

---

combinación de los dos mecanismos (Elias y Arcos, 1984; McIlister y col., 1994; Jefries y Young, 1994; Horvath y col., 1995; Zhang y col., 1996).

Contrario a lo reportado por Elias y Arcos (1984), la alta tasa de crecimiento micelial de los aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. no estuvo correlacionada con el porcentaje de inhibición. Aunque el crecimiento de los antagonistas a los 26 °C fue muy similar, los porcentajes de inhibición ejercidos sobre el hongo de la hormiga fueron diferentes como se observó en los aislamientos de *Trichoderma* (T-85) y *Gliocladium* (G-53), los cuales presentaron una tasa de crecimiento rápido, no obstante el porcentaje de inhibición debido a T-85 fue de 0 % y el hongo *Attamyces* sp., fue estimulado en su crecimiento en un 15.48 % por el aislamiento G-54 de *Gliocladium*.

En el caso de los aislamientos T-84 de *Trichoderma*, y G-54 de *Gliocladium*, ejercieron un estímulo sobre el crecimiento de *Attamyces* sp. Algunos hongos del suelo como *Trichoderma* sp. muestran un efecto positivo sobre la germinación y crecimiento de algunas plantas, sin que se tenga certeza de cuales sean los factores involucrados, los cuales podrían ser sustancias que estimulen el crecimiento, hormonas o factores de crecimiento, (Cotes, 1993; Goldman y col., 1994; Ousley y col., 1994,). Sin embargo, no se tienen datos de este efecto sobre hongos.

En ninguno de los tratamientos con los antagonistas *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. contra *Attamyces* sp. se observó, inhibición de crecimiento de los hongos antagonistas o colonización por parte de *Attamyces* sp., esto coincide con lo reportado por Fisher y col., (1996) quienes no encontraron evidencia que *L. gongylophorus*, identificado como

el hongo simbiote de la hormiga cortadora de hojas *A. cephalotes* mostrara signos de antagonismo contra otros hongos contaminantes del jardín en evaluaciones *in vitro*; los autores sugieren que el hongo simbiote de las hormigas tiene una baja capacidad de reconocimiento y es probable una dependencia estrecha de las hormigas para su protección. Aunque es importante resaltar en los resultados obtenidos cómo algunos aislamientos (T-85 y G-53) no afectaron el crecimiento de *Attamyces* sp. En algunos casos se observó la presencia de exudados y zonas pigmentadas en las colonias de *Attamyces* sp.; sin embargo, no se encontró correlación con los porcentajes de inhibición que permitiera concluir que el hongo simbiote de la hormiga estuviera ejerciendo un mecanismo de defensa.

El crecimiento del hongo *Attamyces* sp. en condiciones *in vitro* no presentó 100 % de inhibición en su crecimiento micelial con ninguno de los antagonistas evaluados, el porcentaje de inhibición más significativo fue el ejercido por la cepa T-26 de *T. lignorum* (51.23 %); en este caso, se observó una zona de inhibición de *Attamyces* sp. en los cultivos mixtos y una significativa reducción en su crecimiento micelial. La presencia de esta zona se debe posiblemente a la presencia de sustancias tóxicas (enzimas, metabolitos, antibióticos, sustancias volátiles y no volátiles) producidas por el antagonista, como ha sido sugerido en la literatura por la acción ejercida por *Chaetomium globosum* contra *S. cepivorum* (Kay y Stewart, 1994), *Trichoderma* sp. contra *R. solani* (Rincón y col., 1992), *F. solani* contra *S. sclerotiorum* (Jefries y Young, 1994), *Ulocladium botrytis* en cultivos mixtos con *Armillaria ostoyae* y *Heterobasidion annosum*, (Reaves y Crawford, 1994). Los resultados de estos trabajos indican que este tipo de comportamiento es debido a la acción de compuestos tóxicos que precedieron los contactos físicos y a la colonización interna de las hifas.

---

## 4.2 EVALUACIÓN DE MICOPARASITISMO *IN VITRO* ENTRE LOS ANTAGONISTAS *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., SOBRE *Attamyces* sp.

