

CONTROL MICROBIANO DE HORMIGAS CORTADORAS POR MEDIO DE HONGOS BENÉFICOS

MICROBIAL CONTROL OF LEAFCUTTING ANTS USING BENEFICIAL FUNGI

Roberto Eduardo Lecuona, Julieta Beatriz Posadas, Jorge Ignacio Mini, Diego Gustavo Gómez, Fernanda Gabriela Martínez y Mariano Maestro (Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola [IMYZA INTA Castelar] / Laboratorio de Hongos Entomopatógenos) - Argentina

Resumen

Las hormigas cortadoras de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* son insectos sociales que se comportan como plagas herbívoras en agricultura y silvicultura. El sector forestal viene creciendo en los últimos años acompañado de nuevas reglas internacionales del “manejo forestal responsable” mediante la certificación bajo estándares internacionales de cuidado ambiental como son las normas FSC (Forest Stewardship Council) e ISO 14001 de Sistemas de Gestión Ambiental. Ambas normas dan extrema importancia al buen uso de productos fitosanitarios y prácticas de mínimo impacto ambiental, lo que conlleva la búsqueda de sustitutos biológicos para los actuales agroquímicos. Las hormigas cortadoras cultivan el hongo basidiomicete *Leucoagaricus gongylophorus* que les servirá como alimento (Mueller *et al.*, 1998; Villesen *et al.*, 2004; Schultz y Brady, 2008). Cada colonia depende de la sanidad de sus hongueras, en especial la calidad sanitaria de los basidiomicetes es muy crítica para el desarrollo de las larvas, ya que constituyen su alimento exclusivo (Quinlan y Cherrett, 1979). Cuando el balance sanitario se altera, una colonia puede abandonar su hormiguero. Por ejemplo, ante la infección de los basidiomicetes por el micoparásito *Escovopsis weberi* y *E. aspergilloides* se produciría el abandono inmediato del hormiguero (Muchovej y Della Lucia, 1990; Seifert *et al.*, 1995; Mueller, 2002). Este micoparásito se nutre exclusivamente de los tejidos del basidiomicete y su presencia causa reducción de la biomasa del hongo cultivado, cambios de comportamiento durante el forrajeo y cuidado de las crías (*stress*) y baja producción de larvas, pupas y adultos, dando como resultado la disminución del tamaño del hormiguero (Currie, 2001; Reynolds y Currie, 2004; Taerum *et al.*, 2007). En la Argentina, ya se realizaron aislamientos de estas especies fúngicas a partir de hormigueros de la provincia de Santa Fe y esto abre posibilidades de utilizar a este micoparásito como un controlador biológico (Mini *et al.*, 2011). Esta propuesta puede contribuir a emplear este bioinsumo solo o en combinación con un micoinsecticida que se está desarrollando a partir de cepas de hongos entomopatógenos (Posadas *et al.* 2013a y b). Las dos alternativas de control, el uso de cebos micoinsecticidas

Abstract

Ants belonging to the genus *Atta* and *Acromyrmex*, known as leafcutter ants, are common agricultural pests. In recent years, the forest industry has grown under the new international responsible management policies such as FSC (Forest Stewardship Council) and ISO 14001 (Environmental Management). Both stress the importance of phytosanitary products and low environmental impact strategies. Leafcutter ants rear the basidiomycete fungus *Leucoagaricus gongylophorus* as food source. The health of the basidiomycete is critical to the welfare of the colony, in particular to the larvae, as it is their only food source. When under sanitary stress, a colony may abandon the anthill, e.g. if the basidiomycetes became infected with the mycoparasites *Escovopsis weberi* or *E. aspergilloide*. These feed on the fungus and their presence causes reduction in growth; regarding the ants, this also causes behavioral alterations in foraging and rearing of larvae and pupae, reducing the colony. In Argentina both mycoparasites have been isolated from anthills in Santa Fe province, and it would be feasible to use them as biological control agents against leafcutters. This bioresource could be used either alone or in combination with a mycoinsecticide based on the entomopathogenic fungi, currently under development. Both control strategies, i.e. of adult leafcutters with mycoinsecticides and of their food source with *Escovopsis* spp. are interesting options to be considered in an integrated pest management program.

