

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM)

Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic)

Grupo Integrado Simbiosis – Hospedero – Microorganismo (GISHM, UCR)

**Evaluación de la actividad entomopatógena de diversos aislamientos de hongos y cepas de *Bacillus thuringiensis* para el potencial desarrollo de un bioformulado contra las hormigas cortadoras de hojas de la especie *Atta cephalotes***

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Esteve Mesén Porras

Cartago, Setiembre de 2015

**Evaluación de la actividad entomopatígena de diversos aislamientos de hongos y cepas de *Bacillus thuringiensis* para el potencial desarrollo de un bioformulado contra las hormigas cortadoras de hojas de la especie *Atta cephalotes***

Esteve Mesén Porras<sup>1</sup>

**RESUMEN**

Las hormigas cortadoras de hojas (*Atta* y *Acromyrmex*) son una de las plagas más relevantes del Neotrópico debido a su compleja organización jerárquica en castas, la forma de vida claustral, el comportamiento eusocial para cuidar larvas y proteger su hongo simbionte, y la capacidad de forrajeo diurno y nocturno. Debido a estos aspectos y a su habilidad para reconocer y remover partículas dañinas de su jardín fúngico, el control con agroquímicos ha sido una tarea difícil. Por ello, el objetivo de este proyecto fue reconocer si aislamientos de *Bacillus thuringiensis* y hongos recuperados de colonias de zompapas podrían ser agentes de biocontrol de obreras de *Atta cephalotes*. El bioensayo de ingestión con *Bt* permitió reconocer 3 aislamientos que produjeron mortalidades de 45 a 54%, concentraciones subletales entre  $9,97 \times 10^1$  y  $5,86 \times 10^7$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  y tiempos de muerte de 5 y 6 días; valores que coincidieron con los reportes de algunos autores que han investigado la entomotoxidad de  $\delta$ -endotoxinas sobre himenópteros. Los ensayos de patogenicidad y virulencia con microhongos permitieron identificar 6 cepas que exhibieron elevada toxicidad y fueron morfológicamente similares a *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Aspergillus*, patógenos que conviven en las colonias de hormigas podadoras, según la literatura consultada. Estos entomopatógenos ocasionaron mortalidades entre 81% y 33%, siendo la posible cepa de *Metarhizium* la que generó mayor virulencia sobre las zompapas en relación con las cepas de *Aspergillus*; y cuyos valores de  $\text{LD}_{50}$  y  $\text{LT}_{50}$  se ubicaron entre  $4,28 \times 10^1$  y  $1,00 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  y entre 5 y 6 días, respectivamente.

**Palabras clave:** *Atta cephalotes*, control biológico de plagas, *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium*, concentración letal media, tiempo subletal, toxicidad del insecto.

---

<sup>1</sup> Informe presentado para el curso TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2015.

**Evaluation of the entomopathogenic activity from isolation of fungi and *Bacillus thuringiensis* strains for the potential development of a formulation bioproduct for the biological control of leaf-cutting ants, *Atta cephalotes***

Esteve Mesén Porras<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) are one of the most devastating pests in the Neotropical region because of their complex hierarchical organization divided in castes, claustral social life, eusocial behavior to care larvae and protect their symbiont fungus and capacity to forage fresh leaves during the day or night. Considering these factors, and including their ability to recognize and remove potentially harmful particles from their fungus garden, agrochemical control has become a hard task to eradicate this pest. Therefore, the objective of this project was to find out if *Bacillus thuringiensis* and fungi strains isolated from leaf-cutting ant nests could be applied as bioinfectious agents against *Atta cephalotes* workers. Ingestion assays adding different *Bt* lyophilized extracts was a proper method to recognize 3 *Bt* strains that reached mortality percentages in the interval of 45 and 54%, with sublethal concentrations between  $9,97 \times 10^{-1}$  and  $5,86 \times 10^7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , as well as sublethal times between 5 and 6 days; values that fit with similar reports where  $\delta$ -endotoxins were used to determine their entomotoxicity on hymenopteran species. Patogenicity and virulence assays adding microfungi enhanced doses allowed to identify 6 strains that exhibited high toxicity, which were morphotypically similar to *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* and *Aspergillus*, common parasites that coexist with leaf-cutting ant colonies according to the consulted literature. Those entomopathogenic strains showed mortalities of 81% - 33%, where the possible *Metarhizium* strain produced the higher virulence on insects in comparison with the *Aspergillus* strains, and  $\text{LD}_{50}$  y  $\text{LT}_{50}$  values were estimated between  $4,28 \times 10^{-1}$ - $1,00 \times 10^5$  spore  $\text{mL}^{-1}$  and 5-6 days, respectively.

**Key words:** *Atta cephalotes*, pest biology control, *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, sublethal concentration, sublethal time, insect toxicity.

---

<sup>2</sup> Report presented to accomplish the licenciature course FINAL GRADUATION PROJECT. Department of Biology, Technology Institute of Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2015.

## ACREDITACIÓN

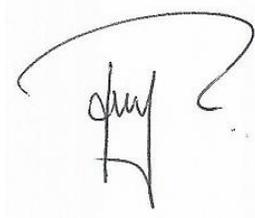
Evaluación de la actividad entomopatógena de diversos aislamientos de hongos y cepas de *Bacillus thuringiensis* para el potencial desarrollo de un bioformulado contra las hormigas cortadoras de hojas de la especie *Atta cephalotes*

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología

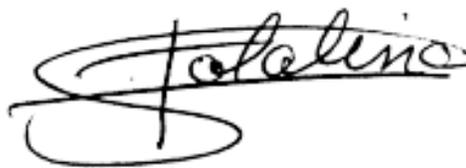
### Miembros del tribunal



Ph.D. Adrián Pinto Tomás



Lic. Fabiola Jiménez Rodríguez



M.Sc. Catalina Murillo Cruz

## DEDICATORIA

*A mis abuelos maternos Elia y Bernardo, y a mi padre Amancio Ronny;  
personas que me dieron muchas enseñanzas de vida y fueron mi  
ejemplo a seguir para impulsar mi carrera y tratara de dar mi  
mejor esfuerzo en cada trabajo a realizar.*

*A Dios, quien siempre me ha concedió muchas bendiciones  
mientras realizaba mis estudios universitarios.*

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar un sentido agradecimiento al Ph.D. Adrián Pinto Tomás, quien me introdujo en este mundo de la investigación, ha tratado de hacer su mayor esfuerzo por posicionarme en el área de la biotecnología vinculada con el control biológico de plagas y me ha incentivado a pensar de manera minuciosa sobre la manera más práctica para estudiar el comportamiento ecológico de un insecto de importancia agronómica, con el fin de buscar soluciones biológicas para su control.

Seguidamente, quisiera agradecer el apoyo incondicional y el seguimiento en mi crecimiento personal y profesional que me ha brindado la Lic. Fabiola Jiménez Rodríguez en todos los proyectos que he desarrollado, quien además ha sido una persona facilitadora, amable, atenta y consejera en todo momento para llevar a cabo el trabajo de laboratorio de la mejor manera posible.

De la misma forma, también me gustaría agradecer a la M.Sc. Catalina Murillo Cruz, quien es una pieza fundamental dentro del grupo de investigación Simbiosis-Hospedero-Microorganismo y es la persona que me proporcionó el apoyo logístico y de organización desde el inicio del proyecto, además fue una gran colaboradora porque mostró un gran interés por la oportuna presentación de avances, pronta compra y obtención de los materiales que necesité en el transcurso de este trabajo.

Para el desarrollo exitoso de este trabajo de graduación, siempre conté con el trabajo en equipo de los colegas de los grupos Integrado Simbiosis-Hospedero-Microorganismo y de Control Biológico, así como dos compañeros extranjeros provenientes de Perú y Alemania, quienes aunque participaron de manera temporal o transitoria durante la realización de este trabajo; su colaboración prestada fue clave en labores de mantenimiento de las colonias de zompopas, giras de campo, sugerencias para mejorar algunos protocolos, selección de los aislamientos de hongos o cepas de *Bacillus thuringiensis*, y el establecimiento y registro de datos de algunos de los protocolos o bioensayos que realicé durante el periodo en que se llevó a cabo este proyecto de investigación.

Me gustaría agradecer a las instituciones y a la amabilidad de las personas que brindaron su apoyo durante las giras de campo en las que asistí para la colecta de colonias de zompopas, en especial a Danilo Brenes Madrigal, Bernal Matarrita Carranza y a la atención brindada por el personal de La Estación Biológica La Selva; a Arturo Ramírez, quien fue un asesor y colaborador en las colectas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; y a German Alvarado, quien nos recibió y ayudó a reconocer colonias en La Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno.

Asimismo, quisiera dar un agradecimiento por la colaboración y amabilidad de todo el personal del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), así como las personas que trabajan en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic); quienes me facilitaron y ubicaron en los lugares físicos para desempeñar el trabajo de laboratorio, me brindaron su amistad, materiales de gira y fueron muy atentos en el préstamo y uso de los equipos de laboratorio.

También me gustaría reconocer la ayuda a nivel de financiamiento que proporcionó la empresa agroquímica industrial RIMAC S.A., así como la Fundación de la Universidad de Costa Rica para la Investigación (FUNDEVI, UCR) que participó en la administración de recursos durante el desarrollo de este proyecto; ya que sin su valiosa contribución, difícilmente hubiese dado inicio este trabajo.

Me gustaría retribuir el esfuerzo que hicieron los profesores de la Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología por explicarme aspectos teóricos y prácticos fundamentales que me fueron de utilidad en el desarrollo del presente proyecto, especialmente en el enfoque estadístico y de métodos de investigación científica para el análisis, procesamiento y evaluación de datos.

De igual manera, me gustara retribuir la amistad que me brindaron los colegas de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, con quienes compartí muy buenos momentos al reencontrarme con muchos de ellos, me ayudaron a continuar creciendo académicamente en el ámbito de las ciencias biológicas, y siguen siendo mis ejemplos a seguir para llegar a ser un excelente profesional.

Finalmente, pero no menos importante, quisiera dar un agradecimiento especial a mi madre Elia Porras Estrada, que ha sido pilar permanente durante toda mi carrera profesional junto con mi hermanos Ronny y Susana Mesén. Igualmente incluyo a mis tíos(as), primos(as) y a mis amigos(as) cercanos; porque cada uno de ellos(as), de alguna u otra forma me han dado su mano en diferentes momentos para seguir adelante en la búsqueda de mis metas personales y profesionales.

## Índice de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>ACREDITACIÓN</b> .....	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
1.1    GENERALIDADES DE LAS HORMIGAS DE LA TRIBU <i>ATTINI</i> .....	5
1.1.1    Origen y distribución geográfica de los géneros <i>Atta</i> y <i>Acromyrmex</i> .....	7
1.1.2    Características anatómicas de los géneros <i>Atta</i> y <i>Acromyrmex</i> y arquitectura del nido.....	7
1.1.3    Ecología y ciclo de vida de las hormigas cortadoras de hojas .....	9
1.1.4    Comportamiento social de las zompopas .....	12
1.2    RELACIONES SIMBIÓTICAS Y AGRICULTURA DE LAS HORMIGAS CULTIVADORAS DE HONGOS .....	14
1.2.1    Relación mutualista de las zompopas con el hongo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	16
1.2.2    El patógeno especializado <i>Escovopsis spp.</i> .....	18
1.2.3    Simbiosis con la actinobacteria <i>Pseudonocardia</i> (género <i>Acromyrmex</i> ) .....	19
1.3    DAÑOS AGROECOLÓGICOS OCASIONADOS POR <i>ATTA</i> Y <i>ACROMYRMEX</i> Y SU ESTATUS COMO PLAGA .....	21
1.4    MECANISMOS DE MANEJO INTEGRADO PARA COMBATIR LAS ZOMPOPAS .....	22
1.4.1    Método de control físico o mecánico.....	23
1.4.2    Estrategia de control químico.....	24
1.4.3    Microorganismos entomopatógenos como agentes de biocontrol .....	26
1.4.3.1    Aplicación de las $\delta$ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de plagas .....	26
1.4.3.2    Utilización de hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol .....	30
1.4.3.3    Consideraciones económicas y logísticas para desarrollar preparados microbianos.....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
2.1    OBJETIVO GENERAL .....	38
2.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1    MUESTREO, RECOLECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE COLONIAS DE <i>ATTA CEPHALOTES</i> EN LABORATORIO .....	38
3.2    AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PURO DEL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL .....	40
3.2.1    ESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN DE CEPAS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> Y DETECCIÓN DE AISLAMIENTOS PROMISORIOS (PROTOCOLO DESARROLLADO POR EL COLEGA JOSÉ FABIÁN CERDAS-ARAYA) .....	40
3.2.2    PREPARACIÓN DE INÓCULOS PARA OBTENER EL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE LAS CEPAS DE <i>BT</i> .....	41
3.2.3    DETERMINACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LA MEZCLA DE $\Delta$ -ENDOTOXINAS Y ESPORAS .....	43
3.2.4    CONTEO DE ESPORAS VIABLES DE CADA CEPA DE <i>B. THURINGIENSIS</i> .....	43
3.2.5    CENTRIFUGACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE LAS DIFERENTES CEPAS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> A EVALUAR.....	44
3.3    BIOENSAYO DE INGESTIÓN EN DIETA SÓLIDA CON CONCENTRACIONES DE <i>BT</i> SOBRE OBRERAS FORRAJERAS .....	46
3.3.1    VALIDACIÓN DE LA INGESTIÓN DE LA DIETA ARTIFICIAL BAJO DISECCIÓN DEL CANAL ALIMENTARIO .....	48
3.4    ESTABLECIMIENTO DE LA COLECCIÓN DE HONGOS Y SELECCIÓN DE POSIBLES ENTOMOPATÓGENOS DE ZOMPOPAS (METODOLOGÍA DESARROLLADA POR JUAN CARLOS CAMBRONERO HEINRICHS).....	50
3.4.1    REACTIVACIÓN DE HONGOS SELECCIONADOS Y PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE ESPORAS.....	50
3.4.2    PRUEBA DE PATOGENICIDAD CONTACTO DEPENDIENTE <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE ESPORAS DE LA COLECCIÓN DE HONGOS SOBRE ZOMPOPAS CORTADORAS .....	52
3.4.3    VERIFICACIÓN PRESUNTIVA DEL PROCESO DE MICOSIS POR EFECTO DE LAS CONIDIAS CRECIENDO SOBRE LOS CADÁVERES DE ZOMPOPAS OBRERAS DE <i>ATTA CEPHALOTES</i> .....	53

3.5	PRUEBA DE VIRULENCIA CONTACTO DEPENDIENTE DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PROMISORIOS SOBRE OBRERAS DE TAMAÑO INTERMEDIO DE <i>A. CEPHALOTES</i> .....	54
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS (MINITAB 17®) .....	56
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>58</b>
4.1	RECUPERACIÓN Y ESPORAS VIABLES DE LAS MUESTRAS LIOFILIZADAS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> .....	58
4.2	TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> SOBRE LAS OBRERAS CORTADORAS.....	59
4.2.1	DETECCIÓN DE PARTÍCULAS DE DIETA SÓLIDA TEÑIDAS EN EL CANAL ALIMENTARIO EN LAS OBRERAS .....	61
4.2.2	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (LC <sub>50</sub> ) DE LAS CEPAS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> .....	62
4.2.3	ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE MUERTE MEDIA DE LAS TRES MEJORES CEPAS DE <i>B. THURINGIENSIS</i> .....	65
4.3	EFFECTO ENTOMOPATÓGENO DE UNA DOSIS ESTÁNDAR DE ESPORAS DE LA COLECCIÓN DE 30 HONGOS EVALUADOS SOBRE HORMIGAS FORRAJERAS DE <i>A. CEPHALOTES</i> .....	67
4.4	ESTIMACIÓN DE LA DOSIS SUBLETAL 95 (LD <sub>95</sub> ) CALCULADA DE LA CEPA DE REFERENCIA DSMZ.....	70
4.5	CRECIMIENTO SAPRÓFITO DE LOS HONGOS PROMISORIOS SOBRE LOS CADÁVERES DE ZOMPOPAS.....	70
4.6	GRADO DE VIRULENCIA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PROMISORIOS SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD ZOMPOPAS DE LA SUBCASTA CORTADORA DE <i>A. CEPHALOTES</i> .....	71
4.6.1	CUANTIFICACIÓN DE LA DOSIS SUBLETAL DE LOS POSIBLES HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	74
4.6.2	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DE LOS HONGOS SOBRE OBRERAS, <i>A. CEPHALOTES</i> .....	74
<b>DISCUSIÓN .....</b>		<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>107</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>		<b>107</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>117</b>
<b>ANEXO 1.....</b>		<b>117</b>
<b>ANEXO 2.....</b>		<b>117</b>
<b>ANEXO 3.....</b>		<b>119</b>
<b>ANEXO 4.....</b>		<b>121</b>
<b>ANEXO 5.....</b>		<b>124</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>		<b>126</b>

## Lista de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Características de los tres clados derivados de hormigas de la tribu <i>Attini</i> .....	6
<b>Cuadro 2.</b> Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> ensayadas por el colega José Fabián Cerdas en un bioensayo burdo y que alcanzaron mayores porcentajes de mortalidad.....	41
<b>Cuadro 3.</b> Lista de cepas de hongos evaluados <i>in vitro</i> sobre obreras de <i>A. cephalotes</i> . ....	51
<b>Cuadro 4.</b> Índices de recuperación del <i>pellet</i> liofilizado de cada una de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> crecidas en 250 mL de medio HCT y número de esporas viables reportado en placas gelificadas con Lauria-Bertani.....	58
<b>Cuadro 5.</b> Valores estimados de concentración letal media para 10 de las cepas promisorias de <i>B. thuringiensis</i> , bajo el modelo de regresión lineal paramétrica de Probit.....	62
<b>Cuadro 6.</b> Valores estimados de tiempo de letalidad medio (LT <sub>50</sub> ) bajo el método de Kaplan-Meier y estimación de los valores de probabilidad de los métodos de Log-Rank y Wilcoxon. ....	66
<b>Cuadro 7.</b> Valores reportados de dosis letales medias (LD <sub>50</sub> ) para las 6 cepas promisorias de posibles hongos entomopatógenos para combatir hormigas cortadoras de hojas, <i>Atta cephalotes</i> . ....	74
<b>Cuadro 8.</b> Tiempos de letalidad medios (LT <sub>50</sub> ) de Kaplan-Meier y estimación de los valores de probabilidad para comparar los tiempos de muerte de cada dosis con de hongos con los métodos Log-Rank y Wilcoxon. ....	75

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Vista macroscópica de tres especies de hormigas zompopas de la casta de obreras forrajeras. (A) *Atta colombica*, (B) *Atta cephalotes*, (C) *Acromyrmex octospinosus*..... 8
- Figura 2.** Vista macroscópica de las castas de insectos temporales y permanentes presentes en una colonia de de hormigas cultivadoras de hongos de la especie *Atta cephalotes*. Individuos permanentes: (A) Obrera forrajera y (B) soldado; individuos temporales: (C) reina áptera, (D) hembra alada y E) macho alado..... 11
- Figura 3.** Estructura y proceso de degradación del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*: A) estructura del jardín fúngico de *Atta cephalotes*; B) representación gráfica de los estratos con el gradiente vertical de degradación de la biomasa del hongo, mostrando los estratos superior (verde), intermedio (rojo) y basal (marrón) **Fuente:** Suen (2010), adaptado por Aylward *et al.* (2013); C) vista microscópica de la estáfila con las estructuras externas de las *gongylidias*, estructuras utilizadas como fuente de alimento de las zompopas, flechas rojas con el código *gly: gongylidia* (magnificación: 100X). ..... 17
- Figura 4.** Estructuras morfológica de *B. thuringiensis*: A) micrografía observada en microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) con la estructura bipiramidal de cepas nativas de *B. thuringiensis* aisladas de suelo del Estado de Guanajuato, México - **Fuente:** del Rincón-Castro *et al.* (2006); B) frotis la cepa *Bt19* a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, teñida con solución de Coomassie R-250 al 0,25% (m/v). Sp: espora, Cry:  $\delta$ -endotoxina, Sp-Cry: inclusión proteica paraesporal asociada a una espora..... 27
- Figura 5.** Mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* cuando son ingeridas por las zompopas: 1) ingestión del complejo espора- cristal por parte del himenóptero, 2) solubilización de los cristales, 2) procesamiento y activación de la protoxina, 3) unión de las toxinas a los receptores, 4) formación de poros en la membrana epitelial y 6) lisis celular y muerte por septicemia. **Fuente:** Adaptado de Brar *et al.* (2007); Pardo-López *et al.* (2012); Price & Gatehouse (2008); Schünemann (2012) y Wu *et al.* (2011). ..... 29
- Figura 6.** Representación del modelo de patogénesis general que ocurre sobre la cutícula del insecto-blanco (zompopa). Una vez que el insecto muere, las hifas colonizan las membranas intersegmentales y aberturas externas del himenóptero (círculos verdes Fig. A. e I.) y posteriormente sobrecrecen desde el interior del cadáver (manchas grises en la figura del insecto I.) para reactivar el ciclo del entomopatógeno. **Fuente:** Adaptado de Mouatcho (2010), Ortiz-Urquiza y Keyhani (2013), Singh-Sandhu *et al.* (2012), Sinia (2013). ..... 34
- Figura 7.** Etapas de colecta y establecimiento *in vitro* de jardines fúngicos de zompopas de *A. cephalotes*. (A) Estructura externa de un montículo maduro con diferentes bocas de entrada, San Pedro de Montes de Oca, San José; (B) estructura externa de un montículo, donde se ubica una cámara subterránea con un jardín fúngico incipiente después de ser excavado, Turrialba, CATIE; C) estructura amolar externa del cultivar incipiente de *L. gongylophorus* rodeado por individuos de diferentes castas; (D) cajas contenedoras usadas para colocar los recipientes con el jardín fúngico; (E) sistema desarrollado para mantener las hormigas *in vitro*, añadiendo hojas frescas para que las obreras incorporen material vegetal fresco, junto con hojuelas avena para que los individuos se establezcan en un periodo de 24 h y algodón humedecido con agua destilada estéril para promover

condiciones de humedad en el contenedor, (F) jardín fúngico con hojas frescas incorporadas por las obreras en el día 2 después de colectar la colonia. ....	39
<b>Figura 8.</b> Medios de cultivo utilizados para cosechar el complejo de esporas y cristales de <i>B. thuringiensis</i> . A) medio nutritivo Lauria-Bertani (LB) utilizado para inducir la producción de células vegetativa. B) medio HCT cubierto con aluminio para prevenir el efecto de los rayos UV sobre los medio, y que se utilizó para alcanzar la fase estacionaria de las células y promover la fase de esporulación y posterior producción de toxinas <i>Bt</i> . ....	43
<b>Figura 9.</b> Placas conteniendo Lauria-Bertani gelificado con agar al 1,5% (m/v) con las diluciones de $10^{-5}$ , $10^{-6}$ y $10^{-7}$ , donde se observa que la proporción de esporas que se ubica entre 30 y 300 UFC/mL fue la dosis de $10^{-5}$ , la cual se utilizó como base para continuar haciendo la cuantificación de esporas a dicha dilución. ....	44
<b>Figura 10.</b> Esquema gráfico de las estructuras anatómicas características de las hormigas cortadoras de hojas del género <i>Atta</i> spp. Fabricius: a) antena, b) espina dorsal. <b>Fuente:</b> Adaptado de Herrera y Valenciaga (2011). ....	49
<b>Figura 11.</b> Gráficos de intervalos de confianza del 95% de las tres corridas de bioensayos en dieta semi-sólida, partiendo de los datos de mortalidad transformados con la función arcoseno, incluyendo los valores de mortalidad obtenidos de los controles negativos, el control positivo con ácido bórico y la $LC_{50}$ de <i>Bt</i> 1A; y mostrando los resultados de la prueba de Tukey: A) cepas evaluadas y sus respectivas dosis: <i>Bt</i> 26, <i>Bt</i> 29 y <i>Bt</i> 42; B) cepas evaluadas: <i>Bt</i> 19, <i>Bt</i> 20, <i>Bt</i> 21, <i>Bt</i> 27, <i>Bt</i> 28 y <i>Bt</i> 45; C) cepas evaluadas: <i>Bt</i> 33, <i>Bt</i> 34, <i>Bt</i> 38, <i>Bt</i> 40, <i>Bt</i> 44 y <i>Bt</i> 47. Las cepas que no comparten la(s) misma(s) letra(s) son significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ). ....	60
<b>Figura 12.</b> Gráfico de barras de los intervalos de confianza del 95%, indicando el grado de mortalidad promedio acumulativo (transformación arcoseno) alcanzado por las 15 cepas más promisorias de <i>B. thuringiensis</i> contra hormigas de la subcasta forrajera de <i>A. cephalotes</i> , junto con un control positivo biológico correspondiente a la $LC_{50}$ de una cepa comercial de <i>B. thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> bioactiva contra zompopas, un control negativo y un control positivo químico correspondiente a ácido trioxobórico ( $H_3BO_3$ ) al $1 \text{ mol L}^{-1}$ . ....	61
<b>Figura 13.</b> Vista macroscópica de obreras de tamaño intermedio (1.2-1.5 cm) disectadas para visualizar la presencia de la dieta particulada o en solución, teñida con el colorante azul utilizado en la preparación de la dieta sólida. Las imágenes A, B y C son disecciones realizadas a obreras de <i>A. cephalotes</i> que murieron al consumir la dieta que incluyó la cepa <i>Bt</i> 29 a $100 \text{ mg mL}^{-1}$ durante el periodo de bioensayo (7 días); mientras que las imágenes D, E y F derivan de disecciones que se hicieron sobre obreras que estaban vivas y continuaron consumiendo la dieta artificial de <i>Bt</i> 45, una vez que concluyó el bioensayo (después del día 7). ....	62
<b>Figura 14.</b> Gráfico Boxplot basado en los rangos intercuartiles de los porcentajes de mortalidad acumulada de cada cepa de <i>B. thuringiensis</i> seleccionada como promisorias para combatir <i>Atta cephalotes</i> , junto con los resultados del análisis de Tukey. Los rangos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (basado en un nivel de umbral del 5% - $p < 0,05$ ). ....	64
<b>Figura 15.</b> Gráfico de dispersión creado a partir de los porcentajes de mortandad alcanzados por las cuatro cepas de <i>B. thuringiensis</i> que presentaron mayor bioactividad contra zompopas obreras de <i>Atta cephalotes</i> . ....	65

**Figura 16.** Gráficos supervivencia, diseñados bajo el método de Kaplan-Meier a partir de las medianas de mortalidad reportadas para combatir obreras de *Atta cephalotes*: A) cepa comercial de *Bti1A*, utilizada como control positivo biológico en los bioensayos, B) cepa *Bt28*, C) cepa *Bt29* y D) cepa *Bt44*. ..... 66

**Figura 17.** Gráfico de intervalos de confianza del 95% de los valores individuales y promedios de mortalidad registrados de los 30 códigos de posibles agentes de biocontrol seleccionados y evaluados en pruebas de patogenicidad para combatir obreras de *A. cephalotes* ( $n = 10, r = 3$ ).... 68

**Figura 18.** Gráfico de efectos principales de la mortalidad promedio acumulada de las obreras de *A. cephalotes* sometidas a una dosis estándar con los 30 códigos de hongos y los respectivos controles positivos y negativos ensayados. Los primeros 9 círculos celestes corresponden a los códigos de hongos que ocasionaron mortalidades similares a la cepa de referencia DSMZ (9 círculos celestes continuos), mientras que los círculos verde claro son los hongos que generaron un efecto estadísticamente comparable ( $\alpha = 0,044$ ) respecto del que produjeron los controles negativos (9 últimos círculos verdes consecutivos)..... 68

**Figura 19.** Gráfico Boxplot de los promedios e intervalos de confianza (95%) de mortalidad de las obreras de *A. cephalotes* probadas en el bioensayo de patogenicidad utilizando un set de 30 hongos a una dosis estándar de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ . Los rombos azul claro corresponden a los promedios de hongos que generaron más de un 90% de mortalidad sobre las zompopas evaluadas. Los promedios que no comparten la misma letra fueron significativamente diferentes (ANOVA:  $p = 0,044$ , Kruskal-Wallis:  $P = 0,00$ )..... 69

**Figura 20.** Proceso de infección contacto-dependiente de los posibles hongos entomopatógenos seleccionados por su efectividad para biocontrolar zompopas obreras de la casta forrajera de *Atta cephalotes* en los bioensayos preliminares de patogenicidad. A) Características macroscópicas del hongo utilizado como control positivo, correspondiente a la cepa DSMZ de *M. anisopliae* creciendo en medio PDA, B) crecimiento saprófito micelial y de esporas de DSMZ sobre las partes intersegmentales y aberturas externas de la zompopa, C) características microscópicas de las hifas y esporas de DSMZ (100X), D) Características macroscópicas del hongo LD10314 (posible *Beauveria* spp.), E) crecimiento saprófito micelial y de esporas de LD10314 sobre el cadáver de una obrera de *A. cephalotes*, F) características microscópicas de las hifas y esporas de LD10314 (100X), G) Características macroscópicas del hongo 29AI (posible *Aspergillus* spp.), H) crecimiento saprófito de 29AI sobre el cadáver de una obrera de *A. cephalotes*, I) características microscópicas de las hifas, esporas y esporófito de 29AI (100X), J) Características macroscópicas del código de hongo 30U (posible *Metarhizium* spp.), K) crecimiento saprófito de 30U sobre el cadáver de una obrera, L) características microscópicas de las hifas y esporas de 30U (100X), M) Características macroscópicas del hongo 29AL (posible *Paecilomyces* spp.), N) crecimiento saprófito de 29AL sobre el cadáver de una obrera, O) características microscópicas de las hifas y esporas de 29AL (100X), P) Características macroscópicas del hongo 30N (posible *Aspergillus* spp.), Q) crecimiento saprófito 30N sobre el cadáver de una obrera, R) características microscópicas de las hifas, esporas y esporófito de 30N (100X), S) Características macroscópicas del hongo 27A (posible *Beauveria* spp.), T) crecimiento saprófito de 27A sobre el cadáver de una obrera, U) características microscópicas de las hifas y esporas de 27A (100X). ..... 71

<b>Figura 21.</b> Gráficos de intervalos de confianza del 95% de la mortalidad generada por los 6 hongos más promisorios evaluados mediante bioensayos de virulencia, con los respectivos resultados del análisis <i>Post-Hoc</i> de Tukey derivado de la prueba ANOVA de una vía. Los promedios que no comparten la misma letra fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ): A) gráfico de intervalos de confianza de la corrida 1 que incluyó los hongos LD10314 y 30U, B) gráfico de intervalos de confianza de la corrida 2 con los hongos 27A y 29AI, C) gráfico de intervalos de confianza de la corrida 3 con los hongos 29AL y 30N.....	72
<b>Figura 22.</b> Gráfico de barras de los valores porcentuales de mortalidad acumulado registrado al ensayar los diferentes códigos de hongos con posible actividad entomopatógena contra forrajeras de <i>A. cephalotes</i> .....	73
<b>Figura 23.</b> Gráfico de dispersión del índice de mortalidad porcentual obtenido al evaluar las seis posibles cepas de hongos entomopatógenos con los promedios de mortandad de las cinco dosis ensayadas.....	74
<b>Figura 24.</b> Gráficos de tiempos de supervivencia generados bajo el método no paramétrico de Kaplan-Meier, a partir de las medianas de mortalidad producidas por seis códigos de hongos bioactivos contra obreras de <i>Atta cephalotes</i> : A) cepa comercial DSMZ, utilizada como control positivo biológico, B) hongo 29AL, C) hongo 30N, D) hongo 2AI, E) hongo 27A, F) hongo 30U y G) hongo LD10314. ....	76
<b>Figura 25.</b> Gráfico de interacciones múltiples sobre la actividad entomopatógena promedio alcanzada por los seis hongos promisorios seleccionados en los bioensayos de virulencia contra zompopas de <i>A. cephalotes</i> .....	77
<b>Figura 26.</b> Vista microscópica de los frotis preparados para las 15 cepas más promisorias de <i>B. thuringiensis</i> que se probaron en los bioensayos de ingestión de dieta sólida sobre zompopas forrajeras de <i>A. cephalotes</i> a concentraciones de 1000 ó 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del liofilizado del complejo espora-cristal. A) $\text{LC}_{50}$ de <i>Bti</i> empleada como control biológico positivo en los bioensayos, B y C) <i>Bt19</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D y E) <i>Bt42</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , F y G) <i>Bt34</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , H e I) <i>Bt44</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , J y K) <i>Bt20</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , L y M) <i>Bt27</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , N y Ñ) <i>Bt45</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , O y P) <i>Bt28</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Q y R) <i>Bt40</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , S y T) <i>Bt38</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , U y V) <i>Bt47</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , W y X) <i>Bt21</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Y y Z) <i>Bt26</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , A-1 y B-1) <i>Bt29</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , C-1 y D-1) <i>Bt33</i> a 1000 y 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ . ...	117
<b>Figura 27.</b> Gráficos de barras de intervalos de confianza del 95% de las 7 cepas comerciales de <i>B. thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> probadas en un bioensayo preliminar para conocer cuál(es) fueron más bioactivas para combatir las zompopas obreras de <i>A. cephalotes</i> y seleccionar a una de las cepas como posible control biológico positivo en el bioensayo fino con las cepas de <i>Bt</i> aisladas de colonia. ....	118
<b>Figura 28.</b> Gráficos de supervivencia derivados de la prueba Probit para estimar las concentraciones letales medias de las diferentes cepas comerciales de <i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> probadas en bioensayo con concentraciones decimales, para definir una posible cepa como control biológico positivo en los bioensayos de ingestión con las cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas de las colonias de <i>A. colombica</i> . A) <i>Bti1A</i> , B) <i>Bti1B</i> , C) <i>Bti2B</i> , D) <i>Bti2D</i> , E) <i>Bti3A</i> , F) <i>Bti3B</i> , G) <i>Bti4</i> .	119
<b>Figura 29.</b> Vista macroscópica de la colección de 30 microhongos reactivados en medio PDA utilizado para establecer los bioensayos de patogenicidad contra obreras forrajeras de tamaño intermedio	

de *Atta cephalotes*. A) cepa de referencia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* DSMZ empleada como control biológico positivo, B) LD10314, C) 29BB, D) 29AI, E) 29S, F) 27A, G) 29N, H) 30U, I) 29BC, J) 29Z, K) 29AG, L) 29P, M) 28I, N) 28Y, O) 29AS, P) 29AA, Q) 28AQ, R) 29J, S) 29AC, T) 29AX, U) 28AM, V) 29AL, W) 29AB, X) 28H, Y) 29Ñ, Z) 30Y, A-1) 30Ñ, B-1) 28E, C-1) 30AK, D-1) 30N, E-1) 29K..... 120

**Figura 30.** Vista macroscópica del proceso de micosis producido por la colección de 30 códigos de hongos evaluados sobre obreras de *Atta cephalotes* sometidas a una prueba de patogenicidad con inóculos de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  (1,5 X de magnificación en estereoscopio) y dispuestas en cámara húmeda. A) cepa de referencia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* DSMZ, B) LD10314, C) 30U, D) 30Ñ, E) 30N, F) 30AK, G) 29S, H) 29P, I) 29K, J) 29J, K) 29BB, L) 29AX, M) 29AL, N) 29AI, Ñ) 29AC, O) 29AB, P) 29AA, Q) 29Z, R) 29N, S) 29BC, T) 28I, U) 28H, V) 28E, W) 28AQ, X) 28AM, Y) 27A, Z) 28Y, A-1) 29AG, B-1) 29AS, C-1) 29Ñ, D-1) 30Y. .... 121

**Figura 31.** Resumen gráfico de las regresiones lineales de Probit (probabilidad del 95%) de cada una de las 15 cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas por su actividad tóxica obtenida en los bioensayos burdos y una cepa comercial de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* activa contra zompopas y usada como control positivo biológico en los bioensayos, para estimar la concentración letal media ( $\text{LD}_{50}$ ) de cada cepa: A) *Bti1A*, B) *Bt26*, C) *Bt42*, D) *Bt20*, E) *Bt21*, F) *Bt28*, G) *Bt29*, H) *Bt34*, I) *Bt44*, J) *Bt33*, K) *Bt45*. .... 122

**Figura 32.** Gráficos de probabilidad derivados de la prueba Probit (95% de confianza) de cada uno de los 6 hongos entomopatógenos promisorios para estimar las dosis letales medias ( $\text{LD}_{50}$ ): A) cepa de referencia de *M. anisopliae*, DSMZ; B) 29AL, C) 30N, D) 29AI, E) 27A, F) 30U y G) LD10314. ... 123

**Figura 33.** Gráfico Box-Plot de la mortalidad producida por las cepas de hongo ensayadas sobre obreras forrajeras de *Atta cephalotes* ( $n = 10, r = 3$ ) bajo bioensayo en placa *Petri*. .... 124

**Figura 34.** Gráfico Box-Plot de la mortalidad producida por las cepas de hongo ensayadas sobre obreras forrajeras de *Atta cephalotes* ( $n = 10, r = 3$ ), mediante un bioensayo en tubo *eppendorf*. .... 125

**Figura 35.** Gráfico Box-Plot de los resultados parciales obtenidos al comparar la mortalidad total de los tratamientos y controles evaluados mediante dos técnicas experimentales (tubo *eppendorf* o placa *Petri*). .... 125

## INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas (orden Hymenoptera: familia Formicidae: subfamilia Myrmicinae) pertenecen a la tribu *Attini* poseen 12 géneros conocidos (Brandão et al., 2011) separados en 3 clados, aunque los más importantes de la región Neotropical a nivel agronómico son las *Attini* superiores que abarcan los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Hölldobler y Wilson, 2011). Este grupo de zompopas poseen una complejidad organizacional porque tienen un comportamiento eusocial para la división de labores y el cuidado de crías (Baer, 2015; Wilson y Nowak, 2014), su sistema de comunicación en colonia (particularmente trofilaxis y antenación) y su respuesta inmune al ataque de patógenos mediante auto-acicalamiento o acicalamiento social (Freddie-Jeanne y Errard, 2009).

Parte de la complejidad por la que se caracterizan estos insectos sociales deriva del mutualismo bipartita con el basidiomicete *Leucoagaricus gongylophorus* (Gadua et al., 2012), el cual es mantenido por las obreras y en retribución, el hongo conformado como un jardín fúngico nutre a la reina y la mayor parte de la colonia con diversas fuentes de carbono acumuladas en una estructura vacuolizada llamada *gongylidia* (Freitas, 2010; Mueller, 2002). Para la manutención del jardín fúngico en cámaras subterráneas, las obreras forrajeras defolian árboles y arbustos para recolectar hojas frescas, que posteriormente son procesadas en la colonia (Klingenberg, 2006; Ward, 2014).

Por lo tanto, considerando todos estos elementos, junto con el comportamiento de forrajeo diurno y nocturno (Mehdiabadi y Schultz, 2010) y el hecho de que la defoliación parcial o total del material vegetal ha acarreado una serie de problemas fitosanitarios para los agricultores debido a los daños ocasionados a cultivos de importancia agronómica (Escobar-Durán et al., 2002; Klingenberg, 2006); se han desarrollado estrategias de control químico incorporando cebos granulados que contengan un atrayente, aunque la efectividad del ingrediente químico activo ha sido variable debido a los hábitos higiénicos de las zompopas (Nickele et al., 2013; Vergara-Castrillón, 2005).

Por estos motivos y tomando en cuenta que el uso de agroquímico no sólo afecta la salud humana, sino también puede ocasionar la contaminación indirecta de fuentes de agua debido a altos niveles de restos de agroquímicos traza (Parral, 2012), las estrategias de control biológico se han convertido en una alternativa eco-amigable, inocua y segura para generar una productividad agrícola sostenible (Donoso et al., 2011). De esta manera, se han planteado estudios de investigación enfocados en la utilización de agentes bioinfecciosos como hongos y bacterias ambientales autóctonos para controlar plagas agrícolas como las zompopas (Kaya y Kaya, 2012).

Una de las estrategias más conocidas es la utilización de las  $\delta$ -endotoxinas que produce la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bravo *et al.*, 2008; Vázquez-Pineda *et al.*, 2012), la cual actúa a nivel digestivo. Las toxinas de *Bt* son lo suficientemente específicas para unirse a receptores de membrana, elicitar la vacuolización de las células asociadas con la membrana plasmática del insecto-blanco y ocasionar la parálisis intestinal (Bravo *et al.*, 2012; Schünemann *et al.*, 2014). Además, existe la alternativa de incorporar esporas pasivas de hongos del *Phylum Ascomycota* (Boomsma *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2012) las cuales germinan y se unen de manera específica a las capas cuticulares del insecto. Posteriormente, la espora germinal ingresa a la hemolinfa, parasitar el cuerpo del insecto e invadir sus membranas intersegmentales para inducir la muerte celular por crecimiento saprófito de las hifas de hongo (Singh-Sandhu *et al.*, 2012; Sinia, 2013).

Basados en los argumentos mencionados, se planteó como objetivo del presente proyecto evaluar la patogenicidad y virulencia de una colección cepas de hongos y *B. thuringiensis* aislados de diversas fuentes (hormigas vivas, cadáveres de insectos, suelo, jardín fúngico y cámaras de desecho) asociados a colonias de zompopas de *Atta colombica* y recuperados en Costa Rica para combatir hormigas de la subcasta forrajera de la especie *Atta cephalotes*. Para lograrlo, partiendo de los aislamientos que obtuvieron los colegas Fabián Cerdas (cepoteca de *B. thuringiensis*) como Juan Carlos Cambroner (colección de hongos), se hizo una selección preliminar de posibles patógenos.

En el caso de las cepas de *B. thuringiensis* congeladas en glicerol al 20% (v/v), se tomó un preinóculo (Lauria-Bertani), que se cultivó posteriormente en un medio con nutrientes limitado (HCT) para inducir la esporulación y eventual producción de las proteínas Cry. Una vez verificado el cultivo puro (solución de Coomassie 0,025% m/v), las células esporuladas embebidas en el medio HCT pasaron por un proceso de centrifugación ( $10000 \times g$ ) y lavados ( $\text{NaCl } 1 \text{ mol mL}^{-1}$ ), los extractos resultantes fueron liofilizados ( $-41 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 Pa) para que las muestras secadas no perdieran actividad. Cada liofilizado de 15 posibles cepas promisorias se sometió a 5 diluciones seriadas (1000 a  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para estandarizar las dosis, las cuales fueron incorporadas en dieta artificial (basado en el protocolo de Silva *et al.* (2003) con citropulpa al 1% m/v como atrayente), que fue suministrada a las forrajeras ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ) con el objetivo de cuantificar la mortandad 7 días *post*-bioensayo. Una vez que las obreras murieron ó después de concluido el bioensayo, las zompopas fueron sometidas a disecciones para ubicar las partículas de dieta en disolución teñidas con colorante azul de cocina.

Las 30 cepas de hongos seleccionados preliminarmente fueron reactivadas (PDA) y luego de 10 días se recuperaron las esporas asexuales (Tween 80® 0,01/ v/v), se cuantificaron las esporas para estandarizar la dosis a aplicar (10000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  en pruebas de patogenicidad y de 1000 a 0,1 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  en pruebas de virulencia), la cual se incorporó individualmente en el tórax de los sujetos de estudio que fueron aislados de su colonia ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ). Transcurridos 7 días, se cuantificó el número de zompopas muertas, cuyos cadáveres fueron dispuestos en cámara húmeda para llevar a cabo la identificación taxonómica de las 6 mejores cepas (Samson *et al.*, 1988; Huber, 2012).

Con todos los resultados reportados, se procedió a hacer el análisis estadístico respectivo con pruebas paramétricas (ANOVA de una vía y Probit) y no paramétricas (Kruskal-Wallis, Kaplan-Meier) para comparar los promedios/medianas de cada uno de los tratamientos con controles positivo y negativo y entre sí, considerando una significancia de 5%.

Los resultados de las pruebas de virulencia con *Bt*, sólo 3 aislamientos (*Bt28*, *Bt29* y *Bt44*) permitieron obtener una mortalidad acumulada cercana a 45% sobre las zompopas evaluadas, comparado con el resto de tratamientos y fue más comparable con una cepa comercial de *Bt* subs. *israelensis* que se empleó como control positivo (*Bti1A*,  $\bar{x} = 73,79\%$ ), mas no así con el control positivo químico de ácido bórico ( $\bar{x} = 99,18\%$ ). La baja eficiencia demostrada en este estudio con las cepas probadas ha sido reportada por otros investigadores (Castilhos-Fortes *et al.*, 2002; Lingathurai *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2003), quienes obtuvieron concentraciones subletales similares a las presentadas en este trabajo con las cepas probadas ( $\text{LC}_{50}$  entre  $9,97 \times 10^1$  hasta  $5,86 \times 10^7$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Parte de lo que pudo reducir la entomotoxicidad de las cepas de *Bt* hacia las proteínas tóxicas deriva del fenómeno de acidificación progresiva, que como sugiere Erthal Jr *et al.* (2004), dicho aspecto pudo afectar la activación de las toxinas porque las enzimas presentes y el pH del canal alimentario de las zompopas de *Acromyrmex subterraneus* disminuye paulatinamente conforme la dieta atraviesa el intestino anterior (pH = 8.2-6.0), medio (pH = 7.6-6.4) y posterior (pH = 5.0-3.0); y el intestino parece no ser lo suficientemente alcalino (pH = 8.0) para solubilizar eficientemente las  $\delta$ -endotoxinas. Además, otros aspectos que también se conocen y pudieron aumentar la tolerancia de los insectos hacia las proteínas Cry fueron la capacidad de auto-renovación de tejidos epiteliales cuando se forma el poro lítico inducido por las toxinas (Engel y Moran, 2013), así como la falta de conocimiento científico acerca de los receptores de membrana asociados con las membranas de vesícula de borde en cepillo a los que se unen las protoxinas (Palma *et al.*, 2013).

Por su parte, en el caso de los hongos, con la prueba de patogenicidad (10000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ), se detectaron 6 cepas (27A, 30U, LD10314, 29AL, 29AI y 30N) que exhibieron mortalidades entre 90-100%; mientras que las restantes 24 alcanzaron mortalidades promedio entre 50 y 85%. Tales resultados fueron asociados con otros estudios (Abril y Bucher, 2007; Merino et al., 2007), quienes obtienen recuperaciones de 2-5 cepas de una colección superior a 50 en varios casos al evaluar otros grupos de himenópteros. Los aspectos más importantes que pudieron mermar la capacidad infectiva de la mayor parte de hongos evaluados sobre las zompopas procede de las defensas cuticulares y epitculares que poseen estos insectos (lípidos, quinonas, difenoles), así como la capacidad de melanización de la cutícula que pudo favorecer el endurecimiento y la esclerotización de los tejidos asociados con esta barrera física (Tsutsui, 2015; Wilson y Cotter, 2013).

Finalmente, la clave taxonómica permitió dilucidar 4 géneros de hongos (*Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Metarhizium* y *Beauveria*), reconocidos por técnicas moleculares como entomopatógenos de *Atta* y *Acromyrmex* por otros autores (Pereira, 2014; Rodrigues et al., 2008). Los porcentajes de mortandad acumulados para estas cepas fueron más promisorios en comparación con los obtenidos con las cepas de *Bt*, ya que variaron desde 80,6% (30U) hasta 33,4% (30N). La posible cepa de *Metarhizium* correspondiente a 30U fue la más promisoriosa, y la literatura respalda este hecho, dado que este género de ascomicete tiene una serie de características que la hacen tener más ventajas (toxinas eficientes llamadas *destruxinas*, adhesinas, hidrofobinas proteínas para evadir sistema inmune) que las hacen más competentes respecto de los otros géneros (Spiteller, 2015; Xiao et al., 2012).

Los altos niveles de mortandad exhibidos por estas cepas resultaron por tanto en dosis y tiempos subletales considerablemente más bajas que las cepas de *Bt* ( $\text{LD}_{50} = 43$  y  $1 \times 10^5$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  y  $\text{LT}_{50}$  entre 5 y 6 días en la mayoría de cepas), valores que coinciden o son muy similares a los reportados por otros autores con insectos sociales como las termitas u otros himenópteros (Sileshi et al., 2012; Johny et al., 2012; Giraldo, 2014). Por consiguiente, para estas 6 cepas, que posiblemente sí lograron penetrar la cutícula, su actividad pudo ser baja debido a factores como ser patógenos casuales y actuar por inmunosupresión (caso de posibles *Aspergillus* 29AI y 30N) (Santi et al., 2010) o por los mecanismos innatos de defensa de estos insectos (*self-grooming*, aplicación de antimicrobianos y ácidos eficientes como el ácido fenilacético), que pudieron mermar la actividad.

Así, se concluye que se recuperaron 3 cepas de *Bt* (28, 29 y 44) y 6 cepas de hongos (30U, LD10314, 30N, 29AI y 29AL) que se podrían revalorar y analizar con pruebas sinérgicas a corto-mediano plazo.

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Generalidades de las hormigas de la tribu *Attini*

Las hormigas (orden *Hymenoptera*: familia *Formicidae*: subfamilia *Myrmicinae*) pertenecen a la tribu *Attini*, la cual comprende 12 géneros y 291 especies descritas; cuyo número de especies por género es el siguiente: *Acromyrmex* (62), *Apterostigma* (44), *Atta* (19), *Cyphomyrmex* (40), *Mycetogroicus* (4), *Mycetarotes* (4), *Mycetophylax* (1), *Mycetosoritis* (5), *Mycocepurus* (6), *Myrmicocrypta* (32), *Sericomyrmex* (22) y *Trachymyrmex* (52) (Brandão *et al.*, 2011). No obstante, las hormigas cortadoras de hojas que corresponden a los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, son el grupo de hormigas más reconocido y abundante de la región Neotropical (Della-Lucia, 2003). Los nombres comunes de estos insectos incluyen: *saúvas* (para el género *Atta*), *quenquéns* (género *Acromyrmex*), *bibijagua*, hormiga podadora, hormiga *isau*, hormiga cabezuda, *bachaco*, *codauca*, hormiga cultivadora de hongos, hormiga forrajera, hormiga parasol y hormiga minera (Della-Lucia, 2003; Giraldo *et al.*, 2011), aunque en Costa Rica se les designa coloquialmente como hormigas zompopas.

La tribu monofilética *Attini* está conformada por tres grandes grupos: dos géneros filogenéticamente derivados forman el clado de “*Attini superiores*”, otros dos géneros comprenden el clado de “*Attini intermedios*” y los restantes ocho géneros son menos diversos y pertenecen al grupo de “*Attini basales*” (Cuadro 1) (Mehdiabadi y Schultz, 2010). A pesar que todas las hormigas de esta tribu son referidas como cultivadoras de hongos, sólo los *Attini superiores* *Atta* y *Acromyrmex* que son herbívoras y fungívoras causan los daños más relevantes, por lo que son nombradas como hormigas cortadoras de hojas (Currie, 2001; Klingenberg, 2006; Ward, 2014).

A pesar que las hormigas cortadoras de hojas son polífagas, se ha estudiado que estos insectos tienen preferencia por algunas especies de plantas (Cuadro 1) y pueden viajar distancias considerables desde el nido para encontrar un cultivo adecuado a través de los trillos que ellas construyen (Poutasse, 2010). De hecho, Link (1997) menciona que las hormigas *Atta* cortan indiferentemente hojas anchas y angostas; pero la preferencia de hojas en *Acromyrmex* varía de acuerdo con la especie. Este criterio es apoyado por el trabajo de Kooij *et al.* (2014)<sup>3</sup>, quienes encontraron que de un número estadísticamente significativo de individuos ( $n = 43 - 1724$ ) de tres especies del género *Atta* (*A. cephalotes*, *A. colombica* y *A. sexdens*) y tres especies del género *Acromyrmex* (*A. echinator*, *A. octospinosus* y *A. volcanus*) ubicados en la localidad de Gamboa,

---

<sup>3</sup> Los datos del material vegetal forrajeado (flores, frutos, hojas de plantas herbáceas, hojas de árboles y otros) fueron transformados al  $\log_{10}$  y se analizaron con el *software* R, mediante el Modelo Lineal de Efectos Mixtos.

Panamá; las hormigas *Atta* presentaron menor uniformidad en el forrajeo de material vegetal ( $D = 1,42 \pm 0,08$  SE) en relación con las hormigas *Acromyrmex* ( $D = 1,86 \pm 0,13$  SE,  $p = 0,024$ ).

Asimismo, estos investigadores averiguaron que el índice promedio de forrajeo de material vegetal fue de  $3374 \pm 476$  SE hormigas hora<sup>-1</sup> en los tres géneros *Atta* y  $80 \pm 14$  SE hormigas hora<sup>-1</sup> ( $p < 0,0001$ ) en los tres géneros de *Acromyrmex*. De igual forma, destacaron que *Atta* cosechó más hojas de árboles que *Acromyrmex* ( $p < 0,0001$ ), mientras que las hormigas *Acromyrmex* forrajearon más fragmentos de flores que las obreras *Atta* ( $p < 0,0001$ ); resultado que se correlacionó con la preferencia al material vegetal que cortan estos dos grupos de hormigas y con el tipo de enzimas identificadas en los hongos cultivados de *Atta* y *Acromyrmex* (Kooij *et al.*, 2014).

