

## EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Metarhizium* sp. PARA EL CONTROL DE HORMIGA ARRIERA *Atta colombica* GUERIN EN CONDICIONES DE LABORATORIO

## EVALUATION OF *Metarhizium* sp. ISOLATES FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Atta colombica* GUERIN UNDER LABORATORY CONDITIONS

KARINA QUIROZ MENA\*, SANDRA VICTORIA MENA CÓRDOBA\*, RODRIGO ESCOBAR DURÁN\*

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad de virulencia de cuatro cepas (HEP-UTCH, 00013, HEP-UTCH 00003, HEP-UTCH 00016, HEP-UTCH 00015) de *Metarhizium* sp sobre individuos de hormiga arriera *Atta colombica* en condiciones de laboratorio. Las cepas de hongos entomopatógenos se aislaron a partir de individuos muertos encontrados en los desechos de hormiga arriera *Atta colombica*. Para la evaluación se aplicó una suspensión  $1 \times 10^7$  conidias/ml por contacto directo sobre los individuos. El análisis de la prueba de supervivencia Kaplan and Meier, mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo. La cepa HEP-UTCH 00003 arrojó un 100% de mortalidad después de cuatro días de aplicado el tratamiento y provocó un 100% de hormigas con presencia de micelio entre los días dos y cinco después de la muerte de éstas, lo que indica que la cepa HEP-UTCH 00003 se podría considerar como la más efectiva para el control biológico de *Atta colombica*.

**Palabras clave:** Control biológico; Hongo entomopatógenos; *Metarhizium* sp; Cepa; *Atta colombica* G.

### ABSTRACT

We evaluated the virulence of four *Metarhizium* species (HEP-UTCH 00013, HEP-UTCH 00003, HEP-UTCH 00016, HEP-UTCH 00015) in *Atta colombica* individuals, under laboratory conditions. The isolates of Entomopathogenic fungi were obtained from dead individuals found in the *Atta colombica* refuges. We applied a concentration  $1 \times 10^7$  c/ml over ant individuals through direct contact. Then we realized a survival test analysis (Kaplan and Meier). That shown remarkable differences between treatments and control. The isolate HEP-UTCH 00003 caused 100% of mortality beginning in fourth and/or fifth day after treatment application. After ants individuals dies due infection, it was 100% production of conidia from days two and five. We concluded that HEP-UTCH 00003 might be considered as the most effective isolate for the biological control of *Atta colombica*.

**Keywords:** Biological control; Entomopathogenic fungi; *Metarhizium* sp; Isolates; *Atta colombica* G.

### INTRODUCCIÓN

La importancia económica de la hormiga arriera se relaciona con el daño que ocasiona a las plantas cultivadas, que consiste en su defoliación total o parcial. En el departamento del Chocó las especies con mayor capacidad de corte, pertenecen a los géneros *Atta* (*A. colombica* Guerin, *A. cephalotes* Linnaeus) y *Acromyrmex* (*A. octospinosus*). Estos insectos ocasionan daño sobre todo a cultivos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), banano

(*Musa acuminata* Colla), plátano (*Musa balbisiana* Colla), árbol del pan (*Artocarpus altilis* (S. Park Fosb), entre otras (Escobar *et al.* 2002 a).

Aunque en Colombia no se han hecho estudios que permitan cuantificar con precisión las pérdidas económicas causadas por las «arrieras», en la región chochoana más de 50% de las especies vegetales son forrajeadas por las hormigas arrieras, que muestran una mayor preferencia por los cultivos que se encuentran en huertos habitacionales, azoteas, fin-

\* Grupo de Investigación Sistemas Productivos, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Colombia.  
e-mail: quirozka@hotmail.com juvisa78@hotmail.com rodesdu@hotmail.com  
Fecha de recibido: Julio 29, 2010 Fecha de aprobación: Noviembre 2, 2010

cas tradicionales, etc., se demuestra así su abundancia en las áreas agrícolas (Escobar *et al.* 2002a).

Para el control de las hormigas cortadoras de hojas se usan sobre todo insecticidas químicos (sulfuramida); sin embargo, su baja especificidad, alta toxicidad, efectos adversos en el ambiente y la generación de poblaciones de insectos resistentes (Hebling *et al.* 1996), llevan a considerar el uso de agentes biológicos para su control (Ortiz y Orduz 2001), que incluye hongos, nematodos entomopatógenos, virus, bacterias, plantas con potencial fungicida, que son los principales mecanismos que se emplean para controlar plagas porque la mayoría de los insectos que causan daño a las plantas cultivadas son susceptibles a enfermedades causadas por este tipo de microorganismos y a plantas con potencial fúngico.