Keywords: leafcutting ants, microbial control, *Escovopsis* sp.

contra hormigas adultas y las infecciones del hongo cultivado con el micoparásito *Escovopsis* spp. se presentan como interesantes estrategias de control microbiano de hormigas para ser empleadas con otras tácticas dentro de un sistema de manejo integrado.

Palabras clave: hormigas cortadoras, control microbiano, *Escovopsis* sp.

Introducción

En este proyecto de investigación a desarrollarse en el marco de los Premios Senasa a la Investigación, Transferencia y Comunicación 2014-2015, se pretende lograr un método de control microbiano de hormigas cortadoras enfocado en destruir el propio alimento de las hormigas, el hongo basidiomycete *Leucoagaricus gongylophorus* que cultivan en sus nidos, con un micoparásito (hongo benéfico) del género *Escovopsis*.

La utilización de este nuevo bioinsumo que controle el alimento de las hormigas, tanto solo como combinado con otros micoïnsecticidas a base de hongos entomopatógenos, contribuirá con una reducción de los perjuicios ocasionados por esta plaga en las explotaciones forestales, colaborando con una producción más limpia, favoreciendo la reducción de la contaminación del ambiente y sobre la población rural en general.

En consecuencia, se pretende que los resultados sean de utilidad a varios destinatarios tales como productores agroforestales, organismos de control y fiscalización nacionales e internacionales, exportadores, comunidad científica, emprendedores agroindustriales, estados provinciales, municipales y la sociedad en general.

Relevancia y justificación del proyecto

El uso incorrecto de los plaguicidas genera resistencia en los artrópodos, contamina el ambiente con riesgos directos sobre la salud humana y deja residuos químicos indeseados en los productos primarios. En el caso particular de las hormigas cortadoras, el uso de insecticidas es el método tradicional de control, sin embargo, existe una seria restricción respecto de su utilización en la actividad forestal por lo cual los productores deben buscar sustitutos menos

contaminantes, ya que certifican su gestión a través del Consejo de Manejo Forestal (FSC, Forest Stewardship Council) y, en consecuencia, la sobrevivencia productiva de estas empresas dependerá de contar con tecnologías más amigables con el ambiente. Por ello, es muy importante y perentorio disponer de alternativas biológicas para reducir los perjuicios ocasionados por las hormigas cortadoras.

Entre las I+D que se vienen realizando en la búsqueda de nuevas tecnologías de control menos contaminantes para el medio, el control biológico juega un importante papel y en particular el control microbiano mediante el uso de microorganismos benéficos que enferman y controlan a los artrópodos. Entre las especies de hongos entomopatógenos, se cita a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, con las cuales se han diseñado micoïnsecticidas y micoacaricidas en la mayoría de los países para varias plagas agropecuarias. En la Argentina, el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) INTA Castelar está trabajando en el desarrollo de agrobiológicos y en particular un cebo hormiguicida a base de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, realizando actividades tanto en laboratorio como en campos experimentales.

Por su parte, en el presente proyecto de investigación se plantea otro interesante enfoque que es destruir el propio alimento de las hormigas, el hongo basidiomycete *Leucoagaricus gongylophorus* que cultivan en sus nidos. Este basidiomycete presenta un enemigo natural específico, un hongo del género *Escovopsis*. Este micoparásito se nutre de los tejidos del hongo cultivado reduciendo su biomasa y provocando cambios de comportamiento durante el forrajeo y disminución de la tasa reproductiva de la colonia, ocasionando así la disminución del tamaño del hormiguero.

En consecuencia, si al micoinsecticida que se está desarrollando para reducir la población de hormigas adultas durante el forrajeo se le puede agregar o complementar con el uso del micoparásito que se propone en este proyecto para que destruya al hongo del cual se alimentan, se estará atacando a esta plaga por dos vías de control complementarias, reduciendo de ese modo las poblaciones y la actividad de la colonia, dando por resultado la disminución de los perjuicios económicos sin contaminación de agroquímicos al medio.

