destilada con 20 g de extracto de levadura, 25 g de sacarosa y 0.025 g de cloranfenicol y posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos. Una vez que se enfrió, se inoculó con esporas del aislamiento Qu-M845 y se mantuvo en agitación durante una semana a temperatura de 25°C.

A partir del cultivo líquido, se realizaron nuevas siembras de inóculo en arroz precosido estéril para lo cual, se prepararon 22 unidades constituidas por 300 g de arroz contenido en bolsas de polipropileno. Luego de la inoculación cada bolsa fue sellada

herméticamente y mantenida a 25°C y oscuridad hasta la completa colonización y esporulación del hongo sobre los granos.

Luego el material fue secado a temperaturas de 25 a 30°C y posteriormente removido sobre un tamiz con apertura de 100 µm, para la extracción de conidias, las que posteriormente fueron envasadas en bolsas de PVC, selladas al vacío y mantenidas en oscuridad a 10°C hasta su uso en los ensayos.

2. Evaluación de métodos de aplicación.

Se estableció un apiario con 25 colmenas tipo Langstroth de *A. mellifera* en el Campo Experimental Santa Rosa de INIA-Quilamapu, en octubre de 2005. En mayo del 2006 se prepararon dosis de 5×10^{10} conidias (deshidratadas al 10% de humedad) por colmena, del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae*. Los tratamientos consistieron en tres métodos de aplicación: a) dispensador de conidias ubicado en la piquera de las colmenas; b) conidias estampadas en papel filtro ubicados cada dos panales móviles al interior de la colmena y c) conidias espolvoreadas sobre y entre los panales. Además, se incluyó un tratamiento testigo que consistió en colmenas sin tratar. Previo al ensayo se realizó un muestreo para determinar el porcentaje inicial de infestación por varroa por lo que se colectaron muestras de 200 abejas adultas provenientes de los panales centrales de cada colmena, posteriormente se colocaron en un frasco plástico de 300 mL y se le adicionó tres gotas de detergente líquido por cada 200 mL de agua. A continuación se tapó y agitó para producir el desprendimiento de ácaros desde las abejas. Posteriormente, el contenido de cada muestra fue vertido sobre un colador, aplicando agua sobre las abejas, con el propósito de desprender las varroas que aún estaban adheridas al cuerpo de ellas. Las varroas retenidas en el colador se contaron y expresaron porcentualmente (SAG, 2002).

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. La unidad experimental consistió en una colmena. La evaluación de la mortalidad de abejas y varroas, posterior a la aplicación del hongo, se realizó a través de una cartulina cubierta con vaselina que se instaló en el piso de cada colmena y que se evaluó cada 48 hr. y por un período de 21 días. Los individuos colectados fueron incubados en cámara húmeda para detectar los signos de micosis. Los resultados de mortalidad a través del tiempo fueron ajustados a curvas sigmoideas y comparación de medias de la mortalidad acumulada al día 21 de post inoculación, mediante la prueba protegida de Fisher ($P < 0,05$). Al cabo de ese período se revisaron nuevamente las colmenas para determinar los niveles de infestación por *V. destructor*. Los resultados se compararon entre tratamientos para conocer el porcentaje de abejas parasitadas y a través de las relaciones entre población final e inicial (P_f/P_i), ambos fueron sometidos a análisis de varianza y separación de medias por la prueba de Tukey ($P < 0,05$).



Las curvas de mortalidad de varroas y abejas para cada colmena inoculada se calcularon en dos oportunidades a inicio de primavera y con 45 días de diferencia entre ellas, para las dos fechas de establecimiento de los ensayos, los resultados se expresaron como mortalidad a través del tiempo. La mortalidad de varroas y abejas se compararon entre los tratamientos a partir de las curvas de mortalidad acumulada a través del tiempo. Los resultados de mortalidad al día 14 y 25 de post inoculación, para la primera y segunda observación respectivamente, se sometieron a análisis de varianza y separación de medias mediante la prueba protegida de Fischer ($p < 0,05$) (Gomez y Gomez, 1984).

3. Evaluación de primavera

Durante la primavera de 2006, se realizaron cuatro aplicaciones de *M. anisopliae* (Qu-M845) cada 4 días entre el 1 y 16 de septiembre, y luego se repitieron otras cuatro entre el 16 y 31 de octubre. Todas las dosis fueron de 5×10^{10} conidias por colmena, aplicadas entre los panales de la cámara de crías. Como control se utilizaron colmenas sin aplicaciones. Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se evaluó el efecto del hongo sobre abejas y ácaros durante 12 días, retirando una cartulina con vaselina cada 48 hr.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con una colmena como unidad experimental, dos tratamientos y cinco repeticiones. Las curvas de mortalidad de varroas y abejas para cada colmena inoculada se calcularon en dos oportunidades: a inicio de primavera y 45 días después, y los resultados se expresaron como mortalidad a través del tiempo mediante ajustes de curvas sigmoideas. Al día 15 de postinoculación se comparó la mortalidad acumulada mediante análisis de varianza y separación de medias con la prueba protegida de Fischer ($p < 0,05$) (Gomez y Gomez, 1984).



2.15 Prueba de pulverizaciones en polvo en panales.

1. Estudio en terreno de dosis del aislamiento Qu-M845.

Con el fin de establecer la mejor dosis del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae* para aplicaciones en terreno, se estableció un ensayo en el apiario ubicado en el campo experimental Santa Rosa de INIA Quilamapu, en marzo de 2007 (Foto 10).

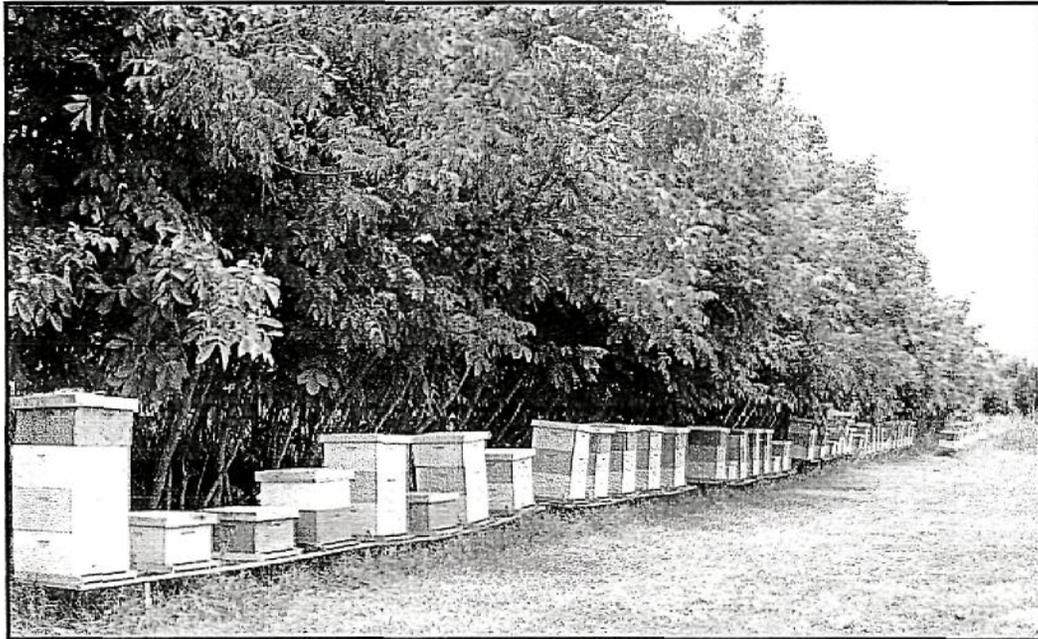


Foto 10. Apiario ubicado en el Campo experimental Santa Rosa de INIA-Quilamapu.

Se aplicaron dosis de: 2.5×10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} y 2×10^{11} conidias por colmena, sobre y entre los panales utilizando una espolvoreadora de espalda marca Solo®.

De acuerdo a lo anterior, los tratamientos fueron las cuatro dosis de hongo, más el acaricida químico Bayvarol® aplicados el 6 y 26 de marzo.

El diseño experimental utilizado fue un completo al azar con 5 tratamientos y 10 repeticiones, constituidas por una colmena.

Las evaluaciones de mortalidad de *Varroa destructor* se realizaron contabilizando los ácaros caídos sobre el cartón con vaselina ubicado en el piso de las colmenas.

Las curvas de mortalidad de varroas y abejas para cada colmena, con los distintos tratamientos, fueron expresadas como mortalidad a través del tiempo. Se realizó la prueba t de Student de las áreas bajo las curvas de la mortalidad de varroas y abejas, para cada tratamiento y medido hasta el día 33 después de la primera aplicación.

2. Aplicación de verano.

Posteriormente, con el objetivo de observar el efecto de la época de aplicación, entre el 13 y 27 de diciembre de 2007 y el 10 y 17 de enero de 2008 se realizó otro ensayo

en un apiario comercial ubicado en la localidad de Pinto (Chillán), conformado por 30 colmenas, las cuales siguen un manejo orgánico y están destinadas para producción de núcleos.

En cada colmena, se evaluó el nivel de infestación por Varroa, utilizando la metodología propuesta por el SAG (2002).

Los tratamientos evaluados fueron Timol puro, en dosis de 8 gr. por colmena y el aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae*, en dosis de 5×10^{10} conidias por colmena, utilizando la pulverización de conidias sobre y entre los panales como método de aplicación y un tratamiento control. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 10 repeticiones y una colmena como unidad experimental. La evaluaciones de mortalidad de Varroa y abejas se realizaron contando los individuos caídos sobre un cartón con vaselina sólida, en el piso de la colmena, mas un malla metálica para evitar el raído de las abejas. Los cartones fueron retirados cada dos días. Con los datos obtenidos, se confeccionaron gráficos de mortalidad de ácaros y abejas a través del tiempo. Las curvas obtenidas de cada repetición fueron linearizadas utilizando regresión lineal y se realizo análisis de las pendientes a través de análisis de varianza y separación de media mediante la prueba protegida de Fisher. En cada colmena tratada con hongo, se marco un trozo de panal con 10 celdillas con crías sin opercular, para observar el efecto del aislamiento sobre las crías y la emergencia de abejas.

2.16 Prueba de trampas (Dispensadora) de esporas en el piso y entre marcos.

1. Estudio de piquera.

En el apiario ubicado en el Campo Experimental Santa Rosa de INIA Quilamapu, se evaluó la aplicación de la dosis de 5×10^{10} esporas por colmena utilizando un dispensador ubicado en la piquera (Fotos 11 y 12).

El dispensador consiste en una caja dividida en dos secciones que separa la entrada y la salida de las abejas. Al ingresar las obreras acarrear el hongo hacia el interior de la colmena. En la entrada del dispensador, se colocó una dosis de 5×10^{10} esporas por colmena, parcializada en 5 aplicaciones cada dos días.

El diseño experimental utilizado fue un completo al azar con dos tratamientos, (Testigo, Qu-M845) y 10 repeticiones constituidas por una colmena. Las evaluaciones de mortalidad de Varroa y abejas se realizaron según lo señalado anteriormente.

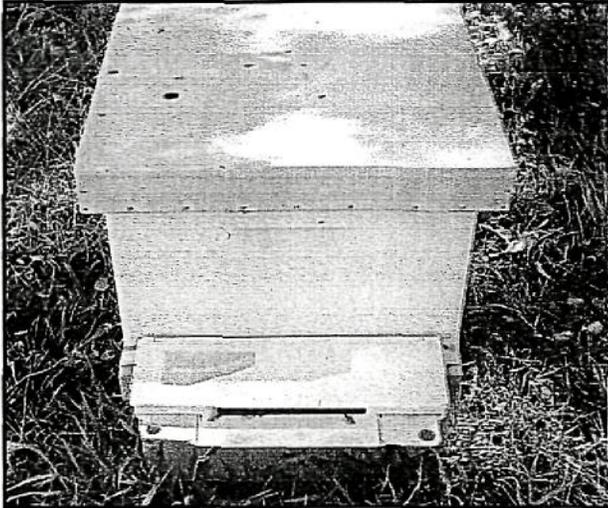


Foto 11. Colmena con dispensador de esporas ubicado en la piquera.

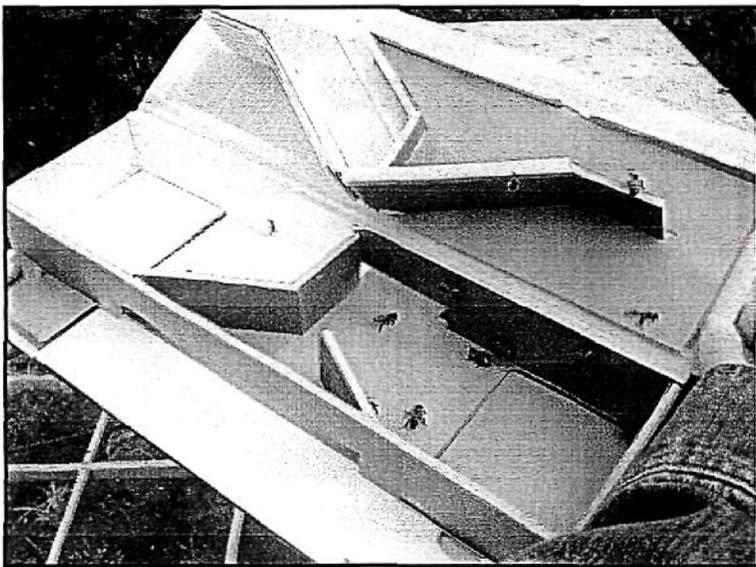


Foto12. Vista interna del dispensador

2. Ensayo Aplicación de tiras de papel con conidias estampadas.

En noviembre de 2008 se realizó otro ensayo para evaluar cuatro dosis: 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} y 5×10^{11} conidias por colmena las cuales, a la vez se compararon con el efecto acaricida del ácido fórmico y colmenas sin tratar (testigo).

La preparación de las dosis se realizó espolvoreando conidias del aislamiento Qu-M845 sobre papel absorbente de 20cm x 20cm utilizando goma arábica como adherente. Posteriormente el papel revestido con conidias fue dividido en tiras de 5 x 20 cm, las sub-dosis de los tratamientos de 10^{11} y 5×10^{11} fueron distribuidas en 4 y 6 segmentos, respectivamente.

La aplicación se realizó colocando las tiras al interior de la colmena, ubicándolas cada dos panales de abejas. Cada tratamiento fue parcializado en 4 aplicaciones, con un intervalo de 4 días.

El tratamiento de ácido fórmico consistió de una solución de 85% (v/v) de ácido, diluido al 70% (v/v) en agua destilada según lo recomendado por de Felipe y Vandamme (2002). El producto fue aplicado por medio de una esponja "Oasis vermiculita" ® (utilizada en floristería) que fue cortada en trozos de 10 x 10 x 1 cm e impregnada con 60 mL de solución, posteriormente la esponja fue colocada dentro de una bolsa plástica con cierre hermético. La aplicación se realizó colocando la esponja impregnada a razón de una por colmena, sobre los cabezales de los bastidores, en la parte central de la colmena. A cada bolsa se le realizó una apertura de 3 x 3, para permitir la evaporación gradual del ácido fórmico. Este tratamiento se parcializó en 4 aplicaciones, con un intervalo de 4 días (de Felipe y Vandamme, 2002).

Para evaluar el nivel de control se realizó una estimación de la infestación de la colmena previa y posterior a la aplicación de cada tratamiento.

El procedimiento fue realizado según lo recomendado por el SAG (2002). Además se evaluó la caída de varroas sobre un piso trampa que consistió en una lámina de cartón piedra cubierta con vaselina, sobre el cual se colocó una malla metálica para evitar que los ácaros pegados al piso sean arrastrados por las abejas. El primer recuento de varroas se realizó 56 horas después de haber aplicado los productos y se repitió en cuatro oportunidades. Con estos datos se calculó la eficacia de cada tratamiento utilizando la fórmula de Henderson y Tilton (1955):

$$\%Eficacia = 100 \times \frac{[1 - (N^{\circ} \text{ ácaros. Testigo antes} \times N^{\circ} \text{ ácaros. Tratamiento antes})]}{N^{\circ} \text{ ácaros. Testigo desp.} \times N^{\circ} \text{ ácaros. Tratamiento desp.}}$$

El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones.

2.17 Aplicación de suspensión de esporas.

El ensayo se realizó en enero de 2008 (Informe N°5), en el Campo Experimental Santa Rosa de INIA-Quilamapu. Veinte colmenas fueron escogidas al azar para determinar su nivel de infestación por *V. destructor*. Luego se preparó 50 mL de una suspensión de conidias del aislamiento Qu-M845 de 0, 10⁷, 10⁸ y 10⁹ conidias por mL, la cual fue aplicada sobre las colmenas. Luego de la aplicación se colocaron cartones con vaselina sólida para evaluar el efecto sobre Varroa y abejas.

El diseño experimental es un completo al azar con 5 tratamientos y 5 repeticiones considerando una colmena de abejas como tal.



2.18 Evaluación de viabilidad de esporas en abejas.

Para investigar la persistencia del hongo en abejas de colmenas tratadas con una concentración de 5×10^{10} conidias, se colectaron al azar 20 abejas por colonia a diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 5 y 7 días). Cada grupo de abejas fue colocado en un frasco con 50 mL de agua destilada estéril.

Cada muestra fue agitada por 15 minutos en agitador mecánico. Veinte mL de agua deionizada estéril, con 0.02% de Tween 80 fueron adicionadas a cada frasco. A partir de estas soluciones, se prepararon 3 diluciones seriadas de 10 mL. Una alícuota de 0.1 mL de cada dilución fueron dispersadas sobre placas de Petri con agar saboroud. Luego, el material fue incubado por 7 días a 25°C, para determinar las unidades formadoras de colonia.

2.19 Evaluación de residuos de esporas en la miel.

Este estudio se realizó utilizando colmenas tratadas con dosis 5×10^{10} conidias por colmena del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae* durante el periodo de septiembre a noviembre de 2006, (Informe FIA N°4). Desde cada colmena tratada, se colectó un kilo de miel, que fue llevado al laboratorio de INIA Quilamapu.

A partir de cada muestra se extrajo 1 gr de miel que fue diluido en 10 mL de agua destilada estéril y agitado por 20 minutos en agitador mecánico. Desde cada porción se colectó 1 mL que fue llevado a la cámara de recuento de Neubauer para determinar la cantidad de esporas por gramo de miel. A su vez, 0.1 mL de cada muestra fue rayado sobre placas de Petri con agar Saboraud, e incubado a 25°C y oscuridad por aproximadamente 7 días. Las colonias desarrolladas fueron identificadas y contabilizadas para determinar las unidades formadoras de colonia por gr. de miel.

Por otra parte, muestras de 200 gr de miel de cada colmena tratada con conidias de hongo en dosis de 10^{11} conidias por colmena y sin tratar fueron enviadas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral para análisis microbiológico y detección del hongo aplicado.

2.20 Desarrollo Protocolo de Producción Bioacaricida MIP AGRO.

La empresa MIP AGRO cambio su línea productiva por lo que no realizara el escalamiento para masificación y comercialización del bioacaricida. La empresa BIOGRAM esta interesada en la masificación y producción de este bioacaricida.

2.21 Día de campo y Capacitación para el uso del bioacaricida.

Se realizaron dos días de campo para difundir los resultados obtenidos en el proyecto y capacitar a los apicultores en la aplicación del acaricida

El 10 de noviembre de 2008, se realizó un día de campo con 40 apicultores de Yumbel pertenecientes a la agrupación Getsemani. Esta actividad se llevo a cabo en el apiario perteneciente al apicultor Sr. Claudio Gutiérrez donde se mostró los resultados obtenidos en el proyecto y se realizo una demostración de aplicación del hongo en colmenas.

Luego el 13 de noviembre de 2008, se realizo otra actividad en el Fundo La Leonera, Guariligue, a la cual estuvieron invitados 50 apicultores y que fue organizada por CEGE Coelemu e INIA Quilamapu.

Actividades de difusión.

Los resultados parciales de cada actividad fueron presentados en informes de avance. También se realizaron actividades de difusión para pequeños y grandes apicultores consistentes en charlas, seminarios y participación en ferias y días de campo. Además, se presentaron los resultados parciales de las actividades realizadas en seminarios científicos y congresos de entomología y de apicultura.

Los datos obtenidos han sido publicados en revistas divulgativas y científicas.

Otro aspecto importante fue la elaboración de tres tesis de grado.

3. Actividades del Proyecto:

- Carta Gantt o cuadro de actividades comparativos entre la programación planteada en la propuesta original y la real.

Carta Gantt de la programación de actividades planteada en la propuesta original.

Trimestre	2004	2005				2006				2007				2008				
	1	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Compra de familias de abejas	X																	
Revisión y mantención de colmenas sanas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Separación familias para Varroa	X																	
Colecta de Varroa e inoculación	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Mantención colonia de Varroa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Incremento de Varroa en colmenas de producción	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Evaluación de sobre vivencia de Varroa en laboratorio sobre diferentes substratos de abejas			X	X	X		X	X	X		X	X	X					
Evaluación de patogenicidad de aislaciones de Beauveria sobre adultos de Varroa.			X	X	X		X	X	X		X	X	X					
Evaluación de patogenicidad de aislaciones de Metarhizium sobre adultos de Varroa.			X	X	X		X	X	X		X	X	X					
Evaluación de causas de muerte de Varroa en cámaras húmedas			X	X	X		X	X	X		X	X	X					
Estudio de dosis letal con aislaciones de Beauveria			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Determinación tiempo letal con aislaciones de Beauveria			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Estudio de dosis letal con aislaciones de Metarhizium			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Determinación tiempo letal con aislaciones de Metarhizium			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Crianza de abejas fuera de la colmena		X			X	X			X									
Evaluación de patogenicidad de aislaciones seleccionadas de Beauveria sobre abejas		X			X	X			X	X			X					
Evaluación de patogenicidad de aislaciones seleccionadas de Metarhizium sobre abejas		X			X	X			X	X			X					
Incubación de abejas muertas en cámara húmeda		X			X	X			X	X			X					
Establecimiento de apiario para ensayo									X	X	X	X			X	X		
Aplicación de aislaciones de Beauveria en panales									X	X	X	X			X	X		
Aplicación de aislaciones de Metarhizium en panales									X	X	X	X			X	X		
Prueba de pulverizaciones en polvo en panales										X	X		X	X	X	X		
Prueba de trampas de esporas en el piso y entre marcos										X	X		X	X	X	X		
Aplicación de suspensión de esporas										X	X		X	X	X	X		
Evaluación de viabilidad de esporas en abejas										X	X		X	X	X	X		
Evaluación de residuos de esporas en la miel										X	X		X	X				
Desarrollo Protocolo de Producción Bioacaricida MIP AGRO										X	X	X	X					
Día de campo				X								X					X	
Capacitación para el uso del bioacaricida														X				



Razones que explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas.

Prueba de pulverizaciones en polvo en panales:

Parte de estas pruebas estaban programadas para el segundo y tercer trimestre del año 2008. Sin embargo, debido a que en el desarrollo del proyecto se determinó que estas épocas no son las más apropiadas para el uso del hongo se postergó para inicio de primavera y verano.

Prueba de trampas de esporas en el piso y entre marcos:

Esta actividad se postergó por las mismas razones explicadas en el punto anterior pero además se consideró que la falta de actividad de las abejas en el período invernal pueden influir en la efectividad del hongo sobre el control del acaro.

Aplicación de suspensión de esporas:

Esta actividad se realizó en enero de 2008, concluyéndose su descarte como método de aplicación de las conidias debido a la poca efectividad lograda (Punto 4.17).

Evaluación de viabilidad de esporas en abejas:

Esta actividad se ejecutó en el período comprendido entre octubre a diciembre de 2007 y se extendió por todo el verano de 2008. Durante el segundo y tercer trimestre no se evaluó por la poca actividad de las abejas en este período.

Día de campo:

Los días de campo se postergaron para el cuarto trimestre de 2008, por que se programaron con el CEGE Coelemu y el CADE de Yumbel. La finalidad de postergar esta actividad era para presentar resultados aplicables en terreno y aptos para los apicultores.

Capacitación para el uso del bioacaricida.

Uno de los objetivos del Día de campo realizado con los apicultores pertenecientes al CADE de Yumbel era capacitarlos en el uso de el bioacaricida razón por la cual se retrasó esta actividad para el período informado.

4. Resultados del Proyecto:

4.1 Establecimiento de las colmenas para el trabajo con Varroa.

En general, para todos los años el período en el que se presentaron mayores problemas fue en otoño debido a la disminución de la población de algunas familias por lo que se debió alimentar frecuentemente.

Los principales problemas se presentaron por la infestación de colmenas con varroa y *Nosema apis*. El control de *Varroa destructor* se inicio en febrero con la aplicación de acaricidas químicos como Vaybarol ® y Amivar (Amitraz en tiras) los que se fueron rotando para evitar resistencia. Este tratamiento se complemento con acido oxálico y acido fórmico para el control de ácaros en primavera.

Para el control de nosemosis, se agrego la aplicación de jarabe a base de ácido oxálico. El periodo más crítico durante la realización del proyecto fue durante el invierno de 2007 en el cual las bajas temperaturas diezmaron la población de abejas y aumentaron la mortalidad de colmenas, por lo que se debió adquirir nuevas familias para poder cumplir con las actividades pendientes del proyecto.

Actualmente, el apiario cuenta con 79 colmenas, las que en general presentan buena condición sanitaria y nutricional.

4.2 Colecta de Varroa desde terreno.

Las colectas realizadas en colmenares productivos y comerciales permitieron contar con niveles de infestación de varroa necesarios para realizar los diferentes ensayos.

4.3 Mantención colonia de Varroa.

Las revisiones frecuentes y el reforzamiento de las colmenas permitieron mantener la crianza de varroa aunque, en algunos casos la población de ácaros aumentó a niveles críticos poniendo en riesgo la sobrevivencia de las colmenas.

4.4 Incremento de Varroa en colmenas de producción.

El trasvasije de panales desde colmenas infestadas permitió aumentar la población de ácaros a niveles críticos. El periodo de mayor crecimiento de la población de ácaros se produjo en primavera lo que puede estar asociado al aumento progresivo de la colonia de abejas. Es así, que al registrar la caída de ácaros por muerte natural durante un periodo de cuatro meses, se observo que niveles cercanos a un 14% de infestación significa una población mínima de Varroa de 4500 individuos. En la Figura 1 se observa un aumento en la caída de ácaros a partir de mediados de septiembre, lo cual coincide con los porcentajes de infestación obtenidos en igual fecha.

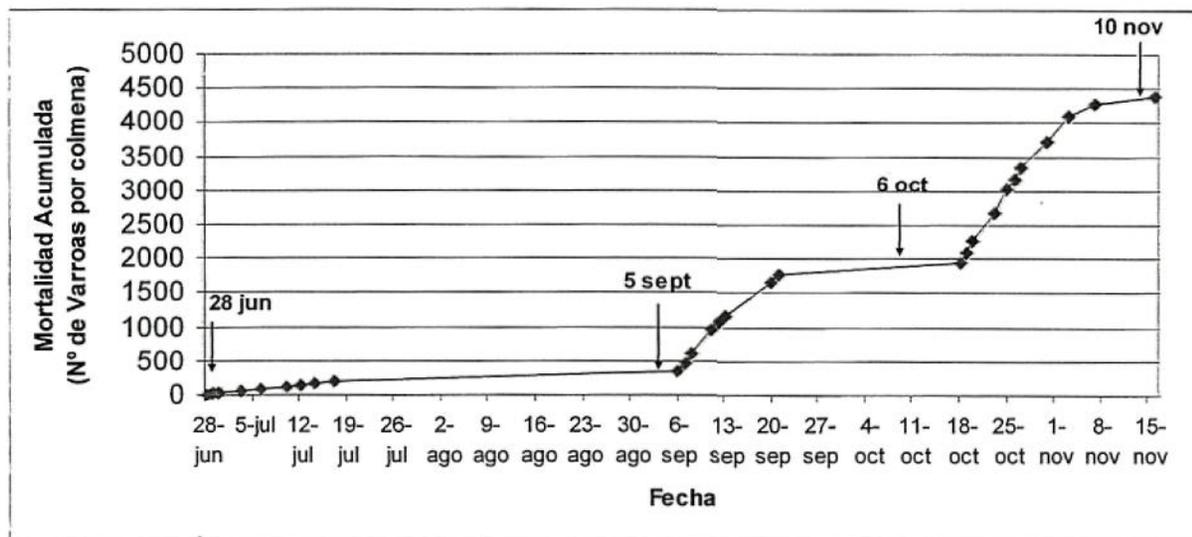


Figura 1. Mortalidad acumulada de ácaros a través del tiempo en colmenas infestadas por *Varroa destructor*. Las flechas indican fechas de muestreos para estimar el grado de infestación de *Varroa destructor* en abejas.

