

TOXICIDAD DE ACEITES ESENCIALES CON EFECTO FUNGISTÁTICO SOBRE *ASCOSPHAERA APIS* EN LARVAS Y ADULTOS DE *APIS MELLIFERA*, L.

Toxicity of Essential Oils with Fungistatic Effect on *Ascosphaera Apis* in Larvae and Adults of *Apis Mellifera*, L.

Albo GN¹, Reynaldi FJ², Yordáz M³, Henning C³

¹Curso de Producción Animal I. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. 60 y 119 (1900). La Plata. Argentina.

La Plata, ARGENTINA. E-mail: albograciela@lpsat.com

²CONICET. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. ³Curso de Química Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen *Los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas resultan una alternativa al uso de sustancias químicas ya que han demostrado ser eficaces para el control de las enfermedades de la abeja melífera. La cría yesificada es una micosis invasiva y altamente contagiosa producida por el hongo Ascosphaera apis Maassen ex Claussen (Olive & Spiltoir) que afecta las pupas de las abejas (Apis mellifera, L.). El objetivo del presente trabajo fue: 1) determinar la toxicidad larval en colonias de abeja melífera de dos mezclas de aceites esenciales: lemongrass-tomillo y lemongrass-tomillo-coriandro efectivas in vitro para el control de la cría yesificada, 2) determinar la toxicidad oral aguda (DL₅₀) de las mezclas, sobre abeja melífera adulta. Los resultados obtenidos demuestran que ninguna de las mezclas ensayadas fue tóxica para los estadios larvales de Apis mellifera L, a pesar que el lemongrass-tomillo se presentó como "levemente tóxica" en abeja melífera adulta*

Abstract *Essential oils extracted from aromatic plants result an alternative to the use of chemical substances since their efficiency in the control of honeybee diseases has been demonstrated. Chalkbrood is an invasive and contagious fungal brood disease caused by the spore-forming fungus, Ascosphaera apis Maassen ex Claussen (Olive & Spiltoir), which affects larvae of honeybees (Apis mellifera, L.). The objective of the present work was to determine: 1) larval toxicity in beehives treated with mixtures of essential oils (lemon grass-thyme and lemongrass- thyme and coriander) effective for in vitro control of chalkbrood and 2) oral acute toxicity (as LD₅₀) of these blends on adult honeybees. Results demonstrated that neither of the blends of essential oils were toxic for larvae of Apis mellifera L in spite of lemon grass-thyme mixture that presented a slight toxicity in adult bees.*

Palabras clave cría yesificada, aceites esenciales, toxicidad, larvas, *Apis mellifera* L.

Key Words chalkbrood disease, essential oils, toxicity, larvae, *Apis mellifera*, L.

INTRODUCCIÓN

La cría yesificada en la abeja melífera (*Apis mellifera*, L.) es una micosis invasiva y altamente contagiosa producida por el hongo *Ascosphaera apis* Maassen ex Claussen (Olive & Spiltoir) que afecta las pupas de las abejas (*Apis mellifera*, L.). Primeramente las pupas muertas en el interior de las celdas operculadas se cubren de un micelio algodonoso blanco, se secan y finalmente se transforman en momias negras o blancas. En la fase aguda de la enfermedad se observan momias en la entrada de la colmena, removidas por las abejas limpiadoras. La infección con cría yesificada ocurre, casi exclusivamente, cuando las larvas de 4 - 5 días de edad consumen las esporas de *Ascosphaera apis* (21). Posteriormente germinan y crecen dentro del ventrículo de la larva, generando micelio que cubre todo el cuerpo de la prepupa dentro de la celda operculada y que atraviesa la membrana peritrófica (29). En la hemolinfa, con mayor tensión de oxígeno esporula nuevamente cubriendo todo el cuerpo de la pupa, tomando un color verdoso – grisáceo, denominada “momia verde” (5).

La enfermedad raramente mata a una colonia (4; 36), pero la pérdida de cría lleva a una reducción de la población que influye negativamente en la producción de miel y en la eficiencia polinizadora (18). La infección con cría yesificada ha sido relacionada con factores de estrés y parece tener mayor prevalencia en la primavera, con el incremento del área de cría en la colonia (5).

El efecto de la enfermedad puede ser controlado con técnicas de manejo (20) que reducen el número de esporas de *Ascosphaera apis* en colonias infectadas.

La mayoría de los métodos de control de la ascosfaeriosis están basados en el uso de biocidas, que incrementan la mortalidad larval y causan malformaciones en adultos, cuando son expuestos en la etapa de larvas (31; 39; 32) y generan contaminación en la miel (16).

Los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas resultan una alternativa al uso de sustancias químicas, ya que han demostrado ser eficaces para el control de las enfermedades de *Apis mellifera* L. Han sido usados *in vitro* para el control de: *Pae-nibacillus larvae* (15; 3; 2; 13; 6; 30), *Ascosphaera apis* (38; 10; 8; 27) y *Varroa destructor* (37; 24; 25) Por otra parte se ha estudiado la toxicidad oral aguda de las esencias sobre abeja melífera adulta (1; 26) y sobre larvas (32). Otros autores han probado los aceites esenciales en colonias de abejas para el control de la ascosfaeriosis (7; 22), loque americana (1) y varroasis (24; 25).