A pesar de los importantes avances en el control microbial en Colombia, en el departamento del Chocó, aún son escasas esta clase de estudios, pero se pueden destacar los esfuerzos realizados por Escobar *et al.* (2002c), que evaluaron el efecto de aplicación de cebos botánicos y hongos sobre la actividad de forrajeo de la hormiga arriera (*Atta colombica* y *Atta cephalotes*) preparados de manera artesanal con *Tithonia diversifolia*, *Clibadium asperum* y *Phyllanthus acuminatus* y tres productos biológicos comerciales a base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma lignorum*; las especies vegetales y hongos que se utilizaron disminuyeron la actividad de forrajeo de la hormiga arriera a partir de la primera semana después de la aplicación hasta la sexta y séptima semana, respectivamente.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la acción patogénica de cuatro cepas (HEP-UTCH, 00013, HEP-UTCH 00003, HEP-UTCH 00016, HEP-UTCH 00015) de *Metarhizium* sp nativas del municipio de Lloró-Chocó, sobre hormiga arriera *Atta colombica* Guerin bajo condiciones de laboratorio, con el fin de contribuir con el manejo de esta plaga.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron salidas de campo al Centro Multi-propósito de la Universidad Tecnológica del Chocó (CMUCH), ubicado en el municipio de Lloró, sobre la margen derecha del río Atrato; geográficamente está a los 5°30'52", 37" de latitud norte y a los 76°33'33", 15" de longitud al oeste de Greenwich. Las exploraciones en este centro se hicieron con el fin de buscar hormigueros de donde se extrajeron la hormiga reina, una porción del hongo simbionte (*Leucoagaricus gongylophorus*) y algunos individuos (obreras) de *Atta colombica*; después, todos los organismos que se colectaron se trasladaron a la Universidad Tecnológica del Chocó, y se situaron en un hormiguero artificial (cámaras con una base de arcilla), que se mantuvo a una temperatura entre 23°C y 25°C, humedad relativa de 86% y un periodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad; como sustrato para el crecimiento del hongo simbionte se suministraron diariamente hojas de *Zysigium malaccense* (marañón) y *Manihot esculenta* (yuca).

Para el aislamiento de las cepas, se colectaron alrededor de dos libras de desechos de *Atta colombica* Guerin en el CMUCH y se extrajeron los individuos de hormiga arriera muertos. Los individuos hallados se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.05% durante un minuto para eliminar los contaminantes externos de la muestra; luego se enjuagaron con abundante agua destilada estéril para quitar los residuos de hipoclorito de sodio. Se depositaron durante ocho días en cámaras húmedas y una vez se presentó la manifestación del micelio, se efectuó el aislamiento; las cepas de hongo aisladas se transfirieron por triplicado a cajas de Petri con medio de cultivo Algar dextrosa de Sabouraud (ADS), hasta que se lograron los cultivos puros, siguiendo la técnica descrita por Calle (2000). La identificación de las cepas puras se realizó considerando las estructuras reproductivas, de acuerdo con Bidochka *et al.* (1998), las claves de Samson (1981) y Harper y Haung (1986), y con la ayuda de expertos en el tema.

**Preparación de la solución madre de esporas.**

Una vez finalizó el período de esporulación de las cepas, se tomó un beaker de 250 ml, con un volumen de agua destilada estéril de 50 ml; para facilitar la remoción del inoculo y la obtención de una solución homogénea, se agregó 0.05% de solución Tween al 80%. Luego, con una cámara de Neubauer y con un microlitro de la solución madre, se determinó la concentración ( $1 \times 10^7$  conidios/ml) con la fórmula de Goettel e Inglis (1997).

$$NC = (SC / 5) * 50000$$

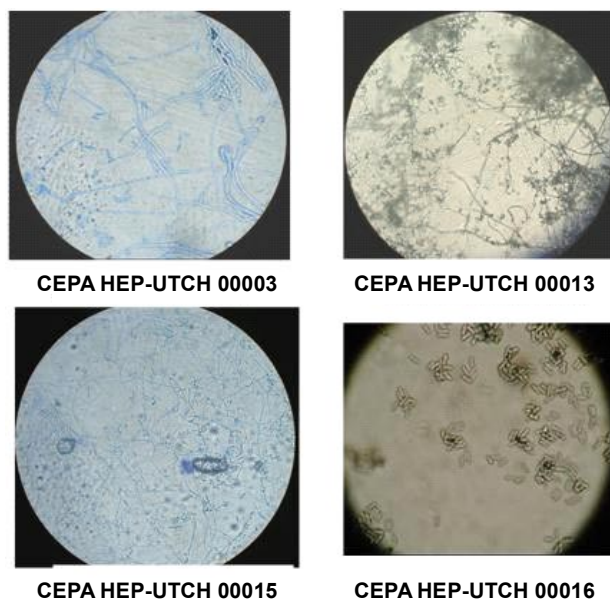
donde:

