

**Selección y Evaluación de una cepa de *Trichoderma*
o *Gliocladium* para el control de
Atta cephalotes en condiciones de laboratorio**

Adriana Ortiz Reyes

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar
al título de maestría en Entomología

Directores

Sergio Orduz P. M.sc; Ph. D.
Alejandro Madrigal C. IA. Entomólogo

Universidad Nacional de Colombia
Sede de Medellín
Facultades de Ciencias y Ciencias Agropecuarias
Posgrado en Entomología

1998

UNAL-Medellín



6 4000 00108310 7

T
0800
1998

8008

86-91-III

Aulno

Doncens

A mi Mamá, María y Blanca por su cariño y apoyo, y a la memoria de mi Papá por su amor y ejemplo.

Agradecimientos

Quiero agradecer sinceramente a La Corporación para Investigaciones Biológicas, por haberme permitido desarrollar mi trabajo de grado en dicha Institución, y poder contar con su constante apoyo y sus valiosos consejos durante estos años.

A COLCIENCIAS, CIB y CORNARE por la cofinanciación del proyecto.

A La Ingeriera Forestal Estela Franco y personal de la UMATA de San Luis por su colaboración en la obtención de los hormigueros.

A la Doctora Angela Restrepo y Doctor Willian Rojas, por crear un espacio para el desarrollo de la investigación y formación de nuevos investigadores.

A Thais, Nora y Diana por compartir sus conocimientos en las técnicas de laboratorio, a Ely por toda su colaboración y Edwar por ayudarme a cuidar de mis hormigas.

A la Doctora Mirta Arango por su valiosa ayuda y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A la Unidad de Micología por su asesoría y amistad.

Gloria Cano por su asesoría en el manejo de la información estadística.

Gilberto Morales, por su asesoría y enseñanzas en el área de la etología.

Victor Manuel Pardo y Francisco Yepes; jurados de la presente investigación.

Sergio Orduz y Alejandro Madrigal, asesores de la tesis.

A todo el personal de la CIB, auxiliares del aseo y lavado, almacén y todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en el desarrollo del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

1. REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1 Hormiga cortadora de hojas, <i>Atta cephalotes</i> .	1
1.1.1 Taxonomía y distribución.	1
1.1.2 Simbiosis con el hongo <i>Attamyces</i> sp.	4
1.1.3 Importancia económica.	10
1.2 Hongos antagonistas <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp.	12
1.2.1 Taxonomía.	13
1.2.2 Ecología y distribución.	14
1.2.3 Mecanismos de acción (micoparasitismo y antibiosis).	15
1.2.4 Estimulación de crecimiento.	19
1.2.5 Control Biológico.	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Establecimiento de las colonias de <i>Atta cephalotes</i> .	22
2.2 Obtención de cepas de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp.	23
2.3 Aislamiento del hongo <i>Attamyces</i> sp. del jardín de la hormiga <i>A. cephalotes</i> .	25
2.4 Curva de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp. y <i>Attamyces</i> sp.	26
2.5 Evaluación <i>in vitro</i> de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. contra el hongo de <i>Attamyces</i> sp.	27

2.6 Evaluación de micoparasitismo entre <i>Trichoderma</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp. sobre <i>Attamyces</i> sp.	29
2.6.1 Observaciones en microscopio de luz.	29
2.6.2 Observaciones microscopio electrónico de rastreo.	30
2.7 Evaluación del comportamiento de las hormigas <i>Atta cephalotes</i> frente a la contaminación del jardín del hongo.	31
2.7.1 Mantenimiento del jardín en una colonia de <i>A. cephalotes</i> en condiciones de laboratorio.	31
2.7.2 Contaminación del jardín con la cepa T-26 de <i>T. lignorum</i> .	33
2.7.3 Evaluación del peso de las cajas con <i>Attamyces</i> sp. durante la evaluación con la cepa T-26 de <i>T. lignorum</i> , con y sin la presencia de hormigas.	34
2.8 Bioensayos en hormigueros de <i>Atta cephalotes</i> en condiciones de laboratorio.	35
3. RESULTADOS	37
3.1 Establecimiento de las colonias de <i>Atta cephalotes</i> .	37
3.2 Aislamiento del hongo del jardín de la hormiga <i>Atta cephalotes</i> .	38
3.3 Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., y <i>Attamyces</i> sp.	40
3.4 Evaluación <i>in vitro</i> de los antagonistas <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. contra el hongo <i>Attamyces</i> sp.	45
3.5 Evaluación de micoparasitismo entre <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. sobre <i>Attamyces</i> sp.	50
3.5.1 Observaciones microscopio de luz.	50
3.5.2 Observaciones microscopio electrónico de rastreo.	61
3.6 Evaluación del comportamiento de las hormigas <i>A. cephalotes</i> frente a la contaminación del jardín del hongo.	65
3.6.1 Mantenimiento del jardín en una colonia de <i>A. cephalotes</i> en condiciones de laboratorio.	65
3.6.2 Contaminación del jardín con la cepa (T-26) de <i>T. lignorum</i> .	69
3.6.3 Evaluación del peso de las cajas con <i>Attamyces</i> sp. durante la evaluación con la cepa T-26 de <i>T. lignorum</i> , con y sin la presencia de hormigas.	78

