

# Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*)\*

Feasibility of the *Metarhizium anisopliae* fungus to be used as a biological control of the "arriera" ant (*Atta cephalotes*)

**Yuly A. Lemus, Ginna M. Rodríguez,  
Raúl A. Cuervo, Jorge Antonio Durán Vanegas,  
Claudia Liliana Zuluaga, Gloria Rodríguez**

## Resumen

Las hormigas del género *Atta cephalotes*, exclusivas de regiones tropicales y subtropicales, se reportan como una de las plagas más importantes de Suramérica y Colombia. El manejo de este insecto se ha fundamentado en el uso de insecticidas químicos; sin embargo, su baja especificidad, alta toxicidad, efectos desfavorables para el ambiente y la generación de poblaciones de insectos resistentes, han llevado a considerar el uso de biocontroles para su manejo.

En este documento se reportan estudios macro y microscópicos del cultivo y crecimiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, cuya efectividad ha sido estudiada desde hace más de un siglo, que permiten la identificación fúngica, además de las pruebas de viabilidad y patogenicidad de un insecticida biológico para el control de la hormiga arriera.

**Palabras clave:** *Metarhizium anisopliae*, hormiga arriera, *Atta cephalotes*, cultivos fúngicos.

• Fecha de recepción del artículo: septiembre de 2007 • Fecha de aceptación: abril de 2008.

**YULY A. LEMUS**, E-mail: yalemus@usbcali.edu.co, **GINNA M. RODRÍGUEZ**, E-mail: ginnaencali85@hotmail.com, estudiantes programa Ingeniería Agroindustrial, Universidad de San Buenaventura Cali

**RAÚL A. CUERVO**, E-mail: racuervo@usbcali.edu.co, **JORGE ANTONIO DURÁN VANEGAS**, jaduran@usbcali.edu.co, **CLAUDIA LILIANA ZULUAGA**, clzgutie@usbcali.edu.co, **GLORIA RODRÍGUEZ**, cgcrodri@usbcali.edu.co, docentes investigadores tiempo completo, programa de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de San Buenaventura Cali; integrantes del grupo de investigación Biotecnología, Universidad de San Buenaventura Cali.

\* Artículo, producto del proyecto "Elaboración de un insecticida biológico a partir del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*):

## Summary

The ants of the *Atta cephalotes* genre, born in the tropical and subtropical regions, are reported as one of the most important plagues in South America and Colombia. The handling of this insect has been based on the use of chemical insecticides. Nevertheless, their low specificity, high toxicity, unfavorable effects for the atmosphere, and the generation of resistant insects, have made the experts consider the use of bio-controls for their handling. This document reports some macro and microscopic studies of the culture and growth of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* fungus, whose effectiveness has been studied for more than a century. These studies allow the identification of the fungus in addition to the tests of viability and pathogenicity of a biological insecticide for the control of this ant.

**Key words:** *Metarhizium anisopliae*, “arriera” ant, *Atta cephalotes*, fungicide crops.

## Introducción

Las hormigas arrieras cortadoras de hojas (*Atta cephalotes*), son una de las plagas económicamente más perjudiciales en la agricultura, consideradas entre las más importantes de Suramérica y Centroamérica, las cuales para su control han presentado grandes complicaciones, principalmente por el comportamiento alimenticio nocturno del adulto, su adaptación a diferentes ecosistemas, la compleja composición social y la ineficacia de los insecticidas químicos, los cuales se han limitado debido a su contaminación ambiental y baja especificidad. Por esto, es necesario el desarrollo de nuevos métodos y productos para el control de la hormiga, tal como el uso de enemigos naturales, entre los que se encuentra el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

Es un hongo perteneciente a la familia *Moniliaceae*, que se caracteriza por presentar conidióforos libres y expuestos, lo que facilita la dispersión de las conidias y la infección de insectos sanos, prolongando la presencia del entomopatógeno en terreno.<sup>1</sup>

El primer ataque reportado a este insecto por el hongo *Metarhizium anisopliae* en Colombia se realizó en Chinchiná, debido a una infección natural en nidos que habían sido tratados con clorpirifos, donde se encontraron hembras aladas moribundas con signos de la enfermedad como crecimiento micelial.<sup>2</sup>

Este trabajo estudiará un hongo entomológicamente capaz de infectar por medio de esporas a la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). Para esto se desarrollará en el laboratorio de microbiología de la Universidad de San Buenaventura una metodología que permita el sembrado en medios específicos para el hongo adquirido de la ATCC (American Type Culture Collection), cepa MYA #1376. Este estudio servirá de base para posteriores investigaciones donde se inoculará el hongo a la hormiga y se comprobará su carácter formicida en campo.