**4.2.1 Observaciones al microscopio de luz.** Trabajos reportados por Jeffries y Young (1994), mencionan como durante los procesos de micoparasitismo de especies de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*, se pueden observar diferentes mecanismos de acción sobre los hongos hospederos, como contacto directo entre las hifas, el cual puede darse de diferentes maneras: enrollamiento de las hifas de los antagonistas sobre las hifas del hospedero ya sea en un estrecho contacto, o un contacto superficial; en algunas ocasiones involucra la penetración directa de las hifas del antagonista a las hifas del hospedero o la formación de estructuras similares a apresorios. El efecto principal sobre la hifas del hongo parasitado se ve marcado por una alteración de la pared celular del hongo inhibido, pérdida de turgencia, acompañado por granulación, y vacuolación (Cotes, 1993; Doi y col., 1994). Sin embargo, en muchos casos no es necesario un contacto directo entre los dos hongos para desencadenar esta respuesta, en estos casos posiblemente enzimas, elementos tóxicos, metabolitos y sustancias volátiles y no volátiles sean las responsables (Cotes, 1993; Jeffries y Young, 1994; Goldman y col., 1994; Bélanger y col., 1995; Lorito y col., 1996).

Durante el estudio de las relaciones necrotróficas entre el antagonista y su huésped es difícil establecer los factores que desencadenan las respuestas en los hongos hospederos debido a que en la mayoría de los casos actúan

---

como un complejo donde varios mecanismos están involucrados y algunos inclusive actúan sinérgicamente (Jeffries y Young, 1994).

La interacción entre los aislamientos de *Trichoderma* sp. o *Gliocladium* sp. y *Attamyces* sp. en condiciones *in vitro*, fue caracterizada en la mayoría de los casos por contacto superficial y crecimiento masivo de las hifas de los micoparásitos entre de las hifas de *Attamyces* sp. y esporulación fuera del hospedero. Las microfotografías revelaron que las hifas de *Attamyces* sp. con la mayoría de los antagonistas, presentaban una secuencia de reacciones, que comenzaban con una pérdida de turgencia de la pared celular, seguida por una desorganización gradual del citoplasma, vacuolación y granulación del material citoplasmático, hasta una lisis total de la pared celular de las hifas (figuras 12-15).

En los ensayos con las cepas, T-22 y T-25 de *Trichoderma* con *Attamyces* sp. se pudo observar cómo la pérdida de turgencia en las hifas de *Attamyces* sp. comenzó antes de que se iniciara la colonización, este resultado sugiere que en estos casos, es posible que la acción por antibiosis preceda al contacto físico (Jeffries y Young, 1994). De acuerdo con estudios realizados se ha encontrado como la actividad enzimática juega un papel importante en el micoparasitismo de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp., aparentemente una variedad de enzimas líticas extracelulares son determinantes en el proceso de la infección inicial del parasitismo, la alta actividad de quitinasa y  $\beta$ - (1-3) glucanasa han sido reportadas en cultivos de *T. harzianum*, *T. hamatum* y *Talaromyces flavus*, mientras parasitan *R. solani* y *Verticillium dahliae* (Benyagoub y col., 1994).

---

Durante la evaluación con las cepas T-30, T-86, T-109 y T-110 de *Trichoderma*, las hifas de *Attamyces* sp. no se vieron afectadas durante las primeras 48 horas, en ese tiempo las hifas de los aislamientos aún no habían comenzado la colonización de *Attamyces* sp. posiblemente en estos casos el contacto físico es necesario para desencadenar la respuesta en las hifas del hongo simbionte, ya que posteriormente cuando comenzó la colonización por parte de los antagonistas, el micelio de *Attamyces* sp. se observó afectado.

De las evaluaciones realizadas con el microscopio de luz se deduce que hay diferentes procesos de acción, de los antagonistas sobre *Attamyces* sp.; algunos ejercieron una acción mecánica por parte de las hifas del antagonista sobre las hifas del hospedero como fue el caso de *Gliocladium* (G-54) (figura 21), también se observó la presencia de estructuras globulares en las hifas de *Gliocladium* (G-55) las cuales facilitaron el contacto con las hifas de *Attamyces* sp., (figura 22) y otros posiblemente por acción enzimática, tóxica o sustancias volátiles y no volátiles, como puede ser el caso de *Trichoderma* T-22, T-25 con *Attamyces* sp.