Tabla de contenido

3.7 Bioensayos en colonias de <i>Atta cephalotes</i> en condiciones de laboratorio.	84
4. DISCUSIÓN	88
4.1 Evaluación <i>in vitro</i> de los antagonistas <i>Trichoderma</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., contra el hongo <i>Attamyces</i> sp.	88
4.2 Evaluación de micoparasitismo <i>in vitro</i> entre los antagonistas <i>Trichoderma</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., sobre <i>Attamyces</i> sp.	91
4.2.1 Observaciones al microscopio de luz.	91
4.2.2 Observaciones al microscopio electrónico de rastreo.	95
4.3 Evaluación de comportamiento de las hormigas <i>A. cephalotes</i> frente a la contaminación del jardín del hongo.	96
4.3.1 Mantenimiento del jardín en una colonia de <i>A. cephalotes</i> en condiciones de laboratorio.	96
4.3.2 Contaminación del jardín con la cepa (T-26) de <i>T. lignorum</i> .	97
4.3.3 Evaluación del peso de las cajas con <i>Attamyces</i> sp. durante la evaluación con la cepa T-26 de <i>T. lignorum</i> , con y sin la presencia de hormigas.	100
4.4 Bioensayos con hormigueros de <i>Atta cephalotes</i> en condiciones de laboratorio.	104
CONCLUSIONES	107
RECOMENDACIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de las especies de <i>Acromyrmex</i> y <i>Atta</i> .	3
Tabla 2 Variabilidad del tamaño de las obreras <i>A. cephalotes</i> .	4
Tabla 3 Lista de cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Gliocladium</i> evaluadas.	24
Tabla 4 Escala de evaluación de la capacidad competitiva <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp.	29
Tabla 5 Tratamientos utilizados en los hormigueros de laboratorio.	36
Tabla 6. Tabla comparativa del promedio en la tasa de crecimiento del radio del micelio de los antagonistas <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. evaluados a dos temperaturas (26 °C y 18 °C).	43
Tabla 7. Parámetros tomados de los antagonistas <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp.	45
Tabla 8. Evaluación de la capacidad competitiva <i>in vitro</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> (T) y <i>Gliocladium</i> (G) con <i>Attamyces</i> sp.	50
Tabla 9. Características de parasitismo de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. con <i>Attamyces</i> sp. entre las 48 y 54 horas del ensayo	60

Tabla 10. Medidas correspondientes al tamaño de las hormigas presentes en el jardín, longitud del cuerpo (L. C.) y ancho céfalico (A. C.)	66
Tabla 11. Porcentaje de obreras presentes durante la evaluación de su comportamiento frente a la contaminación del jardín.	76
Tabla 12. Número promedio de hormigas presentes durante la evaluación de comportamiento frente a la contaminación del jardín con la cepa T-26 de <i>T. lignorum</i> .	78
Tabla 13. Evaluación del peso promedio de las cajas con una parte del jardín y con la presencia de hormigas durante las evaluaciones con <i>T. lignorum</i> .	79
Tabla 14. Evaluación del peso promedio de las cajas con una parte del jardín y sin la presencia de hormigas durante las evaluaciones con <i>T. lignorum</i> .	80
Tabla 15. Evaluación del peso promedio de las cajas con una parte del jardín con presencia y sin presencia de hormigas durante las evaluaciones con <i>T. lignorum</i> .	80
Tabla 16. Observaciones macroscópicas y microscópicas de las cajas con un fragmento de jardín de <i>A. cephalotes</i> durante las evaluaciones con <i>T. lignorum</i> .	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica del modelo empleado en las pruebas de antagonismo.	28
Figura 2. Cultivo puro del hongo <i>Attamyces</i> sp.	39
Figura 3. Hongo simbiote cultivado por <i>Atta cephalotes</i> , <i>Attamyces</i> sp.	40
Figura 4. Tasa promedio de crecimiento del radio del micelio de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. a los 26°C.	41
Figura 5. Tasa promedio de crecimiento del radio del micelio de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Gliocladium</i> sp. a los 18°C.	42
Figura 6. Curva de crecimiento del hongo simbiote <i>Attamyces</i> sp.	44
Figura 7. Efecto inhibitorio de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> y <i>Gliocladium</i> sobre el crecimiento del hongo <i>Attamyces</i> sp.	46
Figura 8. Cultivo mixto del control de <i>Trichoderma lignorum</i> (T-26:T-26).	47
Figura 9. Cultivo mixto del control <i>Attamyces</i> : <i>Attamyces</i>	48
Figura 10. Cultivos mixtos del hongo <i>Attamyces</i> sp. y <i>Trichoderma lignorum</i> (T- 26).	49
Figura 11. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> sp. (G-55) y <i>Attamyces</i> sp.	51