## Materiales y métodos

**Organismos:** Para los estudios de crecimiento y determinación de esporas fúngicas se utilizó la cepa de *M. anisopliae* (MYA # 1376) obtenida de la American Type Culture Collection.

**Medio de crecimiento:** Para el crecimiento fúngico se utilizó el medio sugerido por la American Type Culture Collection (ATCC) conocido como PDA y el cual está compuesto por (g/litro de agua destilada): polvo de papa (300 g), glucosa (20 g), agar (15 g). El medio se agitó y calentó hasta obtener una suspensión homogénea que se colocó en autoclave por 20 minutos a 121 °C y 15 Lb de presión.

Posteriormente, se vertió de 10 a 20 centímetros cúbicos de agar en cajas de petri previamente esterilizadas y se taparon para esperar a la solidificación del medio de cultivo.

La cepa creció en el medio de cultivo anteriormente descrito a una temperatura aproximada de 27°C, durante 6 días (144 horas), con un fotoperíodo de 12:12 y una humedad relativa 50±10 %.

1. AGRIOS, G. Plant Pathology. 4th ed. Academic Press, San Diego, California, USA. 1997. p. 635.

2. POSADA F., Francisco Javier. Infección natural causada por el hongo *Metarhizium anisopliae* en la hormiga arriera. Cenicafé, 48(3): pp. 204-208. 1997.

Mediante microscopía óptica (40X) y cámara de Neubauer se observaron y se corroboró la identificación del hongo entomopatógeno.

**Concentración de esporas:** Se tomó una muestra al azar, de un cultivo de 25 días de desarrollo y se removió las esporas con la ayuda de una espátula, adicionando agua con Tween 80 al 10%. De esta forma quedó preparada la suspensión madre de la cual se tomaron 3 submuestras de 1 ml y se depositaron en tubos con 9 ml de agua destilada estéril (ADE), quedando de esta manera preparada la dilución  $10^{-1}$ ; se repitió el procedimiento llevando 1 ml de esta dilución ( $10^{-1}$ ) a tubos con 9 ml de ADE, hasta obtener una dilución de  $10^{-3}$ .

A partir de las diluciones realizadas anteriormente, se determinó la concentración de esporas, tomando 10  $\mu$ l (0,01 ml) con una micropipeta, depositándose con cuidado en la placa de la cámara de Neubauer, para luego observarla al microscopio (40X). El proceso de recuento de esporas se realizó tres veces y se obtuvo un promedio, los cuales fueron multiplicados por la dilución utilizada, esto con el objetivo de trabajar con datos reales.<sup>3</sup>

**Prueba de patogenicidad:** Se seleccionaron adultos de hormiga arriera, provenientes de una cría libre de patógenos. Se desinfectaron previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, alcohol y se lavaron en ADE. De estas hormigas se seleccionaron las que presentaron mayor actividad.

Las hormigas se sumergieron en una suspensión de esporas del hongo a una concentración de  $7.48 \times 10^9$  e/ml, durante 2 minutos, la cual se mantuvo en agitación. Luego, se colocó una hormiga por vial de vidrio, con papel previamente humedecido con ADE y se taparon con una mota de algodón esterilizada bien ajustada a la boca del vial.

Diariamente y durante 7 días se evaluó la mortalidad causada por el hongo en estudio, observando al estereoscopio los síntomas y signos de enfermedad en las hormigas. Con una jeringa desechable diariamente se adicionaron ADE, hasta humedecer el papel.<sup>4</sup>

**Evaluación de viabilidad:** Se esterilizaron cajas de petri, con papel filtro y porta objeto todos en conjunto, en el autoclave a 15 libras de presión y 121°C durante 20 minutos. Después de esto, se preparó un medio de cultivo de agar-agua y se esterilizó durante 20 minutos.