Los objetivos del presente ensayo fueron: 1) determinar la toxicidad larval en colmenas de abeja melífera de dos mezclas de aceites esenciales y 2) determinar la toxicidad oral aguda (LD₅₀) *in vitro* de dos mezclas de los aceites esenciales sobre abeja adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales

Las especies seleccionadas para extraer los aceites esenciales fueron tomillo (*Thymus vulgaris* L., Fam. Lamiaceae), lemon-grass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., Fam. Poaceae), tagetes (*Tagetes minuta* L., Fam. Asteraceae) y coriandro (*Coriandrum sativum* L., Fam. Umbelíferae). El material verde fue colectado de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata Provincia de Buenos Aires (Latitud 35° S, Longitud 57° O). Las esencias fueron extraídas por el método de destilación por arrastre de vapor de agua en un destilador con trampa tipo Clevenger (17). En el caso del tomillo se utilizaron partes aéreas: hojas, flores y tallos; en el coriandro: el fruto y en el lemongrass sólo las hojas.

Toxicidad larval

Hasta el momento se han desarrollados muchas técnicas diferentes para determinar la mortalidad larval con el uso de productos de síntesis (42; 14; 34). En este trabajo se tomaron como base los trabajos de Fukuda & Sakagami (1968) y Pettis *et al* (2004), con modificaciones.

En noviembre de 2006, se realizó la homogeneización del apiario experimental sito en la localidad de “Los Talas”, Partido de Berisso; Provincia de Buenos Aires, Argentina (Latitud 34° S y Longitud 57° W). Se efectuaron 3 tratamientos con 3 repeticiones por tratamiento, totalizando 9 colmenas de *Apis mellifera* ligustica, provenientes de paquetes de abejas, con 4 cuadros de cría, 6 cuadros de abejas, 2 cuadros de miel y polen, y reinas de la misma madre.

Los tratamientos se aplicaron en forma de candies sobre los cabezales de los cuadros de la cámara de cría. Cada candy de 50 g estaba conformado por 40 g de sacarosa + 10 g glucosa + la correspondiente cantidad de la mezcla de esencias, para diluir las esencias.

Las dosis fueron calculadas en base a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada esencia

de la mezcla (28). Se efectuaron 3 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron: T₁ mezcla de lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) Fam. Poaceae, tomillo (*Thymus vulgaris* L.) Fam. Labiadas y coriandro (*Coriandrum sativum* L.) Fam. Umbeliferae. El candy fue formulado con 0,12 g de lemongrass, 0,12 g de tomillo, 0,12 g de coriandro, 9,64 g de glucosa y 40 g de sacarosa; T₂ mezcla de lemongrass y tomillo, efectuado con 0,45 g de lemongrass, 0,45 g de tomillo, 9,10 g de glucosa y 40 g de sacarosa; T₃ tratamiento testigo con 40 g de sacarosa y 10 g de glucosa. Posteriormente, los candies fueron envueltos en papel de aluminio y conservados en heladera hasta el momento de la colocación.

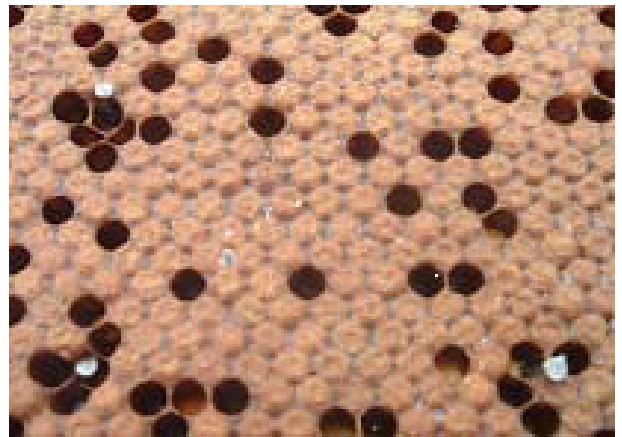
Metodología de campo: El día cero del experimento denominado 1° Inspección, se eligió un cuadro con cría abierta (14). Dentro del cuadro seleccionado se marcó con clavos una sección de 136 celdas donde debía existir tanto huevos como larvas chicas (33). Se obtuvo una foto digital de cada una de las 9 colmenas tratadas y se anotó la cantidad de celdas con huevos, larvas chicas, larvas grandes, celdas vacías y celdas con polen o néctar que había en el área marcada de forma de poder corroborar los datos obtenidos en el campo con las fotos que fueron procesadas en el laboratorio con los software (Corel PHOTO-PAINT 10, PhotoKodak®, Adobe photoshop 6.0) (Figura 1).

Figura 1. 1° Inspección. Sección de panal de cría con huevos y larvas chicas.