Lista de figuras

Figura 12. Cultivo mixto de <i>Trichoderma</i> (T-22) y <i>Attamyces</i> sp.	52
Figura 13. Cultivo mixto de <i>Trichoderma</i> (T-21) y <i>Attamyces</i> sp.	52
Figura 14. Cultivo mixto de <i>Trichoderma</i> (T-71) y <i>Attamyces</i> sp.	53
Figura 15. Cultivo mixto de <i>Trichoderma</i> (T-20) y <i>Attamyces</i> sp.	53
Figura 16. Cultivo mixto de <i>Attamyces</i> sp., y <i>Attamyces</i> sp.	54
Figura 17. Cultivo mixto de <i>Attamyces</i> sp., y <i>Attamyces</i> sp.	55
Figura 18. Cultivo mixto de <i>Attamyces</i> sp., y <i>Attamyces</i> sp.	55
Figura 19. Cultivo mixto de <i>Trichoderma lignorum</i> (T-26) y <i>Attamyces</i> sp.	56
Figura 20. Cultivo mixto de <i>Trichoderma lignorum</i> (T-26) y <i>Attamyces</i> sp.	57
Figura 21. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> (G-54) y <i>Attamyces</i> sp.	57
Figura 22. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> (G-55) y <i>Attamyces</i> sp.	58
Figura 23. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> (G-55) y <i>Attamyces</i> sp.	59
Figura 24. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> (G-55) y <i>Attamyces</i> sp.	61
Figura 25. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> sp. (G-55) y <i>Attamyces</i> sp.	62
Figura 26. Cultivo mixto de <i>Gliocladium</i> sp. (G-55) y <i>Attamyces</i> sp.	62

Lista de figuras

Figura 27. Cultivo mixto de <i>Trichoderma lignorum</i> (T-26) y <i>Attamyces</i> sp.	63
Figura 28. Cultivo mixto de <i>Trichoderma lignorum</i> (T-26) y <i>Attamyces</i> sp.	64
Figura 29. Cultivo mixto de <i>Trichoderma lignorum</i> (T-26) y <i>Attamyces</i> sp.	64
Figura 30. Etograma con presencia de la reina.	67
Figura 31. Etograma sin la presencia de la reina.	70
Figura 32. Tratamiento control.	72
Figura 33. Tratamiento <i>T. lignorum</i> en una concentración de 10^3 conidias/ml.	73
Figura 34. Tratamiento <i>T. lignorum</i> en una concentración de 10^6 conidias/ml.	74
Figura 35. Tratamiento <i>T. lignorum</i> en una concentración de 10^8 conidias/ml.	75
Figura 36. Peso promedio de las cajas con una parte del jardín con presencia y sin presencia de hormigas durante las evaluaciones con <i>T. lignorum</i> en las concentraciones ($10^3, 10^6, 10^8$ conidias/ml) y un tratamiento control.	81

INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas pertenecientes a los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, constituyen actualmente el grupo de mayor importancia económica para países de América Central y del Sur, debido a que utilizan una amplia variedad de recursos vegetales, provocando pérdidas importantes en la agricultura, en el establecimiento de pastos y zonas que están siendo reforestadas.

Actualmente, el control de estas hormigas ha estado orientado a la utilización de productos químicos, generando daños al medio ambiente y efectos tóxicos sobre la entomofauna benéfica; en años recientes el control biológico ha sido una alternativa para el control de estos dos géneros, empleando hongos entomopatógenos, parasitoides y depredadores naturales de las hormigas, como también la utilización de extractos de plantas que actúan como fungicidas sobre el hongo cultivado por ellas o por la acción de compuestos tóxicos para las hormigas.

La presente investigación se enfocó en el estudio de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. como posibles antagonistas del hongo (*Attamyces* sp.) cultivado por *Atta cephalotes*. Para el desarrollo de este trabajo se evaluaron las cepas seleccionadas de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. contra *Attamyces* sp. mediante modelos *in vitro*,

posteriormente se seleccionó la cepa del antagonista que presentó un crecimiento rápido y ejerció el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Attamyces* sp.