NC= Número de conidias/ml de suspensión

SC= Sumatoria de las conidias contenidas en los cinco cuadros de lado de la cámara de Neubauer

**Montaje del bioensayo.** Las cuatro cepas de hongo aisladas se evaluaron en una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml; para los tratamiento (cepas y testigo) se utilizaron tres repeticiones para cada uno, cada repetición con 20 individuos de hormiga arriera (casta cortadoras) y su respectivo testigo. En el bioensayo, se agregaron sobre una caja de Petri 8 ml de la suspensión de esporas. Después se dispusieron 20 hormigas durante un minuto para el contacto tarsal, luego se trasladaron a las cajas de Petri definitivas con papel filtro humedecido antes con un ml de agua destilada estéril; este procedimiento se realizó para cada una de las cepas a evaluar. Por último, se expusieron las hormigas a 12 horas luz/12 horas oscuridad y una temperatura entre 24°C y 26°C. Los individuos muertos se extraían todos los días y se ubicaban en cámara húmeda a una temperatura de 25°C durante ocho días, para favorecer la esporulación del hongo, con la que se verificó la muerte por el mismo (mortalidad intrínseca).

Se observó la supervivencia durante ocho días y se registró el número de individuos muertos por día; con esta información se calculó el porcentaje de mortalidad diaria y acumulada mediante la curva de supervivencia de Kaplan y Meier; además se calcu-



**Figura 1.** Vista microscópica de las cepas de *Metarhizium* sp.

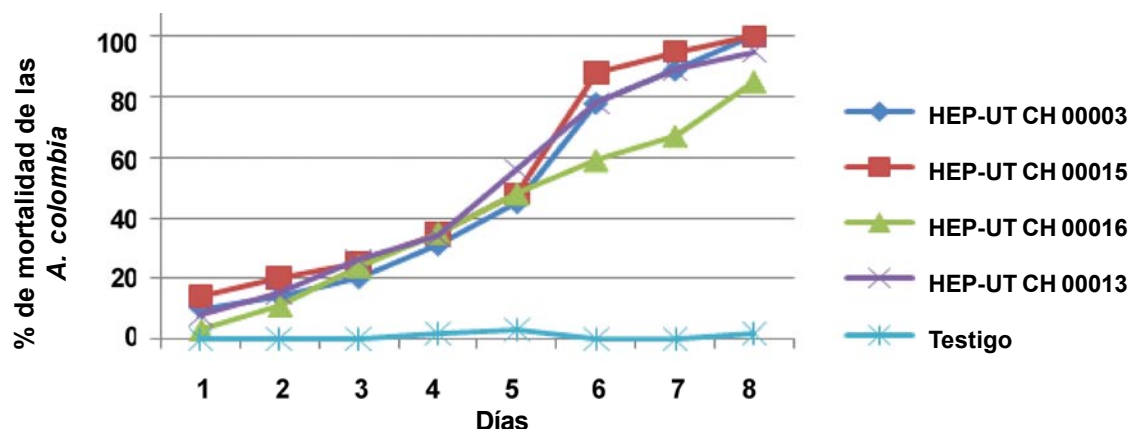
ló el TL50 (tiempo letal medio) mediante el análisis de regresión de Probit.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Identificación de las cepas.** Las cuatro cepas que se aislaron corresponden al género *Metarhizium* sp y se catalogaron como: cepa HEP-UTCH 00003, cepa HEP-UTCH 00013, cepa HEP-UTCH 00015 y la cepa HEP-UTCH 00016 (Figura 1).

Macroscópicamente las cepas presentaron una textura polvorosa, en vez de coloración verde y superficie lisa. Al inicio del crecimiento exhibieron colonias o cespel micelial de color blanco, después se presentaron varias masas conidiales de coloración amarilla y verdosa; a medida que maduraron las cepas, se tornaron de una coloración verde-olivo oscuro sobre los bordes; se notó de manera gradual una variación cromática entre las etapas de crecimiento micelial (blanco-amarillo-verde).