**Cuadro 1.** Características de los tres clados derivados de hormigas de la tribu *Attini*.

Grupo de la tribu <i>Attini</i>	Géneros de hormigas	Sustrato proporcionado al jardín fúngico	Polimorfismo de las castas	Tamaño máx. de la colonia	Fundación de colonias
<b>Superior</b>	<i>Atta</i> <i>Acromyrmex</i>	Hojas frescas; y en menor medida de flores, frutos, debris vegetal y semillas ( <i>Acromyrmex</i> )	Altamente polimórficas	Nidos de 17 mil a 8 millones de obreras con 3500 cámaras ( <i>Atta</i> )	Enclaustrada ( <i>Atta</i> ) o semi-enclaustrada ( <i>Acromyrmex</i> )
<b>Intermedio</b>	<i>Sericomyrmex</i> <i>Trachymyrmex</i>	Debris vegetal, frutos, semillas, partes florales, restos de insectos; y en menor medida hojas frescas	Monomórficas y en ocasiones exhiben polimorfia	Nidos que tienen 100-3000 obreras ubicados en el suelo	Oligándrico
<b>Basal o primitivo</b>	<i>Apterostigma</i> <i>Cyphomyrmex</i> <i>Mycetosoritis</i> <i>Mycetophylax</i> <i>Mycocepurus</i> <i>Mycetarotes</i> <i>Myrmicocrypta</i> <i>Mycetagroicus</i>	Debris vegetal; y en menor medida heces y cadáveres de insectos, semillas, savia, néctar, flores, madera en descomposición ( <i>Apterostigma</i> ) y frutos	Monomórficas	Nidos de 10-500 obreras con una o dos cámaras en el suelo o en madera en descomposición ( <i>Apterostigma</i> )	Monándrico

**Fuente:** Adaptado de De Fine Licht y Boomsma (2010), Klingenberg (2006) y Mehdiabadi y Schultz (2010).

La preferencia por follaje fue comprobada por Rodríguez *et al.* (2008), cuyo estudio comparativo evidenció que *A. cephalotes* tuvo una marcada preferencia por hojas de mango (*Mangifera indica*, Anacardiaceae) con respecto a camarón (*Pachystachys lutea*, Anacardiaceae) ó botón de oro (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) ( $p < 0.000001$ ); lo cual se correlacionó con el estado fisiológico de la planta. Según los autores, estas observaciones sugieren que *A. cephalotes* utiliza una combinación de estrategias de (1) cortar las plantas de preferencia según su abundancia relativa y (2) forrajear selectivamente plantas de menor preferencia con una baja oferta de especies de mayor calidad.

### **1.1.1 Origen y distribución geográfica de los géneros *Atta* y *Acromyrmex***

Las zompopas se originaron en el Neotrópico después de la separación de América del Sur y África (Currie, 2001). Actualmente, las hormigas *Attini* se distribuyen en la región Neotropical que abarca desde los 40°N (New Jersey, Estados Unidos) hasta los 44°S (Chubut, Argentina) (Hölldobler y Wilson, 2011); por lo que las zompopas ocupan ecosistemas desérticos y selvas, aunque aquellas que habitan selvas han sido más estudiadas por la defoliación ocasionada en los bosques y por su función dentro del ciclo de nitrógeno (Nobua-Behrmann, 2014).

De las 21 subfamilias de hormigas descritas en la actualidad, la subfamilia *Myrmicinae* abarca la mayor distribución geográfica (48,18%) y por ende, esta subfamilia de hormigas domina la mayoría de hábitats terrestres alrededor del mundo. Este valor procede del comportamiento cláustrico de la colonia, que le permite especialmente a la reina protegerse de cualquier amenaza (parásitos, competidores, enemigos naturales) del ambiente externo, así como la jerarquización de castas y la eusocialidad de los miembros para el cuidado progresivo y la alimentación de las crías hasta que alcanzar su madurez, así como la prevención de un brote de parásitos que puedan dañar al resto de miembros del nido (Wilson y Nowak, 2014); como se explicará en detalle en las siguientes secciones.

### **1.1.2 Características anatómicas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* y arquitectura del nido**

Las hormigas de los géneros *Atta* Fabricius (1804) y *Acromyrmex* Mayr (1865) son los insectos eusociales más estudiados por su alta diversidad en países como Brasil (9 especies del género *Atta* y 18 del género *Acromyrmex*) y Argentina (4 especies del género *Atta* y 17 del género *Acromyrmex*) y porque habitan en grandes colonias subterráneas monogénicas que constan de una serie de cavernas o cámaras subterráneas que constituyen complejas estructuras que les proporcionan refugio y protección al hongo cultivado, la reina y sus crías (Uribe-Celis, 2013). El género *Atta* es el grupo más conspicuo de la tribu *Attini*, constituyen colonias más grandes y son capaces de cubrir una mayor densidad de individuos por hectárea (más de 5 millones de individuos por colonia) en comparación con las hormigas *Acromyrmex*; quienes crean colonias con menos número de sujetos, pero poseen el mismo grado de polimorfismo (Bolton *et al.*, 2007; Branstetter y Sáenz, 2012).

Anatómicamente; las *saúvas* (*Atta*) se distinguen de los *quenquéns* (*Acromyrmex*) en que las primeras poseen una coloración rojiza o carmelita, tienen 3 pares de espinas dorsales en el tórax (mesosoma), un abdomen liso con sedas, no tienen protuberancias entre el pedicelo y el gáster, no más de una espina en los lóbulos laterales de la cabeza, y las obreras miden 0,7-1,0 cm (Figura 1A y

1B); mientras que los *quenquéns* son de color marrón oscuro, poseen 4-5 pares de espinas dorsales en el tórax, un abdomen tuberculado de superficie irregular y con diminutos cráteres (sedas engrosadas), un pedicelo y el primer segmento del gáster con pequeñas protuberancias, muchas espinas en los lóbulos laterales de la cabeza y las obreras miden 0,8-1,2 cm (Figura 1C) (De Souza, 2012; Herrera-Salazar, 2009; Herrera y Valenciaga, 2011; Varón *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Vista macroscópica de tres especies de hormigas zompopas de la casta de obreras forrajeras. (A) *Atta colombica*, (B) *Atta cephalotes*, (C) *Acromyrmex octospinosus*.

Se cree que sus estructuras anatómicas espinosas ayudan a las zompopas a prevenir la oviposición de parásitos de moscas (*Phylum Diptera*: orden *Phoridae*) que son recurrentes en la depredación y control natural de estos insectos; mientras que las mandíbulas son apéndices cefálicos que permiten cortar y transportar fragmentos de vegetación fresca, podar las hifas del hongo simbiote, trasladar y mover las crías y construir túneles y cámaras (Herrera y Valenciaga, 2011).

La estructura interna y externa de los nidos de ambas especies de hormigas forrajeras también presentan diferencias; donde las hormigas del género *Atta* ocupan áreas de hasta 25 m<sup>2</sup> de tierra suelta en la superficie con un largo total del hormiguero de hasta 200 m<sup>2</sup>, crean bocas de entrada que asemejan una estructura cónica con gran cantidad de tierra excavada en el conglomerado central, poseen miles de cámaras internas de hasta 7 m de profundidad (Herrera-Salazar, 2009; Link, 1997) con una población estimada de hasta 6 millones de obreras con gran actividad forrajera (Dos Santos, 2013); mientras que el género *Acromyrmex* construye montículos de forma cónica achatada con escasa actividad forrajera visible alrededor del nido, poca tierra excavada en el conglomerado central, de 1 a 26 cámaras subterráneas de 3 m de diámetro y un máximo de 4 m de profundidad, donde habitan  $1,7 \times 10^4$ – $8,0 \times 10^6$  obreras (Michel *et al.*, 2001; Nickele *et al.*, 2013).

Estos datos sugieren que los nidos de hormigas zompopas tienen un arreglo espacial que conforman estructuras complejas integrado por cámaras subterráneas interconectadas a través de túneles, cuyas profundidades varían con el tipo de suelo, el límite de agua subterránea y el microclima (Moreira *et al.*, 2004). Las altas densidades de individuos que habitan la colonia y que pueden

alcanzar hasta  $8 \times 10^6$  hormigas colonia<sup>-1</sup> son responsables de establecer el patrón de sucesión y colonización de estos insectos sociales (Benckiser, 2010). En Costa Rica, los nidos de zompopas aparecen en bosques y sistemas cultivados, así como en zonas alteradas por el ser humano como lotes baldíos, huertos, jardines, patios y caminos (Varón *et al.*, 2008).

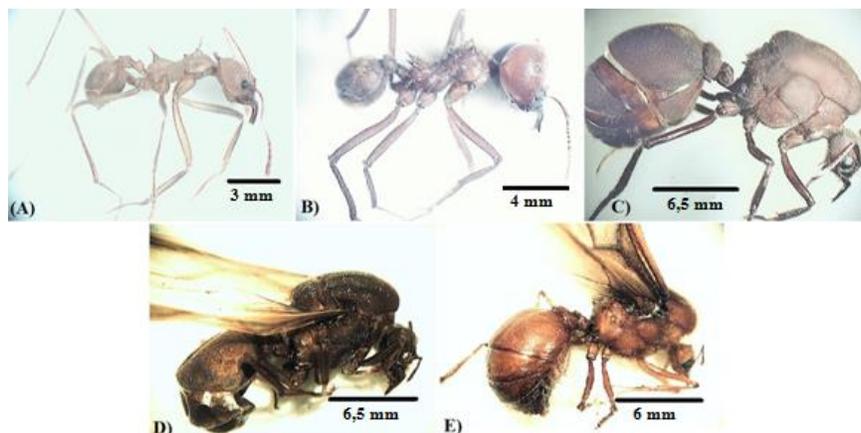
### **1.1.3 Ecología y ciclo de vida de las hormigas cortadoras de hojas**

La eusocialidad desarrollada por insectos sociales es la forma más compleja de socialidad y se ha descrito como el estado de cooperación para el cuidado de crías (huevos y larvas) dentro una comunidad de individuos, repartición de labores y superposición de generaciones en la colonia (Baer, 2015; Yan *et al.*, 2014). Este comportamiento se alcanza bajo tres criterios biológicos: 1) la división reproductiva de labores (con o sin castas estériles), 2) la superposición generacional y 3) el altruismo y la cooperación en el cuidado de los individuos en estado juvenil (De Souza, 2008).

Esta capacidad social es lo que le ha permitido a las zompopas diversificarse y colonizar de forma exitosa los ecosistemas del Neotrópico, además de desarrollar una compleja red de interacciones con bacterias, hongos, plantas y otros animales (Ward, 2014); especialmente por el hecho de instituir una división de labores en el nido. Por estas razones, estos himenópteros poseen una organización social compleja porque han producido individuos temporales (alados y fértiles) y permanentes (ápteros e infértiles), que discrepan en el tipo de alimentación que recibe el resto de castas (De Souza, 2012). Además, exhiben una “disciplina militar”; lo que significa que este himenóptero está segmentado en ocho castas que desempeñan funciones diferenciadas dentro del nido según su tamaño, como describen Della-Lucia y Vilela (1993), Dijkstra *et al.* (2004), Herrera-Salazar (2009), Smith *et al.* (2009), Suárez-Gómez y Tofiño-Rivera (2012) y Vergara-Castrillón (2005):

- 1) *Obreras*: son los individuos que constituyen el mayor porcentaje de miembros que habitan la colonia, son altamente polimórficas y están divididas en seis subcastas:
  - a. *Exploradoras*: inspeccionan los terrenos y seleccionan el material vegetal a cortar y que debe ser enviado al nido, por lo que deben guiar a las forrajeras.
  - b. *Cortadoras*: seccionan la vegetación con sus grandes mandíbulas, construyen caminos de forrajeo y dan mantenimiento al vertedero de desechos (Figura 2A).
  - c. *Cargadoras*: transportan el material vegetal desde el punto donde se cortan los fragmentos vegetales hasta las cámaras del nido.

- d. *Escoteras*: limpian las partes de plantas recién cortadas para prevenir la entrada de otros insectos y cuerpos extraños en el nido.
  - e. *Jardineras*: son hormigas mínimas que dan manutención al jardín fúngico y protección a la reina, fraccionan los trozos vegetales en fragmentos más pequeños, alimentan a las crías y a la reina mediante trofilaxis, defienden y transportan los huevos y larvas inmaduras que representan el 60% de la colonia.
  - f. *Soldados*: se diferencian de otras castas por su cabeza más desarrollada que el resto de castas, defienden el hormiguero de amenazas externas con ayuda de sus fuertes mandíbulas (Figura 2B) y se mantienen vigilando las entradas del jardín fúngico. Esta casta sólo se presenta en el género *Atta* y miden cerca de 1,0-1,3 cm.
- 2) *Reina*: es el insecto que gobierna el hormiguero, quien posee mayor tamaño en la colonia (2 cm) y es más longevo (más 20 años) que el resto de individuos de la colonia (las obreras viven de 4 a 7 meses, los soldados tienen una vida útil de 2 años y el hormiguero puede durar más de 20 años). Una reina de *Atta colombica* almacena inicialmente 450 millones de espermatozoides para matener colonias por décadas y ovispositar entre 150-200 millones de huevos durante su vida, que darán origen a nuevas obreras de todas las castas para establecer y mantener el nido (Figura 2C) (Baer, 2015; Hölldobler y Wilson, 2011).
  - 3) *Hembras aladas*: junto con los machos, son los únicos individuos fértiles dentro la colonia porque su labor es perpetuar la especie al procrear nuevos individuos; por lo que una vez fertilizadas en el aire durante el vuelo nupcial pierden sus alas y se entierran para fundar una nueva colonia y convertirse en la reina si logran sobrevivir los depredadores (Fig. 2D).
  - 4) *Machos alados*: son individuos temporales porque aparecen en la época de apareamiento para fertilizar las hembras aladas y mueren en el suelo unas horas o un máximo de dos días, una vez que concluye el vuelo nupcial (Figura 2E).



**Figura 2.** Vista macroscópica de las castas de insectos temporales y permanentes presentes en una colonia de de hormigas cultivadoras de hongos de la especie *Atta cephalotes*. Individuos permanentes: (A) Obrera forrajera y (B) soldado; individuos temporales: (C) reina áptera, (D) hembra alada y E) macho alado.

*Atta* y *Acromyrmex* tienen un sistema de determinación sexual haplo-diploide en el que los machos se desarrollan por partenogénesis de huevos haploides no fecundados y las hembras – sean reinas vírgenes o nuevas obreras – derivan de huevos diploides fertilizados (López-Riquelme y Ramón, 2010; Smith *et al.*, 2009). Así, la zompopa es un insecto holometábolo que alcanza una metamorfosis completa y su ciclo evolutivo comprende 5 etapas que son el huevo, que da origen al estado larvario, pasa a la etapa de pre-pupa y luego al estadio de pupa, que concluye en la etapa de adulto (De Souza, 2012). Auson (2011), Pérez (2009), Vaccaro y Mousques (1997) y van Gils (2011) mencionan que el ciclo de vida de estos himenópteros consta de tres etapas:

- [1] *Fundación*: la reina recién inseminada almacena de 300 a 7000 millones de espermatozoides viables en una bolsa anatómica de su abdomen llamada *espermateca* para asegurar su reproducción por 10 a 20 años; se desplazan hasta 10 km y aterrizan en el suelo en busca de un sitio de nidificación. La nueva reina se desprende de sus alas con movimientos fuertes contra el suelo para empezar a construir el orificio de la primera cámara subterránea (10 h), en el que se entierra para regurgitar un inóculo del hongo de su cavidad infrabucal (48 h) y con reservas de grasa en su cuerpo y de proteínas de sus músculos alares hacen la postura de las primeras crías (4 – 6 días), que serán alimentadas por secreciones de la reina y del hongo (López-Riquelme y Ramón, 2010).
- [2] *Crecimiento ergonómico*: ocurre una vez que madura la primera generación de obreras (62 a 66 días), cuando éstas se abren camino hacia arriba excavando a través del canal de entrada obstruido (90 días) y comienzan a crear más cámaras y forrajear material vegetal fresco que servirá como sustrato en la cámara de cultivo del hongo. En esta etapa, la labor de la reina se reduce a poner huevos y mantener el control feromonal de la colonia; la cual es autosuficiente porque sobrepasó las adversidades ambientales y estableció un sistema de división de labores donde todos sus miembros se orientan en la búsqueda de alimento, la crianza de nuevas obreras y contribuyen a la expansión en el hormiguero. El desarrollo del nido maduro puede tardar hasta 3 años para *Atta* y 1 año en *Acromyrmex*, en cuyo periodo ya se gestó la primera generación de insectos alados (Vaccaro y Mousques, 1997).
- [3] *Reproducción*: luego de ≈38 meses desde su fundación, la colonia madura produce nuevas hembras y machos alados para iniciar un nuevo proceso de colonización al inicio de la

estación lluviosa, donde  $\approx 3000$  hembras y 15000 machos abandonan la colonia para realizar el vuelo nupcial; que se origina cuando las reinas vírgenes almacenan un *pellet* del hongo del nido materno en su compartimiento infabucal y vuelan para ser fecundadas por uno hasta ocho machos. Cabe mencionar que la renovación del ciclo de vida se alcanza si la hembra fertilizada sobrevive los peligros de su viaje inicial, ya que se vuelven susceptibles al ataque de depredadores y la mortalidad de las nuevas reinas suele ser muy alta<sup>4</sup>.

El tiempo que tarda el vuelo nupcial depende de la especie (*Atta* o *Acromyrmex*). En el caso de *Atta bisphaerica*, se estima que esta actividad es recurrente en días con alta intensidad de luz, bajo condiciones de elevada humedad relativa y durante las 11:00 y 14:00 horas (Ichinose *et al.*, 2004). Aparte, se ha hipotetizado que la capacidad poliándrica de las reinas para aparearse con varios machos alados es lo que permitió desarrollar la diversidad evolutiva entre castas y la creación de individuos cada vez más resistentes al ataque de parásitos del suelo; aunque también se ha sugerido que debido a la relativa heterogeneidad genética de las zompopas, algunos genotipos suelen ser más vulnerables al ataque de patógenos altamente evolucionados (Hughes *et al.*, 2008).

#### **1.1.4 Comportamiento social de las zompopas**

Las zompopas manejan todo un sistema de comunicación en masa que depende del intercambio y reconocimiento de olores que son producidos a través de señales bioquímicas; y Auson (2011) comenta que los insectos sociales cuentan con 12 categorías funcionales para su auto-organización:

- 1) *Alarma*: se origina en respuesta a la invasión de enemigos externos en cámaras del nido. Esta respuesta que se produce por “antenación” es importante para que los individuos moribundos perezcan en aislamiento social (Heinze y Walter, 2010), así como para que otros miembros de la colonia reconozcan y entierren cadáveres del jardín fúngico en las cámaras de basura donde se descartan los desechos del nido (Sun y Zhou, 2013).
- 2) *Atracción*: que conduce a la agrupación de las forrajeras a lo largo de los senderos.
- 3) *Reclutamiento*: comportamiento que ocurre en la búsqueda de sitios para alimento, nuevos sitios para albergar la colonia e identificación sobre la ubicación de enemigos naturales.
- 4) *Acicalamiento social (grooming)*: es un mecanismo de “inmunidad social” bajo el cual se da la asistencia en el cuidado de crías, mantenimiento del olor de la colonia, sanitización del jardín fúngico, minimización de la entrada y el desarrollo de agentes indeseados para

---

<sup>4</sup> De 10 hembras que son fertilizadas, 1 de cada 10 (proporción de 1:10) logra sobrevivir las condiciones ambientales. Menos del 1% de estas sobrevivientes tendrán éxito en llevar su colonia a la madurez.

prevenir infestaciones, y remoción de sustancias químicas que se desarrolla con un comportamiento higiénico entre los miembros de la colonia (Benckiser, 2010).

- 5) *Trofilaxis*: se considera un comportamiento higiénico que se realiza para la transferencia de alimento líquido de forma oral, anal, fluidos corporales y feromonas.
- 6) *Intercambio de partículas*: ocurre durante el traslado de alimento sólido.
- 7) *Efecto grupal*: es un comportamiento de defensa conductual para estimular o inhibir colectivamente una actividad en particular, y ha sido útil para disuadir enemigos naturales o secuestrar sustancias tóxicas mediante la expresión de compuestos bioquímicos o una sobrecarga sensorial para inhibir sus patas, alas o partes bucales (Kaltenpoth y Engl, 2014).
- 8) *Reconocimiento*: de compañeros y castas del nido para agruparse.
- 9) *Determinación de castas*: sea para estimular o inhibir el desarrollo de cierta casta.
- 10) *Control de la competencia*: ocurre durante la época de reproducción.
- 11) *Establecimiento de marcas territoriales o de orientación*: el establecimiento de trillos o senderos que conducen al hormiguero es vital para ubicar a las obreras forrajeras en un punto específico para cortar fragmentos de material vegetal, y también es importante para acarrear desechos o restos de insectos hacia los basureros (Uribe-Celis, 2013).
- 12) *Comunicación sexual*: que incluye reconocimiento entre especie, de género, sincronización de la actividad sexual y respuestas a rivales durante la competencia sexual.

Dados estos comportamientos bioquímicos que realizan las zompopas, Freddie-Jeanne y Errard (2009) averiguaron que las castas de obreras mayores y las forrajeras de *Acromyrmex octospinosus* (67%) y *Acromyrmex subterraneus* (63%) gastaban más tiempo en realizar la trofilaxis, el auto-acicalamiento y el acicalamiento social (del inglés *self-grooming* y *allo-grooming*) en relación con las obreras intermedias, las mínimas y las jardineras; y concluyeron que las obreras mayores y forrajeras se enfocaban en llevar a cabo estas funciones para prevenir el desarrollo de patógenos en el nido, apaciguar la tensión social y distribuir la savia de plantas y néctar floral; mientras que las castas restantes, al encontrarse en contacto directo con el hongo simbionte, en algunas ocasiones regurgitan gotículas endógenas del hongo cultivado en la superficie del jardín sobre otra obrera para prevenir la propagación de infecciones o enfermedades en la colonia.

El comportamiento de sanitización a través de *grooming* mediado por las glándulas metapleurales entre diversas especies de cultivadoras de hongos (*Atta cephalotes*, *A. sexdens*, *A. colombica*, *Acromyrmex octospinosus*, *Trachymyrmex cf. cornetzi*, *Sericomyrmex amabilis*, *Sericomyrmex* spp.

1, *Trachymyrmex zeketi* y *Cyphomyrmex longiscapus*) también fue evaluado por Fernández-Marín *et al.* (2009) mediante un modelo lineal general antes y después de añadir inóculos del entomopatógeno *Metarhizium* spp. y el patógeno *Escovopsis* spp. al jardín fúngico; y averiguaron que el índice de *grooming* fue más pronunciado en *A. colombica* y *S. amabilis* en comparación con *Ac. octospinosus* y *T. zeketi* ( $\chi^2 = 96,5$ ,  $p < 0,0001$ ), lo cual se correlacionó con la capacidad de *Acromyrmex* y *Tachymyrmex* de desarrollar bacterias que secretan antifúngicos en su cutícula y debido a la presencia de crías que obliga a las hormigas a mantener su nido libre de patógenos.

Los efectos ambientales también inciden sobre el comportamiento social de las zompopas, y Anglada *et al.* (2013) comprobaron este aspecto al analizar el efecto del forrajeo de las hormigas *Atta* y *Acromyrmex* en las diferentes épocas del año (primavera, verano, otoño e invierno) en la provincia Entre Ríos, Argentina sobre cultivos de alfalfa. Los resultados arrojaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) sobre la actividad forrajera durante la época de invierno y el resto de las estaciones, por lo que estimaron que la dinámica poblacional de las hormigas disminuye cuando hay bajas temperaturas y aumenta al alcanzar temperaturas de 18 – 25 °C.

## **1.2 Relaciones simbióticas y agricultura de las hormigas cultivadoras de hongos**

El complejo simbiótico que rodea a las hormigas forrajeras abarca un mutualismo multipartita, en el que todas las relaciones simbióticas son dependientes y están interconectadas entre sí: (1) las hormigas cosechan el hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, (2) éste puede ser parasitado por hongos antagonistas como *Escovopsis* spp., (3) aunque éstos antagonistas del hongo cultivado también son controlados naturalmente con ayuda de la actinobacteria *Pseudonocardia* que crece en cutícula de las zompopas y es capaz de producir sustancias antifúngicas que afectan a los parásitos oportunistas como *Escovopsis* (Klingenberg, 2006).

Las hormigas *Attini*, como sofisticados insectos sociales, son consideradas como verdaderas agricultoras debido a su capacidad de cortar y acarrear fragmentos de 1-2 mm de diámetro de material vegetal para procesarlos y disponerlos como sustrato para el hongo cosechado con el fin de constituir un *jardín fúngico* (Douglas, 2009; Gadagkar, 2000), cuya estructura asemeja a una piedra amolar, globular, esponjosa, frágil y grisácea que tiene un diámetro entre 10–25 cm (Figura 3A) (Bolougne, 2011; Morgan, 2008). Como se mencionó anteriormente, las especies de la tribu *Attini* han optimizado el sustrato proporcionado a la honguera y por ello se han separado en cinco grupos agrícolas: (1) cortadoras de hojas y pasto (*Atta* y *Acromyrmex*) (Howard, 1988), (2) *Attini*

superiores basales –*Paleoattini* y *Neoattini*– (*Trachymyrmex* y *Sericomyrmex*) (Poutasse, 2010; Schultz y Brady, 2008), (3) *Attini* inferiores (*Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus* y *Myrmycocrypta*) (Schultz et al., 2005), (4) cultivadoras de levaduras (*Cyphomyrmex rimosus*) que adicionan néctar, ramas secas y heces; y (5) cultivadoras de hongos coral de la familia *Pterulaceae* (*Apterostigma pilosum*, *Basidiomycota: Agaricales*), que añaden material vegetal, ramas secas y heces (Mikheyev et al., 2007).

De Fine Licht y Boomsma (2010) realizaron una revisión de literatura, en el que dividieron los sustratos suplementados al hongo en 12 categorías<sup>5</sup>, y mediante un análisis no paramétrico determinaron que existían diferencias significativas entre el tipo de sustrato incorporado al jardín fúngico y el grupo agrícola de la tribu *Attini* estudiado (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 6.6$ , g.l. = 3,  $p = 0.087$ ). Asimismo, no hallaron un patrón de preferencia por un único sustrato porque en el total de artículos científicos consultados se halló que todas utilizan más de una categoría de sustrato en proporciones variables: las hormigas cortadoras de hojas, *Attini* superiores y cultivadoras de hongos pteruláceos coral utilizan 7 categorías de sustratos; las *Attini* inferiores usan entre 4 y 5 categorías; y las cultivadoras de levaduras usan 3 categorías; como se resumió en el Cuadro 1.

El jardín fúngico de las hormigas de la tribu *Attini* es un compendio de biomasa del hongo al que se le incorpora meticulosamente vegetación fresca para organizar un ensamblaje microbiano estable, y para lograrlo los insectos crean un gradiente de degradación vertical de la biomasa (Figura 3B) (Aylward, 2013) que está conformado por 3 estratos diferenciados: (1) una región superior juvenil de coloración verde-oscura, donde se añade material fresco renovado que contiene polímeros y toxinas de plantas, (2) un estrato intermedio constituido por células blanquecinas-grisáceas con pared delgada granular, donde se empiezan a agotar los nutrientes y (3) el estrato basal o inferior que posee células con una tonalidad amarillenta-marrón, y es donde se deposita biomasa parcialmente digerida que debe ser tratada y dipuesta por las hormigas en las cámaras de desecho que operan como vertederos (Bolougne, 2011; Moran, 2008; Salmerón-Cordero, 2009).

Aylward et al. (2013) hicieron uso de herramientas de genómica y metaproteómica para investigar el proceso de degradación en los jardines fúngicos de *Atta cephalotes* y *Acromyrmex echinaior*

---

<sup>5</sup> Las 12 categorías de sustrato incorporado por las hormigas *Attini* y derivadas del estudio fueron: (1) hojas frescas, tallos y plántulas, (2) fragmentos de césped fresco, (3) tejidos de vertebrados, (4) néctar, (5) madera en descomposición, (6) ramas secas, (7) frutos y bayas, (8) flores, (9) debris vegetal, (10) semillas y cáscaras, (11) heces de insectos y (12) cadáveres de insectos.

recuperados de Argentina, Costa Rica, Panamá, Perú; y mediante un agrupamiento de secuencias de enzimas identificadas con actividad redox, celulasas, pectinas y hemicelulasas en un *heat map*; se estimó que había una cantidad abundante de lacasas (con actividad redox) con proporciones variables de 200 hasta 2000; cantidades de 200 a 500 carbohidrato esterasas (hemicelulasas) y de 250 a 2000 polisacárido liasas (pectinasas), y una densidad mínima de glicosil hidrolasas (celulasas) que variaron en número de 3 a 30; por lo que no se encontró un patrón claro respecto del tipo de enzimas identificadas en cada uno de los estratos de los jardines de *Atta* o *Acromyrmex*.

Considerando estos aspectos, para una sana manutención del jardín, las hormigas jardineras y forrajeras deben velar por el continuo descarte de sustrato desgastado, la remoción de esporas maduras y posterior subcultivo en otras cámaras que desarrollen nuevos jardines fúngicos (5 – 7 semanas) con la aplicación de abonos y restos fecales en el jardín (Mueller, 2002). Adicionalmente se realizan tareas de *allo-grooming* con glándulas metapleurales, deshierbe y secreción de saliva<sup>6</sup> para disminuir el riesgo de contaminación e infestación de patógenos en el jardín (Banderas-Gavilánez, 2004; Mangone y Currie, 2007), cuyas actividades higiénicas han demostrado ser eficientes para inhibir y eliminar la presencia del antagonista *Trichoderma* (Caldera *et al.*, 2009).

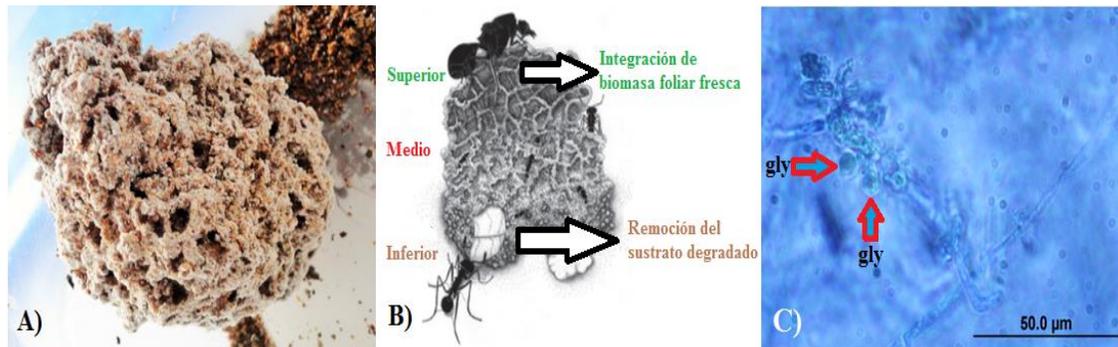
### **1.2.1 Relación mutualista de las zompopas con el hongo *Leucoagaricus gongylophorus***

El “jardín fúngico” de las zompopas no es más que un cultivar del hongo *Leucoagaricus gongylophorus* Hoyt (orden *Agaricales*: familia *Basidiomycota*: tribu *Lepiotaceae*) con el que adquirieron una simbiosis obligada de tipo mutualista hace 50 millones de años atrás y cuya relación evolutiva dejó huella en el genoma de estos insectos porque ocasionó cambios en la dieta de *Atta* y *Acromyrmex*, de acuerdo con los estudios filogenéticos desarrollados por Gadau *et al.* (2012). *L. gongylophorus* se transmite verticalmente, no forma basidiocarpo porque las zompopas le han impedido que éste se desarrolle, presenta esporas blancas-verdosas (Vellinga, 2004) y se caracteriza por producir hifas semejantes a unas protuberancias esferoides (del inglés *hyphal-tip swellings*), que son paquetes vacuolizados ricos en nutrientes (glucosa, manitol, trehalosa, glicano, arabitol y glucógeno, y en menor número lípidos, ergosterol y aminoácidos) llamados *gongylidia*, cuyo conjunto de estas estructuras globosas integran los estáfilos (del inglés *staphylae*) (Figura 3C) de los que se alimentan la reina, huevos y larvas inmaduras (Freitas, 2010; Mueller, 2002) y proporciona enzimas auxiliares que actúan en el proceso digestivo de las hormigas (Dos Santos, 2013). El resto

---

<sup>6</sup> La saliva secretada por las hormigas cortadoras de hojas contiene enzimas hidrolíticas y antibióticos.

de obreras cuenta con un sistema mixto de alimentación que comprende savia de plantas, hifas y consumen un 5-9% de estáfidos (Giraldo *et al.*, 2011; Masiulionis, 2013).



**Figura 3.** Estructura y proceso de degradación del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*: A) estructura del jardín fúngico de *Atta cephalotes*; B) representación gráfica de los estratos con el gradiente vertical de degradación de la biomasa del hongo, mostrando los estratos superior (verde), intermedio (rojo) y basal (marrón) **Fuente:** Suen (2010), adaptado por Aylward *et al.* (2013); C) vista microscópica de la estáfida con las estructuras externas de las *gongylidias*, estructuras utilizadas como fuente de alimento de las zompopas, flechas rojas con el código *gly*: *gongylidia* (magnificación: 100X).

Por lo tanto, la dinámica poblacional de las hormigas podadoras gira en torno a un mutualismo bipartita, en la que los himenópteros propician condiciones favorables para un crecimiento saludable y libre de competidores o patógenos para el hongo que es incapaz de prevalecer en vida libre (Auson, 2011; Schultz *et al.*, 2005; Van Bael *et al.*, 2011), a cambio de que *L. gongylophorus* provea de albergue y suministre la nutrición necesaria a todos los individuos dentro de la colonia (Nobua-Behrmann, 2014; Poulsen y Currie, 2009; Rabeling *et al.*, 2007).

Se han propuesto dos teorías en torno a la evolución del mutualismo bipartita: (1) el modelo tradicional propone que las hormigas incorporaron el hongo en su dieta, lo cultivaron y finalmente lo transmitieron a sus colonias (Weber, 1973); y (2) el modelo alternativo sugiere que las esporas del hongo fueron inicialmente propagadas en las colonias y lo terminaron cultivando porque se volvió parte de la dieta de las hormigas cortadoras (Mueller *et al.*, 2001). Sin embargo, la hipótesis tradicional es aceptada según la fuente original del sustrato del hongo; las semillas almacenadas, las paredes del nido, madera en descomposición, micorrizas, cadáveres y heces de hormigas; mientras que la presencia de *pellets* infrabucales apoya la hipótesis alternativa (Poutasse, 2010).

Empero, aunque las zompopas tratan de mantener la asepsia para el monocultivo de su hongo simbiote; se ha documentado que el jardín fúngico no es un cultivo axénico de *L. gongylophorus*, sino que en el mismo habita una serie de microhongos que forman micelio ó aparecen como conidias en estado latente. Dicha evidencia fue confirmada por Rodrigues *et al.* (2011), quienes

demonstraron que el jardín de tres especies de hormigas *Attini* (*Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* y *Atta texana*) era un ecosistema miniatura con un consorcio de comunidades microbianas, donde de 1435 aislamientos de hongos, *C. wheeleri* obtuvo la mayor diversidad de hongos (57%), seguido de *T. septentrionalis* (46%) y *A. texana* (34%); aunque los porcentajes no exhibieron diferencias estadísticas significativas (Kruskal-Wallis,  $H = 0,00$ ;  $p = 1,00$ ).

De la misma forma, a través de un análisis de lípidos microbianos, Scott *et al.* (2010) estimaron la estructura de la comunidad microbiana en las colonias de los géneros *Atta* (*A. cephalotes*, *A. colombica* y *A. sexdens*) y *Acromyrmex* (*A. laticeps*, *A. octospinosus*, *A. hispidus fallax* y *A. niger*) y demostraron que existe una diversidad de bacterias tanto en los jardines que tuvieron abundancia en bacterias Gram-negativas de los órdenes *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*; como en las cámaras de basura que presentan gran diversidad de bacterias Gram-positivas y anaerobias.

### **1.2.2 El patógeno especializado *Escovopsis* spp.**

Aunque históricamente se asumía que las zompopas mantenían su jardín fúngico en monocultivos libres de parásitos, existen patógenos que pueden repercutir negativamente sobre la supervivencia del hongo simbionte (Caldera *et al.*, 2009). Tal es el caso del microhongo parasítico especializado del género *Escovopsis* (orden *Ascomycota*: familia *Hypocreales*), un micotrófico oportunista que deteriora y puede ocasionar el colapso total del cultivar del hongo cosechado por las hormigas en poco tiempo (Salmerón-Cordero, 2009). *Escovopsis* actúa degradando las células de *L. gongylophorus* y absorbiendo sus nutrientes liberados, por lo que una vez que este parásito devasta la única fuente de alimento de las zompopas, las obreras eventualmente mueren por inanición al no ser capaces de reemplazar el hongo que las mantiene vivas (Currie *et al.*, 1999).

Actualmente sólo se han descrito dos especies de *Escovopsis* con potencial virulento (*E. weberi* y *E. aspergilloides*), aunque la viabilidad de sus esporas no supera el 3% (Currie *et al.*, 1999). Este hongo antagonista genera una infección persistente de hasta 10 meses sobre el jardín; y una vez que el parásito sobrecrece el área total del jardín y produce masas de esporas; se genera su acción necrotrofica alrededor de las cámaras subterráneas, y la colonia se compromete y se ve obligada a abandonar su nido (Price *et al.*, 2003). Con excepción de *Cyphomyrmex rimosus*, este hongo anamórfico tiene una incidencia variable en los jardines de zompopas de 11 – 75%, por lo que es el causante de la reducción significativa de acumulación de material vegetal fresco, así como del índice

de producción de las hormigas forrajeras y jardineras; que son parte de los motivos por los que se suprime el desarrollo del nido y ocurre el posterior colapso (Pagnocca *et al.*, 2012).

Considerando el potencial atagonista de este ascomicete anamórfico para ser utilizado como bio-controlador, y debido a que experimentalmente se ha probado que prolifera fácilmente y genera un importante foco de infección en el jardín fúngico de *L. gongylophorus* de *A. colombica* (Herz *et al.*, 2010), Elizondo-Wallace *et al.* (2014) evaluaron el parasitismo de *Escovopsis* sobre *L. gongylophorus* mediante bioensayos en los que se enfrentó el ascomicete con un fragmento de jardín fúngico, y determinaron que el 53% de aislamientos del parásito crecieron de manera prominente sobre *L. gongylophorus*, redujeron el crecimiento radial del micelio del hongo, consumieron la biomasa del jardín fúngico y éste se tornó de coloración marrón. Adicionalmente, encontraron que el 16,6% de las cepas degradaron los cultivos del hongo cosechado por las zompopas y redujeron el tamaño de la colonia; y al enfrentar una subcolonia conteniendo hormigas mínimas e intermedias, huevos y larvas dentro del jardín fúngico con 10 de las cepas más virulentas de *Escovopsis*, el 70% sobrecreció y colapsó toda la estructura de la colonia<sup>7</sup> ( $p < 0,05$ ).

### **1.2.3 Simbiosis con la actinobacteria *Pseudonocardia* (género *Acromyrmex*)**

Paralelo al descubrimiento de *Escovopsis*, se documentó que las hormigas *Acromyrmex* (y las *Attini* intermedia *Trachymyrmex* y basales *Apterostigma* y *Cyphomyrmex*) establecieron otra simbiosis mutualista en la que promueven el desarrollo cuticular de *Pseudonocardia* (*Phylum Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*) (Caldera *et al.*, 2009), la cual actúa bajo un mecanismo de defensa que sinergiza las secreciones antibióticas producidas en las glándulas metapleurales para combatir en diferente grado de inhibición patógenos recurrentes del jardín, aquellos que entran en contacto con el tórax del insecto (Benckiser, 2010) y algunos patógenos de plantas como *Aspergillus flavus*, *Sclerotium* spp., *Alternaria solani* y *Colletotrichum lindemuthianum* ( $p < 0,05$ ) (Sánchez-Peña *et al.*, 2008), ya que el actinomicete secreta metabolitos que cuentan con propiedades antifúngicas y que han demostrado inhibir el crecimiento de *Escovopsis* y *M. anisopliae* (Schoenian *et al.*, 2011).

Para que la actinobacteria pueda alojarse en la cutícula del insecto, *Acromyrmex* libera secreciones de glándulas bicelulares ubicadas en los poros del tegumento, con las cuales se nutre *Pseudonocardia* y luego de 13 – 18 días, la superficie corporal de la hormiga es recubierta por el crecimiento abundante de este microorganismo (Salmerón-Cordero, 2009). La actinobacteria se

---

<sup>7</sup> El resultado final reportado en los bioensayos se evaluó hasta el día 7 luego del montaje de los tratamientos.

transmite verticalmente y fácilmente prospera en la superficie de los insectos jóvenes porque éstos poseen una cutícula más flexible y se considera una región más favorable para el desarrollo y nutrición de esta bacteria productora de antifúngicos (Bolougne, 2011).

La inhibición de *Escovopsis* spp. por parte de la actinobacteria *Pseudonocardia* spp. ha sido evaluada experimentalmente por Meirelles *et al.* (2014), quienes determinaron diferencias significativas mediante una prueba (ANOVA de dos vías,  $p < 0,0001$ ) entre diversas cepas de *Escovopsis* tratadas con *Pseudonocardia* aislada de colonias de *Acromyrmex heyeri* y *Trachymyrmex* spp., por lo que se sugirió que las cepas evaluadas de *Escovopsis* son más sensibles a los antibióticos producidos por *Pseudonocardia*. Adicionalmente, al comparar el perfil de inhibición de las diferentes cepas de *Pseudonocardia*, también se encontraron diferencias significativas en los mismos ( $p = 0,0019$ ), aunque 11 de las 12 cepas tratadas no difirieron estadísticamente entre sí (TukeyHSD,  $p > 0,05$ ).

Mattoso, *et al.* (2011) evaluaron que el tegumento de obreras de *Acromyrmex subterraneus* fue recubierto por una capa del *Pseudonocardia* durante los primeros 12 – 15 días de nacidas, y la remoción de esta cobertura resultó en la incidencia de colonias infestadas por *Escovopsis* sobre el jardín fúngico. Este reporte comprobó que los compuestos antifúngicos secretados por la actinobacteria inhibieron el crecimiento de *M. anisopliae*, aunque se consideró que las obreras recién emergidas siguen siendo vulnerables a infecciones siempre que (1) el tegumento no tenga capas protectoras de biofilmes microbianos bien desarrollados, (2) el sistema inmune de hormigas jóvenes sea poco activo y (3) las glándulas metapleurales no secreten antibióticos de inmediato.

El artículo de Little *et al.* (2006) también demostró que los *pellets* en el compartamiento infrabucal de colonias de *Trachymyrmex* cf. *zeteki* en Gamboa, Panamá, actuaron como un aparato de desinfección que confina las esporas en cuarentena para que actúe *Pseudonocardia*; ya que luego de infectar el jardín fúngico con esporas de *Escovopsis* por 48 h, el 80% de las colonias había producido *pellets* infrabucales que contenían baja densidad de esporas viables de *Escovopsis* (6,25%) y un porcentaje elevado de *Pseudonocardia* (88,9%) ( $G = 8,71$ ,  $p < 0,005$ );

No obstante, hay reportes como el de Zucchi *et al.* (2011), quienes señalan que *Pseudonocardia* spp. fue ineficiente para inhibir la crecimiento del microhongo *Escovopsis weberii* sobre jardines fúngicos de varias especies de *Acromyrmex* spp.; a pesar de que el actinomicete sí fue efectivo para reducir el desarrollo normal de este parásito. Los resultados se relacionaron con la presencia de compuestos

como candidicina y dentigerumicina que son activos contra *Escovopsis* spp., pero inefectivos para prevenir los efectos de este antagonista dentro del jardín fúngico.

### **1.3 Daños agroecológicos ocasionados por *Atta* y *Acromyrmex* y su estatus como plaga**

La zompopa, al defoliar hojas frescas como materia prima para su jardín, es considerada como una de las cinco plagas más perjudiciales a nivel agroeconómico en Sudamérica y Centroamérica debido su compleja condición social, su comportamiento de forrajeo diurno y nocturno (Mehdiabadi y Schultz, 2010), su adaptación a diversos ecosistemas y la dificultad de controlarlas con agroquímicos altamente contaminantes que tienen baja eficiencia y especificidad (Lemus *et al.*, 2008). La defoliación parcial o total sobre cultivos de importancia agronómica (café, plátano, eucalipto, cítricos, frijol, maíz, hortalizas, pastos, yuca, caña de azúcar y especies forestales) – producida particularmente por las obreras del género *Atta* que suelen ser más agresivas – es uno de los factores primordiales que han repercutido en el crecimiento y reproducción normal de estos cultivos (Escobar-Durán *et al.*, 2002; Klingenberg, 2006) y han desencadenado tanto problemas fitosanitarios que ponen en peligro la seguridad alimentaria de algunos cultivos (Uribe-Celis, 2013), como pérdidas millonarias en el sector agrícola y maderero por los efectos directos e indirectos de esta plaga (Suárez-Gómez y Tofiño-Rivera, 2012; Zanetti *et al.*, 2014).

Los daños directos e indirectos ocasionados por las hormigas *Atta* y *Acromyrmex* varían dependiendo de la cantidad de hormigueros circundantes en el agroecosistema, así como del aprovechamiento que se destine al terreno. En cuanto a los daños directos, las hormigas del género *Atta* talan la vegetación herbácea de árboles circundantes al nido, lo que afecta su crecimiento y disminuyen la receptibilidad de los campos para la cría de ganado; mientras que los daños indirectos se relacionan con la erosión y el lavado de los suelos ocasionado por los hormigueros ubicados en sistemas de producción agrícola, así como el secado de las plantas y su alta susceptibilidad al ataque de otros insectos y patógenos, ya que las zompopas prefieren forrajear continuamente los tejidos de meristemas en crecimiento que tardan un tiempo considerable en regenerarse (Vacarro y Mousques, 1997). Asimismo, Della-Lucia en el 2003 menciona que otro daño indirecto ocasionado por las hormigas mineras es la contaminación ambiental derivada del transporte de agrotóxicos usados en su control, cuyo valor ha sido incalculable por el momento.

Dados estos argumentos y el impacto negativo ocasionado en la economía de diversos países, ha sido necesaria la creación de regulaciones internacionales en el momento de importar productos

hacia regiones no infestadas por estos insectos para evitar su propagación (Williams y deShazo, 2004). Cabe resaltar que se han hecho investigaciones para determinar los daños derivados de esta plaga; como el trabajo de Herz *et al.* (2007), quienes estimaron que una colonia de *Atta colombica* podía llegar a cortar 13,2 toneladas de biomasa (equivalente a 132 kg/ha) por año dentro de bosques secundarios; aunque el índice de consumo de hojas de dicha investigación fue irregular porque en el área de estudio las hormigas consumieron el 1,7% del total de área vegetal producida. Asimismo, Isenring y Neumeister (2010) mencionan que un sólo nido de hormigas cortadoras de hojas podría defoliar una tonelada de hojas frescas por año en Brasil, cuya situación ha llegado a afectar el 14,5% de árboles de pino y eucalipto en esta nación, llegando a contabilizar pérdidas de hasta seis hectáreas en especies madereras que superan los US\$ 6 billones.

A pesar de dichos planteamientos, las zompopas pueden ser vistas como una plaga severa o moderada según cada situación, ya que aunque son responsables de una herbivoría anual correspondiente al 12–17% de la vegetación de bosques tropicales y algunas especies leñosas de la sabana (Poutasse, 2010); las hormigas cultivadoras de hongos son las ingenieras del ecosistema porque se encargan de controlar ciertas poblaciones de plantas, regeneran algunas áreas degradadas del bosque, enriquecen los suelos y favorecen que éstos se mantengan fértiles, promueven el crecimiento y la penetración de raíces, mejoran el drenaje y la aireación de los terrenos, y optimizan el intercambio iónico de terrenos porque se regula la acidez del suelo por la materia orgánica introducida por las zompopas (Branstetter y Sáenz, 2012; Della-Lucia, 2003; Van Bael *et al.*, 2011). Por ende, las estrategias de un programa de manejo integrado de plagas deben enfocarse en controlar las hormigas parasol, en vez de promover su extinción del ecosistema.

#### **1.4 Mecanismos de manejo integrado para combatir las zompopas**

Dado que el inicio de la estación lluviosa marca la etapa de proliferación de microorganismos patógenos que pueden atacar los nidos de *Atta* y *Acromyrmex*, esta plaga se debe concentrar en tareas de vigilancia, limpieza y desinfección del jardín fúngico en vez de ejecutar actividades de forrajeo externo del nido para evitar contaminaciones; por lo que en dicho periodo se deben aplicar metodologías de control físico (destrucción de nidos), químico (con la aplicación de productos como Aldrín, Benomyl o MIREX), biológico (con ayuda de la aplicación de formulados que incorporen *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* o *Heterhabditis bacteriophora*) ó una combinación de estas estrategias (Herrera y Valenciaga, 2011). Otro método para el control de plagas es la utilización controlada de enemigos naturales, aunque el mismo

presenta diversos inconvenientes que incluyen la búsqueda apropiada del insecto enemigo; el desarrollo de un sistema para la cría en masa del mismo; el desarrollo de métodos para el almacenamiento, envío y comercialización de los enemigos naturales; y la preparación de instrucciones claras para la liberación exitosa del enemigo natural (Hoddle, 2009).

#### **1.4.1 Método de control físico o mecánico**

El manejo mecánico es la estrategia tradicional más económica para controlar zompopas que hayan establecido montículos pequeños a nivel superficial del suelo y cuyos nidos incipientes o recién formados cuenten con pocas cámaras subterráneas, como en el caso del género *Acromyrmex* (Giraldo *et al.*, 2011). La excavación de los montículos donde se ubican las colonias consiste en desenterrar y capturar la hormiga reina para erradicar el hormiguero y regular el número de colonias circundantes (Vergara-Castrillón, 2005).

Además, este mecanismo sólo se recomienda aplicarlo en el mes 3 ó 4 después del vuelo nupcial, lapso en el que las reinas se encuentran a 20 m de profundidad del suelo y sería más fácil extraerlas (Della-Lucia y Vilela, 1993). Aunado a este método, existen opciones complementarias en las que se atan las bases de los cultivos que se desean proteger con cinta plástica recubierta con grasa, cilindros plásticos y tiras de aluminio, plástico o metal, o se utilizan recipientes de barro, plástico o goma conteniendo aceite mineral; con el fin de construir barreras que impidan que las zompopas alcancen los cultivos. Los perjuicios de este método es que requeriría hacer inspecciones frecuentes y sustituciones del material para que los métodos sean efectivos (Zanetti *et al.*, 2014).

Otra práctica de control mecánico realizada por los agricultores es la aplicación de gasolina dentro del hormiguero y su posterior detonación, aunque éste no es un método que permita obtener un adecuado nivel de control debido a que no se logra afectar todas las cámaras y es poco probable que se logre destruir toda la colonia (Escobar-Durán *et al.*, 2002). Este método fue estudiado por Ravnborg *et al.* (2002), quien evaluó la efectividad de estrategias de control físico-químico para combatir *A. cephalotes* en una comunidad ubicada al sureste de Colombia con los siguientes métodos: 1) bombear cal dentro de la entrada/salida del hormiguero para incrementar el pH dentro del nido, crear condiciones para inhibir el crecimiento del hongo cultivado y causar gradualmente la muerte de los individuos por inanición, 2) utilizar cal + el órgano-fosforado clorpirifos más utilizado en la región en el hormiguero (proporción 3:1), 3) verter gasolina en la boca de entrada del nido y provocar una explosión mediante fuego para erradicar el hormiguero físicamente y 4) usar polvo

mojable + calcio puro que se vertería dentro y alrededor de los hormigueros, y que serviría como un método alternativo al uso directo de cal bombeada en el nido. Este estudio comprobó que a pesar de que los tres métodos alcanzaron más de un 84% en la reducción de número de nidos, sólo la mezcla de cal + clorpirifos (96 – 100%, inversión: US\$5,60) y la gasolina (100%, inversión: US\$10,1) lograron exterminar el 100% de nidos, por lo que seleccionaron el primer método por ser menos costoso.

#### 1.4.2 Estrategia de control químico

La aplicación de insecticidas químicos implica el uso de formicidas para eliminar las colonias de hormigas, y a pesar de ser los productos ambientalmente más dañinos del mercado, son contraproducentes para el ser humano, y se ha estudiado que las hormigas cortadoras de hojas logran detectar elevadas concentraciones de agroquímicos y se encargan de proteger su nido para evitar entrar en contacto con la dosis tóxica (Akino, 2008). Los plaguicidas mantienen su vigencia en función del costo-efectividad y continúan dominando el mercado internacional de plaguicidas (Pérez, 2009). Akino (2008), Escobar-Durán *et al.* (2002), Isenring y Neumeister (2010), Link (1997), Nickele *et al.* (2013), Vergara-Castrillón (2005), Pérez (2009) y Zanetti *et al.* (2014) citan que los tipos de productos químicos más utilizados en el mercado de agroquímicos incluyen:

- 1) *Polvos*: son insecticidas de contacto creados a base de un material inerte como el talco que actúa como acarreador y el ingrediente tóxico activo. Los polvos deben ser insuflados con bomba directamente en el hormiguero en nidos pequeños de 5 m<sup>2</sup> porque estos productos alcanzan poca profundidad. Tiene las desventajas de generar un alto nivel de contaminación en el agroecosistema y es preferible aplicarlos en la estación seca porque se dificulta su penetración cuando suelo se encuentra húmedo (ej: deltametrina).
- 2) *Líquidos y gases (termonebulizante)*: son formicidas de contacto desarrollados con un disolvente (aceite mineral o queroseno), el ingrediente químico activo y algunas veces se añaden extractos vegetales (ej *d*-limoneno). Tienen limitaciones como requerimientos de mano de obra especializada, deben ser atomizados directamente en la boca del nido para alcanzar profundidades intermedias, pueden contaminar la capa freática del suelo y las personas corren riesgo de intoxicación por inhalación. No obstante, el producto persiste por 6 – 12 meses, es efectivo porque el humo penetra rápidamente, y se puede aplicar bajo precipitaciones ligeras y moderadas (ej: fipronil, cypermetrina clorpirifos).
- 3) *Cebos granulados (pellets)*: representan la opción más práctica de control porque el producto se formula con un disolvente, una sustancia atrayente como la pulpa de cítrico deshidratada y el ingrediente activo, y éstos actúan bajo “mimetismo químico” para atraer

el insecto blanco; ya que se colocan en las proximidades de los túneles de entrada y en los trillos con mayor tránsito para ser acarreado con gran facilidad por las obreras, y una vez incorporado en el hongo, se paralice la actividad forrajera y las obreras mueran de forma gradual en pocos días. Los beneficios de utilizar cebos es que requieren equipo mínimo, así como sencillas medidas de seguridad, se pueden colocar a granel en los costados de las bocas de entrada a un hormiguero y son más rentables respecto de otros tipos de formulados; pero tiene como limitantes que el hecho de que deben aplicados en condiciones de baja humedad para prevenir que el producto gasifique y se anule su actividad insecticida, es susceptible a descomposición por las precipitaciones, y el cebo peletizado puede ser repelido por las hormigas si se contamina con aroma de insecticidas, derivados de petróleo y sudor humano (ej: fipronil, deltametrina y sulfuramida).