Posteriormente, con una micropipeta, se colocaron dos alícuotas del medio de cultivo en un porta objeto.

Se depositó con una micropipeta sobre las mismas alícuotas del medio, dos alícuotas de la suspensión del hongo y se colocó el montaje en una cámara húmeda, la cual consiste en una caja de petri con papel filtro humedecido. La temperatura del montaje estuvo entre 24 y 26 °C.<sup>5</sup>

Luego de esto se hizo el conteo de conidias totales, registrando las germinadas y las no germinadas, de 20 a 24 horas después de realizado el montaje.<sup>6</sup>

## Resultados y discusión

*M. anisopliae* creció a los 6 días bajo condiciones de laboratorio (27 °C y 1 atmósfera de presión) con una esporulación de  $27.733 \times 10^6$  e/ml, denotando el buen comportamiento obtenido en el crecimiento.

El aspecto característico de *M. anisopliae* en adultos de *Atta cephalotes* se puede apreciar en la Figura 1. A partir de esta figura se puede demostrar que el hongo entomopatógeno ataca a la hormiga y desarrolla hifas, la cual la rodean.

La caracterización microscópica y macroscópica determinó que el hongo que ataca la hormiga presenta una textura polvorosa, topografía lisa, de micelio color verdoso, hifas septadas, conidias redondas y micelio hialino.

La impronta fúngica se determinó por microscopía con el colorante azul de lactofenol (Ver Figura 2).

Al mismo tiempo el hongo fue almacenado en semillas de soya, las cuales se encontraban dentro de un frasco transparente previamente esterilizado. Este sería el stock del cual se sacaría la muestra fúngica en caso de necesitarse.

3. VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. Chinchiná, Caldas (Colombia): Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía. CENI-CAFÉ. p. 37.

4. VÉLEZ, P., et al. (1997). *Op. cit.*

5. DIEHL-FLEIG E.; DA SILVA M. E.; VALIM-LABRES M. E.; SPECHT A. (1992). *Ocurrencia natural de Beauveria bassiana (Bals) Vuill. no Rio Grande do Sul. Acta Biol. Leopoldensia*. pp. 99-104. y (1993). *Efficiency of Beauveria bassiana for Acromyrmex spp. Control (Hymenoptera:Formicidae). An. Soc. Entomol. Brasil*. pp. 281-285.

6. VÉLEZ, P. et al. (1997). *Op. cit.*

Figura 1  
*Micelio de M. anisoplae* infectando a la hormiga arriera.



Foto tomada de estereoscopio a 40X, Universidad San Buenaventura-Laboratorio de Microbiología.

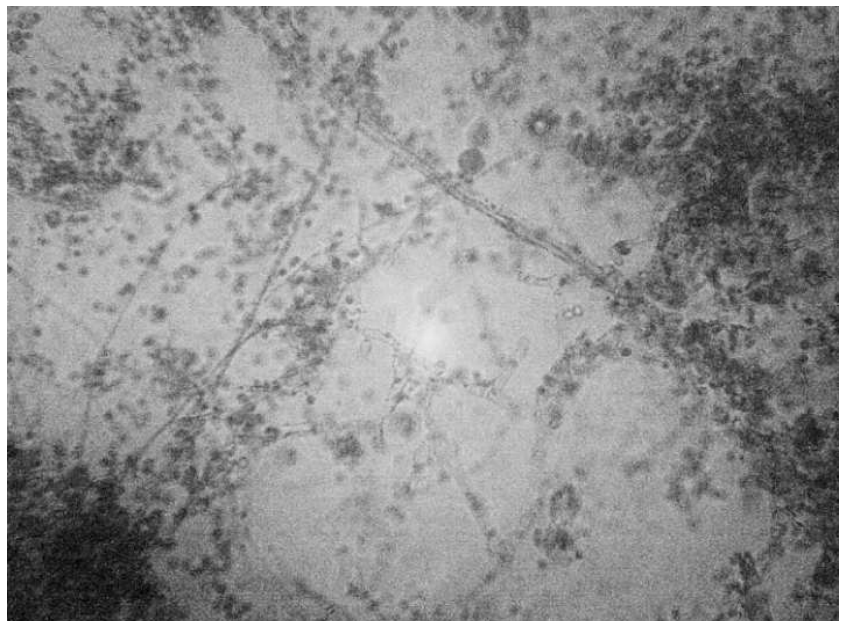
## Obtención de los inóculos

Siguiendo el desarrollo de la metodología, se prosiguió a tomar una de las cajas de petri donde el hongo poseía una coloración ver-