**Patogenicidad de las cepas de *Metarhizium* sp sobre los individuos de *Atta colombica*.** Las mortalidades de las cepas de *Metarhizium* sp evaluadas en individuos de *Atta colombica* Guerin,



Gráfica 1. Área bajo la curva del número de individuos muertos de *Atta colombica*, después de aplicadas las cepas de *Metarhizium sp.*

presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo ( $p < 0.0001$ ); éstas mostraron niveles de mortalidad superiores al 95%. Las cepas HEP-UTCH 00003 y HEP-UTCH 00015 produjeron un 100% de mortalidad, mientras la cepa HEP-UTCH 00013 produjo el 97.5% y por último, la cepa HEP-UTCH 00016 causó 95.8% de mortalidad (Gráfica 1). Estos resultados se relacionan con los encontrados por López y Ordúz (2003), quienes evaluaron aplicaciones en laboratorio y campo, cebos que contenían *Metarhizium sp* cepa M-137 y *T. viride*, cepa T-26 antagonista del hongo simbionte de *A. cephalotes* o una combinación de ambos, obteniendo un 100% de mortalidad ocho días después de aplicados los tratamientos.

Villani *et al.* (1992) citados por Parada (1999), mencionan que «con este hongo (*Metarhizium sp*) se pueden alcanzar niveles altos de mortalidad de insectos en laboratorio»; sin embargo, el control de poblaciones en campo es menos efectivo. Además, cuando un aislamiento proviene del mismo insecto sobre el que se desea conocer su efecto, es más patogénico que los aislamientos de hongos obtenidos de insectos diferentes, porque puede existir cierta especificidad entre el hongo y su huésped (López 1994). Ésta puede ser la razón por la que las cepas de hongo *Metarhizium sp* presentaron porcentajes superiores de mortalidad.

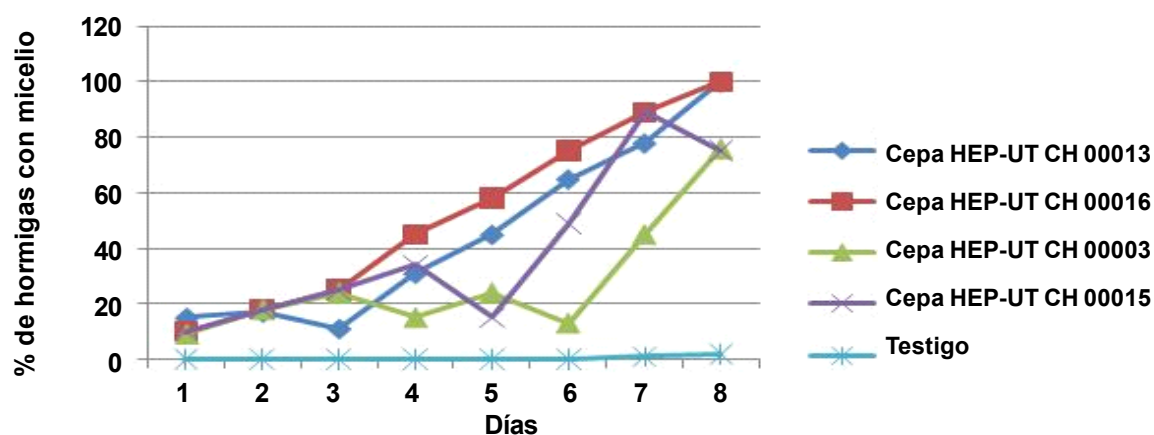
Contrario a lo que se observó en las hormigas infectadas con las cepas, en el testigo se registró mortalidad con porcentajes inferiores a 7%, lo que indica efectividad de los tratamientos y que la mortalidad de los insectos se dio por la aplicación de los hongos; en las arrieras vivas (testigo) no se observaron cambios en el comportamiento. La mortalidad en el tratamiento testigo se puede atribuir a diferentes causas como manipulación y causas fisiológicas como la inanición (Alcalá de Marcano *et al.* 1998).

**Determinación del  $TL_{50}$  (tiempo letal medio).**

Los tiempos letales medios fluctuaron entre dos a cuatro días para los tratamientos evaluados. La cepa con menor tiempo letal fue el aislamiento HEP-UTCH 00003 con 2.5 días, mientras que la HEP-UTCH 00015 tuvo una  $TL_{50}$  de 3.8 días, seguido de HEP-UTCH 00013 con 3.2 días y por último, HEP-UTCH 00016 tardó cuatro días para matar el 50% de los individuos de hormiga arriera infectados; esto permitió observar diferencias en las curvas de supervivencia según el tratamiento (cepas), porque el tiempo se considera como real de respuesta al agente (Matthews 1997).