En *Atta sexdens rubropilosa* y algunas especies de *Acromyrmex* spp. se evaluó la aplicación de 10 g/m<sup>2</sup> de cebo granular con dosis tan bajas de 0,003% de fipronil, y Coll (2003) encontró un 100% de inactividad en los nidos en *Atta sexdens* y más del 80% en *Acromyrmex* spp. Por su parte, Isenring y Neumeister (2010) mencionan que el piretroide delametrina sólo requiere de 0,2% del ingrediente activo cuando se formula como polvo técnico; mientras que el fenitrotion se formula con un 7% del químico activo si se disuelve con aceite mineral y aplica con termonebulizador; y en ambos casos se alcanzan toxicidades superiores al 90% sobre estas hormigas *Attini*.

Dada la rentabilidad y fácil aplicación de los cebos, la mayoría de agroquímicos se ha enfocado en la formulación de perdigones que contengan órgano-fosforados como diazinon, clorpirifos B, clorpirifos C, fenitrotion; organoclorados como mirex y lindano; piretroides como cipermetrina; fosfuros como el fosfuro de aluminio; y alquilos hidrogenados como el bromuro de metilo (Vaccaro y Mousques, 1997). Sin embargo, tomando en cuenta restricciones legales y que muchos de estos pesticidas se han clasificado como “productos altamente peligrosos”, algunos ya han salido del mercado por sus efectos nocivos y persistencia en el ambiente, así como el sobre-uso y su bioacumulación en tejidos humanos y de mamíferos benéficos del agroecosistema (Anglada *et al.*, 2013). A pesar de esto, plaguicidas como Blitz® (Fipronil), Thunder® OD145, Mirex-S® (Sulfuramida), Pyrinex® (Clorpirifós) y Omitox® (Octoborato de sodio) se siguen formulando con dosis elevadas (Vieira, 2010) porque siguen siendo bastante eficientes a nivel del sistema GABA, ruta de biosíntesis de quitina, transmisión sináptica, y fosforilación oxidativa; a pesar de que no produzcan el efecto esperado y requieran de aplicaciones regulares para controlar zompopas (Boaretto, 1997).

### 1.4.3 Microorganismos entomopatógenos como agentes de biocontrol

El rápido agotamiento de recursos naturales y la demanda de una productividad agrícola sostenible han hecho necesaria la búsqueda de opciones biológicas inocuas, eco-amigables y que propicien la seguridad de los alimentos (Donoso *et al.*, 2011). Por ello, se ha propuesto el control biológico para controlar una plaga o crear una enfermedad epidémica que se propague sobre poblaciones con altas densidades de insectos-blanco (Roberts y St. Leger, 2004). En ese sentido; animales, hongos, bacterias y virus cumplen un papel vital en el control de insectos, por lo que el ser humano se ha ideado para manipular microorganismos como hongos y bacterias, y aplicarlos en formulados como agentes potenciales de biocontrol (Santi, 2009).

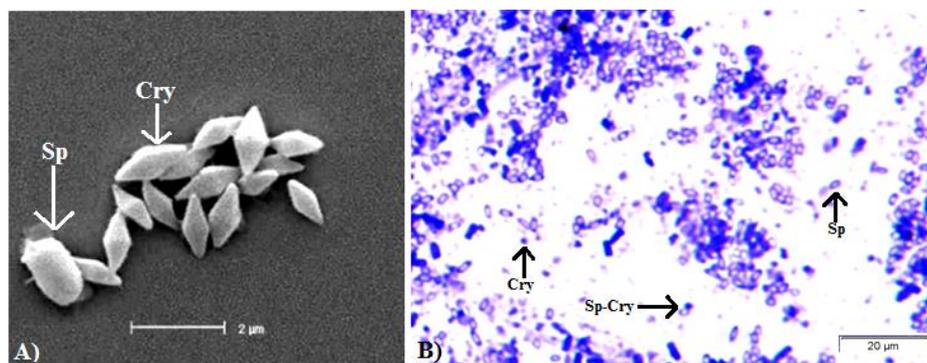
El término “entomopatógeno” ó “agente bioinfeccioso” se ha definido por Kaya y Vega (2012) como “todo microorganismo capaz de producir una enfermedad sobre un insecto después de invadir, reproducir y propagarse sobre su cuerpo”. Este método se ha convertido en una pieza muy importante dentro de programas de manejo integrado de plagas, donde se pretende incorporar inóculos del microorganismo para reducir la población de una plaga específica (Hoeschle-Zeledon *et al.*, 2013), que en este caso serían las zompopas. Con estas explicaciones, las siguientes secciones harán énfasis en la aplicación de *B. thuringiensis* y hongos como biocontroladores.

#### 1.4.3.1 Aplicación de las $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas

Aunque se reconoce la existencia de bacterias asociadas a insectos, son pocas las que tienen comportamiento entomopatógeno; y las especies más estudiadas corresponden a los órdenes *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* y algunos géneros del orden *Pseudomonales* (Suárez-Gómez, 2012). Una de las principales alternativas para proteger cultivos agronómicos es la bioformulación de productos que contengan el patógeno *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), productor de  $\delta$ -endotoxinas específicas para atacar el intestino a uno o dos órdenes de insectos (Vázquez-Pineda *et al.*, 2012). *Bacillus thuringiensis* (orden *Bacillales*: familia *Bacillaceae*) es una bacteria entomopatógena, aerobia facultativa, Gram-positiva, quimioorganótrofa con actividad catalasa; capaz de fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa; de flagelación perítica; y con un tamaño de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho (Bravo *et al.*, 2008; Gillis *et al.*, 2012)). *B. thuringiensis* es una especie cosmopolita que se ha encontrado en ambientes variables como el suelo, excrementos, cadáveres de insectos, hojas de plantas, y ambientes marinos (Levin, 2009; Vázquez-Pineda *et al.*, 2012).

Esta bacteria ambiental fue descubierta en 1901 en Japón por el bacteriólogo Shigetane Ishiwata mientras estudiaba la epidemia que causaba la enfermedad del colapso repentino (del inglés *sotto disease*) en larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*, Lepidoptera) (Mandal *et al.*, 2014); y luego fue reaislada por el biólogo alemán Ernst Berliner (1916) de larvas de la polilla de la harina del Mediterráneo (*Ephestia kuehniella*, Lepidoptera), quien bautizó la bacteria con el nombre de *Bacillus* (por su forma cilíndrica) *thuringiensis* (en honor a la región alemana de Turingea) (Sanchis y Bourguet, 2008). Para 1938, la compañía francesa Laboratoire Libec empezó a comercializar los primeros bioproductos a base de las proteínas tóxicas que produce *B. thuringiensis* que fueron acuñados con la marca de Sporeine®; y en 1954 se describió el mecanismo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas, que se mantiene vigente hasta la actualidad (Piccinin *et al.*, 2013). Cabe señalar que en más de 50 años se han producido cerca de 200 bioproductos con *B. thuringiensis* (Davidson, 2012) y el genoma completo de este bacilo se publicó por Challacombe *et al.* (2007).

El ciclo de vida de *B. thuringiensis* posee dos fases distintivas que comprenden la fase de crecimiento *vegetativo*, donde las células se duplican por bipartición a temperaturas de 28-30 °C (Rojas-Ruíz *et al.*, 2010); y la fase de *esporulación* que se basa en la producción de estructuras de resistencia llamadas *endósporas*, que se originan bajo condiciones de estrés ambiental como la desecación o un desbalance de carbono y nitrógeno (Carrera-Cabezas, 2009; Sauka y Benintende, 2008). Una vez esporulada, *B. thuringiensis* expresa inclusiones proteicas paraesporales denominadas  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry (Figura 4B) que presentan diferentes formas geométricas (del Rincón-Castro *et al.*, 2006), aunque la más común es la bipiramidal (Figura 4A). Las toxinas de *Bt* distinguen a este bacilo no sólo de *Bacillus cereus*, con quien comparte una estrecha relación genética-ecológica porque ambas especies residen en el suelo y cadáveres (Nester *et al.*, 2002); sino también del resto de *Bacillus* esporulados (Hussien-Ibrahim, 2012; Levin, 2009).



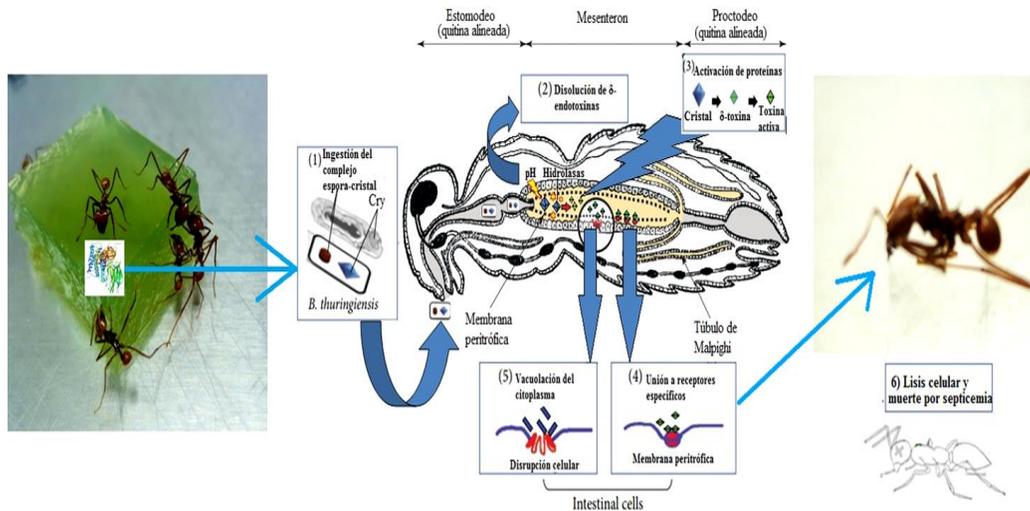
**Figura 4.** Estructuras morfológicas de *B. thuringiensis*: A) micrografía observada en microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) con la estructura bipiramidal de cepas nativas de *B.*

*thuringiensis* aisladas de suelo del Estado de Guanajuato, México - **Fuente:** del Rincón-Castro *et al.* (2006); B) frotis la cepa *Bt19* a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , teñida con solución de Coomassie R-250 al 0,25% (m/v). Sp: espora, Cry:  $\delta$ -endotoxina, Sp-Cry: inclusión proteica paraesporal asociada a una espora.

Brar *et al.* (2007), Bravo *et al.* (2012), Jurat-Fuentes y Jackson (2012), Piccinin *et al.* (2013), Sanahuja *et al.* (2011), Schünemann *et al.* (2014) y Talukdar (2013) describen el *Modelo de Unión Secuencial* de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* postulado y aceptado por la evidencia científica demostrada, para explicar el modo de acción de las toxinas sobre plagas en seis etapas (Figura 5):

- 1) *Ingestión y solubilización*: los cristales son ingeridos por el insecto y su estructura monomérica es solubilizada en el tubo digestivo del insecto, debido al microambiente del intestino que posee condiciones reductoras (pH 9.0 a 12.0), aunque algunas toxinas se solubilizan en condiciones de pH ácidas ó neutras, que libera protoxinas de 130-140 kDa (Fiúza, 2009).
- 2) *Procesamiento proteolítico y activación*: la protoxina Cry es procesada en los extremos N- y C-terminal por hidrolasas ubicadas en el intestino para generar los pequeños péptidos de  $\delta$ -endotoxinas (60-70 kDa) resistentes a la acción de las proteasas.
- 3) *Unión al receptor*: una vez activadas, las  $\delta$ -endotoxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen a receptores específicos, ubicados en las microvellosidades apicales presentes en las vesículas de membrana de borde en cepillo de las células epiteliales. Una vez unidas a los receptores (glicoproteínas, glicoproteínas, glicosilfosfatidil (GPI)-inositol-aminopeptidasa-N y GPI-fosfatasa alcalina) se procesa una de las  $\alpha$ -hélices y se produce un cambio conformacional que inicia la formación de oligómeros.
- 4) *Inserción en la membrana y formación del poro lítico*: una vez que los oligómeros se insertan en el receptor, se forma un pre-poro iónico permeable y el receptor desplaza selectivamente las balsas lipídicas (del inglés *lipid rafts*) que conducen la señal de transducción, la protoxina se inserta y se forma el poro que es similar a un *paraguas*; y ocurre la disrupción de cilios.
- 5) *Lisis celular*: el poro aumenta la afinidad por un receptor secundario (aminopeptidasa-N o fosfatasa alcalina) y facilita el aumento de la permeabilidad en la membrana, donde ocurre un diferencial de potencial dependiente del ión  $\text{Mg}^+$  que estimula la exocitosis del receptor desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula. Tanto el poro como la exocitosis conducen a la hipertrofia de células epiteliales y la vacuolización del citoplasma; ocasionada por la disrupción del flujo osmótico de agua, iones y algunas moléculas de mayor tamaño entre el lumen y el citoplasma; que permiten incrementar el número de receptores y amplificar la señal inicial con la incorporación de un mayor número de toxinas.

6) *Septicemia*: se desequilibra el sistema que mantiene el gradiente de pH, lo cual impide la asimilación y retención de componentes vitales del insecto. Este proceso produce la destrucción de las microvellosidades, una afección generalizada del epitelio e induce la muerte de las células epiteliales por liberación del contenido celular en la cavidad del poro, fenómeno denominado *citólisis osmótica coloidal*. El insecto eventualmente sufre una inanición fisiológica por parálisis del intestino y las partes bucales, que le ocasiona septicemia por la proliferación bacteriana.



**Figura 5.** Mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* cuando son ingeridas por las zompopas: 1) ingestión del complejo espóra-cristal por parte del himenóptero, 2) solubilización de los cristales, 2) procesamiento y activación de la protoxina, 3) unión de las toxinas a los receptores, 4) formación de poros en la membrana epitelial y 6) lisis celular y muerte por septicemia. **Fuente:** Adaptado de Brar *et al.* (2007); Pardo-López *et al.* (2012); Price & Gatehouse (2008); Schünemann (2012) y Wu *et al.* (2011).

Para que el modo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas de *Bt* ocurra, las proteínas Cry cuentan con tres dominios: 1) el Dominio I (N-terminal) comprende un conjunto de 7  $\alpha$ -hélices responsables de la inserción de la toxinas en la membrana del intestino medio del insecto hospedero, la formación del poro lítico y el mantenimiento de la integridad estructural de la proteínas Cry a enlazarse al receptor de las BBMV; 2) el Dominio II comprende 3 hojas- $\beta$  antiparalelas que forman un prisma, es el menos conservado de los 3 dominios proteicos y se encarga de la unión de la toxina a receptores específicos de membrana, por lo que se cree que juega un papel esencial en la selectividad de la toxina y las interacciones proteína-receptor; y 3) el Dominio III (C-terminal) o estructura de “ $\beta$ -sándwich” está constituido por 2 láminas- $\beta$  antiparalelas enrolladas y tiene las funciones de preservar la integridad estructural de la toxina y de asistir en la unión, penetración, y formación de los poros en las células del epitelio intestinal (Argôlo-Filho y Loguercio, 2014; Krishnan, 2013; Palma *et al.*, 2014).

El efecto insecticida producido por *B. thuringiensis* deriva de estas proteínas tóxicas, pero para actúen es necesario que el canal alimentario del insecto tenga condiciones alcalinas (pH 8.0 – 10.0), que aunadas a la actividad enzimática de las proteasas digestivas van a promover la digestión y posterior activación en pro-toxinas para atacar el epitelio (Piccinin *et al.*, 2013; Suárez-Gómez, 2012). La condiciones de pH del canal alimentario de las hormigas forrajeras se deben conocer, de ahí que Erthal Jr. *et al.* (2004) evaluaran la actividad enzimática del aparato digestivo de insectos disectados de *Acromyrmex subterraneus* mediante ensayos con sustratos cromogénicos. En dicha investigación encontraron que el buche tenía un pH alcalino (8.2 – 6.0) y el intestino medio exhibió condiciones de neutralidad (7.6 – 6.4); y se reconoció la actividad de serín-proteasas, amino-peptidasas,  $\alpha$ -amilasas,  $\alpha$ -glicosidasas y  $\alpha$ -manosidasas, por lo que se confirmó que las zompopas tienen un pH apropiado para que las  $\delta$ -endotoxinas sean procesadas y activadas eficientemente.

Parte de las particularidades que caracterizan las  $\delta$ -endotoxinas *Bt* es por el hecho de no ser nocivas para el ser humano, como destacan Mandal *et al.* (2015); quienes mencionan que en un estudio en el que 18 personas ingirieron 1 g o inhalaron 100 mg de una preparación comercial de *Bt* var. *kurstaki* en su dieta diariamente por 5 días no fueron infectados ni envenenados por este bacilo. Asimismo, en el trabajo de Hayes (1986), 8 personas fueron expuestas al consumo de caldo fermentativo de *Bt*, queques conteniendo *Bt* y polvo fino creados durante la producción comercial de *Bt*. De manera preliminar, Pinto *et al.* (2003) aislaron 35 cepas de *Bacillus* spp. de obreras de *Acromyrmex crassipinus* y *A. lundii* y mediante el desarrollo de bioensayos en placa *Petri*; estimaron mortalidades de 50 a 100% al probar los aislamientos contra obreras de *A. lundii*, y en la cepa que causó el 100% de mortalidad se identificaron los genes *cry1* (22%) y *cry9* (67%).

#### **1.4.3.2 Utilización de hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol**

Se estima que el reino *Fungi* comprende 1,5 millones de hongos, de las cuales 700 especies que pertenecen a 90 géneros han sido descritos como agentes etiológicos del 80% de infecciones en insectos agrícolas y forestales (Sinia, 2013). Los micoparásitos fueron los primeros organismos en ser usados como biocontroladores (Roberts y St. Leger, 2004); y se ha hecho la tentativa de generalización por linajes que incluya el *Phylum Ascomycota* (orden *Hypocreales*: familia *Clavicipitaceae*; orden *Onygenales*: familia *Ascosphaeraceae*) y el *Phylum Entomophthoromycota* (orden *Entomophthorales*: familia *Entomophthoraceae*; orden *Neozygiales*: familia *Neozygiteaceae*) (Boomsma *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2012; Vega, 2012).

La historia del descubrimiento de hongos entomopatógenos como posibles agentes de biocontrol deriva de la observación de las infecciones por *Cordyceps* spp. sobre gusanos de seda en China, publicada por el científico francés René-Antoine (1683-1757) (Réamur, 1734-1742). Años más tarde, Hagen (1879) reportó la observación de un epizootico de hongo en la mosca amarilla del estiércol (*Scathophaga stercoraria* L., Diptera) en 1867, y Cohn (1855) describió un hongo llamado *Empusa* en la mosca doméstica (*Musca domestica* L., Diptera). Seguidamente, el físico alemán J.B. George W. Fresenius (1808-1866) propuso el nombre *Entomophthora* a este género de hongo, porque *Empusa* ya correspondía al nombre de la orquídea (Keller *et al.*, 1999). Años más tarde, para inicios de 1878, el ruso Elie Metchnikoff aisló un hongo en el suelo contaminado de larvas del abejorro del trigo (*Anisolia austriaca*, Coleoptera) y lo denominó como la muscardina verde (*Entomophthora anisopliae*); luego su colega Isaak Krassilstchik produciría esta cepa de hongo y la distribuiría en campos experimentales de Kiev en en 1888 para combatir el abejorro (*Melonotha melonotha*, Coleoptera) (Davidson, 2012). El nombre científico de este hongo sería acuñado por Sorokin (1883) como *Metarhizium anisopliae*, que se convirtió en el primer biopesticida en recibir acreditación de ensayos de campo para su comercialización (De Melo *et al.*, 2006).

Los micoparásitos están dispersos en la mayor parte de ecosistemas terrestres; particularmente en la rizosfera, filosfera y la hojarasca de bosques tropicales donde habitan insectos plaga y en menor medida en bosques templados porque hay menor diversidad de estos insectos (Augustyniuk-Kram y Kram, 2012). Dichos micoparásitos se originaron de un ancestro saprófito común que habitó el suelo y la hojarasca (Shahid *et al.*, 2012), y luego divergieron evolutivamente en el modo de nutrirse y su agresividad sobre un hospedero determinado (Roy *et al.*, 2006).

Aunque estos tres linajes fueron propuestos como hongos entomopatógenos, el mecanismo de acción de los órdenes *Hypocreales* y *Entomophthorales* ha sido más estudiado porque éstos actúan vía exocutícula, mientras que el orden *Onygenales* se reproduce cuando el hospedero ingiere un inóculo de esporas (Boomsma *et al.*, 2014). No obstante, los *Hypocreales* difieren de los *Entomophthorales* en que los primeros producen únicamente esporas asexuales que se descargan pasivamente en el insecto por efecto del viento o agua; mientras que los *Entomophthorales* generan tanto *conidias primarias* (asexuales) y esporas latentes llamadas *zigósporas* (sexuales), que se propagan activamente por presión mecánica (Augustyniuk-Kram y Kram, 2012).

El proceso genérico de micosis de los HEP – excepto los hongos del orden *Onygenales* que colonizan el epitelio intestinal del insecto cuando son ingeridos – es descrito por Shahid *et al.* (2012) Augustyniuk-Kram y Kram (2012), Boomsma *et al.* (2014), Cañedo y Ames (2004), Khan *et al.* (2012), Mouatcho (2010), Ortiz-Urquiza y Keyhani (2013), Singh-Sandhu *et al.* (2012), Sinia (2013), Sookar (2013) y Vega (2012); y éste se gesta en la cutícula, ya que por ingestión las esporas no germinan en el intestino y son anulados en las heces. Las etapas de infección son (Figura 6):

1. *Germinación de la espora*: el tubo germinativo se alarga para originar hifas; donde asisten proteasas, quitinasas y lipasas. Los componentes de la cutícula, agresividad del HEP y el microclima condicionan la evolución de la espora germinal; en especial la presencia de agua libre, que mantiene la turgencia de la espora, brinda un medio nutritivo y favorece la posterior ruptura de la estructura cuticular.
2. *Adhesión al tegumento*: esta etapa marca el inicio de la fase *parasítica* sobre un hospedero susceptible e incluye dos procesos: 1) la adsorción directa de conidias pegajosas aéreas o bastósporas (*B. bassiana*) por liberación pasiva sobre la superficie exocuticular (Roberts y Humber, 1981); y 2) la unión específica donde ocurren interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas (bastósporas) de bajo alcance, en las que participan sustancias mucoides<sup>8</sup>. Además, se genera la estructura de infección *apresorio*; responsable del acoplamiento del tubo germinal en la capa epicuticular, y la formación del *apresorio* está limitada por la topografía superficial lisa del hospedero, la presencia de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) y AMP cíclico (cAMP), la producción de mucílago y la capacidad del hongo para superar la epicutícula.
3. *Detoxificación y penetración de la procutícula*: ocurre como resultado de la presión mecánica y la actividad enzimática del tubo germinativo; que está mediada por la secreción de una batería de hidrolasas que incluye lipasas, proteasas, aminopeptidasas, esterases, quitinasas y toxinas<sup>9</sup>, las cuales participan en la degradación de la procutícula. La velocidad de penetración es fundamental en el proceso de virulencia y se ve afectada por el grosor y esclerotización del tegumento cuticular, el pH, la presencia de oxígeno y otros compuestos nutricionales, la disponibilidad de agua, la actividad proteasas digestivas del insecto, las sustancias antifúngicas y el estadio fisiológico y de desarrollo del insecto.

---

<sup>8</sup> La capa de moco que recubre las esporas tiene como componentes principales proteínas y glucanos. Estas sustancias mucoides presuntamente potencian la unión a la cutícula en la etapa de germinación para emitir el tubo germinativo.

<sup>9</sup> De acuerdo con Boomsma *et al.* (2014), para las especies de *Entomophthorales* se requiere un número más bajo de enzimas respecto de un número mayor de enzimas que asisten en la penetración de la cutícula de hongos *Hypocreales*.

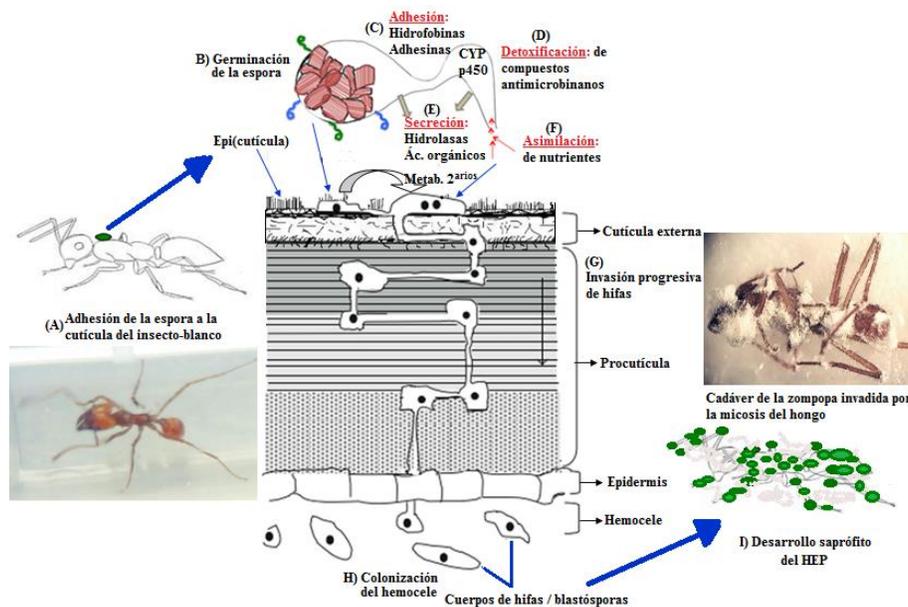
4. *Invasión de las hifas*: los HEP crecen de manera progresiva en la procutícula como protoplastos sin pared celular (algunos *Hypocreales* y *Onygenales*) en el espacio intersticial de las fibras musculares, como propágulos de *blastósporas* que originan ramificaciones laterales en todas las direcciones (*Hypocreales*), ó como cuerpos de hifa que asemejan levaduras (*Entomophthorales*), que tienen la ventaja de adquirir nutrientes y multiplicarse rápidamente en el hemocele para colapsar el sistema inmune. Una vez dentro de la cavidad corporal del insecto, los cuerpos de hifa se propagan y circulan dentro de la *hemolinfa* – sistema circulatorio –, donde se producen respuestas autoinmunes como la melanización cuticular, encapsulación celular, fagocitosis y secreción de antimicrobianos<sup>10</sup>.
5. *Colonización del hemocele y muerte*: la patogénesis por invasión de los tejidos internos ocasiona deficiencias nutricionales y problemas fisiológicos; que incluyen comportamiento errático de alimentación, pérdida de coordinación y convulsiones. Eventualmente, el individuo entra en estado de letargo y muere, concluyendo así la fase parasítica. La patogénesis se propicia por secreción de toxinas *destruxina*, *beauvericina* y *efrapeptinas*<sup>11</sup>.
6. *Desarrollo saprófito*: la fase *saprófita* se lleva a cabo cuando las hifas emergen del cadáver y las conidias diseminan pasivamente por acción del viento o condiciones de alta humedad relativa. Posteriormente, masas de micelio se extienden en las aberturas externas (partes bucales, ojos, ano), regiones intersegmentales y superficie ventral del hospedero. En el caso de los hongos *Entomophthorales* también se forman hifas aéreas; y todos los tipos de esporas llegan a generar la *momificación* del insecto. Finalmente, cuando las esporas se dispersan en otro hospedero, el ciclo de infección del hongo se reinicia.

Se debe señalar que la duración de infección puede tardar de 3 a 20 días, dependiendo de factores físico-químicos como la masa corporal del insecto-blanco, la especie de hongo, la dinámica de producción de esporas y las condiciones ambientales (Boomsma *et al.*, 2014). (Shahid *et al.* (2012) reportan que este proceso está en sincronía con el ciclo de vida del insecto hospedero y las condiciones ambientales prevaecientes, aunque el grado de infección que ejerce cada linaje de HEP es variable de acuerdo con el orden de insecto a atacar, el índice de germinación de conidias, la temperatura óptima requerida para su dispersión y el tipo de aislamiento de hongo.

---

<sup>10</sup> Las lisozimas y aglutininas son parte de las enzimas que actúan como antimicrobianos.

<sup>11</sup> Tales toxinas son secretadas por *Beauveria*, *Entomophthora*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Tolyposcladium*.



**Figura 6.** Representación del modelo de patogénesis general que ocurre sobre la cutícula del insecto-blanco (zompopa). Una vez que el insecto muere, las hifas colonizan las membranas intersegmentales y aberturas externas del himenóptero (círculos verdes Fig. A. e I.) y posteriormente sobrecrecen desde el interior del cadáver (manchas grises en la figura del insecto I.) para reactivar el ciclo del entomopatógeno. **Fuente:** Adaptado de Mouatcho (2010), Ortiz-Urquiza y Keyhani (2013), Singh-Sandhu *et al.* (2012), Sinia (2013).

Dentro del ciclo de infección, uno de los factores críticos que incide en la especificidad de un HEP sobre un insecto-blanco son las propiedades y esclerotización de la cutícula; la cual es una interfase insecto-ambiente externo y actúa como barrera física contra factores ambientales como el estrés mecánico, sequía, humedad, entre otros; permite el almacenamiento de compuestos químicos, y forma parte de la estructura de los quimio- y mecano-receptores (De Crecy, 2012). El 70% de esta red de polímeros comprende proteínas y las áreas que poseen quitina están dispuestas de manera helicoidal en una estructura laminar (Singh-Sandhu *et al.*, 2012). La cutícula está segmentada en dos capas que son: (1) *envoltura o capa cuticulona*: capa más externa, que posee un grosor de 10-30 nm; (2) *epicutícula externa*: una barrera hidrofóbica delgada carente de quitina, pero cubierta con proteínas estabilizadas por fenol y una capa cerosa de lípidos, esteroides y ácidos grasos (0,5-2 µm grosor); y (3) *procutícula*: es la segunda barrera física que forma la mayor parte de la estructura cuticular y comprende fibrillas de quitina (Kaltenpoth y Engl, 2014; (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013) embebidas en la matriz que contiene proteínas, lípidos y quinonas (100-200 µm grosor), la cual tiene células epidérmicas en la base de la procutícula y el hemocele está bajo estas células (Vega, 2012).

La efectividad de las esporas producidas por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* fue evaluada en el insecto social *Macrotermes* spp. (Isoptera: Termitidae), evaluando dosis de  $1 \times 10^5$

hasta  $1 \times 10^9$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ; y se logró determinar que ambos hongos exhibieron un alto grado de virulencia y secretaron la toxina *destruxina* que asistió la patogenicidad, aunque una de las cepas de *M. anisopliae* causó el 100% de mortalidad sobre toda la colonia en un periodo de exposición de 5 días al aplicar  $1 \times 10^9$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  (Sileshi *et al.*, 2013). Además, estimaron dosis letales medias y tiempos de muerte media de 3.31 a 5.09 esporas  $\text{mL}^{-1}$  con 7,74 – 8,19 días de muerte para *B. bassiana* y 2.35 a 3.82 esporas  $\text{mL}^{-1}$  con 8,11 – 8,59 días de muerte para *M. anisopliae*.

Por otra parte, Ribeiro *et al.* (2012) evaluaron la supervivencia de tres colonias de *Atta bisphaerica* al inocular dosis de  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^9$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  de *Aspergillus ochraceus* ó *Beauveria bassiana* disueltas en Tween al 0,05% (v/v)<sup>12</sup>, y averiguaron que el tiempo de supervivencia fue de 25 días en las colonias analizadas, e identificaron 10 especies de HEP<sup>13</sup> que causaron efectos deletéreos sobre las obreras, de los cuales *Aspergillus ochraceus* fue el más frecuente y quien causó el mayor índice de infección (44 aislamientos, 15,33%), seguido de *A. ochraceus* (14,67%), *A. niger* (0,33%) y *B. bassiana* (0,33); aunque sólo *A. ochraceus* ( $\chi^2 = 42,27$ ,  $p < 0,001$ ) y *B. bassiana* ( $\chi^2 = 94,03$ ,  $p < 0,001$ ) mostraron diferencias significativas y tiempos de muerte media de 4 días. Este valor (4 días) para infectar zompopas es igual al obtenido por Lemus *et al.* (2008) al enfrentar una solución de un inóculo de *M. anisopliae* disuelto en Tween® 80 al 10% con obreras de *A. cephalotes* y utilizando una dosis mínima de  $1.03 \times 10^9$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ .

A la fecha, algunos bioformulados cuyo ingrediente activo incluye HEP se han liberado en los mercados de Estados Unidos y el Reino Unido con productos como Vertalec® (a base de *Lecanicillium longisporum*), BotaniGard® (*Beauveria bassiana*) y Meta-Sin® (*Metarhizium anisopliae*), y en menor medida se han desarrollado algunos bioproductos que incluyen *Hirsutella*, *Isaria* y *Nomuraera*; aunque por el momento mantienen un mercado limitado debido especialmente al tiempo que tardan los insectos en morir (Jacob *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2012).

#### **1.4.3.3 Consideraciones económicas y logísticas para desarrollar preparados microbianos**

Las ventajas de utilizar cualquier tipo de agente entomopatógeno para controlar una plaga en particular son citadas por Donoso *et al.* (2011), Jacob *et al.* (2014), Santi (2009), Singh-Sandhu *et al.* (2012) y Vieira (2010); y son las siguientes: (1) muchos de estos entomopatógenos han sido aislados

---

<sup>12</sup> Las muestras fueron analizadas a nivel estadístico bajo el método de Kaplan-Meier.

<sup>13</sup> Los hongos entomopatógenos identificados fueron *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *Beauveria bassiana*, *Cladosporium* spp., *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium* spp. 1 y spp. 2, y *Mycelia sterilia*.

del mismo hábitat donde se encuentra el insecto a controlar, por lo que su persistencia sobre el insecto es elevada; (2) su efecto virulento hacia la plaga-blanco es específico; (3) son inocuos para los seres humanos y otros organismos benéficos; (4) dejan pocos residuos en los alimentos y no impactan significativamente el entorno; (5) el modo de invasión de los microorganismos patógenos a través del epitelio intestinal y cutícula evoluciona junto con el insecto y 6) el tiempo que demora un bioproducto en entrar a un mercado tan competitivo como el de Estados Unidos (2-3 años) es dos o tres veces mayor que el de un plaguicida sintético (5-7 años). Haciendo énfasis en estos puntos, las preparaciones biológicas pretenden ser una solución permanente que no requiera aplicaciones regulares como los agroquímicos, porque éstas se pueden adaptar a cambios evolutivos de una plaga en particular; y parte de estos aspectos han influenciado para aseverar que dentro de 2-3 años se estimaría un incremento de 150-300% del mercado global de biopesticidas (Donoso *et al.*, 2011). Empero, se debe tomar en cuenta que el desarrollo de estos bioproductos presenta una serie de limitaciones: (1) los efectos de su aplicación no son inmediatos ni tan dramáticos como los de los plaguicidas; (2) la plaga se reduce pero no se elimina por completo; (3) el comportamiento de la plaga ante biocontrol es difícil de determinar aunque se cuenten con modelos de simulación; (4) el control biológico es al principio más costoso con respecto del control químico; (5) las condiciones de luz y humedad relativa repercuten sobre la efectividad del producto; y (6) al principio se requieren aplicaciones permanentes de inóculos del microparásito, mientras que las aspersiones químicas sólo se realizan hasta alcanzar el umbral de infestación (Nicholls-Estrada, 2008).

Otras situaciones que se han generado en torno al desarrollo de bioplaguicidas es que se deben cumplir una serie de medidas fitosanitarias pre- y post-liberación en el mercado las cuales comprenden el monitoreo de los microorganismos para corroborar su persistencia en campo, estimar los impactos reales sobre la plaga y los organismos no-blanco, establecer planes de acción para prevenir los posibles riesgos del bioformulado en el ecosistema, realizar protocolos de seguridad para verificar que el producto no presenta contaminantes, mantener suficiente documentación sobre el formulado y regular las dosis del biocontrolador *in vivo* (Hoeschle-Zeledon *et al.*, 2013).

Además, el desarrollo de un bioinsecticida efectivo depende de la selección de un aislamiento altamente virulento para el hospedero-blanco con el que se pueda formular una dosis apropiada de esporas que sea potencialmente efectiva *in vivo*, el cual debería ser genética y biológicamente estable (Babu, 2013). De ahí que se ha estudiado la posibilidad de sinergizar pesticidas químicos selectivos como spinosad y bórax en asociación con agentes etiológicos como los hongos *B.*

*bassiana*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces* spp., y hongos antagonista como *Trichoderma harzianum*, *T. viride* ó *Escovopsis weberii* junto con una dosis específica de las  $\delta$ -endotoxinas *B. thuringiensis* y/o extractos vegetales tóxicos (Isenring y Neumeister, 2010).

El desarrollo de bioproductos que contengan una mezcla de agentes etiológicos también han sido sugeridos por Escobar-Durán *et al.* (2002), quienes mencionan que el efecto combinatorio de los micoparásitos *M. anisopliae* y *B. bassiana* junto con el hongo antagonista *Trichoderma Ignorum* como ingredientes activos dentro de cebos con un atrayente (p.e. extracto de naranja) y un estabilizador (p.e. avena) podría ser útil para reducir la actividad forrajera a niveles mínimos de *Atta* y *Acromyrmex* y el tamaño de la colonia, así como potenciar y diversificar el ataque tanto hacia las obreras forrajeras como hacia el hongo *L. gongylophorus* (Escobar-Durán *et al.*, 2002).

Las zompopas han sido utilizadas como sujetos apropiados con biocontroladores debido a la longevidad de la colonia y por los impactos ecológicos sobre el área circundante (Poutasse, 2010). Por ello y tomando en cuenta un primer acercamiento con los resultados positivos al evaluar un hongo antagonista como es *Escovopsis* para inhibir el jardín fúngico y colapsar la colonia (Elizondo-Wallace, 2012); el presente trabajo pretende determinar el potencial de diferentes aislamientos de hongos y cepas de *B. thuringiensis* aislados de jardines, insectos vivos, cadáveres, cámaras de basura y suelo circundante de la colonia; que puedan actuar como patógenos contra zompopas de la subcasta cortadora de *Atta cephalotes* para posteriormente formular con dosis estandarizadas un cebo con microorganismos entomopatógenos del himenóptero y antagonistas del jardín fúngico.

Consecuentemente, para esta investigación se planteó la siguiente hipótesis: existen cepas de microorganismos entomopatógenos autóctonos de Costa Rica que concurren obreras, cadáveres de insectos, suelo asociado a la colonia, jardín fúngico y/o cámaras de desecho en nidos de *Atta colombica*; los cuales exhiben un alto potencial de patogenicidad y se podrían aplicar como agentes de control biológico para combatir las zompopas obreras de la especie *Atta cephalotes*.

## OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad entomopatógena de una colección de hongos y cepas de *B. thuringiensis* aislados de individuos vivos, cadáveres, suelo, jardín fúngico y cámaras de desecho asociados a colonias de zompopas para combatir hormigas obreras de la especie *Atta cephalotes*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad infectiva de las esporas de una colección de hongos potencialmente entomopatógenos obtenidos a partir de materiales asociados de colonias de zompopas sobre hormigas forrajeras de la especie *Atta cephalotes*.
2. Establecer la dosis/concentración letal media (LC<sub>50</sub>/ DL<sub>50</sub>) de los hongos más virulentos y las cepas de *B. thuringiensis* más agresivas para combatir obreras de *A. cephalotes*.
3. Estimar el tiempo de muerte media (TL<sub>50</sub>) de las cepas de *B. thuringiensis* y los hongos más promisorios contra zompopas de la subcasta cortadora de *A. cephalotes*.

## MÉTODOS

### 3.1 Muestreo, recolección y establecimiento de colonias de *Atta cephalotes* en laboratorio

La recolecta de las colonias de zompopas se realizó con base en protocolos internos y otras recomendaciones sugeridas por los miembros que conforman el Grupo Integrado Simbiosis-Hospedero-Microorganismo. Se efectuaron giras de campo en tres localidades de Costa Rica:

- 1) Estación Biológica La Selva – Sarapiquí, Heredia (10°25'51.75"N, 84°0'14.08"O).
- 2) Ciudad de la Investigación – San Pedro de Montes de Oca, San José (9°57'0"N, 84°2'0"O).
- 3) Parcelas de investigación de la finca comercial "La Montaña" del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) – Turrialba, Cartago (9°52'0"N y 83°38'0"O).

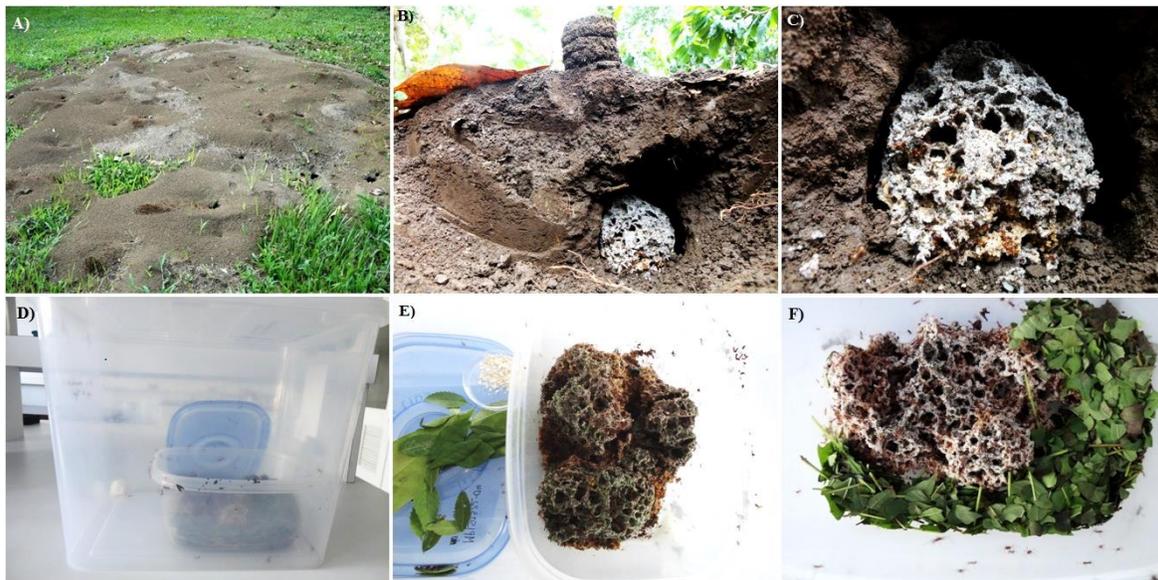
En las diferentes giras de campo se llevaron a cabo excavaciones de montículos (Fig. 7A) y recolectas del hongo *L. gongylophorus* de la especie *Atta cephalotes* que se utilizaron en los ensayos posteriores, manteniendo la técnica aséptica durante la recolección de cada pieza de jardín fúngico. Una vez que se alcanzó una cámara subterránea (Fig. 7B), el jardín fúngico cosechado y con la mayor parte de la población de obreras y la reina (Fig. 7C)<sup>14</sup> (para cámaras incipientes) se extrajo con ayuda de una cuchara flameada con alcohol de 95°, y se colocó en recipientes plásticos con capacidad de

---

<sup>14</sup> Las hormigas de la casta soldados fueron removidas del jardín fúngico porque no aportan mucho en el mantenimiento y el desarrollo de *L. gongylophorus*.

40 ó 72 onzas<sup>15</sup> previamente desinfectados con etanol de 70°. Seguidamente, cada recipiente con el jardín se dispuso en una caja plástica contenedora (Fig. 7D), cuyo borde superior se limpió con una capa de aceite mineral para que las hormigas resbalaran cuando intentaran escalar el contenedor. De inmediato, se procedió a remover la tapa que contenía el jardín fúngico para que las hormigas salieran y se adaptaran a su nuevo ambiente.

Adicionalmente, en el fondo del contenedor y afuera del recipiente que contenía el jardín se colocó media caja de *Petri* plástica, a la cual se le añadieron hojuelas de avena para promover la rápida adaptación de las hormigas y la estabilización de la colonia en condiciones de laboratorio durante las primeras 24 h – 48 h (Fig. 7E). Asimismo, se dispuso una mota de algodón estéril humedecida con agua destilada estéril (ADE) para mantener la humedad en el medio, y luego de 24 h, la avena se substituyó con hojas frescas de vainillo (*Tecoma stans*, Bignoniaceae) para que las obreras forrajeras proporcionaran un sustrato apropiado para el crecimiento del hongo (Fig. 7F) y removieran el sustrato desgastado afuera del jardín para crear una cámara de desecho. El alimento de las zompopas se renovó cada 2 días para la manutención de los jardines recolectados.



**Figura 7.** Etapas de colecta y establecimiento *in vitro* de jardines fúngicos de zompopas de *A. cephalotes*. (A) Estructura externa de un montículo maduro con diferentes bocas de entrada, San Pedro de Montes de Oca, San José; (B) estructura externa de un montículo, donde se ubica una cámara subterránea con un jardín fúngico incipiente después de ser excavado, Turrialba, CATIE; (C) estructura amolar externa del cultivar incipiente de *L. gongylophorus* rodeado por individuos de diferentes castas; (D) cajas contenedoras usadas para colocar los recipientes con el jardín fúngico; (E) sistema desarrollado para mantener las hormigas *in vitro*, añadiendo hojas frescas para que las obreras incorporen material vegetal fresco, junto con hojuelas avena

<sup>15</sup> En el caso de aquellos jardines que tuvieran jardines fúngicos incipientes de 2 a 4 años de edad.

para que los individuos se establezcan en un periodo de 24 h y algodón humedecido con agua destilada estéril para promover condiciones de humedad en el contenedor, (F) jardín fúngico con hojas frescas incorporadas por las obreras en el día 2 después de colectar la colonia.

Scott *et al.* (2010) mencionan que los jardines fúngicos cultivados en campo y aquellos que se mantienen *in vitro* son espacio-temporalmente estables porque las comunidades microbianas identificadas y grupos de microorganismos detectados en ambos tipos de jardines fúngicos fueron las mismas, a pesar de que en los basureros se encontró mayor diversidad de microorganismos en jardines fúngicos de campo que *in vitro*. Por ello, al transferir el hongo cosechado junto con una parte de la población de zompopas, se esperaba que al realizar las pruebas posteriores no se generaran modificaciones significativas en la colonia mientras éstas se mantuvieran *in vitro*.

Las colonias de *A. cephalotes* mantenidas en condiciones de laboratorio en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM, UCR) fueron utilizadas para llevar a cabo bioensayos de ingestión, patogenicidad y virulencia con los posibles entomopatógenos aislados y derivados de las colecciones de *B. thuringiensis* y hongos pertenecientes al Grupo Integrado Simbiosis – Hospedero – Microorganismo (GISHM).

### **3.2 Aislamiento y obtención de un cultivo puro del complejo espora-cristal**

#### **3.2.1 Establecimiento de la colección de cepas de *B. thuringiensis* y detección de aislamientos promisorios (protocolo desarrollado por el colega José Fabián Cerdas-Araya)**

Se llevaron a cabo giras de campo en los Parques Nacionales Carara y Corcovado, Refugio Nacional de Fauna Silvestre Golfito y Reserva Biológica La Selva; para obtener muestras de diversas partes de jardín fúngico, hormigas vivas asociadas al jardín, obreras muertas en las cámaras de desecho y suelo de las cámaras de basura de las zompopas del género *Atta colombica*. De las cámaras de desecho se extrajo la mayoría de aislamientos porque se supuso que había mayor oportunidad de encontrar cepas virulentas de *B. thuringiensis* contra zompopas de otras especies, ya que éste género de hormigas en particular construye montículos en la intemperie a partir de las unidades de carga que éstas acarrearán para crear montañas de basura hacia afuera del nido. Dicho supuesto deriva de diversos estudios donde se ha planteado que estos grupos de insectos sociales –donde habitan millones de individuos– se ven amenazados eusocialmente por el desarrollo de enfermedades asociadas a los desperdicios que éstas producen y por tanto; requieren de prácticas sanitarias efectivas para disponer de sus productos fecales, miembros muertos de la colonia y el manejo de desperdicios derivados del procesamiento de alimento; con el fin de combatir el riesgo

a posibles enfermedades ocasionadas por entes entomopatógenos que las puedan atacar directamente y enfermedades que puedan colapsar su única fuente de alimento producida por el basidiomicete que éstas cultivan, como el parásito antagonista *Escovopsis* spp. (Hart *et al.*, 2002).

Las posibles cepas de *Bt* se reactivaron a partir de muestras recuperadas de las cámaras de basura de *A. colombica* y se crecieron, primero en 25 mL de medio LB sólido durante 24 h, y luego se tomó un 1 mL de la solución anterior y se cultivó en 25 mL de medio HCT líquido. Una vez inoculado, el medio HCT se incubó por un periodo de 5 días bajo condiciones aerobias y a 200 rpm hasta que se alcanzara la fase de crecimiento estacionaria y se iniciara la esporulación. Posterior a este periodo, el volumen total se transfirió a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 4000 rpm por 30 min. El *pellet* recuperado que contenía el complejo espора- cristal se lavó tres veces con solución de PBS al 9% (m/v), se hizo una cuantificación de esporas viables en la que se obtuvieron  $1 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup> para verificar la pureza y presencia de toxinas en el medio de cultivo, y finalmente los aislamientos se almacenaron en crioviales conteniendo 20% de glicerol bajo congelación a -80 °C para luego ser probados en ensayos burdos (Cerdas-Araya, 2015).

### 3.2.2 Preparación de inóculos para obtener el complejo espора- cristal de las cepas de *Bt*

Cada una de las 15 cepas de *B. thuringiensis* se clasificó de manera descendente de acuerdo con la actividad entomotóxica que éstas exhibieron en estos bioensayos (Cuadro 2), y para dicha selección se tomaron en cuenta los criterios de mortalidad acumulada alcanzados en los días 7 y 9, así como la mortalidad natural de las zompopas que se obtuvo entre los días 7 y 9.

**Cuadro 2.** Cepas de *Bacillus thuringiensis* ensayadas por el colega José Fabián Cerdas en un bioensayo burdo y que alcanzaron mayores porcentajes de mortalidad.

No. cepa	Cepa <i>Bt</i>	Mortalidad, día 7 (%)	Mortalidad C-, día 7 (%)	Mortalidad, día 9 (%)	Mortalidad C-, día 9 (%)	Origen del aislamiento
1	<i>Bt34</i>	80	17	83	17	Obreras vivas
2	<i>Bt40</i>	77	20	83	33	Jardín fúngico
3	<i>Bt33</i>	60	17	80	17	Obreras muertas
4	<b><i>Bt28</i></b>	<b>53</b>	<b>10</b>	<b>77</b>	<b>17</b>	<b>Obreras muertas</b>
5	<i>Bt19</i>	10	10	73	17	Cámaras de desecho
6	<i>Bt21</i>	13	10	73	17	Cámaras de desecho
7	<i>Bt27</i>	40	10	73	17	Obreras muertas
8	<i>Bt45</i>	67	20	70	23	Obreras muertas
9	<i>Bt20</i>	20	10	67	27	Obreras muertas
10	<b><i>Bt29</i></b>	<b>33</b>	<b>10</b>	<b>67</b>	<b>13</b>	<b>Obreras muertas</b>
11	<i>Bt26</i>	43	10	60	13	Obreras muertas
12	<i>Bt42</i>	47	20	60	23	Obreras vivas
13	<b><i>Bt44</i></b>	<b>50</b>	<b>20</b>	<b>53</b>	<b>23</b>	<b>Obreras vivas</b>
14	<i>Bt38</i>	47	20	50	23	Obreras vivas
15	<i>Bt47</i>	10	7	50	7	Obreras muertas

A cada una de estas cepas mantenidas en los crioviales a  $-80^{\circ}\text{C}$  se les extrajo un pre-inóculo con el asa bacteriológica, el cual se dispensó por separado en frascos erlenmeyers de 250 mL con 62,5 mL de medio nutritivo Lauria-Bertani autoclavado previamente para promover el crecimiento de células vegetativas. Cada erlenmeyer se colocó en *shaker* y se mantuvo en condiciones de agitación aerobia a 150 rpm durante 48 h y temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  (Figura 8A).

Durante este periodo, se prepararon 1600 mL de medio de cultivo limitado HCT (modificado de Lecadet, 1980) que induce la producción de esporas de *B. thuringiensis*. Para ello, se incorporaron 80 mL de solución I (fosfato diácido de potasio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0,068%) 1,6 mL de solución II (sulfato de magnesio heptahidratado,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 0,0123%; sulfato de magnesio hidratado,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  al 0,000169%; sulfato de zinc heptahidratado,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 0,0014%), 16 mL de solución III (sulfato de hierro heptahidratado,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 0,002% y ácido sulfúrico 1 N al 0,1%) y 6,4 g de peptona grado bacteriológico en un erlenmeyer con capacidad de 2 L. El medio se ajustó a un  $\text{pH} = 7.25$  y se autoclavó a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Una vez que el medio se encontró a temperatura ambiente, se añadieron 16 mL de solución IV (cloruro de calcio dihidratado  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 0,0147%) y 48 mL de solución de dextrosa al 10% (m/v). El medio se ajustó a un volumen final de 1438,4 mL con agua destilada estéril y se almacenó en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para obtener un crecimiento sincronizado del complejo espора- cristal de cada una de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas, se tomaron 10 mL del pre-inóculo crecido en el medio LB después de 48 h y se dispensaron en 250 mL de medio HCT transferido a erlenmeyers de 1 L, manteniendo la técnica aséptica. Una vez que se obtuvo el cultivo deseado, los erlenmeyers con las diferentes cepas se colocaron en *shaker* y éste se mantuvo a 150 rpm y  $28^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 72 – 96 h (Figura 8B), verificando mediante tinción de Gram que no hubiese contaminación cruzada. Los medios de cultivo con HCT se mantuvieron cubiertos con papel aluminio para prevenir que las proteínas del medio tuvieran contacto con los rayos UV-C ( $\lambda \approx 256 \text{ nm}$ ), ya que tienden a inactivar la actividad de las esporas en formación (Talkhan *et al.*, 2007).



**Figura 8.** Medios de cultivo utilizados para cosechar el complejo de esporas y cristales de *B. thuringiensis*. A) medio nutritivo Lauria-Bertani (LB) utilizado para inducir la producción de células vegetativa. B) medio HCT cubierto con aluminio para prevenir el efecto de los rayos UV sobre los medio, y que se utilizó para alcanzar la fase estacionaria de las células y promover la fase de esporulación y posterior producción de toxinas *Bt*.