4.5 Evaluación de sobre vivencia de *Varroa* en laboratorio sobre diferentes substratos.

Se determinó que el mejor método de mantención de ácaros es utilizando pupas de zánganos en estado de "ojos blancos". Este material se obtiene retirando cuidadosamente las pupas y traspasándolas a tubos plásticos de 1mL previamente esterilizados y tapados con algodón hidrófilo. Las condiciones ambientales de incubación fueron en oscuridad y a temperatura ambiente de 25 a 30°C. Otro factor importante es la limpieza del material y de la sala de incubación a utilizar ya que, las pupas son muy susceptibles a enfermedades bacterianas y fungosas.

Este método permitió realizar los ensayos de patogenicidad para selección de aislamiento y estudios de concentración y tiempo letal.

4.6 Evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Beauveria* sobre adultos de varroa.

Se registró diferentes grados de mortalidad de ácaros con los aislamientos de *B. bassiana* pero estos no superaron el 30% de esporulación sobre los cadáveres ($P = 0,0034$) (Figura 2).

La capacidad de esporulación del hongo sobre su hospedero es fundamental para la diseminación de la enfermedad en condiciones de campo, esto permite reinfestaciones a partir de insectos parasitados.

Existen discrepancias con lo esperado: De acuerdo a esto y a los resultados obtenidos no se seleccionó ninguno de ellos para control del acaro.

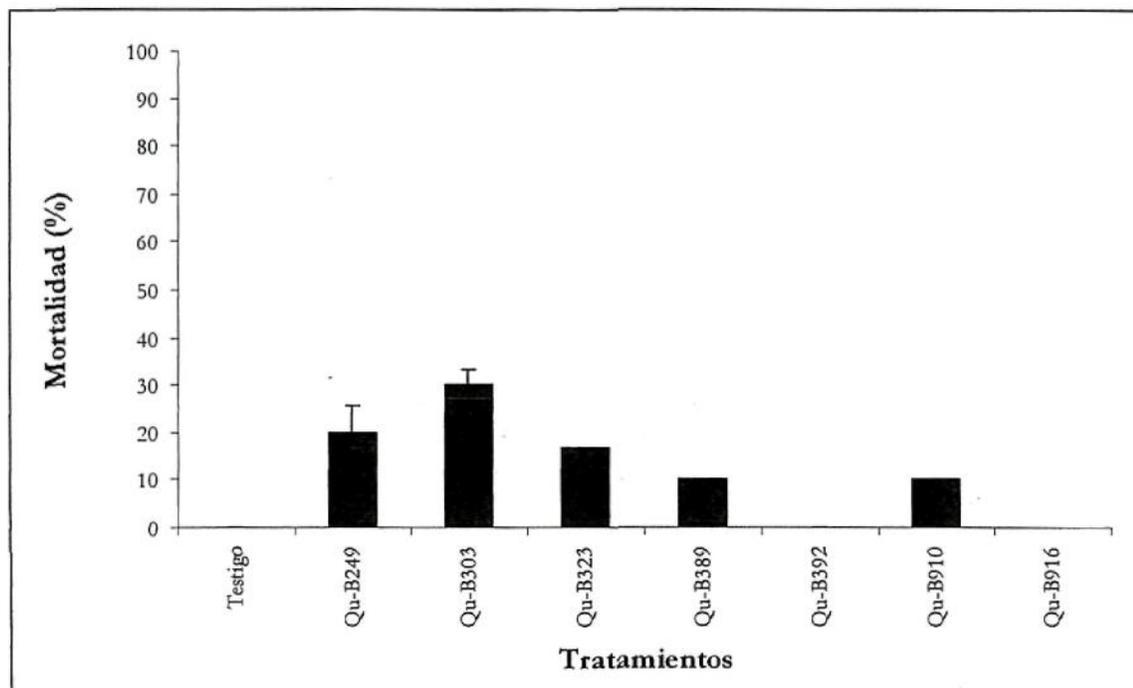


Figura 2. Mortalidad de *Varroa destructor* con diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* (Qu-B.).

4.7 Evaluación de patogenicidad de aislaciones de *Metarhizium* sobre adultos de varroa.

De los 53 aislamientos de *M. anisopliae*, 46 presentaron algún grado de mortalidad en adultos de varroa. Solamente los aislamientos Qu-M326, Qu-M436, Qu-M489a y Qu-M845 lograron los más altos porcentajes de esporulación (76, 77, 83 y 85% respectivamente), seguido de Qu-M597, Qu-M559, Qu-M608 y Qu-M532 con 73, 70, 66,7 y 62,5 % respectivamente ($P = 0,0033$) (Figura 3).

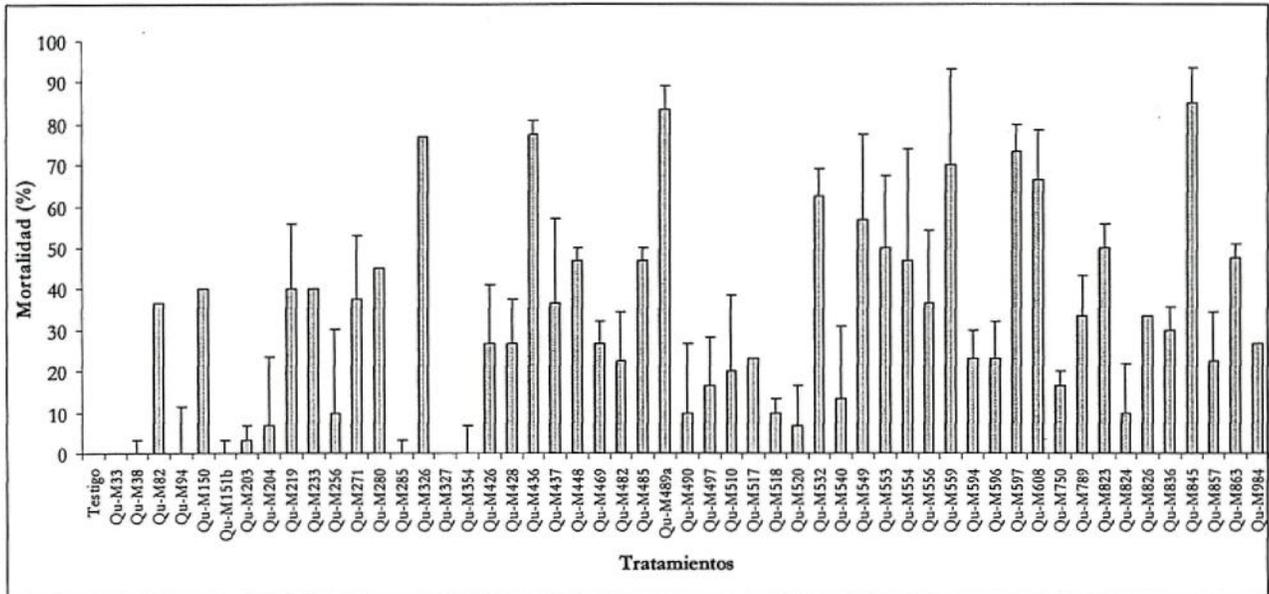


Figura 3. Mortalidad de *Varroa destructor* con diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Qu-M..).

Las diferencias en los grados de virulencia de cepas pertenecientes a una misma especie de hongo, se pueden deber a las variaciones genéticas dadas por la especialización hacia un determinado hospedero y por la distribución geográfica de las cepas (Alves, 1998 y Coates *et al.*, 2002). En este caso, los aislamientos utilizados provienen de muestras de suelo de diferentes orígenes geográficos y que fueron colectados utilizando *Galleria mellonella* L (Lepidoptera: Pyrellidae) como insecto cebo (Goettel e Inglis, 1997) (Cuadro 2).

También, se observó un periodo de mortalidad de ácaros de 4 a 7 días. Meikle *et al.*, (2006) reportó un tiempo de muerte de ácaros entre 5 a 10 días con *B. bassiana* y 4 a 7 días con *M. anisopliae*, utilizando la misma concentración de esporas empleadas en este estudio, mientras que Shaw *et al.* (2002) reportaron valores de 2 a 3 días usando una concentración de 10^8 conidias mL^{-1} y la inmersión de ácaros en esta suspensión como método de aplicación, lo cual puede producir una mayor efectividad del hongo.

Un aspecto importante observado en este estudio es que las pupas de los zánganos sobre los cuales se mantuvieron las varroas inoculadas con los aislamientos Qu-M326 y Qu-M436 manifestaron síntomas de enfermedad por *Metarhizium*, posiblemente por la transmisión de conidias desde las varroas enfermas. Debido a lo anterior y para evitar epizootias en las colmenas causadas por estos aislamientos su uso para pruebas posteriores fue descartado.

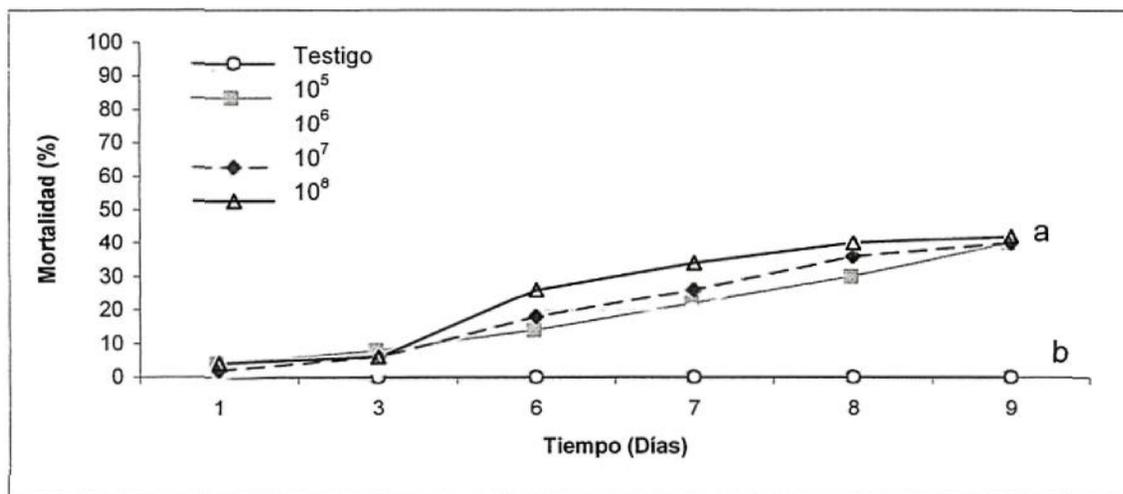
4.8 Evaluación de causas de muerte de varroa en cámaras húmedas.

Los ácaros muertos por los tratamientos con HEP se incubaron en cámaras húmedas y presentaron síntomas de micosis por el hongo inoculado, lo que quedó demostrado por la presencia de micelio y esporas entre las articulaciones de las patas y el

abdomen, el tratamiento control así como la mayoría de los individuos tratados con los diferentes aislamientos de ambas especies no presentaron sintomatología.

4.9 Estudio de dosis letal de aislamientos de *Metarhizium*.

El aislamiento Qu-M489 de *M. anisopliae* mostró el mayor porcentaje de mortalidad de varroas (42%) el día 8 post inoculación, con la concentración de 10^8 conidias mL^{-1} , este grado de mortalidad se mantuvo hasta el final del ensayo y su curva de mortalidad a través del tiempo no fue diferente ($P = 0,002$) a la producida a concentración de 10^5 , 10^6 y 10^7 conidias mL^{-1} , con la que se alcanzó un 40% de mortalidad. No se observó mortalidad del testigo por el hongo (Figura 4). De acuerdo a los resultados obtenidos y la baja mortalidad alcanzada por este aislamiento no se realizó el cálculo de CL50 y 90 por lo que su uso para ensayos de terreno queda descartado.



* Letras distintas al final de cada curva indican diferencias estadísticas entre el área de la curva del progreso de la mortalidad, de acuerdo al test de Tukey ($P \leq 0,05$).

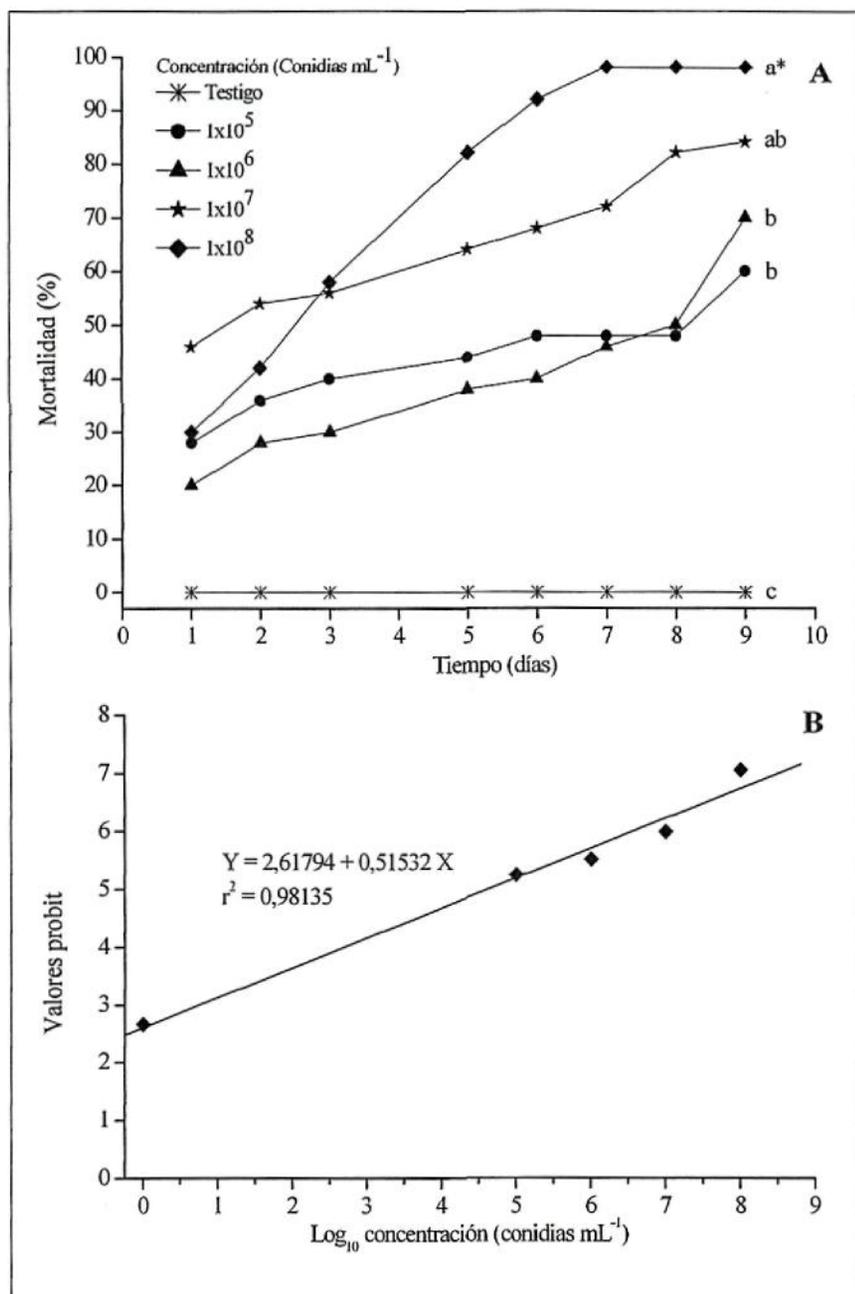
Figura 4. Mortalidad de *Varroa destructor*, inoculadas con distintas concentraciones del aislamiento Qu-M489 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

El aislamiento Qu-M845 en tanto, produjo un 98% de mortalidad de varroas el día 7 post inoculación, con la concentración de 10^8 conidias mL^{-1} . El tratamiento de 10^7 conidias mL^{-1} produjo un 72% de mortalidad, valor diferente al anterior ($p < 0,05$). Las concentraciones de 10^6 y 10^5 conidias mL^{-1} , fueron similares entre si con mortalidades de 46 y 48% de varroas, respectivamente ($p \leq 0,05$). (Figura 5a). A partir de la fórmula de la ecuación de la recta se obtuvo una CL50 y CL90, de $1 \times 10^{4,6}$ y $1 \times 10^{7,1}$ conidias mL^{-1} , respectivamente (Figura 5b).

Kanga *et al.* (2002) obtuvieron una CL90 para *V. destructor* de $1,37 \times 10^9$ conidias mL^{-1} de un aislamiento de *M. anisopliae* el día 7 post inoculación, la cual fue más alta que



la obtenida en este ensayo. Para otras especies de ácaros como *Tetranychus evansi*, Wekesa *et al.* (2005) señalan una concentración letal entre $0,7 \times 10^7$ y $2,3 \times 10^7$ conidias mL^{-1} para lograr el 50% de mortalidad con diversos aislamientos de *M. anisopliae*, valores que nuevamente son más altos que los encontrados en nuestros ensayos.



* Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al área bajo la curva ($P < 0,05$).

Figura 5. A) Mortalidad de *Varroa destructor* inoculada con diferentes concentraciones del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. B) Regresión Probit para la mortalidad de *V. destructor* inoculada con distintas concentraciones del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

4.10 Determinación tiempo letal con aislaciones de *Metarhizium*.

El tiempo letal para matar el 50% de la población (TL50) se calculó con la concentración de 1×10^7 , valor que correspondió al más cercano del cálculo de la CL90. Los resultados indicaron un TL50 de 1,72 días. Meikle *et al.* (2006) observaron un tiempo letal para varroa de 4 a 7 días utilizando una dosis de 10^7 conidias mL^{-1} de *M. anisopliae* con una técnica de inoculación y mantención de los ácaros similar a la descrita. Estos valores resultaron menores a los encontrados por otros autores. Chandler *et al.*, (2000), señalan que la muerte por hongos entomopatógenos ocurre generalmente en el plazo de tres a diez días después de la infección, la que es producida por pérdida de agua, privación de nutrientes, daño mecánico y acción de toxinas.

4.11 Crianza de abejas fuera de la colmena.

No se observó una mortalidad significativa de abejas mantenidas en estas condiciones por lo que los panales se pudieron mantener vivos por un periodo de 36 días. El problema más frecuente fue la aparición de nosemosis lo que causó diarreas y mortalidad de abejas en pequeñas cantidades.

También se observó un aumento en el tamaño de los panales de cera gracias al suministro de miel para la alimentación de las abejas.

Solo las crías sacadas de la colmena en estado de cría tapada completaron su desarrollo las más nuevas en tanto, murieron.

En los panales con reinas no fecundadas no se observó postura de huevos de zánganos. Las pequeñas colmenas se mantuvieron vivas logrando un periodo de sobrevivencia de 45 días alimentadas con miel y agua, mantenidas en oscuridad y con temperaturas de 25 a 30°C.

4.12 Evaluación de patogenicidad de aislaciones seleccionadas de *Metarhizium* sobre abejas.

Ensayo de laboratorio.

Para la mortalidad de los tratamientos a un mismo periodo de tiempo se utilizó el test de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia menor a 0,05 evaluados en tres periodos: día 4, 10 y 16 después de iniciado el ensayo. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro N°3.

Cuadro N°3. Porcentaje de mortalidad de los tratamientos a un mismo periodo de tiempo.

Tratamientos (conidias mL ⁻¹)	DIAS (% de Mortalidad)		
	4	10	16
0	0 b	0 d	0 d
10 ⁶	0 b	0 d	0,6 d
10 ⁷	0 b	2,8 c	3 c
10 ⁸	0 b	10,6 b	11,2 b
10 ⁹	3,2 a	32,2 a	34,4 a

De acuerdo al cuadro N°3, se puede observar que el porcentaje de mortalidad, se incrementa a través del tiempo y con el aumento de la concentración de conidias.

Desde el inicio del ensayo hasta el día 3, no se presentaron diferencias significativas entre la mortalidad producida por las distintas concentraciones.

A partir del 4^o día se observaron diferencias significativas de mortalidad entre el tratamiento de 10⁹ conidias mL⁻¹, y el resto de las concentraciones.

A partir del día 10, la mortalidad a concentraciones de 10⁸ y 10⁹ conidias mL⁻¹ son significativamente mayores que el resto de los tratamientos lo cual se mantiene hasta el día 16.

Los resultados obtenidos indican que a pesar de que se registró un 34% de mortalidad de abejas con una alta concentración del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*, en las condiciones del presente ensayo, esta puede ser considerada baja. En efecto, la mortalidad obtenida con los diferentes tratamientos fue reducida lo cual no permitió calcular la CL50 y CL90.

Por otro lado se debe destacar que las abejas evaluadas se encuentran aisladas de su ecosistema natural y de su población lo cual puede redundar en una condición de stress que a su vez favorece el desarrollo de patologías. En efecto, Coppa (2006), define a una colonia como una organización perfecta adaptada para cubrir todos los requerimientos que le permiten sobrevivir, producir reservas de alimento, reproducirse, conservar la especie y difundirse geográficamente, en donde cada miembro de la colonia realiza una actividad sumamente especializada. Formando parte de un sistema en donde cada elemento interactúa tan estrechamente unos con otros que resultan inter-dependiente.

Gliński y Buczed (2003), mencionan a la expulsión de las abejas muertas o enfermas de la colonia como factor de gran importancia para la mantención de la misma, lo que se conoce como comportamiento higiénico.

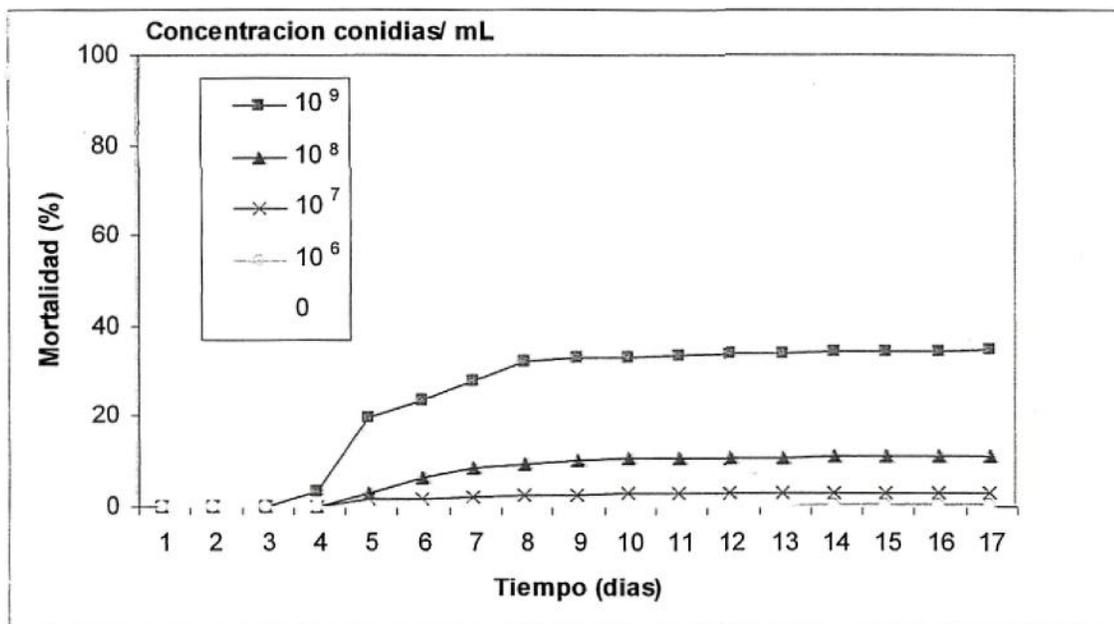


De igual forma, Pajuelo (2007), hace mención a los mecanismos de defensa de la colonia, los cuales se dividen en dos grandes grupos: mecanismos de resistencia de la abeja y mecanismo de resistencia de la colmena.

Los mecanismos de resistencia de la abeja se encuentran agrupados en barreras ya sea cuticulares, como es el caso del exoesqueleto, y barreras intestinales donde se destaca la membrana peritrófica, la cual recubre el canal alimentario desde la boca hasta el ano. Además de las barreras se encuentran las reacciones celulares y la defensa hemolinfática. En tanto que los mecanismos de la colmena se halla la correcta incubación de la cría y el comportamiento higiénico.

Mortalidad por tratamientos

La evaluación se hizo desde el día 1 al día 17, considerando las distintas concentraciones. Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:



*Letras distintas indican que existe diferencia estadística significativa según el test de Friedman ($P < 0.05$).

Figura 6. Mortalidad a través del tiempo de *Apis mellifera* tratadas con cinco concentraciones de *Metarhizium anisopliae*, aislamiento Qu-M845.

Del gráfico se desglosa que la mortalidad de abejas a través del tiempo para las distintas concentraciones evaluadas presentó diferencias estadísticas significativas.

Desde el inicio del ensayo hasta el día 3 no se observó mortalidad en la totalidad de los tratamientos. Sin embargo, a contar del 4° día se presentó mortalidad en el tratamiento 10^9 conidias mL^{-1} , no obstante, el mayor porcentaje se produjo entre los días 8 y 9, para luego continuar con un aumento diario de 0,2% aproximadamente hasta el final del ensayo.

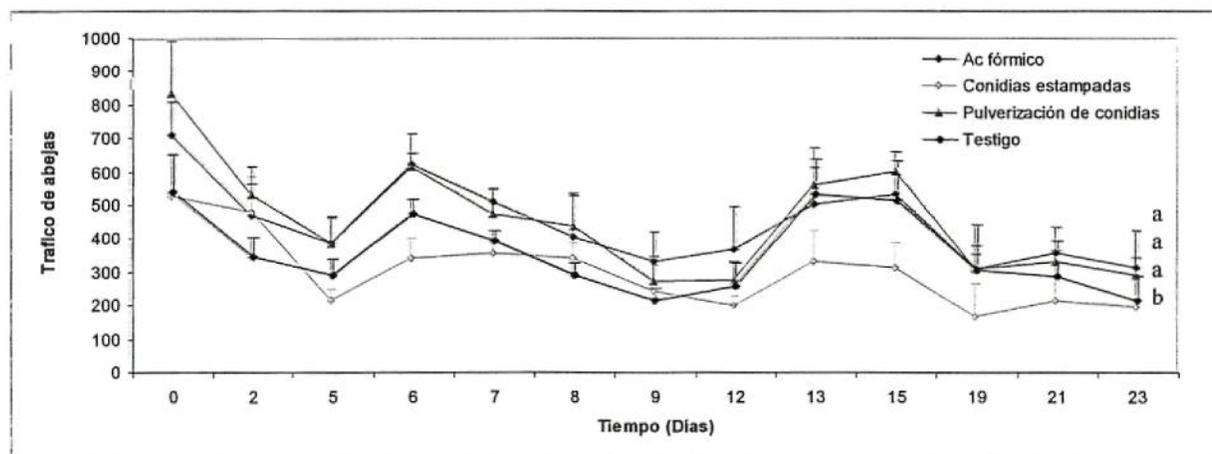
A partir de estos resultados se puede afirmar que el aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae* no produce mortalidad significativa de abejas a concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 conidias mL^{-1} ($P < 0.01$), pero si a concentración de 10^9 conidias mL^{-1} . Sin embargo, se debe considerar que estos resultados pueden estar influenciados por la vía de administración del hongo la cual fue por ingestión y por las condiciones en las que permanecieron las abejas.

Ensayo de terreno.

Efecto del Método de aplicación

Al comparar los datos obtenidos se aprecia que no hay diferencia significativa en la actividad de pecoreo entre los tratamientos testigo, ácido fórmico y pulverización de conidias los cuales además fueron diferentes estadísticamente a la actividad registrada en las colmenas tratadas con la aplicación de hongo por medio de tiras de papel engomado con goma arábica (Figura 7).

Se puede observar que este tratamiento presentó menor tráfico de abejas desde y hacia la colmena lo cual puede explicarse por que al encontrar un agente extraño, en este caso papeles con conidias, las abejas dedicaron los primeros días a la eliminación de estos desde el interior, lo que disminuyó el tiempo dedicado para otras actividades, como limpieza, cuidado de larvas, producción de cera, fabricación de celdillas, pecoreo, etc. Al pasar el tiempo se observó restos de papeles entre los cuadros móviles y en el piso de la colmena sin la presencia de conidias sobre ellos lo que indica la limpieza del material ejercida por las abejas.



*Letras distintas en la columna indican diferencia estadística significativa. Prueba de LSD ($P < 0.005$).

Figura 7. Trafico de abejas en la piquera de colmenas tratadas con ácido fórmico y diferentes métodos de aplicación de conidias del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae*.