Objetivos y resultados esperados

El objetivo general es contribuir al control de las hormigas cortadoras mediante el empleo de bioinsumos o agrobiológicos, productos no contaminantes para el hombre y el ambiente, que puedan ser utilizados dentro de la estrategia de Manejo Integrado de Plagas. Se parte de la hipótesis de que existe la posibilidad de lograr bioproductos capaces de controlar hormigas cortadoras de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* basados en cepas de hongos entomopatógenos y de hongos micoparásitos.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean varios específicos:

- 1- Mantenimiento de las crías de hormigas en laboratorio (indispensable para la realización de los bioensayos).
- 2- Aislamiento de microorganismos presentes en las hongueras de los hormigueros (actividad permanente para obtención de nuevas cepas más efectivas).
- 3- Realización de ensayos en laboratorio con *Escovopsis* sp. (micoparásito), a fin de evaluar su eficiencia de control sobre el basidiomycete cultivado.
- 4- Estudios de compatibilidad entre *Escovopsis* sp. y las cepas de hongos entomopatógenos seleccionadas para el control de hormigas adultas.
- 5- Ajuste de producción del micoparásito en fermentación sobre sustrato sólido.
- 6- Realización de ensayos en laboratorio con bioinsumos experimentales solos y en mezclas (hongos entomopatógenos + micoparásitos).

De esta manera, los resultados esperados son: conocimiento del proceso de producción masiva de *Escovopsis* sp.; bioinsumo (micofungicida) a base del micoparásito *Escovopsis* sp. con eficiencia conocida; y bioinsumo dual, micoinsecticida + micofungicida con eficiencia conocida.

Metodología propuesta

Las siguientes actividades serán llevadas a cabo en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA (INTA Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas [CICVyA] Castelar) donde se trabaja en el desarrollo de bioinsumos o agrobiológicos para varios artrópodos plaga.

1- Aislamiento y conservación de cepas de hongos, en particular *Escovopsis* spp., a partir de hongueras de hormigueros.

1.a. Se colectarán muestras de honguera de las especies de hormigas identificadas. Para ello, se realizarán excavaciones en las cercanías del hormiguero a fin de llegar a la cámara en la cual se halla la honguera.

1.b. Las muestras serán procesadas en el laboratorio. Una alícuota de 10 g de honguera se colocará en 90 ml Tween 80 (0,05 %) y se agitará en shaker a 200 rpm por dos horas. Luego se realizarán diluciones decimales seriadas en Tween 80 (0,05 %) y se sembrarán 100 µl sobre medios de cultivo selectivos, se incubarán a 26 °C por 48-72 h y se aislarán las colonias crecidas.

1.c. Se identificarán bajo microscopio óptico las cepas fúngicas aisladas, mediante la utilización de claves.

1.d. Se conservarán las cepas aisladas mediante la técnica de liofilizado, utilizando leche descremada (Difco) como protector térmico, la técnica de conservación en glicerol y mediante el cultivo en tubos estría.

2- Mantenimiento de la cría de hormigas cortadoras en laboratorio.

Si bien se cuenta con una cría estable, esta debe incrementarse anualmente para poder disponer de material vivo para los ensayos con hormigas y para

la utilización del basidiomycete cultivado por ellas. Para esto se colectarán reinas fecundadas (luego del vuelo nupcial) que se llevarán al laboratorio y se acondicionarán en jaulas de acrílico en salas con temperatura y humedad controladas (25 °C y 70 % HR). A fin de que las reinas inicien un nuevo hormiguero, se les proveerá diariamente de alimento que se colocará en cámaras interconectadas a la cámara central (donde se encuentra la reina).

3- Bioensayos de efectividad entre el micoparásito *Escovopsis* y el basidiomycete cultivado.

Se realizarán bioensayos en laboratorio para evaluar la efectividad de *Escovopsis* usando cebos para su ingreso a los hormigueros experimentales. Se realizarán observaciones para determinar el grado de descomposición del basidiomycete producto del parasitismo.

4- Estudio de compatibilidad entre el micoparásito *Escovopsis* y las cepas de hongos entomopatógenas seleccionadas (micoinsecticida).

4.a. Se realizarán ensayos en laboratorio mediante la técnica de cultivo dual. Para ello, se enfrentarán las distintas cepas fúngicas (entomopatógenos y micoparásitos) sobre una placa de Petri con medio de cultivo (PDA) y se incubarán 26 °C durante 72 horas.

4.b. Se medirán los halos de inhibición para establecer compatibilidades.

5- Formulación experimental de *Escovopsis*.

5.a. Se utilizará la técnica de fermentación en sustrato sólido. Las cepas serán inoculadas en bolsas que contengan arroz previamente esterilizado y ajustado a 50 % de humedad y se incubarán a 26° C durante diez días. Posteriormente serán secadas y tamizadas, y se cosecharán los inóculos producidos.