Sin embargo, es importante analizar los resultados obtenidos con los antagonistas y *Attamyces* sp. comparados con los controles (antagonistas - antagonistas y *Attamyces* sp. - *Attamyces* sp.) lo que permite concluir que en todos los casos evaluados el hongo simbionte de la hormiga se vió afectado por el antagonista, hasta que las hifas estuvieron totalmente desintegradas por efecto de la lisis, a las 96 horas de sembrados los microcultivos. No obstante, es importante tener en cuenta algunos factores que pudieron influir en estos resultados: primero, el hongo simbionte de la hormiga provenía de cultivos con 4 a 7 semanas de sembrados, lo que

significa que el medio ha perdido muchas de sus propiedades nutritivas; adicionalmente el hongo se encuentra sólo sin la presencia de las hormigas las cuales le suministran elementos nutritivos, e incorporan enzimas para una mejor utilización del sustrato (Cherrett y col., 1989; Hölldobler y Wilson, 1990; Fisher y col., 1996). Segundo, la muestra del hongo para los microcultivos debe tomarse directamente del cultivo lo que genera unas condiciones muy altas de estrés, porque se está manipulando el hongo, y posiblemente se alcanza a dañar algo del micelio que se encuentra en el borde del cultivo, igualmente las condiciones se están cambiando al ser enfrentado al antagonista; y finalmente, el hongo de la hormiga no continúa creciendo y comienza a deteriorarse lentamente como se observó en los controles, en algunos casos el micelio presentó daños a las 48 horas y se alcanzó a observar granulación y lisis de la pared celular como también pérdida de turgencia; en estos casos el micelio correspondía a cultivos de *Attamyces* sp. que había sido subcultivado tres veces, mientras que los ensayos que se realizaron con cultivos que habían sido subcultivados 1 y 2 veces, no presentaron este daño en el micelio, el número de veces que el hongo fue subcultivado posiblemente influyó en el deterioro del hongo en los controles (*Attamyces* sp. - *Attamyces* sp.).

A las 96 horas de sembrados los microcultivos, el micelio presentaba pérdida de turgencia en la pared celular, pero en ningún caso se observó desintegración total del micelio como fue observado en los tratamientos con antagonistas. Los controles con los antagonistas no presentaron ningún efecto en las hifas, en algunas ocasiones se vió anastomosis entre las hifas de ambos cultivos, las estructuras reproductivas mostraron formación de conidióforos, fialides, y la producción de conidias fue normal, tanto en los controles como en los tratamientos.

4.2.2 Observaciones al microscopio electrónico de rastreo. Un análisis mas detallado de los antagonistas *T. lignorum* (T-26) y *Gliocladium* (G-55) se realizó mediante la observación en un microscopio de alta resolución; se escogieron estos dos aislamientos por las siguientes razones: *T. lignorum* (T-26) por ser el aislamiento que mayor porcentaje de inhibición causó en las pruebas de antagonismo y *Gliocladium* (G-55) por presentar estructuras de contacto no registradas en los otros antagonistas.

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 muestras estudiadas se encontró que la pared celular de las hifas de *Attamyces* sp. ya presentaba lisis y en algunos casos se encontraban totalmente desintegradas. Este resultado posiblemente nos indica que entre las 24 y 48 horas, ya hay un efecto sobre las hifas de *Attamyces* sp. por efecto de *T. lignorum* (T-26), antes de que las hifas del antagonista (T-26) colonicen al hongo simbiote de la hormiga, lo que sugiere que un elemento tóxico pudiese estar involucrado. También se observó en las hifas de *Attamyces* sp. un engrosamiento de la pared con forma redondeada semejante a una clamidospora, estas estructuras no se observaron en los cultivos de *Gliocladium* (G-55) con *Attamyces* sp.

Beale y Pitt, (1995) describen la producción de pequeños brazos cortos llevando pseudoapresorios en *T. hamatum* y *T. harzianum*. En estados tempranos de parasitismo, estas estructuras podrían tener la forma de células de contacto semejantes a las células encontradas en hongos biotróficos. Durante ese estudio, Beale y Pitt, (1995) no observaron la penetración de estos pseudoapresorios dentro de las hifas del hospedero,

aunque si detectaron que las células del hongo hospedero murieron después del contacto. De manera similar se encontraron estructuras redondas al final de hifas de *Gliocladium* (G-55) denominadas protrusiones las cuales posiblemente facilitan el contacto con las hifas de *Attamyces* sp. en este caso tampoco se observó que dichas estructuras penetraran en las hifas de *Attamyces* sp., igualmente se pudo observar en las microfotografías la pérdida de turgencia de la pared celular de las hifas del hongo simbiote de la hormiga.