Igualmente, se consideró importante evaluar el comportamiento defensivo de *A. cephalotes* frente a la contaminación de su jardín por el hongo antagonista seleccionado y adicionalmente evaluar esta cepa mediante bioensayos con colonias ya establecidas en el laboratorio. Este tipo de estudios son necesarios, si se quiere buscar alternativas para el control de las hormigas cortadoras de hojas que sean mas viables al medio ambiente.

RESUMEN

La interacción de 19 aislamientos de *Trichoderma* sp. y 4 de *Gliocladium* sp. con el hongo simbionte de la hormiga arriera *Atta cephalotes*, *Attamyces* sp., fué investigada. La mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* y *Gliocladium* (82.6 %) inhibieron el crecimiento del radio micelial de *Attamyces* sp. posiblemente debido a la capacidad de competencia y colonización del sustrato, mecanismo utilizado por cepas de estos dos géneros. La cepa T-26 de *T. lignorum* fue la que ejerció el porcentaje más significativo de inhibición del radio micelial en un 51.23 % de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) y un grado de colonización entre el 50 - 60 %; en este caso, se observó una zona de inhibición de *Attamyces* sp. en los cultivos mixtos, posiblemente debido a la presencia de sustancias inhibitorias como enzimas, sustancias volátiles y no volátiles, metabolitos, antibióticos, o péptidos.

Durante las observaciones al microscopio de luz, las zonas de contacto de los antagonistas, *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. con *Attamyces* sp. fueron caracterizadas por pérdida de turgencia en la pared celular, vacuolación y granulación del material citoplasmático de las hifas de *Attamyces* sp. y finalmente lisis y desintegración total de la pared celular del hongo atacado en un lapso de 96 horas.

Las interacciones de *T. lignorum* (T-26) y *Gliocladium* (G-55) con *Attamyces* sp. fueron evaluadas con más detalle en un microscopio electrónico de rastreo; las hifas de *T. lignorum* (T-26) crecieron en asociación con las hifas de *Attamyces* sp., en un enrollamiento flojo y masivo, sin embargo, en algunas de las zonas observadas las hifas de *Attamyces* sp. se encontraban desintegradas o la pared celular de las hifas presentaban lisis, lo que sugiere que un elemento tóxico o enzimas líticas pudiesen estar actuando; adicionalmente se observó una estructura en las hifas de *Attamyces* sp. semejante a una clamidospora, la cual no fue observada durante la interacción con *Gliocladium* (G-55), ni tampoco ha sido descrita en la literatura revisada. En las microfotografías con *Gliocladium* (G-55), se observaron protrusiones que posiblemente facilitan el contacto entre las hifas del antagonista con las hifas del hongo simbiote de la hormiga *A. cephalotes*.

Durante las evaluaciones del comportamiento de las obreras de *A. cephalotes* en la descontaminación del jardín, se encontró que las labores de limpieza (podar el jardín e ingerir el inóculo del contaminante) por parte de las obreras medianas y mínimas, fueron determinantes en la descontaminación del hongo simbiote, cuando el tratamiento fue dado en una concentración baja (10^3 conidias/ml de *T. lignorum* (T-26)) y una concentración media (10^6 conidias/ml de *T. lignorum* (T-26)).

Cuando se utilizó la concentración alta (10^8 conidias/ml de *T. lignorum* (T-26)) se registró una alta mortalidad de las obreras las que aparentemente se intoxicaron al ingerir algún elemento presente en el antagonista, siendo imposible la descontaminación del jardín.

Las interacciones de *T. lignorum* (T-26) y *Gliocladium* (G-55) con *Attamyces* sp. fueron evaluadas con más detalle en un microscopio electrónico de rastreo; las hifas de *T. lignorum* (T-26) crecieron en asociación con las hifas de *Attamyces* sp., en un enrollamiento flojo y masivo, sin embargo, en algunas de las zonas observadas las hifas de *Attamyces* sp. se encontraban desintegradas o la pared celular de las hifas presentaban lisis, lo que sugiere que un elemento tóxico o enzimas líticas pudiesen estar actuando; adicionalmente se observó una estructura en las hifas de *Attamyces* sp. semejante a una clamidospora, la cual no fue observada durante la interacción con *Gliocladium* (G-55), ni tampoco ha sido descrita en la literatura revisada. En las microfotografías con *Gliocladium* (G-55), se observaron protrusiones que posiblemente facilitan el contacto entre las hifas del antagonista con las hifas del hongo simbiote de la hormiga *A. cephalotes*.