Al final del periodo de evaluación se observa una reducción en el tráfico de abejas en todos los tratamientos lo cual puede explicarse por una disminución de la temperatura ambiental.

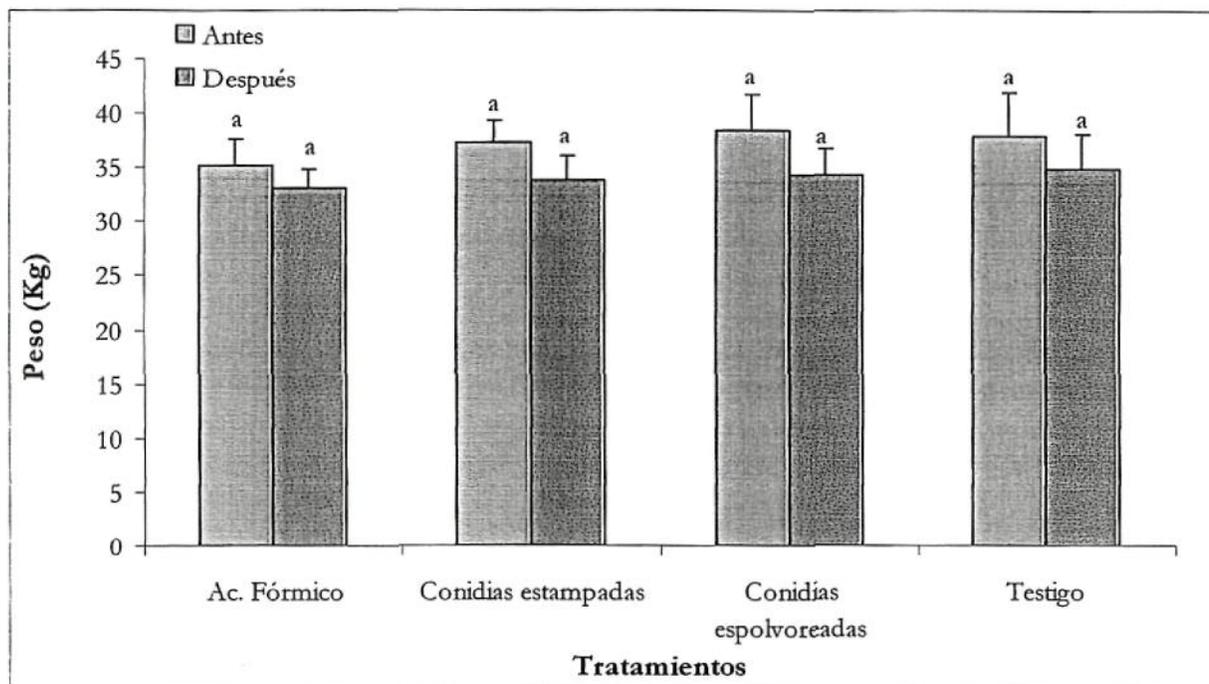


En efecto, el comportamiento de las abejas está regulado por factores de clima, particularmente por la temperatura. A temperatura inferior a 10°C, los músculos de las alas quedan inactivos y el vuelo es imposible. Cuando la temperatura exterior sube, la abeja se muestra activa y empieza a volar. A temperaturas que exceden de 15°C hay una actividad considerable en la colmena, a 30°C comienza la puesta de huevos y a 35°C se activa la construcción de panales y la secreción de cera.

Las abejas mismas regulan la temperatura interna de la colmena pero, el ascenso y descenso de su multiplicación así como la actividad de pecoreo sigue paralelamente los cambios de las temperaturas en la temporada.

En ensayos resientes, se ha evaluado el impacto que tiene la aplicación de *Beauveria bassiana* en el desarrollo y salud de la colmena (Meikle *et al*, 2008) y sostienen que no han encontrado efectos negativos, considerando crecimientos moderados en la población de la colonia, peso de abejas adultas, superficie de celdas operculadas y la sobrevivencia de la colonia. Lo que coincide con Kanga *et al*, (2005), que indica que los tratamientos con esporas de *Metarhizium anisopliae* no daña el crecimiento de las crías ni a las abejas jóvenes y tampoco impide el desarrollo de la colonia ni el tamaño de la población.

En este estudio se observa que no hay diferencias en el peso de las colmenas con los diferentes tratamientos antes y después de realizado el ensayo (Figura 8). Al final de la evaluación se aprecia una reducción en el peso de todas las colmenas, lo cual puede estar asociado a la disminución de flora melífera y a la utilización de reservas nutricionales de la colonia.



*Letras distintas en la columna indican diferencia estadística significativa. Prueba de Duncan ($P < 0.005$).

Figura 8. Peso de colmenas antes y después de tratadas con diferentes métodos de aplicación del aislamiento Qu-M845 y ácido fórmico.

4.13 Incubación de abejas muertas en cámara húmeda.

En los diferentes ensayos se considero como mortalidad de abejas solo la producida por hongo y que es manifestada por la esporulación sobre los cadáveres. Los resultados se presentan de acuerdo a los estudios realizados en cada actividad.

4.14 Establecimiento de apiario para ensayo y aplicación de *Metarhizium* en colmenas.

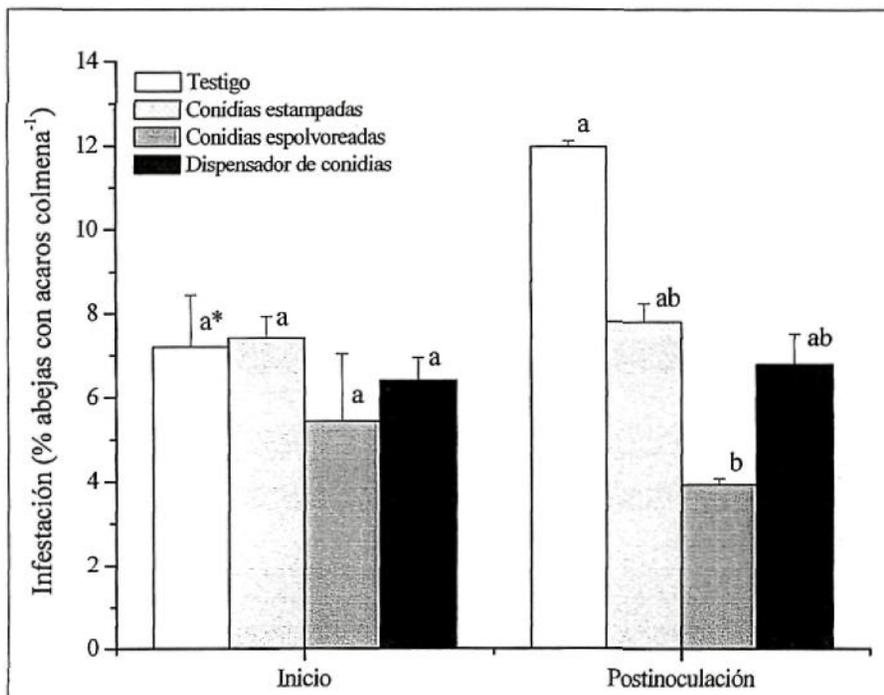
Evaluación de métodos de aplicación

Después de las aplicaciones, los tratamientos con hongos presentaron una infestación de *V. destructor* significativamente diferente y menor en comparación con el testigo, El tratamiento de espolvoreo de conidias sobre los panales presentó una disminución de 67% en el porcentaje de abejas infestadas, en relación a la población de los ácaros en el testigo (Figura 9). Respecto a la variación de las poblaciones (P_f/P_i), el testigo aumentó en 2,4 veces la población inicial, los tratamientos conidias estampadas y dispensadores de conidias mantuvieron una relación cercana a 1, lo que indica que al menos la población de varroa no creció. Por último, el tratamiento de espolvoreo de conidias disminuyó en 0,21 veces la población inicial de varroa.



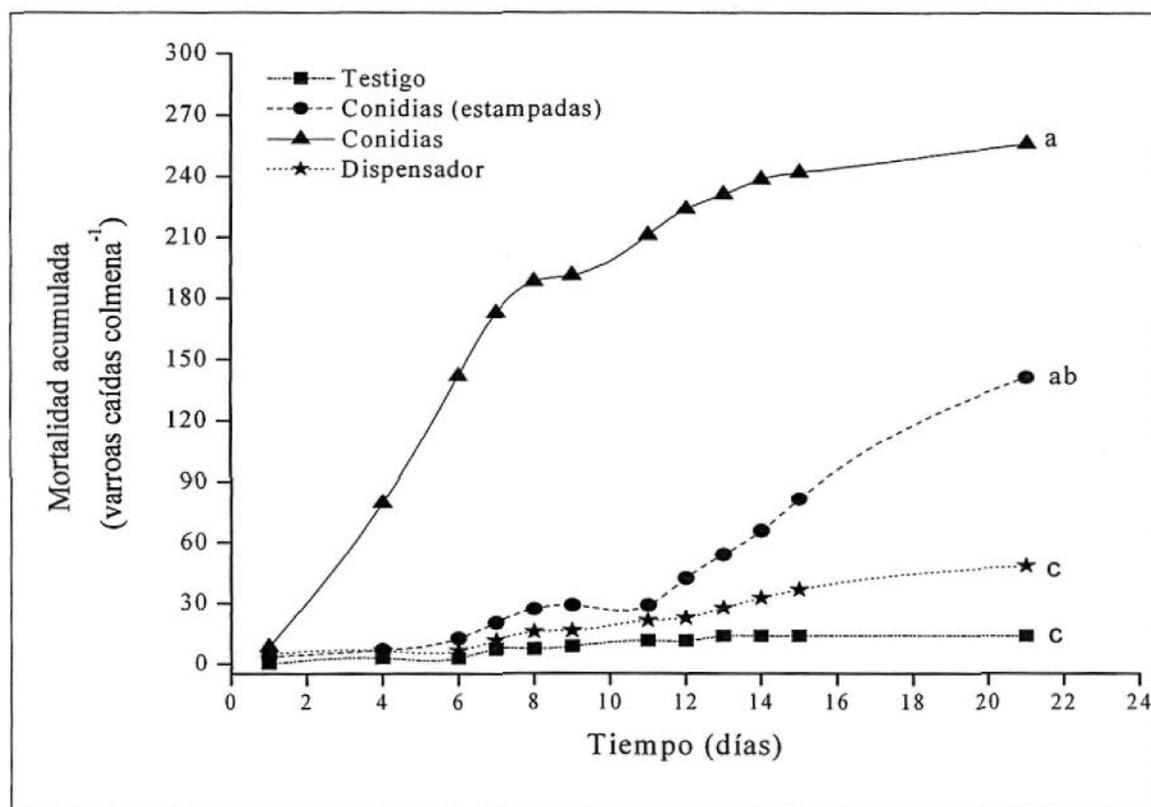
La mortalidad acumulada de ácaros durante este período mostró resultados similares al aplicar las conidias en forma directa sobre y entre los panales y las conidias adheridas en papel filtro, pero fueron estadísticamente diferentes a los resultados obtenidos con los otros tratamientos ($p= 0,0093$) (Figura 10). A pesar de estos resultados, no se obtuvo un nivel de infestación igual o inferior al 3%, que es el recomendado como tolerable dentro de la colmena (Neira *et al.*, 2004), sin embargo estos resultados fueron obtenidos a los 21 días, con lo que se podría esperar que sigan bajando a medida que el inóculo de *Metarhizium* logre multiplicarse en las varroas muertas.

Kanga *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares al evaluar tiras plásticas revestidas con esporas de *M. anisopliae* para controlar *V. destructor* en colonias de abejas en otoño.



* Letras distintas para cada período indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 9. Nivel de infestación por *Varroa destructor* en colmenas antes y después de ser tratadas con el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.



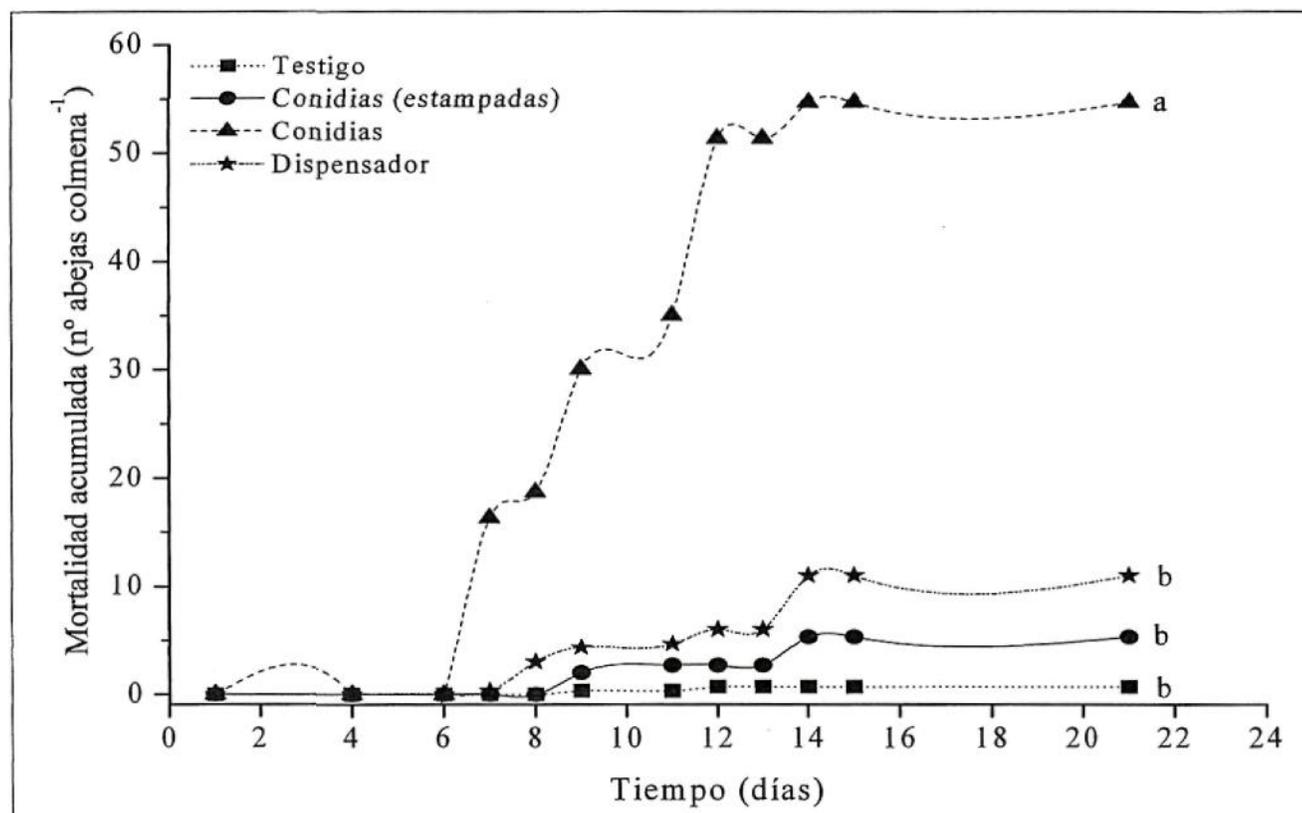
* Letras distintas indican diferencias significativas según el área bajo la curva ($P \leq 0,05$)

Figura 10. Mortalidad acumulada de *Varroa destructor* a través del tiempo diferentes métodos de aplicación del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Al evaluar la mortalidad acumulada de abejas para cada tratamiento, se observaron diferencias en la caída de abejas a través del tiempo, las colmenas en las cuales se aplicaron conidias sobre y entre los panales tuvieron mayor mortalidad de abejas que el resto de los tratamientos; los que además fueron similares ($p < 0,05$) a las colmenas testigo (Figura 11). De un total de 154 abejas muertas en las colmenas tratadas con conidias espolvoreadas sobre los panales un 35% mostró micosis. Si bien existen reportes de que *M. anisopliae* puede infectar *A. mellifera* en ensayos de laboratorio, hasta el momento no se ha reportado causando epizootias entre las abejas (Chandler *et al.*, 2001).

En las colmenas testigo en promedio se registraron 71 abejas muertas, pero sólo un 1,5% presentó parasitismo por *Metarhizium*. Lo anterior puede ser explicado por el transporte por viento de conidias al momento de la aplicación, por zánganos que pueden llevar la conidia de una colmena a otra o por la deriva de abejas entre las colmenas (Kanga *et al.*, 2003) y también por la cercanía entre los tratamientos. En efecto, Meikle *et al.* (2007) encontraron que el porcentaje de varroas infectadas con *B. bassiana* también se incrementó en el control, sugiriendo un movimiento de conidias probablemente por la deriva de abejas. Kanga *et al.* (2003) indican que las conidias

pueden ser fácilmente aplicadas en un apiario, un factor que puede ser beneficioso para los apicultores. De acuerdo a esto y a los resultados obtenidos, se concluye que el método más efectivo de aplicación es la pulverización de conidias sobre los panales.



* Letras distintas indican diferencias significativas según el área bajo la curva ($P \leq 0,5$).

Figura 11. Mortalidad acumulada de abejas a través del tiempo con diferentes métodos de aplicación del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Evaluación de primavera

Al evaluar el efecto del hongo sobre las colmenas en primavera, se observaron diferencias significativas entre las colmenas tratadas con el aislamiento Qu-M845 y las colmenas testigo (Figura 12). La curva de mortalidad de ácaros a través del tiempo se ajustaron a una sigmoidea para ambas fechas de evaluación, En las dos fechas las colmenas tratadas con hongos produjeron una mayor caída de ácaros ($p < 0,05$) para primera y segunda fecha de observación). (Figura 12 A y B).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Meikle *et al.* (2007), quienes observaron un incremento en el porcentaje de ácaros infectados en colmenas tratadas con un aislamiento de *B. bassiana*.

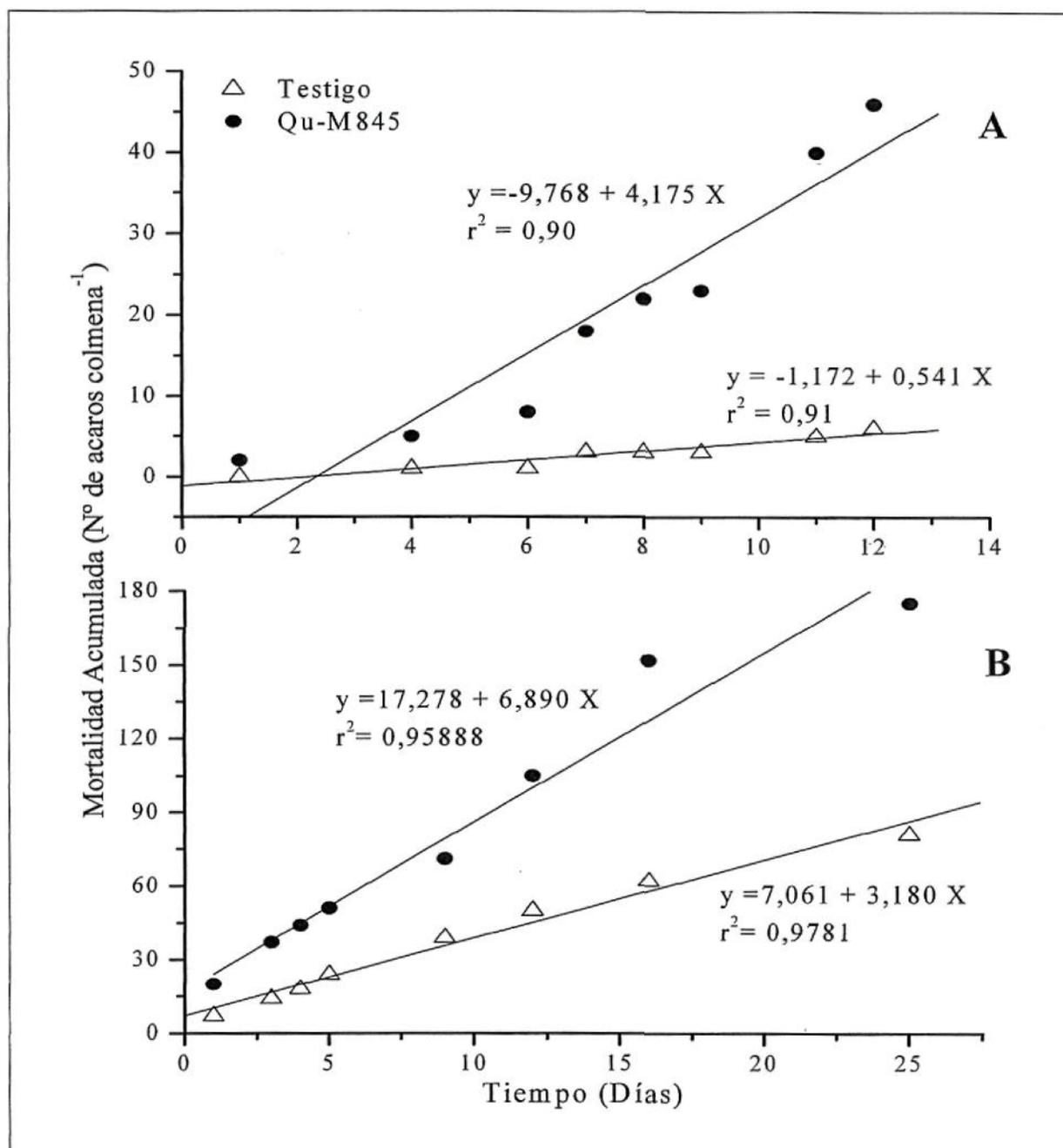


Figura 12. Mortalidad acumulada de *Varroa destructor* a través del tiempo en colmenas tratadas con el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. A) Aplicado el 5, 8, 12 y 16 de septiembre. B) Aplicado el 19, 23, 27 y 31 de octubre.

No se observaron diferencias significativas en la mortalidad de abejas entre los tratamientos para ambas fechas de aplicación (septiembre y octubre) ($P \leq 0,05$). Tampoco se observaron síntomas de micosis en las abejas colectadas, descartando mortalidad por hongo (Figura 13).

La carencia de toxicidad de *M. anisopliae* para otros animales, incluidos los mamíferos, además de los resultados obtenidos, indica que esta especie es una alternativa promisoriosa para el control biológico de varroa.

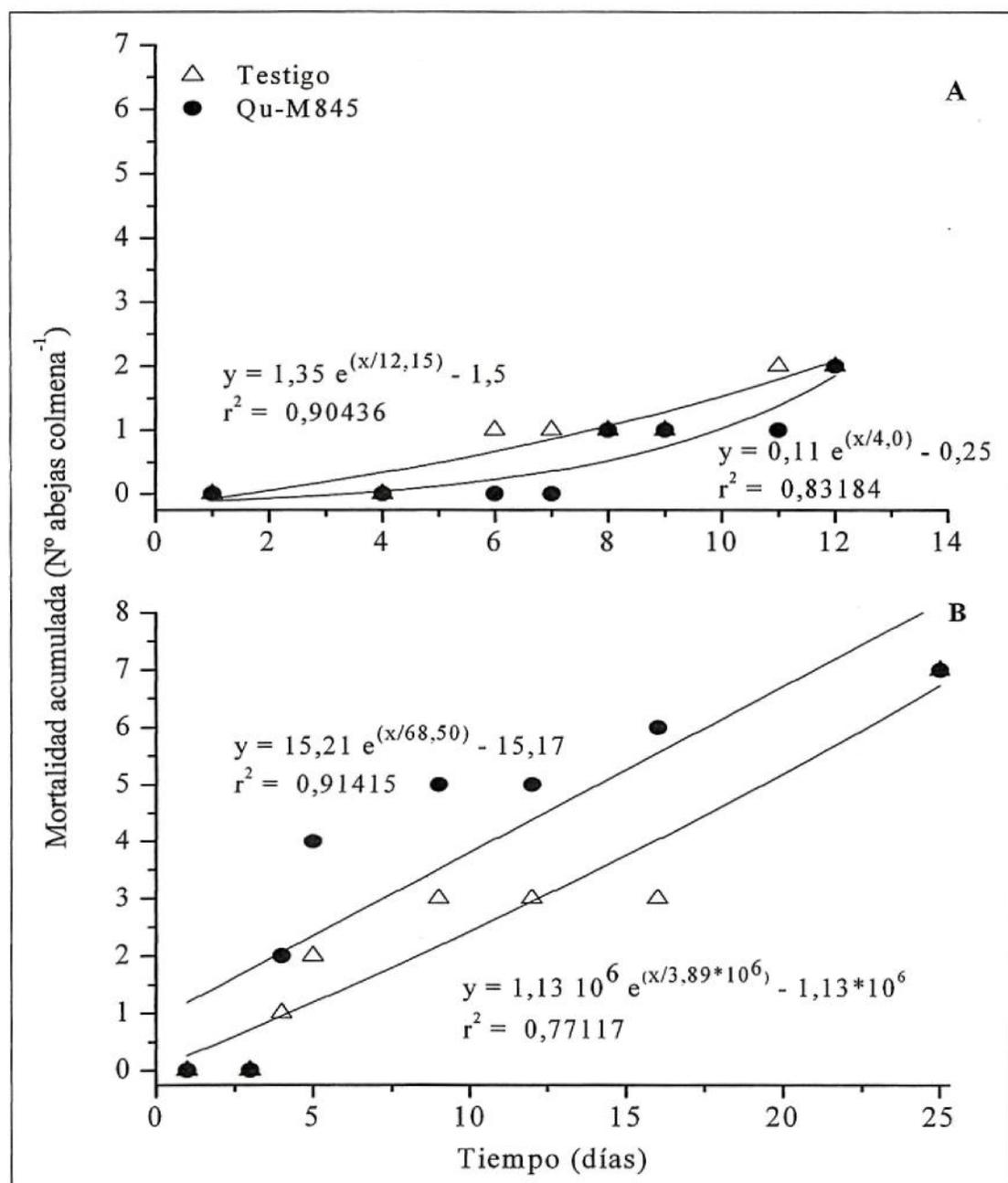


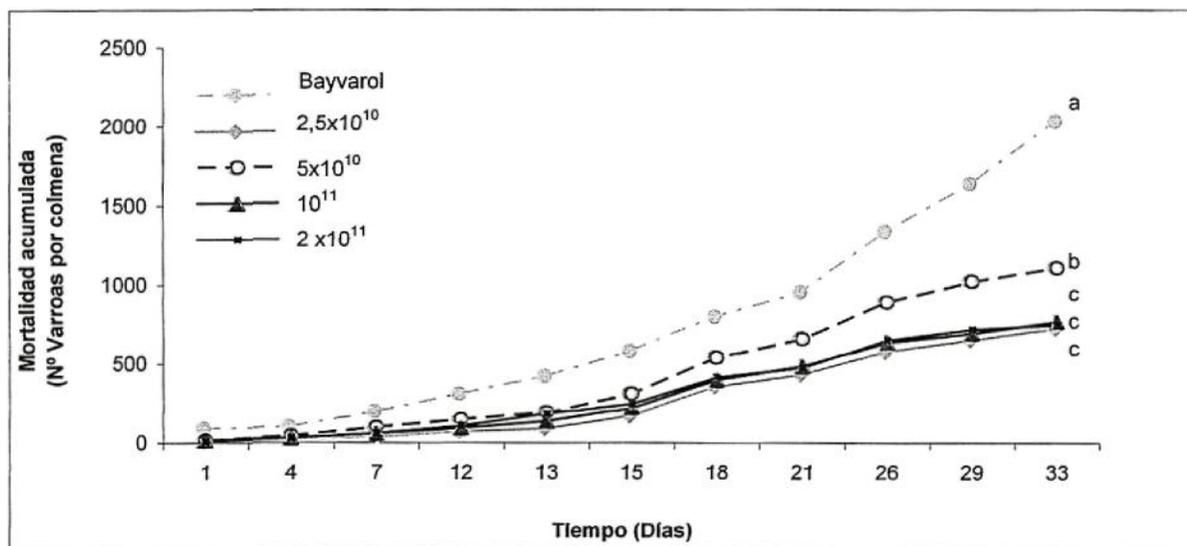
Figura 13. Mortalidad acumulada de abejas a través del tiempo en colmenas tratadas con el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. A) Aplicado el 5, 8, 12 y 16 de septiembre. B) Aplicado el 19, 23, 27 y 31 de octubre.

4.15 Prueba de pulverizaciones en polvo en panales.

1. Estudio en terreno de dosis del aislamiento Qu-M845.

Al evaluar la mortalidad acumulada de *Varroa* para cada tratamiento, se observaron diferencias en la caída de ácaros obtenida en las colmenas tratadas con Bayvarol® y en las tratadas con conidias sobre y entre los panales, entre las cuales además, se registro diferencias estadísticas entre la dosis de 5×10^{10} conidias por colmena y el resto de los tratamientos ($P = 0.0093$) (Figura 14).