#### 4.3 EVALUACIÓN DE COMPORTAMIENTO DE LAS HORMIGAS *A. cephalotes* FRENTE A LA CONTAMINACIÓN DEL JARDÍN DEL HONGO.

4.3.1 Mantenimiento del jardín en una colonia de *A. cephalotes* en condiciones de laboratorio. La división del trabajo entre los individuos especializados de una colonia es una característica importante de la eusociabilidad de los insectos, ya que contribuye a su éxito ecológico debido a que aumenta la eficiencia y efectividad de la respuesta de la colonia a las diferentes tareas (Pratt y col., 1994). Es claro que las obreras (mínimas y medias) están encargadas del cultivo y mantenimiento del jardín, como se puede comprobar en la (figura 30). De acuerdo con Weber (1972), se encontró una correlación directa entre el tamaño de las obreras y las actividades ejecutadas por ellas dentro y fuera del nido, lo que concuerda con lo encontrado en el etograma inicial, donde se observó una correlación entre las actividades realizadas por las mínimas (tamaño, 1 y 2) con el manejo y cuidado del micelio del hongo del jardín y las

---

actividades realizadas por las obreras medias (tamaño, 3 y 4) correlacionadas, con la manipulación de la hoja para elaborar el sustrato; estos tipos de correlación son conocidos como división del trabajo y a medida que van evolucionando se incrementa la especialización lo que conduce a la conformación de diferentes castas morfológicas con deberes específicos (Weber, 1972; Hölldobler y Wilson, 1990; Bass y Cherret, 1996a).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que, además del tamaño de las hormigas, otras características como la edad, influyen en las actividades que están desempeñando, lo que se conoce como polietismo temporal (división del trabajo por edad); en este caso las obreras jóvenes cuidan la cría y tienden a hacer otras tareas dentro del nido, mientras que las obreras mayores tienden a ejecutar actividades como la construcción del nido, defensa y forrajeo (Hölldobler y Wilson, 1990). Esto es importante porque genera cierta flexibilidad en el comportamiento cuando la colonia tiene que responder a un determinado estímulo como a los cambios en la estructura de la población de la colonia, al ambiente o a algún elemento extraño (Pratt y col., 1994).

4.3.2 Contaminación del jardín con la cepa (T-26) de *T. lignorum*. Debido a la gran capacidad que tienen las hormigas de presentar diferentes respuestas frente a determinados estímulos, es posible que modificaciones en las condiciones ambientales, la ausencia de la reina y la introducción de elementos extraños (antagonista T-26) dentro del jardín, provocara cambios en el comportamiento de las obreras. Las actividades que fueron ejecutadas por el mayor número de hormigas de todos los tamaños fueron específicamente las tareas relacionadas con la descontaminación del jardín, es así como la principal tarea ejecutada fue

---

la poda del mismo, actividad que se incrementó en todos los tratamientos evaluados (tabla 11). Es importante analizar como el porcentaje de hormigas que inicialmente se encontraban ejecutando esta tarea 29.12 % (etograma inicial) concuerda con lo reportado en la literatura por Bass y Cherrett (1994), quienes encontraron, que en el jardín usualmente están presentes un 30 % de las obreras en un proceso de descontaminación; durante el tratamiento control el porcentaje de hormigas realizando la poda del jardín se incrementó, a un 80.37 %. En los tratamientos con *T. lignorum* (T-26) esta actividad también se incrementó pero en un menor porcentaje (tabla 11), las hormigas de tamaño mediano 3 y 4 participaron en mayor proporción de esta actividad comparado con el etograma inicial (figuras 30 y 32).

Durante la contaminación del jardín se observó una reacción diferente en el comportamiento normal de las hormigas, aunque en el control ya se observaba cómo todos los tamaños se concentraron en mayor proporción para descontaminar el jardín; cuando éste fue inoculado con *T. lignorum* (T-26), las obreras respondieron inmediatamente después de la contaminación, inicialmente a consumir el inóculo para luego expulsarlo fuera del jardín, este comportamiento no se observó durante la realización del etograma inicial, sin embargo, aunque esta tarea no está descrita como parte de las actividades de mantenimiento del jardín en condiciones normales, las hormigas ingieren líquidos y luego los regurgitan como parte de los procesos de alimentación de la reina y de las crías, intercambio de sustancias (posiblemente enzimas) en el jardín, y transporte de agua para mejorar la humedad de los jardines (Cherrett y col., 1989; Hölldobler y Wilson, 1990).