dosa, color que se relaciona con su madurez sexual para realizar las diluciones.

Para la determinación de la capacidad infectiva y la viabilidad a largo plazo en un medio externo dado, se realizaron las pruebas

Figura 2  
Fotografía microscópica (40X) de las hifas y esporas de *M. anisoplae*, donde se pueden apreciar conidias redondas de color verdoso y los septos de las hifas que forman el micelio



Universidad de San Buenaventura-Laboratorio de Microbiología.

7. BENÍTEZ, N. *Manual de laboratorio de microbiología*. Universidad del Valle. Colombia. 2002.

de viabilidad, patogenicidad y conteo de esporas. Estas pruebas servirán para en un posterior trabajo determinar el posible uso de este hongo en la elaboración de un insecticida de origen biológico y la determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento fúngico.<sup>7</sup>

## Conteo de esporas

Se realizaron varias diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) con el objetivo de encontrar la concentración de esporas apropiadas para elaborar la formulación del insecticida. Mediante el conteo de esporas por cámara de Neubauer se obtuvo una concentración promedio de esporas de  $9.97 \times 10^9$  e/ml, resultados que concuerdan con la bibliografía encontrada para la elaboración de un insecticida elaborado con el hongo *Beauveria bassiana*.

En la siguiente dilución ( $10^{-2}$ ), se obtuvo una concentración promedio de  $7.48 \times 10^9$  e/ml. Esta concentración fue la escogida para la realización de las pruebas de viabilidad y las pruebas de patogenicidad.

La disgregación de las esporas en las diferentes diluciones se realizó con Tween 80 al 10%. Sin embargo, para probar la conveniencia de la utilización de este reactivo se realizaron ensayos utilizando el detergente y ensayos sin utilizarlo, como se puede observar en la Tabla 1.

Los resultados anteriores muestran la conveniencia de la utilización de Tween 80, para lograr la homogenización ideal de las

esporas fúngicas que serán utilizadas en la formulación.

Al realizar la comparación entre los dos ensayos se obtuvo una mayor concentración de esporas al utilizar Tween 80 ya que es un jabón no iónico que reacciona con las esporas separándolas unas de otras y lo cual permite una mejor contabilización.

## Prueba de patogenicidad

El criterio de evaluación en el experimento fue la mortalidad por micosis y esporulación de los hongos en el tegumento de los cadáveres, previamente desinfectados.

Entre algunas de las variables que afectan los resultados está el hecho de haber utilizado hormigas colectadas en el campo y no insectos criados en el laboratorio, ya que no se conoce la edad, la dieta y el estado fisiológico para determinar su susceptibilidad a la contaminación por el hongo.<sup>8</sup>

Otro hecho importante, está en el suministro de alimento en el tiempo en que se realizaba la prueba, ya que las hormigas eran alimentadas con una solución de azúcar a la cual no estaban acostumbradas en el campo.

En cuanto al porcentaje de mortalidad, este fue del 100%, ya que en un período de 7 días todas las hormigas habían muerto. Hay que resaltar que la prueba de patogenicidad fue realizada en viales de vidrio de 5 ml donde la cantidad de oxígeno en su interior era abundante y además se realizó otra prueba en tubos Eppendorf de 1,5 ml, en ambos casos se colocaba la hormiga en

Tabla 1  
Datos de la dilución de esporas de las diferentes muestras cuando se utilizaba Tween 80 y sin utilizar Tween 80

DILUCIÓN	SIN TWEEN	CON TWEEN
$10^{-1}$	$7.48 \times 10^9$ e/ml	$7.23 \times 10^{10}$ e/ml
$10^{-2}$	$1.925 \times 10^9$ e/ml	$1 \times 10^{10}$ e/ml
$10^{-3}$	$2 \times 10^8$ e/ml	$1.03 \times 10^9$ e/ml

Fuente: El autor.