### 3.2.3 Determinación de la morfología de la mezcla de $\delta$ -endotoxinas y esporas

Los cultivos crecidos después del periodo de incubación (4-5 días) fueron analizados mediante frotis bajo microscopio de luz con tinción de Gram, utilizando la solución de Coomassie preparada con azul de Coomassie R-250 al 0,25% (m/v), etanol al 60% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v) (Arrieta y Espinoza, 2006). Para ello, se tomaron dos alícuotas de cada cepa con el asa bacteriológica utilizando la técnica aséptica y se distribuyeron en la superficie de un portaobjetos de vidrio, por separado. Seguidamente, cada muestra se fijó a la llama por unos segundos y se tiñó con la solución de Coomassie al 0,25% (m/v). Las muestras permanecieron en contacto con la solución de tinción durante 1 min, y una vez concluido este periodo se procedió a lavar el exceso de colorante sobre la muestra con agua y se secó con un trozo de papel toalla a temperatura ambiente (Carrera-Cabezas, 2009). Finalmente, se dispuso a observar la morfología de las diferentes estructuras de cada cepa bajo el microscopio óptico de luz con un aumento de 100X para corroborar la presencia de esporas e inclusiones proteicas cristalinas, proteínas Cry (Ver Anexo 1).

### 3.2.4 Cuento de esporas viables de cada cepa de *B. thuringiensis*

La concentración de esporas viables en el medio de cultivo HCT fue cuantificada para estimar la proporción del complejo espора- cristal cosechada, cuyo experimento se llevó a cabo según Valicente y Mourão (2008) con algunas modificaciones. Se tomó una alícuota de 2 mL de medio HCT de cada cepa y se dispensaron en un tubo *ependorf* con capacidad para 2 mL. El tubo se calentó a 80 °C durante 15 min. Posteriormente se llevaron a cabo diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución del orden de  $10^{-5}$ , donde previamente se comprobó que a tal dilución se podía hacer una cuantificación de esporas en el ámbito de 30 a 300 unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>).

Las diluciones se realizaron agregando 900  $\mu\text{L}$  de solución salina al 1% (m/v) en los tubos tipo *ependorf* estériles y 100  $\mu\text{L}$  de la dosis madre o la dosis decimal anterior, las cuales se homogenizaron con la micropipeta. De cada suspensión, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra de la cepa de interés y se adicionaron en placas LB gelificadas con agar al 1,5% (m/v), cuyo volumen se extendió homogéneamente con ayuda del asa de Digrafski, esterilizada previamente a la llama. Este proceso se repitió dos veces más para cuantificar las esporas por triplicado ( $n = 3$ ), las placas LB resultantes con la dilución de  $10^{-5}$  se incubaron por 24 h a  $30 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  y se registró el número promedio de unidades formadoras de colonias por mililitro de medio HCT obtenido (Figura 9).



**Figura 9.** Placas Luria-Bertani gelificado con agar al 1,5% (m/v) con las diluciones de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , donde se observa que la proporción de esporas que se ubica entre 30 y 300 UFC/mL fue la dosis de  $10^{-5}$ , la cual se utilizó como base para continuar haciendo la cuantificación de esporas a dicha dilución.

### 3.2.5 Centrifugación y liofilización de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* a evaluar

Una vez que se verificó la pureza del cultivo con el complejo espора- cristal, el pH del medio se redujo a 4.0 para el mantenimiento de las células bacterianas y se dispuso a realizar el protocolo de centrifugación, con base en el experimento propuesto por Bravo y Silva-Filha (2002). El volumen total del medio de cultivo se transfirió a un contenedor de centrifuga con dimensiones apropiadas. Las muestras se colocaron en un rotor *Type 19* y se procedió a centrifugar los medios en la centrifuga *Sorvall WX Ultracentrifuge Series*<sup>®</sup> (Thermo Scientific) bajo condiciones de vacío, a refrigeración (4  $^{\circ}\text{C}$ ) para evitar la desnaturalización de proteínas y una velocidad de  $10000 \times g$  (equivalente a 8200 rpm según el rotor) por 15 min.

Posteriormente, el sobrenadante obtenido con restos celulares y proteínas insolubles en medio acuoso se descartó y se recuperó el botón en el fondo del recipiente, el cual fue lavado con al menos 3 mL de solución salina estéril a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  para la remoción de las proteasas endógenas que pudieran desnaturalizar las proteínas tóxicas de *Bt*. Las muestras se homogenizaron en *vortex* para a realizar un nuevo proceso de centrifugación bajo las condiciones descritas previamente (Fuchs *et al.*, 1993)

Este proceso se repitió dos veces más y una vez que se centrifugaron los contenedores con el medio HCT, se procedió a sonicar cada muestra 1 min en sonicador *ultrasonic cleaner bath sonicator FS6* (Fisher Scientific™) que está ajustado a 40 kHz, a cuya frecuencia se ha demostrado que las ondas ultrasónicas de baja frecuencia generan una microcorriente por efecto de la cavitación estable (proceso de implosión y vibración de burbujas que pasan a través del medio líquido), cuya fuerza mecánica promueve la disrupción y homogenización de las células microbianas (Kang, 2006). Finalmente, el sobrenadante se decantó en su totalidad y el *pellet* restante se transfirió a tubos con capacidad de 5 mL previamente pesados para hacer el cálculo posterior de los pesos fresco y seco, y estimar el grado de recuperación (%).

Las muestras en los tubos se almacenaron toda la noche a -70 °C y después de este periodo, las tapas de cada tubo se removieron y en la boquilla de cada uno se colocó un fragmento de papel *Parafilm*, al cual se le hicieron agujeros con la punta de una asa micrológica previamente esterilizada a la llama con el fin de que ocurriera la sublimación progresiva con mayor facilidad.

Los tubos se colocaron dentro de los frascos para liofilizar y se conectaron en el colector del liofilizador *FreeZone*® (Labconco Corp., Kansas City, MO). De inmediato, se encendió la bomba de vacío (25 Pa) una vez que se alcanzó la temperatura óptima de refrigeración (-41 °C). El proceso de liofilización ó *freeze drying* se estuvo monitoreando por aproximadamente 4 – 5 h, verificando que la bomba de vacío absorbiera el calor y transfiriera el vapor de agua de la superficie de la muestra al colector. Luego de 6 – 7 h, el proceso de detuvo, las muestras se almacenaron en refrigeración a 4 a 8 °C hasta su uso en la preparación de las dosis a incorporar en la dieta semi-sólida. La liofilización es un proceso adecuado para secar materiales termolábiles y que sean compatibles con operaciones estériles como enzimas y microorganismos; ya que las muestras son sometidas al fenómeno de sublimación progresiva, donde el solvente de una muestra en solución pasa directamente de estado sólido (hielo) a vapor sin pasar por el estado líquido y se recupera únicamente el soluto (Nireesha *et al.*, 2013). Para que esto ocurra, la muestra a secar necesariamente se debe congelar junto con el frasco liofilizador antes de conectarse al sistema de bombeo de vacío, que debe estar por encima del punto triple de presión; y una vez congelada, debe pasar por etapas de secado primaria y secundaria con ayuda de la cámara de condensación para finalmente recuperar la muestra liofilizada (Pržić *et al.*, 2004).

### 3.3 Bioensayo de ingestión en dieta sólida con concentraciones de *Bt* sobre obreras forrajeras

La preparación de la suspensión microbiana y el procedimiento para establecer el bioensayo fino se estableció con base en el protocolo propuesto por Navon (2003), con algunas modificaciones y sugerencias del grupo de biocontrol del CIBCM y del Ph.D. Jorge Ibarra Rendón. Para ello, se prepararon diluciones seriadas de *Bt* con las siguientes dosis decimales: 1 mg mL<sup>-1</sup>, 100 µg mL<sup>-1</sup>, 10 µg mL<sup>-1</sup>, 1 µg mL<sup>-1</sup> y 0,1 µg mL<sup>-1</sup>. Cada dilución se preparó en tubos tipo *eppendorf* con capacidad de 2 mL, partiendo de la dosis madre correspondiente a 1 mg de liofilizado de *Bt* por cada mililitro de dieta a incorporar en las placas *Petri*, y haciendo las diluciones posteriores dispensando 200 µL de la solución madre o la dilución anterior sobre tubos conteniendo 1800 µL de solución salina estéril al 10% (v/v). El diluyente de todas las preparaciones fue dieta sólida en su fase líquida, la cual se preparó a partir del protocolo modificado de Silva *et al.* (2002) adicionando dextrosa al 5.0% (m/v), agar al 1.5% (m/v) y citropulpa al 1% (m/v)<sup>16</sup> ajustado a un pH de 5.6 y añadiendo 4 gotas de colorante azul comercial para cocina – que se incorporó para verificar que las zompopas consumieran la dieta, revisar en Sección 3.3.1 – antes de autoclavar por 15 min<sup>17</sup>. La citropulpa fue el ingrediente adicional incorporado en la dieta porque el estudio previo de Herrera *et al.* (2013) demostró que este componente fue un atrayente estadísticamente apropiado (prueba LSD de Fisher,  $\alpha = 0,05$ ) para que las zompopas del género *Atta* spp. acarrearan el perdigón a sus respectivos nidos en tiempos promedio más bajos ( $\bar{x} = 33,53 - 47,46$  min) en comparación con el insecticida químico bioactivo contra hormigas cortadoras de hojas, Mirex-S® ( $\bar{x} = 72,04$  min); y favoreció a la germinación de esporas del hongo antagonista del jardín fúngico, *Trichoderma* spp.

De acuerdo con lo mencionado por O'Callaghan *et al.* (2012), la utilización de una dieta artificial para evaluar insectos en bioensayos suele ser más fácilmente reproducible y eficiente, siempre y cuando los componentes de la dieta alcancen una supervivencia óptima del insecto, la cual no debe exceder el 20% de mortalidad natural. Además, la selección de incorporar el agente biocida en la dieta esterilizada en estado líquido para proporcionarla a las zompopas consideró el comportamiento de alimentación de este himenóptero, ya que con los individuos mastican la dieta semisólida con sus mandíbulas. Luego de preparar todas las diluciones y con la dieta autoclavada, mantenida a temperatura soportable a la mano ( $\approx 40$  °C), se incorporó 1 mL de cada una de las concentraciones

---

<sup>16</sup> La citropulpa fue incorporada posteriormente dentro de la dieta durante el proceso de estandarización de los protocolos, dado que éste componente actúa como atrayente de las hormigas cortadoras de hojas e idealmente se podría adicionar en la etapa de formulación del perdigón para controlar esta plaga.

<sup>17</sup> La dieta no se autoclavó por 20 min, dado que la dextrosa en el medio tiende a caramelizar en ese tiempo.

decimales del liofilizado de las cepas *B. thuringiensis* disueltos en la solución salina al 10% (m/v) sobre placas *Petri* estériles con dimensiones de 94 mm  $\varnothing$   $\times$  15 mm alto y seguidamente se vertieron 14 mL de la dieta semi-sólida en placas separadas de acuerdo con la dosis de *Bt* dispensada. Considerando que se agregó 1 mL del liofilizado disuelto, se hizo una corrección a los 15 mL dieta semi-sólida total por placa, para obtener la concentración final deseada. Finalmente, el medio se dejó secar por un periodo de al menos 7 min bajo el flujo de aire de la cámara de flujo laminar, y se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso en bioensayos.

Paralelamente, se prepararon tres grupos de placas adicionales que se utilizaron como controles, uno de los cuales fue la incorporación de un control positivo químico que correspondió a ácido trioxobórico,  $H_3BO_3$  al 1 mmol mL<sup>-1</sup>; cuyo reactivo químico se probó experimentalmente como un compuesto efectivo para matar más del 90% de las zompopas y se ha utilizado en bioensayos de toxicidad a nivel ultraestructural e histopatológico para conocer las respuestas compensatorias y no-compensatorias que sufren las microvellosidades (acortamiento, irregularidad o lisis), mitocondria (abultamiento, variación en el número de crestas, disrupción de membrana), retículo endoplásmico rugoso (cisternas con dilatación o vesiculadas, degranulación, disrupción de membrana, formación de figuras de milina) o el núcleo (alteraciones morfológicas, compactación de cromatina, cariólisis nuclear, dilatación del espacio perinuclear) del intestino medio, túbulos de Malpighi y glándulas post-faríngeas de las obreras de *Atta sexdens rubropilosa* ( $n = 6$ ,  $r = 3$ ) después de ser expuestas a concentraciones de 0,2-0,5% de este ácido por 7 días (Silva-Zacarin *et al.*, 2011).

Los otros dos grupos seis placas (tres por tratamiento) se emplearon para establecer: 1) un control positivo biológico correspondiente a la adición de la concentración subletal ( $LC_{50}$ ) estimada para una de las cepas comerciales de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* (código *Bti-1A*), que se ensayó de forma experimental y se valoró mediante la prueba Probit como una de las mejores cepa bioactivas contra obreras de tamaño intermedio de *A. cephalotes* en comparación con otras 6 cepas seleccionadas aleatoriamente de la colección de 14 cepas comerciales pertenecientes al grupo de control biológico del CIBCM y que fue parte de la estandarización de protocolos de los bioensayos (Anexo 2); y 2) un control negativo que correspondió únicamente a la adición de dieta artificial en la caja *Petri* sin incorporar concentración alguna de otro componente adicional a la dieta artificial de zompopas.

Para darle la suficiente validez y poder estadístico a la prueba, las 5 concentraciones de cada cepa a evaluar se probaron por triplicado ( $r = 3$ ) y se seleccionó un número total de 10 obreras de la subcasta forrajera ( $n = 10$ ) de tamaño intermedio (0,5 – 0,9 cm) provenientes de una colonia que

contara con un jardín fúngico sano y suficientes individuos para ser utilizados como unidad experimental. Los grupos de 10 hormigas fueron transferidos a una caja *Petri* estéril que contenía 1,5 cm<sup>2</sup> de dieta artificial cortada con instrumentos flameados con anticipación. Una vez que se colocaron aleatoriamente todos los individuos dentro de las placas con sus respectivas réplicas; todas las placas fueron transferidas a un contenedor plástico de color azul oscuro y se incubaron a temperatura ambiente bajo oscuridad total (para evitar el efecto de la luz sobre las toxinas en la dieta) para reportar la mortalidad diaria de cada insecto sometido a una de las dosis de cada cepa.

La mortalidad de los himenópteros fue evaluada diariamente durante 7 días continuos, y en el día 7 se registró el último valor de mortalidad, dado que en algunos de los bioensayos burdos la mortalidad natural de los individuos alcanzó más del 20% y el protocolo se estandarizó para aceptar una mortalidad natural menor o igual a este porcentaje (McGuire *et al.*, 1997). Cuando se obtuvieron todos los resultados, se procedió a analizar los datos con el paquete estadístico Minitab 17®, para estimar las concentraciones y tiempos subletales con pruebas paramétricas (ANOVA de una vía, Probit) y no paramétricas (Kruskal-Wallis, Kaplan-Meier) derivadas de los valores de mortalidad obtenidos con las 5 diferentes concentraciones, con una confianza del 95%.

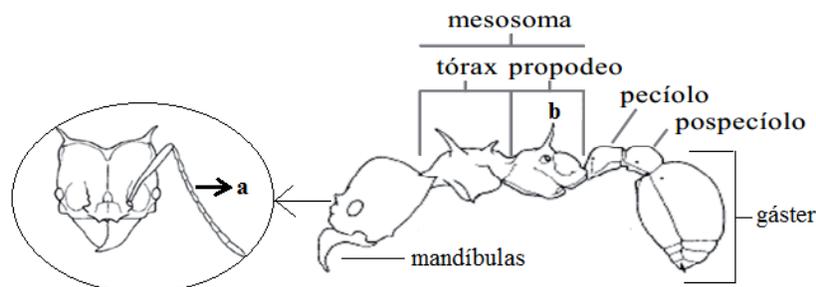
### **3.3.1 Validación de la ingestión de la dieta artificial bajo disección del canal alimentario**

El protocolo de disección del aparato digestivo en obreras se desarrolló según los protocolos propuestos por Dijkstra *et al.* (2005) y Erthal Jr. *et al.* (2004). Una vez que se verificó que las obreras sometidas al bioensayo fino en dieta semi-sólida no presentaron movimientos voluntarios y tenían una coloración más oscura, fueron asignadas como individuos muertos y se procedió a recuperarlos de las placas *Petri*, manteniendo la técnica aséptica dentro de la cámara de flujo laminar. Además, una vez que concluyó el bioensayo, éste se mantuvo por un periodo de siete días más para diseccionar a las hormigas que quedaron vivas y que se continuaron alimentando, con el objetivo de verificar presuntivamente si en los individuos vivos había presencia de colorante en las regiones del íleo o el recto, y corroborar que estuvieran digiriendo completamente las partículas ingeridas de la dieta, incluyendo el *Bt*. La razón por la que el bioensayo concluido se dejó únicamente por 7 días fue porque Erthal Jr. *et al.* (2004) reportan que un colorante como el azul de Evans tiene un tiempo de residencia de 0,5 días en la región del buche, no más de 10 días en el íleo y el recto, y más de 11 días en la región del intestino medio en obreras de *Acromyrmex subterraneus*.

Previamente, se hizo el montaje de una base correspondiente a un trozo de esponja con dimensiones de 12,5 cm de largo × 2,5 cm de alto, sobre la cual se colocó un trozo de papel blanco

para utilizarlo como fondo contrastante y encima de éste se dispuso un trozo de papel *Parafilm* sobre el que se situó el cadáver de la hormiga. Seguidamente, se procedió a ajustar el aumento del estereoscopio para visualizar al individuo a disectar con mayor detalle y se añadieron 4-5 gotas de solución Ringer para insectos, la cual es una solución fisiológica especializada para mantener los tejidos de insectos en solución sin que éstos se distorsionen durante la realización de un protocolo de disección. Dicha solución se preparó según el protocolo descrito por Becnel (1997) y con algunas modificaciones sugeridas por Povey *et al.* (2009), mezclando 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0,25 g de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), 0,25 g de cloruro de potasio (KCl) y 0,25 g de carbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) en balón aforado de 1 L y homogenizando las sales en 1000 mL de agua destilada hasta la marca de aforo (pH = 7.5), para autoclavar la solución seguidamente.

Es relevante considerar como antecedente que el canal alimentario de todo insecto está compartimentalizado en tres regiones distintivas que son el estomodeo (intestino anterior), mesenteron (intestino medio) y proctodeo (intestino posterior); donde la región del intestino medio es el principal sitio de digestión y absorción de carbohidratos y proteínas, y el pH del lumen de esta región intestinal es bioactivamente regulado y diverge de la hemolinfa; mientras que el proctodeo es una región donde se acumulan los desechos y se termina de digerir el resto de alimento que no se logró hidrolizar en el mesenteron (Douglas, 2012). Considerando estos conceptos, inicialmente se separó la cabeza del himenóptero del resto del cuerpo y se inspeccionó el interior del mesosoma (conformado por el tórax y el propodeo) donde se ubica el tejido epitelial y el lumen del mesenteron. Si no había presencia del colorante disuelto o particulado en esta región del canal alimentario, se continuó disectando las secciones del peciolo, postpeciolo y el gáster (Figura 10) para visualizar si en los contenidos del lumen y el tejido epitelial asociado al íleo y el recto había presencia del colorante azul en estas regiones del tracto alimentario.



**Figura 10.** Esquema gráfico de las estructuras anatómicas características de las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta* spp. Fabricius: a) antena, b) espina dorsal. **Fuente:** Adaptado de Herrera y Valenciaga (2011).

### **3.4 Establecimiento de la colección de hongos y selección de posibles entomopatógenos de zompopas (metodología desarrollada por Juan Carlos Cambroner Heinrichs)**

Las recolectas para establecer la colección de hongos se realizaron en el Parque Nacional Carara, ubicado en el distrito de Jacó, provincia de Puntarenas. Se eligieron azarosamente de 3 a 5 colonias de zompopas de la especie *Atta colombica*, y por cada nido se tomaron entre 100 y 300 hormigas de los siguientes 4 tipos de muestras: 1) hormigas forrajeras ubicadas en las cercanías de la colonia, 2) obreras que se alojaban en una cámara de jardín fúngico, 3) hormigas muertas presentes en el montículo del basurero. Adicionalmente, se aisló un cuarto tipo de muestra que correspondió a 4) 1 g de suelo asociado a las cámaras excavadas o asociado con el jardín fúngico. Cada una de estas muestras fue mantenida a 8 °C hasta su uso.

Las muestras que incluyeron hormigas fueron pesadas para determinar un volumen a adicionar y realizar diluciones seriadas, se lavaron con solución de cloro estéril al 0,5% (v/v) durante 1 min y 3 veces con agua destilada estéril. Cada muestra fue macerada en mortero, se diluyó en una proporción 1:10 (m/v) con Triton X-100 al 0,05% (v/v), y con dicha muestra se procedió a hacer diluciones seriadas en proporción 1:10 (v/v) con PBS. Por su parte, la muestra de 1 g de suelo fue diluida en 9 mL de Triton X-100 al 0,05 (v/v) para hacer dos diluciones seriadas 1:10 (v/v) en PBS.

Se tomaron 100 µL de cada una de las muestras diluidas para hacer siembras por triplicado en placas con medio CTAB-Avena (20g Avena + 0,6g CTAB + 15g agar + 0,5g cloranfenicol), CTC (PDAY + 0,5g Cloranfenicol + 0,001g Tiabendazole + 0,25mg Ciclohexamida) y Dodina al 0,03% (m/v) (PDAY + 0,5g de cloranfenicol + 0,83ml de dodina al 36% (m/v)). Las placas con las respectivas muestras fueron incubadas a 30 °C en oscuridad y se dispuso a revisar las placas diariamente. Seguidamente, cada uno de los morfotipos obtenido fue aislado en medio PDA. Finalmente, las muestras fueron conservadas en glicerol al 20% (v/v) a -70 °C para ser reactivadas posteriormente.

#### **3.4.1 Reactivación de hongos seleccionados y preparación de suspensión de esporas**

Juan Carlos Cambroner Heinrichs hizo una selección de 30 posibles cepas de microhongos entomopatógenos, que fueron utilizadas para llevar a cabo la prueba preliminar de patogenicidad. Las mismas se eligieron según las características morfológicas de las esporas y el tubo germinativo que estuviesen relacionadas con géneros de entomopatógenos reconocidos como agentes generalistas de biocontrol. Los hongos seleccionados para las pruebas de patogenicidad, así como la fuente de aislamiento de los mismos se describen con detalle en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Lista de cepas de hongos evaluados *in vitro* sobre obreras de *A. cephalotes*.

Número de cepa	Código de hongo	Origen del aislamiento	Proporción de fuente de aislamientos
1	LD10314 <sup>18</sup>	Cadáveres en el basurero	6/30
2	27A	Cadáveres en el basurero	6/30
3	30U	Suelo asociado a la colonia	3/30
4	29BB	Hormigas de la colonia	6/30
5	29AI	Cadáveres en el basurero	6/30
6	29S	Hormigas de la colonia	6/30
7	28AQ	Hormigas de la colonia	6/30
8	29Z	Hormigas de la colonia	6/30
9	29AC	Cadáveres en el basurero	6/30
10	29AA	Hormigas de la colonia	6/30
11	29BB	Hormigas de la colonia	6/30
12	29J	Obreras vivas del basurero	10/30
13	29N	Hormigas forrajeras	5/30
14	29K	Obreras vivas del basurero	10/30
15	29Ñ	Obreras vivas del basurero	10/30
16	28E	Obreras vivas del basurero	10/30
17	28H	Obreras vivas del basurero	10/30
18	29AB	Cadáveres en el basurero	60/30
19	29AL	Cadáveres en el basurero	60/30
20	28AM	Obreras vivas del basurero	10/30
21	29AX	Obreras vivas del basurero	10/30
22	30N	Obreras vivas del basurero	10/30
23	30Ñ	Obreras vivas del basurero	10/30
24	30Y	Suelo asociado a la colonia	3/30
25	30AK	Obreras vivas del basurero	10/30
26	28I	Hormigas forrajeras	5/30
27	29P	Suelo asociado a la colonia	5/30
28	29AG	Suelo asociado a la colonia	3/30
29	28Y	Hormigas forrajeras	5/30
30	29AS	Hormigas forrajeras	5/30

El protocolo para reactivar los diferentes hongos y preparar la suspensión de esporas se realizó con base en los protocolos de Elizondo-Wallace (2012), Poulsen *et al.* (2006) y Poulsen *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Para ello, se prepararon placas *Petri* conteniendo medio agar papa dextrosa, PDA (del inglés Potato Dextrose Agar), ajustado el medio de cultivo a un pH de 4.0 para inhibir el desarrollo de microorganismos y autoclavado posteriormente (Ver colección de microhongos reactivados en el Anexo 3). Una vez autoclavado a temperatura soportable a la mano, se incorporó el antibiótico ampicilina a 0,1 g L<sup>-1</sup> al medio PDA. Finalmente, el medio se almacenó en cuarto frío a 4 °C hasta utilizar las placas para reactivación.

<sup>18</sup> Los seis códigos de hongos marcados con color azul (LD10314, 27A, 29AI, 29AL, 30N y 30U) fueron seleccionados posteriormente para desarrollar los bioensayos preliminares de virulencia.

Las placas con el medio PDA fresco se inocularon de forma separada con técnica aséptica, partiendo de las muestras de los hongos en los crioviales con su respectivo código. Con ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó un inóculo, y éste se colocó en tres puntos de la placa de PDA + amp 0,1 g L<sup>-1</sup> (pH = 4.0). Enseguida, las placas fueron incubadas a temperatura constante de 28 °C durante 7 a 10 días. Paralelamente, cada vez que se probó un grupo de las 30 cepas, también se reactivó una cepa comercial genéticamente estable de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (BIPESCO 5/ F52) de la colección del Instituto Leibniz DSMZ (del término alemán *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*), Braunschweig, Alemania; que se caracteriza por esporular apropiadamente a temperaturas de 25-30 °C y a pH de 3.3-8.5, y actúa produciendo destruxinas A, B, y E bajo un mecanismo que no está completamente dilucidado, pero se cree que la muerte del insecto se debe a un efecto de parálisis, agotamiento de nutrientes, obstrucción física, invasión mecánica de órganos y toxicosis. Además, dicha cepa se evaluó experimentalmente como hongo entomopatógeno que tiene un alto grado de virulencia contra zompopas y para efectos de bioensayo, se utilizó como un control positivo biológico (EFSA, 2012).

En laboratorio, se ha verificado que se requieren dosis mínimas de esporas para causar una infección por micosis en un insecto, pero dicha dosis no suele ser representativa en condiciones de campo, donde las infecciones exitosas deberían alcanzarse con un pequeño inóculo que permita alcanzar la mortalidad de un número significativo de individuo y se generen suficientes esporas viables para que éstas se propaguen a toda la población de individuo (Boomsma *et al.*, 2014). Bajo tal disertación, transcurrido el periodo de reactivación, se preparó una suspensión de esporas de los hongos seleccionados y de la cepa de referencia de *M. anisopliae* de la colección DSMZ bajo la técnica aséptica; raspando la superficie de una colonia esporulada al menos tres veces con asa bacteriológica y depositando cada inóculo con esporas en un tubo con capacidad de 5 mL y que contenía 2 mL de solución de Tween 80® al 0,01% (v/v). El Tween 80® es un surfactante no iónico que se ha utilizado en diversos estudios para evaluar hongos entomopatógenos debido a que permite la dispersión y homogenización de las esporas de conidias (Lemus *et al.*, 2008) y por su capacidad de humedecer la cutícula hidrofóbica de hormigas (Rostas y Blassman, 2009).

Posteriormente, la suspensión fúngica se agitó en vortex (1 min) y se dispuso a llevar a cabo un recuento del número de propágulos por unidad de volumen en cámara de Neubauer (Inglis *et al.*, 2012) para ajustar la concentración madre a una dosis estándar de 10000 esporas µL<sup>-1</sup>. Luego, se tomaron 15 µL de esta suspensión con micropipeta y se depositaron en la placa del hemocitómetro

para proceder a observar las esporas y hacer el conteo respectivo en microscopio óptico de luz (magnificación de 40X) (Lemus *et al.*, 2008). Las esporas se contaron partiendo del recuadro central, conformado por 20 recuadros pequeños, los cuales a su vez poseen 16 recuadros más pequeños y de éstos, los 4 que estaban ubicados en las esquinas y el central se contaron para proceder a hacer el cálculo de la dosis madre de la siguiente forma:

$$\text{Dosis madre} \left( \frac{\text{esporas}}{\mu\text{L}} \right) \times 5 \text{ recuadros contados} \times 10 \text{ mm de profundidad por pozo}$$

Una vez obtenida la dosis madre, se calculó el volumen de esporas requerido para alcanzar la dosis estándar deseada de 10000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ , con base en la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de esporas a incorporar} = \frac{(10000 \text{ esporas} \times 1000 \mu\text{L})}{\text{Conteo de esporas de la dosis madre (esporas)}}$$

A partir de este valor, se hizo un resta de (1000 – volumen de solución de esporas ( $\mu\text{L}$ )) al volumen de esporas para obtener la cantidad de Tween 80® al 0,01% a adicionar para obtener un volumen final de trabajo de 1000  $\mu\text{L}$  (Cavalcanti *et al.*, 2007).

### **3.4.2 Prueba de patogenicidad contacto dependiente *in vitro* para determinar la susceptibilidad de esporas de la colección de hongos sobre zompopas cortadoras**

Las pruebas de patogenicidad para controlar zompopas son útiles para identificar las cepas que demuestren ser más agresivas contra el insecto de interés (Ribeiro *et al.*, 2012). Por esta razón, se realizaron estos bioensayos de patogenicidad para discriminar la agresividad entre una cepa y otra, partiendo de única dosis estandarizada a 10000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  con base en los protocolos de Lemus *et al.* (2008), de Souza *et al.* (2013) y Diehl y Junqueira (2001) con algunas modificaciones.

Se seleccionaron aleatoriamente 10 obreras ( $n = 10$ ) de tamaño intermedio (1,2 – 1,5 cm largo), provenientes de una colonia con hongo sano. Cada individuo se dispuso de manera aislada en placas de *Petri* estériles con dimensiones de 145 mm  $\phi$   $\times$  20 mm de altura y se microinoculó con 1  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas de cada uno de los hongos seleccionados ó el hongo de la cepa de referencia, que se preparó mezclando un inóculo de esporas en 2 mL de solución de Tween 80® al 0,01% (v/v) y se estandarizó la dosis para alcanzar de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ . La gota de suspensión fue aplicada por gravedad sobre el mesotórax o cabeza del himenóptero y se dejó secar por  $\approx 1$  min para asegurar que las conidias permanecieran sobre la cutícula del insecto. Este protocolo se desarrolló de esta manera, dado que la aplicación de la dosis con el microinóculos de una dosis de hongos estandarizada colocada directamente en la superficie del exoesqueleto del insecto es uno de los

métodos comúnmente utilizado, y los volúmenes aplicados pueden ser tan bajos como 0,5  $\mu\text{L}$ , dicha dosis es proporcional al número de propágulos insecto<sup>-1</sup> (Goetel, 1997).

Posteriormente, cada hormiga se colocó en tubos tipo *ependorf* estériles con capacidad de 2 mL, y la boquilla de los mismos se cubrió con una mota de algodón estéril humedecida con abundante solución de dextrosa al 10% (m/v). Todos los tubos *ependorf* con las hormigas fueron organizados en *racks* y posteriormente fueron transferidos a un contenedor plástico desinfectado y se evaluó la mortalidad de las zompopas hasta el día 7 de incubación. El ensayo se replicó tres veces ( $r = 3$ ) con los tratamientos experimentales de hongos seleccionados, el control positivo (obreras con inoculados con la suspensión de la cepa de referencia) y el control negativo (hormigas sin dosis de esporas); y cuando se registraron los resultados del último día, se procedió a llevar a cabo el análisis estadístico con los análisis de varianza (ANOVA de una vía y Krustall-Wallis).

### **3.4.3 Verificación presuntiva del proceso de micosis por efecto de las conidias creciendo sobre los cadáveres de zompopas obreras de *Atta cephalotes***

Una vez muertos o con signos de micosis, 10 ejemplares (si los había) fueron removidos de los tubos tipo *ependorf*, manteniendo la técnica aséptica y fueron transferidos a placas *Petri* con dimensiones de 145 mm  $\varnothing$   $\times$  20 mm de altura conteniendo al menos 10 trozos de papel toalla estériles (con dimensiones de 1 cm de ancho  $\times$  2 cm de largo) humedecidos con abundante agua destilada estéril, con ayuda de unas pinzas estériles para establecer un sistema de cámara húmeda en la placa y promover el desarrollo saprófito del hongo sobre el cadáver de la zompopa (de Zarzuela *et al.*, 2012). Cada cámara con el respectivo código del hongo bajo el cual murieron los cadáveres se incubó a temperatura ambiente en cajas plásticas durante 4-5 días, y después de este periodo, los insectos fueron inspeccionados como prueba presuntiva para observar el proceso de micosis sobre los cadáveres y verificar de manera preliminar que cada posible hongo colonizara el cuerpo del himenóptero, cuyo crecimiento se observó inicialmente en estereoscopio (remitirse al Anexo 3).

Adicionalmente, para observar las diferencias entre estructuras morfológicas de las hifas, conidiógenos y/o esporas de cada uno de los 6 hongos prometedores; se tomó una sección de micelio creciendo activamente sobre las aberturas externas y/o membranas intersegmentales de las obreras muertas mediante técnica aséptica y con asa micológica. El micelio recuperado con las esporas se dispersó uniformemente en el área de un portaobjetos, para teñir las estructuras de los hongos con solución de azul de lactofenol, y visualizar la morfología de los mismos mediante un microscopio óptico de luz (Inglis *et al.*, 2012).

### 3.5 Prueba de virulencia contacto dependiente de los hongos entomopatógenos promisorios sobre obreras de tamaño intermedio de *A. cephalotes*

Una vez que se seleccionan los aislamientos que causaron una mortalidad significativa ( $p < 0,05$ ) y que exhibieran índices de mortalidad superiores a 50%, se realizó la prueba de virulencia, de la misma forma en que se estableció el bioensayo de patogenicidad, con algunas modificaciones de los protocolos de Conteiro-Castilho *et al.* (2010), Lemus *et al.* (2008) y Diehl y Junqueira (2001). Una vez que se reactivaron nuevamente estos hongos promisorios en PDA + ampicilina 0,1 g L<sup>-1</sup> (pH = 4.0), el género de cada uno de estos hongos fue identificado morfológicamente por las características microscópicas de las hifas, esporas y esporófito mediante la clave taxonómica descrita por Samson *et al.* (1988) y actualizada por Humber (2012), como se describe a continuación:

- a) *Aspergillus* (Michelli): el hongo dispone de conidióforos erectos sin ramificaciones que terminan en una estructura de ovoide hinchado o un ápice clavado llamado “vesícula”. Las fiálides presentan forma de frasco y son uniseriadas en la vesícula o biseriadas en la métula; las conidias son unicelulares dispuestas sobre largas cadenas, son suaves o rugosas, hialinas a tener un pigmento oscuro (29AI y 30N).
- b) *Beauveria* (Vuillemin): los conidióforos corresponden a verticilos y densos grupos de células conidiógenas simpoidales, cortas y globosas o con forma de frasco con un raquis apical denticulado dando apariencia de zig-zag, hialinas, de pared lisa. Las conidias son unicelulares, hialinas, de pared lisa, globosa a elipsoidal (LD10314 y 27A).
- c) *Metarhizium* (Sorokin): los conidióforos están dispuestos en parches compactos a estromáticos, las conidias son mononematas, aunque también ocurren sinematas sobre artrópodos enterrados en el suelo u otros sustratos. Las células conidiógenas se organizan en verticilos en una estructura similar a un “candelero”, son clavadas a cilíndricas; las conidias son unicelulares, de pared lisa, hialina a ligeramente pigmentada, la cual conforma cadenas agregadas en columnas prismáticas (30U).
- d) *Paecilomyces Bainier*: presentan conidióforos erectos, mononemata, aunque en algunas especies de insectos se expresa sinemata, verticilado, y asociando verticilos de ramificaciones divergentes y fiálides; las cuales poseen forma de frasco o con una región basal hinchada, que se estrecha abruptamente en un cuello variable. Las conidias son unicelulares, hialinas a ligeramente pigmentadas, y se producen en cadenas divergentes, de pared lisa u ocasionalmente espinosa (29AL).

Luego, se prepararon suspensiones de esporas de aquellos hongos reactivados que exhibieron capacidad infectiva igual o mayor a 90% a  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ , y se hizo el conteo celular directo en cámara de Neubauer y utilizando microscopio óptico, para ajustar la concentración de una suspensión madre de cada inóculo con 2 mL en 1 mL de dilución, y proceder a realizar diluciones decimales seriadas hasta el orden de  $1 \times 10^{-5}$  (v/v), con el objetivo de establecer 5 dosis diferentes:  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$ , 1 y 0,1 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ . La dilución utilizada se derivó de la patente publicada por De Crecy (2012), quien asegura que el índice de dilución aplicable para una cepa de hongo a evaluar en un bioensayo puede ser tan baja como  $1 \times 10^{-6}$  (v/v) ó tan alta como  $2 \times 10^{-1}$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  (v/v).

Se seleccionaron aleatoriamente grupos de 10 hormigas ( $n = 10$ ) de la casta forrajera que estuvieran en un jardín fúngico sano y cuyo individuos se observaran fisiológicamente activos para ser sometidos a ensayo con las diferentes dosis de hongos promisorios. Además, para corroborar la repetibilidad de los resultados, cada unidad experimental se replicó tres veces ( $r = 3$ ). Las hormigas fueron trasladadas del jardín fúngico a placas *Petri* con ayuda de una pinzas estériles en cámara de flujo laminar y bajo la técnica aséptica, y se pipeteó por gravedad un microinóculo de 1  $\mu\text{L}$  con la dosis recién preparado de cada hongo sobre la superficie de la cabeza o el mesotórax de los himenópteros. La microgota con la dosis agregada en el exoesqueleto del insecto se dejó secar por un periodo de  $\approx 1$  min. Posteriormente, cada individuo fue dispuesto en tubos *ependorf* de 2 mL y la boquilla de cada tubo se tapó con una mota de algodón humedecida con solución de dextrosa estéril al 10% (m/v). Cada grupo de tubos con las unidades experimentales se organizó en *racks* y se procedió a incubarlos dentro de una caja plástica a temperatura ambiente con media placa *Petri* conteniendo agua destilada estéril en el fondo de las cajas para mantener la humedad. Una vez muertos, los cadáveres fueron removidos de los tubos tipo *ependorf* y se colocaron en placas *Petri* para establecer nuevamente cámaras de húmedas y verificar el desarrollo saprófito sobre los insectos, como se describió en la sección 3.4.3.

La mortalidad de las zompopas obreras se registró después de 7 días para calcular la dosis letal media ( $\text{LD}_{50}$ ) bajo la prueba paramétrica de regresión de Probit, y diariamente se contabilizó el número de insectos muertos para estimar el tiempo de letalidad medio ( $\text{LT}_{50}$ ) bajo el método no paramétrico de Kaplan-Meier. Adicionalmente se hizo un análisis de varianza por corrida de grupos de hongos y por dosis aplicada para comparar los factores (tipo de hongo) y niveles de factor (dosis) y determinar si habían diferencias significativas con los controles positivo y negativo.

### 3.6 Análisis estadístico de los datos (Minitab 17®)

Todos los análisis mencionados en esta sección se condujeron con ayuda de las funciones y gráficos generados por el paquete estadístico Minitab 17® (Minitab Ltd., Coventry, UK). Según lo que comenta Kaya y Vega (2012), es necesario evaluar al menos 5 niveles de factor, respondientes a las dosis/concentraciones aplicadas en biocontrol de plagas para cuantificar la mortalidad, infección o tiempo de muerte con ayuda de los parámetros de concentración o dosis letal (LC/LD, del inglés *lethal concentration/lethal dose*) o tiempo letal para muerte (LT, del inglés *lethal time*); y el parámetro más común que se expresa es el valor obtenido del percentil 50 ó 90 (LD<sub>50</sub> y LD<sub>90</sub>).

Los datos crudos de los valores de mortalidad reportados para las pruebas de patogenicidad y/o virulencia fueron sometidos a un análisis de varianza *One-Way ANOVA* ( $\alpha = 0,05$ ,  $n = 10$  y  $r = 3$ , una vez que se cumplieron los supuestos de parametricidad (normalidad, homogeneidad de varianzas y poder estadístico). No obstante, aquellos datos que no se ajustaron a las pruebas de normalidad para la prueba ANOVA fueron transformados con la fórmula del arcoseno  $\sinh^{-1}(x)$ , la cual es estadísticamente válida para obtener un intervalo de valores más reducido (entre 0 y 3) para hacer un análisis de varianza o de toxicidad como la prueba Probit, y se ha reportado en diversos artículos científicos como una fórmula apropiada para normalizar datos crudos para probar biofertilizantes, fumigantes de origen vegetal y esporas de hongos entomopatógenos contra himenópteros sociales como *Solenopsis invicta* (Ahmed y Abdelbagi, 2014; Barta, 2010; Caldwell, 2015; Chan *et al.*, 2013).

Posterior al análisis de varianza, se realizaron pruebas adicionales *Post-Hoc* de Tukey (que compara todos los tratamientos, incluyendo controles positivo y negativo para determinar aquellos que fueron significativamente diferentes) y Dunnet (que compara las muestras con el control negativo) para determinar los promedios de mortalidad de las proteínas tóxicas de *Bt* u hongos que fueron estadísticamente más diferentes entre sí (Back, 2011). Además, para comparar los resultados del ANOVA de los datos transformados y darle mayor validez a los resultados, también se aplicó el análisis no paramétrico de Krustall-Wallis, que en vez de comparar las medias de los datos de mortalidad, se comparan las medianas y se establecen rangos para estimar diferencias significativas.

Seguidamente, se realizó el análisis paramétrico de regresión de Probit para estimar la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) – a partir de las concentraciones incorporadas del complejo esporacristal de *B. thuringiensis* en dieta semisólida – ó la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) – a partir de los registros de mortalidad de las dosis decimales probadas con los 6 hongos más promisorias que alcanzaron más de un 90% de mortalidad en los ensayos de patogenicidad (Finney, 1980).

Dichos estimadores fueron comparados con base al traslape de los intervalos de confianza del 95% contruidos a partir del análisis de varianza previo (Mascarin, 2015). Como en ambos bioensayos se obtuvo mortalidad natural en los controles negativos, se aplicó una corrección con la fórmula Abbot, la cual permite alcanzar un nivel de respuesta final entre 10% y 90% después de aplicarla:

$$Mortalidad\ corregida\ (\%) = \frac{O_{tratamiento} - O_{control\ negativo}}{100 - O_{control\ negativo}} \times 100$$

Cuando la respuesta porcentual de mortalidad (eje Y) es graficada bajo las dosis o concentraciones correspondientes, se suele obtener una curva en forma de S, debido a que la toxicidad se relaciona directamente con la función logarítmica, es por ello que para obtener un comportamiento lineal de los datos, se suele transformar la variable respuesta (ej: mortandad) a escala Probit y la dosis o concentración a una escala logarítmica (Heong *et al.*, 2011; Kaya y Vega, 2012).

Finalmente, para obtener el tiempo de supervivencia y derivar el tiempo subletal ( $LT_{50}$ ) se aplicó la prueba no paramétrica de Kaplan-Meier (basado en las medianas de los registros periódicos de muerte) para cada una de las cepas y concentraciones administradas a las obreras de *A. cephalotes*; fuese con extracto liofilizado de las 3 cepas promisorias *B. thuringiensis* que presentaron mejor ajuste y letalidad en el análisis Probit, o con cada una de las dosis de los 6 hongos promisorios evaluados (Coombs, 2013). Este método se construye a partir de un diseño escalonado o censurado que determina el “tiempo de supervivencia”, ya que la variable “tiempo” ( $T$ ) se usa como estimador en el momento en que se presente un evento (ej: % de mortandad) más que una variable binaria  $Y$ , por lo que la función de supervivencia se denota:  $S(t): P(T > t)$  (Bender, 2009) y que se explica como:

$$S_t = \frac{No.\ individuos\ vivos\ al\ principio\ del\ ensayo - No.\ individuos\ muertos\ al\ final}{No.\ individuos\ vivos\ al\ principio\ del\ ensayo}$$

La curva de supervivencia estimada se ha definido como la probabilidad de un individuo de sobrevivir por un periodo dado, mientras se considera al tiempo en muchos intervalos cortos. Goel *et al.* (2010), mencionan que para dicha curva: 1) se aplica una censura a aquellos individuos que no generan respuesta al tratamiento dado, 2) se asume que las probabilidades de supervivencia bajo los factores o niveles de factor dados son iguales y 3) los eventos ocurren a tiempos especificados. Además, para conocer cuán diferentes son las curvas generadas bajo los tiempos subletales calculados, se suelen aplicar pruebas como log-rank, que se basa en la fórmula:

$$Log - Rank\ test = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2}$$

## RESULTADOS

### 4.1 Recuperación y esporas viables de las muestras liofilizadas de *B. thuringiensis*

Con base en el resumen de resultados del cuadro 4, se obtuvieron porcentajes de recuperación bastante similares entre todas las cepas reactivas, dado que los valores porcentuales se ubicaron entre 10% y 32% de recuperación del *pellet* liofilizado por muestra; incluyendo el control positivo biológico utilizado de *Bt* subs. *israelensis*. Asimismo, se reportó que el promedio porcentual de las cepas aisladas fue de  $\approx 16,41\%$ , que está acorde con el intervalo de porcentajes mencionado. Además, la recuperación más baja fue la obtenida por la cepa *Bt21* (10,23%), mientras que la cepa con la mayor recuperación fue *Bt33* (32,56%).

De la misma forma, los promedios cuantificados de esporas viables en medio solidificado Luria-Bertani con el *pellet* de cada *Bt* aislado en solución salina a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  a una dilución de  $1 \times 10^5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; variaron entre  $3,30 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$  (*Bt1A*) hasta  $2,10 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$  (*Bt34*) y ninguna de las cepas evaluadas presentó diferencias significativas [Kruskal-Wallis:  $P = 0,459$ ,  $P$  (empates ajustados) = 4,51]. Es importante tomar en consideración que en los bioensayos burdos elaborados por Fabián Cerdas, al realizar el protocolo para el conteo de esporas viables, en la mayoría de aislamientos se obtuvo una viabilidad de  $1,00 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ; lo que sugiere que para el momento en que se reactivaron estas cepas, se perdió entre 0,1- 1% de la viabilidad de estas cepas.

**Cuadro 4.** Índices de recuperación del *pellet* liofilizado de cada una de las cepas de *B. thuringiensis* crecidas en 250 mL de medio HCT y número de esporas viables reportado en placas gelificadas con Luria-Bertani.

Cepa de <i>Bt</i>	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	Porcentaje de recuperación (%) <sup>19</sup>	Promedio de esporas viables recuperadas (UFC mL <sup>-1</sup> , $r = 3$ )
<i>Bt19</i>	874	182	20,82	$6,70 \times 10^6$
<i>Bt20</i>	589	72	12,22	$1,00 \times 10^7$
<i>Bt21</i>	518	53	10,23	$4,70 \times 10^6$
<i>Bt26</i>	600	97	16,17	$1,40 \times 10^7$
<i>Bt27</i>	646	106	16,41	$6,90 \times 10^6$
<i>Bt28</i>	906	173	19,09	$7,90 \times 10^6$
<i>Bt29</i>	1207	133	11,02	$4,70 \times 10^6$
<i>Bt33</i>	691	225	32,56	$4,70 \times 10^6$
<i>Bt34</i>	871	244	28,01	$2,10 \times 10^7$
<i>Bt38</i>	880	107	12,16	$3,60 \times 10^6$
<i>Bt40</i>	927	112	12,08	$5,20 \times 10^6$
<i>Bt42</i>	921	96	10,42	$1,30 \times 10^7$
<i>Bt44</i>	1243	162	13,03	$4,10 \times 10^6$
<i>Bt45</i>	806	135	16,75	$1,60 \times 10^7$
<i>Bt47</i>	626	84	13,42	$2,10 \times 10^7$
<i>Bt1A</i>	895	162	18,10	$3,30 \times 10^6$

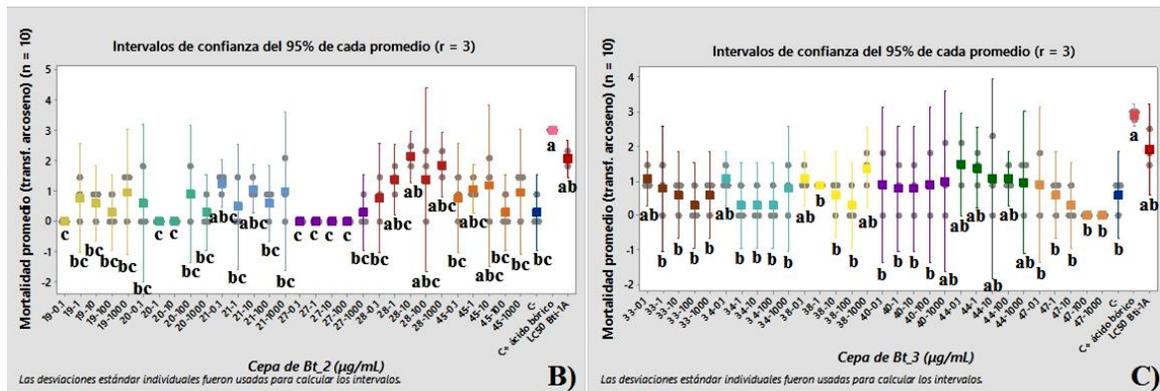
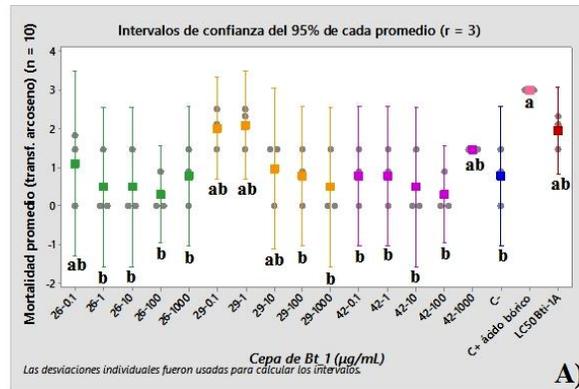
<sup>19</sup> % de recuperación de cada cepa de *Bt* = (peso seco (mg) / peso fresco) \* 100

#### 4.2 Toxicidad de los extractos liofilizados de *B. thuringiensis* sobre las obreras cortadoras

Se llevó a cabo un total de tres bioensayos para evaluar un total de 15 cepas. Previamente, se hizo un bioensayo para conocer si siete de las 14 cepas de la colección de cepas comerciales de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* seleccionadas aleatoriamente podrían ser bioactivas contra las zompopas obreras de *A. cephalotes*. Los resultados mostraron que la cepa *Bt1A* se ajustó mejor al modelo Probit y se alcanzó una concentración subletal ( $LC_{50}$ ) lo suficientemente medible y viable para utilizarla como cepa de control positivo biológico (Ver detalles en Anexo 2, Figura 12).

En la primera corrida (cepas *Bt26*, *Bt29* y *Bt42*) se encontró una varianza entre grupos (varianza explicada por los factores y sus niveles de factor – concentraciones evaluadas) de 63,2% y una varianza dentro de grupos (varianza de la prueba no explicada, derivada del error) de 36,8%; la cual presentó diferencias estadísticas significativas entre cada variable en estudio ( $F = 3,64 - p = 0,001$ ) y un ajuste al modelo ANOVA de una vía de 63,21% ( $S = 0,681$ ); que es aceptable considerando que se está trabajando con datos biológicos. La corrida 2 (*Bt19*, *Bt20*, *Bt21*, *Bt27*, *Bt28* y *Bt45*) muestra que también hubo diferencias singnificativas entre la cepas de *Bt* evaluadas y sus concentraciones establecidas ( $F = 4,26 - p = 0,000$ ), una variabilidad dentro de grupos (debida a factores externos no contemplados) de 32,6% y una correlación apropiada a la prueba ( $S = 0,604$ ,  $R^2 = 67,40\%$ ) para establecer diferencias con Tukey. Finalmente, la corrida 3 (*Bt33*, *Bt34*, *Bt38*, *Bt40*, *Bt44* y *Bt47*) apunta a que al igual que en las otras corridas, la variabilidad derivada de otros factores que no se contemplaron en la prueba fue de 43,91%, mientras que el 56,09% corresponde a la variabilidad entre grupos y las respectivas concentraciones de *Bt* evaluadas, las cuales fueron significativas ( $F = 2,63 - p = 0,000$ ) y se ajustaron al modelo *One-way ANOVA* ( $S = 0,607$ ,  $R^2 = 54,09\%$ ).

Con respecto a qué tan significativas fueron las diferentes obtenidas, con base en los resultados arrojados de las pruebas de Tukey y Dunnet; en la corrida 1, las concentraciones más bajas de la cepa *Bt29* ( $1$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la  $LC_{50}$  del control biológico de *Bt1A* presentaron un efecto significativo en la mortalidad de las zompopas al compararlo con el control positivo químico de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Figura 11A); en la segunda corrida, la mayor parte de concentraciones valoradas de la cepa *Bt28* y la  $LC_{50}$  de *Bt1A* en los bioensayos desarrollados parecen tener un efecto estadístico ( $\alpha = 0,05$ ) importante en relación con el control positivo químico (Figura 11B); y en la corrida 3, sólo la cepa *Bt44* presentó una ligera tendencia a generar un efecto semejante (con un 95% de confianza) al producido por el control positivo químico de ácido bórico  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 11C).