La actividad de ingerir el inóculo fue la segunda actividad que ejecutaron el mayor número de hormigas de los tratamientos *T. lignorum* T-26 ( $10^3$  y  $10^6$  conidias/ml) en un porcentaje del 24.06 y 39.58 % de hormigas respectivamente, esta actividad fue determinante en la descontaminación del jardín porque permitió sacar el inóculo del jardín y de esta manera no permitir que *T. lignorum* invadiera a *Attamyces* sp., mientras un porcentaje alto de hormigas podaban el hongo para retirar los elementos extraños, es posible que en el tratamiento T-26 con  $10^6$  conidias/ml el porcentaje de hormigas fuera mayor debido a que la concentración fue más alta, en ambos casos la participación de las hormigas de los tamaños 3 y 4 fue mayor.

Durante el último tratamiento, de *T. lignorum* (T-26), con una concentración de  $10^8$  conidias/ml los resultados obtenidos indicaron que el número de hormigas que participaron en la descontaminación del jardín fue menor, ya que ocurrió una alta mortalidad durante los dos primeros días del experimento. La respuesta inicial fue la misma que se presentó en los otros dos tratamientos, las obreras comenzaron a ingerir el inóculo (6.84 %), pero se observó una alta mortalidad en las obreras, incluso las obreras muertas no eran retiradas del jardín. Durante la ingestión del inóculo las hormigas presentaban movimientos lentos y con temblor posiblemente causado por una intoxicación, esto generó que la tarea de retirar el líquido (inóculo) fuera realizada por muy pocas obreras, incluso la poda del jardín también fue realizada por obreras en una menor cantidad comparada con los otros tratamientos, y finalmente las cajas con el jardín fueron abandonadas. Es posible que el hongo *T. lignorum* (T.26) produzca metabolitos o sustancias tóxicas para las hormigas, pero en muy poca cantidad y que debido a esto solamente se

---

observa el efecto cuando se utiliza una concentración alta. Este tratamiento fue el único donde el jardín no pudo ser descontaminado por las hormigas.

El jardín fue descontaminado con la concentración baja ( $10^3$  conidias /ml) y media ( $10^6$  conidias/ml) comparado con el ensayo de las cajas con los jardines sin presencia de hormigas, en donde todos los tratamientos fueron contaminados por *T. lignorum* (T-26).

No obstante, la actividad de sacar el hongo de las cajas petri fue realizada por un pequeño porcentaje de hormigas en todos los tratamientos evaluados (tabla 11), a pesar de que no se presentaron diferencias significativas comparada con las otras actividades es un resultado importante, porque esto significa poder salvar una pequeña parte del hongo simbiote lo que sería suficiente para comenzar nuevamente la fundación de la colonia.

4.3.3 Evaluación del peso de las cajas con *Attamyces* sp. durante la evaluación con la cepa T-26 de *T. lignorum*, con y sin la presencia de hormigas. Durante la segunda fase de este experimento se evaluaron los pesos de las cajas durante los 5 días que duró el ensayo, con la presencia de las hormigas y sin la presencia de éstas, utilizando los mismos tratamientos anteriormente mencionados. Se encontró que los pesos de las cajas, en presencia de hormigas presentaron diferencia significativa con el peso de las cajas con el tratamiento control con cada una de las tres concentraciones utilizadas; esto se explica por la diferencia de peso de las cajas control y el peso de las cajas cuando se adicionan los tratamientos. En el tratamiento control las hormigas

mantiene el hongo vivo aunque no se adiciona sustrato nuevo ni se continúa con la producción del jardín por lo que las cajas mantienen un peso más o menos estable durante todo el ensayo el cual va disminuyendo gradualmente.

Los tratamientos T-26 ( $10^3$  conidias/ml) y T-26 ( $10^6$  conidias/ml) presentaron diferencia significativa, este resultado se debe posiblemente a que durante las evaluaciones algunas cajas fueron abandonadas por las hormigas y el hongo retirado a una caja en particular, esto influyó en el peso de las cajas, en ambos casos durante el primer ensayo la mayoría de las repeticiones conservaron el hongo el cual fue descontaminado, pero durante el segundo ensayo la actividad se concentró en una sola caja.