El tiempo de evaluación de este ensayo abarcó 33 días, periodo en el cual se observó un 54% más de mortalidad acumulada de ácaros con el tratamiento Bayvarol® que con la dosis de 5×10^{10} conidias por colmena. Al mismo tiempo, en este tratamiento (5×10^{10} conidias por colmena), se registró un 29% más de caída de ácaros que con la dosis de 10^{11} conidias por colmena, lo cual indica que no hay un aumento proporcional con respecto a la dosis.

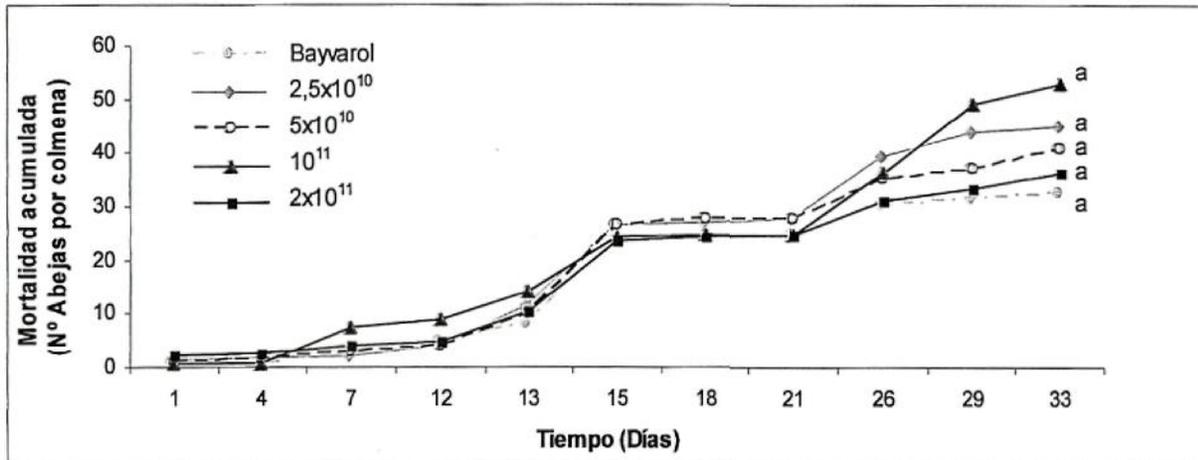


*Letras distintas muestran diferencias estadísticas según prueba t de Student ($P \leq 0.05$).

Figura 14. Mortalidad acumulada de *Varroa destructor* durante 33 días, en colmenas tratadas con el acaricida químico Bayvarol® y tratadas con diferentes dosis del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*.

Al evaluar la mortalidad de abejas no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0,05$). Sin embargo, se observó que a dosis superiores a 5×10^{10} conidias por colmena se produce una reducción de los nidos de cría y en algunos casos abandono de la colmena, síntomas similares a los producidos con la aplicación de ácidos orgánicos.

A pesar de lo anterior, no se detectó síntomas de micosis en las crías o en las abejas colectadas descartando con ello, la mortalidad por hongo (Figura 15).



*Letras distintas muestran diferencias estadísticas según prueba t de Student ($P \leq 0.05$).

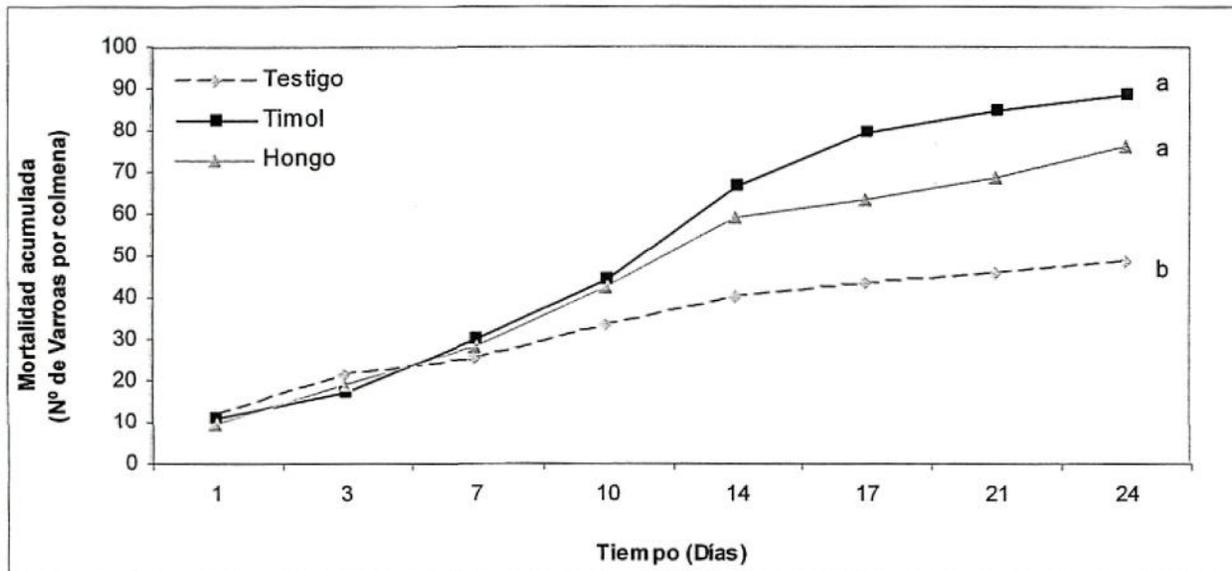
Figura 15. Mortalidad acumulada de *Apis mellifera* durante 33 días, en colmenas tratadas con el acaricida químico Bayvarol® y tratadas con diferentes dosis del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*.

De acuerdo a los resultados, se puede considerar que aplicaciones de alta concentración de conidias en un periodo posterior a la cosecha de miel producen perturbación en las actividades de la colonia y abandono del nido.

2. Aplicación de verano.

Se observó diferencias estadísticas entre las colmenas testigo y aquellas tratadas con Timol puro y con el aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae*, entre las cuales no hubo diferencias ($P < 0.05$). Ambos tratamientos presentaron un 46 y 35% respectivamente, más de caída de ácaros que en el testigo.

Al evaluar el nivel de infestación de cada tratamiento, se observó una disminución en las colmenas tratadas con hongo y Timol en tanto, que aquellas no tratadas presentaron un aumento del 50%.

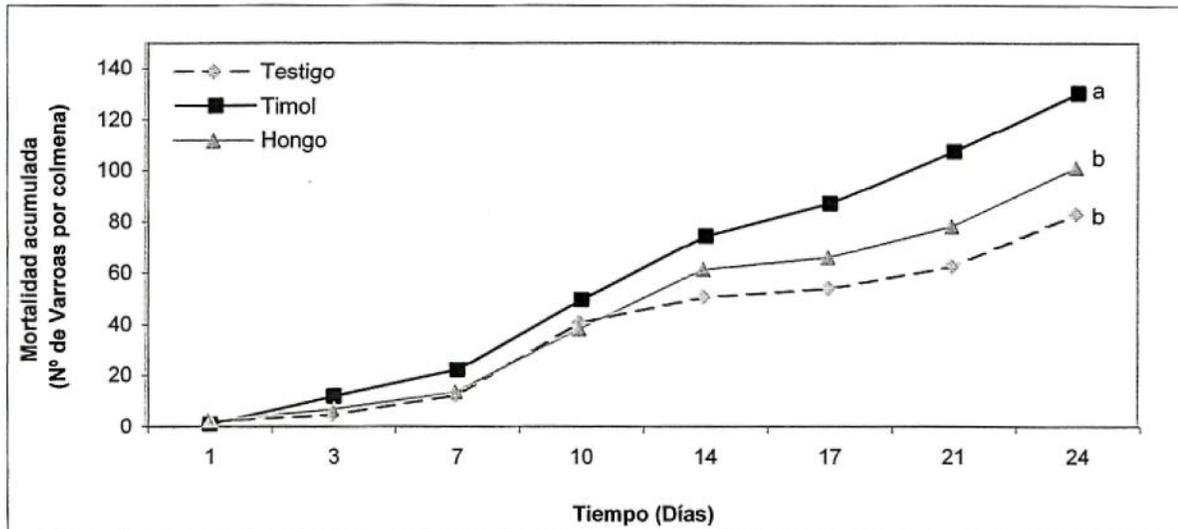


* Letras distintas indican diferencias significativas según prueba protegida de Fisher ($P \leq 0,05$)

Figura 16. Mortalidad acumulada de *V. destructor* a través del tiempo con la aplicación del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Al evaluar la mortalidad acumulada de abejas para cada tratamiento, se observaron diferencias en la caída de abejas obtenida en las colmenas en las cuales se aplicó Timol y en las tratadas con conidias, la cual además fue similar estadísticamente a las colmenas testigo (Figura 17). Un total de 101 abejas muertas obtenidas en las colmenas tratadas con conidias fueron examinadas para detectar mortalidad por hongo pero, no se registró micosis.

La mortalidad observada se puede explicar por utilización de la malla metálica lo que hace que muchas abejas queden atrapadas en el piso de la colmena.



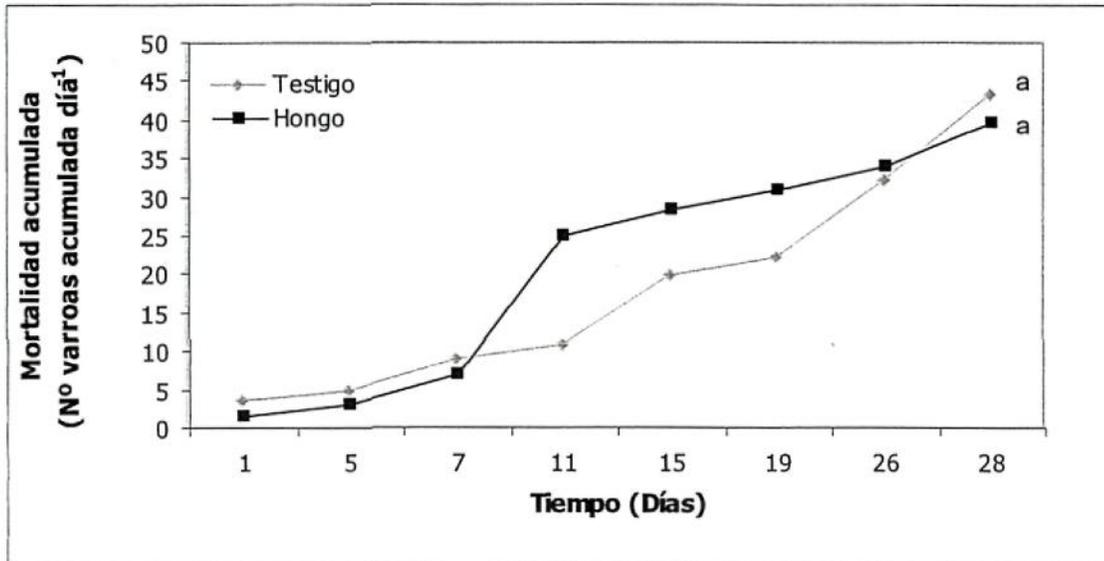
* Letras distintas indican diferencias significativas según prueba protegida de Fisher ($P \leq 0,05$)

Figura 17. Mortalidad acumulada de abejas a través del tiempo con la aplicación del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

4.16 Prueba de trampas de esporas en el piso y entre marcos.

1. Estudio Dispensador (Piquera).

Se observó un aumento en la caída de ácaros en colmenas tratadas con conidias aplicadas a través del dispensador. Este aumento se produjo a partir del día siete y se mantuvo hasta el día 26 pos aplicación. Sin embargo, no se detectó diferencias estadísticas en la mortalidad acumulada a través del tiempo entre los dos tratamientos ($p < 0,05$).



* Letras distintas indican diferencias significativas según prueba protegida de Fisher ($P \leq 0,05$)

Figura 18. Mortalidad acumulada de *Varroa destructor* a través del tiempo en colmenas tratadas con dispensador de conidias del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Al evaluar la infestación un mes después, se observa un aumento de 3% en la infestación por Varroa en las colmenas sin tratar en tanto, que las colmenas en las cuales se aplicó el dispensador de conidias mantuvieron su nivel inicial de infestación que fue de 0,74%.

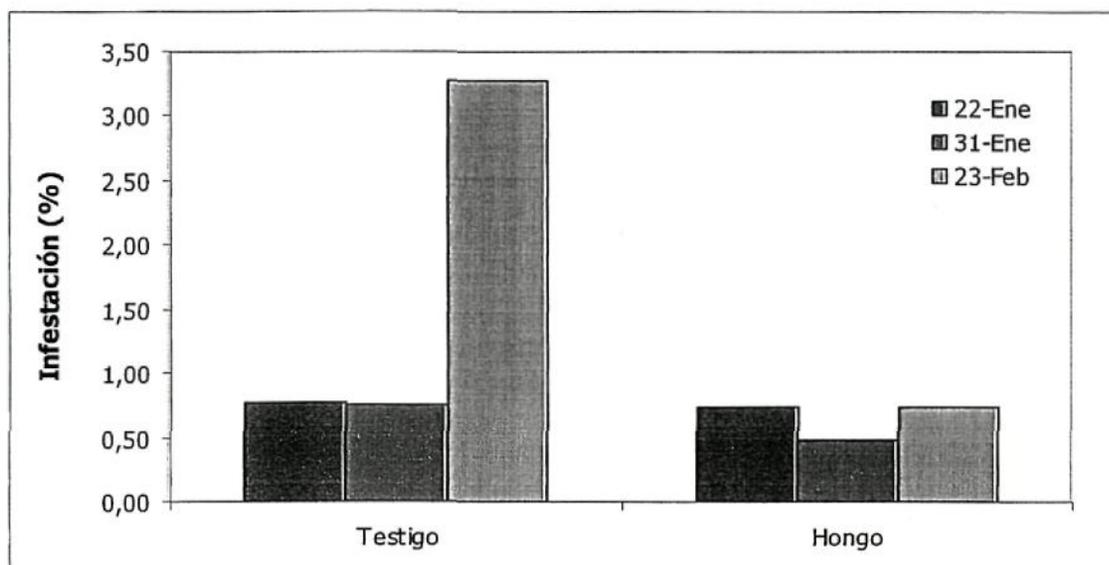
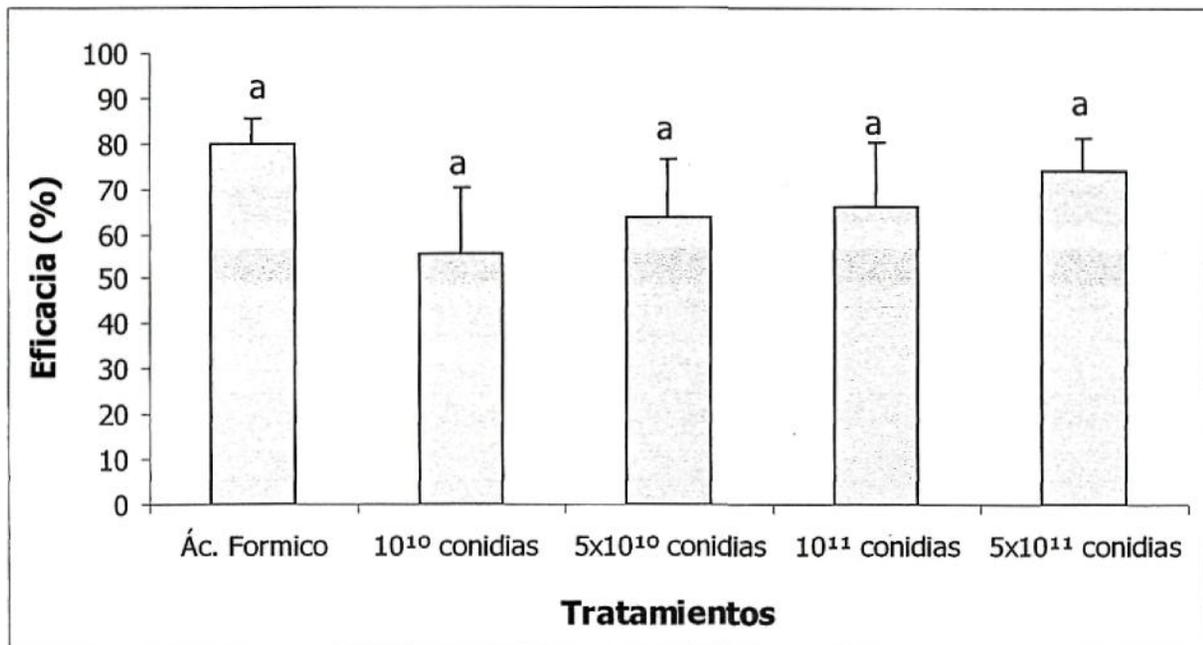


Figura 19. Infestación inicial y final de colmenas tratadas con dispensador de conidias del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

2. Ensayo Aplicación de tiras de papel con conidias estampadas.

Los porcentajes de eficacia entre los distintos tratamientos variaron desde 55,61% con el tratamiento de 10^{10} conidias por colmena hasta 79,72% con ácido fórmico. A pesar de lo anterior, no se detectaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Figura 20). Sin embargo, al examinar los niveles de infestación inicial y final, los resultados muestran diferencias entre ellos y una evidente disminución en la infestación en las colmenas tratadas con ácido fórmico y con 5×10^{11} conidias por colmena los cuales presentaron una infestación final de 3,3 y 2,8 % respectivamente (Figura 21).

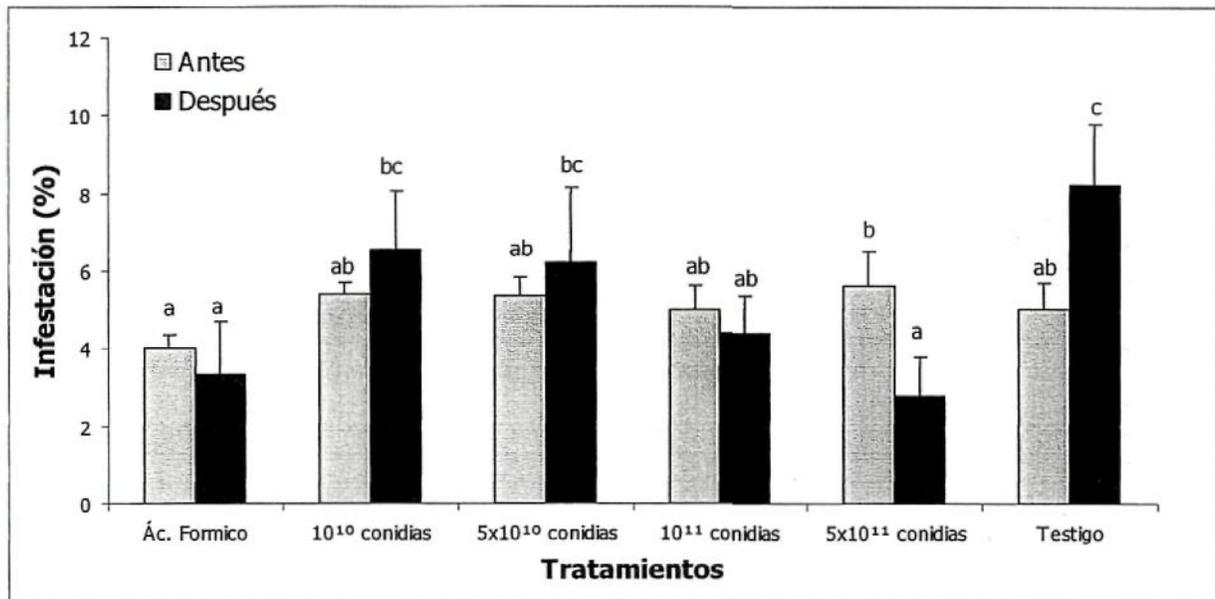
También, se puede observar que la infestación final de las colmenas tratadas con concentraciones 10^{10} y 5×10^{10} fueron comparativamente mayores con respecto a la infestación inicial, comportándose de la misma forma que el testigo, en el cual la infestación aumento en promedio a un 8%.



*Letras distintas en la columna indican diferencia estadística significativa. Prueba de Duncan ($P < 0.005$).

Figura 20. Eficacia en el control de *Varroa destructor* de diferentes concentraciones del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae*.

Ácaros muertos promedio por tratamientos aplicados y corregidos según Henderson y Tilton.



*Letras distintas en la columna indican diferencia estadística significativa entre tratamientos. Prueba de LSD ($P < 0.005$).

Figura 21. Comparación de los porcentajes de los niveles de la diferencia entre infestación inicial y final entre cada uno de los tratamientos.

4.17 Aplicación de suspensión de esporas.

No se observó mortalidad significativa de ácaros con las diferentes concentraciones de conidias aplicadas sobre las abejas, siendo los resultados similares a los encontrados en el testigo. Una de los factores que quizás podrían explicar estos resultados es que la baja cantidad de agua utilizada produjo una mala distribución de inóculo al interior de la colmena y por ende un control poco efectivo, además el agua escurre rápidamente en los panales. En ensayos previos se había utilizado un mayor volumen de agua (200 mL) pero esto produjo exceso de humedad en la colmena y perturbación en las abejas.

Debido a lo anterior por el momento se descarta la aplicación de conidias por esta vía.

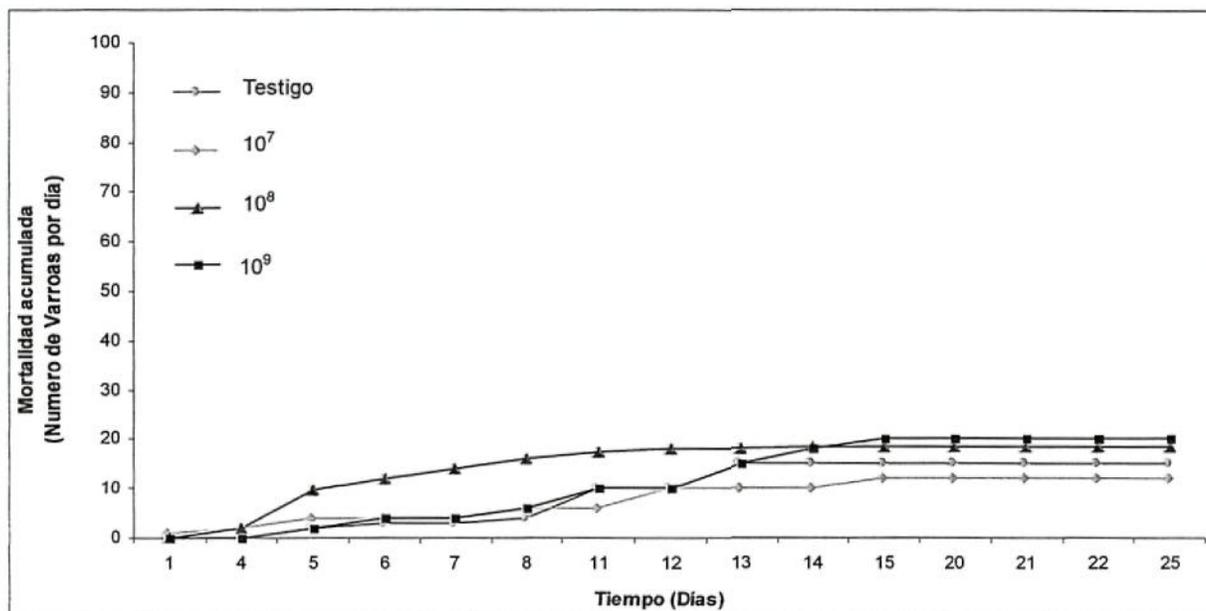


Figura 22. Mortalidad acumulada de *Varroa destructor* a través del tiempo en colmenas tratadas con distintas concentraciones de conidias del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

4.18 Evaluación de viabilidad de esporas en abejas.

Para esta evaluación se utilizaron muestras de abejas colectadas desde colmenas pulverizadas con una dosis de 5×10^{10} conidias. No se detectó esporas al evaluar el número de conidias sobre el cuerpo de las abejas a partir del día 1 después de tratadas.

Al estudiar el desarrollo de colonias en medio de cultivo de suspensiones obtenidas a partir del lavado de las abejas, no se observó presencia de colonias de *Metarhizium* pero, si de bacterias.

Estos resultados pueden ser explicados si se considera que la conducta higiénica de las abejas produce una eliminación rápida del inoculo. De acuerdo a lo anterior, es importante destacar que una baja persistencia de las conidias en el ambiente redundara, en aplicaciones más seguidas del producto para lograr un control eficaz.

4.19 Evaluación de residuos de esporas en la miel.

La aplicación de una dosis de 5×10^{10} conidias por colmena, mediante espolvoreo, realizada el 1º y 16 de septiembre y el 16 y 31 de octubre produjo una concentración de 6250 conidias de *Metarhizium* por kilo de miel (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de conidias del aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae* en miel colectada desde colmenas tratadas.

Repetición	Conidias Kg ⁻¹ de miel
1	7500
2	7500
3	7500
4	2500
5	6250
Promedio	6250

Sin embargo, al evaluar las unidades formadoras de colonia sobre agar Saboroud, no se detectó germinación o desarrollo de colonias de *Metarhizium*.

En tanto que si se apreció crecimiento de levaduras y hongos sobre el medio (Foto 13).

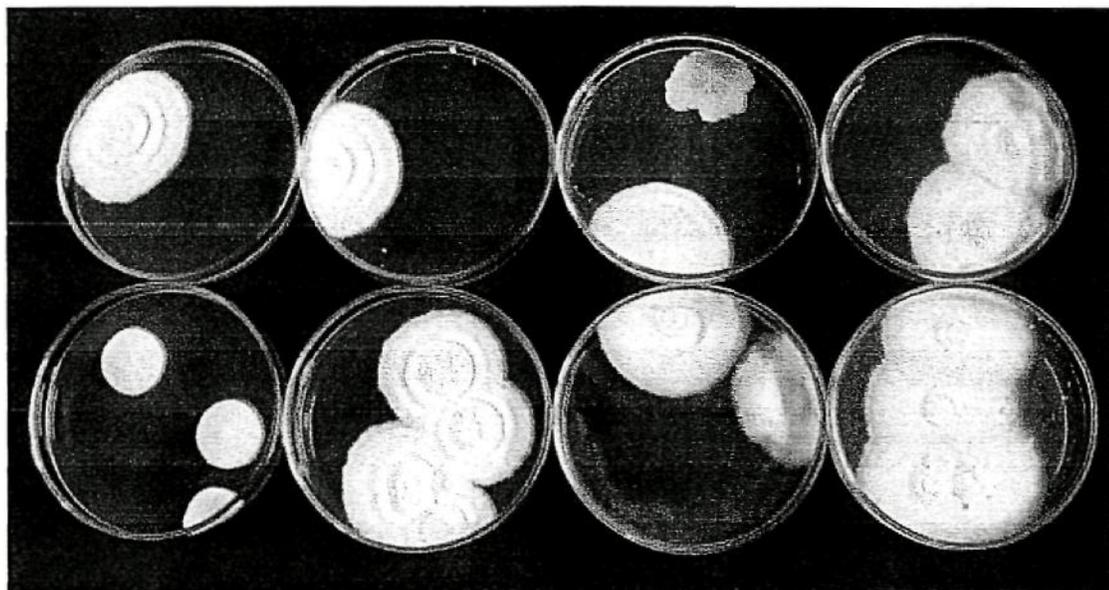


Foto 13. Cultivo de solución de miel cosechada desde colmenas tratadas con el aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae*.

Los resultados de las muestras de miel enviadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UACH, señalan la ausencia de colonias de *Metarhizium* lo que indicaría una rápida eliminación de inóculo desde la colmena, por lo que se descarta contaminación del producto por el hongo aplicado.

4.20 Desarrollo Protocolo de Producción Bioacaricida.

Se realizó un a capacitación para la producción de hongos entomopatógenos a la empresa BIOGRAM.

4.21 Día de campo y Capacitación para el uso del bioacaricida.

En ambas actividades participaron un total de 60 apicultores quienes se mostraron muy interesados en los resultados obtenidos del proyecto y fueron efectivamente capacitados en la aplicación del hongo.

Además se realizó un taller de producción de microorganismos en dependencias del Centro de producción masiva de hongos entomopatógenos de INIA Quilamapu al cual asistieron 21 personas entre profesionales, y agricultores.

Cuadro comparativo de los resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.

Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Resultado Esperado	Resultado Final
1	Aislamientos de Beauveria, mas patogénicos a Varroa	Nº de aislamientos	3	0
1	Aislamientos de Metarhizium mas patogénicos a Varroa	Nº de aislamientos	3	4
1	Dosis letal de aislamientos mas patogénicos a Varroa	Nº de conidias/mL	N/A	N/A
1	Tiempo letal de aislamientos mas patogénicos a Varroa	Días	N/A	N/A
2	Aislamientos inocuos a abejas	Mortalidad de abejas	<5%	0%
3	Formulación bioacaricida	Nº de Formulaciones	2	3
3	Dosis optima de aplicación de HEP sobre las colmenas	Nº de conidias/colmena	N/A	5 X 10 ¹⁰
3	Momento de aplicación del biopesticida en la temporada	% de infestación de abejas con Varroa	1%	Variable por estación (0,4 - 4%)
3	Aplicaciones en la temporada	Nº aplicaciones	N/A	3
3	Nivel de Control de Varroa dentro de la colmena	% de Reducción de la población	>95%	75%
3	Reinfestación natural de Varroa dentro de la colmena	% de ácaros parasitados	N/A	N/A
3	Calidad de la miel	Esporas/gramo de miel	0	0
4	Desarrollo de protocolo de producción bioacaricida MIP AGRO	Escalamiento MIP AGRO	N/A	Escalamiento BIOGRAM
4	Capacitación a apicultores para el uso del biopesticida	Nº de apicultores	N/A	N/A
4	Día de campo	Nº de actividades	1	1



4	Boletín Técnico	Nº de boletines	1	1
4	Informe final	Nº de Informes	1	1

Razones que explican las discrepancias entre los resultados esperados y los obtenidos.

Resultado (Obj 1) Nº de Aislamientos de Beauveria (3), mas patogénicos a Varroa: No se detectaron aislamientos de Beauveria resistentes a altas temperaturas y que además fueran patogénicos a Varroa.

Resultado (Obj. 3) Nivel de Control de Varroa dentro de la colmena (>95%): Nivel de control fue dependiente de la población inicial de Varroa y del momento de aplicación. Además se debe considerar que el hongo no actúa sobre las varroas que están dentro de las celdillas operculadas.

Resultado (Obj. 4) Boletín Técnico: Se adjunta el boletín enviado a revisión y aprobación por FIA.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:



Ficha Técnica: Para la comercialización del producto, se tiene preparada la siguiente ficha técnica, la cual está disponible para ser utilizada por la empresa que se haga responsable de la masificación de la tecnología, o por inia en los estadios temprano de producción y apertura de mercados (Figura N° 22).

Ficha Técnica del Producto

Composición

5×10^{10} conidias del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*.

Contraindicaciones

Producto no compatible con la mayoría de los fungicidas químicos.

Efectos colaterales

En aplicaciones invernales o con alto nivel de infestación por varroa puede producir estrés en abejas y despoblamiento de la colmena.

Instrucciones

Aplicar a inicios de primavera y repetir en octubre y diciembre. No tocar el producto con las manos, y manipularlo donde no existan corrientes de aire que liberen las conidias. Igualmente, para no dañar el producto y para que éste no reduzca su efectividad, no debe permanecer expuesto al sol ni al calor, ya sea en su traslado o en el momento de la aplicación.

Modo de empleo

Espolvorear una dosis de 5×10^{10} conidias por colmena sobre y entre los panales de las abejas tratando de cubrir toda la población. Para asegurar el control se recomienda usar piso trampa y determinar infestación antes y después del tratamiento.

Tiempo de carencia

No tiene

Residualidad

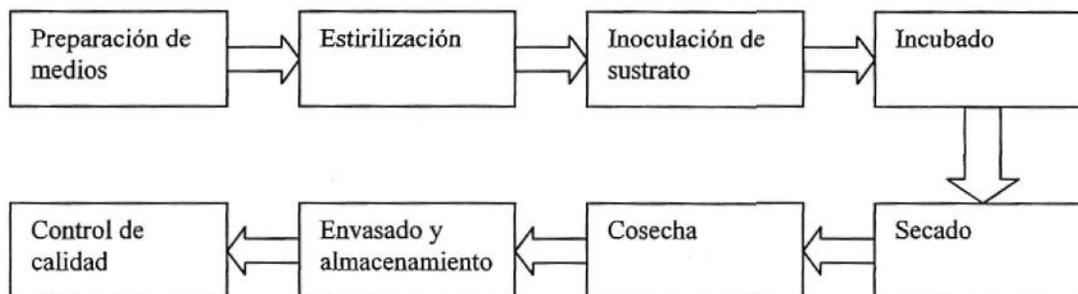
No tiene

Recomendaciones

Almacenar el producto a temperaturas de 5 a 10°C y en oscuridad.
Realizar monitoreos constante de las colmenas.
Realizar 3 aplicaciones



La tecnología desarrollada hace referencia al aislamiento de hongos entomopatógeno nativo, para lo cual, los costos de producción están en base a la siguiente figura:



Siguiendo con este análisis se puede estructurar las necesidades de equipos en base a la etapa productiva que se analice, lo que se muestra en el cuadro N° 5:

Cuadro N° 5.

Etapa	Equipamiento necesario
Preparación de medio	Destilador de agua
	Balanza
	Microondas
	Agitador vortex
	pH metro
Esterilización	Autoclaves
	Campana de extracción
Inoculación	Camara de flujo laminar
Sala de incubación	Sistema de calefacción
	Shaker incubator
Sala de secado	Calefactor
	Deshumedecedor
Cosecha	Maquina cosechadora
	Campana de extracción
Envasado y almacenamiento	Balanza
	Selladora al vacio
	Refrigerador
Control de Calidad	Termobalanza
	Microscopio
	Lupa
	Balanza

Para la operación, también se trabajo en la configuración de los costos de recursos humanos, cuyo equipo ideal de producción sería un profesional, un técnico y tres operarios. Así como también se trabajo en los costos operativos de la producción, los

cuales son mayoritariamente destinados a sustrato para cultivo de hongos (50% del costo operacional por dosis), y otros insumos menores para la etapa de incubación (25%), el resto de los costos de energía, aseo, esterilización y otros representan el 25% restante.

Sobre los costos totales por dosis por aplicación, incluyendo la depreciación de los equipos antes nombrados y las instalaciones requeridas (aproximadamente 120 m² (con base de depreciación de 10 años) nos da un costo de producción de \$1.600 por dosis envasada y lista para comercializar.

Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.

Para determinar el valor del mercado, es necesario considerar la presencia de sustitutos en el mismo, teniendo productos como Bayvarol, cuya caja compuesta de 4 sobres permite atacar 2 cajones afectados por sobre, teniendo que su mercado potencial es de 57 mil dosis, con un valor total de mercado de MM\$228 (valor por caja de aproximadamente \$4.000). En el caso del Amitraz, su aplicación se basa en tiras por colmena, la cual tiene un costo por unidad de aproximadamente (\$1.500), lo que daría un mercado MM\$681

Considerando los costos actuales de producción de una dosis de hongos para aplicación en suelo, y siguiendo las mismas condiciones para producir la cepa que será utilizada para el control de varroa, se tendría un costo aproximado de producción (para los 4 grs. Necesarios) de \$1.600 más los gastos de distribución y venta, que ascienden a un 15% y la utilidad esperada de un 20% sobre el total de los costos, el precio de mercado al cual podemos aspirar es de \$2.200

Sobre el mercado real al cual apuntaría este producto, se espera atender preferentemente a los exportadores de miel, específicamente a los inscritos en Ramex, lo cuales representan a 192 mil colmenas. Considerando una penetración de mercado a tasas de un 10%, iniciando en un 5% del mercado y con un crecimiento del precio y de los empresarios en RAMEX de un 10%, se tiene el siguiente cuadro que nos da el mercado esperado para este desarrollo.



Año	Nº de colmenas	Precio de Venta	Nº de aplicaciones	% de mercado a atender	Mercado esperado (MM\$)	Utilidad Neta (MM\$)
1	192.249	2200	3	5%	63,44	12,69
2	211.474	2420	3	6%	92,12	18,42
3	232.621	2662	3	7%	133,76	26,75
4	255.883	2928	3	9%	194,21	38,84
5	281.472	3221	3	10%	282,00	56,40
6	309.619	3543	3	12%	409,46	81,89
7	340.581	3897	3	15%	594,54	118,91
8	374.639	4287	3	18%	863,27	172,65

Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.

Las exportaciones totales de miel de Chile en el año 2008 alcanzaron 10.336 toneladas, avaluadas en US\$29,8 millones, lo que representa un crecimiento del 133% en valor y un 41,3% en volumen respecto del 2007. El precio unitario alcanzado el 2008 (US\$2,88 por kilo es el mayor valor promedio anual de los últimos diez años.

En general, las exportaciones se han comportado con un énfasis al crecimiento durante los últimos años. Dentro de este contexto, la industria se maneja en base 10.523 explotaciones, distribuidas entre las regiones de Tarapacá y Aysén, estas cuentan con un total de 454.489 colmenas (INE 2008), del total de explotaciones el 42,3% esta inscrito en el registro de exportadores Ramex. Dentro de las enfermedades o plagas asociadas a la producción melífera, la varroosis es la mayor limitante para la apicultura mundial. Esta enfermedad, producida por el ácaro *Varroa destructor* (Anderson y Trueman, 2000), anualmente causa enormes pérdidas en la producción apícola. En los casos más severos se produce el colapso total de las colonias en tan solo dos semanas. *V. destructor* se alimenta de abejas tanto en estado de larva como adulto, suprimiendo su sistema inmune, facilitando con esto el accionar de otros patógenos (Britt, 2005). Kozak y Currie (2005) indican que niveles de infestación de varroa sobre abejas adultas en tasas tan bajas como un 2% (2 ácaros por 100 abejas) reducen la producción de miel entre un 40 y 50%.

De ahí la importancia del desarrollar alternativas que, primeramente, permitan controlar el efecto del ácaro sobre la colonia, y además sean viables de utilizar para no generar efectos sobre la exportación, como lo es el uso de químicos, los cuales dejan trazas dentro de los productos y son un factor limitante relevante a la hora de ingresar



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

a mercados, principalmente en los que Chile compite (Alemania, EEUU, Suiza y Francia).



Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (según corresponda a la naturaleza del proyecto).

Referente a las estrategias de marketing para el producto, estas no se realizarán por parte de INIA, sino que por parte de las empresa que sea la receptora de la tecnología (el Centro Tecnológico de Control Biológico – CTCB lo estipula en las cláusulas para las transferencias tecnológicas realizadas).

6. Impactos y Logros del Proyecto:

- Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.

Impactos presupuestados	Impactos efectivos
<p>Económico</p> <p>La fundamental desventaja de Chile frente a los principales países productores de miel del mundo, Argentina y China, es la falta de volumen para la exportación. El impacto económico mas importante del proyecto será por tanto, el mejoramiento de los rendimientos de miel, ya que se estará eliminando una plaga que incide directamente sobre la producción, lo que redundara en un aumento de la oferta para los países importadores de este producto.</p> <p>A lo anterior se anexa la obtención de miel libre de residuos químicos, competitivamente superior y de mayor aceptación en países exigentes en cuanto a uso de pesticidas lo que abrirá nuevas oportunidades de comercialización para que los propios apicultores desarrollen nuevos mercados.</p> <p>El producto final (bioacaricida) podrá ser también una alternativa de control de varroa en colmenas para la producción de miel orgánica, cuyo</p>	<p>Económico</p> <p>Se ha desarrollado un controlador biológico del acaro Varroa, cuya efectividad es comparable e inclusive superior a la de algunos productos comerciales en base química.</p> <p>Respecto del aumento en la productividad de las colmenas, estas en el sentido estricto no aumenta por la aplicación del HEP para controlar varroa, puesto que existían otros productos comerciales con tasas similares de control, sin embargo, el valor agregado, que potencialmente diferenciaría el producto final, está en el uso de un controlador biológico nativo para una plaga que incide fuertemente en la productividad y el uso de este controlador hace que se pueda optar por nuevos mercados para los productos finales de la colmena.</p>



<p>valor es superior a la miel tradicional. Por ultimo, la elaboración de un acaricida biológico para el control de la Varroa destructor puede dar derecho a patentes y pagos de propiedad intelectual en caso de exportar el producto.</p>	
<p>Social</p> <p>La apicultura es una actividad familiar por lo que el cambio que producirá la implementación del proyecto en la calidad sanitaria y por ende productiva de las colmenas tendrá un efecto en la rentabilidad del negocio lo que beneficiara a cientos de familias campesinas.</p> <p>Por otra parte, el mejoramiento sanitario de las colmenas incrementara la actividad polinizadora de Apis mellifera en los principales cultivos frutales chilenos, con una alta proporción de la producción atribuible a la abeja de miel: 90% en almendros y manzanos; 81% en cerezo, kiwi y palto; y un 55% de participación en la producción de ciruelo japonés, frambuesa y peral. Por lo tanto, la sanidad de las colonias destinadas a la polinización asegurara una parte de la producción frutícola que representa una fuente importante de ingresos al país en los rubros mencionados.</p> <p>Finalmente el uso de un bioacaricida no implica riesgos de contaminación accidental o envenenamiento de los usuarios por manipulación. Principalmente en el caso de productores con menor nivel de conocimiento o los operarios que finalmente manipulan los pesticidas.</p>	<p>Social</p> <p>Se logro un producto no contaminante por efecto de su aplicación a la colmena y que reduce los riesgos de rechazo en envíos, así como agrega valor para el ingreso a nuevos mercados.</p> <p>Para incrementar la actividad polinizadora de las abejas, se logró un desarrollo que mejora su estatus sanitario, así como un nuevo aparato (piquera) que al ser adosado a la colmena y en su correcto uso permite, además de incrementar la actividad polinizadora, ser un transportador de controladores biológicos para las flores que visita la abeja.</p>



<p>Otro</p> <p>Legal: El desarrollo un bioacaricida para el control de Varroa puede ser sujeto de patente o registro. La especificación y aclaración de los alcances de este aspecto será una actividad complementaria de recopilación de información y antecedentes a desarrollar en la primeras etapas del desarrollo del proyecto.</p>	<p>Otros</p> <p>Como consecuencia de los resultados del proyecto, se ha encontrado una cepa patogénica de hongo entomopatígeno para varroa, dicho producto en su estado actual para la comercialización no es factible de ser patentado (solo en condición de espora), pero si en posibles formulados que se pueden desarrollar bajo la estructura del Centro Tecnológico de Control Biológico.</p> <p>Otro producto que se derivo de este proyecto es la construcción de una piquera bidireccional para la aplicación de enemigos naturales que afectan las colmenas. Dicho producto esta en fase interna de INIA para su patentamiento y comercialización.</p>



Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	No	No	
Producción (<i>por producto</i>)	Si	Si	Se logró desarrollar un producto en condición comercial para el control de varroa.
Costos de producción	No	No	
Ventas y/o Ingresos			
<i>Nacional</i>	Sin	Sin	
<i>Internacional</i>	sin	Sin	
Convenios comerciales	sin	sin	

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	No	No	
Nuevos empleos generados	No		
Productores o unidades de negocio replicadas	1	1	Se puede iniciar la producción del Hongo controlador en la planta piloto del CTCB, para que sea replicada por empresas comerciales dispuestas a adquirir la licencia de producción y cepa del HEP controlador de varroa.



Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	2	-	-	A consecuencia del proyecto se encontró la cepa patogénica de varroa destructor, así como se logro establecer un nuevo diseño de piquera bidireccional potencialmente protegible por patente o resguardo de diseño industrial según INAPI.
Proceso	-	-	-	-
Servicio	-	-	-	-

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes	0	
Solicitudes de patente	0	
Intención de patentar	2	<ul style="list-style-type: none"> ○ Se ha presentado a la instancia interna de INIA, la propuesta de patente de la piquera bidireccional desarrollada a partir del año 2003 y perfeccionada durante la ejecución del proyecto, para la aplicación de enemigos naturales y otros desde y hacia la colmena. Aún en discusión interna el borrador propuesto. ○ Se ha pensando en trabajar en un formulado de conidias estampadas para el uso del HEP en condiciones ambientales adversas.
Secreto industrial	0	
Resultado no patentable	0	
Resultado interés público	0	

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica		
Generación nuevos proyectos	4	Implementación de una unidad de prestación de servicios tecnológicos para el aumento de la competitividad de la industria apícola en la Región del Bio Bio. CONVOCATORIA DE PROYECTOS DE EQUIPAMIENTO TECNOLÓGICO PARA INSTITUCIONES REGIÓN DEL BIO BIO, 2008.



	<p>Aprobado.</p> <p>Proyecto "Nodo De Difusión Y Transferencia En Sanidad Y Calidad Apícola Región Del Bío Bío" aprobado por Innova Chile 2009.</p> <p>Desarrollo de un sistema de aplicación masiva de esporas del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> para el control de varroa en colmenares comerciales. CONSORCIO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO APÍCOLA, AÑO 2009. En concurso.</p> <p>Estudio colaborativo Franco-Chileno sobre los efectos de la interacción de los parásitos y los pesticidas en las poblaciones de abejas <i>Apis mellifera</i>. INTERCAMBIO REGULAR ECOS-CONICYT 2009. En concurso.</p>
--	--



Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones	5	<p>Rodríguez, M., M. Gerding y A. France. (Aceptada). Selección de hongos entomopatógenos por crecimiento a altas temperaturas como potenciales controladores de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Varroidae). Chilean Journal of Agricultural Research código: AT 7-126</p> <p>Rodríguez, M., M. Gerding, A. France y R. Ceballos. (peer review). Uso de hongos entomopatógenos para el control de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Varroidae). Chilean Journal of Agricultural Research código AT 7-127.</p> <p>Rodríguez, M. y M. Gerding. 2005. Control Biológico de <i>Varroa destructor</i> con Hongos Entomopatógenos. Tierra Adentro 65:20.</p> <p>Rodríguez, M. y M. Gerding. 2006. Formación y Manejo de un Apiario Moderno. Serie Cartillas Divulgativas Proyecto CADEPA N°12. INIA-Quilamapu.</p> <p>Rodríguez, M. y M. Gerding. 2008. Control Biológico de <i>Varroa destructor</i> con Hongos Entomopatógenos. Informativo Agropecuario BIOLECHE – INIA QUILAMAPU: Año 21, N°1.</p>
<i>(Por Ranking)</i>		
Eventos de divulgación científica	12	<ol style="list-style-type: none">1) Rodríguez, M., y M. Gerding. 2005. Estudio de la relación temperatura-crecimiento de Hongos entomopatógenos, como potenciales controladores de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Mesostigmata). Resúmenes XXVII Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología, Universidad Austral de Chile. 23-25 de Noviembre, Valdivia.2) Rodríguez M. 2005. Control Biológico de <i>Varroa</i>. Primer Seminario Apícola "Trazabilidad y Sanidad Apícola". 7 de diciembre, Quillón.3) Rodríguez, M. y M. Gerding. 2006. Control Biológico de <i>Varroa destructor</i> con Hongos entomopatógenos. Tercer Simposio Apícola Nacional. 28 al 30 de Agosto, Viña del Mar.4) Rodríguez, M. y M. Gerding. 2006. Uso de hongos entomopatógenos para el control de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Mesostigmata). XXVIII Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología, Universidad de la Frontera. 29-30 de noviembre y 1 de diciembre de



	<p>2006, Temuco.</p> <p>5) Rodríguez, M. y M. Gerding. 2006. Estudio de la relación temperatura-crecimiento de hongos entomopatógenos, como potenciales controladores de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Mesostigmata). XXVIII Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología, Universidad de la Frontera. 29-30 de noviembre y 1 de diciembre de 2006, Temuco.</p> <p>6) Rodríguez, M., M. Gerding and A. France. 2007. Potential use of entomopathogenic fungi against <i>Varroa destructor</i>. Apimondia Programme & Abstracts Beekeeping Down Under pag 133. 40th Apimondia International Apicultural Congress. September 9th to 14th. Melbourne, Australia.</p> <p>7) Rodríguez M., Gerding M. Miguel N. y R. Ceballos. 2008. Uso de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> Metsh. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) para el control biológico de <i>Varroa destructor</i> (ACARI: VARROIDAE). IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. 9 al 13 de Julio. Concepción, Chile.</p> <p>8) Rodríguez M., Gerding M. Miguel N. y R. Ceballos. 2008. Evaluación de un sistema de aplicación de hongos entomopatógenos para el control biológico de <i>Varroa destructor</i> (ACARI: VARROIDAE). IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. 9 al 13 de Julio. Concepción, Chile.</p> <p>9) V. Montes, M. Rodríguez S., Gerding M. Miguel N. y R. Ceballos. 2008. Efecto del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> Metsh. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) sobre la viabilidad de abejas <i>Apis mellifera</i> L (HYMENOPTERA: APIDAE.) en laboratorio. IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. 9 al 13 de Julio. Concepción, Chile.</p> <p>10) Rodríguez M, V. Montes, M. Gerding, M. Neira. 2008. Efecto del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> Metsh. (Deuteromycotina: Hyphomycetes), aislamiento Qu-M845 sobre la viabilidad de abejas <i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera: Apidae.) en laboratorio. XXX Congreso Nacional de Entomología. Universidad Católica del Maule, Talca.</p> <p>11) Rodríguez M., M. Gerding, M. Neira y R. Ceballos. 2008. <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> Metsh. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) una alternativa para el control biológico de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Varroidae). XXX Congreso Nacional de Entomología. Universidad Católica del Maule, Talca.</p>
--	--



		12) Rodríguez M., N. Molina, M. Gerding P. y M. Neira. 2009. Eficacia de <i>Metarhizium anisopliae</i> para el control de <i>Varroa destructor</i> (Acari: Varroidae) en colmenas de abejas (<i>Apis mellifera</i>)(Hymenoptera: Apidae). 2º Simposio Internacional de Control Biológico. Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias CRI-Quilamapu. 11 al 15 de mayo. Chillán.
Integración a redes de investigación		



Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
Tesis pregrado	4	<p>Mass, J. 2007. Comportamiento de abejas nodrizas (<i>Apis mellifera</i> L.) expuestas a <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin utilizados en el control de <i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile.</p> <p>Kramm, V. 2007. Desarrollo de una piquera bidireccional para el transporte de organismos benéficos por abejas. Tesis para optar al título de Diseñadora Industrial. Facultad de Diseño Industrial, Universidad del Bio-Bio, Concepción.</p> <p>Montes, V. 2008. Efecto del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> Metsh. (Deuteromycotina: Hyphomycetes), aislamiento Qu-M845 sobre la viabilidad de abejas <i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera: Apidae.) en laboratorio. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Adventista.</p> <p>Molina, N. Estudio de la eficacia y efectos sobre abejas (<i>Apis mellifera</i>) de diferentes métodos de aplicación del aislamiento Qu-M845 de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> para el control de <i>Varroa destructor</i>. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. En Revisión.</p>
Tesis postgrado		
Pasantías		
Cursos de capacitación	3	<p>Curso Internacional: Producción de Microorganismos Entomopatógenos y Antagonistas para el Control de Plagas Agrícolas. Instituto de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. 6-10 de noviembre de 2006.</p> <p>26 -28 abril 2007 VII Encuentro Nacional de Ciencia y Tecnología Apícola. Organizado por la Universidad Austral de Chile, Valdivia.</p> <p>30 abril – 1 mayo 2007 Taller Herramientas para una Apicultura Limpia y de Calidad. Organizado por Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) e INNOVA-CORFO. Universidad Austral de Chile, Valdivia.</p>



7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales

Ninguno.

- Técnicos

Las bajas temperaturas registradas durante el invierno de 2007 y el alto nivel de infestación por *Varroa destructor* en las colmenas mantenidas en INIA Quilamapu y Santa Rosa produjo una alta mortandad de familias, lo que causó un retraso en las actividades de evaluación del hongo en terreno.

- Administrativos

Ninguno.

- Gestión

El retiro de Colmenares Werner debido a la falta de comunicación y a interés de la empresa en realizar las actividades comprometidas como agente asociado al proyecto dificultó las evaluaciones en colmenares comerciales. Además las actividades de terreno comprometidas con la UACH, no se pudieron ejecutar debido a una orden de cuarentena dictada por el SAG, por ataque de Loque americano.

La empresa MIP AGRO cambió su línea productiva por lo que no realizará el escalamiento para masificación y comercialización del bioacaricida.

Debido a su condición de pequeños productores no se consideró realizar pruebas de terreno con los apicultores asociados a la agencia de desarrollo rural Ranquil debido al bajo número de colmenas existentes en los apiarios.

Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Para realizar las actividades comprometidas con colmenares Werner y la Agencia de Desarrollo Rural de Ranquil, se solicitó la colaboración de tres apicultores de la región: Sra. Elia Navarrete, Sres. Sady Muena y Patricio Ortiz quienes aportaron un total de 100 colmenas las cuales fueron utilizadas en los diferentes ensayos.



8. Otros Aspectos de Interés

Debido a que por base, el proyecto no podía iniciarse antes, se produjo un retraso en las actividades que redundaron en la pérdida de una temporada productiva. Por ello se solicitó ampliar el período del proyecto hasta mayo del 2009, de manera de aprovechar una temporada más en la prueba de los agentes de control.



Conclusiones y Recomendaciones:

- Desde el punto de vista:
 - Técnico

Gracias a las evaluaciones realizadas en laboratorio y terreno hoy se cuenta con un aislamiento nativo de hongo entomopatógenos específico para el control de *Varroa destructor* y que sirve de base para formular un acaricida biológico.

Las investigaciones efectuadas durante la ejecución de este proyecto señalan que es posible controlar el acaro sin afectar el comportamiento y viabilidad de las abejas.

Si bien, se lograron buenos resultados en la reducción de la plaga con aplicaciones del hongo en primavera e inicios de verano se debe considerar, que la efectividad del hongo disminuye con altos niveles de infestación por lo que se recomienda utilizar el producto de manera preventiva.

- Económico

Existe interés de parte de una empresa en producir y comercializar el hongo, lo que hace a este proyecto viable desde el punto de vista económico. Además existe demanda por parte de los apicultores que conocieron las bondades del producto.

- De gestión.

La ejecución de este proyecto permitió interactuar con las diferentes empresas y asociaciones gremiales de apicultores lo que facilitó la realización de varias actividades de transferencia e investigación así como también permitió contar con el apoyo para realizar nuevas propuestas de investigación y desarrollo tecnológico apícola.

Se debe destacar también que este proyecto sentó las bases para el establecimiento de una línea de investigación apícola en el Centro Tecnológico de Control Biológico de INIA Quilamapu contribuyendo con ello al progreso de este rubro en la región.



IV. INFORME DE DIFUSIÓN

- Difusión de los resultados obtenidos **adjuntando** las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.
- Listado (número y detalle) de actividades por instrumento de difusión, como por ejemplo:
 - Presentaciones en congresos y seminarios
 - Organización de seminarios y talleres
 - Días de campo o reuniones técnicas
 - Publicaciones científicas
 - Publicaciones divulgativas
 - Artículos en prensa
 - Páginas web

Charlas y Seminarios:

Control Biológico de Varroa. Diplomado de Apicultura Orgánica. 2005. Centro de Educación y Tecnología CET. Programa Bío-Bío, Yumbel.

Charla: Alternativas de Control de *Varroa destructor*. Seminario Control de plagas Apícolas Organizado por Mesa Apícola de la VII Región, Red Apícola Nacional. Talca. 30 de Agosto de 2005.

Seminario "Control de plagas Apícolas". Mesa Apícola de la VII Región, Talca, 30 de Septiembre de 2005.

Control Biológico de Varroa destructor. 1er Seminario Apícola Comunal Trazabilidad y Sanidad Apícola. Organizado por Municipalidad de Quillón, Red Apícola, Asociación Gremial de Apicultores VIII Región. Quillón. 7 de diciembre de 2005.

Exposición: Desarrollo de un acaricida biológico para el manejo no contaminante de *Varroa destructor* en colmenares comerciales. Tercera Reunión Científica sobre Investigación y Tecnología Apícola. Organizado por Univ. Católica de Chile, Red Nacional Apícola, FIA. Campus San Joaquín, Santiago. 8 de junio de 2006.

Exposición en feria: Control biológico de plagas apícolas. Exposición en día de campo EXPOINIA-2006 Estación Experimental Santa Rosa. Chillán, 6 de diciembre de 2006.

Charla: Sanidad Apícola actualidad mundial y desafíos para Chile. Dictada en el VIII Encuentro Apícola Regional. Organizado por Red APIX A.G. Valdivia y Puerto Varas. 15-16 de noviembre de 2007.

Seminario: "Avances del Proyecto Desarrollo de un acaricida biológico para el manejo no contaminante de *Varroa destructor* en colmenares comerciales". INIA-Quilamapu, 19 de noviembre de 2007.

Exposición en feria: Control Biológico de *Varroa destructor* con Hongos entomopatógenos. ExpoINIA 2007. Estación Experimental Santa Rosa. Chillán, 28 y 29 de noviembre de 2007.