8. CURRIE C. R.; MUELLER U. G.; MALLOCH D. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci.* pp. 7.998-8.002 y (2001). *Proc. R. Soc. London. B. Biol. Sci.* pp. 1.033-1.039.

9. DA SILVA M. E.; DIEHL-FLEIG E. (1998). *Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga Atta sexdens piriventris*. *An. Soc. Entomol. Brasil.* pp. 263-269.

una solución azucarada que le proporcionaba alimento y que contenía esporas del hongo entomopatógeno.<sup>9</sup>

Esto se realizó con el objetivo de determinar cuál de los dos recipientes era el mejor para esta prueba. Los resultados determinaron que los tubos Eppendorf de 1,5 ml eran muy estrechos y contenían muy poca cantidad de oxígeno, lo que pudo influir en la muerte de las hormigas y el escaso crecimiento de los hongos. En cambio, los viales de vidrio contenían el suficiente oxígeno para el desarrollo fúngico, lo cual permite corroborar la muerte de las hormigas por contaminación con las esporas del hongo. De aquí en adelante todas las pruebas de patogenicidad se realizaron en estos viales de vidrio.

A partir de los resultados experimentales de los viales de vidrio de 5 ml se puede observar que todas las hormigas presentaron crecimiento fúngico con esporulación externa a los 4 días, lo que corrobora la teoría sobre la falta de oxígeno; además, había mayor humedad en el frasco lo que permitió una mayor expansión del hongo (Figura 3).

### Prueba de viabilidad

Para la prueba de viabilidad se utilizó una simulación de cama húmeda en el laboratorio para darle al hongo unas condiciones de humedad y temperatura adecuadas donde las es-

poras desarrollan pequeños tubos germinales en 24 horas. Se realizaron dos pruebas, una con una concentración de  $7,48 \times 10^9$  esporas / ml, y otra con  $8,3 \times 10^9$  esporas / ml.

Esta prueba de viabilidad es muy importante porque de ella depende que las conidias puedan absorber humedad del medio para que el hongo mantenga su viabilidad en campo, ya que estos necesitan realizar germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

En cuanto a las variables que alteraron esta prueba se encuentra la humedad del medio ya que no en todas las cajas había la humedad adecuada, en la primera prueba de viabilidad los resultados no se pudieron leer ya que se usó muy poco agar, el cual estaba demasiado concentrado y no permitió un correcto desarrollo del hongo, en la segunda prueba que se realizó se debió esperar más de 24 horas porque no se observaron esporas germinadas, por lo que se prefirió utilizar esta prueba como una ayuda para la prueba residual, la cual se leyó a los 18 días encontrándose una germinación de 6 esporas por 14 observadas en el objetivo de 40X, lo que significa que este valor debe ser multiplicado por el valor que indica este objetivo y así determinar el porcentaje de germinación.

El porcentaje con estos primeros valores arrojados sería del 42.85%, el cual es bastante alto después de todo el tiempo que estuvo el hongo en crecimiento (Ver Figura 4).

Figura 3  
Prueba de patogenicidad.



Foto Universidad San Buenaventura-Laboratorio de Biología.

Figura 4  
Prueba de viabilidad del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* realizado en los laboratorios de microbiología de la Universidad de San Buenaventura- Cali



## Conclusiones

- El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* es capaz de infectar a la hormiga arriera en un período de 4 días, donde se ocasiona su muerte, lo cual permite la continuación de la investigación para el desarrollo de una formulación que pueda ser aplicada en campo.
- El hongo entomopatógeno debe ser continuamente recrecido, esto asegura mejores resultados en la prueba de viabilidad y patogenicidad.
- Se logró, a nivel de laboratorio, obtener una cantidad suficiente de esporas ( $9.97 \times 10^9$  e/ml), resultados que permita el desarrollo fúngico de una manera eficaz.
- Es importante tener en cuenta la cantidad de oxígeno disponible para el desarrollo de las esporas fúngicas. Las pruebas de patogenicidad corroboran que cuando el oxígeno es muy poco el hongo tiene muy baja o casi nula patogenicidad.
- El grupo de investigación de biotecnología vegetal de la Universidad de San Buenaventura, realizará ensayos de campo con una formulación para la co-

roboración de los datos experimentales obtenidos en el laboratorio.