Por otra parte, en las evaluaciones realizadas sin la presencia de las hormigas se encontraron diferencias significativas entre los controles con cada uno de los tres tratamientos, en este caso el hongo que no recibe ningún cuidado por parte de las hormigas muere, mientras las evaluaciones con los tratamientos ganan peso a medida que los contaminantes van creciendo. En los tratamientos T-26 ( $10^3$  conidias/ml y  $10^8$  conidias/ml), también se encontró diferencia significativa, esta diferencia posiblemente se debe a la diferencia de concentración de el inóculo, por lo que T-26 ( $10^8$  conidias/ml) presentó mayor peso.

En general es difícil establecer como la presencia de las hormigas influye en los resultados con los tratamientos con T-26, porque se presentaron dos inconvenientes, el primero las hormigas en algunas ocasiones desocuparon las cajas y concentraron toda su actividad en un sólo lugar lo que afectó el peso de las cajas en general y lo segundo fue la presencia del mismo



contaminate ya sea T-26 u otro, porque las cajas perdieron peso en muy baja proporción, al morir *Attamyces* sp. y ganaron peso al crecer el contaminante.

Solamente, fue posible analizar la diferencia significativa en el peso de las cajas con el tratamiento control en la presencia de hormigas y sin hormigas, allí se ve claramente como la presencia de las hormigas es determinante para mantener el hongo vivo, a pesar de que se observa en el tratamiento con hormigas que el peso del hongo va disminuyendo, la pérdida de peso es menor comparada con el control sin la presencia de hormigas, esto se debe a que el tratamiento control con la presencia de hormigas conserva el hongo vivo mientras que en el otro tratamiento el hongo muere (figura, 36A).

Durante las observaciones macroscópicas y microscópicas, se encontró que en el tratamiento control durante las dos repeticiones las hormigas concentraron toda la actividad en una sola caja, trasladando todo el hongo; en los dos casos cuando se aisló el hongo en medio PDA, se encontró que el hongo aislado correspondía a *Attamyces* sp.

En el tratamiento con T-26 en una concentración de  $10^3$  conidias/ml, durante la primera repetición, una de las cajas fue abandonada, mientras que las restantes continuaron con una actividad normal, no obstante cuando el hongo fue aislado se encontró *Rhizopus* sp.; sin embargo, la presencia de este hongo no significa que el hongo estuviera contaminando el jardín durante el ensayo, simplemente cuando el hongo simbiote es aislado en el medio PDA, sin la presencia de las hormigas los contaminantes comienzan a crecer. Durante la segunda repetición la

---

actividad se concentró principalmente en una caja y los otros recipientes fueron abandonados. En las cajas donde había actividad se observó alta presencia de exudados sobre *Attamyces* sp., en el segundo caso la mayor contaminación fue debida a bacterias (tabla 16).

Durante el tratamiento de T-26 en una concentración de  $10^6$  conidias/ml, en la primera repetición, se observó actividad en todas las cajas cuando el hongo fue aislado, se encontró como principal contaminante *Rhizopus* sp. En la segunda repetición, la actividad de todas las cajas se concentró en una sola, las otras cajas fueron abandonadas, la principal causa de contaminación fue por bacterias (tabla 16).

En el tratamiento T-26 en una concentración de  $10^8$  conidias/ml, la actividad de las hormigas dentro de las cajas se suspendió durante el primero y segundo días, el olor dentro de la bandeja era bastante fuerte y todos los hongos presentaron contaminación por *T. lignorum* (T-26) y *E. weberi*. En la segunda repetición se observó una mayor humedad y los contaminantes aislados fueron bacterias.

En los tres tratamientos sin la presencia de hormigas, con concentraciones baja, media y alta, el hongo fue colonizado en la mayoría de los casos por *T. lignorum* (T-26). En 3 cajas se encontró que el hongo aislado era diferente a T-26, posiblemente debido a que *Fusarium* sp. y *E. weberi* (Seifert y col., 1995) son altamente contaminantes y de un crecimiento rápido (tabla 16).