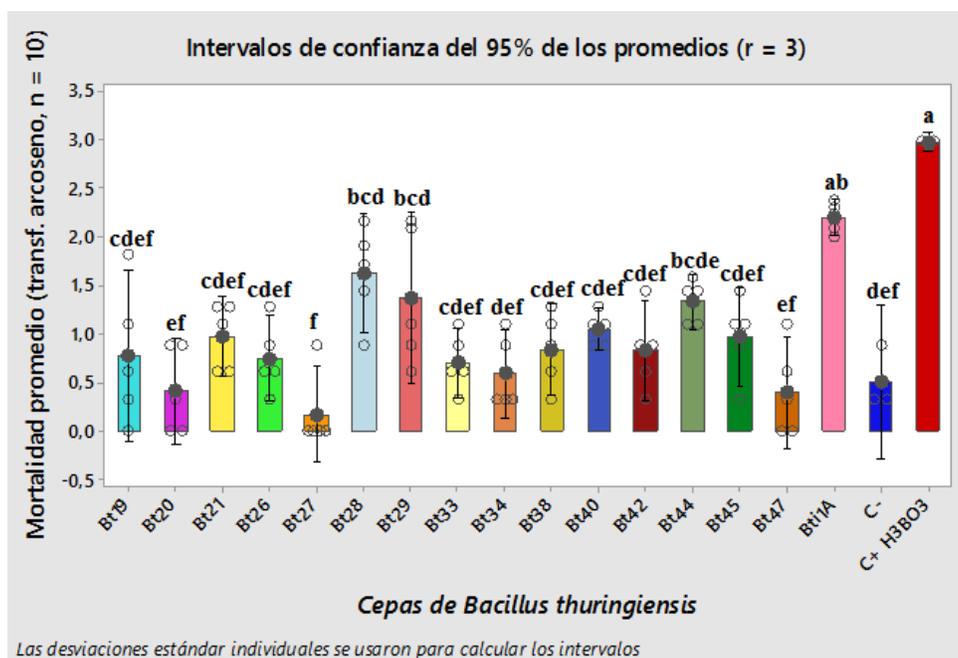


**Figura 11.** Gráficos de intervalos de confianza del 95% de las tres corridas de bioensayos en dieta semi-sólida, partiendo de los datos de mortalidad transformados con la función arcoseno, incluyendo los valores de mortalidad obtenidos de los controles negativos, el control positivo con ácido bórico y la LC<sub>50</sub> de *Bti1A*; y mostrando los resultados de la prueba de Tukey: A) cepas evaluadas y sus respectivas dosis: *Bt26*, *Bt29* y *Bt42*; B) cepas evaluadas: *Bt19*, *Bt20*, *Bt21*, *Bt27*, *Bt28* y *Bt45*; C) cepas evaluadas: *Bt33*, *Bt34*, *Bt38*, *Bt40*, *Bt44* y *Bt47*. Las cepas que no comparten la(s) misma(s) letra(s) son significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ).

Cabe mencionar que este resultado fue respaldado por el obtenido por la prueba alterna no paramétrica de Krustall Wallis, la cual presentó diferencias significativas entre las medianas evaluadas en la primera ( $H = 30,86 - g.l. = 17 - P = 0,021$ ), segunda ( $H = 60,45 - g.l. = 32 - P = 0,002$ ) y tercera corridas ( $H = 45,59 - g.l. = 32 - P = 0,046$ ); donde se evidenció que el orden de los rangos promedios evaluados favoreció a las concentraciones más bajas de *Bt29* 1 y 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (44,8% y 44,2% vs. 43,5% de *Bti1A* y 53,0 del C+), así como las concentraciones de 1, 10 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de *Bt28* (rangos promedio 71,8 – 90,5% y 84,3 vs. 89,8% de *Bti1A* y 98,0% del C+) y 1 y 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de *Bt44* (rangos promedio 74,0 y 75,3% vs. 88,3% de *Bti1A* y 98,0% del C+).

Después de hacer la prueba ANOVA, se generó un gráfico de barras con los valores individuales e índice de mortalidad acumulada (datos transformados a arcoseno) registrado para todas las cepas ensayadas (Figura 12) y se observó que la cepa que obtuvo estadísticamente mayor grado de mortalidad acumulada sobre las zompopas obreras después de control positivo químico de  $\text{H}_3\text{BO}_3$

(99,18%) fue la cepa control positivo biológico de *Bti*1A (73,59%), seguidas por la cepas *Bt*28 (54,16%) y *Bt*29 (45,82%). La cepa *Bt*44 (44,45%) también tuvo una leve tendencia a causar un aumento en el grado de mortalidad con respecto al resto de cepas ( $\alpha = 0,05$ ). Este resultado viene a ser complementario a los análisis de varianza ANOVA de una vía y Krustall-Wallis, cuyas cepas ya fueron mencionadas por tener su comportamiento a nivel de entomopatogenicidad sobre las obreras de *A. cephalotes*; tanto a nivel de media aritmética o de mediana.

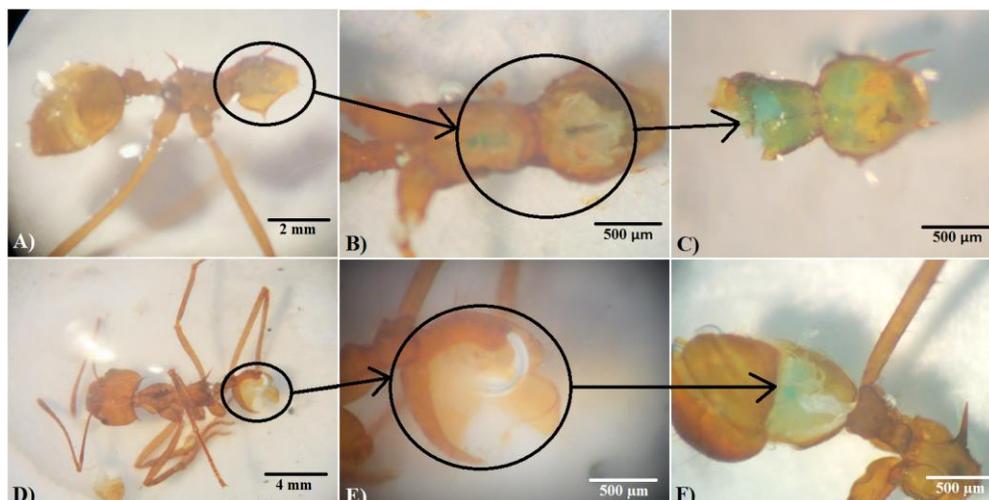


**Figura 12.** Gráfico de barras de los intervalos de confianza del 95%, indicando el grado de mortalidad promedio acumulado (transformación arcoseno) alcanzado por las 15 cepas más promisorias de *B. thuringiensis* contra hormigas de la subcasta forrajera de *A. cephalotes*, junto con un control positivo biológico correspondiente a la  $LC_{50}$  de una cepa comercial de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* bioactiva contra zompopas, un control negativo y un control positivo químico correspondiente a ácido trioxobórico ( $H_3BO_3$ ) al  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.2.1 Detección de partículas de dieta sólida teñidas en el canal alimentario en las obreras

Como un método para confirmar que las zompopas intermedias seleccionadas en el bioensayo consumieron la dieta, se llevaron a cabo disecciones una vez que éstas murieron durante el ensayo. De la misma manera, considerando que 11 de las 14 cepas alcanzaron mortalidades menores a 35%; se decidió llevar a cabo disecciones sobre hormigas vivas que estuviesen consumiendo la dieta artificial, una vez que el bioensayo concluyó y cuyos resultados visuales se muestran en la figura 13. Como se logró apreciar, en todos los ejemplares de insectos muertos diseccionados durante el periodo de bioensayo (Figura 13A) había presencia de partículas de dieta dispersas o dentro de la región del intestino medio (Figura 13B) y cercano al buche (estomodeo) de los individuos (Figura

13C); mientras que la presencia de algunas partículas de dieta en solución en la sección del proctodeo cerca del íleo (Figura 13E) o del recto (Figura 13F); se evidenció solamente en aquellas obreras que sobrevivieron el periodo de ensayo (Figura 13D) y que también fueron utilizadas como individuos de estudio durante el experimento de bioensayo fino conducido.



**Figura 13.** Vista macroscópica de obreras de tamaño intermedio (1.2-1.5 cm) diseccionados para visualizar la presencia de la dieta particulada o en solución, teñida con el colorante azul utilizado en la preparación de la dieta sólida. Las imágenes A, B y C son disecciones realizadas a obreras de *A. cephalotes* que murieron al consumir la dieta que incluyó la cepa *Bt29* a  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  durante el periodo de bioensayo (7 días); mientras que las imágenes D, E y F derivan de disecciones que se hicieron sobre obreras que estaban vivas y continuaron consumiendo la dieta artificial de *Bt45*, una vez que concluyó el bioensayo (después del día 7).

#### 4.2.2 Determinación de la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) de las cepas de *B. thuringiensis*

Una vez que se registró el número de individuos muertos al día 7 del bioensayo, se procedió a hacer la prueba de Probit, cuyos resúmenes gráficos muestran el ajuste de los valores promedio de mortalidad por dosis a la regresión lineal de Probit que se presentan en el anexo 4; mientras que los valores de concentración subletal junto con los valores de probabilidad estimados y los resultados de la prueba de ajuste de Pearson al Probit se indican en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Valores estimados de concentración letal media para 10 de las cepas promisorias de *B. thuringiensis*, bajo el modelo de regresión lineal paramétrica de Probit.<sup>20</sup>

Cepa de <i>Bt</i>	Valor de Z (regresión)	Valor de <i>p</i> (regresión)	Valor de $\chi^2$ (Pearson)	<i>g.l.</i> (Pearson)	Valor de <i>p</i> (Pearson)	LC <sub>50</sub> ± SD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Bt26</i>	0,00	0,998	0,000	3	1,000	$(1,00 \times 10^2 \pm 1,476)$
<i>Bt42</i>	0,00	0,998	0,000	3	1,000	$(1,000 \times 10^6 \pm 1,476)$

<sup>20</sup> Con las cepas *Bt19*, *Bt27*, *Bt38*, *Bt40* y *Bt47* no se obtuvieron las concentraciones letales medias porque los datos transformados analizados bajo la prueba Probit no los ajustaron a una regresión lineal y había resultados cuya concentración-mortalidad se repitió y eso impidió generar un resultado.

<b>Bt29</b>	0,00	<b>0,998</b>	0,000	3	<b>1,000</b>	<b>(3,170×10<sup>3</sup> ± 1,212)<sup>21</sup></b>
<b>Bt20</b>	0,00	0,998	0,000	3	1,000	<b>(3,17×10<sup>2</sup> ± 1,214)</b>
<b>Bt21</b>	-1,08	0,282	2,789	3	0,425	<b>(4,80×10<sup>1</sup> ± 209,575)</b>
<b>Bt28</b>	2,11	<b>0,035</b>	6,207	3	<b>0,102</b>	<b>(5,859×10<sup>7</sup> ± 7,402×10<sup>5</sup>)</b>
<b>Bt45</b>	-0,59	0,557	3,409	3	0,333	<b>(6.132×10<sup>-1</sup> ± 5,831×10<sup>4</sup>)</b>
<b>Bt34</b>	0,00	0,998	0,000	3	1,000	<b>(1,00×10<sup>2</sup> ± 1,476)</b>
<b>Bt44</b>	-0,91	<b>0,360</b>	1,142	3	<b>0,767</b>	<b>(9,97×10<sup>1</sup> ± 3,895×10<sup>3</sup>)</b>
<b>Bt33</b>	0,00	0,998	0,000	3	1,000	<b>(1,00×10<sup>2</sup> ± 1,476)</b>
<b>Bti1A</b>	0,74	<b>0,046</b>	3,056	3	<b>0,383</b>	<b>(1,28 ± 2,667)</b>

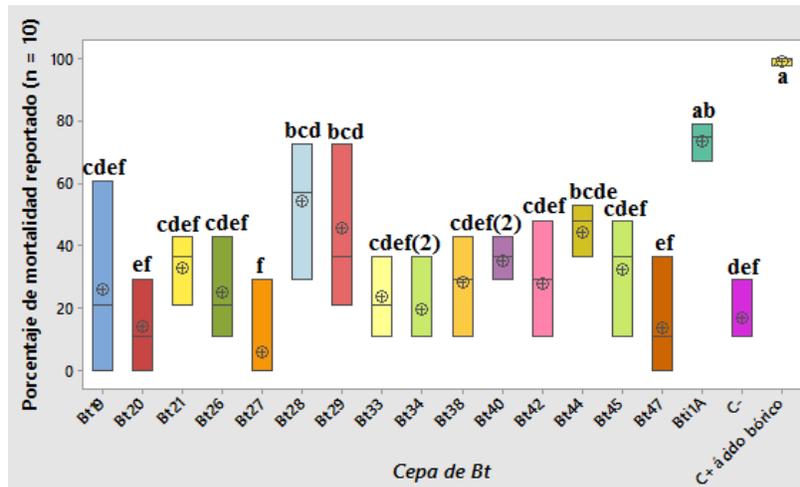
Tal como se presenta en los resultados de la prueba Probit (cuadro 5), sólo en dos de los casos se obtuvo una probabilidad menor del 5% del umbral para aseverar estadísticamente que con alguna de las cepas se pueden hacer predicciones del resultado obtenido, y los factores que fueron significativos corresponden a las cepas *Bt28* ( $p$  de regresión = 3,5%) y *Bti1A* ( $p$  de regresión = 4,6%). Sin embargo, los resultados de mortalidad reportados para ambas cepas no se ajustaron apropiadamente al modelo de regresión de Probit, dado que la probabilidad de ajuste fue de  $\approx 10\%$  (valor de  $p$  de Pearson) para la cepa de *Bt28* y  $\approx 38\%$  para la cepa *Bti1A*.

Este grupo de resultados de  $LC_{50}$  presenta un nivel considerable de sesgo, por lo que las variables de *Bt* no parecen ser buenos predictores para estimar el nivel de mortalidad de las zompopas de *Atta cephalotes*, ni tampoco poseen buenos niveles de ajuste a la prueba paramétrica aplicada. No obstante, el valor calculado no parece ser tan crítico si se toma en consideración que el valor de  $LC_{50}$  reportado para la cepa de *Bti-1A* bioactiva contra zompopas y que se probó como control positivo contra el resto de cepas de *Bt* aisladas de zompopas, alcanzó valores de mortalidad entre 40 – 50%.

Conociendo estos resultados, se creó un gráfico Boxplot (Figura 14) con los valores porcentuales transformados de mortalidad acumulada (luego de aplicar la prueba ANOVA y Tukey); donde se determinó que ninguna de las cepas alcanzó el 99,18% de mortalidad que generó el control positivo químico ( $\alpha = 0,05$ ). Sin embargo, la cepa *Bti1A* utilizada como control positivo biológico presentó un 73,59% de mortalidad acumulada, cuyo porcentaje sí fue más comparable con los resultados de mortalidad producidos por las cepas *Bt28* ( $\bar{x} = 54,16\%$ ), *Bt29* ( $\bar{x} = 45,80\%$ ) y *Bt44* ( $\bar{x} = 44,45\%$ ). Esto implica sin duda, que aunque las obreras de *A. cephalotes* son susceptibles a las cepas evaluadas, dado que las cepas de *Bt* no son tan bioactivas para causar un grado de mortandad superior al 50%.

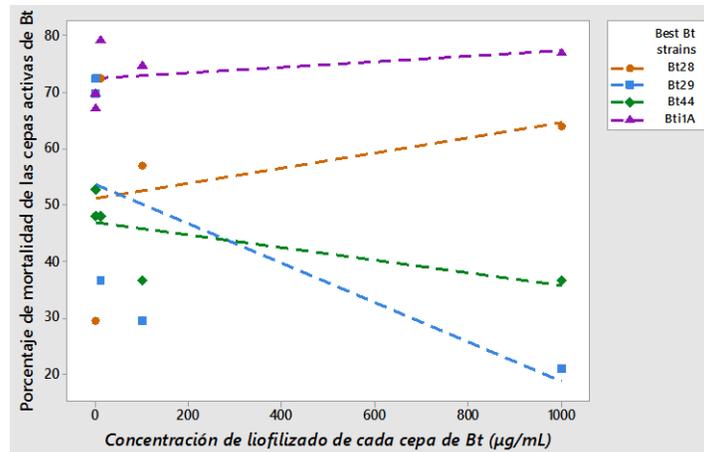
<sup>21</sup> Los valores derivados de la prueba Probit marcados con color azul corresponden a las cepas probadas de *B. thuringiensis* aisladas de colonias de *A. colombica* que presentaron mejores valores de mortandad, mientras que el valor marcado con naranja es la cepa de *Bt* var. *israelensis* que se utilizó como control.

El resto de cepas generaron mortalidades más bajas de 35% y se estimó que las cepas menos activas fueron *Bt20* ( $\bar{x} = 13,93\%$ ), *Bt47* ( $\bar{x} = 13,67\%$ ) y *Bt27* ( $\bar{x} = 5,88\%$ ), respectivamente.



**Figura 14.** Gráfico Boxplot basado en los rangos intercuartiles de los porcentajes de mortalidad acumulada de cada cepa de *B. thuringiensis* seleccionada como promisorio para combatir *Atta cephalotes*, junto con los resultados del análisis de Tukey. Los rangos que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (basado en un nivel de umbral del 5% -  $p < 0,05$ ).

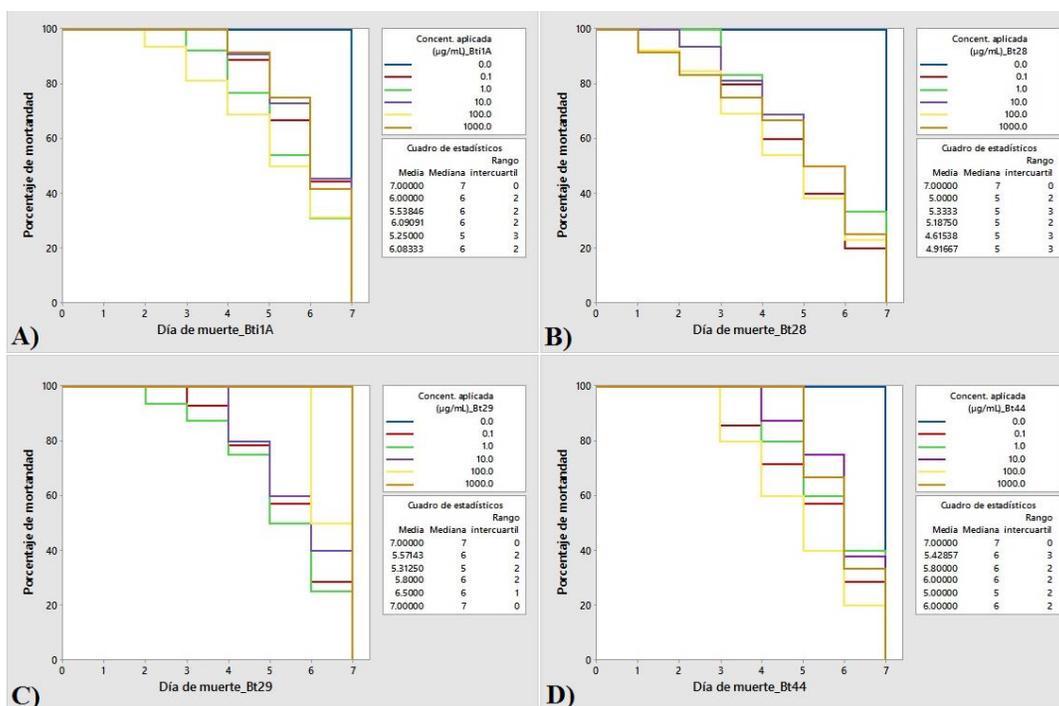
Finalmente, se creó un gráfico de dispersión de los porcentajes de mortalidad reportados para las 3 cepas que alcanzaron un mayor nivel de mortandad en los bioensayos desarrollados y la cepa bioactiva de *Bti1A* (Figura 15) para conocer la correlación de los valores de mortandad registrados y la concentración utilizada. En este caso, se determinó que las cepas *Bti1A* ( $R^2 = 0,600$  – Spearman Rho:  $p = 0,029$ ) y *Bt28* ( $R^2 = 0,700$  – Spearman Rho:  $p = 0,188$ ) presentaron una correlación positiva, pero dicha correlación no fue significativa en la cepa *Bt28*; mientras que las cepas *Bt29* ( $R^2 = -0,900$  – Spearman Rho:  $p = 0,037$ ) y *Bt44* ( $R^2 = -0,949$  – Spearman Rho:  $p = 0,014$ ) presentaron una correlación negativa y en ambos casos sí fue significativa. Cabe mencionar que el ajuste de los datos a los valores de correlación fue mayor a 60% en todos los casos, cuyo porcentaje de correlación es aceptable considerando que se trabajó con datos biológicos.



**Figura 15.** Gráfico de dispersión creado a partir de los porcentajes de mortandad alcanzados por las cuatro cepas de *B. thuringiensis* que presentaron mayor bioactividad contra zompopas obreras de *Atta cephalotes*.

#### 4.2.3 Estimación del tiempo de muerte media de las tres mejores cepas de *B. thuringiensis*

Luego de seleccionar las mejores cepas de *Bt* (a pesar del sesgo implicado) que correspondieron a *Bt28*, *Bt29* y *Bt44*; se llevó a cabo el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier (aplicando una censura a los datos en los que no murió ningún individuo durante el bioensayo, censura = 0 individuos muertos) con respecto de las medianas de los valores de mortalidad calculados, junto con la cepa de *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* que se utilizó como control positivo dentro del ensayo (los resultados de promedios y medianas asociadas al tiempo de muerte mediana de esta prueba se presentan en la figura 16). En general, la mayoría de tiempos subletales se ubicaron entre 5–7 días; a pesar de que se determinó que la cepa que tuvo medianas de 5 al evaluar todas las dosis contra el porcentaje de mortandad fue *Bt28* (Figura 16B), que como se ha visto en las pruebas anteriores, fue la produjo mayor mortalidad en comparación con las restantes 14 cepas evaluadas. Por su parte, con la cepa *Bt29* (Figura 16C) alcanzó  $LT_{50}$  de 6 – 7 días, mientras que con *Bt44* (Figura 16D) y *Bti1A* (Figura 16A) se estimó una  $LT_{50}$  de 5 – 6 días.



**Figura 16.** Gráficos supervivencia, diseñados bajo el método de Kaplan-Meier a partir de las medianas de mortalidad reportadas para combatir obreras de *Atta cephalotes*: A) cepa comercial de *Bt1A*, utilizada como control positivo biológico en los bioensayos, B) cepa *Bt28*, C) cepa *Bt29* y D) cepa *Bt44*.

Aparte de los resultados presentados, a la prueba también se le aplicaron los análisis no paramétricos de Log-Rank y Wilcoxon para hacer comparaciones múltiples entre los valores de tiempo letal medio generados a partir de las diferentes concentraciones de *Bt* evaluadas, y determinar si existían diferencias significativas entre las medianas estimadas (Cuadro 6). Bajo ambos métodos aritméticos se comprobó que no existen diferencias estadísticas entre las medianas calculadas de estas cuatro cepas de *B. thuringiensis* ni del tiempo de supervivencia asociado; dado que en el caso de la cepa utilizada como control positivo biológico, la mayor parte de las cepas presentaron tiempos subletales que se ubicaron entre los 5-6 días en promedio, excepto la cepa *Bt29* que presentó un tiempo subletal de 7 días con la concentración de 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

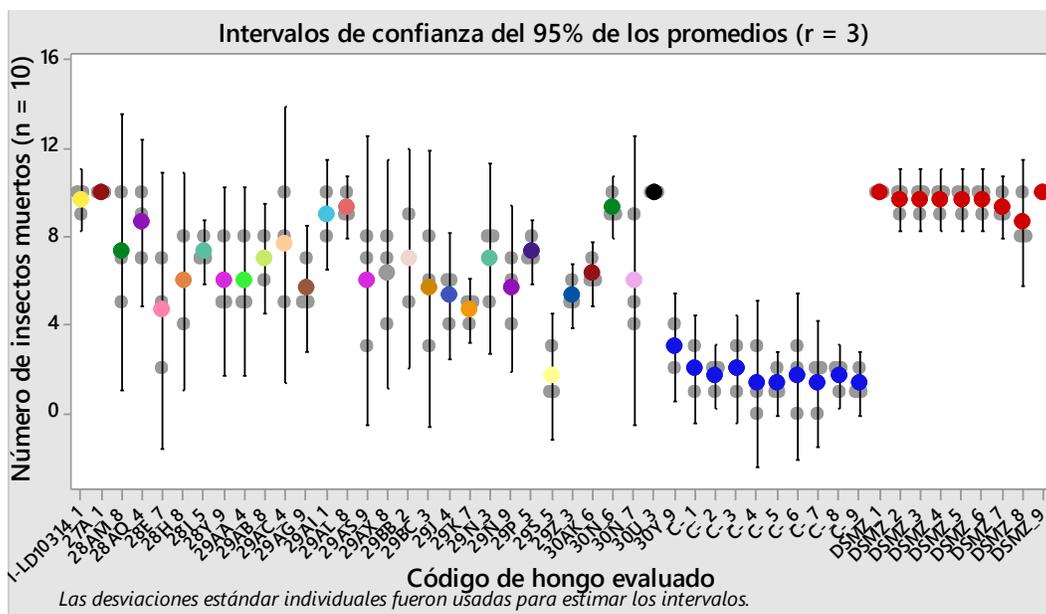
**Cuadro 6.** Valores estimados de tiempo de letalidad medio (LT<sub>50</sub>) bajo el método de Kaplan-Meier y estimación de los valores de probabilidad de los métodos de Log-Rank y Wilcoxon.

Cepa <i>Bt</i>	Concentración con ST <sup>22</sup> más bajo (µg mL <sup>-1</sup> )	LT <sub>50</sub> promedio (días)	Valor de $\chi^2$	<i>g.l.</i>	Valor de <i>p</i> (Log-Rank – Wilcoxon)
<i>Bt1A</i>	100	5,250	3,606 – 4,291	5	0,607 – 0,508
<i>Bt28</i>	100	4,615	3,934 – 3,822	5	0,559 – 0,575
<i>Bt29</i>	1	5,312	3,289 – 3,511	5	0,656 – 0,622
<i>Bt44</i>	100	5,000	2,872 – 3,175	5	0,720 – 0,673

<sup>22</sup> ST: tiempo de supervivencia (del inglés *Survival Time*).

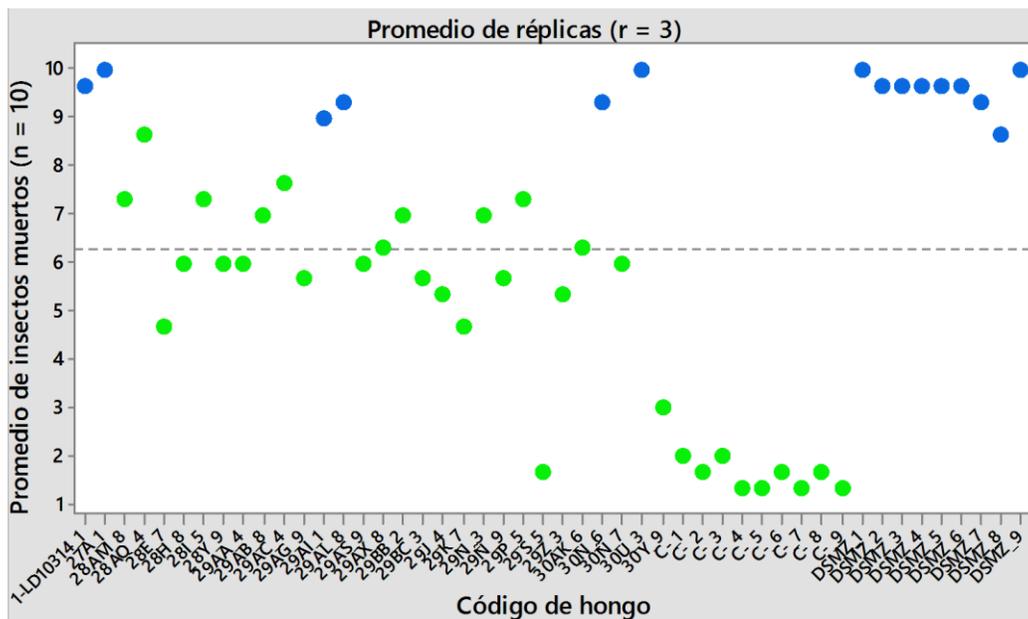
### 4.3 Efecto entomopatígeno de una dosis estándar de esporas de la colección de 30 hongos evaluados sobre hormigas forrajeras de *A. cephalotes*

Se llevaron a cabo un total de 9 corridas de ensayos de patogenicidad (que en los gráficos se aprecia como: Código del hongo\_Número de corrida (ej: 29AX\_8) y a partir de los datos crudos que se generaron se creó un gráfico de intervalos de confianza del 95% (Figura 17). Dicho gráfico demuestra que tanto los controles negativos como positivos mantuvieron mortalidades dentro de los valores estimados (15% C-, 90% DSMZ), excepto en dos de los bioensayos de patogenicidad, donde uno de los controles negativos presentó una mortalidad natural de los individuos del 30% (ensayo 1), mientras que uno de los controles positivos de *M. anisopliae* alcanzó en promedio 80% de mortalidad (ensayo 8). De la misma forma, se observó que a nivel individual sólo dos de las cepas de posibles hongos entomopatógenos evaluados alcanzaron un 100% de mortalidad (promedio de número de hormigas muertas,  $\bar{x} = 10,00 \pm 0,00$ ) y que podrían ser los que causen mayor incidencia para controlar las obreras de *Atta cephalotes* fueron los códigos 27A (posible *Beauveria* spp.) y 30U (posible *Metarhizium* spp.), seguidos por los hongos LD10314 (posible *Beauveria* spp.,  $\bar{x} = 9,67 \pm 0,58$ ), 30N (posible *Aspergillus* spp.,  $\bar{x} = 9,33 \pm 0,58$ ), 29AL (posible *Paecilomyces* spp.,  $\bar{x} = 9,33 \pm 0,58$ ) y 29AI (posible *Aspergillus* spp.,  $\bar{x} = 9,00 \pm 1,00$ ). Hubo una sexta cepa que alcanzó aproximadamente un 87% de mortalidad de los individuos evaluados ( $\bar{x} = 8,66 \pm 1,53$ ), pero al tener un intervalo de confianza muy alto, también se alcanzó una desviación estándar elevada y por ende generaría mayor sesgo si se seleccionara en bioensayos de virulencia.



**Figura 17.** Gráfico de intervalos de confianza del 95% de los valores individuales y promedios de mortalidad registrados de los 30 códigos de posibles agentes de biocontrol seleccionados y evaluados en pruebas de patogenicidad para combatir obreras de *A. cephalotes* ( $n = 10, r = 3$ ).

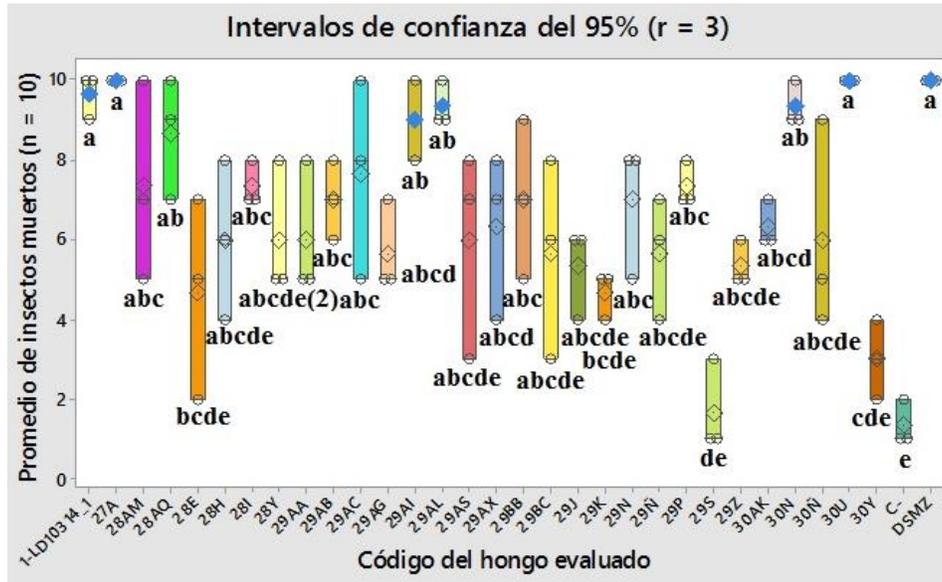
Posteriormente se generó un gráfico de efectos principales (Figura 18) para corroborar que en efecto, los promedios de mortalidad generados de las unidades experimentales evaluadas ( $n = 10, r = 3$ ) de las 6 cepas de hongos mencionadas anteriormente produjeron un efecto entomopatógeno similar al reportado para la cepa de referencia de *M. anisopliae* (DSMZ). De acuerdo con la aleatoriedad observada por 9 puntos continuos hacia arriba (generados por los controles positivos) y hacia abajo (generados por los controles negativos), la prueba de varianza ANOVA de una vía se llevó a cabo con un promedio por réplica de cada uno de éstos controles; ya que de lo contrario, no se habría podido ajustar los datos crudos dentro de una probabilidad normal y por ende, una transformación de datos hubiese ocasionado una pérdida de significancia estadística ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 18.** Gráfico de efectos principales de la mortalidad promedio acumulada de las obreras de *A. cephalotes* sometidas a una dosis estándar con los 30 códigos de hongos y los respectivos controles positivos y negativos ensayados. Los primeros nueve círculos celestes corresponden a los códigos de hongos que ocasionaron mortalidades similares a la cepa de referencia DSMZ (9 círculos celestes continuos), mientras que los círculos verde claro son los hongos que generaron un efecto estadísticamente comparable ( $\alpha = 0,044$ ) respecto del que produjeron los controles negativos (9 últimos círculos verdes consecutivos).

Dichas diferencias fueron visualizadas a través de un gráfico Box-Plot, mediante el que también se observó que los promedios de mortalidad de los hongos evaluados y los controles presentaron traslapes (incluyendo los cuartiles y rango intercuartil) (Figura 19). Este gráfico permitió detectar que la gran mayoría de hongos que comparten la letra a) tienen un efecto similar estadísticamente

( $\alpha = 0,05$ ) al de la cepa de referencia de *M. anisopliae*. Empero, sólo 7 de los 30 hongos evaluados comparten una o dos letras (a y b) que los hacen estadísticamente más afines (LD-10314, 27A, 28AQ, 29AI, 29AL, 30N) al control positivo DSMZ. De estos 7 códigos de hongos, sólo se seleccionaron 6, dado que el código 28AQ no alcanzó un 90% de mortalidad, y para pruebas de virulencia con organismos vivos lo ideal es probar cepas que hayan alcanzado al menos este porcentaje.



**Figura 19.** Gráfico Boxplot de los promedios e intervalos de confianza (95%) de mortalidad de las obreras de *A. cephalotes* probadas en el bioensayo de patogenicidad utilizando un set de 30 hongos a una dosis estándar de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ . Los rombos azul claro corresponden a los promedios de hongos que generaron más de un 90% de mortalidad sobre las zompopas evaluadas. Los promedios que no comparten la misma letra fueron significativamente diferentes (ANOVA:  $p = 0,044$ , Krustal-Wallis:  $P = 0,00$ ).

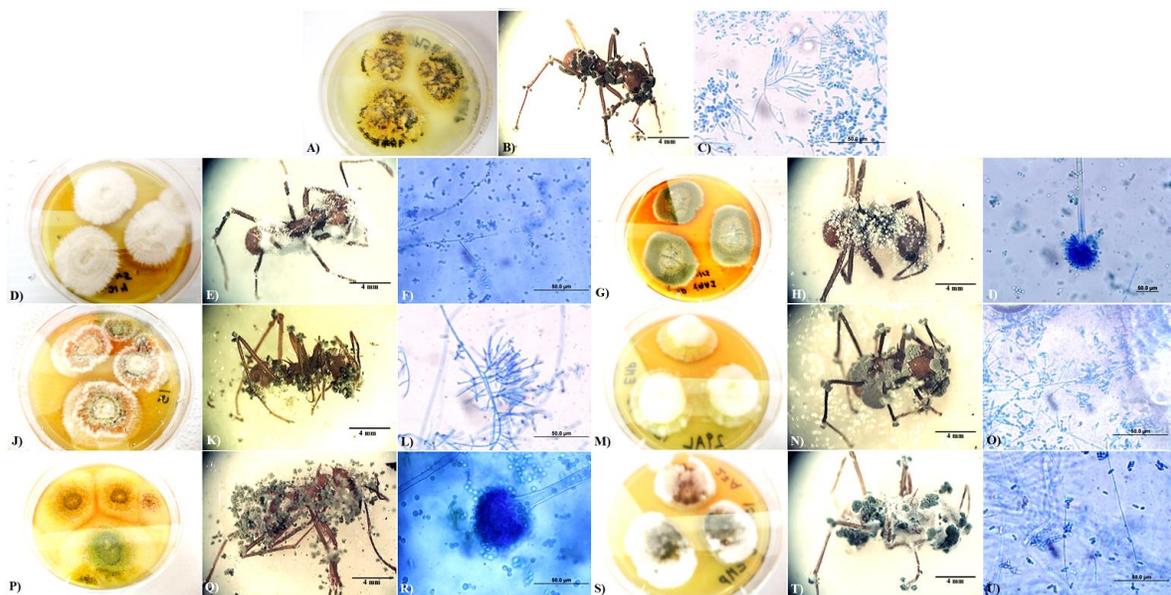
Para hacer dicha selección, también se consideró el resultado derivado de la prueba no paramétrica alterna a la ANOVA de una vía correspondiente a Krustal-Wallis (que en vez de basarse en promedios, compara las medianas de mortalidad y en sus rangos promedio), y de la misma forma se obtuvieron diferencias significativas entre las medianas de la mortalidad de hongos comparados ( $H = 67,36$ ,  $g.l. = 31 - P = 0,00$ ). Adicionalmente, los resultados apuntaron a que los mismos 7 hongos que se contemplaron en la prueba ANOVA son los potenciales hongos entomopatógenos porque alcanzaron medianas de 9,00; y dicha selección nuevamente no contempló al código de hongo 28AQ porque esta prueba tiene menor poder estadístico respecto de una prueba que incluya parametricidad, donde sí se pueden crear intervalos de confianza del 95% y se puede obtener información más válida de estas pruebas; por lo que fue más estricto considerar las 6 cepas propuestas inicialmente para hacer los ensayos de virulencia.

#### 4.4 Estimación de la dosis subletal 95 (LD<sub>95</sub>) calculada de la cepa de referencia DSMZ

De manera preliminar, se llevó a cabo un bioensayo de virulencia para definir la dosis letal 95 (LD<sub>95</sub>) de la cepa de referencia DSMZ para conocer la dosis mínima requerida para alcanzar un 95% de mortalidad de los individuos sometidos a cinco dosis decimales seriadas (1000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ , 100 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ , 10 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ , 1 espora  $\mu\text{L}^{-1}$  y 0,1 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Una vez que se verificaron los supuestos de normalidad de los datos (Ryan-Joiner, RJ = 0,949 –  $p = 0,65$ ) y homocedasticidad (Levene = 0,80 –  $p = 571$ ) se dispuso a realizar la prueba paramétrica de Probit (Ver Anexo 2). Con los resultados arrojados por este análisis, se verificó que para alcanzar dicho porcentaje de mortalidad estimado sería necesario aplicar  $\approx 73$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$ , cuyo valor fue el que se estandarizó para continuar usándolo en los bioensayos de virulencia.

#### 4.5 Crecimiento saprófito de los hongos promisorios sobre los cadáveres de zompopas

Para corroborar de manera presuntiva que los hongos seleccionados como posibles agentes de biocontrol colonizaran el cuerpo de las zompopas blanco de interés, los ejemplares de insectos fueron colocados en cámaras húmedas, una vez que éstos murieron durante el periodo de incubación del bioensayo, y se procedió a tomar un inóculo de los mismos para observar las características morfológicas de las hifas, esporas, conidiógenos y conidióforos (Figura 20). A nivel morfológico, se corroboró que las posibles estructuras de los hongos LD10314 y 27A se relacionaron con *B. bassiana*, 30U se asoció con *M. anisopliae* y la cepa de referencia DSMZ, la cepa 29AL parece ser un posible hongo de *Paecilomyces* spp., y las cepas 30N y 29AI presentaron las características morfotípicas de hongos del género *Aspergillus* spp.



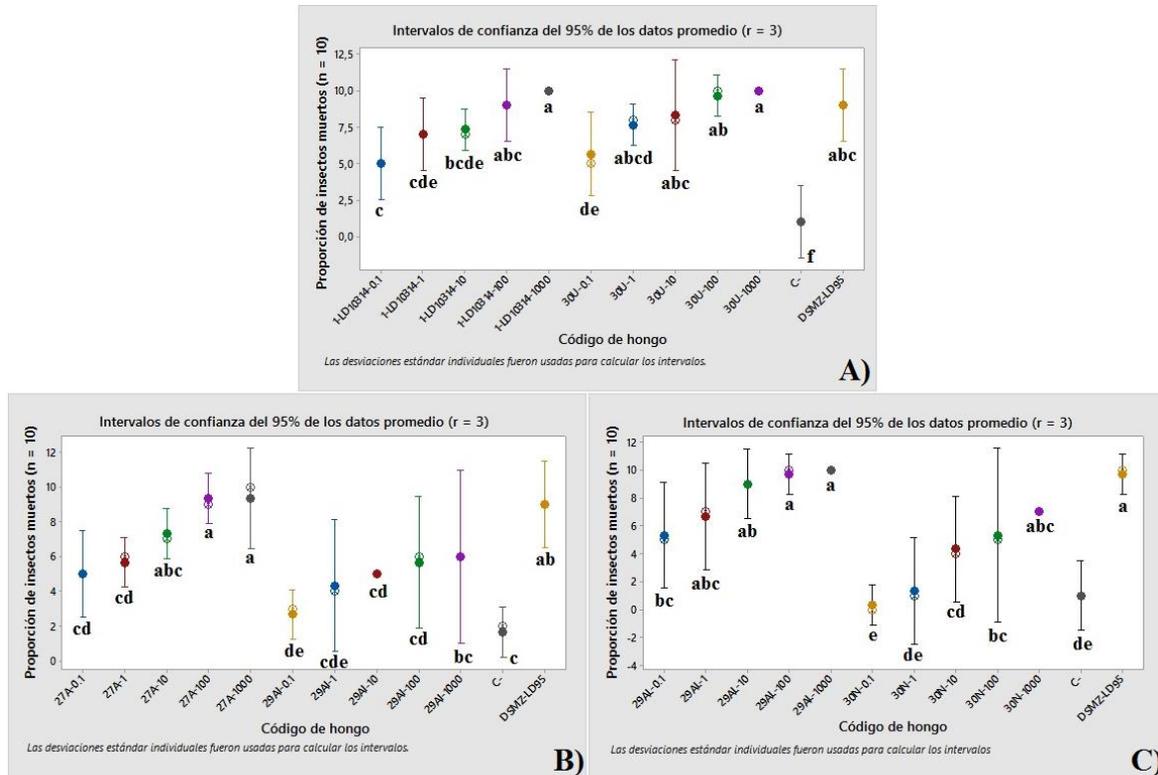
**Figura 20.** Proceso de infección contacto-dependiente de los posibles hongos entomopatógenos seleccionados por su efectividad para biocontrolar zompopas obreras de la casta forrajera de *Atta cephalotes* en los bioensayos preliminares de patogenicidad. A) Características macroscópicas del hongo utilizado como control positivo, correspondiente a la cepa DSMZ de *M. anisopliae* creciendo en medio PDA, B) crecimiento saprófito micelial y de esporas de DSMZ sobre las partes intersegmentales y aberturas externas de la zompopa, C) características microscópicas de las hifas y esporas de DSMZ (100X), D) Características macroscópicas del hongo LD10314 (posible *Beauveria* spp.), E) crecimiento saprófito micelial y de esporas de LD10314 sobre el cadáver de una obrera de *A. cephalotes*, F) características microscópicas de las hifas y esporas de LD10314 (100X), G) Características macroscópicas del hongo 29AI (posible *Aspergillus* spp.), H) crecimiento saprófito de 29AI sobre el cadáver de una obrera de *A. cephalotes*, I) características microscópicas de las hifas, esporas y esporófito de 29AI (100X), J) Características macroscópicas del código de hongo 30U (posible *Metarhizium* spp.), K) crecimiento saprófito de 30U sobre el cadáver de una obrera, L) características microscópicas de las hifas y esporas de 30U (100X), M) Características macroscópicas del hongo 29AL (posible *Paecilomyces* spp.), N) crecimiento saprófito de 29AL sobre el cadáver de una obrera, O) características microscópicas de las hifas y esporas de 29AL (100X), P) Características macroscópicas del hongo 30N (posible *Aspergillus* spp.), Q) crecimiento saprófito 30N sobre el cadáver de una obrera, R) características microscópicas de las hifas, esporas y esporófito de 30N (100X), S) Características macroscópicas del hongo 27A (posible *Beauveria* spp.), T) crecimiento saprófito de 27A sobre el cadáver de una obrera, U) características microscópicas de las hifas y esporas de 27A (100X).

#### **4.6 Grado de virulencia de los hongos entomopatógenos promisorios sobre la susceptibilidad zompopas de la subcasta cortadora de *A. cephalotes***

Se desarrolló un total de 3 corridas de bioensayos de virulencia, y en cada una se evaluaron dos cepas de posibles hongos entomopatógenos (para evaluar las 6 cepas en total) (Figura 21). Cuando se verificaron los supuestos de parametricidad<sup>23</sup> y se confirmó que había un poder estadístico igual o superior al 95% de confianza para realizar el análisis de varianza, se procedió a realizar la prueba ANOVA de una vía para comparar las diferentes dosis y cepas de hongos por corrida. En la corrida 1 (Figura 21A) se alcanzó una significancia del 100% ( $F = 25,24 - p = 0,000$ ,  $R^2 = 92,04\%$ ), lo que permitió aseverar que habían diferencias significativas entre las dosis y hongos evaluados, con una varianza dentro de grupos del  $\approx 8\%$  (derivado del resultado de la suma de cuadrados ajustados); en la corrida 2 (Figura 21B) se alcanzó una variación dentro de grupos del  $\approx 12\%$  y una probabilidad del 100% ( $F = 16,24 - p = 0,000$ ,  $R^2 = 88,15\%$ ) de que hubiesen diferencias estadísticas entre las dosis evaluadas y los códigos de hongos 29AI y 27A; y en la corrida 3 (Figura 21C) se registró una variabilidad asociada dentro de grupos del  $\approx 8,31\%$ , con una probabilidad del 100% ( $F = 23,75 - p = 0,000$ ,  $R^2 = 91,58\%$ ) de que cada tratamiento tuviera diferencias significativas. Además, en todos los

<sup>23</sup> Corrida 1 (LD10314 y 30U) → normalidad (RJ: 0,970 –  $p > 0,100$ ), homogeneidad (Levene: 0,65 –  $p = 0,765$ )  
 Corrida 2 (29AI y 27A) → normalidad (RJ: 0,997 –  $p > 0,100$ ), homocedasticidad (Levene: 0,74 –  $p = 0,691$ )  
 Corrida 3 (29AL y 30N) → normalidad (RJ: 0,986 –  $p > 0,100$ ), homocedasticidad (Levene: 1,09 –  $p = 0,408$ ).

casos el ajuste al modelo ANOVA de una vía fue mayor al 88%, por lo que se propuso realizar las pruebas posteriores de Tukey y Dunnet para determinar cuáles dosis fueron significativamente diferentes entre sí ó con respecto del control negativo.

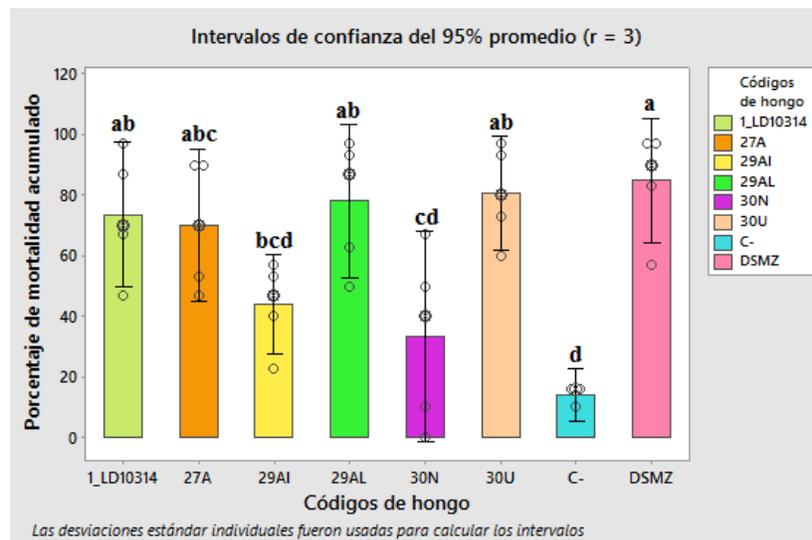


**Figura 21.** Gráficos de intervalos de confianza del 95% de la mortalidad generada por los 6 hongos más promisorios evaluados mediante bioensayos de virulencia, con los respectivos resultados del análisis *Post-Hoc* de Tukey derivado de la prueba ANOVA de una vía. Los promedios que no comparten la misma letra fueron significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ): A) gráfico de intervalos de confianza de la corrida 1 que incluyó los hongos LD10314 y 30U, B) gráfico de intervalos de confianza de la corrida 2 con los hongos 27A y 29AI, C) gráfico de intervalos de confianza de la corrida 3 con los hongos 29AL y 30N.

En el gráfico de intervalos de confianza del 95% de cada una de las corridas se reportó que en general, la dosis más elevada de todos los tratamientos (1000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ) fue estadísticamente más similar a la LD<sub>95</sub> de la cepa de referencia de *M. anisopliae*, por lo que el índice de mortandad fue proporcional a la dosis administrada. En el caso de la corrida 1 (LD10314 y 30U), cada dosis evaluada fue estadísticamente parecida entre sí, de acuerdo con las letras que se comparten en los resultados de la prueba Tukey. Pese a ello, el código de hongo 30U fue ligeramente superior a nivel del grado de mortalidad reportado; la corrida 2 muestra que la cepa 27A fue estadísticamente más similar al control positivo DSMZ que el código de hongo 29AI; y la corrida 3 parece señalar que el hongo con el código 29AL presentó un efecto en la mortalidad superior sobre las unidades experimentales seleccionadas con respecto al código de hongo 30N.

La prueba Dunnet de la corrida 3 indicó que la mortalidad natural del control negativo ( $\bar{x} = 1,00$ ) se asemejó a la mortalidad promedio de las dosis más bajas del código de hongo 30N (1 y 0,1 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}_1 = 1,33$  y  $\bar{x}_2 = 0,33$ ); en la corrida 2 se verificó que sólo la mortalidad promedio de la dosis más baja del código 29AI (0,1 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x} = 2,67$ ) fue similar al control negativo ( $\bar{x} = 1,67$ ); y en la corrida 1 ninguno de los promedios de mortalidad fueron estadísticamente similares al control negativo ( $\bar{x} = 1,00$ ), dado que los códigos LD10314 y 30U presentaron porcentajes de mortandad mínimos o superiores al 50%, hasta la dosis más baja. Adicionalmente, de la prueba ANOVA se construyeron gráficos de los valores residuales del error acumulado, y se observó que en todos los tratamientos con las dosis evaluadas se mantuvo la normalidad de los residuales porque mantuvieron el comportamiento de una campana de Gauss, así como la aleatoriedad de los mismos con base en los resultados de los gráficos de control (resultados no mostrados).

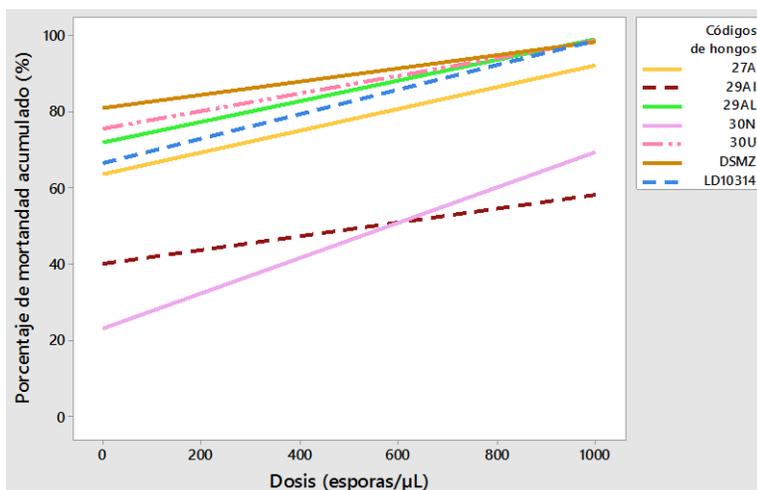
Una vez que se estimaron los valores derivados de la prueba de varianza, se hizo una comparación entre los valores porcentuales de mortalidad acumulada de los hongos promisorios probados bajo la experimentación realizada (Figura 22), y se observó que los códigos de hongos que generaron un grado de mortalidad similar a la cepa de referencia de *M. anisopliae* fueron 30U ( $\bar{x} = 80,6\%$  - IC: 61,9-99,3), 29AL ( $\bar{x} = 78,0\%$  - IC: 52,6-103,4) y LD1014 ( $\bar{x} = 73,6\%$  - IC: 49,6-97,6), respectivamente; seguidos del hongo 27A ( $\bar{x} = 70\%$  - IC: 45,0-94,9); y en menor proporción los códigos de hongo 29AI ( $\bar{x} = 44\%$  - IC: 27,4-60,6) y 30N ( $\bar{x} = 33,4\%$  - IC: -1,2-68,0), respectivamente ( $\alpha = 5\%$ ).



**Figura 22.** Gráfico de barras de los valores porcentuales de mortalidad acumulada registrado al ensayar los diferentes códigos de hongos con posible actividad entomopatogena contra forrajeras de *A. cephalotes*.

#### 4.6.1 Cuantificación de la dosis subletal de los posibles hongos entomopatógenos

Después de realizar el análisis de varianza, se procedió a hacer un gráfico de dispersión para establecer la significancia de la correlación dosis-mortalidad del total individuos evaluados con las diferentes dosis decimales (1000, 100, 10, 1 y 0,1 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de los hongos promisorios bajo el método de Spearman Rho y conocer si dicha correlación seguía un comportamiento lineal (Figura 23), antes de llevar a cabo la prueba paramétrica de Probit.



**Figura 23.** Gráfico de dispersión del índice de mortalidad porcentual obtenido al evaluar las seis posibles cepas de hongos entomopatógenos con los promedios de mortalidad de las cinco dosis ensayadas.