**Capacidad de conidiación de las cepas de *Metarhizium sp.***

Las cepas HEP-UTCH 00003 y HEP-UTCH 00015 tuvieron una conidiación de



Gráfica 2. Cambio diario en el crecimiento del micelio sobre individuos de *Atta colombica*.

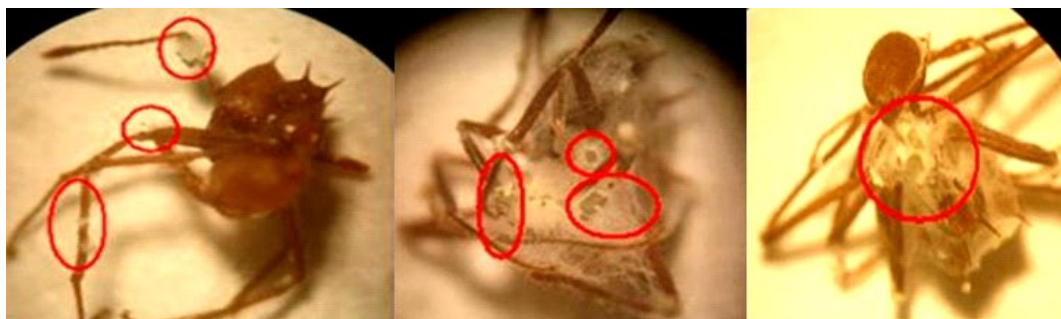


Figura 2. Individuos de *Atta colombica* G muertos y esporulación de las cepas sobre el integumento de estos.

100% de los individuos tratados, mientras que HEP-UTCH 00013 presentó 84.2 % y HEP-UTCH 00016 un 81.7% de conidiación sobre las hormigas muertas (Gráfica 2). El hecho de que las cepas esporulen los cadáveres y tengan una capacidad de conidiación alta es de gran importancia, porque la transmisión de la micosis a partir de hormigas arrieras enfermas sería una forma exitosa de acceder a las partes del hormiguero, que no son accesibles por tratamiento directo; además se considera que los hongos entomopatógenos son los de mayor interés para el control, dada la capacidad de infección directa a los insectos a través de la penetración de la cutícula y a los múltiples mecanismos de acción que ejerce, lo que les confiere alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Da Silva y Bittencourt 2006).

Las hormigas muertas presentaron esporulación de manera progresiva cada día hasta cubrir todo el

cuerpo del insecto, la invasión se presentó sobre todo en las áreas intersegmentales como lo mencionan Tanada y Kaya (1993), comenzando en las patas, antenas e incluso en la región anal y bucal; esto concuerda con lo propuesto por Legar (1993) quien expresa que el proceso de esporulación parte de la emergencia de las hifas que crecen fuera del integumento. Se observa primero el micelio en las articulaciones y partes blandas del insecto y en días posteriores se incrementa en todo el cuerpo hasta cubrirlo (bajo condiciones de humedad relativa alta) (Figura 2).

En el tratamiento testigo dos hormigas muertas (3.3%) presentaron conidiación; esto se debió quizás a que por la volatilidad de las conidios, se pudieron haber contaminado algunos individuos o porque no fue suficiente el proceso de desinfección.

Los resultados hallados en esta investigación indi-

can que HEP-UTCH 00003 del hongo *Metarhizium* sp es la más opcionada como potencial biológico de las hormigas cortadoras de hojas *Atta colombica* G, tomando como criterio la sobrevivencia o mortalidad, el TL50 y la conidiación del hongo en el cadáver. Sin embargo, los otros aislamientos también presentaron resultados promisorios para el control de esta plaga. Según Ordúz y López (2001) los aislamientos de *Metarhizium* sp pueden tener algunas características propias de la adaptación al huésped que las haga más eficientes en el control biológico de las hormigas.

### CONCLUSIONES

Las hormigas *A. colombica* presentaron mayor susceptibilidad a las cepas HEP-UTCH 00003 y HEP-UTCH 00015 en condiciones constantes de humedad y temperatura. La concentración que se empleó, tuvo efectos significativos en la disminución de la supervivencia de los individuos, convirtiendo estas cepas en agentes viables para el control de la hormiga arriera en el departamento del Chocó y microorganismo de interés para la actividad agrícola; dada la capacidad de conidiación de estos aislamientos se establecen como fuente potencial de infección y factor importante para la diseminación de la micosis en campo, a partes del hormiguero que no son accesibles por tratamiento directo.