---

#### 4.4 BIOENSAYOS CON HORMIGUEROS DE *Atta cephalotes* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Está comprobado que los nidos de hormigas cortadoras de hojas abrigan una rica flora microbiana donde están presentes hongos, levaduras, y bacterias. Debido a que el microclima del nido de las hormigas ofrece condiciones ideales para el desarrollo de estos microorganismos, especialmente hongos, su presencia puede poner en peligro la sobrevivencia de la colonia, ya sea el caso de hongos entomopatógenos o de hongos competidores del hongo simbiote (Diehl-Fleig y Valim-Labres, 1993). Para contrarrestar posibles contaminaciones, el interior del nido es meticulosamente aseado por las hormigas, los objetos extraños ó partículas de material inútil son llevados fuera del nido y adicionalmente la aplicación de material fecal y salival sobre el hongo simbiote, posiblemente conteniendo agentes antibióticos o agentes promotores de crecimiento, sean los responsables en parte de la asepsia del jardín (Hölldobler y Wilson, 1990; Luciano y col., 1995; Fisher y col., 1996).

Los hormigueros mantenidos en laboratorio, están constantemente sometidos a condiciones de estrés, lo que afecta en muchos casos su normal desarrollo, debido a esto algunos de los descensos en el área del jardín que se presentaron durante el ensayo pudieron ser producidos por factores externos al mismo contaminante.

Se ha encontrado que en los ecosistemas naturales las hormigas presentan preferencias por algunos tipos de plantas, mientras que otras no son utilizadas, posiblemente debido al desarrollo de mecanismos de defensa en

---

ellas, como la presencia de metabolitos secundarios que pueden causar la muerte de la hormiga directa o indirectamente al reducir el crecimiento del hongo simbionte. En este último caso, las larvas y la reina serían privadas de su único alimento (Hebling y col., 1996). De acuerdo con los trabajos reportados por Pagnocca y col., (1990); Pagnocca y col., (1996); Hebling y col., (1996), existe evidencia de la presencia de metabolitos secundarios en algunas especies nativas de Brasil como *Virola sebifera* (Myristicaceae), *Sesamum indicum* (Pedaliaceae), *Ligustrum lucidum* (Oleaceae), *Ipomoea batata* (Convolvulaceae) y *Ricinus communis* (Euphorbiaceae); actualmente varios trabajos están orientados hacia el estudio de los metabolitos de estas plantas como posibles biocontroladores de las hormigas cortadoras de hojas. En el trabajo descrito por Hebling y col., (1996), durante el tiempo que las hormigas, *A. sexdens rubropilosa* fueron alimentadas con hojas de la planta *Ricinus communis* presentaron un gradual decrecimiento del volumen del jardín del hongo y una alta tasa de mortalidad de las obreras, incrementándose hasta la sexta semana en la cual el hongo se extinguió completamente y solo sobrevivieron una pocas obreras, algunas larvas y la reina.

Igualmente Bueno y col., (1995) reportaron la muerte de colonias de *A. sexdens rubropilosa* alimentadas con hojas de *Sesamum indicum*, después de dos meses de iniciado el tratamiento, durante este lapso los autores detectaron cambios en la apariencia del nido y el comportamiento de las hormigas, durante los primeros 10 días las hormigas consumieron las hojas normalmente y el jardín conservaba el color gris, pero posteriormente las hormigas comenzaron a rechazar el alimento, cambiaron de posición las crías y el hongo cambió a un color crema, el volumen y la humedad del jardín también se afectó hasta que finalmente

los hormigueros murieron después de ocho semanas. Estos resultados concuerdan con algunos de los cambios observados durante este trabajo como fueron rechazo al alimento, cambios en la posición de las crías en el hormiguero #1, cambios en el color del hongo del jardín y disminución del área del jardín, es posible que si se aumentan las unidades infectivas o la cantidad de veces que se adiciona el inóculo se pueda obtener un resultado mejor, logrando un efectivo control en condiciones de laboratorio.

---

## CONCLUSIONES

1. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Attamyces* sp. más significativo fue el ejercido por el aislamiento T-26 de *T. lignorum* (51.23 %), cepa que fue seleccionada entre los 23 aislamientos evaluados.
2. La cepa T-26 de *T. lignorum* produce posiblemente compuestos inhibitorios para el hongo cultivado por *A. cephalotes*.
3. El hongo simbiote *Attamyces* sp. no ejerció ningún efecto de inhibición del crecimiento micelial sobre los hongos antagonistas evaluados.
4. *Attamyces* sp. no fue inhibido en su crecimiento micelial en un 100 % por ninguno de los aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp., incluso algunos aislamientos de *Attamyces* sp. continuaron su crecimiento normal. Posiblemente *Attamyces* sp. dispone de algún mecanismo de defensa; no depende totalmente de las hormigas para su protección o las cepas de los antagonistas no disponen de mecanismos para inhibir totalmente el crecimiento de *Attamyces* sp.
5. De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de micoparasitismo entre *T. lignorum* (T-26) y *Attamyces* sp., es posible que

---

un elemento tóxico producido por producido por *T. lignorum* pudiese estar involucrado.