El gráfico de dispersión parece indicar que las cepas que alcanzaron porcentajes de mortalidad comparables con la cepa de referencia DSMZ utilizada como control positivo fueron los códigos 30U y 29AL, seguidos de LD10314 y 27A. Por su parte, los códigos de hongos que causaron menor mortalidad sobre las hormigas cortadoras de hojas fueron 29AI y 30N. Curiosamente, 30U es la cepa que morfológicamente se pareció a la cepa de referencia de *M. anisopiae*, los códigos LD10314 y 27A que generaron mortalidades similares son posibles cepas de *B. bassiana*; y 30N junto con 29AI son posibles cepas de *Aspergillus* spp. Como incentivo, los resultados de la prueba de correlación de Spearman Rho sugieren que hay una correlación superior al 70% entre las dosis de cada uno de los hongos evaluados, y los valores de correlación estimados fueron significativos:

- 1) DSMZ ( $R^2 = 0,824$ ;  $p = 0,000$ ).
- 2) 29AL ( $R^2 = 0,894$ ;  $p = 0,000$ ).
- 3) 30N ( $R^2 = 0,878$ ;  $p = 0,000$ ).
- 4) 29AI ( $R^2 = 0,697$ ;  $p = 0,004$ ).
- 5) 27A ( $R^2 = 0,910$ ;  $p = 0,000$ ).
- 6) 30U ( $R^2 = 0,875$ ;  $p = 0,000$ ).
- 7) LD10314 ( $R^2 = 0,921$ ;  $p = 0,000$ ).

Finalmente, y considerando los resultados mostrados anteriormente, se realizó la prueba de regresión de Probit para determinar las dosis subletales requeridas para alcanzar una mortalidad

del 50% sobre una colonia de hormigas forrajeras de *Atta cephalotes* (los gráficos generados de la regresión lineal se muestran en el anexo 4). Con base en el cuadro 7, recuperado a partir de los resultados generados por la prueba Probit, se determinó que todos los hongos probados y sus dosis fueron valorados como predictores confiables (valor de probabilidad de la prueba de regresión –  $p = 0,000$ ) y todas las cepas se ajustaron en más de un 50% (valor de  $p$  de Pearson  $> 0,500$ ) a esta prueba paramétrica. Una vez que se conoció que estos valores se ajustaron a este análisis, se obtuvo el cálculo de la LD<sub>50</sub> de las seis cepas seleccionadas, el cual mostró que el hongo que requiere una menor cantidad de esporas para ocasionar una elevada mortalidad fue el código 30U (posible *Metarhizium* spp.) ya que requiere la aplicación de cerca de 43 esporas mL<sup>-1</sup> para producir un 50% de mortalidad a una población de zompopas, cuyo valor se acercó bastante al reportado para la cepa de referencia DSMZ de *M. anisopliae* que alcanzó una dosis subletal de  $\approx 23$  esporas mL<sup>-1</sup>. Otros hongos que requieren dosis relativamente más altas de esporas para alcanzar un 50% de mortalidad sobre obreras de *A. cephalotes* fueron los códigos 29AL ( $\approx 118$  esporas mL<sup>-1</sup>), LD10314 ( $\approx 175$  esporas mL<sup>-1</sup>) y 27A ( $\approx 283$  esporas mL<sup>-1</sup>). Finalmente, los códigos 29AI y 30N de posibles hongos de *Aspergillus* spp. requieren de dosis de esporas en los órdenes de  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup>, por lo que no sería tan apropiado seleccionados en un proceso de formulación.

**Cuadro 7.** Valores reportados de dosis letales medias (LD<sub>50</sub>) para las 6 cepas promisorias de posibles hongos entomopatógenos para combatir hormigas cortadoras de hojas, *Atta cephalotes*.

Código de hongo	Valor de Z (regresión)	Valor de $p$ (regresión)	Valor de $\chi^2$ (Pearson)	$g.l.$ (Pearson)	Valor de $p$ (Pearson)	LD <sub>50</sub> $\pm$ SD (esporas mL <sup>-1</sup> )
LD10314	4,59	0,000	1,389	3	0,708	(1,745 $\times 10^2 \pm 2,397$ ) <sup>24</sup>
30U	4,26	0,000	0,429	3	0,934	(4,281 $\times 10^1 \pm 2,411$ )
27A	4,58	0,000	1,523	3	0,677	(2,828 $\times 10^2 \pm 2,552$ )
29AI	2,61	0,009	0,636	3	0,888	(5,564 $\times 10^4 \pm 5,063$ )
30N	6,03	0,000	4,080	3	0,253	(1,002 $\times 10^5 \pm 1,671$ )
29AL	4,89	0,000	0,660	3	0,882	(1,176 $\times 10^2 \pm 2,003$ )
DSMZ	4,18	0,000	1,661	3	0,646	(2,293 $\times 10^1 \pm 2,130$ )

#### 4.6.2 Determinación del tiempo de supervivencia de los hongos sobre obreras, *A. cephalotes*

Como paso final en la determinación de la cepa de hongo más promisorio de las seis que se seleccionaron preliminarmente, se realizó la prueba no paramétrica de Kaplan-Meier, cuyo resumen de resultados se muestra en el cuadro 8 y los gráficos de supervivencia obtenidos del análisis se

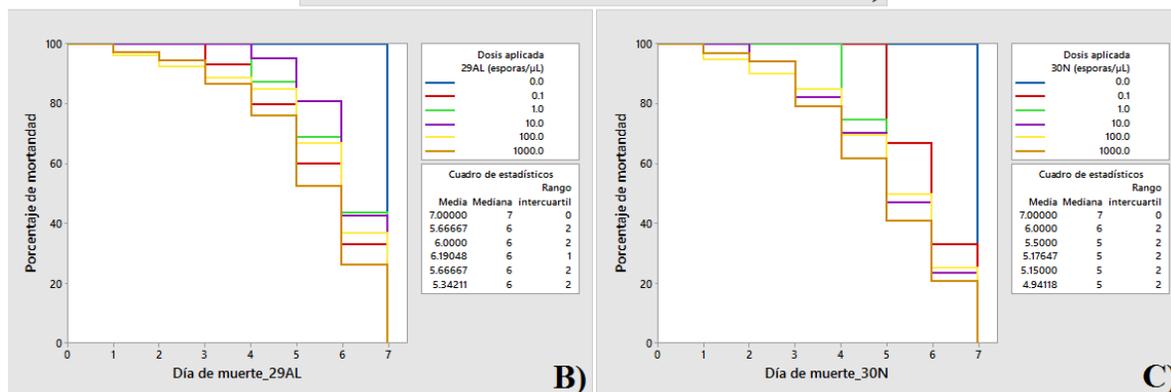
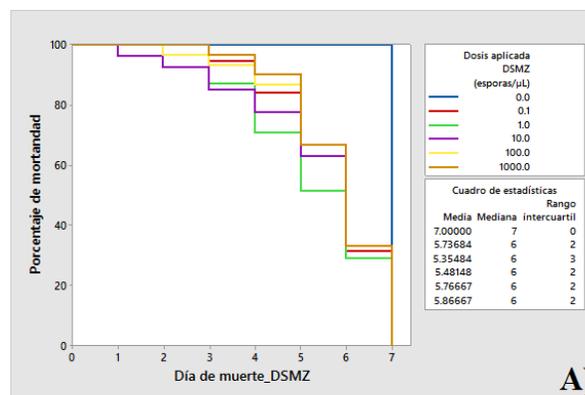
<sup>24</sup> El valor de dosis subletal marcado con color azul (30U) es el que requiere la menor cantidad de esporas en solución de Tween 80® 0,01% (v/v) para alcanzar una mortalidad del 50% de hormigas parasol en una colonia, que fue similar al valor de la cepa DSMZ de *M. anisopliae* var. *anisopliae* marcado con color naranja. Por su parte, los valores marcados con color verde (LD10314, 27A y 29AL) requieren dosis ligeramente más altas y los valores de los códigos marcados con rojo son los que requerirían las dosis más altas de esporas para poder alcanzar al menos un 50% de mortandad de obreras *A. cephalotes* dentro de una colonia (29AI y 30N).

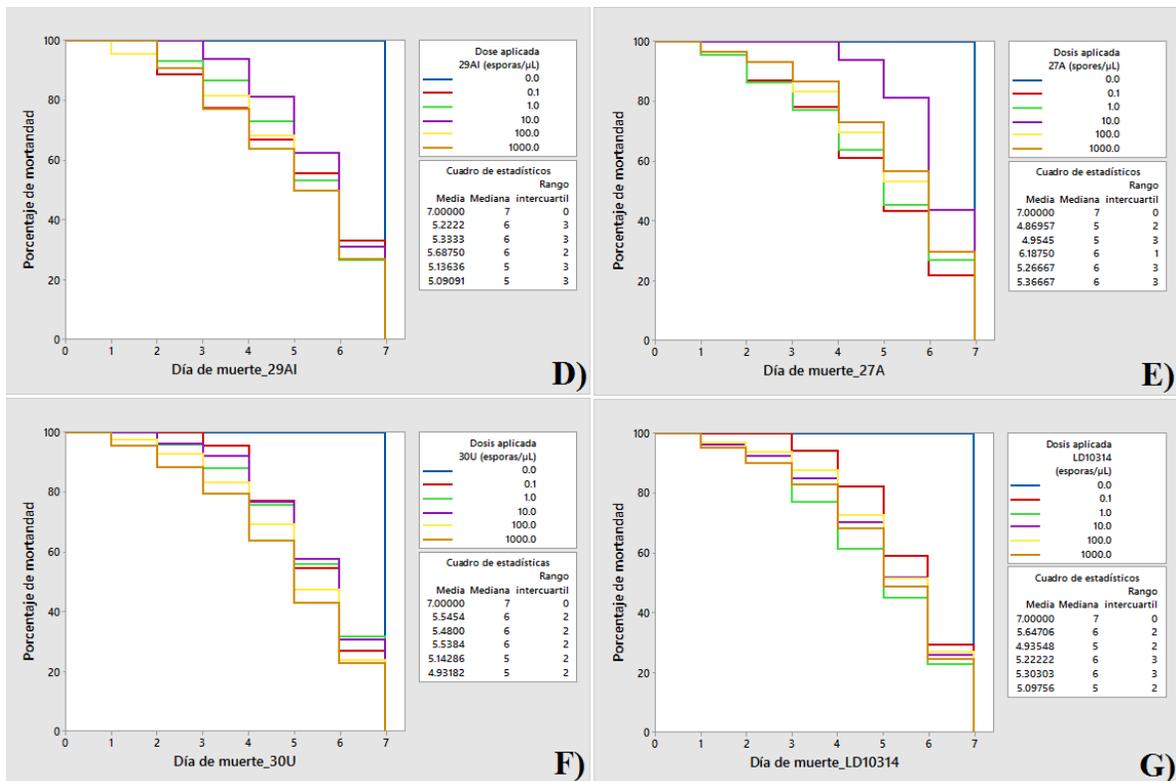
presentan en la figura 24. Asimismo, se aplicaron los métodos de Log-Rank y Wilcoxon para estimar si existían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tiempos de supervivencia medios derivados de cada cepa de hongo ensayada y los controles negativos.

Como se aprecia en dicho cuadro, ninguna de las cepas de hongos presentó diferencias estadísticas significativas entre las dosis aplicadas, bajo los métodos de Wilcoxon o Log-Rank evaluados ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, las medianas de tiempos de muerte se ubicaron en promedio entre los días 5 y 6 (Figura 24); por lo que espera que todos los individuos de una colonia de *A. cephalotes* mueran en este lapso de tiempo efectivo por efecto de los entomopatógenos ( $LT_{50} = 6$  días).

**Cuadro 8.** Tiempos de letalidad medios ( $LT_{50}$ ) de Kaplan-Meier y estimación de los valores de probabilidad para comparar los tiempos de muerte de cada dosis con de hongos con los métodos Log-Rank y Wilcoxon.

Cepa <i>Bt</i>	Tiempo subletal ( $LT_{50}$ ) promedio a 1000 esporas $\mu L^{-1}$ (días)	Valor de $\chi^2$	<i>g.l.</i>	Valores de $p$ (Log-Rank – Wilcoxon)
DSMZ	5,867	2,632 – 3,119	5	0,756 – 0,682
29AL	5,342	5,711 – 6,299	5	0,335 – 0,278
30N	4,941	2,767 – 2,851	5	0,736 – 0,723
29AI	5,091	2,063 – 2,235	5	0,840 – 0,816
27A	5,367	6,224 – 7,264	5	0,285 – 0,202
30U	4,932	4,085 – 4,543	5	0,537 – 0,474
LD10314	5,098	2,882 – 3,184	5	0,718 – 0,672

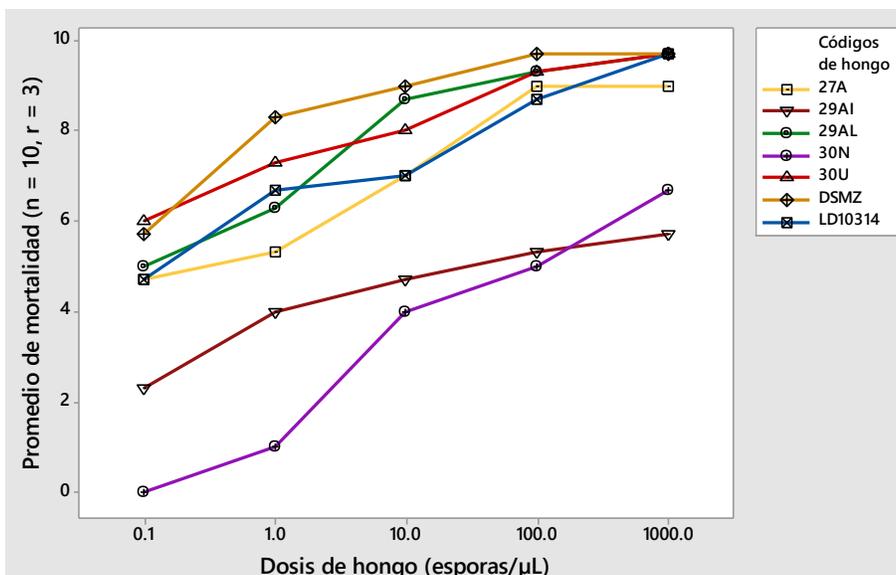




**Figura 24.** Gráficos de tiempos de supervivencia generados bajo el método no paramétrico de Kaplan-Meier, a partir de las medianas de mortalidad producidas por seis códigos de hongos bioactivos contra obreras de *Atta cephalotes*: A) cepa comercial DSMZ, utilizada como control positivo biológico, B) hongo 29AL, C) hongo 30N, D) hongo 2AI, E) hongo 27A, F) hongo 30U y G) hongo LD10314.

Si bien es cierto que las medianas de las dosis aplicadas no variaron significativamente ( $\alpha = 0,05$ ), los tiempos subletales bajaron gradualmente conforme la dosis aplicada y a nivel promedial, los códigos de hongos que alcanzaron menores tiempos de muerte a la dosis más elevada fueron 30U ( $\bar{x} = 4,932$ ) y 30N ( $\bar{x} = 4,941$ ); ya que el resto de hongos tuvieron tiempos subletales mayores de 5.

Para darle mayor valor a los resultados reportados, se creó un gráfico de interacciones para verificar que los valores de mortalidad reportados por los códigos de hongos más afines con DSMZ (30U, LD10314 y 29AL) se traslaparan en alguno de los puntos de la gráfica con el comportamiento de mortalidad acumulada producido por cepa de referencia (Figura 25). Con ayuda de este gráfico, se observó que la cepa de referencia DSMZ se cruzó en dos puntos del hongo 30U (entre las dosis 0,1 y 1000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ), además se cruzó en un punto con LD10314 y 29AL (a la dosis de 1000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ). En adición, 29AL interaccionó en varios puntos con 30U y con LD10314, y 27A sólo interaccionó con LD10314 en 3 puntos y ambas cepas presenta un comportamiento similar. Cabe señalar que los hongos 29AI y 30N, que causaron menor efecto de entomopatogenicidad, sólo interaccionaron entre sí y se cruzaron en un punto (a la dosis de 100 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ).



**Figura 25.** Gráfico de interacciones múltiples sobre la actividad entomopatógena promedio alcanzada por los seis hongos promisorios seleccionados en los bioensayos de virulencia contra zompopas de *A. cephalotes*.

Con base en los resultados finales y basado en las dosis estimadas y el valor de *p* de bondad de ajuste, el código de hongo que parece ser más efectivo a una dosis más baja para combatir hormigas cortadoras de hojas del género *Atta cephalotes* y que se podría utilizar en una próxima etapa de formulación es el código 30U (aislado de suelo asociado a la colonia), seguido de cerca por los códigos 29AL, LD10314 y 27A (aislados de cadáveres de las cámaras de desecho); y los hongos que ocasionaron menor mortalidad sobre las forrejas de *A. cephalotes* fueron 29AI (cadáveres del basurero) y 30N (obreras vivas del basurero).

## DISCUSIÓN

En la presente investigación, se evaluaron posibles patógenos facultativos (*Aspergillus* spp.) (Hughes *et al.*, 2004) y obligados (*M. anisopliae*, *B. bassiana* y las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*) (Bennet, 2007) para ser aplicados como potenciales agentes bioinfecciosos que ocasionaran alta letalidad sobre obreras susceptibles de *Atta cephalotes*. Para dicho estudio, se partió del conocimiento sobre los portales de entrada bajo los cuales actúan estos entomopatógenos: 1) las conidias de los hongos que elicitaban una enfermedad contagiosa al insecto (Kaya y Vega, 2012); y 2) las proteínas Cry de *B. thuringiensis*, que originan una infección *per os* y conducen a septicemia por efecto de toxemia<sup>25</sup>

<sup>25</sup> Toxemia de un insecto corresponde a la presencia de una gran cantidad de toxinas a lo largo del canal alimentario del hospedero y posterior invasión del resto de los tejidos.

(Vergara-Ruiz, 2004). Por consiguiente, en los siguientes párrafos se discutirán los elementos que llevaron a decidir cuán efectivos fueron las toxinas Cry o esporas de HEP probados.

Durante un proceso de fermentación de *Bacillus thuringiensis*, se deben considerar tres etapas: 1) el crecimiento de células vegetativas, 2) la transición hacia la esporulación y 3) la maduración de las esporas y posterior lisis celular (Berbert-Molina *et al.*, 2008). Tomando en consideración estos aspectos dentro de la cinética de crecimiento microbiano de este bacilo, Salazar-Magallón *et al.* (2015) evaluaron un proceso fermentativo de una cepa de *B. thuringiensis* autóctona del estado de Morelos, México, crecida en el medio de cultivo comercial HCT; y determinaron que la fase 3 de crecimiento se alcanzó hasta el día 3, con una concentración promedio de  $(1,78 \pm 0,06)$  mg mL<sup>-1</sup> de liofilizado, y un conteo de esporas resultante de  $(2,71 \times 10^8 \pm 0,79)$  UFC mL<sup>-1</sup>. Estos resultados son mayores a los reportados en esta investigación luego de recuperar el liofilizado de las 15 cepas promisorias de *Bt* y la cepa de referencia de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* (*Bti1A*), ya que el máximo valor de peso seco obtenido fueron 0,728 mg mL<sup>-1</sup> (cepa *Bt19*) y el mínimo fue de 0,212 mg mL<sup>-1</sup> (cepa *Bt19*). Sin embargo, estos resultados estarían acorde con el conteo de esporas viables si se toma en consideración que el conteo de esporas promedio obtenido por Salazar-Magallón *et al.* (2015) es superior a los conteos obtenidos en este estudio, los cuales variaron entre  $3,30 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (cepa *Bti1A*) y  $2,10 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> (cepas *Bt34* y *Bt47*) (Sección 4.1, Cuadro 2).

Los hechos que explican los motivos por los que los porcentajes de muerte acumulada alcanzados por las 12 cepas de *B. thuringiensis* menos bioactivas contra obreras de *Atta cephalotes* (*Bt19*, *Bt20*, *Bt21*, *Bt26*, *Bt27*, *Bt33*, *Bt34*, *Bt38*, *Bt40*, *Bt42*, *Bt45* y *Bt47*, Sección 4.2, Figura 12) fueron más bajo de 40% derivan de dos posibles eventos que ocurrieron en el canal alimentario: 1) hubo una sobre-expresión de las enzimas del tipo serín-proteasas (tripsina y quimiotripsina) en el mesenteron, situación que convergió en una proteólisis pronunciada sobre las proteínas Cry e indujo cambios conformacionales de la proteína, disminuyó la afinidad de la toxina para reconocer al receptor presente en las vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) o para inactivar las toxinas por el creciente grado de hidrólisis (Wilson y Cotter, 2013); ó 2) hubo una baja densidad de serín-proteinasas, que resultó en alteraciones de la composición de la batería de hidrolasas del intestino medio de las zompopas o simplemente el mesenteron de las obreras estudiadas no contó con un microambiente digestivo lo suficientemente alcalino (pH = 9.0-12.0) para producir una solubilización efectiva sobre las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Talaie-Hassanloui *et al.*, 2013).

Con cualquiera de los dos razonamientos, se podría presumir que el tamaño de las proteínas Cry se mantuvo invariable (Mandal *et al.*, 2015) o fue altamente digerido por expresión de serín-proteasas de bajo peso molecular ( $\approx 66$  kDa) (de Maagd *et al.*, 2003) en el mesenteron de aquellas zompopas que lograron sobrevivir el *post*-bioensayo, lo que conllevó a que las inclusiones cristalinas inactivas cruzaran todo el canal alimentario del insecto hasta ser excretadas en el proctodeo (Deist *et al.*, 2014). Estos argumentos irían de la mano con las observaciones de las partículas de la dieta artificial disueltas y teñidas con el colorante azul, que fueron visualizadas en el mesenteron de obreras que murieron al ser sometidas al bioensayo por 7 días – Sección 4.2.1, Figuras 13A, B y C o en la región del proctodeo en aquellas obreras que sobrevivieron el *post*-ensayo (Figuras 13C, D y E).

Los posibles motivos con los que se podría argumentar el por qué se hallaron partículas de la dieta teñidas en los individuos vivos y muertos en diferentes regiones digestivas podrían ser consecuencia del tipo y la cantidad de *enzimas digestivas* implicadas en el proceso de digestión de las zompopas, ya que estas *endoproteasas* son las variables que rigen la actividad tóxica de estos himenópteros (Deist *et al.*, 2014). Esta especulación se complementa con el estudio de Erthal Jr. *et al.* (2004), que valoraron la proteólisis del canal alimentario de obreras intermedias de *Acromyrmex subterraneus*, y determinaron que en el mismo ocurre el fenómeno llamado *acidificación progresiva*. Este proceso consiste en una disminución paulatina del potencial de hidrógeno desde el estomodeo (pH = 8.2–8.0) hasta el proctodeo (pH = 5.0–3.0); la cual está regulada por diversos grupos de hidrolasas; donde en el estomodeo (incluye el buche) y el mesenteron abundaron serín-proteasas, amino-peptidasas,  $\alpha$ -amilasas y  $\alpha$ -glucosidasas; mientras que en el proctodeo (que comprende el íleo y el recto) había mayor número de  $\alpha$ -glucosidasas,  $\beta$ -glucosidasas,  $\alpha$ -galactosidasas y  $\alpha$ -manasidasas.

La sacarosa fue uno de los componentes incorporados a la dieta, ya que las zompopas requerían de una fuente de carbohidratos para su alimentación. Por ello, se ha estudiado que las zompopas obreras poseen altos niveles de  $\alpha$ -glucosidasas en el mesenteron para digerir este disacárido y degradarlo a glucosa. Además, cuentan con quitinasas y  $\beta$ -glucosidasas en las glándulas labiales, que participan en la degradación intermedia y final de quitina y celobiosa/celulosa/olisacáridos en el jardín fúngico, respectivamente (Dowd, 1992; Schiøtt *et al.*, 2008). Las  $\beta$ -glucosidasas, junto con  $\alpha$ -galactosidasas y  $\alpha$ -manasidasas parecen acumularse en el recto de las obreras para ser liberadas posteriormente en el proceso de defecación sobre el material vegetal recién cortado y prevenir la incidencia de partículas o microorganismos contaminantes del jardín fúngico (Erthal Jr. *et al.*, 2009).

Es posible que esta última suposición explique los motivos por los que Erthal Jr. *et al.* (2004) hallaron que en obreras vivas de *Ac. subterraneus* presentaron variaciones en relación con la actividad enzimática del intestino medio de las hormigas ( $8,1 \pm 4,1$  mU mg<sup>-1</sup>), en relación con la proteólisis exhibida en el contenido del lumen del recto ( $11 \pm 3$  mU mg<sup>-1</sup>), sobre la fracción soluble de sacarosa; y presumieron que estas diferencias se deben a la proporción de  $\alpha$ -glucosidasas en estas regiones digestivas. Asimismo, hallaron actividad de aminopeptidasas y serín-proteasas en el lumen del intestino medio y el proctodeo, lo que demostró la importancia de estas hidrolasas en la digestión del material fúngico y vegetal, tanto en el intestino medio como en el fluido de las gotículas fecales.

La actividad proteolítica de 7 especies de la tribu *Attini* y algunos himenópteros de las familias *Formicinae* y *Mymicinae* también fue estudiada por Martin y Martin (1970) bajo disecciones sobre obreras vivas que incluyeron la especie *A. cephalotes* ( $n = 10$ ); y determinaron que había mayor grado de proteólisis en el recto (0,505 mg de enzimas proteolíticas zompopa<sup>-1</sup>) que en el intestino medio (0,110 mg de proteasas digestivas zompopa<sup>-1</sup>); cuyo comportamiento fue similar en el resto de hormigas *Attini*, pero difirió notablemente con respecto de las otras especies de himenópteros como *Acanthomyops claviger* (Hymenoptera: Formicinae) y *Crematogaster cesari* (Hymenoptera: Myrmicinae), que exhibieron mayor actividad proteolítica en el mesenteron (0,200 mg de proteasas digestivas zompopa<sup>-1</sup>) que en el recto ( $< 0,005$  mg de endoproteasas zompopa<sup>-1</sup>).

En ambos estudios, los autores presumieron que la principal razón que expone una mayor actividad proteolítica en el recto con respecto del intestino medio de las zompopas obreras se debe a que la mayoría de estas endoproteasas fueron desplazadas del mesenteron y se acumularon en el recto, para que en conjunto con la acidez del líquido fecal (pH = 5.0-3.0); estas hidrolasas participaran en funciones de: 1) prevención microorganismos contaminantes circundantes en el jardín fúngico, 2) limpieza del hongo simbionte y/o 3) detoxificación de metabolitos vegetales. En consecuencia, estos puntos se deben contemplar porque pudieron tener un efecto negativo sobre el liofilizado con el complejo espora-cristal de *B. thuringiensis* incorporado en dieta, y confirmarían las presunciones mencionadas anteriormente acerca de la digestión total o nula solubilización de las  $\delta$ -endotoxinas.

Por tanto, considerando la carencia de un microambiente alcalino (pH = 8.0-10.5) en el epitelio intestinal de las obreras de *A. cephalotes* debido al fenómeno de *acidificación progresiva* del sistema digestivo, así como una baja densidad de serín-proteasas que solubilizaran las proteínas Cry (Schünemann *et al.*, 2014); pudo ocurrir una baja hidrólisis intramolecular y/o activación regulada de las toxinas, así como una reducida unión a los receptores de las células epiteliales, lo que elicó

una activación proteolítica alterada de las  $\delta$ -endotoxinas (Nester *et al.*, 2002). Este proceso es lo que pudo gestar un bajo a intermedio índice de entomotoxicidad, como se obtuvo con las cepas promisorias de *Bt* (*Bt28*, *Bt29* y *Bt44*) probadas en bioensayos (Sección 4.2.2) (Erthal Jr. *et al.* 2007).

Aunque se han publicado pocos artículos acerca de la actividad entomotóxica de las  $\delta$ -endotoxinas sobre hormigas de la tribu *Attini* y sobre himenópteros en general, se discutirán los resultados más relevantes que se complementan con los experimentos de este proyecto. En primer término, Sims (1997) evaluó la aplicación de las proteínas CryIIA de *Bt* var. *kurstaki* sobre tres himenópteros adultos de abejas (*Apis mellifera*), la avispa macrónido (*Macrocentrus ancylivorus*), un bracónido parasitoide (*Meteorus pulchricornis*) y la avispa de la jalea (*Nasonia vitripennis*) ( $n = 25$ ,  $r = 6$ ) a una concentración fija de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  mediante bioensayos en dieta artificial; y mencionaron que ninguno de adultos mostró una mortalidad significativa ( $p > 0,05$ ), ya que las mortalidades asignadas a cada especie de insectos fueron de 24,3% (*Apis mellifera*), 25,8% (*Macrocentrus ancylivorus*), 50,0% (*Meteorus pulchricornis*) y 32,0% (*Nasonia vitripennis*);

Los porcentajes conseguidos por Sims (1997) parecen concordar con los obtenidos en este trabajo, dado que las tres cepas promisorias alcanzaron mortalidades acumuladas de 54,16% (*Bt28*), 45,80% (*Bt29*) y 44,45% (*Bt44*) (Sección 4.2.2, Figura 14). De hecho, ninguna de las restantes 12 cepas ensayadas a 100 y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  exhibieron mortalidades superiores al 20%; por lo que el autor explica la posibilidad de que los insectos que soportan concentraciones tan elevadas como  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  y exhiben baja mortandad, no parecen ser un riesgo ecológico para los himenópteros. Estos resultados se vinculan con un limitado número de sitios de unión a los receptores asociados a las BBMV y las constantes de equilibrio de disociación de las toxinas, que pudieron afectar el grado de especificidad para actuar en el epitelio intestinal de *A. cephalotes* (Saraswathy y Kumar, 2004); por lo que se sugiere que sólo tres de las 15 cepas de *Bt* parecen ser potenciales cepas de entomopatógenos promisorios para formulación de bioproductos contra zompopas.

Otro estudio en el que se desarrollaron bioensayos con los siguientes himenópteros: la falsa oruga del rosal (*Arge rosae*), la mosca de sierra (*Diprion pini*), la spruce sawfly europea (*Gilpinia hercyniae*) y la gregaria spruce sawfly (*Pristiphora abietina*) para evaluar la toxicidad de una cepa de *B. thuringiensis* que contenía los genes Cry5A y Cry5B a concentraciones de  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  fue Porcar *et al.* (2008). Los autores revelaron que las toxinas de esta cepa fueron bioactivas en menos de un 10% sobre *A. rosae* y *G. hercyniae* y asumieron que estos insectos no fueron susceptibles al efecto de las proteínas Cry; *D. pini* fue más sensible porque a una administración oral de  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$

se obtuvo un 40% de mortandad con una concentración subletal ( $LC_{50}$ ) de  $4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; y dicha mortalidad fue similar a la obtenida sobre los insectos de *P. abietina* (35%) que se asociaron a una  $LC_{50}$  de  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , por lo que estas toxinas pudieron ser más específicas para unirse a las BBMV.

Las concentraciones subletales reportadas por estos investigadores difieren con este estudio, exceptuando la  $LC_{50}$  que se registró para la cepa comercial *Bti1A* utilizada como control positivo biológico en todos bioensayos ( $1,28 \pm 2,667 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y alcanzó cerca del 50% de mortalidad; dado que las concentraciones subletales obtenidas para las cepas más promisorias – *Bt28* ( $5,859 \times 10^7 \pm 7,402 \times 10^5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Bt29* ( $3,170 \times 10^3 \pm 1,212 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *Bt44* ( $9,97 \times 10^1 \pm 3,895 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Sección 4.2.2, Cuadro 5) – fueron mucho más elevadas que las calculadas por Porcar *et al.* (2008); probablemente: 1) por la especificidad de las toxinas, 2) porque no se ajustaron bien a la prueba Probit y 3) porque no fueron predictores significativos como sí lo fue la cepa *Bti1A*.

Tal como se apreció en el gráfico de dispersión de las cepas más promisorias y la cepa comercial *Bti1A* empleada como control positivo (Sección 4.2.2, Figura 15) y con base en los resultados de ajuste a la prueba Probit (Cuadro 5), es probable que el comportamiento del complejo espora-cristal incorporado en el liofilizado de *Bt* no siga un comportamiento lineal, inclusive después de que los datos de  $LC_{50}$  fueran transformados a  $\log_{10}$ , y los valores de mortandad se convirtieran a valores de Probit. Este aspecto es respaldado por Wilson y Cotter (2013), quienes destacan que es común que se presenten relaciones no lineales entre la densidad del entomopatógeno y el número de infecciones esperables, dada la plasticidad fenotípica y los mecanismos de resistencia del insecto.

La concentración letal media resultante de una cepa de *B. thuringiensis* conseguida al establecer bioensayos preparados por Lingathurai *et al.* (2015), evaluar concentraciones de  $20 \times 10^3$ ,  $40 \times 10^3$  y  $80 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 4 días y estimar el grado de emergencia (que fue de  $\approx 37,9\%$  al aplicar  $80 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la mortalidad de adultos de la avispa sin aguijón (*Trichogramma chilonis*, *Hymenoptera*) ( $n = 50$ ,  $r = 3$ ) resultó en un valor de  $5,27 \times 10^1 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ); se asemeja al valor de  $LC_{50}$  calculado para la cepa *Bt44* ( $9,97 \times 10^1 \pm 3,895 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de la presente disertación.

No obstante, la tasa de muerte mencionada por estos autores difirió con los valores reportados en este estudio (Sección 4.2.2, Cuadro 5), ya que Lingathurai *et al.* (2015) mencionan que la mortalidad y la inhibición del desarrollo del parasitoide se incrementaron proporcionalmente con base en la concentración de insecticida aplicado, lo cual no se determinó en este estudio porque ninguna de las cepas exhibió un patrón constante de la dupla *concentración-mortandad*. Además, estos autores

confirmaron que la  $LC_{50}$  de la cepa de *Bt* alcanzó un valor más alto que el reportado por tres insecticidas sintéticos comúnmente utilizados para controlar a estos parasitoides: endosulfán ( $2,87 \times 10^1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), monocrotophos ( $7,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y cipermetrina ( $0,96 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); los cuales suelen ser efectivos porque actúan inhibiendo el canal de sodio, ATPasas, sistema GABA y/o receptores de acetilcolina; dado que van en detrimento y repercuten en el sistema nervioso del insecto-blanco, y podrían dar razón al que el ácido bórico  $1 \text{ mmol mL}^{-1}$  fuera tan efectivo para matar zompopas.

de Castilhos-Fortes *et al.* (2002) determinaron la concentración y el tiempo subletales de cepas de *B. thuringiensis* var. *sooncheon* y *roskildiensis* sobre un insecto social como las obreras de termitas (*Nasutitermes ehrhardti*, Isoptera) ( $n = 60$ ,  $r = 3$ ) a concentraciones decimales de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; y de los 55 aislamientos adquiridos de las termitas, se hizo un *screening* de 7 posibles agentes bio-infecciosos: *Bt* var. *sooncheon* ( $Bts = 100\%$ ), *Bt* var. *roskildiensis* ( $Btr = 100\%$ ), *Bt* var. *yunnanensis* ( $Bty = 71,4\%$ ), *Bt* var. *huazhongiensis* ( $Bth = 57,1\%$ ), *Bt* var. *brasiliensis* ( $Btb = 52,3\%$ ), *Bt* var. *colmeri* ( $Btc = 42,85\%$ ) y *Bt* var. *kurstaki* ( $Btk = 27,57\%$ ). Las  $LC_{50}$  estimadas en un periodo de 7 días para las cepas *Bts* ( $5,14 \times 10^5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *Btr* ( $1,68 \times 10^8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) son comparables con las calculadas para las cepas *Bt28* ( $5,859 \times 10^7 \pm 7,402 \times 10^5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *Bt29* ( $3,170 \times 10^3 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

El estudio más representativo sobre zompopas en el que se aislaron cepas de *B. thuringiensis* a partir de obreras de *Acromyrmex crassispinus* y *Ac. lundii* para combatir *Ac. lundii* ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ) fue realizado por Pinto *et al.* (2003) mediante bioensayos en dieta semi-sólida (glucosa al 5%, peptona bacteriológica al 1%, extracto de levadura al 0,1% y 1,5% agar bacteriológico) o líquida (con los mismos componentes, pero sin agregar agar). A partir de  $1-125 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  inóculos de cada cepa que confirmaron la presencia de las toxinas Cry1 y Cry9, evidenciaron que las zompopas adquirieron una longevidad promedio de 7,5 días en la dieta líquida, con la que se alcanzó mejores resultados.

Independientemente de la baja variabilidad, ambas preparaciones de dieta permitieron detectar 3 cepas que alcanzaron mortandades de 50% (genes *cry* no detectados), 80% (gen *cry1*) y 100% (gen *cry9*); mientras que los restantes 6 aislamientos probados presentaron mortalidades de 12,5-42,8% hasta el día 17 de evaluación. Aunque estos investigadores no reportan valores de concentración ni tiempo subletales de las cepas ensayadas, los porcentajes de mortalidad acumulada están acorde con los resultados de este trabajo, dado que el 80% (12 cepas) de las 15 cepas asignadas como entomopatógenos prometedores obtuvieron menos de 35% de mortalidad (Figura 15), cuyo porcentaje se encuentran dentro del intervalo de mortalidad mencionado por Pinto *et al.* (2003), y las 3 cepas que alcanzaron entre 44,45 y 54,16% (*Bt28*, *Bt29* y *Bt44*) representan un 20% del total

de cepas probadas; similar al 21,43%, representado por las 3 cepas de *Bt* (de 14 en total) que alcanzaron más de 50% de mortandad en los bioensayos desarrollados por estos investigadores.

Con respecto al tiempo subletal, Azizoglu *et al.* (2015) indagaron la mortalidad de hembras de la avispa parasitoide de huevos de lepidópteros (*Trichogramma evanescens*, *Hymenoptera*) a una concentración de 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de la mezcla espора- cristal de *Bt* subs. *kurstaki* mediante bioensayos ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ) y calcularon una longevidad promedio de los individuos de 6,3 días; cuyo valor no fue significativo en relación con el control negativo (7,5 días,  $t = 0,977 - p = 0,341$ ). A pesar de que la concentración utilizada en este estudio es 5 veces más grande que la concentración más alta aplicada en este estudio, los  $LT_{50}$  calculados para las cepas de *Bt* más promisorias (*Bt28*, *Bt29* y *Bt44*) se relacionan con la longevidad reportada, ya que la mayoría de las medianas estimadas se ubicaron entre los días 5 y 7, indiferentemente a la concentración usada (Sección 4.2.3, Figura 16, Cuadro 6).

Otros resultados complementarios derivan de la publicación de Castilhos-Fortes *et al.* (2002), además de la  $LC_{50}$  que calcularon sobre las obreras de termitas (*Nasutitermes ehrhardti*, *Isoptera*) para cada concentración de las cepas promisorias de *Bts* y *Btr* utilizando concentraciones de  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , también estimaron que los  $LT_{50}$  asociados con estas cepas fueron de 4,23-14,67 días para la cepa *Bt* var. *sooncheon* y se ubicaron entre 4,54–12,17 días para *Bt* var. *roskildiensis*. Los resultados presentados por estos científicos se ubican dentro del rango de índices de tiempo de muerte demostrado en este estudio, ya que los valores de  $LT_{50}$  calculados a partir de las  $LC_{50}$  con las 3 cepas de *Bt* más promisorias fueron de 5 días (*Bt28*) y 6-7 días (cepas *Bt29* y *Bt44*) (Cuadro 6).

Se han propuesto mecanismos de resistencia que insectos como las hormigas podadoras podrían exhibir para soportar el efecto de toxinas Cry, y se ha comprobado que las proteínas Cry han requerido modificar su estructura para mejorar su afinidad a los receptores del epitelio (Jisha *et al.*, 2013). Una de las principales ideas que pudieron conducir a una tolerancia por parte de las zompopas fue su capacidad para reparar células dañadas en el mesenteron; cuya evidencia es presentada por Cruz-Landim y Costa-Leonardo (1996). Estos autores analizaron cortes del mesenteron de termitas obreras (orden *Isoptera*) con microscopía electrónica de transmisión y averiguaron que las células columnares deterioradas de la lámina basal epitelial sufrieron procesos de continua diferenciación y fueron reemplazadas por células producidas *de novo*, con ayuda de vacuolas autofágicas que únicamente dejaron restos de debris en el lumen. Por lo tanto, considerando que las termitas y las hormigas parasol son insectos sociales que tienen comportamientos higiénicos parecidos, es posible que en los 12 aislamientos de *Bt* que tuvieron una

bioactividad tóxica reducida, las obreras tuvieron la capacidad de renovar rápidamente las células necrosadas, limitando así el efecto de las  $\delta$ -endotoxinas incorporadas en la dieta (Obata *et al.*, 2015).

Con estos supuestos, han surgido teorías sobre los *factores de virulencia* que poseen las toxinas de *Bt* para invadir el mesenteron de los insectos (Argôlo-Filho y Loguercio, 2014), y evitar que el insecto bloquee alguno de los pasos del mecanismo de infección *per os* de *Bt*: 1) la auto-renovación de las células epiteliales modulada por la inducción de un deterioro celular, es inhibida por las *enhancinas* y quitinasas de *Bt* para superar el epitelio; 2) la hidrólisis excesiva de las toxinas, mediada por las endoproteasas y la biosíntesis de péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés *antimicrobial peptides*), son mermadas a través de bacteriocinas de *Bt* (Engel y Moran, 2013; Griffiths y Aroian, 2005; Shishir *et al.*, 2014); 3) la respuesta inmune humoral que se activa cuando el patógeno alcanza el hemocele y que resulta en la producción de hemocitos circundantes o el secuestro de las proteínas Cry por fracciones de glicolípidos o esterases (Pardo-López *et al.*, 2012), requiere la secreción de metaloproteasas InhA1 e InhA2 para brindar protección a las  $\delta$ -endotoxinas (Harrison y Bonning, 2010; Raymond *et al.*, 2010); y 5) la reducida unión de las toxinas a las BBMV por modificaciones de estructura o a una baja expresión de los receptores proteicos tipo cadherina, fosfatasa alcalina, aminopetidasa-N o el transportador ABCC2, suele requerir que la modificación estructural de las proteínas Cry para que éstas sean más afines a las BBMV (Bravo *et al.*, 2012; Griffiths y Aroian, 2005).

No obstante, es posible que estos mecanismos de respuesta de las proteínas Cry no se hayan presentado en la mayor parte de los aislamientos de *B. thuringiensis*, por lo que se podría sugerir que cuando el liofilizado conteniendo el complejo espора-cristal fue ingerido por las obreras: 1) las  $\delta$ -endotoxinas no fueron específicas, lo que resultó en la unión inapropiada en los receptores de la membrana epitelial; o 2) sí fueron activadas por las proteasas digestivas, pero el sistema inmune del himenóptero fue elicitado cuando las células epiteliales fueron afectadas por la apertura de poros líticos en la membrana, estimulando la auto-renovación de estas células; mientras que de manera análoga 3) se sobreexpresaron las proteasas digestivas o AMPs del insecto para catalizar y eventualmente inactivar las  $\delta$ -endotoxinas; ó 4) se produjo el secuestro de las proteínas Cry por los lípidos ubicados en el lumen (Engel y Moran, 2013; Pardo-López *et al.*, 2012), que interfirieron en la interacción toxina-receptor. Dada esta explicación, es posible que el efecto del extracto de *Bt* haya sido mermado y parte de los resultados generados de los bioensayos no fueron tan promisorios.

Pese a que en las últimas décadas se han secuenciado más de 700 genes *cry* que codifican para  $\approx 73$   $\delta$ -endotoxinas que se podrían utilizar en biocontrol, son pocos los grupos de proteínas Cry capaces

de actuar sobre el orden *Hymenoptera*, ya que la mayoría de toxinas reconocidas contra insectos de este orden han sido dilucidadas y evaluadas como protoxinas para combatir hormigas de fuego (*Solenopsis invicta*), zompopas (*Ac. lundii*), abejas (*A mellifera*) y otros himenópteros parasitoides. Estas proteínas incluyen Cry1, Cry3A, Cry5A, Cry5B, Cry9 y Cry22A (Palma *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2003; Porcar *et al.*, 2008 y van Frankenhuyzen, 2013); y no se tiene certeza de los sitios de unión de las protoxinas a los receptores de las BBMV de la membrana epitelial, a pesar de que se ha propuesto que estos sitios corresponden a las proteínas del tipo cadherina, aminopeptidasa-N y fosfatasa alcalina; cuyas proteínas actúan sobre el orden Lepidoptera (van Frankenhuyzen, 2013).

Algunos elementos que se deben contemplar cuando un grupo de insectos se prueba en bioensayos con dieta artificial y se exponen a concentraciones diferenciales de *B. thuringiensis*, es que tanto 1) el tiempo de exposición a la especie de *Bt* ensayada, 2) el sustrato incorporado en la dieta y 3) la concentración del complejo espора-cristal; son factores que pueden incidir en una mayor tolerancia del insecto hacia las toxinas, así como en la prevalencia y reducción de unidades formadoras de colonias sobre los insectos susceptibles (Kondo *et al.*, 1995). Este fenómeno fue analizado por Ben-Dov *et al.* (2003), quienes sometieron larvas del mosquito del dengue (*Aedes aegypti*, Diptera) sobre diferentes sustratos y concentraciones diferenciales de *Bt* subs. *israelensis* y larvas de la plaga conocida como rosquilla negra (*Spodoptera littoralis*, Lepidoptera) con otros sustratos o dieta semisólida y concentraciones de *Bt* subs. *kenyae*; y encontraron un comportamiento anómalo sobre la mortalidad ocasionada en estos individuos debido a la presencia de diversos tipos de partículas añadidos en la dieta (nutricionales, atrayentes y no nutricionales), que promovieron la dilución de unidades formadoras de colonias y se inhibió la alimentación de los insectos al final del bioensayo.

Los autores destacan que esta situación pudo ser el resultado de que las partículas ingeridas por el insecto-blanco ejercieron un efecto protector sobre el epitelio del intestino medio en el momento en que las  $\delta$ -endotoxinas ingresaron en el tracto gastrointestinal; ya que tales partículas pudieron cubrir la superficie donde se localizaban las células epiteliales, previniendo que las protoxinas Cry alcanzaran los receptores de las BBMV y anulando así su efecto entomotóxico. Otra limitante que también comentan es que la presencia de las partículas nutricionales comúnmente incrementa el contenido de endoproteasas digestivas en el intestino medio, las cuales participan activamente en el proceso de digestión, pero también pudieron sobredegradar las toxinas agregadas en la dieta.

También se han hecho planteamientos a nivel genético para exponer los métodos empleados por un orden de insectos para tolerar un patógeno microbiano que actúe bajo infección *per os* como *B.*

*thuringiensis* (Landa *et al.*, 1991) y se han distinguido biotipos resistentes en una colonia de insectos; donde influye el flujo de genes de resistencia, cuyo componente podría mejorar el desarrollo de resistencia de un insecto según el patrón de movilización exhibido por las poblaciones y los posibles cruces entre insectos susceptibles con insectos resistentes en áreas tanto tratadas como no tratadas con preparaciones de proteínas Cry (Cory y Franklin, 2012), como las que añadieron del liofilizado.

La estrategia frecuentemente utilizada por las plagas en campo para favorecer la resistencia a un biocida que incorpore *Bt*, así como reducir la presión de selección y disminuir el crecimiento de las poblaciones resistentes se conoce bajo el término de *dosis elevadas/ refugio estructurado*, que se basa en modelos teóricos y experimentales de poblaciones de insectos, y asume lo siguiente: 1) los genes de resistencia se presentan en una baja frecuencia dentro de una población; 2) las cantidades de toxinas aplicadas en campo son lo suficientemente altas para eliminar el 95% de una población de individuos no resistentes; y 3) los individuos resistentes se cruzan con insectos susceptibles que nacen en zonas de refugio; un sitio donde la plaga se puede propagar y mantener su hábitos alimeticios (Machado y Fiúza, 2009). En consecuencia, comprender *a posteriori* la estructura genética y el comportamiento de las obreras al someterlas a concentraciones específicas del complejo espora-cristal *Bt* incorporado en un cebo sería un aspecto imprescindible si se decide introducir este bioproducto en programas de manejo integrado de plagas (MIP) y control biológico.

La aplicación directa de hongos entomopatógenos (HEP) sobre plagas agrícolas que poseen un comportamiento claustral como las hormigas cortadoras de hojas ha sido todo un reto debido a la logística implicada en la introducción de conidias dentro de las colonias, así como la respuesta conductual de alarma y respuesta inmediata a través del comportamiento higiénico que realizan los individuos infectados para remover las esporas y la evitar el ingreso de una infección sobre los miembros que habitan el nido (Baverstock *et al.*, 2010). Conforme a ello, en este proyecto se realizó una selección preliminar inicial que incluyó un set de 30 hongos de la colección aislados de *Atta colombica*, cuyas cepas de hongos tenían características de entomopatógenos generalistas (*M. anisopliae* y *B. bassiana*) o agentes casuales (*Aspergillus*); para establecer un *screening* inicial y determinar aquellos que alcanzaran una patogenicidad igual o superior a 90% (Shah *et al.*, 2007).

La razón inicial por la que se evaluaron 30 hongos aislados de colonias de *A. colombica* fue probar la *patogenicidad* preliminar de hongos aislados de los jardines fúngicos donde habitan las zompopas (Shapiro-Ilan, 2005); ya que en dichos jardines suelen encontrarse un complejo multiespecífico de microhongos que poseen hifas septadas, no septadas, ramificadas, no ramificadas, de color y grosor

variable. Los mismos pueden ser beneficiosos o patógenos para la colonia, y en este caso, las cepas ensayadas podrían ser posibles entomopatógenos de zompopas (Abril y Bucher, 2007).

Los estudios acerca de la comparación de toxicidad reportada por una colección de hongos para el biocontrol de himenópteros fue valorada por Merino *et al.* (2007), quienes analizaron la entomopatogenicidad de 59 cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* nativas de la región de Bío-Bío, Chile sobre la avispa “chaqueta amarilla” (*Vespula germanica*, Hymenoptera) ( $n = 10$ ,  $r = 6$ ), para discriminar aquellos hongos que causaran mortalidades dentro del percentil 90, y con estas cepas promisorias se estableció un bioensayo para calcular la LD<sub>90</sub> con dosis variables desde 0–10<sup>5</sup> esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ . En ese proyecto, estimaron que sólo 2 cepas de *B. bassiana* superaron el percentil 90 ( $p < 0,05$ ) y alcanzaron 95 y 79% de mortandad sobre los individuos; mientras que ninguna de las cepas de *M. anisopliae* alcanzó este percentil, por lo que esta especie se descartó en los ensayos de virulencia.

El método de selección de los microhongos más promisorias difirió del método que se utilizó en este trabajo, dado que las cepas prometedoras fueron elegidas, partiendo de aquellos aislamientos que alcanzaron más de 90% de mortalidad sobre las obreras de *A. cephalotes*, y cuyo número de hongos fue 6 (Sección 4.3, Figura 17), con respecto a las únicas 2 cepas elegidas por Merino *et al.* (2007); cuyos autores asumen que las diferencias en el grado de patogenicidad de un stock de hongos son atribuidas a las variaciones genéticas dadas por la especificidad del agente biocida hacia un determinado orden de insecto y el origen geográfico de la cepa (Rodríguez *et al.*, 2006).

Parte de los razonamientos que explican las diferencias en la patogenicidad de los 6 aislamientos que alcanzaron más de 90% de mortandad (LD10314, 27A, 29AI, 29AL, 30N y 30U) sobre las zompopas obreras en comparación con los restantes 24 códigos de hongos (Sección 4.3, Figura 18); cuyas mortalidades fueron variables y presentaron intervalos de mortalidad más amplios derivan de la baja especificidad y agresividad de las conidias implicadas en el proceso de infección de estos 30 biotipos de hongos ensayados a nivel de exoesqueleto. La microarquitectura de la cutícula, además de estar compuesta por quitina, células epidérmicas y otras secreciones proteicas (Headrick, 2009); la superficie cuticular incluye lípidos, toxinas antifúngicas, hidrocarburos, péptidos antimicrobianos (AMPs), inhibidores de proteasas y de quitinasas, y compuestos fenólicos. Los mismos previenen el ataque de esporas infectivas y la penetración de esporas de HEP a través de procesos conocidos como la melanización y el endurecimiento del tegumento (De Crecy, 2012).

La melanización de los tejidos es una de las respuestas innatas de los insectos, que se gesta una vez que el individuo adquiere una herida/laceración e involucra la inclusión de melanina, ácidos grasos e hidrocarburos en los tejidos. Por tanto, la respuesta inmune producida permite proteger los tejidos internos del insecto contra HEP externos porque 1) se inhibe la germinación de las conidias y las enzimas proteolíticas del hongos; 2) se promueve el endurecimiento del exoesqueleto del hospedero, que ayuda al insecto soportar condiciones de desecación; 3) se incrementa la tolerancia del insecto a la penetración mecánica de hifas y a la acción de enzimas fúngicas que digieren las capas cuticulares, por lo que el microorganismo limita el consumo energético de los nutrientes del insecto (Wilson y Cotter, 2013); y 4) la producción de melanina citotóxica inducida por la activación de la *fenoloxidas*a en su forma proactiva de *fenolidasa*, junto con supproductos intermediarios (ej: quinonas), contribuyen a controlar u ocasionar la inhibición de estos HEP (Gillespie *et al.*, 1997)

A pesar de que la naturaleza hidrofóbica de los lípidos epicuticulares es un sustrato apropiado para la adhesión de las esporas en la superficie del hospedero, se ha hipotetizado que las adaptaciones de los insectos para modificar el contenido de lípidos en la capa cerosa del exoesqueleto también podrían inhibir el proceso de adhesión de un propágulo de esporas y por ende, incidir de manera negativa en el proceso de patogénesis (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Otro componente de importancia del tegumento en insectos sociales son los hidrocarburos cuticulares (CHC, del inglés *cuticular hydrocarbons*); los cuales son grupos de alquenos y dimetil-alcanos que cumplen funciones como mantener la flexibilidad de los individuos, ser barreras para tolerar la desecación (Tsutsui, 2015), estimular señales bioquímicas para reconocer la casta y prevenir infecciones microbianas a través del aseo higiénico, en especial la cabeza y el abdomen (Sumana y Starks, 2004).

Un efecto que incidió en las diferencias de toxicidad exhibidas por las 30 cepas de hongos ensayadas a través de bioensayos miniaturizados en tubos tipo *ependorf* corresponde a la presencia de quinonas, pigmentos *difenoles*, residuos de *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (quitina), *N*- $\beta$ -alanildopamina y la actividad de la *polifenol oxidasa* (sintetiza quinonas) (Wilson-Rich *et al.*, 2009); los cuales promueven el oscurecimiento y la esclerotización de los tejidos cuticulares (Evans, 1988; Merzendorfer y Zimoch, 2003). La composición de la cutícula esclerotizada suele ser variable en los diversos órdenes de insectos, particularmente en insectos sociales como las zompopas; que al estar divididos en subcastas, presentan variaciones estructurales a nivel del tegumento (Jurenka, 2008).