5.b. Se formularán al *Escovopsis* bajo cebo atrayente, según metodología ya empleada para el micoinsecticida.

6- Evaluar la efectividad de los formulados experimentales en condiciones de laboratorio

6.a. Se realizarán bioensayos en laboratorio con los formulados utilizando la misma metodología descrita en el punto 3.

6.b. Se evaluará, además, la estabilidad de los formulados, realizando ensayos de viabilidad cada tres meses.

La sostenibilidad de estas actividades y la replicabilidad de sus resultados se basan en poder disponer de capacidades científico-técnicas y material biológico propio (crías masivas de insectos, cepario, etc.) y lugares específicos para la realización de ensayos, contando con protocolos adecuados de funcionamiento.

En el caso específico del control de hormigas, parte de sus actividades se encuentran enmarcadas en un proyecto que vincula al IMYZA-INTA con empresas forestales apremiadas por disponer de alternativas menos contaminantes para el control dentro de un manejo forestal responsable. Con la inclusión de los objetivos específicos de este proyecto que se presenta al Senasa, se estima que se podrá contar con otro bioinsumo, basado en un micoparásito del hongo cultivado, que se complementaría con el micoinsecticida para adultos. Por lo tanto, este proyecto contribuirá a la comprensión del sistema micoparásito- basidiomycete, el cual deberá ser profundizado posteriormente para una mejor comprensión del modelo base para lograr la disminución de la actividad forrajera de las hormigas a largo plazo.

Asimismo, los resultados obtenidos permitirán que la actividad forestal argentina continúe siendo rentada con un manejo respetuoso de la salud ambiental, aportando datos concretos y tangibles para que los organismos fiscalizadores nacionales e internacionales puedan corroborar el manejo adecuado de sus explotaciones.

Bibliografía

- Currie, C. R. (2001), "Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism", *Oecologia* 128 (1), pp. 99-106.
- Mini, J. I.; Masiulionis, V. E. y R. E. Lecuona (2011), "Aislamiento de hongos presentes en nidos de hormigas cortadoras del género *Acromyrmex*", *XII Congreso Argentino de micología y XXII Jornadas Argentinas de Micología* (306), Posadas, Misiones.
- Muchovej, J. J. y T. M. C. Della Lucia (1990), "*Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum", *Mycotaxon* 37, pp. 191-195.
- Mueller, U.G. (2002), "Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the destruction of the ant-fungus symbiosis", *The American Naturalist* 160, pp. 68-98.
- Mueller, U. G.; Rehner, S. A. y T. R. Schultz (1998), "The evolution of agriculture in ants", *Science* 281 (5385), pp. 2034-2038.
- Posadas, J.; Ottaviani, M.; Mini, J.; Angulo Lewylle, M. y R. Lecuona (2013a), "Aislamiento de cepas de hongos entomopatógenos a partir de cadáveres de hormigas cortadoras, hongueras y muestras de suelo", *XIII Congreso Argentino de Microbiología*, Buenos Aires.
- Posadas, J. B.; Ottaviani, M.; Mini, J.I; Angulo Lewylle, M. y R. E. Lecuona (2013b), "Compatibilidad entre cepas de hongos entomopatógenos seleccionadas para el biocontrol de hormigas cortadoras y el hormiguicida comercial Glacoxan E®", *XIII Congreso Argentino de Microbiología*, Buenos Aires.
- Quinlan, R. J. y J. M. Cherrett (1979), "The role of the fungus in the diet of the leafcutting ant *Atta cephalotes* (L.)", *Ecological Entomology* 4, pp. 151-160.
- Reynolds, H. T. y C. R. Currie (2004), "Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus", *Mycologia* 96 (5), pp. 955-959.
- Schultz, T.R. y S. G. Brady (2008), "Major evolutionary transition in ant agriculture", *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14), pp. 5435-5401.
- Seifert, K. A.; Samson, R. A. y I. H. Chapela (1995), "*Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests", *Mycologia* 87 (3), pp. 407-413.
- Taerum, S. J.; Cafaro, M. J.; Little, A. E. F.; Schultz, T. R. y C. R. Currie (2007), "Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis", *Proceeding of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 274 (1621), pp. 1971-1978.
- Villesen, P.; Mueller, U. G.; Schultz, T. R.; Adams, R. M. M. y A. Bouck (2004), "Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants", *Evolution* 58 (10), pp. 2252-2265.