Durante las evaluaciones del comportamiento de las obreras de *A. cephalotes* en la descontaminación del jardín, se encontró que las labores de limpieza (podar el jardín e ingerir el inóculo del contaminante) por parte de las obreras medianas y mínimas, fueron determinantes en la descontaminación del hongo simbiote, cuando el tratamiento fue dado en una concentración baja (10^3 conidias/ml de *T. lignorum* (T-26)) y una concentración media (10^6 conidias/ml de *T. lignorum* (T-26)).

Cuando se utilizó la concentración alta (10^8 conidias/ml de *T. lignorum* (T-26)) se registró una alta mortalidad de las obreras las que aparentemente se intoxicaron al ingerir algún elemento presente en el antagonista, siendo imposible la descontaminación del jardín.

Finalmente, durante el ensayo en los hormigueros bajo condiciones de laboratorio que fueron inoculados con *T. lignorum* (T-26) a una concentración de 10^8 conidias/ml) los hormigueros se vieron afectados en el área de los jardines; sin embargo, posteriormente estos se recuperaron.

Palabras claves: *Atta cephalotes*, *Attamyces* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., antagonismo, micoparasitismo.

SUMMARY

The interaction of 19 isolates of *Trichoderma* sp. and 4 of *Gliocladium* sp., with *Attamyces* sp. was investigated. Most of the isolates of *Trichoderma* and *Gliocladium* (82.6 %) inhibited the mycelial growth of *Attamyces* sp., possibly because of competition and colonization of the substrate a normal antagonistic mechanism used by these genera. Strain T-26 of *T. lignorum* had the most significant percentage of inhibition of the mycelial radio, 51.23 %, according with Tukey test ($P \leq 0.05$), and had a grade of colonization from 50 - 60 %; in this case, an inhibition zone in *Attamyces* sp. was observed in mixed cultures, due probably to the presence of inhibitory substances such as enzymes, volatile and non-volatile substances, metabolites, antibiotics or peptides.

Microscopic observations revealed that, the zones of contact of the antagonists, *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. with *Attamyces* sp., were characterized by hyphae lost turgor, vaculation and granulation of the cytoplasmic material of the hypha of *Attamyces* sp. and finally the lysis and total disintegration of the cell wall of the fungus attacked in a period of 96 hours.

The interactions of *T. lignorum* (T-26) and *Gliocladium* (G-55) with *Attamyces* sp. were evaluated in detail in scanning electronic microscope;

the hypha of *T. lignorum* (T-26) grew up associated with the hypha of *Attamyces* sp., in a weak and massive roll; nevertheless, in some zones the hypha of *Attamyces* sp. were observed desintegrated or the cell wall damaged; these suggest that a toxic element or lytic enzymes could be acting there; moreover, a chlamyospore - like structure was observed in the hyphae of *Attamyces*, which was not observed during the interaction with *Gliocladium* (G-55), neither case has been described in the reviewed literature. In the microphotographs of the interaction *Gliocladium* (G-55) - *Attamyces* sp., protusions were observed that probably facilitate the contact between the hypha of the antagonist with the hypha of the symbiotic fungus of the *A. cephalotes*.

During the evaluations of the behavior of the work ants of *A. cephalotes* in the decontamination of the garden, it was found that the works of cleanness (to prune the garden and to take the inoculun of the contaminant) by the median and minimum worker ants were definitive in the decontamination of the symbiotic fungus, when the treatment was given in low concentration (10^3 spores/ml) of *T. lignorum* (T-26) and in a median concentration (10^6 spores/ ml) of *T. lignorum* (T-26).

When a high concentration (10^8 spores/ml) of *T. lignorum* (T-26) was used, a high mortality of the worker ants was detected, which probably were intoxicated by taking some element present in the antagonist, therefore decontamination of the garden was impossible.

Finally, during the assay the anthill inoculated at laboratory conditions with, *T. lignorum* (T-26) at a concentration of 10^8 spores/ml, were affected in the garden areas nevertheless, later they were recuperate.

Key word: *Atta cephalotes*, *Attamyces* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. antagonism, mycoparasitism.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 HORMIGA CORTADORA DE HOJAS, *Atta cephalotes*.

1.1.1 **Taxonomía y distribución.** Las hormigas cortadoras (Hymenoptera: Formicidae) pertenecen a uno de los grupos de insectos más evolucionados. Taxonómicamente comprende 12 géneros que constituyen la tribu Attini de la cual se han identificado aproximadamente 190 especies; todas tienen una obligada dependencia con un hongo simbiote como única fuente de alimentación de las larvas y en menor proporción de la reina y las obreras (Cherrett y col., 1989).

Wilson, (1971) clasificó la tribu Attini en tres categorías con base en el tamaño de la colonia, el polimorfismo de las obreras y el sustrato usado para el cultivo del hongo: primitivo, en período de transición y avanzado.