Otro mecanismo que también pudo influir sobre los microhongos probados fue la inmunidad celular conducida por los AMPs que se activan en la hemolinfa – que aplicaría para aquellas conidias que

germinaron y superaron la cutícula – y son sintetizados por células de grasa, aunque también se producen en menor medida por los hemocitos; por lo que actúan a través de la ruptura de la membrana celular y/o la detención de la síntesis de ADN (Parisien *et al.*, 2008). En insectos sociales predominan los hemocitos de los tipos prohemocitos, granulocitos y plasmocitos (de Souza, 2008); que actúan mediante mecanismos de inmunidad celular para curar y coagular heridas, así como para participar en procesos de nodulación (agregados de plasmocitos) y encapsulamiento (ocurre diferenciación de células aplanadas llamadas lamelocitos) (Wilson-Rich *et al.*, 2009); sin embargo, para conocer a detalle estos mecanismo sería apropiado hacer pruebas a nivel del hemocele.

Por ejemplo, la actividad de los AMPs probada por de Souza (2008), luego de inyectar el hemocele de adultos de la hormiga carpintera (*Camponotus fellah*, Hymenoptera) ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ) con 0,5  $\mu\text{L}$  de peptidoglucanos aislados de *Saccharomyces cerevisiae* y disueltos en solución Ringer al 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  ó únicamente solución Ringer para insectos (control negativo); reportó una fuerte respuesta antibacteriana elicitada por los AMPs de los insectos afectados por *S. cerevisiae* en el día 4 del ensayo; y a pesar de que no se distinguieron diferencias significativas con el control negativo ( $p > 0,05$ ), éste no reportó la presencia de péptidos bactericidas a niveles detectables, los cuales sí fueron reconocidos sobre las unidades experimentales sometidas al efecto de *S. cerevisiae*. Este investigador supone que una de las razones por las cuales no hubo diferencias entre ambos tratamientos es porque los AMPs son un mecanismo eficiente, pero inespecífico de respuesta de defensa inmune, por lo que la respuesta de estos péptidos no suele ser fácilmente reconocible.

Con base en estos planteamientos que afectan la patogenicidad, es probable que las esporas de hongos 30U, 27A ( $\bar{x} = 100\%$  c/u), LD10314 ( $\bar{x} = 97\%$ ), 29AL, 30N ( $\bar{x} = 93\%$ ) y 29AI ( $\bar{x} = 90\%$ ) hayan sido diferencialmente más patogénicas y lograron un mayor impacto en superar de exitosamente la primera barrera física cuticular y entrar al hemocele de las obreras de *A. cephalotes*; con respecto de los restantes 26 hongos probados (Sección 4.3, Figura 19). Otras cepas que presentaron cierto efecto de biocontrol significativo ( $p < 0,05$ ) sobre las zompopas con más de 70% de mortandad fueron 28AQ ( $\bar{x} = 87\%$ ), 29AC ( $\bar{x} = 77\%$ ), 29P, 28I, 28AM ( $\bar{x} = 73\%$  c/u), 29N, 29BB y 29AB ( $\bar{x} = 70\%$ ); pero es posible que las interacciones espора-cutícula no fueron tan estables y no tuvieron tanta afinidad hacia la cutícula para superar las capas epidérmicas y alcanzar la hemolinfa (Jurenka, 2008); en relación con los seis HEP promisorios seleccionados.

El análisis morfológico de los 6 biotipos de hongos con los códigos LD10314, 27A, 29AI, 29AL, 30N y 30U permitió definir posibles cepas de *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Aspergillus* (Sección

4.5, Figura 20). Tres de los cuatro géneros de ascomicetes identificados morfológicamente se ubican dentro de la clase *Hyphomycetes*, mientras que *Aspergillus* (29A1 y 30N) es el único género variable que pertenece a la clase *Coelomycetes* (Srivastava *et al.*, 2009). El hecho de que los 6 posibles entomopatógenos reconocidos se ubiquen dentro del *Phylum Ascomycota* es relevante porque los ascomicetes son el grupo taxonómico más grande (300 000 hongos) que presenta una ecología más diversa que el *Phylum Entomophthoromycota*, debido a que se los primeros pueden aislar de materiales en descomposición, suelo, endófitos de plantas y animales; por lo que hay una gran probabilidad de que la mayor parte de los 30 hongos filamentosos ensayados en esta investigación correspondan al grupo de microhongos ascomicetes (Araújo y Hughes, 2014).

Parte de los géneros reconocidos en esta investigación (formalmente *Metarhizium* y *Beauveria*) se han probado en formulación como insecticidas comerciales debido a: 1) alta letalidad comprobada, 2) especificidad de las conidias infectivas estables que actúan por contacto sobre el insecto-blanco y 3) baja o carente peligrosidad hacia insectos no-blanco de otros órdenes y mamíferos dentro de un agroecosistema (De Crecy, 2012). Cabe señalar que estas especies de HEP han sido confirmadas como agentes de biocontrol de hormigas podadoras, aspecto que representa un 33,33% de las 12 especies genéricas más reconocidas como hongos que regulan el 80% de poblaciones de insectos agronómicos; las cuales también incluyen a los hongos *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophtora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Lecanicillium*, *Rhizopus*, *Cordyceps*, *Culicinomyces*, *Nomurea*, *Gliocardium* y *Pochonia* (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011).

En la búsqueda de literatura relacionada con el aislamiento de hongos de colonias de zompopas, himenópteros u otros grupos de insectos sociales; Rodrigues *et al.* (2010) reportaron el crecimiento saprófito de los ascomicetes *Aspergillus candidus* (1 aislamiento, prevalencia de 0,7%), *A. flavus* (42, 30,7%), *A. ochraceus* (1, 0,7%), *A. versicolor* (1, 0,7%), *Metarhizium anisopliae* (3, 2,1%) y *Paecilomyces lilacinus* (4, 3%)<sup>26</sup>; a partir de una muestra de 100 cadáveres de obreras de la hormiga loca (*Paratrechina longicornis* Latreille, Hymenoptera, Formicidae) recolectadas de dos colonias y mantenidas en cámaras húmedas. Estos autores proponen que el perfil fúngico de las diversas especies de hongos identificados sugiere que estas cepas son componentes transitorios del

---

<sup>26</sup> Además, Rodrigues *et al.* (2010) reconocieron otros hongos como *Acremonium* spp. (1 aislamiento), *Cladosporium* spp. (25), *Geotrichum* spp. (3), *Monilia* spp. (4) y *Penicillium* spp. (32) de 117 aislamientos.

microbioma de obreras, y lo notable de este reporte es que se asocia con la mayoría de posibles patógenos reconocidos taxonómicamente en la presente investigación.

Asimismo, Pereira (2014) estableció una colección de HEP de forrajeras de *A. sexdens* y *A. laevigata* asociadas al jardín fúngico, suelo circundante al nido y cámaras de basura; donde asumieron que estos agentes microbianos perjudiciales de zompopas se alojaron en estos sustratos, dado que en los mismos suele acumularse una gran cantidad de nutrientes y materia orgánica en descomposición (Lacerda, 2008). Mediante análisis morfológicos, Pereira (2014) detectó que en *A. sexdens* había presencia de *Metarhizium* spp. (15), *Aspergillus flavus* (3), *Acremonium* spp. (2), *Aspergillus* spp. (2), *Colletotrichum* spp. (1) del total de 23 cadáveres con crecimiento saprófito; mientras que en *A. laevigata* detectó *Mucor* spp. (8), *Aspergillus flavus* (1), *Fusarium solani* (3) y *Aspergillus niger* (8) de los 20 individuos que presentaron un crecimiento saprófito luego de un proceso de desinfección; donde prevaleció la presencia de *Metarhizium* spp. en *A. sexdens* y *Aspergillus niger* y *Mucor* spp. en las operarias infectadas de *A. laevigata*. La presencia de *Metarhizium* y *Aspergillus* en colonias de zompopas está acorde con el trabajo presentado, por lo que se podría presumir en el género *Atta* estos microhongos parásitos son concurrentes en los nidos de hormigas parasol.

El primer estudio que reporta la incidencia de *Aspergillus* spp. (33,33% de los 6 HEP seleccionados) es el de Ribeiro *et al.* (2012), quienes determinaron una alta proporción de especies de *Aspergillus* spp. (especialmente *A. ochraceus*) de 100 obreras de *A. bisphaerica* evaluadas en 3 colonias (44 brotes); de las cuales se reportó por primera vez actividad entomopatógena de esta especie en un 14,67% de los individuos evaluados, seguido de una proporción más baja de otros HEP como *B. bassiana* (0,33%) y *A. niger* (0,33%). Por ello, dicho estudio sugirió que a pesar de que estas hormigas fueron sometidas a condiciones de estrés como el aislamiento social, *A. ochraceus* ocasionó una mortalidad considerable y un tiempo de muerte medio significativamente bajo (prueba Log-Rank:  $\chi^2 = 42,27$ ,  $P < 0,001$ ), particularmente con la dosis de  $1 \times 10^6$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$  ( $\text{LT}_{50} = 4$  días). La dosis probada de *A. ochraceus* es más elevada que la empleada en ensayos de patogenicidad establecidos en este trabajo ( $1 \times 10^4$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$ ), sin embargo se complementa porque es el primer reporte de *Aspergillus* spp. como hongo entomopatógeno, que concuerda con dos aislamientos (29AI y 30N).

Por otra parte, la ocurrencia de *Paecilomyces* spp. en zompopas (29AL, representa un 16,67% de los posibles HEP elegidos); fue reconocida por Rodrigues *et al.* (2010) Miranda-Duarte (2010) y Torres-Barragán *et al.* (2004), quienes observaron el crecimiento saprófito de este microhongo en el interior de reinas recién fertilizadas de *Atta capiguara* y *A. laevigata* y en obreras de *Solenopsis* spp.

(Hymenoptera: Formicidae). En las 3 investigaciones encontraron una incidencia de estos HEP del 10% sobre las hembras *A. laevigata* (3 aislamientos, 25% del total de 12 microhongos aislados) y *A. capiguara* (1, 25% de 4 HEP obtenidos), y 30% de *P. marquandii* sobre las obreras de *Solenopsis* spp (1 aislamiento, 20% de los 5 HEP aislados), cuyos aislamientos se identificaron por morfología mediante una clave taxonómica y/o por métodos moleculares a través de la secuenciación del ADN, 18S. Es importante apuntar que la transmisión directa de ascomicetes y entomopterales durante la cópula en insectos sociales se ha probado experimentalmente, y se ha propuesto la inoculación de dosis específicas de estos HEP y la posterior liberación de machos infectados previo al vuelo nupcial como un método de biocontrol de poblaciones de zompopas (Toledo *et al.*, 2007).

Al analizar los porcentajes de virulencia exhibidos por las 6 cepas de microhongos prometedoras, curiosamente los hongos que compartieron características morfológicas con *Beauveria* presentaron mortalidades promedio acumuladas similares (27A:  $\bar{x} = 70\%$  y LD10314:  $\bar{x} = 73,6\%$ ), cuyo patrón también fue semejante con el control positivo y la posible cepa de *Metarhizium*; (DSMZ:  $\bar{x} = 84,8\%$  y 30U:  $\bar{x} = 80,6\%$ ); las posibles cepas de *Aspergillus* (29AI:  $\bar{x} = 44\%$  y 30N:  $\bar{x} = 33,4\%$ ); y la posible cepa de *Paecilomyces*, que alcanzó una mortalidad intermedia entre los posibles *Metarhizium* y *Beauveria* (29AL:  $\bar{x} = 78\%$ ) (Sección 4.6, Figura 22). Los principales argumentos que explican la razón por la que tanto la cepa de referencia de *M. anisopliae* como la posible cepa aislada de *Metarhizium* spp. (30U) fueron más virulentas que las restantes 5 cepas promisorias (Figura 23); se gestan por el arsenal de enzimas entomotóxicas que participan en la degradación de componentes proteínicos, lípidos y quitina presentes en la cutícula, los cuales están asociados a la superficie de las conidias de *M. anisopliae*. Otro aspecto que complementa la presencia de estos factores de virulencia es explicado por Santi *et al.* (2010), que detectaron un complejo de multiproteasas de *M. anisopliae* implicadas en las etapas iniciales de infección y degradación de proteínas cuticulares, que incluyeron serín-proteasas, carboxi-peptidasas y metalo-proteasas; y junto con la quitinasa contribuyeron al crecimiento micótico dentro del insecto bajo la rápida solubilización de quitina y melanina.

Estos autores también mencionan que otros factores de virulencia que posee *M. anisopliae* para atacar son: 1) enzimas lipolíticas, que actúan en la adhesión/penetración de las conidias a la cutícula del hospedero porque incrementan las interacciones hidrofóbicas sobre la capa cerosa de la cutícula bajo la liberación ácido grasos; 2) fosfolipasa C, que hidroliza los fosfolípidos de la membrana celular e induce la disrupción física de los componentes que conforman esta estructura; 3) la catalasa y peroxidasa, que protegen a las esporas del ambiente y mejoran la tolerancia de las

conidias a la actividad las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) que se forman por efecto de la luz ultravioleta y el calor; y 4) la serín-proteasa PR1A, que se encarga de degradar las proteínas cuticulares y del hemocele, y media la penetración (Harrison y Bonning, 2010). Otro componente que influye en la patogénesis de *M. anisopliae* es la presencia de una mezcla de *destruxinas*, depsipéptidos cíclicos que consisten en 5 residuos de aminoácidos y un ácido  $\alpha$ -hidrocarboxílico; los cuales depolarizan la membrana celular debido a la abertura de los canales iónicos de calcio, ocasionando parálisis tetánica en el insecto-blanco (Spiteller, 2015).

Por su parte, las posibles cepas de *Beauveria* (27A y LD10314) alcanzaron mortalidades crecientes sobre las obreras de *A. cephalotes* (Figura 25); que podría deberse por ciertos genes asociados a la virulencia con los que cuenta *B. bassiana*, como explican Xiao *et al.* (2012). Este grupo de investigación realizó un análisis genómico de este microhongo, y averiguaron que el mismo posee genes que codifican para 1) un citocromo P450, que promueve la degradación de ácidos grasos cuticulares y 2) una  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasa, que mantiene la integridad celular; y genes ortólogos de *M. anisopliae* que codifican para 3) una proteína tipo perilipina, que controla el almacenamiento de lípidos y la penetración del apresorio; 4) un osmosensor que media la adaptación del insecto al hemocele; 5) adhesinas MAD1 y MAD2 para la adhesión de la espora en la superficie cuticular; y 6) hidrofobinas que regulan la hidrofobicidad de la superficie celular de la cutícula externa y su potencial virulencia sobre el insecto a atacar, que en este caso son las zompopas. Asimismo, Harrison y Bonning (2010) comentan que *B. bassiana* cuenta serín-proteasas CDEP1, que degradan las proteínas cuticulares, pero parecen ser menos efectivas que las de *M. anisopliae*.

Sin embargo, los investigadores también reconocieron que *B. bassiana* carece de genes homólogos de *M. anisopliae* como el gen que codifica para una proteína del tipo colágeno, cuya proteína que evadir el sistema inmune del hospedero y el gen *dtsS1* que está implicado en la biosíntesis de las *destruxinas* insecticidas; aunque sí produce otros depsipéptidos cíclicos como la *beauverólida Ba*, *beauvericina* y *bassianólida* (Spiteller 2015), los cuales se cree que tienen mecanismos de acción similares a la *destruxina*; pero es posible que su actividad varíe de acuerdo con el orden de insecto-blanco. Con estos argumentos, se podrían explicar los motivos por los que 27A y LD10314 fueron menos bioactivas que el código 30U para controlar a las obreras de *Atta cephalotes*.

Los hongos taxonómicamente asociados con el género *Aspergillus* (29AI y 30N) exhibieron niveles de mortalidad bastante bajos ( $\bar{x}$  = 44% y 33,4%, respectivamente) (Figura 25), lo cual tendría sentido porque se ha verificado que *Aspergillus* es un parásito oportunista de suelo que actúa cuando

decaen las defensas inmunológicas de los insectos (Lange, 2014; Pagnocca *et al.*, 2012) y se ha extraído del suelo asociado a las cámaras donde se aloja el jardín fúngico, tal como en este estudio, donde los hongos 29AI y 30N fueron recuperados de obreras muertas o vivas localizadas en los basureros. Además, Rodrigues *et al.* (2014) reportan que en la microbiota del suelo asociado con la honguera de *A. sexdens rubropilosa* se identificó la presencia de *A. niger* y *A. japonicus*; las cuales pueden producir el efecto “crías de piedra” en colonia, que implica la momificación de las larvas cuando no reciben un cuidado eusocial apropiado por parte de las obreras (Lacerda, 2009).

Considerando que las obreras del género *Atta* coexisten con este patógeno oportunista, dada la estrecha relación a nivel de microbiota del suelo que poseen con *Aspergillus*, se ha estudiado que los mecanismos de defensa innatos por secreción de sustancias antibióticas producidas en el compartamiento infrabucal de las zompopas son efectivos para bloquear la incidencia y reducir en al menos un 50% el efecto patogénico ocasionado por este entomopatógeno (Tranter *et al.*, 2013). Por consiguiente, es probable que las obreras sometidas a los análisis de virulencia con 29AI y 30N pudieron resistir el crecimiento de las conidias, detoxificaron las posibles aflatoxinas producidas por estos hongos (las cuales son secretadas a pH ácido, Frey-Klett *et al.*, 2011), y lograron detectar oportunamente y regular el efecto de patogenicidad de los posibles *Aspergillus*.

Para englobar toda la información discutiva y darle mayor validez a las hipótesis acerca de la efectividad virulenta entre los biotipo de hongos probados, Yek (2014) realizaron pruebas de sensibilidad para enfrentar 10  $\mu\text{L}$  de las secreciones producidas por las glándulas metapleurales de las obreras de *Acromyrmex octospinosus* de Gamboa, Panamá; con diferentes entomopatógenos aislados de estas colonias y presentaron más de 90% de germinación de esporas, que incluyeron *B. bassiana*, *M. brunneum*, *A. niger* y *Gliocladium virens* a una dosis única de  $1 \times 10^2$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$ . Este grupo de investigadores determinaron que la eficiencia de las secreciones antibióticas de estas glándulas en cuanto a la inhibición del halo de crecimiento de los hongos fue variable y repercutió significativamente en mayor medida sobre *A. niger* y *G. virens* que sobre *M. brunneum* y en especial sobre *B. bassiana*, que presentó un halo más grande y produjo mayor tolerancia a la inhibición. Por lo tanto, en dicho trabajo también demuestra que *Aspergillus* corresponde a un saprófito del jardín fúngico, que es medianamente patogénico y altamente sensible a la plasticidad de las secreciones antifúngicas de las obreras, lo que resultó en un efecto contraproducente para la germinación de esporas (29AI y 30N) en relación con los posibles *Metarhizium* (30U) y *Beauveria* (LD10314 y 27A).

El conocimiento acerca de la procedencia de un HEP es de gran relevancia porque Kolczarek (2015) demostró que al aislar hongos de muestras del suelo de las praderas de fincas cultivadas con raigrás (*Lolium perenne* L., Gramineae) ubicadas en las provincias de Podlaskie y Lublin, Polonia; identificó la presencia de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumorosea* con crecimientos de  $1,5 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> de suelo, aunque la densidad promedio de las colonias en ambos sitios de colecta tuvo variaciones de acuerdo con la época del año (otoño o verano) y el tipo de suelo del que se obtuvieron los hongos. En Podlaskie se obtuvo una mayor número de propágulos de *M. anisopliae* ( $1,5 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>); mientras que Lublin se recuperó más *B. bassiana* ( $1,9 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>) y *I. fumorosea* ( $1,8 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>).

También comentan que *I. fumorosea* sólo se logró aislar en Lublin durante otoño, posiblemente porque luego de que concluyen las lluvias, en los suelos de esta provincia había más partículas de suelo ricas en arcilla y materia orgánica para absorber esporas con carga eléctrica opuesta, lo que facilitó el crecimiento saprófito de los HEP. Cabe señalar que una de las cepas más bioactivas contra zompopas en este trabajo fue el posible ascomicete *Metarhizium* spp. (código 30U), que se aisló del suelo asociado a una colonia de *A. colombica*, mientras que las restantes 5 cepas se recuperaron de individuos vivos y muertos; por lo que cabe la posibilidad que el aislamiento 30U extraído del suelo haya venido cargado con materia orgánica, lo que facilitó la recuperación en laboratorio de este potencial entomopatógeno que circulaba cerca del jardín fúngico de las obreras de *A. colombica*.

Uno de los estudios que más se asocia con las extracciones de microhongos potenciales recuperados de las colonias de *A. colombica* es el de Hughes *et al.* (2004), quienes llevaron a cabo un muestreo e identificación molecular de la micoflora asociada a colonias de *A. colombica* en Gamboa, Panamá, y detectaron la presencia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (1 aislamiento de cámaras de desecho y 3 de obreras vivas en los basureros), *Beauveria bassiana* (1 de suelo de la colonia) y *Aspergillus flavus* (1 de cámaras de desecho). Si la procedencia de los mejores hongos filamentosos recuperados de las colonias de *A. colombica* del Parque Nacional Carara que presentaron una alta patogenicidad y virulencia sobre las obreras de *A. cephalotes* se compara con el origen los hongos aislados por Hughes *et al.* (2004); habría concordancia únicamente con los dos posibles agentes infecciosos de *Aspergillus* (29AI y 30N), los cuales fueron rescatados de obreras vivas y cadáveres situados en cámaras de desecho, mientras que contrastan con el origen de las cepas de *Beauveria* (LD10314 y 27A: cadáveres del basurero) y *Metarhizium* (30U: suelo asociado a la colonia)

Tales discrepancias de origen se gestarían a razón de la dificultad de hallar HEP verdaderos con una frecuencia de entomotoxicidad sobre obreras de insectos sociales como las zompopas, dado que las

partículas potencialmente nocivas para las hormigas como las esporas de HEP suelen permanecer de manera transitoria sobre el tegumento de alguna de las forrajeras o en los alrededores del jardín fúngico hasta ser detectadas por aquellos miembros más expuestos a patógenos, en cuyo caso algún miembro procede a ser remover y/o desinfectar las conidias mediante los mecanismos de respuesta mecánica o bioquímica bajo secreciones de antibióticos (Stroeymeyt et al., 2014; Singh-Sandhu et al., 2012). Esta respuesta fue demostrada por Römer y Roces (2013), quienes diseñaron una torre experimental para enfrentar un fragmento de jardín fúngico (con obreras de *A. laevigata*) con suelo asociado a las cámaras de desecho, y determinaron que mediante señales químicas olfativas las obreras detectaron estas partículas potencialmente dañinas para ellas y su nido y las dispusieron en un sitio específico para acumular desechos, cuya respuesta fue virtualmente nula comparada con el control negativo al que no se le añadió suelo del basurero ( $p < 0,05$ ).

Estudios comparativos de virulencia sobre himenópteros para estimar las dosis ( $LD_{50}$ ) y tiempos subletales ( $LT_{50}$ ) de HEP (Shapiro-Ilan, 2005) han sido reportado por varios autores; como Sileshi et al. (2012), que calcularon  $LD_{50}$  de 2 cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* al someter obreras de termitas (*Macrotermes* spp., Isoptera) ( $n = 20$ ,  $r = 3$ , 15 días de bioensayo) de la localidad del Sureste de Addis Adaba, Etiopía a dosis decimales crecientes ( $1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$  conidias  $\mu L^{-1}$ ). Ellos estimaron que las cepas de *M. anisopliae* fueron más virulentas, inclusive a la dosis más baja de  $1 \times 10^2$  conidias  $\mu L^{-1}$  ( $LD_{50} = 3,82 - 3,21$  conidias  $\mu L^{-1}$ ;  $LT_{50} = 8,54 - 8,19$  días -  $p > 0,05$ ) con respecto de *B. bassiana* a la misma dosis ( $LD_{50} = 5,08 - 4,40$  conidias  $\mu L^{-1}$ ;  $LT_{50} = 8,80 - 8,59$  días -  $p > 0,05$ ).

Asimismo, reportaron que la tasa de muerte fue menor entre los días 1 y 2 durante evaluación, y en día 7 del bioensayo todas las concentraciones probadas alcanzaron un 100% de mortalidad sobre las obreras usadas como unidad experimental. Este trabajo sugiere que las cepas de *M. anisopliae* fueron más virulentas que las de *B. bassiana*, tal como se determinó en la presente investigación; ya que se estimó que la posible cepa de *Metarhizium* spp. (30U) y DSMZ fueron más bioactivas con respecto de los HEP de *Beauveria* spp. (27A y LD10314). Empero, los valores de  $LC_{50}$  calculados por Shileshi et al. (2012) fueron menores a los reportados en esta investigación; tanto para la posible cepa de *Metarhizium* spp. ( $LD_{50}$  30U:  $4,281 \times 10^1 \pm 2,411$  conidas  $\mu L^{-1}$ ), la cepa de referencia ( $LD_{50}$  DSMZ:  $2,293 \times 10^1 \pm 2,130$  conidas  $\mu L^{-1}$ ) y las cepas de *Beauveria* spp. ( $LD_{50}$  27A:  $2,828 \times 10^2 \pm 2,552$  conidas  $\mu L^{-1}$ ,  $LD_{50}$  LD10314:  $1,745 \times 10^2 \pm 2,397$  conidas  $\mu L^{-1}$ ). Si fuese así, habría cierta congruencia porque los valores de  $LT_{50}$  de Shileshi et al. (2012) a la dosis más baja de  $1 \times 10^2$  conidias  $\mu L^{-1}$  ( $LT_{50}$  *B. bassiana*: 8,50-8,80 días,  $LT_{50}$  *M. anisopliae*: 8,19-8,54 días) fueron más altos que los obtenidos en

este proyecto a la dosis de  $1 \times 10^2$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$  (LT<sub>50</sub> de *B. bassiana* – 27A y LD10314: 5,27-5,30 días, LT<sub>50</sub> de *M. anisopliae* – 30U y DSMZ: 5,14-5,77 días) (Sección 4.6.1, Cuadro 7).

Johny *et al.* (2012) determinaron las LD<sub>50</sub> ( $2,0 \times 10^1 - 10^4$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y el tiempo de supervivencia medio (a  $2,0 \times 10^3$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de 8 cepas potenciales de *Beauveria* spp. aislados de larvas, huevos y adultos muertos infectados del barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*, Coleoptera) para combatir adultos de esta plaga ( $n = 15$ ,  $r = 3$ , 14 días); y hallaron que aunque todas las cepas evaluadas en bioensayos de patogenicidad causaron 90% de mortalidad, en la prueba de virulencia obtuvieron dosis (LD<sub>50</sub>:  $4,58 \pm 0,24 - 5,87 \pm 0,32$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) y tiempos subletales (LT<sub>50</sub>:  $6,16 \pm 0,42$  días –  $9,09 \pm 0,60$  días) variables de los aislamientos identificados como *B. bassiana*. Este aspecto agrega un punto importante al proyecto ejecutado porque la virulencia de las dos posibles cepas de *B. bassiana* presentaron ligeras diferencias en cuanto a los valores reportados de dosis subletales (LD<sub>50</sub> 27A:  $2,828 \times 10^2 \pm 2,552$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , LD<sub>50</sub> LD10314:  $1,745 \times 10^2 \pm 2,397$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ).

Igualmente, Mena-Córdoba (2010) aisló HEP de cadáveres de obreras de *A. cephalotes* y *A. colombica* de las regiones de Chocó y Lloró en Colombia, y mediante bioensayos evaluó la virulencia sobre obreras de *A. colombica* ( $n = 20$ ,  $r = 3$ , 10 días) a partir de inoculaciones de dosis variables de  $1-1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ . El científico encontró que sólo 2 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* desplegaron un parasitismo que no difirió estadísticamente de una cepa de *M. anisopliae* empleada como control positivo ( $p > 0,05$ ). Estos dos aislamientos presentaron valores de LD<sub>50</sub> de  $1,12 \times 10^6$  y  $1,16 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , los cuales vendrían a ser valores considerablemente más elevados respecto de las dosis subletales reportadas para la única posible cepa de *Metarhizium* (LD<sub>50</sub> 30U:  $4,281 \times 10^1 \pm 2,411$  conidias  $\mu\text{L}^{-1}$ ); cuyas diferencias de virulencia podrían ser consecuencia de que los hongos de Mena-Córdoba (2010) fueron extraídos de cadáveres o muestras de los basureros, mientras que el aislamiento 30U que se aisló en esta investigación fue obtenido del suelo asociado a la colonia.

Los tiempos de muerte estudiados por Loureiro y Monteiro (2005) sobre obreras máximas de *A. sexdens sexdens* ( $n = 8$ ,  $r = 3$ , 15 días) con dosis de  $1$ ,  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^3$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  de cepas de hongos *Paecilomyces farinosus*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* e incubadas; comprobaron que las dosis aplicadas tuvieron una relación directa *dosis-tiempo de muerte* ( $p < 0,01$  en cada tratamiento), lo cual también es válido en esta disertación porque la mortalidad de las obreras de *A. cephalotes* aumentó cuantiosamente conforme se incrementó la dosis de hongo aplicada.

Asimismo, los intervalos de tiempo subletal reportados por este investigador están acorde con el orden de virulencia propuesto para las 4 mejores cepas de posibles HEP del proyecto desarrollado, considerando que *M. anisopliae* (LT<sub>50</sub>: 5,41-2,60 y 5,22-2,75 días) fue la cepa que presentó el tiempo letal más bajo, seguidos de *B. bassiana* (LT<sub>50</sub>: 6,02-2,77 y 3,80-2,69 días) y *P. farinosus* (sólo las dosis más altas de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidias mL<sup>-1</sup> se ajustaron a la regresión de Probit, LT<sub>50</sub>: 2,98 y 3,14 días). Además, estos intervalos de tiempo letal fueron similares a los reportados para las posibles cepas de *Metarhizium* spp. (LT<sub>50</sub> 30U = 4,94-5,54 días) y *Beauveria* spp. (LT<sub>50</sub> 27A = 4,87-5,37 días, LT<sub>50</sub> LD10314 = 5,10-5,65 días); pero se desvían y son menores al valor de LT<sub>50</sub> conseguido para la posible cepa de *Paecilomyces* spp. (LT<sub>50</sub> 29AL = 5,34-5,67 días).

Caldwell (2015) evaluó la capacidad infectiva de dosis de  $2 \times 10^3$  ó  $2 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{g}^{-1}$  de *B. bassiana* sobre obreras de hormigas de fuego (*Solenopsis invicta*, Hymenoptera) ( $n = 50$ ,  $r = 3$ , 6 días) mediante bioensayos de patogenicidad en la localidad de Matto-Grosso, Brasil; y halló que la velocidad de muerte y los porcentajes de mortalidad incrementaron proporcionalmente con base en el tiempo en que las obreras estuvieron en contacto con los propágulos de *B. bassiana* (día 1 = 0,0%, día 6 = 84,7% -  $p < 0,05$ ), lo cual se asocia con los argumentos señalados anteriormente. Este autor reportó un tiempo letal promedio de las conidias de *B. bassiana* de 3,88 días, cuyo valor sería mayor al reportado con los hongos 27A (LT<sub>50</sub>  $\bar{x}$ : 5,12 días) y LD10314 (LT<sub>50</sub>  $\bar{x}$ : 5,37 días).

Otro trabajo que reporta los tiempos subletales de *B. bassiana* al someter obreras de *Atta mexicana* ( $n = 7$ ,  $r = 4$ , 8 días) del estado de Nuevo León, México, a dosis de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  de cepas de este hongo aislados de colonias de este himenóptero es el de Sánchez-Peña *et al.* (2005). Estos investigadores comentan que obtuvieron un tiempo de muerte media de 5,43 días y una mortalidad asociada significativamente elevada ( $p = 0,0153$ , esporulación superior al 50%). Este valor es muy similar al obtenido con LD10314 y 27A (posibles *Beauveria*) al evaluar ambos hongos a la dosis más alta ( $1 \times 10^3$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ), donde se calcularon valores de LT<sub>50</sub> de 5,10 y 5,36 días, respectivamente.

Con respecto de los valores de LT<sub>50</sub> de *Aspergillus*, el trabajo preparado por Giraldo (2014) al evaluar la patogenicidad de aislamientos nativos de Cali, Colombia sobre obreras *A. cephalotes* ( $n = 15$ ,  $r = 7$ , 10 días) a dosis de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ; demostró que hubo cepas de hongos *A. ochraceus* y *A. flavus* que alcanzaron mortalidades de 85,84% y 100% ( $p < 0,05$ ), respectivamente (con niveles de colonización superiores a 70%) junto con tiempos subletales asociados de 5,5 (*A. ochraceus*) y 2,1 (*A. flavus*) días, de acuerdo con la dosis de hongos. El tiempo de letalidad reportado para la cepa de *A. ochraceus* se asemeja a los mencionados en la presente investigación para las posibles cepas de

*Aspergillus* (LT<sub>50</sub> 30N: 4,94 días; LT<sub>50</sub> 29AI: 5,10 días) que se probaron a 1×10<sup>3</sup> esporas μL<sup>-1</sup>; por lo que de ser el caso, esta sería la especie de *Aspergillus* a la que se podrían asociar las cepas evaluadas.

Paralelamente, los valores de LT<sub>50</sub> reportados por Pereira (2014) después de inocular una suspensión de esporas de 1×10<sup>4</sup> esporas μL<sup>-1</sup> de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *Metarhizium* spp. sobre obreras de *A. laevigata* o *A. sexdens* ( $n = 20$ ,  $r = 3$ , 10 días) demostraron que *A. niger* (LT<sub>50</sub> = 6 días) fue el agente de biocontrol más efectivo contra las obreras de *A. laevigata*, seguidos de *A. flavus* (LT<sub>50</sub> = 7 días) y *Metarhizium* spp. (LT<sub>50</sub> = 8 días). Algunos de los resultados presentados por este autor difieren de los obtenidos en este trabajo a la dosis más elevada que se probó (1×10<sup>4</sup> esporas μL<sup>-1</sup>), ya que los valores de LT<sub>50</sub> fueron menores para la posible cepa autóctona de *Metarhizium* spp. (LT<sub>50</sub> 30U = 5 días), pero sí coinciden con las posibles cepas de *Aspergillus* spp. (LT<sub>50</sub> 29AI = 6 días, LT<sub>50</sub> 30N = 6 días) (Sección 4.6.2, Cuadro 8, Figura 24), y las pequeñas diferencias exhibidas a nivel de tiempo subletal se podrían deber al azar por efectos a nivel de especie de *Atta*.

Según explican Iwanga y Lee (2005) y Sánchez-Peña (2005), los mecanismos de respuesta inmune propios de cada obrera empleados para detectar cuerpos extraños (metabolitos de hongos, peptidoglucanos o polisacáridos de pared) son parte de los componentes que pueden regular la actividad bioinsecticida de un entomopatógeno, tanto de manera humoral (mediados por la biosíntesis de moléculas en la hemolinfa: péptidos antimicrobianos, encapsulamiento, melanina) como celular (formación de nódulos multicelulares y encapsulamiento mediante células granulares, plasmocitos y fagocitosis en el caso de hemocitos individuales); aunque algunos proyectos han demostrado que las defensas de las zompopas no siempre suelen ser eficientes para detener el crecimiento fúngico.

Por lo tanto, las variaciones en relación con los valores de LD<sub>50</sub> o LT<sub>50</sub> reportados por los estudios referidos anteriormente para las cepas promisorias de microhongos en comparación con los datos calculados en este trabajo, ocurrieron por factores como: 1) el tiempo de ocurrencia de procesos antisépticos propios de las obreras sometidas a los bioensayos es inconstante entre especies de himenópteros sociales (ej: el caso de las termitas vs. zompopas) (Sileshi *et al.*, 2012); 2) la virulencia entre hongos morfológicamente similares a una especie de HEP presenta variabilidad genética, por lo que es común que haya genotipos que produzcan esporas con una capacidad infectiva superior (ej: al comparar las dos cepas de *Beauveria* o las dos de *Aspergillus*) (Johny *et al.*, 2012); 3) la capacidad inherente de insectos sociales para remover las esporas dañinas dispuestas en el tórax de obreras y su habilidad de secretar sustancias antifúngicas son elementos que limitan el grado de infección al comparar dos o más géneros de HEP (ej: la comparación entre la habilidad de producción

de sustancias antimicrobianas entre *Solenopsis* y *Atta*) (Caldwell, 2015); y 4) los métodos para cultivar y suscitar su esporulación un parásito fúngico varían según los requerimientos nutricionales de la especie de hongo y el microambiente (temperatura, pH, condiciones luz/oscuridad y humedad) proporcionados para el crecimiento del HEP *in vitro* (Gao *et al.*, 2009). Estos cuatro componentes, aunado a factores de la prueba de virulencia (edad fisiológica de los insectos, tarea que realiza según la subcasta, método de aplicación de la suspensión de conidias y especie de microhongo) pudieron repercutir en el error estándar de los bioensayos establecidos (Shileshi *et al.*, 2012).

Araújo y Hughes (2014) comentan que para que un hongo potencialmente entomopatógeno produzca una invasión exitosa sobre su hospedero susceptible, el mismo debe alcanzar 1) un bajo lapso de tiempo de muerte del insecto por micosis y 2) un elevado grado de producción de conidias infectivas. Empero, Novak y Cremer (2015) mencionan que estos aspectos se ven restringidos de acuerdo con dos métodos empleados por los miembros de una colonia de insectos que conviven en sociedad para limitar el riesgo a una infección de esporas: 1) *el efecto dilución*: se genera por la redistribución y disminución paulatina de las partículas infecciosas a través del contacto social de las forrajeras (en ausencia de inmunidad social); y 2) *remoción mecánico y/o desinfección química*: que se produce con ayuda de las defensas activas del hospedero (bajo efecto inmune).

Como las hormigas parasol del género *Atta* carecen de antibióticos secretados por actinobacterias como *Pseudonocardia* spp. como las del género *Acromyrmex*, las obreras deben explotar sus dos tipos de defensas físico-químicas para protegerse a sí mismas y a su jardín fúngico: 1) la inmunidad social innata y 2) las secreciones glandulares antimicrobianas (Yek, 2012). En este estudio en particular, sólo se podría considerar el segundo punto, dado que las hormigas podadoras sometidas a bioensayos con esporas fueron aisladas de su colonia, por lo que la supervivencia de las mismas dependió meramente de la efectividad de las sustancias antisépticas estimuladas por las glándulas metapleurales (GMP) (Herrera y Valenciaga, 2011); estructuras internas que poseen los miembros de la tribu *Attini* para el control higiénico de obreras mediante procesos de auto-acicalamiento (del inglés *self-grooming*) y la limpieza de áreas contaminadas en el jardín fúngico (De Souza, 2008).

Según do Nascimento *et al.* (1996), los principales componentes químicos de las secreciones de las GMP en obreras de *Atta* son los ácidos cítrico, fenilacético, indolacético, hexanóico, octanóico, 4-metil-3-heptanol, 2-heptanona, 3-octanona, 4-metil-2-heptanona,  $\beta$ -citronelol y geraniol. Un primer acercamiento para comprender el rol funcional del componente principal de las GMP que corresponde al ácido fenilacético (AFA) es el proyecto que desarrollaron Fernández-Marín *et al.*

(2015), quienes evaluaron el efecto del AFA en obreras de *Atta cephalotes*<sup>27</sup> sobre la germinación de los hongos generalistas *M. brunneum*, *B. bassiana* o *Escovopsis* spp.; después de colocar 1 g con una concentración de  $2,5 \times 10^{-1}$  conidias secas sobre los jardines fúngicos, donde habían individuos de todas las castas (mínimas, intermedias y máximas). Los autores calcularon una proporción más constante del AFA en obreras mínimas (78-81%) que en máximas (54-88%), sin diferencias detectables entre las colonias probadas ( $Z = 1,55 - p = 0,122$ ), mas sí entre las castas ( $F_{3,88} = 42,2 - p < 0,001$ ); y estimaron que las obreras mínimas lograron inhibir de mejor forma la germinación de los HEP (*M. brunneum*: >30%, *Escovopsis* spp.: >60%) y parecen ser más tolerantes a estos patógenos respecto de las intermedias y máximas (*M. brunneum*: <20%, *Escovopsis* spp.: 50-60%).

También determinaron que en los *pellets* infrabucales, la máxima producción de AFA que pudo alcanzar una sola zompopa para evitar el crecimiento de HEP fue de 0,5  $\mu\text{g}$ , y la densidad fue variable según la colonia y el tipo de entomopatógeno ( $F_{6,24} = 4,15 - p < 0,005$ ). Adicionalmente, con pruebas de sensibilidad verificaron que la inhibición en placa de *M. brunneum* y *B. bassiana* hacia el AFA no se alcanzó con la dosis más elevada evaluada de 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *M. brunneum* (cuya concentración apenas inhibió cerca del 15% del halo) y fue cercana a 85% a esta misma dosis en *B. bassiana*. Este aspecto tendría que ser confirmarse, ya que de ser cierto, se podría asumir que las conidias de los hongos LD10314 y 27A (posibles *Beauveria* spp.) podrían ser menos eficientes y mejor reguladas por las obreras de *A. cephalotes* respecto del hongo 30U (si resulta ser una verdadera cepa de *Metarhizium* spp.), cuyo aspecto también tendría que ser verificado al probar estos hongos en colonia cuando los individuos se encuentren bajo inmunidad social, dado que la producción de AFA de una zompopa mantenida en aislamiento social no sería suficiente para controlar una dosis elevada de conidias, y posiblemente perecería por causa del crecimiento micótico de los HEP.

El papel de las GMP sobre la función metabólica de las zompopas parece ser preponderante y la ausencia parcial o total de estas glándulas conduce a secuelas negativas no sólo sobre la viabilidad de los individuos, sino también sobre la capacidad higiénica y regulación de antibióticos secretados para superar los efectos de hongos entomopatógenos. Esta teoría fue analizada en el proyecto de Poulsen *et al.* (2002), quienes evaluaron la incidencia de bloquear las secreciones producidas por las GMP sobre el índice de respiración, la mortalidad natural y la mortandad ejercida por *Aspergillus*

---

<sup>27</sup> El ácido fenilacético (AFA) es el componente principal de las secreciones de las glándulas metapleurales porque suele encontrarse en una proporción porcentual que varía entre 80% y 57,3% en la mezcla total de los componentes ácidos de las secreciones de las glándulas metapleurales (do Nascimento *et al.*, 1996).

*nomius* sobre hormigas máximas de de *Acromyrmex ocostopinosus* ( $n = 30$ ,  $r = 3$ ), mantenidas en colonia. Estos autores comentan que el cierre de las GMP ocasionó una reducción progresiva (13,0-20,3%) del índice de respiración hasta el día 15 en que se estableció el bioensayo ( $p < 0,05$ ), y generó un alto promedio de mortalidad ( $\bar{x} < 1-6$  cadáveres, día 5) al rociar dosis de  $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ , con respecto del control negativo ( $\bar{x} < 1$ , día 5) (interacción GMP\**M. anispliae* –  $p < 0,0009$ ).

Este estudio se complementa con los hallazgos de Hughes *et al.* (2008) y Poulsen *et al.* (2006), quienes destacan que el polimorfismo de las obreras ha hecho que la especialización de las GMP de las diferentes castas varíe en proporción a su tamaño y a las tareas que desempeñan en la colonia; por lo que debería ser común hallar que una obreras soldado sea menos eficiente con sus filtros infrabucales en labores de *grooming* y control de un patógeno como *Aspergillus nomius* ( $\bar{x} = 100\%$  mortanda) en comparación con las obreras mínimas ( $\bar{x} 62,5\%$ ); que se encargan meramente de atender crías, cuidar a la reina y terminar de procesar el material vegetal fresco recién introducido al jardín fúngico; por lo que es razonable pensar que el orden de vulnerabilidad de las castas de obreras hacia un parásito en particular sería descendentemente el siguiente: máximas (+) → intermedias ( $\pm$ ) → mínimas (-), donde las obreras mínimas tienen una tendencia a ser más resistentes y a bocontrolar efectivamente los parásitos externos.

El comportamiento antiséptico del *self-grooming* producido por himenópteros sociales se expresa cuando los insectos se acicalan con ayuda de sus membranas bucales o se frotan en su colonia; para realizar funciones *multi propósito*, esencialmente: 1) limpieza de partículas potencialmente dañinas de sus órganos sensoriales (Römer y Roces, 2013), 2) frotamiento de lípidos cuticulares secretados (Lenoir *et al.*, 2001) y 3) remoción de entomopatógenos a través de una respuesta conductual al estrés (Walker y Hughes, 2009). Se ha hipotetizado que la respuesta fundamental del *grooming* en obreras de insectos sociales como las zompopas y abejas proviene de la percepción diferencial de estos microparásitos a través de una serie de señales, que como destacan Zhukovskaya *et al.* (2014) pueden ser 1) quimiorreceptores a través de olores o 2) mecánicas por detección de las conidias.

El estudio desarrollado por Reber *et al.* (2011) confirma el efecto de el auto-*grooming* en hormigas *Formica selysi* (Hymenoptera: Formicidae) ( $H_{4,90} = 11,9$ ;  $P = 0,02$ ) cuando grupos de 11 adultos fueron expuestos a dosis incrementales de esporas de *Metarhizium anispliae* (10, 1000 y  $1 \times 10^5$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ); permitió detectar que la cantidad de auto-*grooming* fue 75% mayor en presencia de altas dosis del hongos respecto de un testigo con Tween ( $U = 95,5$ ,  $n_1 = n_2 = 19$ ,  $P = 0,01$ ) que alcanzó cerca de un 30%; y un testigo con agua destilada ( $U = 275$ ,  $n_1 = n_2 = 19$ ,  $P = 0,005$ ) o una dosis media

de esporas de hongos ( $U = 251, n_1 = n_2 = 19, P = 0,01$ ), cuya ocurrencia de *self-grooming* fue de 15%. Siendo así, esto verificaría la alta variabilidad, no sólo respecto de dosis subletales obtenidas para cada uno de los 6 códigos de hongos promisorios (Cuadro 7), sino también a nivel del porcentaje de mortalidad acumulado alcanzada al probar la virulencia de cada una de estas cepas (Figura 25).

Una variable de gran importancia que se ha vinculado con el *self-grooming* es el proceso de *antenación*, donde se ha comprobado que las antenas de insectos sociales son de utilidad para agudizar la detección química de olores producidos por HEP, y se ha formulado la posibilidad de que la acumulación de hidrocarburos cuticulares (HCC) en la superficie antenal y en la región de la *sensilla olfativa* es un signo de protección contra patógenos externos, y por lo tanto, las antenas podrían actuar como *lentes olfativos* para enfocarse en el reconocimiento específico de ciertos contaminantes químicos extrínsecos (Böröczky *et al.*, 2014).

Este argumento fue comprobado por Yanagawa *et al.* (2009) cuando evaluaron la antenación mediante pruebas de preferencia alimenticia sobre las termitas obreras de *Coptotermes formosaus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae) sometidas a dosis variables de  $1-1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  de los HEP *Beaveria brongniartti*, *Paecilomyces fumosoroseus* ó *Metarhizium anisopliae*, mediante electroantenografía. Estos autores reportaron que las obreras consumieron en mayor medida la solución que incorporó *P. fumosoroseus* (66,9%) en relación con las dosis que incluyeron los hongos *M. anisopliae* (13,9%) ó *B. brongniartti* (47,3%) ( $p = 0,0001$ ); por lo que asumieron que las obreras podrían discriminar entre un patógeno medianamente activo (29AL) para atacar termitas en relación con microhongos generalistas altamente patogénicos como *M. anisopliae* (30U) y *B. brongniartti* (27A y LD10314); que pudieron ser reconocidos mediante estímulos olfativos según el tipo y la dosis de conidias; cuyo planteamiento tiene congruencia con los resultados de este trabajo.

Considerando todos los mecanismos postulados anteriormente que poseen las hormigas parasol para evadir el efecto de HEP, se ha propuesto los métodos de limpieza desarrollados por las zompopas que se complementan con: 1) las defensas estructurales del insecto que incluyen la barrera cuticular; 2) las defensas bioquímicas por la secreción de antibióticos mediante las GMP con las que cuentan las obreras, que son clave para evitar que un enfermedad alcance niveles insostenibles; 3) el monitoreo continuo del jardín para tener control de la aparición de un brote de entomopatógenos o patógenos antagonistas; 4) el comportamiento claustral que han llegado a desarrollar las zompopas para secuestrar su cultivar sano de *L. gongylophorus* en cámaras subterráneas y reducir al mínimo el influjo de patógenos; y 5) la amplia diversidad de microorganismos

o microbioma que habita en la colonia de hormigas podadoras, la cual compete y puede llegar a suprimir totalmente la actividad biocida de un agente bioinfeccioso (Mueller *et al.*, 2010).

La creciente presión de la sociedad para que se comercialicen productos más saludables, así como la concientización del sector agropecuario para dar a conocer las adversidades acerca del abuso de agroquímicos junto con la inclusión de estrategias de control biológico y la implementación de legislaciones cada vez más rigurosas y restrictivas acerca del uso de productos tóxicos han hecho un notable direccionamiento mundial hacia la búsqueda de estrategias biológicas como la aplicación de organismos entomopatógenos para combatir plagas específicas (de Faria y Magalhães, 2009)

Es por ello que las bacterias entomopatógenas como *B. thuringiensis* y los hongos entomopatógenos han emergido como alternativas eficientes, agro-ecológicas y económicas para resolver el daño que ocasionan insectos sociales como las hormigas cortadoras de hojas (de Castilhos-Fortes *et al.*, 2009; Giraldo, 2014) sobre los cultivos. De acuerdo con la patente de Folgarait *et al.* (2014), las principales bacterias que se han estudiado para combatir hormigas acarreadoras de hojas y que se podrían considerar microorganismos promisorios para formulación de un preparado microbiano incluyen a *B. thuringiensis*, *Serratia marescens* y *Wolbachia*; mientras que los géneros de hongos que se podrían incluir en formulación son *Purpureocillium* (formalmente *Paecilomyces*), *Beauveria*, *Metarhizium*, *Acromonium*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Zoophtora*, *Pandora*, *Entomophaga* y *Fusarium*; los cuales podrían sumarse al efecto antagonista producido por los hongos parásitos *Escovopsis* y *Trichoderma* sobre el jardín fúngico de *L. gongylophorus*.

Aspectos que pueden limitar la bioformulación de un preparado que contenga una preparación microbiana es la estabilidad y persistencia de los microorganismos en campo debido a los efectos contraproducentes de la luz UV que merman su actividad biocida, el lavado de estas toxinas por las precipitaciones y la degradación ambiental paulatina de las esporas o el complejo espora-cristal si el dicho formulado se llega a aplicar como un cebo en el suelo (Nester *et al.*, 2002). Por otra parte, en Estados Unidos y otros países, la aplicación de bioproductos que contengan microorganismos suele pasar por tediosos procesos de una aprobación gubernamental y registro del producto para entrar al mercado, por lo que se deben conocer las especificaciones de bioseguridad en cuanto a las propiedades alergénicas e infecciosas del patógeno a liberar, lo cual implica ciertas restricciones que podrían limitar el tiempo para que el bioproducto pueda competir en el mercado (Hoddle, 2009).

Por ello, estas evidencias hacen crítica la formulación de bioproductos con dosis elevadas y uniformes que prevengan reaplicaciones frecuentes cada 2-4 días, sumado al hecho de que la apropiada preparación de un cebo podría ampliar su vida útil. Pese a ello, las ventajas que podrían resultar de utilizar toxinas de *Bt* y hongos entomopatógenos para combatir plagas incluyen 1) la capacidad de estos microorganismos para ser crecidos fácilmente mediante fermentación en espacios de trabajo *in vitro* reducidos; 2) se pueden realizar bioensayos de supervivencia extensivamente bajo condiciones controladas *in vitro* con los agentes de biocontrol bajo métodos rigurosos y consistentes; 3) el establecimiento de preparaciones microbianas puede incrementar su eficacia si se utilizan estrategias de rotación de bioproductos; y 4) se ha evaluado que existe una compatibilidad entre los entomopatógenos con algunos plaguicidas sintéticos, que se podrían aplicar en campo de forma simultánea o en rotación, lo que podría intensificar el nivel de control de la enfermedad microbiana (Punja, 1997; Suckling *et al.*, 2014).

Durante décadas, los proyectos biotecnológicos han hecho incanzables esfuerzos para mejorar la estabilidad y la virulencia de las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, ya que esta bacteria se puede incorporar en programas de manejo integrado de plagas por su baja peligrosidad hacia poblaciones de depredadores y parásitos en relación con los insecticidas químicos de amplio espectro, y al hecho de que las toxinas generan una *respuesta funcional* al controlar una plaga y una *respuesta numérica* porque las toxinas se reproducen según el flujo generacional de la plaga; de ahí que los bio-productos formulados de *Bt* cuentan con ventas anuales que ascienden los US\$75 millones en el mercado global de pesticidas biológicos (Talukdar, 2013).

Por otra parte, debido a los obstáculos que enfrentan algunos hongos entomopatógenos para ser considerados en procesos de formulación de bioproductos (producción limitada de micotoxinas, micotoxicosis carcinogénica sobre organismos no-blanco y baja efectividad de las conidias en campo por condiciones ambientales desfavorables) y al hecho en que no se ha incursionado en el desarrollo de bioproductos fúngicos contra insectos del orden *Hymenoptera* a nivel mundial (2,9%), se han propuesto enfoques sinérgicos para combinar hongos con bajas dosis de estresores químicos (carbamatos, organofosforados, piretroides, nicotinoides) como ingredientes activos conjuntos, lo que podría proporcionar un método de biocontrol seguro y eficiente para extender el espectro insecticida del bioproducto para atacar a la plaga desde diversos flancos de acción e idealmente reducir el tiempo de acción del hongo para generar su efecto entomotóxico (Srivastava *et al.*, 2009).