La obtención de las cepas de *Metarhizium* sp a partir de los cadáveres de hormigas *Atta colombica*, demostró la muerte de estos insectos por acción del hongo, constituyéndose éste en agente promisorio para el control de *A. colombica*, dada la capacidad de los aislamientos para matar y producir conidiación a las hormigas. Sin embargo, es necesario realizar pruebas en campo para determinar el comportamiento del hongo y la patogenicidad del mismo.

El reconocimiento de los enemigos naturales de plagas como la hormiga arriera o cortadoras de hojas, es fundamental para el manejo integrado de estas y reemplazar y/o complementar el uso de insectici-

das. Además se fundamenta como una herramienta, que beneficia de manera directa a los agricultores, a través de unos mejores resultados para el control y manejo de la arriera, y los consumidores al disponer de unos alimentos libres de tóxicos; estos tipos de controles son amigables con el medio ambiente.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los integrantes del Grupo de Investigación Sistemas Productivos por su apoyo y colaboración para la realización de este proyecto; al Grupo de Investigación en Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional, Bogotá, en especial al profesor Daniel Uribe Vélez por su colaboración.

### LITERATURA CITADA

- Alcalá de Marcano, D, Marcano, J. A., Morales, M. 1998. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *paecilomyces fumosoroseus* sobre adultos del picudo de la batata *Formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). En línea [fecha de acceso: 3 de junio de 2008]. URL disponible en: <http://www.revfacagrnluz.org.ve>
- Barnett, H. L., B. B. Hunter. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3th ed. Minneapolis: Burgess Publ Co; 241 p
- Calle, J. 2000. *Vers un contrôle microbiologique des populations colombiennes de Triatominae, insectes vecteurs de la maladie de Chagas*. Tesis presentada para obtener el título de Doctor de la Universidad de París V. Univ. De Paris V. Rene Descartes, Facultad de Medicina Necker; p. 45-53.
- Escobar, R., García, F., Neita, J., Murillo, D., Mena, S. 2002a. Hormigas cortadoras de la tribu *Attini* en sistemas productivos del departamento del Chocó. *Revista institucional Universidad Tecnológica del Choco*. 15: 35-45.
- Gaytán, J. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos (*Hyphomycetes*) de suelo y termitas (Isoptera: Rhinotermitidae) en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tecomán: Universidad de Colima; Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Goettel, M., Inglis, G. D. 1997. *Fungi Hyphomycetes. Manual of techniques in insect pathology*. New York: Academic Press; p. 213-49.

- Hebling, M. J., Maroti, P. S., Bueno, O. C., Da Silva, O. A., Pagnocca, F. C. 1996. Toxic effects of leaves of *Riemus communis* (Euphobiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Bull Entomol Res.* 86: 253-6.
- Legar, S.T.1993. *Biology and mechanisms of insect-cutiele invasión by Deuteromycete fungal pathogens. Parasites and pathogens of insects.* New York: Academic Press, Inc; p. 211-25.
- López, J. C. 1994. Efecto patogénico de cuatro aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals) Bulli (Hyphomicetes) sobre larvas de *Bombix mori* (L.) (Lepidóptero: Bombycidae) en laboratorio. *Rev Colomb Entomol* 20 (1): 53-60.
- López, E., Orduz, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan efectivamente la hormiga cortadora de hojas *Atta cephalotes*. Medellín: Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); 22 p.
- Matthews, G. A. 1997. *Techniques to evaluate insecticide efficacy en: methods in ecological y agricultural entomology.* Cambridge: CAB International; p. 243-69.
- Orduz, S., López, E. 2001. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nest of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological control.* En línea. [fecha de acceso: 23 de julio de 2008]. URL disponible en: <http://www.sciencedirect.com>
- Ortiz, A., Ordúz, S. 2001. *In vitro* evaluation in *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. *Mycopathology.* 150: 53-60.
- Parada, J. 1999. *Potencialidad de los hongos entomopatógenos para el manejo de gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleóptera: Melolonthidae) en el cultivo del maíz.* Tesis Msc. Estado de México, Colegio de post graduados. Instituto de enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 73 p.
- Tanada, Y., Kaya, H. K. 1993. *Insects pathology.* San Diego: Academic Press, Inc; p. 35.