El grupo avanzado está conformado por tres géneros, *Pseudoatta* el cual contiene obreras que presentan un comportamiento parasítico, los otros dos géneros, *Acromyrmex* y *Atta* poseen colonias grandes con obreras polimórficas. En ambos géneros, el jardín del hongo es cultivado sobre un sustrato conformado por hojas frescas, flores y frutos de plantas vivas (Wilson, 1971; Weber, 1972). El rango de especies de plantas utilizadas es muy amplio y de acuerdo con lo reportado por Stradling (1991), está

determinado por la riqueza del hábitat, lo que les confiere gran capacidad de adaptación y explotación de una considerable variedad de plantas. Las hormigas de las categorías más primitivas se caracterizan por tener colonias de tamaño pequeño con no más de 100 obreras monomórficas, su hongo es cultivado sobre sustratos de heces de insectos y sobre material vegetal muerto (Wilson, 1971).

Las Attini se diferencian de otras hormigas por su morfología y comportamiento, pero principalmente, por el hecho de cultivar un hongo simbiote como una estrategia básica para obtener condiciones óptimas para su desarrollo (Diehl-Fleig y Lucchese, 1992).

Las hormigas constituyen uno de los grupos de los insectos eusociales más abundantes que existen, su alta diversidad local y amplia distribución reflejan su tendencia evolutiva a ocupar un amplio rango de hábitats (Hölldobler y Wilson, 1990; Brener y Ruggiero, 1994). La distribución de los géneros considerados como los más evolucionados *Atta* y *Acromyrmex*, está confinada al Nuevo Mundo, aproximadamente entre las latitudes 33°N y 44°S (Brener y Ruggiero, 1994). La tabla 1 resume la distribución de las especies pertenecientes a estos géneros.

Tabla 1. Distribución de las especies de *Acromyrmex* y *Atta*.

Especies	Distribución
Subgénero <i>Acromyrmex</i>	
<i>Ac. ambiguus</i>	Argentina, Brasil
<i>Ac. aspersus</i>	Argentina, Brasil, Perú, Colombia
<i>Ac. coronatus</i>	Bolivia y Brasil hasta Costa Rica
<i>Ac. crassispinus</i>	Argentina, Brasil, Paraguay
<i>Ac. diasi</i>	Brasil
<i>Ac. disciger</i>	Brasil
<i>Ac. gallardoii</i>	Argentina
<i>Ac. hispidus</i>	Argentina, Bolivia, Brasil
<i>Ac. hystrix</i>	Guayana, Bolivia, Perú
<i>Ac. laticeps</i>	Bolivia, Uruguay, Brasil
<i>Ac. lobicornis</i>	Argentina, Bolivia, Brasil
<i>Ac. lundii</i>	Argentina, Bolivia, Brasil
<i>Ac. niger</i>	Brasil
<i>Ac. nobilis</i>	Brasil
<i>Ac. octospinosus</i>	Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Curacao, Ecuador, Guatemala, Guayana, México, Panamá, Perú, Surinam, Trinidad, Venezuela.
<i>Ac. rugosus</i>	Colombia hasta Argentina
<i>Ac. subterraneus</i>	Brasil, Perú hasta Argentina
Subgénero <i>Moellerius</i>	
<i>Ac. heyeri</i>	Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay
<i>Ac. landolti</i>	Norte de Sur America hasta Argentina
<i>Ac. mesopotamicus</i>	Argentina
<i>Ac. pulvereus</i>	Argentina
<i>Ac. silvestrii</i>	Argentina, Uruguay
<i>Ac. striatus</i>	Argentina, Bolivia, Brasil
<i>Ac. versicolor</i>	Estados Unidos, norte de Mexico
<i>A. bisphaerica</i>	Brasil
<i>A. capiguara</i>	Brasil, Paraguay
<i>A. cephalotes</i>	Brasil, México, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Guayanas, Ecuador, Perú y Bolivia.
<i>A. colombica</i>	Guatemala, Costa Rica, Ecuador, Guayana, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Trinidad y Tobago, Venezuela, y Colombia.
<i>A. goiana</i>	Brasil
<i>A. insularis</i>	Cuba
<i>A. laevigata</i>	Brasil, Colombia, Venezuela, Guayana Inglesa, Bolivia y Paraguay
<i>A. mexicana</i>	Estados Unidos hasta El Salvador
<i>A. opaciceps</i>	Brasil
<i>A. robusta</i>	Brasil
<i>A. saltensis</i>	Argentina, Bolivia, Paraguay
<i>A. sexdens</i>	Costa Rica hasta Argentina y Paraguay
<i>A. silvai</i>	Brasil
<i>A. texana</i>	Estados Unidos
<i>A. vollenweideri</i>	Argentina, Brasil, Bolivia