Charla Técnica: Alternativas de control de *Varroa destructor*. Diplomado en Apicultura Orgánica. Centro Tecnológico de Educación CET. Yumbel. 28 de Julio de 2008.

Varroa destructor. Biología y alternativas de Control. Seminario organizado por Prodesal Talca e INIA CRI Quilamapu. Talca. 13 de octubre de 2008.

Plataforma científico apícola para la Región del Bio Bio. Taller regional estrategia de mercado Biomiel AG. Concepción. 20 de noviembre de 2008.

Plagas Apícolas de importancia en Chile. Seminario Apícola Centro de Capacitación Maule Sur Ltda. San Javier. 24 de noviembre de 2008.

Control Biológico de plagas Apícolas. Exposición en feria EXPOINIA 2008. Estación Experimental Santa Rosa. Chillán, 26 al 27 de noviembre de 2008.

Días de Campo

Proyecto FIA: Desarrollo de un acaricida Biológico para el control de *Varroa destructor*. Día de Campo organizado por CEGE Coelemu e INIA Quilamapu. Coelemu, Región del Bio Bio. 13 de noviembre de 2008.

Proyecto FIA: Desarrollo de un acaricida Biológico para el control de *Varroa destructor* y capacitación para la aplicación. Día de Campo organizado por CADE Ltda. e INIA Quilamapu. 10 de noviembre de 2008.

Taller

Producción de Hongos Entomopatógenos. Centro Tecnológico de Control Biológico. INIA Quilamapu. 15 de Mayo de 2009.

Publicaciones científicas y Divulgativas:

Rodríguez, M. y M. Gerding. 2005. Control Biológico de *Varroa destructor* con Hongos Entomopatógenos. *Tierra Adentro* 65:20.

Rodríguez, M. y M. Gerding. 2006. Formación y Manejo de un Apiario Moderno. Serie Cartillas Divulgativas Proyecto CADEPA N°12. INIA-Quilamapu.

Rodríguez, M. y M. Gerding. 2008. Control Biológico de *Varroa destructor* con Hongos Entomopatógenos. Informativo Agropecuario BIOLECHE – INIA QUILAMAPU: Año 21, N°1.

Rodríguez, M., M. Gerding y A. France. (Aceptada). Selección de hongos entomopatógenos por crecimiento a altas temperaturas como potenciales controladores de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* código: AT 7-126

Rodríguez, M., M. Gerding, A. France y R. Ceballos. (peer review). Uso de hongos entomopatógenos para el control de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* código AT 7-127.

Presentaciones en Congresos:

- 1) **Rodríguez, M.**, y M. Gerding. 2005. Estudio de la relación temperatura-crecimiento de Hongos entomopatógenos, como potenciales controladores de *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). Resúmenes XXVII Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología, Universidad Austral de Chile. 23-25 de Noviembre, Valdivia.
- 2) **Rodríguez M.** 2005. Control Biológico de *Varroa*. Primer Seminario Apícola "Trazabilidad y Sanidad Apícola". 7 de diciembre, Quillón.
- 3) **Rodríguez, M.** y M. Gerding. 2006. Control Biológico de *Varroa destructor* con Hongos entomopatógenos. Tercer Simposio Apícola Nacional. 28 al 30 de Agosto, Viña del Mar.
- 4) **Rodríguez, M.** y M. Gerding. 2006. Uso de hongos entomopatógenos para el control de *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). XXVIII Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Chilena de Entomología, Universidad de la Frontera. 29-30 de noviembre y 1 de diciembre de 2006, Temuco.
- 5) **Rodríguez, M.** y M. Gerding. 2006. Estudio de la relación temperatura-crecimiento de hongos entomopatógenos, como potenciales controladores de *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). XXVIII Congreso Nacional de



Entomología. Sociedad Chilena de Entomología, Universidad de la Frontera. 29-30 de noviembre y 1 de diciembre de 2006, Temuco.

- 6) **Rodríguez, M.**, M. Gerding and A. France. 2007. Potential use of entomopathogenic fungi against *Varroa destructor*. Apimondia Programme & Abstracts Beekeeping Down Under pag 133. 40th Apimondia International Apicultural Congress. September 9th to 14th. Melbourne, Australia.
- 7) **Rodríguez M.**, Gerding M. Miguel N. y R. Ceballos. 2008. Uso de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Metsh. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) para el control biológico de *Varroa destructor* (ACARI: VARROIDAE). IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. 9 al 13 de Julio. Concepción, Chile.
- 8) **Rodríguez M.**, Gerding M. Miguel N. y R. Ceballos. 2008. Evaluación de un sistema de aplicación de hongos entomopatógenos para el control biológico de *Varroa destructor* (ACARI: VARROIDAE). IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. 9 al 13 de Julio. Concepción, Chile.
- 9) V. Montes, **M. Rodríguez S.**, Gerding M. Miguel N. y R. Ceballos. 2008. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Metsh. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) sobre la viabilidad de abejas *Apis mellifera* L (HYMENOPTERA: APIDAE.) en laboratorio. IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. 9 al 13 de Julio. Concepción, Chile.
- 10) **Rodríguez M.**, V. Montes, M. Gerding, M. Neira. 2008. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Metsh. (Deuteromycotina: Hyphomycetes), aislamiento Qu-M845 sobre la viabilidad de abejas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae.) en laboratorio. XXX Congreso Nacional de Entomología. Universidad Católica del Maule, Talca.
- 11) **Rodríguez M.**, M. Gerding, M. Neira y R. Ceballos. 2008. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Metsh. (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) una alternativa para el control biológico de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). XXX Congreso Nacional de Entomología. Universidad Católica del Maule, Talca.
- 12) **Rodríguez M.**, N. Molina, M. Gerding P. y M. Neira. 2009. Eficacia de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colmenas de abejas (*Apis mellifera*)(Hymenoptera: Apidae). 2º Simposio Internacional de Control Biológico. Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias CRI-Quilamapu. 11 al 15 de mayo. Chillán.



Otros: Integrante de la Comisión Científico Apícola. IX Congreso Iberoamericano de Apicultura. Realizado del 9 al 13 de Julio de 2008. Concepción, Chile.

Tesis de Grado:

Mass, J. 2007. Comportamiento de abejas nodrizas (*Apis mellifera* L.) expuestas a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin utilizados en el control de *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile.

Kramm, V. 2007. Desarrollo de una piquera bidireccional para el transporte de organismos benéficos por abejas. Tesis para optar al título de Diseñadora Industrial. Facultad de Diseño Industrial, Universidad del Bio-Bio, Concepción.

Montes, V. 2008. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Metsh. (Deuteromycotina: Hyphomycetes), aislamiento Qu-M845 sobre la viabilidad de abejas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae.) en laboratorio. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Adventista.

Molina, N. Estudio de la eficacia y efectos sobre abejas (*Apis mellifera*) de diferentes métodos de aplicación del aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* para el control de *Varroa destructor*. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. En Revisión.



ANEXOS

Como fue indicado para los informes de avance técnico, pero en este caso la información no corresponde sólo a la actualización sino a la histórica. Por ejemplo, cambios en el equipo técnico, se debe adjuntar la ficha de todos los participantes que participaron en alguna de las etapas del proyecto aunque hayan sido reemplazados.



Equipo Técnico del Proyecto

Nombre Completo	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (% año)
Marcos Gerding	Ing Agrónomo	Entomología, Control Biológico	Coordinador	20
Andrés France	Ing Agrónomo	Patología de insectos	Coordinador alternativo	15
Miguel Neira	Ing Agrónomo	Entomología Apicultura	Investigador	10
Rodrigo Avilés	Ing. Civil	Evaluación de Proyectos	Evaluación de Proyectos	5
Marta Rodríguez	Ing. Agrónomo	Apicultor	Investigador	100



ANEXO 1 : FICHA DATOS PERSONALES EQUIPO TECNICO

Ficha Representante(s) Legal(es)

(Esta ficha debe ser llenada tanto por el Representante Legal del Agente postulante o Ejecutor como por el Representante Legal del Agente Asociado)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Ejecutor		
Nombres	Leopoldo		
Apellido Paterno	Sánchez		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Investigaciones Agropecuarias		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Director Nacional		
Dirección (laboral)	Fidel Oteiza 1956		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago, Providencia		
Fono	2-2252118		
Fax	2-2258773		
Celular			
Email			
Web			
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)	profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Asociado		
Nombres	Victor		
Apellido Paterno	Cubillos		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Universidad Austral de Chile		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Rector		
Dirección (laboral)	Independencia 641		
País	Chile		
Región	De los Lagos		
Ciudad o Comuna	Valdivia		
Fono	63-221232		
Fax	63-221233		
Celular			
Email			
Web			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)	profesional		



Ficha Coordinadores y Equipo Técnico

(Esta ficha debe ser llenada tanto por el Coordinador Principal, Coordinador Alterno y cada uno de los integrantes del Equipo Técnico)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador principal		
Nombres	Marcos Eduardo		
Apellido Paterno	Gerding		
Apellido Materno	Paris		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	CRI INIA Quilmapu de Chillán		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador entomólogo		
Profesión	Master of Sciences		
Especialidad	Entomología		
Dirección (laboral)	Vicente Méndez 515		
País	Chile		
Región	VIII		
Ciudad o Comuna	Chillán		
Fono	42-209705		
Fax	42-209599		
Celular			
Email	mgerding@inia.cl		
Web			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador alternativo		
Nombres	Andrés Rene		
Apellido Paterno	France		
Apellido Materno	Iglesias		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Patología		
Profesión	Ing. Agrónomo		
Especialidad	Fitopatologo		
Dirección (laboral)	Avda. Vicente Mendez 515		
País	Chile		
Región	Bío-Bío		
Ciudad o Comuna	Chillán		
Fono	42 209704		
Fax	42 209720		
Celular			
Email	afrance@inia.cl		
Web	www.inia.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	No aplica		
Tipo (C)	profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Investigador		
Nombres	Miguel		
Apellido Paterno	Neira		
Apellido Materno	Caamaño		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	UACH		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Docente		
Profesión	Ing Agrónomo		
Especialidad	Entomólogo		
Dirección (laboral)	Independencia 641		
País	Chile		
Región	De los Lagos		
Ciudad o Comuna	Valdivia		
Fono	63-221232		
Fax	63-221233		
Celular			
Email	mneira@uach.cl		
Web			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)	profesional		

(A), (B), (C): Ver notas al final de este anexo



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Investigador		
Nombres	Rodrigo		
Apellido Paterno	Avilés		
Apellido Materno	Rodriguez		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador		
Profesión	Ingeniero Civil Industrial		
Especialidad	Proyectos		
Dirección (laboral)	Av. Vicente Méndez 515. Chillán		
País	Chile		
Región	VIII		
Ciudad o Comuna	Chillán		
Fono	42-209513		
Fax	42-209599		
Celular			
Email	raviles@inia.cl		
Web	www.inia.cl		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	No aplica		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Investigador		
Nombres	Marta Emilia		
Apellido Paterno	Rodríguez		
Apellido Materno	Sanhueza		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad	Control Biológico Apicultura		
Dirección (laboral)	Av. Vicente Méndez 515. Chillán		
País	Chile		
Región	VIII		
Ciudad o Comuna	Chillán		
Fono	42-209667		
Fax	42-209720		
Celular			
Email	mrodrigu@inia.cl		
Web	www.inia.cl		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	No aplica		
Tipo (C)	Profesional		

(Se deberá repetir esta información tantas veces como números de coordinadores e integrantes del equipo técnico participen)



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario Directo		
Nombres	Agustín		
Apellido Paterno	Infante		
Apellido Materno	Lira		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Director		
Profesión	Ingeniero Agrónomo		
Especialidad			
Dirección (laboral)	O'Higgins # 301		
País	Chile		
Región	VIII		
Ciudad o Comuna	Yumbel		
Fono	43-431342		
Fax	43-431342		
Celular			
Email	cetbiobio@terra.cl		
Web			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)			



Ficha Participantes o Beneficiarios Directos

(Esta ficha debe ser llenada por cada uno de los beneficiarios directos o participantes vinculados al proyecto)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario Directo		
Nombres	Rubén		
Apellido Paterno	Gutiérrez		
Apellido Materno	Velásquez		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Asociación Gremial de Apicultores Region Bio-Bio		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública	Privada	<input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Representatnte Legal		
Profesión			
Especialidad			
Dirección (laboral)	Central Los Notros		
País	Chile		
Región	VIII		
Ciudad o Comuna	Santa Barbara		
Fono	43-698246		
Fax	43-698246		
Celular			
Email	biomielag@hotmail.com		
Web			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)			



Ficha Participantes o Beneficiarios Directos

(Esta ficha debe ser llenada por cada uno de los beneficiarios directos o participantes vinculados al proyecto)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Beneficiario Directo		
Nombres	Jaime		
Apellido Paterno	Quiroz		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	BIOGRAM		
RUT de la Organización			
Tipo de Organización	Pública		Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente		
Profesión			
Especialidad			
Dirección (laboral)	Las Canteras 8534, Parque industrial la Reina, Santiago		
País	Chile		
Región	Región Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	434 5144 / 45		
Fax			
Celular			
Email			
Web	www.biogram.cl/		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)			
Tipo (C)			



SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) POR CRECIMIENTO A 30 Y 35°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y multiplicación de aislamientos

Se utilizaron 50 aislamientos de *B. bassiana* y 48 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, seleccionados de la colección de hongos entomopatógenos del Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Quilamapu, los cuales se encuentran almacenados como cultivos monospóricos a -198 °C en nitrógeno líquido. Para cada uno de los aislamientos se efectuó una siembra tomando conidias con ayuda de un asa bacteriológica. Las conidias se esparcieron en forma superficial sobre medio nutritivo de, contenido en placas Petri de 90 mm de diámetro. Las placas se incubaron a 25 °C durante 2 ó 3 días.

Evaluación de crecimiento radial

A partir de los cultivos realizados y antes de observar desarrollo de conidias, del borde de crecimiento de la colonia se extrajeron discos de 5 mm de diámetro de agar más micelio con un sacabocados. Estos discos se depositaron en el centro de placas Petri con medio ASD, quedando en contacto el micelio con el medio nutritivo. Las placas se incubaron en cámaras de incubación, en oscuridad, a temperaturas de 30 y 35 °C. El crecimiento radial de la colonia se registró periódicamente, durante 18 días, midiendo el radio de crecimiento desde el centro de la colonia en cuatro ejes equidistantes, previamente marcados en la parte basal de cada placa..

La unidad experimental correspondió a una placa Petri. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones para cada aislamiento y tratamiento de temperatura. Se realizó análisis de varianza y separación de medias utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Tasa de crecimiento

Los datos de crecimiento radial se expresaron como crecimiento (mm) a través del tiempo. A partir de las regresiones lineales de cada repetición se calculó la tasa de crecimiento para cada aislamiento y temperatura, la que correspondió a la pendiente de la regresión (Ouedraogo *et al.*, 1997). Las diferentes tasas de crecimiento se compararon al día 18 postsiembra.

RESULTADOS

Evaluación del crecimiento radial

Todos los aislamientos de *B. bassiana* evaluados presentaron crecimiento a temperatura de 30 °C. La tasa de extensión de la colonia varió desde 0,043 a 1,99 mm día⁻¹ siendo el aislamiento Qu-B323 el que mostró mayor desarrollo, seguido de los aislamientos Qu-B910, Qu-B392 y Qu-B389, entre los cuales no hubo diferencias (p



< 0,0001) (Figura 1). A 35°C, 14 de los 50 aislamientos evaluados presentaron algún grado de desarrollo de sus colonias, de los cuales Qu-B303 fue el mejor ($p < 0,0001$), seguido por Qu-910 y Qu-B323 (Figura 1). A pesar que la tasa de crecimiento del mejor aislamiento, a temperaturas de 35°C, no superó los 0,5 mm día⁻¹, ésta fue similar a lo observado a 30°C, indicando tolerancia a este rango de temperaturas. Mientras que en los otros aislamientos se observó una marcada reducción a mayor temperatura, característica que concuerdan con Tefera y Pringle (2003) quienes observaron una disminución en el radio de crecimiento de aislamientos de *Beauveria* a 35 °C.

Respecto a *M. anisopliae*, se observó desarrollo de todas las colonias a 30 °C, temperatura a la cual las tasas variaron desde 0,14 a 3,39 mm día⁻¹, siendo los aislamientos Qu-M38 y Qu-M285 los que alcanzaron el mayor crecimiento ($p < 0,0001$) (Figura 2). La incubación a 35°C indicó que solo 24 aislamientos pudieron desarrollarse, con tasas de crecimiento que variaron desde 0,017 a 2,17 mm día⁻¹. El aislamiento Qu-M845 presentó el mayor radio (2,17 mm día⁻¹), siendo además uno de los que mejor reacciono a ambas temperaturas. Qu-M984 y Qu-M256 no fueron afectados por el alza de temperatura ($p < 0,0001$), mientras que el resto disminuyó estadísticamente su crecimiento (Figura 2).

En este estudio, se observó que la respuesta en el crecimiento bajo las dos temperaturas evaluadas varió considerablemente entre los aislamientos y las especies, es así que hubo una mayor cantidad de aislamientos de *Metarhizium* que crecieron a 30 y 35 °C, que lo observado en *Beauveria*.

Los requisitos térmicos de los aislamientos de hongos estudiados como potenciales controladores de *V. destructor* es que deben estar adaptados a las temperaturas existentes en el nido de cría de las colonias de abejas. Al igual que lo señalado por Davidson *et al.*, (2003), nuestros resultados indican que los aislamientos seleccionados crecen a temperatura de 35°C, con lo cual también podrán funcionar a las temperaturas de la periferia del área del nido de cría (32,5 -33,4°C), que es donde los ácaros se reproducen preferentemente (Le Conte *et al.*, 1990).

La temperatura de la colonia de abeja cambia marcadamente entre el verano y el invierno. En el verano las temperaturas son mayormente dependientes del ambiente. El área de cría usualmente se mantiene de 32 a 37 °C mientras que el resto de la colmena mantiene temperaturas de 28 a 33°C. En invierno en tanto, las abejas se conservan activas para generar calor y permanecen juntas para reducir la tasa de pérdida de energía. En regiones templadas la temperatura invernal del nido de abejas se mantiene normalmente entre 20 a 30°C (Shaw *et al.*, 2002). Si bien, las temperaturas evaluadas se han basado en las condiciones de la colmena de abejas en verano, se estima que los aislamientos seleccionados también funcionarán bajo las condiciones de temperatura en invierno.

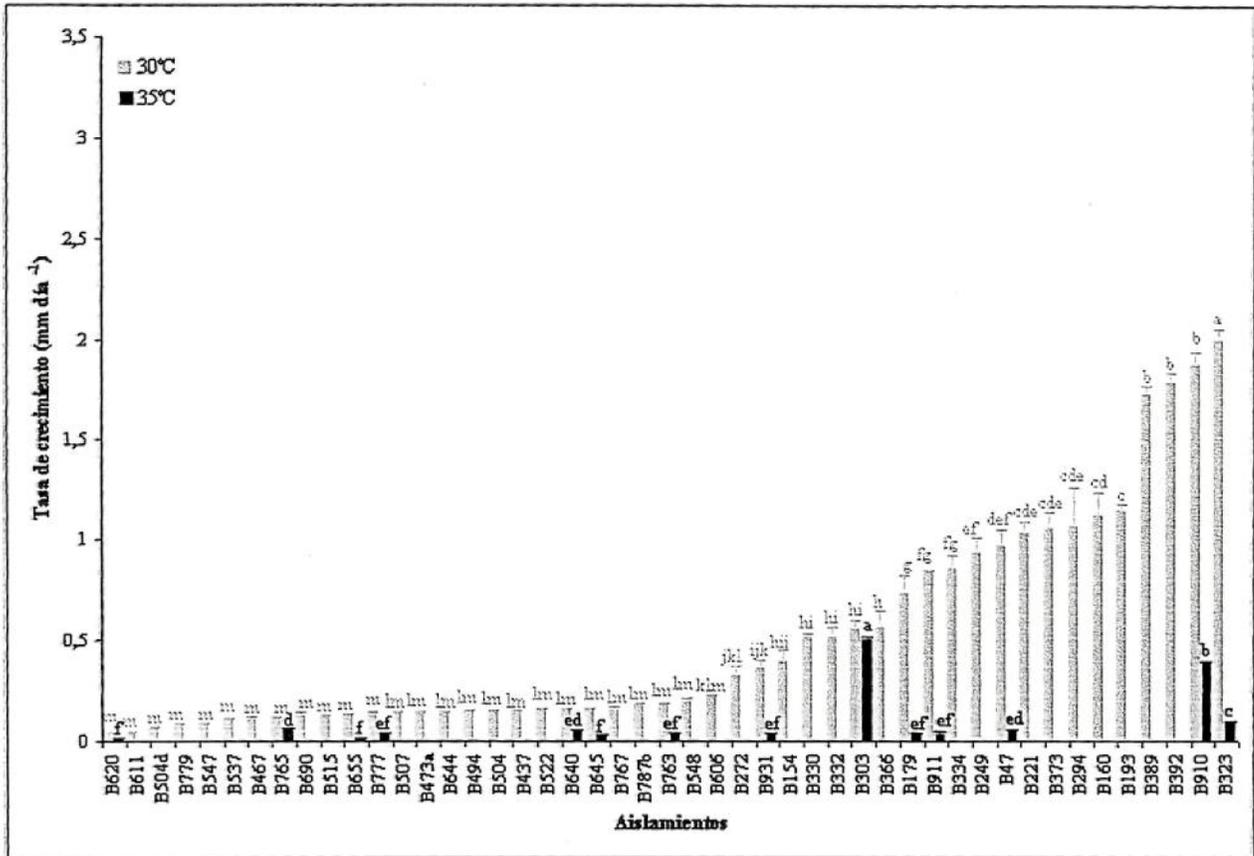


Figura 1. Tasa de crecimiento de colonias (mm día⁻¹) de aislamientos de *Beauveria bassiana* a temperaturas de 30 y 35°C. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey (P < 0,05).

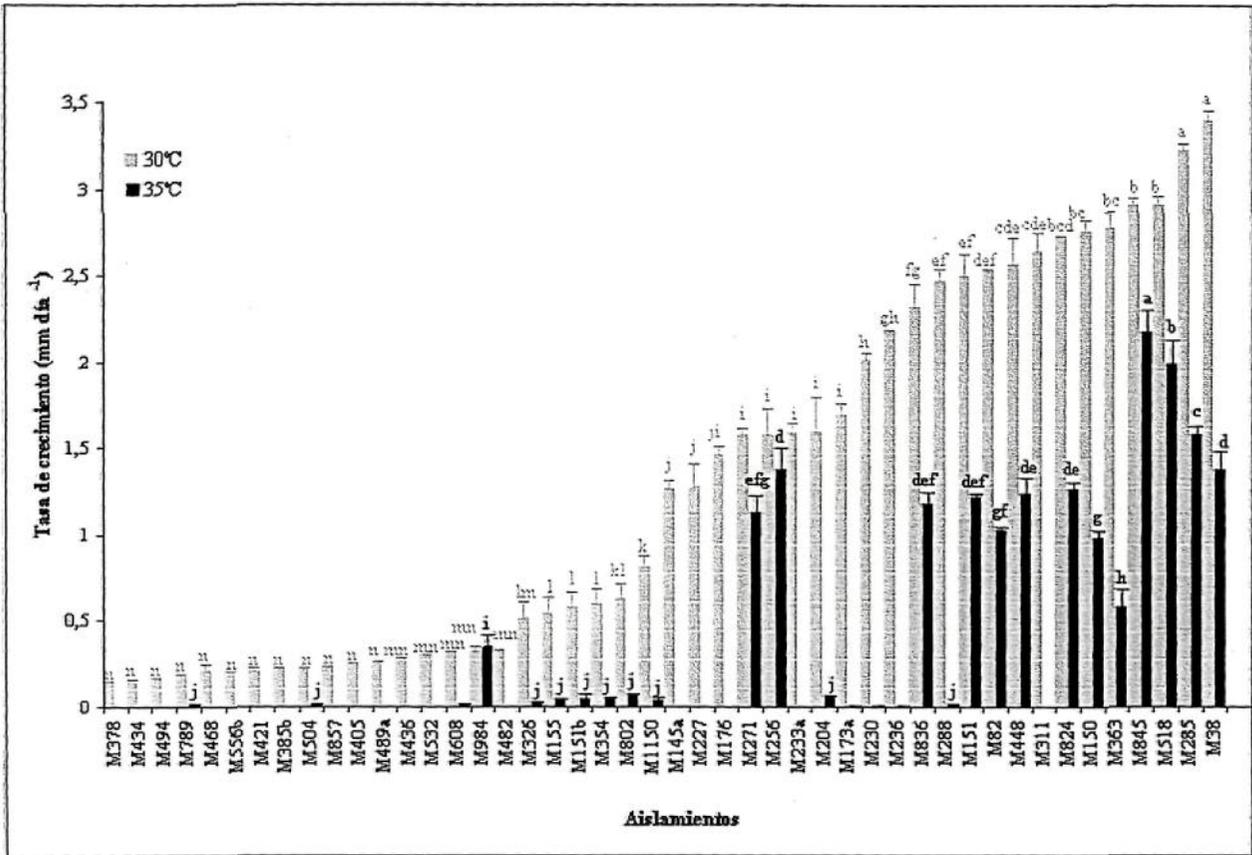


Figura 2. Tasa de crecimiento de colonias (mm día⁻¹) de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a temperaturas de 30 y 35°C. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey (P < 0,05).



BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos. p. 289-381. En: S. B. Alves (Ed.). Controle microbiano de insetos (2a ed.). FEALQ. Piracicaba, Brasil.
- Coates, B., R. Hellmich, and L. Lewis. 2002. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome* 45:125-132.
- Coppa, R. 2006. Carpeta Técnica, Misceláneas Nº 6, Octubre 2006. EEA INTA Esquel. Argentina.
- Chandler, D., G. Dadidson, J. Pell, B. Vall, K. Shaw, and K. Sunderland. 2000. Fungal Biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology* 10: 357 – 384.
- Chandler, D., K.D. Sunderland, B.V. Ball, and G. Davison. 2001. Prospective biological control agents of *Varroa destructor* n. sp., an important pest of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Biocontrol Science and Technology* 11: 429 – 448.
- Davidson, G., K. Phelps, K. Sunderland, J. Pell, B. Ball, K.E. Shaw, and D. Chandler. 2003. Study of temperature – growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using a nonlinear model of poikilotherm development. *Journal of Applied Microbiology* 94: 816- 825.
- de Felipe. M. y R. Vandamme. 2002. Control alternativo de *Varroa jacobsoni*, ácaro parásito de las abejas con ácidos orgánicos y timol. [en línea]. AgroNet. <http://www.agronet.com.mx/cgi/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=0&Type=G&Datemin=2002-01-01%2000:00:00&Datemax=2002-01-31%2023:59:59>. [consulta: 25 agosto 2008].
- Gliński, Z., and K. Buczek. 2003. Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta* 38: 183-189.
- Goettel, M.S., and D.G. English. 1997. Fungi: Hyphomycetes. p. 213-249. In Lacey, L.A. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London, UK.
- Gomez, K., and A. Gomez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research*. (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc., Singapore.
- Henderson, C., and E. Tilton. 1955. Test with acaricidas against the brown wheat mite. *J. Econ. Entomol.* 48:157-161.



Kanga, L.H, R.R. James, and D.G. Boucias. 2002. *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. J. Invertebr. Pathol. 81(3):175-84.

Kanga, L.H., W. Jones, and R. James. 2003. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. Biological and Microbial Control 96 (4): 1091 – 1099.

Kanga, H. B., W. A. Jones and R. James. 2005. Enlisting fungi to protect the honey bee. Biologist. 52 (2): 88-94.

Kanga, L.H, W.A. Jones, and C. Gracia. 2006. Efficacy of strips coated with *Metarhizium anisopliae* for control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies in Texas and Florida. Exp. Appl. Acarol. 40(3-4):249-58.

Le Conte, Y., G. Arnold, and P.H. Desenfant. 1990. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). Environmental Entomology 19: 1780 – 1785.

Meikle, W.G., G. Mercadier, V. Girod, F. Derouné, and W.A. Jones. 2006. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from varroa mites in southern France. Journal of Apicultural Research 45 (3): 219 – 220.

Meikle, W.G., G. Mercadier, N. Holst, C. Nansen, and V. Girod. 2007. Duration and spread of an Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), used to treat Varroa mites (Acari: Varroidae) in Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hives. Journal of Economic Entomology 100 (1): 1 – 10 (10).