6. En las hifas de *Attamyces* sp. se observó un engrosamiento de la pared con forma redondeada semejante a una clamidospora, estas estructuras no han sido descritas en ninguno de los trabajos revisados y su función posiblemente sea la formación de una estructura de resistencia.

7. Las actividades, podar el jardín e ingerir el inóculo fueron efectivas para la descontaminación del hongo; en las concentraciones baja y media de *T. lignorum*, mas no en la concentración alta.

8. La alta mortalidad de hormigas observada durante el tratamiento con *T. lignorum* (T-26) a una concentración de  $10^8$  conidias/ml, sugiere una acción simultánea del antagonista, sobre el crecimiento de *Attamyces* sp. y sobre las obreras causando su muerte; posiblemente un elemento tóxico sea producido por el antagonista, aunque, en una concentración muy baja o con actividad débil, ya que este resultado solo se presentó cuando se utilizó el tratamiento con la concentración mas alta.

9. A pesar de que la actividad de sacar el hongo fue realizada por un bajo porcentaje de hormigas y los resultados estadísticamente no fueron significativos, es un comportamiento interesante porque podría indicar cómo en condiciones adversas las hormigas pueden optar por trasladar a otro sitio una pequeña parte del micelio del hongo y esto sería suficiente para comenzar nuevamente la colonia, lógicamente contando con la presencia de la reina.

---

## RECOMENDACIONES

1. Sería interesante ajustar más la metodología de los bioensayos en los hormigeros en el laboratorio, con el fin de poder evaluar de una manera mas precisa el efecto de *T. lignorum* (T-26). La técnica para adicionar el inóculo también podría ser ajustada posiblemente con cebos con algún atrayente para las hormigas con el fin de aumentar el número de veces que el contaminante entre en contacto con el jardín y por un período de tiempo más prolongado.
2. Se necesita realizar estudios mas profundos para identificar los compuestos tóxicos de *T. lignorum* responsables de la inhibición del crecimiento de *Attamyces* sp. y evaluar su potencial como una alternativa en el control de las hormigas cortadoras de hojas *A. cephalotes*.
3. Las diferentes técnicas empleadas durante este trabajo permiten implementar una metodología para buscar cepas de hongos antagonistas contra *Attamyces* sp. con el fin de seleccionar aislamientos agresivos y potenciales para el control de *A. cephalotes*, teniendo en cuenta dos aspectos fundamentales como son las interacciones *in vitro* de los hongos (antagonista - huésped) y el comportamiento de las obreras frente a la contaminación de su jardín.

---

4. Es importante investigar más a fondo la estructura semejante a una clamidospora en las hifas de *Attamyces* sp. que se formó durante la prueba de micoparasitismo entre *T. lignorum* y *Attamyces* sp. con el fin de profundizar más en el estudio de este hongo.

5. Igualmente, sería importante confirmar e identificar qué compuesto fue el que causó la alta mortalidad de las hormigas cuando se utilizó una alta concentración de *T. lignorum* durante la evaluación, debido a que esto causaría una disminución de la población de las hormigas quedando el jardín mas susceptible a ser contaminado por *T. lignorum*.

6. Durante el aislamiento de *Attamyces* sp. los contaminantes que se encontraron fueron aislados y quedaron formando parte de la colección de microorganismos de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la CIB; sería interesante que en trabajos futuros se evaluara su actividad contra *Attamyces* sp. utilizando las técnicas propuestas.

7. Uno de los factores limitantes en los trabajos de control biológico de hormigas ha sido la falta de cepas entomopatógenas específicas, debido a esto, la autora considera que es de gran importancia desarrollar trabajos con los dos aislamientos de *Metarhizium* sp. que se encontraron durante el transcurso de este trabajo para comprobar su actividad patógena y posterior uso.

8. Finalmente, sería recomendable profundizar en estudios sobre posibles compuestos tóxicos del aislamiento de T-26 de *T. lignorum* con el fin de identificar que tipo de sustancia afecta el crecimiento de *Attamyces* sp.