Hölldobler y Wilson, (1990)

1.1.2 Simbiosis con el hongo *Attamyces* sp. Las hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Acromyrmex* y *Atta* se caracterizan por su alto grado de organización social, la cual está dirigida a la conservación y transmisión del patrimonio genético de la colonia (Machado y col., 1988). Ambos géneros presentan un alto grado de polimorfismo entre las obreras, las que presentan un continuo y gradual cambio de tamaño desde la obrera mas pequeña a la más grande (Hölldobler y Wilson, 1990). Stradling y Van Breda, (1994), encontraron una alta variabilidad en el ancho de la cabeza del género *Atta* la que se puede encontrar desde 0.6 mm a 6.1 mm; aunque es difícil asignar grupos de obreras por tamaños determinados, se han descrito algunas categorías para agruparlas (tabla 2).

Tabla 2. Variabilidad del tamaño de las obreras *A. cephalotes*.

Categoría	Longitud del cuerpo	Ancho céfalico
Soldados	10-15 mm*	-----
Medianas (máximas)	7-9 mm*	-----
Medianas (pequeñas)	4-6 mm*	1.6- 2.2 mm**
Mínimas	2-3 mm*	1.2 - 0.8 mm**

* Weber, (1972)

** Hölldobler y Wilson, (1990)

Las obreras de mayor tamaño son conocidas como soldados, se observan, acompañando a las cortadoras en los senderos o reunidos en grupos alrededor de la entrada de los nidos; su principal función es la de cuidar la colonia y defenderla; en raras ocasiones cortan o transportan hojas u otros objetos; las obreras medianas (máximas) cortan las hojas y recobran la vegetación, las obreras medianas mas pequeñas degradan las hojas en pequeños terrones de pulpa y las mínimas colocan los terrones en el sustrato, implantan las hifas de los hongos sobre el sustrato fresco y cuidan del hongo hasta que este crece (Hölldobler y Wilson, 1990).

Existe una fuerte correlación entre el tamaño de las obreras y las tareas que ellas ejecutan, lo que posiblemente da lugar a la especialización y división del trabajo en el cuidado y mantenimiento del jardín (Weber, 1972; Hasegawa, 1993; Wetterer, 1994a; Wetterer, 1994b).

El mantenimiento del jardín y la remoción de material contaminante son dos de las tareas más importantes ejecutadas por las obreras mínimas y medianas pequeñas, debido a que constantemente llegan hongos extraños y bacterias sobre las hojas o sobre el integumento de ellas mismas. Las hojas frescas son llevadas al nido, y son sujetas a procesos de degradación; así primero, las hormigas limpian y cortan las hojas en pequeños pedazos (1 y 2 mm de diámetro); posteriormente, mastican los fragmentos hasta convertirlos en pulpa, durante este proceso adicionan gotas de un líquido anal sobre la superficie y con movimientos de lado a lado con los tarsos superiores, siembran el hongo activamente en el sustrato y mantienen el cultivo por varios medios físicos y químicos (Hölldobler y Wilson, 1990).

Para el mantenimiento del jardín las hormigas Attini han desarrollado una serie de adaptaciones fisiológicas y de comportamiento, es así como una de las enzimas encontradas en las glándulas labiales es una quitinasa, en el intestino medio se ha encontrado lipasa, maltasa, trehalasa y proteasas, cuyo papel consiste posiblemente en acelerar la digestión del sustrato fresco y aumentar la tasa de crecimiento del hongo; se cree por ejemplo que la acción de la quitinasa es la de lisar algunos hongos contaminantes (Cherrett y col., 1989; Hölldobler y Wilson, 1990; Fisher y col., 1996), en las glándulas metatorácicas se han encontrado compuestos como los ácidos - hidroxidecanoico (myrmicacin), y fenil acético, que tienen actividad antibiótica. Además, el myrmicacin tiene un efecto

inhibidor de la germinación de esporas; igualmente estas glándulas producen ácido indolacético el que aparentemente tiene el efecto de incrementar la acidez del sustrato, factor limitante para el crecimiento bacterial, el jardín se encuentra en un rango de pH 4.5 - 4.8 (Powell y Stradling, 1986; Cherrett y col., 1989).

El tipo de interacción de las Attini y su hongo simbiote aún no es muy claro, sin embargo, se sabe que las hormigas dependen en un alto grado del hongo simbiote para obtener muchos de sus nutrientes mientras el hongo depende de las hormigas para el cuidado e intercambio de algunas de las enzimas necesarias para su desarrollo. Aunque es posible que el hongo produzca antibióticos, las hormigas le proporcionan una serie de secreciones que evitan que los jardines sean invadidos por hongos comunes presentes en el suelo y en las plantas utilizadas como sustrato para el jardín como son, *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. entre otros (Cherrett y col., 1989; Hölldobler y Wilson, 1990; Fisher y col., 1996).