Meikle, W. G., G. Mercadier, N. Holst and V. Girod. 2008. Impact of two treatment of a formulation of *Beuaveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes), conidia on Varroa mites (Acari: Varroidae) and on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health. Exp. Appl. Acarol 46: 105-107.

Neira, M., P. Heinsohn, R. Carrillo, A. Báez, y J. Fuentealba. 2004. Efecto de aceites esenciales de lavanda y laurel sobre el acaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman (Acari: Varroidae). Agric. Téc. (Chile) 64:238-244.

SAG (Chile). 2002. 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 la miel en la región de la Araucanía y de Los Lagos. pp 7-8. Proyecto fondo SAG N°71. Apicoop Ltda. Chile.



Shaw, K. E., G. Davidson, S. J. Clark, B. V. Ball, J. K. Pell, D. Chandler and K. D. Sunderland. 2002. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporitic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. Biol. Contr. 24: 266-276.

Tefera, T. and K. Pringle. 2003. Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. Biocontrol Science and Technology 13 (7): 699 – 704.

Wekesa, V.W., M. Nguya, M. Knapp, and H. Boga. 2005. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. Experimental and Applied Acarology 36 (1): 41-50(10).



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN

DATOS DE ASISTENTES A DIAS DE CAMPO

Día de Campo Yumbel

Comuna	Nº	NOMBRE	RUT	Actividad	Domicilio
Yumbel	1	Claudio Alonso Gutiérrez González		Apicola	Cambrales
Yumbel	2	Armando Segundo Villablanca Rifo		Apicola	Vega Blanca
Yumbel	3	Pedro Segundo Arroyo Esparza		Apicola	Cambrales
Yumbel	4	Hugo Enrique Barrera Campos		Apicola	Cambrales
Yumbel	5	Pedro Muñoz Aguilera		Apicola	Cambrales
Cabrero	6	José Cipriano Salgado Burgos		Apicola	Colicheo
Cabrero	7	José Carlos Chávez Fernández		Apicola	La Isla
Yumbel	8	Elsa Elizabeth Ramírez González		Apicola	La Aguada
Yumbel	9	Patricia Angélica Pardo Inostroza		Apicola	La Aguada
Yumbel	10	María Soledad Paredes		Apicola	Río claro
Yumbel	11	Juan Carlos Betancur		Apicola	El pajal
Yumbel	12	Luisa Cabezas Fica		Apicola	Yumbel
Yumbel	13	Fernando Segundo Jiménez Araneda		Apicola	Yumbel
Yumbel	14	Glady Corina Inostroza Escobar		Apicola	Río claro
Yumbel	15	Hilda Jaramillo Jara		Apicola	Yumbel
Yumbel	16	Ramón Inzunza Jara		Apicola	Huinanco
Yumbel	17	Moisés Ordenes Jara		Apicola	Huinanco
Cabrero	18	Silvia Elena Ortega Gacitua		Apicola	Los Leones
Yumbel	19	Aida De Las Nieves Parra Muñoz		Apicola	Estero de los Sapos
Yumbel	20	Luis Antonio Escobar Silva		Apicola	Cambrales
Yumbel	21	Pablo Inzunza		Apicola	Peleco

LISTADO DE DÍA DE CAMPO

13-nov-08

CEGE ÑUBLE S. A.

N°	NOMBRE	RUT	N°/PE	CANCE	ESTADO	CONCURSO	CUADERN	FIRMA
1	AGUAYO JOSE							
2	ALEGRIA FLORES RACHEL		2	2000	CANC.	NO	NO	Rachel
3	ALEGRIA BENAVENTE EUGENIA							
4	ARTEAGA CASTILLO DOMINGO		1			NO		
5	ARTEAGA PARRA FRANCISCO							
6	ARTEAGA PARRA TERESA							
7	ARTEAGA REYES AMANDA							
8	ARTEAGA REYES DOMINGO		1	1000	CANCELO	SI	SI	
10	ARTEAGA REYES LUIS ORLANDO						SI	
11	BERTIOLA TORRES MARIÁ LUISA		1	1000	CANCELO	NO		
12	BINIMELIS SANDOVAL FRANCISCO							
13	BUSTOS PINO FILOMENA							
14	CAAMAÑO CABRERA LUIS FERNANDO		1	1000	CANCELO	SI	SI	
15	CAAMAÑO PARRA GRISELDA							
16	CABRERA ITURRA TERESA		1	1000	CANCELO	? S, Tec.	SI	
17	CANO FUENTEALBA MARIA GRACIELA		NO	NO	NO	NO		
18	CARTES BAEZA RUBI		NO	NO	NO	NO		
19	CASTILLO FUENTEALBA SALVADOR		2	2000	CANCELO	?		
20	CASTILLO NEIRA MARGARITA							
21	CASTILLO SILVA HECTOR							
22	CEBALLOS ORTIZ MARIA ROSA		2	2000	CANCELO	NO	SI	Amaria R C Cisternas
23	CERNA FUENTES ISIDRO							
24	CERNA FUENTES JOSE ALBERTO		1	1000	CANCELO	NO		
25	CISTERNAS CISTERNAS MARIA IRIS		1	1000	CANCELO	NO	NO	Monica Cisternas

6

85	SAHIBUZZA NEIRA APOLOHIMES							
89	CAHIBUZZA PARRA JOSE							
90	SOLIS SAEZ JOSE	1	1000 CANCELLO SI					X <i>[Signature]</i>
91	SOTO FUENTEALBA LUIS	2	2000 Cancello Sitec					X <i>[Signature]</i>
92	SOTO URRUTIA EDUARDO							
93	TOLEDO ZAPATA TABITA	1	1000 CANCELLO SI	105	SI, al final			X <i>[Signature]</i>
94	TORRE PARRA HILDA							
95	TORRES FUENTEALBA ANIA PABLA							
96	TORRES FUENTEALBA JOSE HECTOR							
97	TORRES ROJAS SONIA ESCALI	1	1000 C.	SI				X <i>[Signature]</i>
98	TORRES FUENTEALBA MARIA							
99	ULLOA MONTECINOS JUAN	1	1000 C.	NO				
100	ULLOA NEIRA JOSE	1	1000 Cancello Sitec					X <i>[Signature]</i>
101	VAL EIZUELA MARDÓHIES HORMA							
102	VARELA LUISAIN JUAN							
103	VASQUEZ RIVERA ROSA							
104	VENEGAS GONZALEZ ANA PATRICIA	2	2000 CANCELLO SI					
105	VENEGAS BUSTOS LUIS	1	1000 CANCELLO SI					
106	VENEGAS GONZALEZ JOSE	1	1000 CANCELLO NO					
107	VENEGAS GONZALEZ MARIA	1	1000 CANCELLO NO					X <i>[Signature]</i>
108	VIDAL TORRES ROSA	2	2000 CANCELLO SI					
109	VILLA FUENTEALBA LORENZA							
110	VILLA TORRES ROSA	2	2000 CANCELLO SI					X <i>[Signature]</i>

62000

4



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN

RESUMENES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

XXVII
Congreso Nacional de

Entomología

Valdivia, 23 al 25 de noviembre de 2005



Universidad Austral de Chile
Conocimiento y Naturaleza



Sociedad Chilena de Entomología

Libro de Resúmenes

ENTOMOPATÓGENOS, COMO POTENCIALES CONTROLADORES DE VARROA DESTRUCTOR (ACARI: MESOSTIGMATA).

Rodriguez Marta y Gerding M.

INIA-Quilamapu

Varroa destructor, es un ectoparásito de la abeja de miel *Apis mellifera* que causa los daños en la producción apícola a nivel nacional y mundial. El desarrollo de resistencia a Varroa a los productos químicos utilizados y los problemas de residuos en los productos vendidos de la colmena, han hecho necesario buscar alternativas de control más efectivas y viables.

Con este propósito, el INIA-Quilamapu está desarrollando un proyecto financiado por el FIA para determinar aislamientos nativos de hongos entomopatógenos que puedan controlar esta plaga.

Los aislamientos seleccionados que se puedan utilizar contra Varroa, fue necesario seleccionar aislamientos capaces de soportar las temperaturas del nido de cría de las abejas (35 °C). Con este objetivo, se realizó una evaluación del crecimiento de 15 aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a 5 temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30 y 35 °C).

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Control Biológico del INIA-Quilamapu de Quilamapu. Las cepas utilizadas fueron Qu-B249, Qu-B272, Qu-B303, Qu-B323, Qu-B326, Qu-B327, Qu-B912, Qu-B916 y Qu-B931 de *B. bassiana* y Qu-M142, Qu-M151b, Qu-M204, Qu-M205, Qu-M845 y Qu-M984 de *M. anisopliae*.

ESTUDIO DE LA RELACIÓN TEMPERATURA-CRECIMIENTO DE HONGO ENTOMOPATÓGENOS, COMO POTENCIALES CONTROLADORES DE *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata).

Marta Rodríguez y Marcos Gerding.

Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.

E-mail: mrodrigu@inia.cl

INTRODUCCIÓN

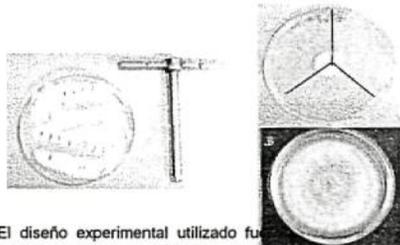
Antecedentes de control de *Varroa* reportados en otros países con hongos entomopatógenos (HEP), motivaron la realización de un proyecto financiado por el Fondo para la Innovación Agraria (FIA), ejecutado por el INIA Quilamapu y la Universidad Austral de Chile, que tiene por objetivo desarrollar un acaricida biológico a partir de aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium* nativos y específicos para el control de *Varroa destructor*.

Para seleccionar aislamientos capaces de soportar las temperaturas del nido de cría de las abejas (30-35 °C) se realizó una evaluación de la biología termal de 32 aislamientos de *Beauveria bassiana* y 32 de *Metarhizium anisopliae* pertenecientes a la colección de HEP de INIA-Quilamapu, a 5 temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30, 35°C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el laboratorio del Programa de Control Biológico del INIA-Quilamapu de Chillán.

A partir de placas inoculadas con cada aislamiento, se extrajeron del borde de crecimiento de la colonia discos de 5 mm de diámetro de micelio. Estos fueron depositados en el centro de placas de Petri con ASD. Las placas fueron incubadas en oscuridad a diferentes temperaturas: 15, 20, 25, 30 y 35°C. El crecimiento radial de la colonia fue registrado periódicamente a través de tres radios equidistantes. Las mediciones se suspendieron cuando la colonia alcanzó el borde de la placa.



El diseño experimental utilizado fue el de un solo factor a al azar con tres repeticiones para cada aislamiento y tratamiento de temperatura.

Los datos de crecimiento radial (mm) fueron graficados en función del tiempo, de manera de calcular la tasa de crecimiento para cada aislamiento y temperatura. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y separación de media mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Las figuras 1 y 2 muestran las tasas de crecimiento de los distintos aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* var. *anisopliae* obtenidas en condiciones de laboratorio, para los diferentes tratamientos de temperatura.

Los resultados obtenidos indican que los aislamientos de *Beauveria bassiana* son capaces de crecer a temperaturas desde 15 a 30°C. Sin embargo, las mayores tasas se observaron a temperaturas de 25°C, (Figuras 1c).

A 30°C, las tasas de crecimiento variaron desde 0,25 a 1,5 mm día⁻¹ siendo el aislamiento Qu-B297 el que obtuvo la mayor tasa (Figura 1d). A 35°C en tanto, se observa una marcada disminución de las tasas de crecimiento permitiendo inferir que esta especie es sensible a esta temperatura (Figura 1e).

Para *M. anisopliae* se observó crecimiento en todas las temperaturas evaluadas. Sin embargo, al igual que en el caso anterior las mayores tasas se observaron a 25°C.

A temperaturas de 30 y 35°C no se observó limitaciones del crecimiento para la mayoría de los aislamientos. A 30°C el aislamiento que alcanzó la mayor tasa de crecimiento fue Qu-M285 (3,5 mm día⁻¹) seguido por los aislamientos Qu-M518, Qu-M363, Qu-M38, Qu-M448, Qu-M151 y Qu-M824 que en promedio alcanzaron los 2,75 mm día⁻¹. A 35°C, las mayores tasas de crecimiento variaron de 1 a 2 mm día⁻¹ para 12 aislamientos, siendo Qu-M518 el que alcanzó el mayor desarrollo a esta temperatura.

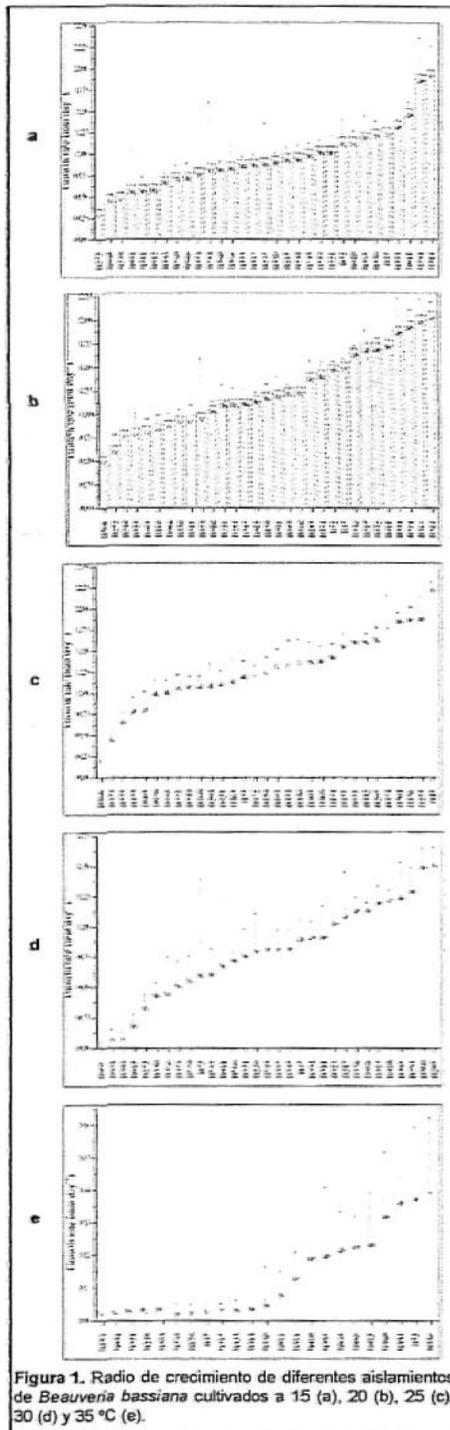


Figura 1. Radio de crecimiento de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* cultivados a 15 (a), 20 (b), 25 (c), 30 (d) y 35 °C (e).

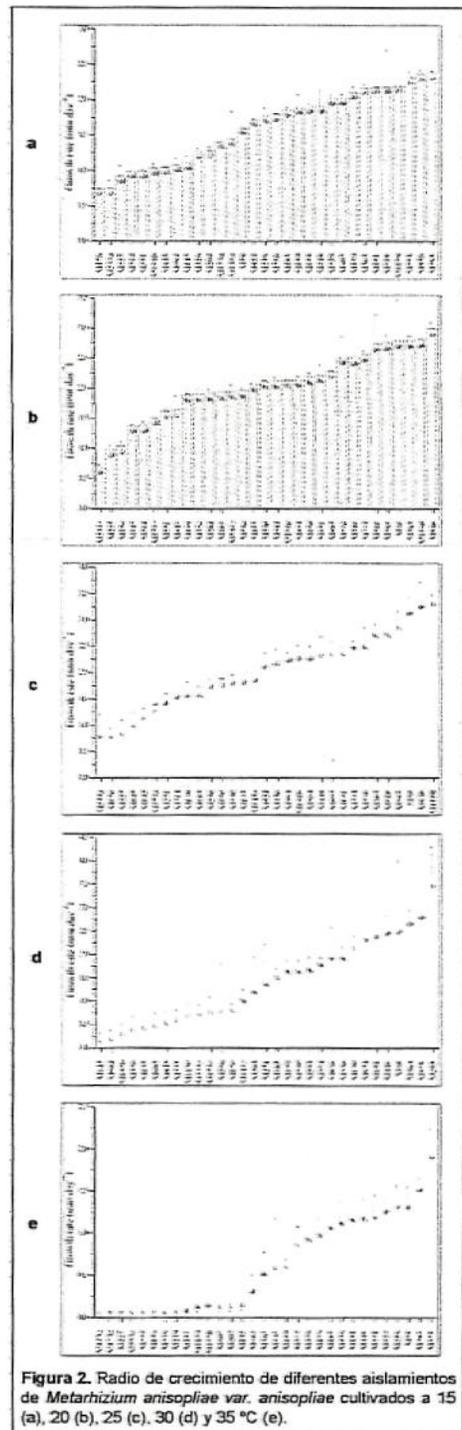


Figura 2. Radio de crecimiento de diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* cultivados a 15 (a), 20 (b), 25 (c), 30 (d) y 35 °C (e).

CONCLUSIONES

- De los 32 aislamientos de *Beauveria bassiana* evaluados 17 crecieron a temperaturas de 15 a 30°C. A 35 °C en tanto, se observó muy poco crecimiento.
- Todos los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* crecieron a temperaturas de 15 a 35°C. A 35°C, 17 presentaron aumento en su radio de crecimiento pero solo los aislamientos Qu-M38, Qu-M256, Qu-M285, Qu-M518 y Qu-M824 presentaron diferencias significativas.
- La importancia de estos aislamientos de crecer a altas temperaturas, sería que eventualmente pudieran ser seleccionados para el control de *Varroa destructor*, considerando la temperatura interna que puede alcanzar la colmena.

5.4. Efecto del Hongo Entomopatógeno *Metarhizium Anisopliae* Metsh. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Sobre la Viabilidad de Abejas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en Laboratorio

Victor Montes¹, Marta Rodríguez², Marcos Gerding², Miguel Neira³ y Ricardo Ceballos²

Varroa destructor es un ácaro parásito externo que ataca a abejas melíferas, provocando la enfermedad denominada varroasis. *V. destructor* solamente puede reproducirse sobre colonias de abejas, y es reconocido como el parásito de mayor impacto económico en la apicultura. Este ácaro se adhiere al cuerpo de la abeja, debilitándola debido a que se alimenta de la hemolinfa. Así una alta infestación podría causar la muerte de la colonia. Dada la importancia de esta plaga y los efectos nocivos, ampliamente conocidos, de los insecticidas químicos en la apicultura e industria asociada, es que El Centro Tecnológico de Control Biológico (INIA Quilamapu) en conjunto con la Universidad Austral de Chile están abocados a desarrollar un biopesticida, a base de hongos entomopatógenos, para controlar biológicamente al acaro *V. destructor*. En estudios preliminares se ha logrado aislar, identificar y seleccionar un aislamiento de *Metarhizium anisopliae*, Qu-M845 el cual en condiciones de campo logra hasta un 70% de control de la plaga en colmenas tratadas. Sin embargo no se cuenta con antecedentes de este microorganismo sobre abejas por lo cual se planteó evaluar el efecto del hongo sobre la viabilidad de abejas confinadas en laboratorio. Se colectaron paneles de cría de abejas operculados los cuales fueron incubados a 35° C para la emergencia de adultos. Las abejas nacidas fueron confinadas en contenedores de vidrio (20x27x30 cm) y alimentadas con jarabe de miel con tres concentraciones de conidias del aisl. Qu-M845 (106, 107, 108 y 109 conidia mL⁻¹). Un tratamiento de jarabe de miel sin la adición de conidias fue incorporado como control. Se empleó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Se registró cada 24 horas por 17 días el número de individuos muertos, los que posteriormente fueron incubados en cámara húmeda para corroborar la presencia del hongo. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante la prueba de Chi-cuadrado (P<0,05).

Solamente la concentración 109 conidia mL⁻¹ alcanzó un nivel de mortalidad significativo respecto de las otras concentraciones evaluadas (P < 0.01), alcanzando un 34%. La CL₅₀ fue 1,15x10⁹ conidias mL⁻¹, la cual es superior a la CL₅₀ 104,6 de varroa. A partir de estos resultados, es posible concluir que al emplear una adecuada del hongo no causará la muerte de abejas. Sin embargo, aun falta determinar su efecto en terreno y evaluar el efecto de la colonización por el hongo sobre la conducta de las abejas.

¹ Universidad Adventista de Chile.

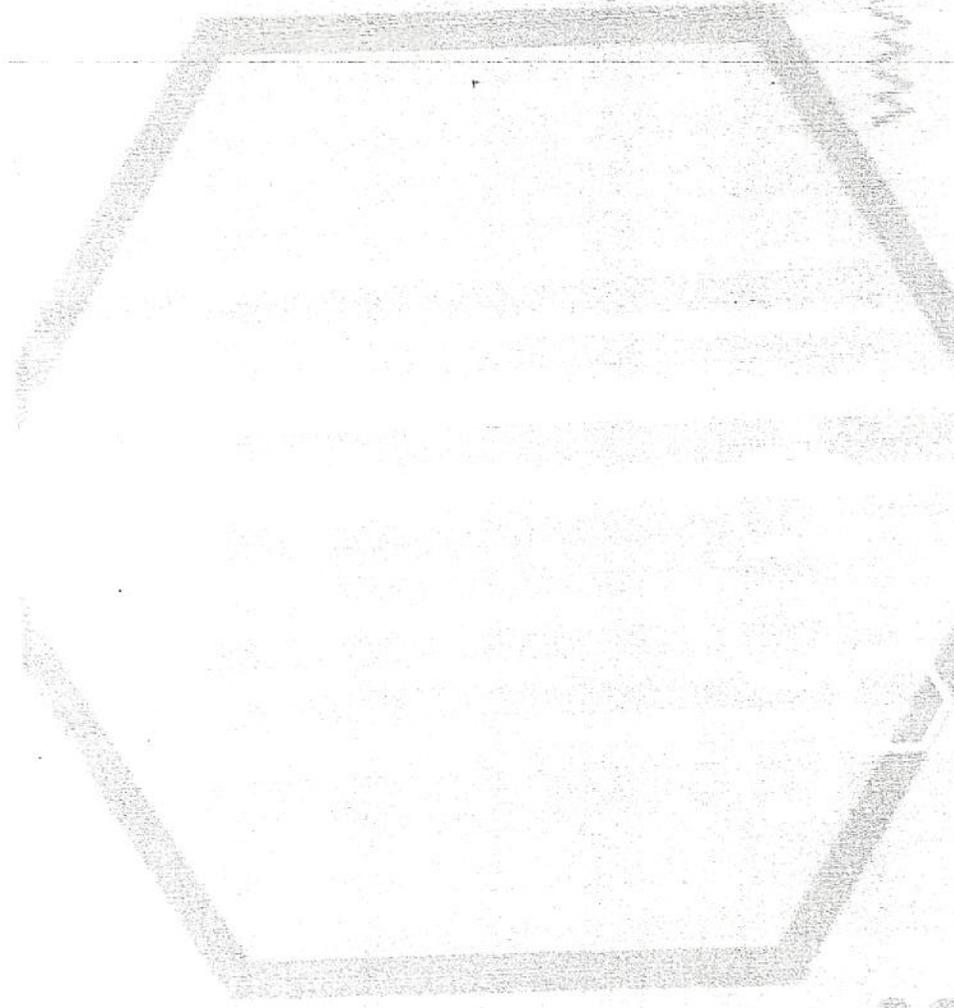
² Centro Tecnológico de Control Biológico, Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Quilamapu.
www.controlbiologicochile.cl.

³ Universidad Austral de Chile.



September 9th to 14th 2007

Apimondia Programme & Abstract
Beekeeping Down Under



www.apimondia2007.com.au



40th Apimondia International Apicultural Congress
Melbourne Australia

ructor

93

enter: Mrs. Marta Rodríguez Sanhueza

r Authors: Mr. Marcos Gerding Dr. Andrés France

nisation: National Institute of Agriculture Research VIII Región Chile

l: mrodrigu@inia.cl

Use of a collection of native isolates of entomopathogenic fungi were tested against *Varroa destructor*: 40 *Metarhizium anisopliae* and 42 *Beauveria bassiana* isolates, belonging to the collection of the Chilean Institute of Agriculture Research, were evaluated at different temperatures (15-35°C), to select isolates resistant to the honey bee hives (30-35°C). 15 *Metarhizium anisopliae* and 4 *Beauveria bassiana* were resistant to these temperatures.

selected isolates were each one applying directly as a 10⁷ conidia mL⁻¹ suspension on 10 *V. destructor* adults. The best isolate was *Metarhizium*

133

Introduction

An alternative to reduce damages caused by *Varroa destructor* is the biological control with entomopathogenic fungi. The Chilean Institute of Agricultural Research, INIA, has a collection of native entomopathogenic micro-organisms which includes 800 isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Consequently the objective of this work was to select, through laboratory and field trials the most virulent and specific isolates to develop a biological acaricide for management of *V. destructor* on hives.



Entomopathogenic Fungi Collection



Beauveria bassiana



Metarhizium anisopliae

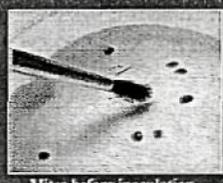
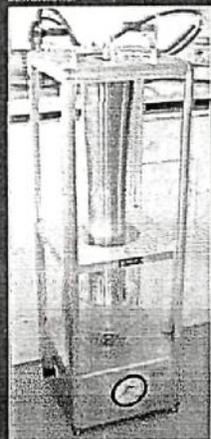
Materials and Methods

Laboratory Trials

10 *M. anisopliae* and 42 *B. bassiana* isolates were evaluated at different temperatures (15-35°C) to select resistant isolates to survive at honey bee hives temperature (30-35°C).

The selected isolates were inoculated by spraying a suspension of 10^7 conidia mL^{-1} directly on adult of *V. destructor* through a Potter tower. The treated mites were maintained on honey bee pupae. Mortality of *V. destructor* with different isolates were registered daily and the dead mites were incubated in wet chamber.

The best isolate "Qu-M845 *M. anisopliae*" was evaluated at different concentrations (10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4 conidia mL^{-1}) on *V. destructor* adults to determine the Lethal Concentration 50 (LC50) in laboratory conditions.



Mites before inoculation



Mites after inoculation



Field Trials

A field trial was performed through three different application methods: T1. Filter paper imbibed with conidia located inside the hive, T2. Dry conidia were powdered on and between the frame hive, and T3. Conidia dispenser at the hive entry. The control test (T0) was a hive without fungi. The dose for each method was 3×10^5 conidia for beehives, and applied on early fall. Level infestation of *V. destructor* was estimated before and after applications, and mites mortality per day was detected using a sticky cardboard located on the bee hive floor.



Conidia Dispenser (T3)

Results

Pathogenesis differences were founded among isolates (Tukey, $P < 0.05$) in the screening test.

The most pathogenic isolates of *M. anisopliae* were Qu-M845 and Qu-M826 which caused the highest rates of mortality of *V. destructor*. *B. bassiana* did not produce significant mortality (Figure 1) to the pest.

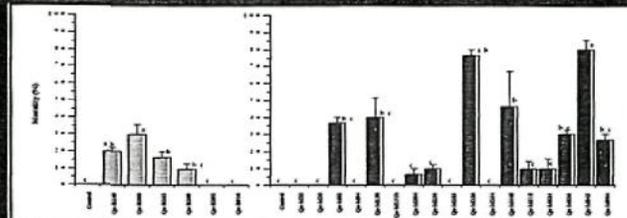


Figure 1. *Varroa destructor* mortality caused by the inoculation with different isolates of *Beauveria bassiana* (Qu-B) and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Qu-M).

Qu-M845 caused 98% of mites mortality 7 days post inoculation (dpi), with 10^5 conidia mL^{-1} , which was statistically similar ($P < 0.05$) with 10^6 conidia mL^{-1} (72% of mortality). The LC50 and LC90 for this isolate were about $10^{4.5}$ and $10^{7.0}$ conidia mL^{-1} , respectively (Figures 2 and 3).

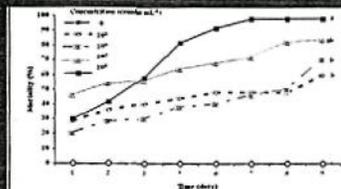


Figure 2. Mortality of *Varroa destructor*, inoculated with different concentrations of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Qu-M845 isolate.

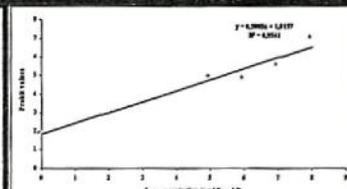


Figure 3. Probit regression of mortality curve of *Varroa destructor*, inoculated with different concentrations of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Qu-M845) isolate.