El día 7 post-tratamiento denominada 2° Inspección se consideró como cría viable la presencia de cría operculada que deviene de larvas de 1°-5° estadio (41) o larvas grandes que devienen de huevos de la semana anterior, en tanto que las celdas vacías con huevos y/o larvas chicas que en 1° Inspección tenían huevos a larvas, se contabilizaron como recambiadas (por muerte) (Figura 2).

Figura 2. 2° Inspección. Sección de panal de cría con cría operculada, huevos y larvas jóvenes



En el día 21 post-tratamiento denominada 3° Inspección se contabilizó la cantidad de cría nacida, o naciente, que existía en las áreas marcadas respecto a la 1° Inspección.

Análisis estadístico: La proporción de larvas muertas en la 2° Inspección respecto al número de larvas en la 1° Inspección fue transformada usando la transformación estándar arcoseno (seno^{-1} (raíz cuadrada de Y) (11; 43). Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de las transformaciones con un $p \leq 0,05$.

Toxicidad oral aguda *in vitro* de abejas adultas

En la primavera de 2005, se evaluó la toxicidad oral aguda de mezclas de aceites esenciales para abejas adultas, de acuerdo a las metodologías propuestas por ICBB (1985), Gough y col. (1994), Kraus y col. (1994) y Alippi y col. (1999) con modificaciones. El experimento fue conducido en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, La Plata 35° S latitud, 57° O longitud.

Se recolectaron abejas pecoreadoras del alza melaria de una colmena con reina y sin síntomas clínicos de enfermedades, sin emplear humo para evitar el consumo de miel y posterior rechazo del tratamiento a probar. Las abejas se anestesiaron con CO₂ y se colocaron de a 10 en frascos de prueba efectuando 10 repeticiones (10 frascos) por cada una de las concentraciones de las mezclas de esencias probadas. Se usó al frasco como unidad experimental. Las abejas se dejaron recuperar espontáneamente dentro de los frascos. Los frascos con abejas se mantuvieron en un ambiente oscuro con condiciones ambientales controladas (temperatura ambiente 25° C ± 2° C y humedad relativa de 65% ± 5%). Los frascos se ubicaron de manera

aleatoria sobre las mesadas de trabajo.

Las mezclas de esencias probadas y sus dosis se seleccionaron de acuerdo con resultados previos obtenidos *in vitro* (28). Las dosis fueron expresadas en microgramos de principio activo por abeja ($\mu\text{g p.a./abeja}$). Cada grupo de 10 abejas (frasco individual) se alimentó con 200 μl de una solución estéril de sacarosa al 50% p/v en alcohol 70° más la correspondiente dosis de la mezcla, de modo que cada abeja recibió *ad libitum* 20 μl de solución. Una vez que la dosis fue consumida (aproximadamente 5 horas) (3) se colocó en el alimentador una solución de sacarosa y agua, que fue repuesto en forma permanente. Se efectuaron 25 tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos y dosis probadas fueron: Tratamiento 1: lemongrass 33,3% - tomillo 33,3% - coriandro 33,3%): 0,12; 0,25; 0,50; 1; 2 y 4 $\mu\text{g p.a./abeja}$. Tratamiento 2: lemongrass 50% - tomillo 50%): 0,18; 0,37; 0,75; 1,5; 3 y 6 $\mu\text{g p.a./abeja}$. Tratamiento 3: testigo altamente tóxico (dimetoato): 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 $\mu\text{g p.a./abeja}$ y Tratamiento 4: testigo no tóxico conformado por sacarosa al 50% (p/v) en solución acuosa. En todos los casos la evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 h, contando el número de abejas muertas por frasco.

Análisis Estadístico: Con los valores obtenidos se calcularon los valores de LD_{50} (*dosis letal media*) (11), que se define como la dosis de biocida necesaria para que muera la mitad de la población

en estudio. El cálculo de la LD_{50} se obtiene trazando una horizontal desde $y=0$ en abscisas y, en el punto de corte, es donde se halla el valor buscado. Sobre una población de insectos se puede definir una cierta distribución de niveles de tolerancia.

Este modelo de regresión *probit* para las relaciones entre las distribuciones de muertos y las distribuciones de insecticida, surge como resultado directo de asumir la condición de normalidad de la distribución de las tolerancias (12; 40; 43).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toxicidad larval

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de mortalidad larval entre los tratamientos probados ($p = 0,43$). Asumiendo que la tasa de mortalidad normal para larvas de abejas puede llegar hasta un 14% (14) y teniendo en cuenta los porcentajes de mortandad encontrados en este ensayo, se ve claramente que ninguna de las mezclas probadas ni el testigo supera esos valores en la 1° inspección (Figura 3).

Asimismo, la mortandad que existió entre la 2° y la 3° Inspección fue, para todos los tratamientos, inferior a la tasa normal de mortandad para cría operculada propuesta por Fukuda & Sakagami (1968).

Algunos investigadores han demostrado que

Figura 3. Diagrama Box Plot que exhibe el porcentaje de la mortalidad larval después de 7 días (1° inspección) bajo diversos tratamientos (mezcla de aceites esenciales de lemongrass-tomillo y lemongrass-tomillo-coriandro)