Una de las adaptaciones importantes en la morfología de las Attini para el mantenimiento del jardín es el bolsillo infrabucal, el cual cumple varias funciones. Las reinas vírgenes (Gynes) transportan el hongo simbiote para la fundación de nuevas colonias, y sirve como filtro del material que las hormigas remueven con sus mandíbulas, (hojas recolectadas y durante la poda del jardín) (Weber, 1972; Cherrett y col., 1989; Fisher y col., 1996).

El jardín del hongo es esponjoso, su estructura es en forma de colmena, lo que incrementa el área del jardín especialmente en la parte interna; las obreras de todos los tamaños tienen acceso a la superficie externa del

hongo, mientras que a las áreas internas solo pueden llegar las obreras mínimas (Bass y Cherret, 1996a). El jardín, se encuentra localizado en cámaras subterráneas con un diámetro de 25 - 30 cm, el control de la humedad en los jardines es ajustado por corrientes de aire que las obreras acondicionan al abrir y cerrar túneles que comunican con las cámaras de cultivo y por regurgitamiento de agua dentro del jardín por parte de las obreras. El hongo crece en la oscuridad y la temperatura de incubación depende de la profundidad de cada cámara. Powell y Stradling (1986), reportaron una temperatura óptima de 25 °C, a temperaturas mayores o menores el hongo comienza a morir.

Análisis químicos del material del hongo de las colonias de las Attini han mostrado que es rico en aminoácidos libres (4.7 %), carbohidratos (27 %), proteínas (13 %) pero carece de lípidos (Weber, 1972; Powell y Stradling, 1986). Adicionalmente en un trabajo de Powell (1984), citado por Powell y Stradling (1986), se reportó el aislamiento del hongo, utilizando un medio definido y se estimó la productividad del hongo en términos de biomasa; el hongo simbiote de *A. cephalotes*, *Ac. octopinosus*, y *Trachymyrmex urichi* es capaz de utilizar glucosa, fructuosa, galactosa, celobiosa, maltosa, sucrosa, almidón, celulosa y pectina. Debido a esto, el autor sugiere que para utilizar estas fuentes el hongo requiere de enzimas específicas que degradan sus respectivos sustratos. Powell y Stradling (1986), realizaron ensayos para determinar las condiciones óptimas de cultivo del hongo y los índices de crecimiento, utilizaron hongos aislados de cinco especies diferentes y subespecies de Attini, *A. cephalotes*, *Ac. octopinosus*, *T. urichi*, *A. sexdens*, y *A. sexdens rubropilosa* obtuvieron los mejores resultados con un medio agar dextrosa papa (PDA) con un pH entre 4.5 a 5.0, a una temperatura de incubación de 25 °C, el crecimiento fue medido en

términos de producción de biomasa, y adicionalmente pudieron concluir que cada especie de hongo está caracterizada por una productividad diferente.

Las obreras de *Atta* y *Acromyrmex* se alimentan directamente de la savia de las plantas cortadas, lo que corresponde a un 95 %, mientras que solamente el 5 % es tomada del hongo, lo contrario pasa con las larvas que dependen en un 100 % para su desarrollo de los estafilos del hongo simbionte, la reina obtiene su alimento en parte por huevos tróficos que colocan las obreras y de los estafilos del hongo (Hölldobler y Wilson, 1990).

El hongo simbionte aún no se ha identificado claramente; sin embargo, características bioquímicas y micromorfológicas del micelio indican que el hongo de las Attini es un basidiomiceto (Chapela y col., 1994). Estos hongos producen hifas con la parte apical hinchada (gongylidia), las que cuando están en grupos o racimos se les llama estafilos, constituyendo el alimento para las larvas; los estafilos no parecen tener otro objeto y son derivados de hifas vegetativas (Bass y Cherrett, 1996b; Cherrett y col., 1989). En un principio este hongo simbionte fue clasificado como *Rozites gongylophora*; sin embargo, durante los diferentes trabajos que se han realizado se le han dado varios nombres como *Leucocoprinus gongylophorus*, *Leucoagaricus gongylophora*, y *Agaricus gongylophora*. Debido a la falta de claridad se le conoce con el nombre genérico de *Attamyces* (Cherrett y col., 1989; Fisher y col., 1996). Sin embargo en un trabajo reportado por Fisher y col., (1994); en una colonia de *Atta cephalotes* de 13 años de establecida en su laboratorio, encontraron un basidiomiceto que fue posteriormente identificado como *Leucoagaricus gongylophorus*. Una de las basidiomas fue seccionada y el tejido fue