The level of infestation of mites before treatment ranged between 5.41 to 7.42% in the hives. After application all *M. anisopliae* treatments showed lower mite infestation level than the control which increased in 11.143%. The best treatment was dry conidia powdered in the hive which reduced in 67.03% the level of infestation with *V. destructor* (Figure 4).

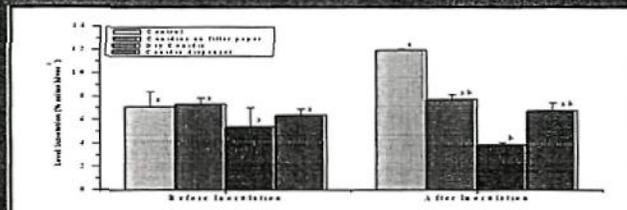


Figure 4. Level of infestation with *Varroa destructor* in colonies before and after treated with Qu-M845 isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Cumulative mortality of *V. destructor* was significantly different ($P \leq 0.05$) between bee colonies 21 dpi. At the same time, the cumulative daily mortality of the honey bees did not differ significantly ($P = 0.002$) between treatments (Figures 5 and 6).

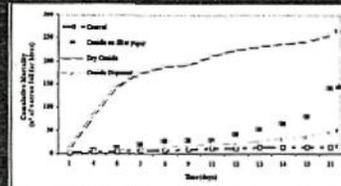


Figure 5. Cumulative mortality of *V. destructor* over time with different methods of application of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Qu-M845 isolates.

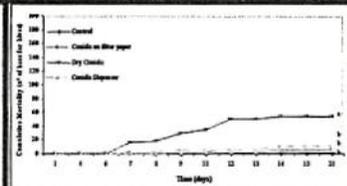


Figure 6. Cumulative mortality of honey bees over time with different methods of application of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Qu-M845 isolates.



Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* on *Varroa destructor*.

5.12. Uso de *Metarhizium anisopliae* Var. *Anisopliae* Metsh. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para el Control Biológico de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)

Marta Rodríguez S.¹, Marcos Gerding P.¹, Miguel Neira² y Ricardo Ceballos¹

En Chile, desde el año 2005, el Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias sede Chillán (CRI-Quilamapu), en conjunto con la Universidad Austral de Chile y con el apoyo del Fondo para la Innovación Agraria (FIA) se encuentra desarrollando un acaricida biológico en base a hongos entomopatógenos para el manejo no contaminante de *Varroa destructor* en colmenares comerciales. A la fecha se ha identificado y seleccionado el aislamiento Qu-M845, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, por su alto nivel de virulencia sobre la plaga en ensayos de laboratorio, en donde se ha logrado disminuir la infestación hasta en un 70% con la aplicación de 5×10^{10} conidias. Con el objetivo de evaluar la forma de aplicación y efectividad en campo de este aislamiento se estableció un ensayo en dos localidades de la región del Bío-Bío. En la localidad de Pinto se evaluó una dosis de 5×10^{10} conidias del aislamiento Qu-M845, las que fueron espolvoreadas sobre las abejas. Adicionalmente se evaluó la aplicación de Timol puro en una dosis de 80 gr colmena⁻¹. En el sector de Cato se evaluó la misma dosis anterior del aislamiento Qu-M845 aplicado como conidias estampadas sobre un soporte celulósico de 50 mm de diámetro, los que fueron ubicados en los panales. En ambas localidades se emplearon como testigos colmenas sin aplicación, y un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones. Se evaluó la caída de ácaros por 35 días, y los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante la prueba de Chi cuadrado ($P < 0,05$).

En la localidad de Pinto no se observaron diferencias significativas en la caída de varroa por la aplicación de Timol o Qu-M845. Sin embargo, en la localidad de Cato la aplicación del aislamiento Qu-M845 aumentó significativamente la mortalidad de ácaros respecto del control ($P < 0,05$). Estos resultados preliminares indican que es posible la obtención de un biopesticida, en base a hongo entomopatógenos, para el control de *V. destructor*, sin embargo es necesario seguir evaluando el comportamiento del aislamiento Qu-M845 bajo distintas condiciones ambientales y formas de aplicación.

¹ Centro Tecnológico de Control Biológico, Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Quilamapu.

www.controlbiologicochile.cl, mrodrigu@inia.cl

² Universidad Austral de Chile.a.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Varroa destructor* CON HONGOS ENTOMOPATOGENOS.

Marta Rodríguez S. y Marcos Gerding P.

Dpto. de Producción Vegetal, INIA-Quilamapu. E-mail: mrodrigu@inia.cl

Varroa destructor es un ácaro ectoparásito de la abeja de miel *Apis mellifera* que causa serios daños en la producción apícola tanto a nivel nacional como mundial.

Una alternativa promisoría que puede ayudar a reducir o eliminar los problemas causados por esta plaga es su control biológico por medio de microorganismos.

En Chile, el INIA Quilamapu, de Chillán, dispone de microorganismos entomopatógenos entre los que destacan 800 aislamientos de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, constituyendo la única colección existente en el país.

Con el propósito de encontrar aislamientos nativos de hongos entomopatógenos controladores de *Varroa destructor* se comenzó a desarrollar a partir del año 2005 un proyecto financiado por el Fondo para la Innovación Agraria (FIA), ejecutado por el INIA Quilamapu y la Universidad Austral de Chile.

La primera etapa del proyecto consistió en evaluar la biología termal de 31 aislamientos de *Beauveria bassiana* y 31 de *Metarhizium anisopliae* a 5 temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30, 35°C) para seleccionar aquellos capaces de soportar las temperaturas del nido de cría de las abejas (30-35 °C).

14 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y 4 de *Beauveria bassiana* seleccionados en la etapa anterior fueron evaluados aplicando directamente suspensiones de 10^7 conidias mL^{-1} para cada aislamiento sobre hembras adultas de varroa, con el sistema de pulverización de la torre de Potier. La mortalidad y esporulación sobre ácaros, fueron significativamente mayores con los aislamientos Qu-M845 y Qu-M326 de *Metarhizium anisopliae*. Ambos aislamientos fueron evaluados nuevamente aplicando 10^7 conidias mL^{-1} sobre 10 varroas foréticas mantenidas sobre abejas adultas confinadas con un trozo de panal en cajas de vidrio y conservadas en oscuridad a 25-30°C. La mortalidad de ácaros fue evaluada mediante la colecta de cadáveres en papel con vaselina. Los individuos muertos colectados fueron incubados en cámara húmeda para comprobar su muerte por hongo. De acuerdo a esto y a su inocuidad sobre abejas se selecciono la cepa Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* como la mas efectiva.

La evaluación en terreno de tres diferentes métodos de aplicación de una dosis de 5×10^5 conidias del aislamiento Qu-M845 por colmena, mostró diferencias importantes entre las colmenas no tratadas (testigo) y las colmenas sobre las cuales se pulverizo esporas. 14 días después de la aplicación, se apreció una diferencia de hasta 70.0% menos de infestación que la existente en las colmenas testigo.

Los resultados indican que es factible desarrollar un acaricida biológico a base de estos hongos pero, aun queda determinar la dosis exacta de producto, frecuencia y época óptima de aplicación además de medir su verdadero efecto sobre las abejas.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Varroa destructor* CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Marta Rodríguez y Marcos Gerding.

Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.

E-mail: mrodrigu@inia.cl

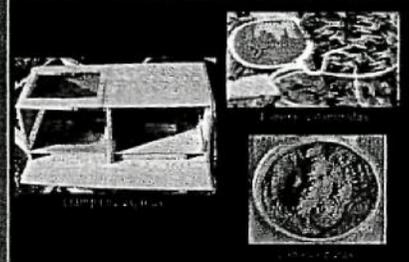
Introducción
Una alternativa promisorio para solucionar o reducir los problemas causados por *Varroa destructor* es el control biológico por medio de microorganismos. En Chile, el INIA Quilamapu, de Chillán, dispone de microorganismos entomopatógenos entre los que destacan 800 aislamientos de los hongos entomopatógenos (HEP) *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, constituyendo la única colección existente en el país. Antecedentes de control de varroa reportados en otros países con cepas de *Metarhizium*, motivaron la realización de un proyecto financiado por el Fondo para la Innovación Agraria (FIA), ejecutado por el INIA Quilamapu y la Universidad Austral de Chile.

Colección de Hongos Entomopatógenos INIA - CRI Quilamapu



Los métodos evaluados fueron: trampa de esporas, esporas estampadas y esporas puras aplicadas entre los panales, en dosis de 5×10^{10} conidias por colmena. Además de un control sin aplicación.

Antes de hacer las aplicaciones se determinó el porcentaje inicial de infestación por colmena (Figura 3).

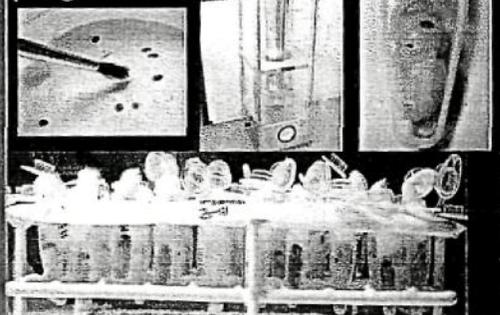


Este proyecto tiene por objetivo desarrollar un acaricida biológico para el manejo no contaminante de *V. destructor*, sobre la base de los HEP nativos.

Materiales y Métodos

Las primeras pruebas consistieron en evaluar la mortalidad de varroa con aislamientos de *Beauveria* y *Metarhizium* seleccionados por crecer a temperaturas de 30 a 35°C.

Pruebas de patogenicidad



Las pruebas se realizaron aplicando mediante el sistema de pulverización de Torre de Potter, suspensiones de 10^7 conidias mL⁻¹ de cada aislamiento, sobre varroas adultas colectadas desde terreno.

Luego las varroas inoculadas fueron mantenidas sobre pupas de zánganos.

Las varroas muertas fueron incubadas en cámara húmeda para comprobar su parasitismo por hongo.

De los aislamientos de *M. anisopliae* evaluados (Figura 1), 10 causaron algún grado de mortalidad, pero solo Qu-M845 y Qu-M326 presentaron índices altos de mortalidad, 80% y 75% respectivamente.

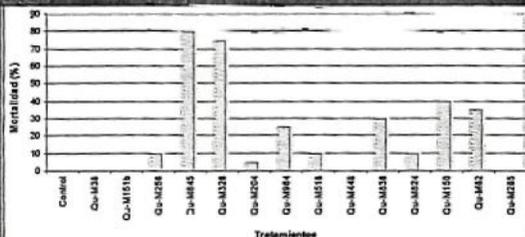


Figura 1. Mortalidad de *Varroa destructor* inoculadas con distintos aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

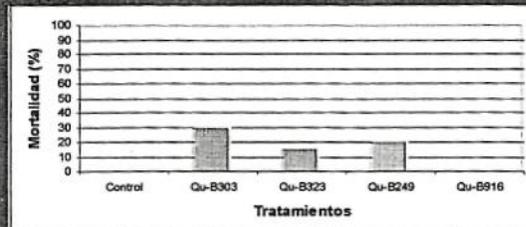


Figura 2. Mortalidad de *Varroa destructor* inoculadas con distintos aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Con el aislamiento Qu-M845 seleccionado por producir un alto porcentaje de mortalidad de varroas en laboratorio, se realizó un nuevo ensayo para evaluar el método óptimo de aplicación del hongo en terreno.

De los cuatro aislamientos de *Beauveria* evaluados, tres causaron mortalidad pero, en un bajo porcentaje, descartándose por tanto su uso para futuras aplicaciones.

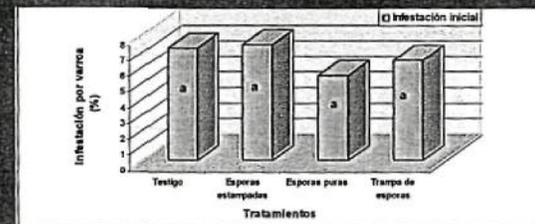


Figura 3. Niveles de infestación por *Varroa destructor* en colmenas de abejas.

Durante 21 días se evaluó la caída de ácaros en el piso de las colmenas (Figura 4). Las varroas encontradas, fueron incubadas en cámaras húmedas para detectar síntomas de parasitismo por hongo.

Se observaron diferencias importantes entre las colmenas tratadas con esporas puras y el resto de los tratamientos.

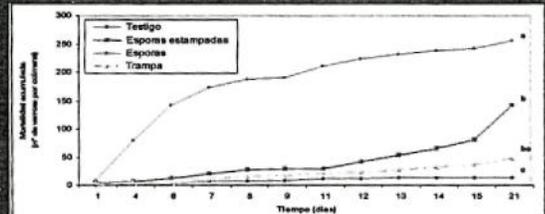


Figura 4. Mortalidad acumulada de *Varroa destructor* en colmenas tratadas con el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*.



Los cadáveres colectados desde el piso de las colmenas tratadas con la aplicación de esporas puras de aislamiento Qu-M845 mostraron síntomas de parasitismo y esporulación.

Varroas parasitadas por el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Al evaluar nuevamente los porcentajes de infestación en cada colmena se observó diferencias significativas entre las colmenas tratadas con hongo y el testigo a los 21 días de realizada la aplicación.

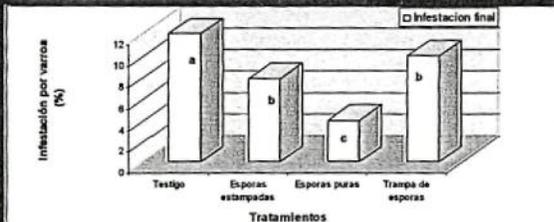


Figura 5. Niveles de infestación de *Varroa destructor* en colmenas tratadas con el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae*.

Control biológico de *Varroa destructor* con hongos entomopatógenos

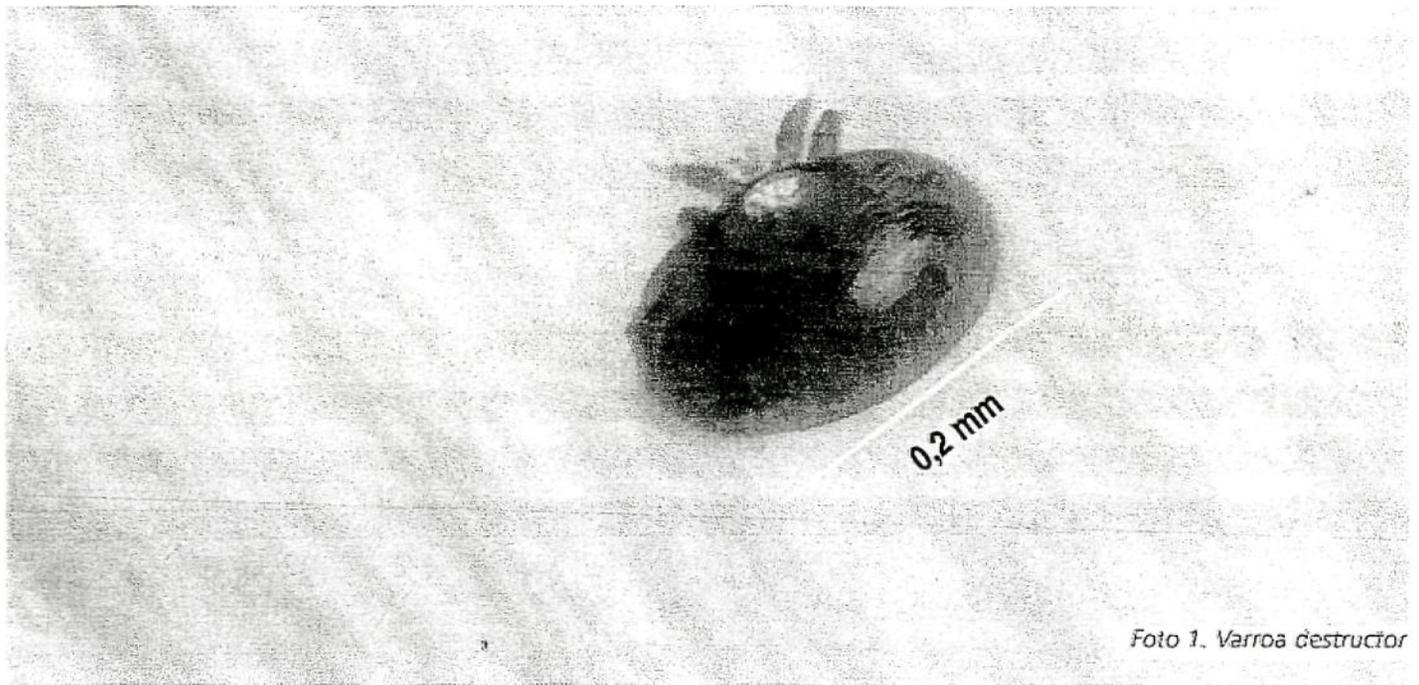


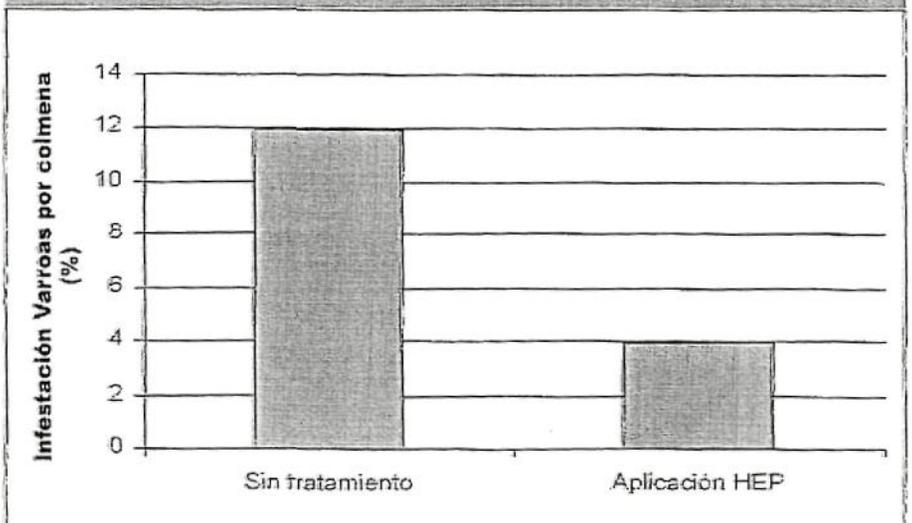
Foto 1. *Varroa destructor*

En el Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias -INIA-, se desarrolla un bioacaricida para el manejo no contaminante de *Varroa destructor* en colmenares comerciales, en base a hongos entomopatógenos chilenos.

El ácaro *Varroa destructor* (Acarí: Varroidae) es originario de Asia, donde parasita a la abeja *Apis cerana*. Debido a la trashumancia comenzó a parasitar a la abeja de miel *Apis mellifera* causando serios daños en los colmenares en todo el mundo. Desde su introducción a Chile, en el año 1992, se ha distribuido a casi la totalidad del país ocasionando graves pérdidas económicas entre los apicultores.

La enfermedad ocasionada por este ácaro (Varroasis) se inicia cuando la hembra fecundada de *V. destructor* abandona a la abeja adulta que ha parasitado y penetra en una celdilla de cría de abeja a punto de ser operculada. A las 48 horas de haber sido puestos los huevos nacen las ninfas del ácaro, las que comienzan a alimentarse de la hemolinfa de la cría

Figura 1. Infestación por *Varroa destructor* en colmenas tratadas y no tratadas con el aislamiento nativo Qu-M845 del hongo entomopatógeno (HEP) *Metarhizium anisopliae*.



de abeja.

En las abejas adultas, la hembra de *V. destructor* busca las zonas blandas para perforarlas y succionar la hemolinfa de su huésped, causando dos tipos de daño: un daño físico al disminuir el contenido de proteínas y un daño tóxico infeccioso, debido a la transmisión de microorganismos causantes de enfermedades virales y bacterianas.

Los acaricidas registrados en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para el control de la enfermedad son Amitraz (tiras), Bayvarol (Flumetrina) y flumetrina (tiras). Sin embargo, es factible encontrar resistencia a estos productos y además residuos de ellos en miel y cera cuando son aplicados indebidamente. Otra alternativa de control es el uso de aceites y ácidos orgánicos como el ácido fórmico, oxálico y el timol, los cuales han sido intensamente estudiados en Europa y Asia.

Una alternativa de control que aún no ha sido explotada es el uso de agentes de control biológico, práctica que en los últimos años ha cobrado creciente interés, debido a la preocupación por contar con nuevas formas de control de plagas no contaminantes y más amigables con el medio ambiente. Además, se dispone de más información sobre la biología y producción masiva de estos organismos, incluyendo los hongos que atacaban a la varroa.

Antecedentes sobre el uso de hongos entomopatógenos (HEP) señalan que es posible controlar ácaros en todos sus estadios, con hongos tales como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Ensayos de campo realiza-

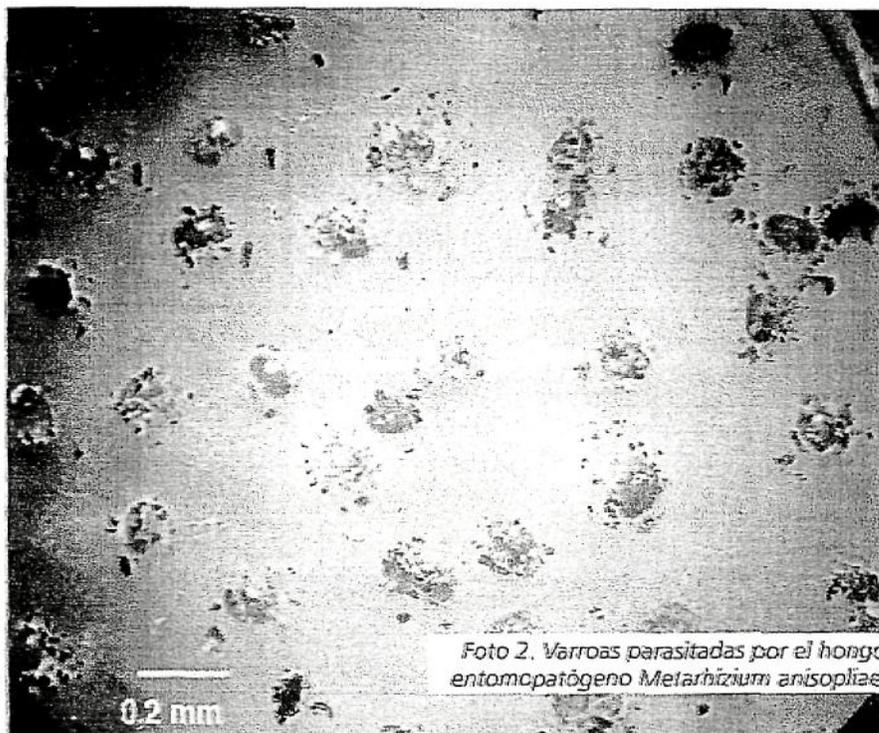


Foto 2. Varroas parasitadas por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

dos sobre colmenas de abejas en Estados Unidos han demostrado la capacidad de *M. anisopliae* para controlar *V. destructor*.

En Chile, desde el año 2005, el Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias -INIA-, (ubicado en el Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán) en conjunto con la Universidad Austral de Chile y con el apoyo del Fondo para la Innovación Agraria (FIA), han estado desarrollando el proyecto "Desarrollo de un acaricida biológico para el manejo no contaminante de *Varroa destructor* en colmenares comerciales", cuyo objetivo es establecer una



Imbatible Cydectin

Contra los parásitos más resistentes

FORT DODGE

Bayer





Bombas
Agitadores
Separadores
Sólido/Líquido

system
Keenan



también tenemos
**CARROS
ESTERCOLEROS**

Exclusiva
tecnología que
mantiene la
contextura
del alimento

Requiere poca potencia
Diseño de fácil mantenimiento
Carga directa: fardos res. y silo
Indicador de nivel y volumen
Descarga controlada
Gran capacidad de mercado
Modelos desde 3m3 a 25 m3

Jobe

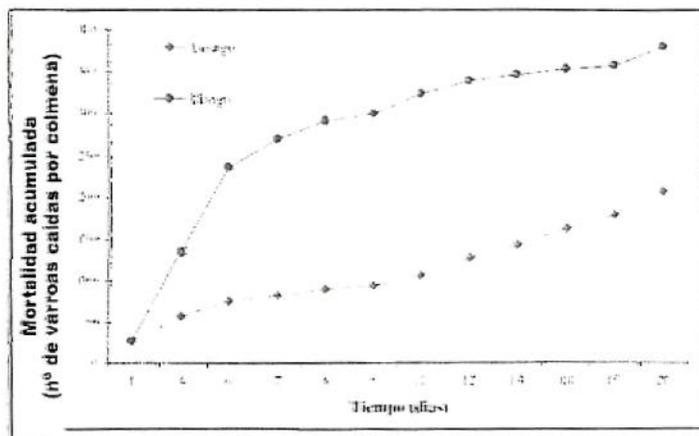


Construcción
compacta y
robusta,
resistente a
la corrosión.

AITEC
INNOVACION TECNOLÓGICA

Elíodoro Yañez 1812, Providencia, Santiago
Fono: 2-2049000 - Fax: 2-2045868 / www.aitec.cl

SER-CO



estrategia de manejo de varroa, mediante la elaboración y uso de un bioacaricida en base a HEP chilenos.

Hasta el momento los resultados obtenidos han permitido seleccionar un aislamiento del hongo *M. anisopliae* denominado Qu-M845, que en ensayos de laboratorio ha logrado un control del 98% de ácaros. Asimismo, en evaluaciones de terreno este aislamiento ha logrado un control de 67% de varroas cuando se aplicaron las esporas sobre y entre los panales de las colmenas en otoño (Figura 1 y 2). En aplicaciones en primavera este aislamiento incrementó la caída de varroa en un 50% en comparación a colmenas en las cuales no se aplicaron estas esporas.

La especificidad de este tipo de control asegura que su aplicación no dañará a las abejas. Lo anterior, junto con la capacidad patogénica del aislamiento seleccionado para el manejo de *Varroa destructor* y su tolerancia a las condiciones ambientales a las que será expuesto, permite considerar a los HEP como una nueva alternativa de control para esta plaga.

Glosario

Hemolinfa: sangre de los insectos.

Aislamiento: cepa de hongo entomopatógeno obtenida desde muestra de suelo o insecto parasitado. ¹³

EFICACIA DE *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL DE *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) EN COLMENAS DE ABEJAS (*Apis mellifera*)(Hymenoptera: Apidae).

Marta Rodríguez S¹, Nélida Molina², Marcos Gerding P¹ y M. Neira³.

¹Centro Tecnológico de Control Biológico, INIA-Quilamapu. E-mail: mrodriqu@inia.cl

²Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción Campus Chillan.

³Facultad de Agronomía, Universidad Austral de Chile.

El Centro Tecnológico de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, en conjunto con la Universidad Austral de Chile, se encuentran desarrollando un acaricida biológico en base a hongos entomopatógenos para el manejo de *V. destructor*, plaga clave en la producción apícola nacional y mundial. A la fecha se ha seleccionado el aislamiento Qu-M845 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, por su alto nivel de virulencia sobre la plaga. Con el objetivo de evaluar en terreno la efectividad de diferentes concentraciones de conidias estampadas con goma arábica en tiras de papel se realizó un ensayo en el cual se probaron concentraciones de 0, 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} y 5×10^{11} conidias por colmena utilizando además un tratamiento con ácido fórmico. El diseño experimental fue bloques completos al azar con 4 repeticiones (una colmena como unidad experimental). La evaluación se realizó midiendo la infestación por el ácaro con lo cual se calculó la efectividad de cada tratamiento. Los resultados obtenidos indican que se obtuvo una eficacia entre el 56 y 74% con los diferentes tratamientos de hongos siendo además similar estadísticamente a la alcanzada con ácido fórmico (79%) ($p < 0.05$).

Posteriormente, se realizó una nueva evaluación donde se midió el efecto de diferentes métodos de aplicación de la concentración de 5×10^{11} conidias por colmena sobre la actividad de las obreras para lo cual se midió el tráfico (entrada y salida de abejas desde la piquera) y el peso de cada familia al inicio y final del ensayo. El diseño utilizado fue bloques completos al azar con 4 repeticiones. Los tratamientos fueron esporas estampadas con goma arábica, esporas espolvoreadas, ácido fórmico y un control sin inóculo. Las evaluaciones indicaron que la actividad de las abejas no se afectaron por las aplicaciones del hongo, ni tampoco el peso de las colmenas. Se concluyó que el aislamiento Qu-M845 de *M. anisopliae* se presenta como una alternativa viable para el control de *V. destructor*.