## Bibliografía

1. AGRIOS, G. (1997). *Plant Pathology*. 635 p. 4th ed. Academic Press, San Diego, California, USA.
2. CARREÑO, Irina Alean. (2003). *Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero*. Bogotá, D. C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología agrícola y veterinaria. [Online]. [Citado 4 agosto 2005]. Disponible en la world wide web: <[http://patula.ciat.cgiar.org/webciat/ipm/pdfs/tesis\\_irina\\_alean.pdf](http://patula.ciat.cgiar.org/webciat/ipm/pdfs/tesis_irina_alean.pdf)>
3. BENÍTEZ, N. (2002). *Manual de laboratorio de Microbiología*. Dpto. de Biología. Universidad del Valle. Cali. Colombia.
4. BUSTILLO, A. (2001). *Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia*. En: *Seminario uso de entomopatógenos en Colombia*. Bogotá: Sociedad Colombiana de entomología. pp. 30-53.
5. CHARNLEY, A. (1984). *Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A*

- speculative review*. In: *Invertebrate-microbial Interactions*.
6. CHERRETT, J. (1968). *The foraging behavior of Atta cephalotes*. (Hymenoptera: Formicidae). *Foraging patterns and species attacked in Tropical rain forest*. J. Anm. Ecol. 37: pp. 387-403.
  7. CHERRET, J. 1981. *The interaction of wild vegetation and crops in leaf-cutting and attack*. In: J. Thresh, Ed., *Pest, Pathogens and Vegetation*. Pitman, Boston and Melbourne, pp. 315-325.
  8. CURRIE C. R.; MUELLER U.G.; MALLOCH D. (1999). *The agricultural pathology of ant fungus gardens*. Proc. Natl. Acad. Sci. pp. 7.998-8.002.
  9. CURRIE C. R.; STUART A. E. (2001). *Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants*. Proc. R. Soc. London. B. Biol. Sci. 1.033-1.039 pp.
  10. DA SILVA M. E.; DIEHL-FLEIG E. (1988). *Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga Atta sexdens piriventris (Santschi, 1919) (Hymenoptera:Formicidae)*. An. Soc. Entomol. Brasil. pp. 263-269.
  11. DESTRIXIN. *Insecticida biológico a partir de Metarhizium anisopliae*. [Online]. [Citado 27 agosto 2005]. Disponible en la world wide web: <<http://www.laverlam.com.co/espanol/Agricola/productos/destruxin.htm>>
  12. DIEHL-FLEIG E.; DA SILVA M. E.; VALIM-LABRES M. E.; SPECHT A. (1992)a. *Ocorrencia natural de Beauveria bassiana (Bals) Vuill. no Rio Grande do Sul. Acta Biol. Leopoldensia*. pp. 99-104.
  13. DIEHL-FLEIG E.; DA SILVA M. E.; SPECHT A.; VALIM-LABRES M. E. (1993). *Efficiency of Beauveria bassiana for Acromyrmex spp. Control (Hymenoptera:Formicidae)*. An. Soc. Entomol. Brasil. pp. 281-285.
  14. ESCUELA DE INGENIERÍA DE ANTIQUARIA. Sitios Web EIA. Hormiga Arriera. [Online]. Colombia. [Citado 21 Agosto 2005]. Disponible en la world wide web: <<http://biologia.eia.edu.co/ecologia/estudiantes/hormigaarriera.htm>>
  15. POSADA F., Francisco Javier. (1997). *Infecção natural causada por el hongo Metarhizium anisopliae en la hormiga arriera*. Cenicafé, 48(3): 204-208.
  16. VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARIN, P.; GONZALEZ, M.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatogênicos*. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía. CENICAFE. Chinchiná, Caldas (Colombia). p. 37.