## CONCLUSIONES

- A partir de los resultados generados por los ensayos de ingestión a través de dieta artificial con las 15 cepas de *B. thuringiensis*, se seleccionaron los aislamientos *Bt28*, *Bt29* y *Bt44* como potenciales agentes de biocontrol de hormigas cortadoras de hojas.
- A través de los bioensayos de patogenicidad, de un grupo de 30 microhongos evaluados, los códigos 30U, LD10314, 27A, 29AL, 29AI y 39N fueron seleccionados como posibles entomopatógenos para combatir zompopas obreras de *Atta cephalotes*.
- El análisis morfológico realizado a las cepas de microhongos que alcanzaron mayores porcentajes de mortandad acumulada sobre las obreras forrajeras de *A. cephalotes* sugiere que los mismos se ubican taxonómicamente dentro de los géneros *Metarhizium* (30U), *Beauveria* (27A y LD10314), *Paecilomyces* (29AL) y *Aspergillus* (29AI y 30N).
- Las estimaciones de las concentraciones/dosis ( $LC_{50}/LD_{50}$ ) y tiempos subletales ( $LT_{50}$ ) permitieron determinar que la cepa de *B. thuringiensis* y microhongo que parecen ser las mejores cepas bioactivas para combatir una colonia de zompopas corresponden a las cepas *Bt28* y 30U respectivamente; ya que fueron estimadores significativos y permitieron obtener concentraciones/dosis letales acordes con lo que sugieren otros autores, por lo que éstas cepas se podrían potenciar eventualmente mediante pruebas de actividad sinérgica esporas-toxinas a corto plazo.

## RECOMENDACIONES

A pesar de que en los bioensayos de patogenicidad y virulencia se reconocieron 6 microhongos y 3 cepas de *B. thuringiensis* que pueden llegar a ser potenciales parásitos de obreras de *A. cephalotes*, los mismos se deberían reprobear y afinar nuevamente en bioensayos que incluyan un intervalo de dosis menor, tomando como criterio los resultados biológicos las dosis y tiempos subletales derivados de los análisis Probit y Kaplan-Meier de este trabajo (Novak y Cremer, 2014); y de esa manera conocer el verdadero grado de biocontrol que cada uno de los microorganismos aislados puede lograr para hacer sucumbir gradualmente a las obreras de *A. cephalotes* (Shah *et al.*, 2007).

Esta propuesta de verificación se gesta porque la caracterización y hallazgo de microparásitos especializados (tanto *Bt* como HEP) de hormigas parasol es una tarea complicada porque además de que el número de publicaciones asociadas a parásitos fúngicos verdaderos que ataquen las hormigas podadoras del género *Atta* es limitado (Pereira, 2014), la prevalencia de los mismos en el

nido es difícil si se toma en cuenta que las obreras enfermas o moribundas son removidas del nido con anticipación o ellas abandonan el nido para morir en soledad (Lachaud *et al.*, 2012).

Un aspecto que no se evaluó en las pruebas de virulencia corresponde a la inmunización a través del acicalamiento higiénico social (*allo-grooming*), en el que participan los miembros de la colonia para coletar el debris producido en el jardín fúngico y lo acumulan en forma de *pellets* de desecho en las glándulas metapleurales para ser removido de manera conjunta de las secreciones exocrinas (Fernández-Marín *et al.*, 2006). Este concepto ha sido evaluado por diversos autores (Fernández-Marín *et al.*, 2009; Konrad *et al.*, 2012; Loreto *et al.*, 2014; Reber *et al.*, 2011) para conocer la habilidad de insectos sociales (*A. cephalotes*, hormiga negra del jardín *Lasius neglectus*, hormiga carpintera de *Camponotus rufipes*, hormiga negra del Caribe *Formica selysi*, *A. laevigata*) en la remoción de esporas hacia cámaras de desecho dispuestas para tal fin.

Por consiguiente, se podría probar la incidencia de las 6 mejores cepas de microhongos (30U, 29AL, 27A, LD10314, 29AI y 30N) y las 3 cepas más prometedoras de *B. thuringiensis* (*Bt28*, *Bt29* y *Bt44*), incursionando en bioensayos finos a nivel de colonia, para estudiar la efectividad de la inmunidad social operacional, a exponer las obreras a dosis específicas de conidias infectivas. Esto sería importante porque aunque diversos estudios sugieren que no existen diferencias significativas entre la actividad de forrajeo de colonias de zompopas; proyectos como el de Goffré y Folgarait (2015) sí defienden la posibilidad de que hayan diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre las colonias, cuando se enfrentan hongos entomopatógenos como *Purpurecillum lilacillum* con obreras de *Ac. lundii*, lo cual sería otra variable a contemplar en futuros bioensayos de patogenicidad o virulencia.

De la misma manera habría que probar si los miembros de una colonia de *A. cephalotes* pueden pasar por alto la presencia de algunos patógenos, ya que se ha propuesto que las conidias pueden ser invisibles o no son reconocidas cuando se encuentran infectando tejidos internos de una compañera del nido; ya que de lo contrario, si detectan que un individuo exhibe síntomas de infección por un HEP, se elicitan efectores de inmunización bajo señales químicas olfativas para el reconocimiento de estos componentes dañinos y se induce dos tácticas para neutralizar la transmisión vertical de un brote: 1) el individuo infectado experimenta exclusión social y se aísla del resto de compañeras en las cámaras de desecho para no infectar al resto de miembros o 2) se elicitan el *allo-grooming* para a) destruir las esporas inoculadas en la cutícula de la hormiga con los antimicrobianos secretados por las GMP, b) desinfectar y comprimir las conidias infectivas mediante

las secreciones en el compartimiento infrabucal, c) transferir sustancias antimicóticas mediante la transferencia de gotas trofilácticas entre dos obreras para inhibirlas (Bolougne, 2014).

A pesar de que se han hecho algunas pruebas preliminares con Miguel Pacheco con una solución hipoclorito de sodio al 10% (v/v) sometido a calor previamente, sería conveniente probar y estandarizar un protocolo de desinfección para limpiar la superficie del cadáver de las obreras y confirmar la muerte de la obrera por efecto de micosis *post-mortem*. Un protocolo de desinfección que se podría adaptar es el propuesto por Pereira (2014), quien sumergió a los cadáveres de obreras forrajeras (*Atta sexdens* y *A. laevigata*) en una solución que contenía etanol al 70% (v/v), hipoclorito de sodio al 4% (v/v) y agua destilada estéril (ADE) durante 10 s en la solución; y se secaron posteriormente en un trozo de papel filtro bajo el flujo de aire de la cámara de flujo laminar, se almacenaron en tubos *ependorf* y se taparon con unaa mota de algodón humedecida con ADE para mantenerlas en incubación a  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta que se observara la extrusión del hongo.

También se podría trabajar con el protocolo de desinfección establecido por De Souza-Cardoso (2010) para limpiar la superficie del tórax de obreras muertas de *A. sexdens rubropilisa* después de morir al ser sometidas a bioensayo contacto-dependiente. Este investigador confirmó la muerte de las zompopas, luego de desinfectar a los individuos en etanol de 70° (v/v) por 30 s, someterlos a un enjuague en ADE y secar a los cadáveres en papel filtro esterilizado preliminarmente. Finalmente, las zompopas fueron colocadas en placas *Petri* y se incubaron en cámara húmeda a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $80 \pm 1\%$  humedad relativa) bajo oscuridad por 10 días para comprobar el porcentaje de micosis.

Para analizar la susceptibilidad de enfermedades bioinfecciosas ocasionadas por aislamientos de los posibles HEP seleccionados sobre obreras forrajeras de *A. cephalotes* detectados de manera preliminar por Miguel Pacheco Leiva y el autor de este trabajo, en los últimos meses se establecieron bioensayos contacto-dependientes utilizando microinóculos de conidias (1  $\mu\text{L}$ ) para conocer la interacción mortalidad de obreras – grado de infección del microhongo (Goetel, 1997). No obstante, dichos bioensayos se han diseñado en diferentes sistemas a mediana escala en placas *Petri* o miniaturizado en tubos tipo *ependorf*; basados en protocolos propuestos por diferentes autores (de Souza *et al.*, 2013; Dielh y Junqueira, 2001; Giraldo, 2014; Lemus *et al.*, 2008; Mena-Córdoba, 2010; Poulsen *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2007) con algunas modificaciones.

Por ello, para conocer cuál sería el método más apropiado de bioensayo, se recomienda estandarizar ambos bioensayos y determinar cuál método podría ser de mejor utilidad para el grupo

de biocontrol de zompopas, con base en los siguientes aspectos: 1) reproducibilidad entre ambas metodologías respecto de los valores de patogenicidad y porcentajes de mortandad reportados para algunos códigos de hongos previamente ensayados; 2) baja mortalidad natural del control negativo y mortalidad superior a 90% para el control positivo DSMZ que ambos autores probaron (Heong *et al.*, 2013), 3) registro de resultados fácilmente observables; 4) corto tiempo de duración relativo para montar un mayor número de réplicas, 5) obtención de una respuesta lineal *dosis-respuesta* estandarizable a partir de los resultados (Isman, 2011) y 6) limitaciones a nivel de costos económicos que implica establecer el protocolo en Placa *Petri* vs. Tubo tipo *ependorf*.

Para estandarizar ambos métodos se propone establecer dos bioensayos paralelos, con la idea de que la única fuente de variabilidad sea el contenedor empleado; haciendo comparaciones mediante prueba *t* y ANOVA de una vía entre ambos métodos de infección contacto-dependiente de las dosis de esporas; partiendo de un diseño experimental similar que seleccione el mismo número de unidades experimentales ( $n = 10$ ) y réplicas ( $r = 3$ ); así como la utilización de una misma colonia para establecer ambos tipos de bioensayos para darle mayor validez estadística a los resultados (revisar resultados preliminares derivados de esta recomendación en el Anexo 5).

Además, se propone seleccionar una única dosis de HEP, que sería de 750 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ , tomando en cuenta que 1) es una de las dosis restrictivas más baja reportada en un artículo (Poulsen *et al.*, 2002) para evaluar la patogenicidad de *Aspergillus nomius* contra zompopas de *Ac. echinatio*, 2) es una dosis intermedia que se asocia con las dosis subletales seleccionadas en este trabajo y 3) es una dosis similar a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI,  $5,0 \times 10^2$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  y  $6,5 \times 10^2$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ) reportadas por Onofre *et al.* (2011) al evaluar la CMI de dos cepas nativas de *M. anisopliae* var. *anisopliae* para evaluar el efecto de fungicidas comerciales (Sphere®, Nativo® y Bendazol®) a dosis variables desde 22  $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  hasta 1000  $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  en Brasil, los cuales afectan la actividad bioplaguicida de los HEP prometedores elegidos y serían otra variable a considerar en campo.

Por otra parte, después de haber hecho la identificación taxonómica preliminar de los aislamientos más prometedores recuperados de las colonias de *Atta colombica*, restaría hacer su respectiva identificación molecular mediante PCR y generación de árboles filogenéticos (Evans *et al.*, 2010). Para hacer un procedimiento de extracción de ADN de micelio y PCR que permita ahorrar tiempo, Bernal Matarrita Carranza empleó el método propuesto por Zhang *et al.* (2010) mediante la extracción de un fragmento de la colonia del hongo con un removedor de dientes estéril que se somete a una solución de lisis (denominada *breaking buffer*, EasySelect™ *Pichia* Expression Kit –

Invitrogen®, USA), se incubó a 85 °C y se almacena posteriormente a -20 °C. Seguidamente, se realiza la amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') del ADN<sub>nr</sub> y se visualizan los productos de PCR mediante la corrida electroforética en geles de agarosa preparados con *buffer* TAE a 1-2% (m/v).

Se ha propuesto que la actividad de una plaga de insectos puede ser suprimida de acuerdo con la diversidad de comunidades microbianas con las cuales convive, ya que se encuentra más propensa a ser infectada por un potencial patógeno porque continuamente se incorpora material vegetal fresco en el jardín fúngico, el cual puede acarrear parásitos molestos para el mismo (Jabbour *et al.*, 2011). Es por ello que ahora que se conoce la bioactividad real de las cepas más promisorias de *B. thuringiensis* y los posibles hongos entomopatógenos contra las obreras de *A. cephalotes*, este trabajo tendría un insumo considerable en biocontrol si se hicieran pruebas de coexistencia para comprobar experimentalmente si existe un efecto sinérgico al mezclar dos o más grupos potenciales de los agentes bioinfecciosos elegidos o incluso si se podrían combinar con insecticidas químicos como *imidaclopride*, el cual se ha evaluado en dosis sucesivas de *B. bassiana* para combatir *Acromyrmex subterraneus* y el efecto sinérgico permitió producir una mayor mortalidad en obreras (Galvanho Da Costa, 2009). Estas pruebas se realizarían con el fin de estimar si se puede potenciar la mortalidad reportada para las toxinas de *Bt* y mejorar el efecto de los HEP (Giraldo, 2014).

Bajo este panorama, se hace la salvedad de que hasta la fecha, no se encontraron publicaciones en las que se haya probado el efecto sinérgico entre alguna cepa de hongos entomopatógenos conocidos + *B. thuringiensis* para controlar hormigas cortadoras de hojas u otro himenóptero en particular; por lo que quedaría de tarea incursionar en este aspecto, probablemente porque aún quedan vacíos en el entendimiento del mecanismo de acción de *Bt* y debido a que esta bacteria sólo ha sido potenciada cuando ha interactuado con inhibidores de proteasas (IP) vegetales, enzimas capaces de promover la oligomerización y mediante la mezcla con otras proteínas Cry (Then, 2010).

Sin embargo, la sinergia entre hongos entomopatógenos u otros químicos sí ha sido presentada. Por ejemplo, Salinas y Arias-Ruiz-Díaz (2010) evaluaron la actividad tóxica de dos productos a base de *M. anisopliae* (Metanat PM) y *B. bassiana* (Bovenat PM) individualmente o de combinados sobre nidos de *Acromyrmex landolti franticornis* ( $n = 3$ ,  $r = 2$ ; 15, 22, 30 y 60 días después de aplicación, DDA) en la localidad de San Lorenzo, Paraguay, utilizando dosis de  $3 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$  y  $1,2 \times 10^7$  esporas mL<sup>-1</sup>; y comprobaron que el incremento sucesivo de la dosis bajo los diferentes tratamientos y los DDA mejoró considerablemente la eficiencia del producto; particularmente desde el día 8 DDA, que

presentó una lectura final de 80% de eficiencia del producto Metanat PM + Bovenat PM sobre los hormigueros y 70% de eficiencia de los productos individualmente al día 60 DDA. Además, no detectaron diferencias significativas ( $\alpha = 0,10$ ) entre los tratamientos, a pesar de que los resultados de la prueba de  $\chi^2$  (90% de confianza) sugieren que el producto a base de *M. anisopliae* fue ligeramente más efectivo (51,4% al día 60 DDA) respecto de *B. bassiana* (50,1% al día 60 DDA).

Por otra parte, a pesar de que los gráficos de interacciones múltiples y dispersión (Figuras 23 y 25) denotan que el efecto de las cepas de *Aspergillus* (29Al: 67%, 30N: 57% a 1000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ) descritas por taxonomía no fueron tan promisorias como los otros cuatro códigos de hongos que alcanzaron mayores índices de mortandad (30U, LD10314 y 29AL: 97%, 27A: 90% a 1000 esporas  $\mu\text{L}^{-1}$ ) sobre los individuos de *A. cephalotes*; no se deberían descartar porque se han comprobado que el efecto combinatorio de dosis específicas de dos o más aislamientos de agentes bioinfecciosos obligados como *B. bassiana* o *M. anisopliae* con patógenos oportunistas del jardín fúngico podrían impulsar una sinergia significativa ( $p < 0,05$ ) del efecto bioinfeccioso de las esporas de *Aspergillus*.

Esta predicción es apoyada por Hughes y Boomsma (2004), quienes demostraron que la dinámica de una infección cruzada entre un HEP con mayor capacidad infectiva sobre zompopas como *M. anisopliae* dominó a *A. flavus* al evaluar su efecto de micosis individual (35%) o combinado (70%) con obreras de *Acromyrmex echinator*. Este grupo de científicos menciona que la competencia inducida entre ambos hongos estimuló una superinfección que incrementó la esporulación y la producción de toxinas inmunodepresoras por parte de *A. flavus* sobre un mayor número de obreras; por lo que hipotetizaron que las toxinas secretadas por las hifas de *M. anisopliae* degradaron el sistema inmune del hospedero y causaron la inmunosupresión del insecto; proceso que conllevó a una ineficiencia de la respuesta inmune innata de *Ac. echinator* y por tanto, condujo al un éxito en la dispersión de conidias de *A. flavus* y le permitió ser un competidor virulento para *M. anisopliae*, que actuó en menor tiempo con respecto a *A. flavus* cuando se evaluó individualmente.

Sería importante que los bioensayos finos se puedan complementar con estudios que apliquen microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *scanning electron microscopy*) para verificar el crecimiento fúngico y la penetración de las hifas de sobre las capas cuticulares de los cadáveres de *A. cephalotes* (Gabarty *et al.*, 2014), así como el progreso de la infección *per os* (Gökçe y Er, 2005); y mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*) para comprobar los efectos internos de los mejores HEP y los impactos negativos

producidos en las células epiteliales columnares asociadas a las vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV) del mesenteron con las cepas de *Bt* a nivel digestivo (del Rincón *et al.*, 2006).

De esta forma, se podrían utilizar parte de los métodos desarrollados por Silva-Zacarin *et al.* (2011) para disectar obreras *A. sexdens rubropilosa* sometidas a concentraciones de hidrametilnona y ácido bórico, para fijar [fijación: paraformaldehído al 4% en *buffer* fosfato de sodio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7.4), *post*-fijación: tetraóxido de osmio al 1% + *buffer* fosfato de sodio], lavar [*buffer* cacodilato de sodio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7.2)] y deshidratar (acetona a diferentes concentraciones + citrato de plomo al 0,4%) las diferentes muestras de órganos (túbulos de Malpighi, mesenteron y glándulas post-faríngeas) y disponerlas en un resina epóxica (Araldit®) para hacer observaciones ultraestructurales a través de un TEM y comparar los resultados presentados por estos autores.

La identificación de microorganismos entomopatógenos (MEP) para el biocontrol de una plaga agrícola como son las hormigas podadoras se pone en perspectiva como una oportunidad para formular a futuro cebos humedecidos con atrayentes extractos de cítricos (usualmente citropulpa de naranja), avena o salvado de trigo (Ospina-Penagos *et al.*, 2011); que incluyan las cepas nativas de *B. thuringiensis* (*Bt28*, *Bt29* y *Bt44*) y los códigos de posibles HEP (30U, 29AL, LD10314, 27A, 29AI y 30N) que fueron bioactivos contra zompopas para incorporarlos como ingredientes activos.

No obstante, se debe recalcar que para formular un bioinsecticida antimicrobiano para controlar una plaga como las hormigas parasol es necesario conocer 1) el comportamiento de las obreras forrajeras en campo en el momento de acarrerar material vegetal; 2) la presencia de fungicidas en el sitio de aplicación que puedan limitar el efecto epizootico de los HEP; 3) el ambiente de almacenamiento; 4) los tipos de materiales inertes a incorporar en el producto final (vehículo acarreador, solventes, emulsificantes y aditivos); y 5) la temperatura y humedad (Alean-Carreño, 2003; Fernández y Juncosa, 2002); los cuales están implicados en la estabilidad, persistencia y viabilidad del bioproducto en campo que no debería ser menor de 95% (Cortez-Madrigal, 2006).

Por ello; será necesario evaluar cebos con las cepas más promisorias en campo a mediano plazo para desarrollar la forma más eficiente de aplicación del bioproducto de acuerdo con el comportamiento y horario de forrajeo del insecto; ya que el tipo de aplicación va a repercutir en el grado de mortalidad del insecto a controlar, particularmente en sistemas de producción que tengan una certificación de sistemas de producción orgánica y aquellos en los que sea necesario cumplir con requisitos específicos de sanidad que exige el mercado internacional (Díaz-Ordaz *et al.*, 2010).

Por lo pronto, la mayor parte de cebos diseñados para combatir zompopas se han preparado como granulados gelatinosos o *pellets* secos, cuyos acarreadores (2,5-5,0 mm) suelen incorporar el ingrediente activo correspondiente al agente biocida (que en la actualidad sólo se han preparado con HEP a dosis desde  $10^3$ - $10^{10}$  conidias  $g^{-1}$ ), junto con un atrayente como los extractos de aceites vegetales (especialmente uva, naranja o mandarina) o fragancias artificiales (Folgarait *et al.*, 2014).

Considerando estos factores, a pesar de que no se han hecho estudios para la formulación de cebos que contengan las toxinas de *B. thuringiensis* para combatir zompopas, se han generado investigaciones con cebos que contengan conidias de HEP que podrían sumar una contribución a los posibles HEP detectados en este trabajo a largo plazo. Uno de estos estudios es el Herrera-Salazar (2009), quien evaluó la eficacia de cebos granulados que contenían un extracto de neem, levadura (1% ó 5% cada uno) o el antagonista del jardín fúngico *Trichoderma* ( $7,01 \times 10^7$  esporas  $mL^{-1}$ ) junto con diferentes atrayentes (citropulpa, extracto alcohólico de cáscaras de naranja y follaje de cítricos) para combatir colonias de *A. cephalotes*. La prueba resultó en que el extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayente y los ingredientes activo de neem (1%) ó *Trichoderma* spp. ( $7,01 \times 10^7$  esporas  $mL^{-1}$ ) permitieron reducir significativamente el forrajeo de las hormigas cortadoras de hojas, ya que los promedios de forrajeo fueron de 9,43 hasta 13,27 hormigas  $min^{-1}$  en el sitio de muestreo.

Otro trabajo es el de Jaccoud (1999), quien reporta una mortalidad elevada sobre obreras de una subcolonia de *Atta sexdens rubropilosa* sin reina al probar cebos con esporas secas (DS, del inglés *dry spores*) o esporas secas + polvo de cítricos (CP, del inglés *citrus powder*) de *M. anisopliae* a 0,5 g a 0,05 g aplicados sobre los mini-nidos durante un periodo de 37 días<sup>28</sup>. El autor menciona que con ambos cebos se alcanzó una mortalidad significativa ( $p < 0,001$ ), que fue de 100% con 0,5 g DS al día 37; mientras que los tratamientos 0,05 g DS y 0,5 g CP alcanzaron mortalidades de  $64,5\% \pm 15,4$  y  $45,2\% \pm 17,3$ , respectivamente en el último día de revisión; el tratamiento 0,05 g CP generó una mortalidad menor al 10% que se mantuvo desde el día 16 hasta el final de ensayo; y el control negativo alcanzó una mortalidad natural de  $(1,4 \pm 0,1)$  %. Adicionalmente, la recuperación de esporas de *M. anisopliae* fue superior al 80% las primeras 4 semanas (27 días) de evaluación sobre los cadáveres, pero decayó sustancialmente al día 31 y fue mínimo al día 37 con CP 0,5 g.

---

<sup>28</sup> Los datos generados en el trabajo de Jaccoud (1999) fueron transformados al  $\log_{10}$  para proceder a hacer los análisis estadísticos respectivos.

Con los valores obtenidos, el científico conjeturó que el hecho de que se haya generado mayor grado de mortalidad en los tratamientos con esporas secas que los tratamientos de esporas secas + polvo de cítricos se debe a diferencias en los niveles de estrés en los individuos que causó la sola presencia de las esporas secas y generó una disrupción social dentro de los mini-nidos para causar una efectiva mortalidad, dado que el formulado con polvo de cítricos pudo ser más fácilmente manipulado, tomando en cuenta que el tamaño de las partículas en cítricos es mayor que el de las esporas y la elevada humedad en los nidos pudo agrupar en menor medida las esporas secas que las de cítricos.

Otros aspectos que se deberían considerar cuando se hacen formulaciones con HEP son: 1) *vida media del bioproducto*: el uso de de propágulos de conidias o blastósporas de un micoinsecticida debe tener una vida media apropiada para tener una pérdida mínima de viabilidad de al menos un año para uso comercial en campo tomando en cuenta factores abióticos como temperatura, luz y humedad; 2) *formulación, adyuvantes y adherencia*: este es un factor importante porque se decide si el producto será preparado como polvo técnico, polvo mojable, aspersion aceitosa o incorporando las esporas con un acarreador sólido, por lo que es importante comprender la forma en que el patógeno interactúa con su hospedero o responde a su ambiente; y 3) *persistencia del formulado en el hábitat del insecto-blanco*: la persistencia de los propágulos fúngicos en el ambiente es variable que repercute en la eficacia del micoinsecticida, sea por la topografía del lugar donde se aplica, la temperatura, la exposición a luz UV y el grado de precipitación del sitio (Jackson *et al.*, 2010).

Basados en estos supuestos, considerando que la detección de entomotoxicidad de los seis posibles HEP es uno de los factores limitantes; también sería conveniente incorporar algún método para cuantificar los propágulos viables de conidias por unidad de volumen a partir de un ensayo de germinación de esporas, ya que las mismas son las que inciden en la toxicidad de insecto-blanco (Inglis *et al.*, 2012; Onofre *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que chequear que la viabilidad de las esporas sea igual o superior a 90% antes de establecer un bioensayo le da mayor veracidad a los ensayos *in vitro* cuando se desea reconocer si un aislamiento en particular puede ocasionar una enfermedad comunicable sobre un plaga en particular, ya que si la viabilidad de las conidias no es apropiada, lo más recomendable es repetir el ensayo con cultivos fúngicos frescos (Devi *et al.*, 2008).

Se debe hacer la salvedad de que aunque los aislamientos de posibles entomopatógenos fueron altamente virulentos mediante las pruebas de laboratorio en que se ensayaron diferentes grupos de obreras de *A. cephalotes*; en campo es posible que tales resultados varíen, dado que se debe incorporar el factor de inmunidad social y comportamiento de *allo-grooming* de los individuos

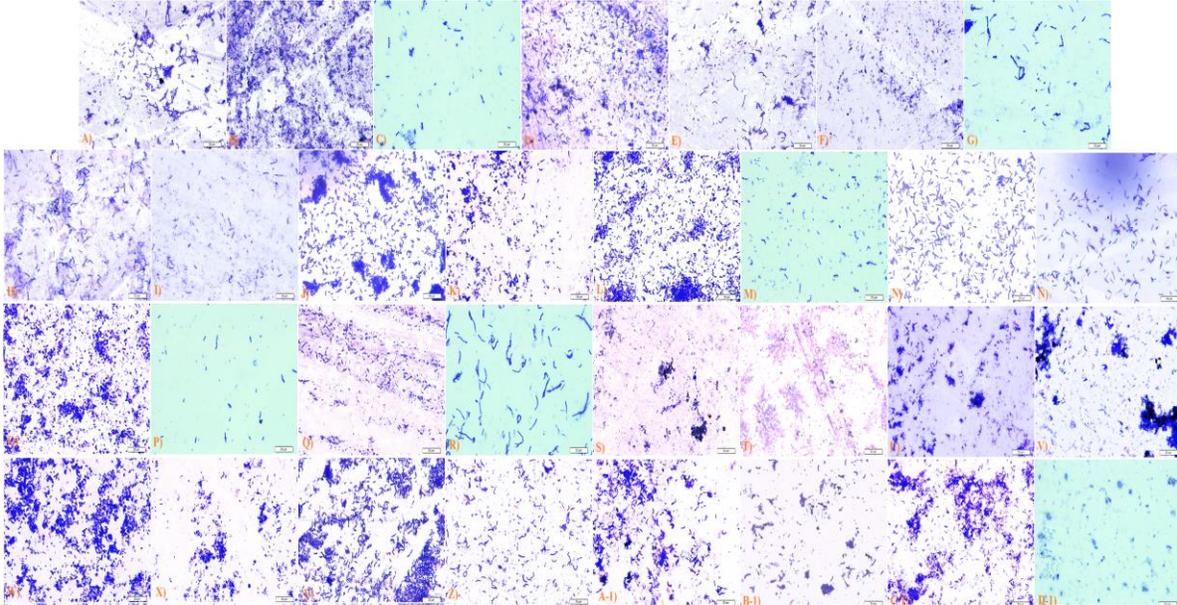
dentro de su colonia, cuya variable podría generar resultados inconsistentes al probar los hongos o cepas de *B. thuringiensis* en fincas experimentales (Liu *et al.*, 2003). Bajo esta disertación, la recomendación sería hacer pruebas preliminares *in vitro* en colonia; y pruebas en campo *a posteriori* en hormigueros de fincas específicas para conocer si los entomopatógenos designados como promisorios mantienen su letalidad sobre colonias de hormigas, y de esa manera ir pensando en el mejor método de aplicación que asegure que los agentes de biocontrol van a infectar a las zompopas en su ambiente natural (Johny *et al.*, 2012).

El éxito en la aplicación de agentes de biocontrol con hongo entomopatógenos se relaciona con la identificación y comprensión de los mecanismos de acción de cada hongo o el efecto bactericida de *Bt*, situación que ha sido difícil de establecer no sólo por la complejidad social de un insecto como las hormigas forrajeras, sino también por factores bióticos y abióticos y los microorganismos competidores asociados a las colonias que podrían inhibir o mermar la efectividad de los bio-productos; por tanto, se presenta una urgencia por identificar con anticipación las relaciones beneficiosas y/o deletéreas de los microorganismos presentes en las colonias de *Atta/Acromyrex* y conocer las características propias de la región de aplicación (suelo, precipitación y humedad), las cuales son elementos relevante para estimar si los biocontroladores podrían alcanzar una elevada bioeficacia para el combate efectivo y eficiente de colonias de zompopas (Shahid *et al.*, 2012).

## ANEXOS

### ANEXO 1

Frotis preparados de las concentraciones más alta ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y más baja ( $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para conocer la proporción del complejo espора- cristal de las 15 cepas más prometedoras de *Bacillus thuringiensis* procedentes de colonias de *Atta colombica*

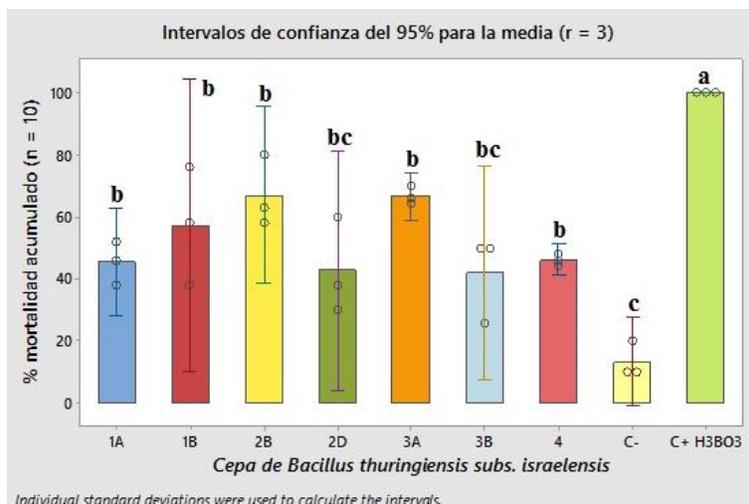


**Figura 26.** Vista microscópica de los frotis preparados para las 15 cepas más prometedoras de *B. thuringiensis* que se probaron en los bioensayos de ingestión de dieta sólida sobre zompopas forrajeras de *A. cephalotes* a concentraciones de  $1000$  ó  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  del liofilizado del complejo espора- cristal. A)  $LC_{50}$  de *Bti* empleada como control biológico positivo en los bioensayos, B y C) *Bt19* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , D y E) *Bt42* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , F y G) *Bt34* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , H e I) *Bt44* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , J y K) *Bt20* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , L y M) *Bt27* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , N y Ñ) *Bt45* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , O y P) *Bt28* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Q y R) *Bt40* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , S y T) *Bt38* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , U y V) *Bt47* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , W y X) *Bt21* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Y y Z) *Bt26* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , A-1 y B-1) *Bt29* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , C-1 y D-1) *Bt33* a  $1000$  y  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### ANEXO 2

**Prueba de virulencia preliminar con 7 cepas comerciales de *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* empleadas para conocer la bioactividad contra zompopas**

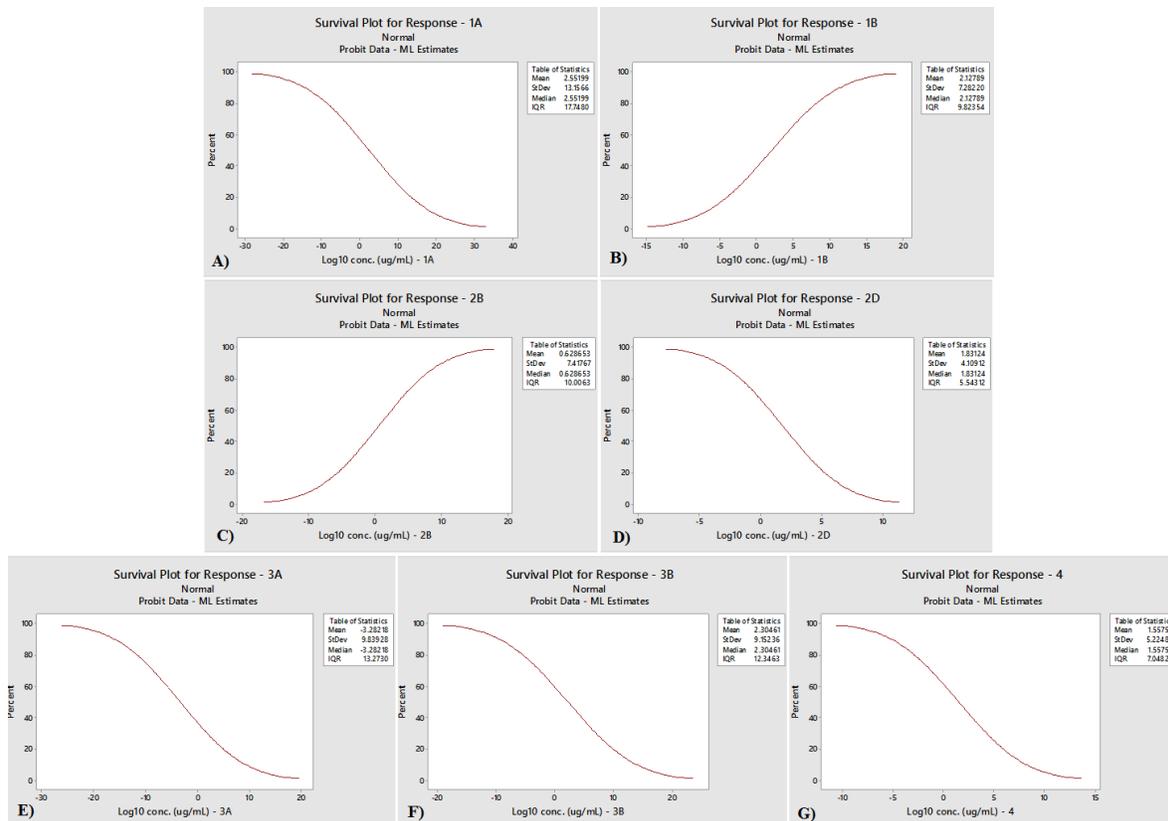
Para seleccionar una posible cepa control positivo de *B. thuringiensis* para darle mayor veracidad a los resultados que se obtuvieran en los bioensayos finos con las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de colonias de *Atta colombica*, se eligieron aleatoriamente 7 cepas (del total de 14 cepas de *Bti* de la colección perteneciente al grupo de Control Biológico del CIBCM, UCR) y se ensayaron al igual que se montaron los bioensayos de ingestión de la sección de metodología para evaluar las 15 cepas autóctonas más activas de *B. thuringiensis*; y cuyos resultados de la prueba ANOVA de una vía y *Post-Hoc* de Tukey se muestran en la figura 27.



**Figura 27.** Gráficos de barras de intervalos de confianza del 95% de las 7 cepas comerciales de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* probadas en un bioensayo preliminar para conocer cuál(es) fueron más bioactivas para combatir las zompopas obreras de *A. cephalotes* y seleccionar a una de las cepas como posible control biológico positivo en el bioensayo fino con las cepas de *Bt* aisladas de colonia.

De acuerdo con el gráfico de barras, se observa si habían diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos en consideración ( $p < 0,000$ , con una variabilidad del error de 13%) que el orden por letras generado de la prueba Tukey indica que las cepas más similares al control positivo químico con ácido bórico al 1 mmol mL<sup>-1</sup> ( $\bar{x} = 100\%$  de mortandad acumulada) fueron *Bti2B* ( $\bar{x} = 67,00\%$ ), *Bti3A* ( $\bar{x} = 66,67\%$ ), *Bti1B* ( $\bar{x} = 57,30\%$ ), *Bti4* ( $\bar{x} = 46,00\%$ ) y *Bti1A* ( $\bar{x} = 45,33\%$ ). Por su parte, las cepas *Bti4* ( $\bar{x} = 42,67\%$ ) y *Bti1A* ( $\bar{x} = 42,00\%$ ) fueron más similares al control negativo ( $\bar{x} = 13,33\%$ ).

Después de conocer estas diferencias, paralelamente se preparó un bioensayo fino con diferentes concentraciones decimales desde 1000 hasta 0,1 µg mL<sup>-1</sup> del liofilizado obtenido de estas cepas comerciales para comprobar si las mismas se ajustaban a la prueba Probit y qué valores de concentración subletal se obtenía para cada una de estas cepas, como aprecia en la figura 28.

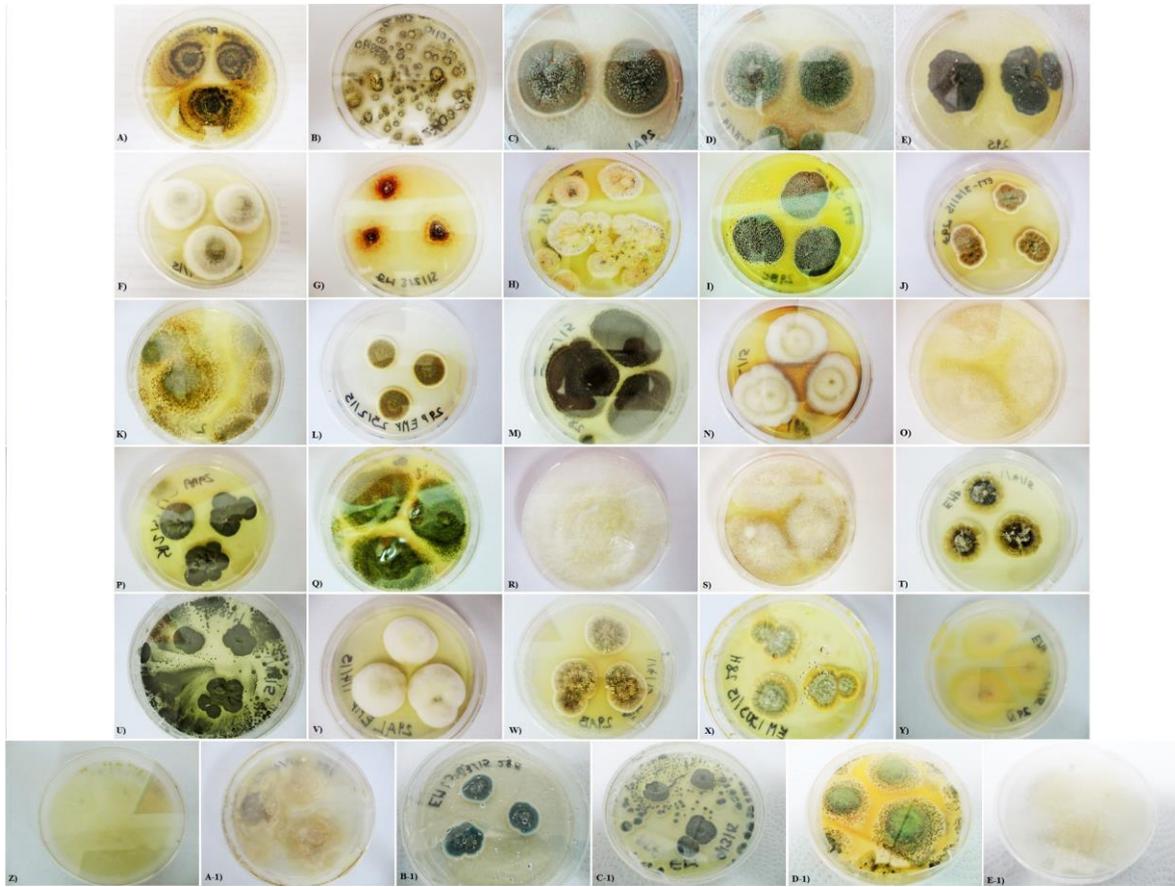


**Figura 28.** Gráficos de supervivencia derivados de la prueba Probit para estimar las concentraciones letales medias de las diferentes cepas comerciales de *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* probadas en bioensayo con concentraciones decimales, para definir una posible cepa como control biológico positivo en los bioensayos de ingestión con las cepas nativas de *B. thuringiensis* aisladas de las colonias de *A. colombica*. A) *Bti1A*, B) *Bti1B*, C) *Bti2B*, D) *Bti2D*, E) *Bti3A*, F) *Bti3B*, G) *Bti4*.

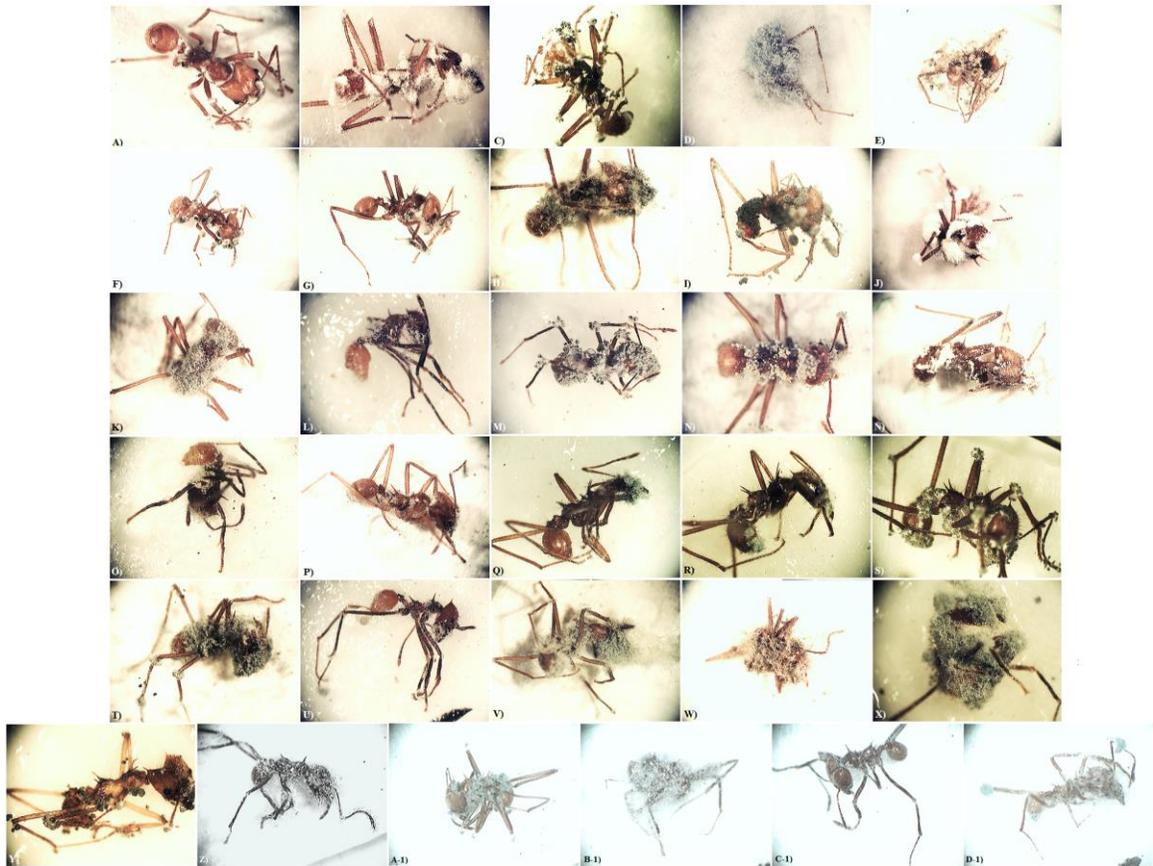
A partir de los gráficos de supervivencia y los percentiles derivados de los mismos, una vez que los datos fueron transformados al log<sub>10</sub> para estimar la concentración subletal, se obtuvo que las cepas que presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones probadas fueron *Bti1A*, *Bti1B*, *Bti2D* y *Bti4*. De estas 4 cepas, únicamente la cepa *Bti1A* se ajustó a la prueba de Probit en 74,5%, de acuerdo con los métodos de Deviance y Pearson; por lo que la dosis letal media calculada de esta cepa ( $1,28 \pm 2,667 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fue la que se utilizó como control biológico positivo.

### ANEXO 3

Ilustraciones de la colección de microhongos aislados de colonias de *Atta colombica* sometidos a  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  en pruebas de patogenicidad con obreras de *A. cephalotes* y colocados en cámara húmeda para observar la fase saprófita.



**Figura 29.** Vista macroscópica de la colección de 30 microhongos reactivados en medio PDA utilizado para establecer los bioensayos de patogenicidad contra obreras forrajeras de tamaño intermedio de *Atta cephalotes*. A) cepa de referencia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* DSMZ empleada como control biológico positivo, B) LD10314, C) 29BB, D) 29AI, E) 29S, F) 27A, G) 29N, H) 30U, I) 29BC, J) 29Z, K) 29AG, L) 29P, M) 28I, N) 28Y, O) 29AS, P) 29AA, Q) 28AQ, R) 29J, S) 29AC, T) 29AX, U) 28AM, V) 29AL, W) 29AB, X) 28H, Y) 29Ñ, Z) 30Y, A-1) 30Ñ, B-1) 28E, C-1) 30AK, D-1) 30N, E-1) 29K.

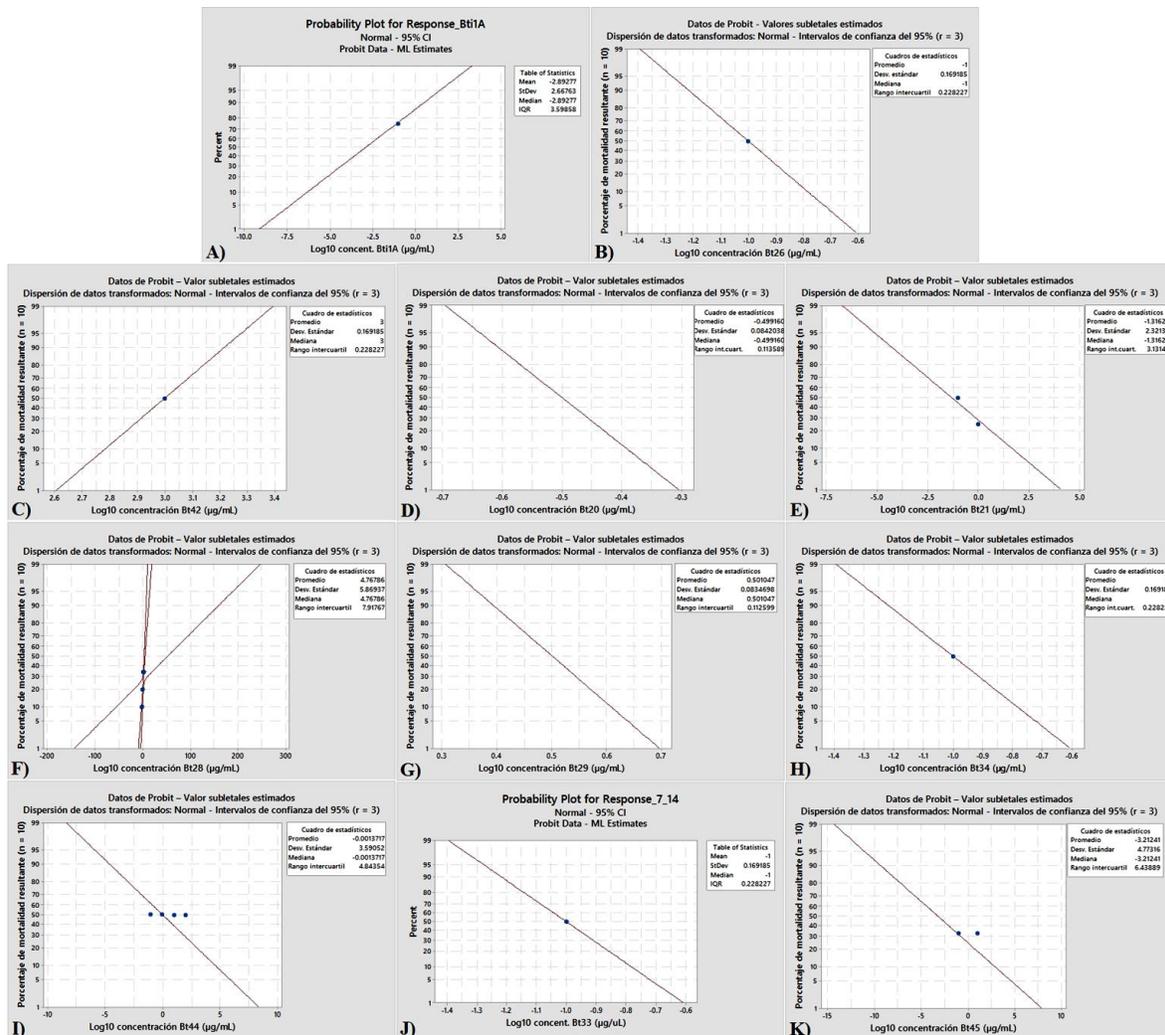


**Figura 30.** Vista macroscópica del proceso de micosis producido por la colección de 30 códigos de hongos evaluados sobre obreras de *Atta cephalotes* sometidas a una prueba de patogenicidad con inóculos de  $1 \times 10^4$  esporas  $\mu\text{L}^{-1}$  (1,5 X de magnificación en estereoscopio) y dispuestas en cámara húmeda. A) cepa de referencia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* DSMZ, B) LD10314, C) 30U, D) 30Ñ, E) 30N, F) 30AK, G) 29S, H) 29P, I) 29K, J) 29J, K) 29BB, L) 29AX, M) 29AL, N) 29AI, Ñ) 29AC, O) 29AB, P) 29AA, Q) 29Z, R) 29N, S) 29BC, T) 28I, U) 28H, V) 28E, W) 28AQ, X) 28AM, Y) 27A, Z) 28Y, A-1) 29AG, B-1) 29AS, C-1) 29Ñ, D-1) 30Y.

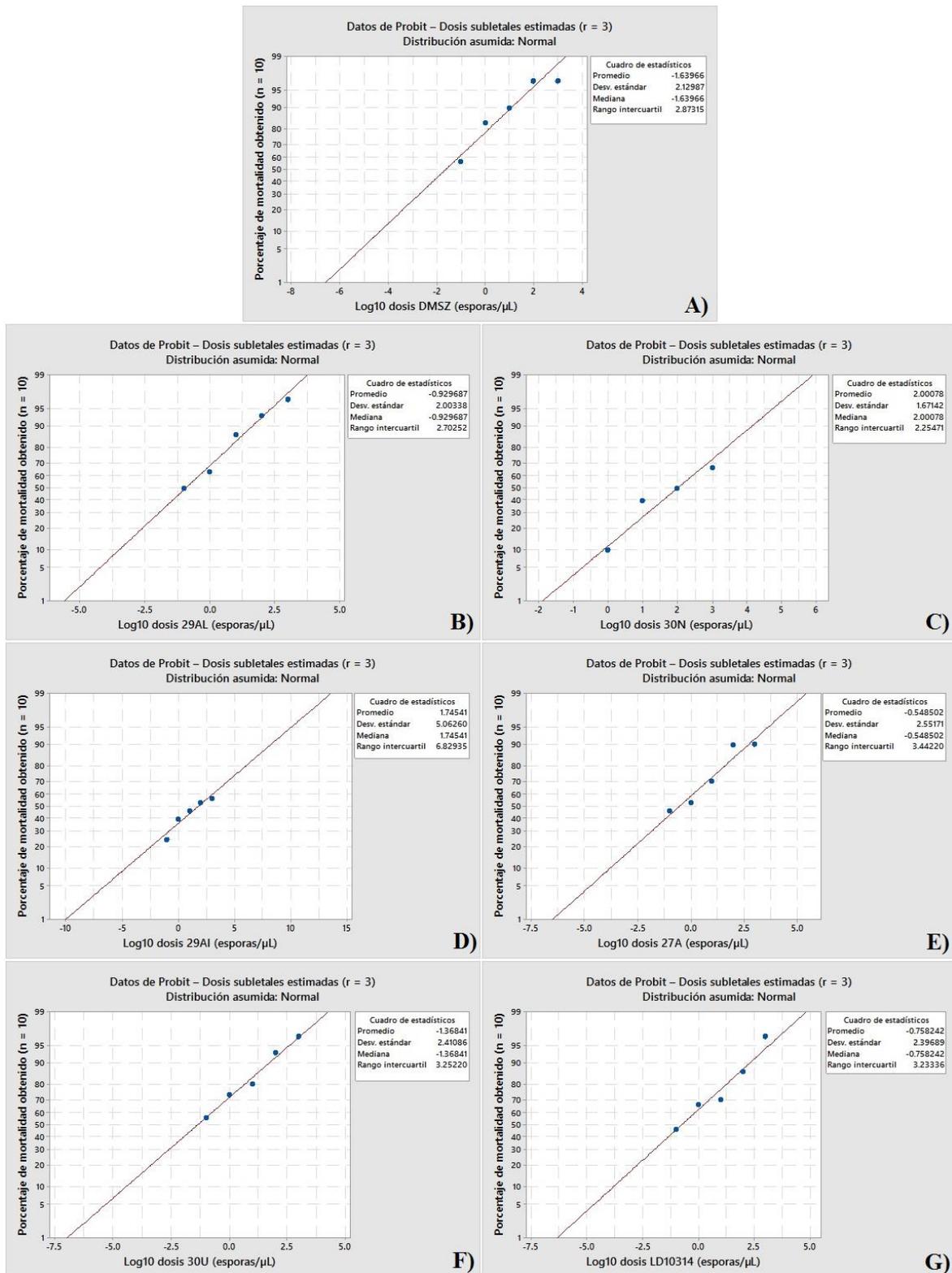
#### ANEXO 4

##### **Gráficos de probabilidad generados a partir de los análisis Probit con los bioensayos finos de las 15 cepas de *B. thuringiensis* y 6 códigos de hongos promisorios y con bioactividad para combatir obreras de *A. cephalotes***

Para estimar las concentraciones/ dosis subletales de las diferentes cepas de *Bt* o microhongos que presentaron mayor mortalidad en los bioensayos burdos desarrollados (por Fabián Cerdas y Esteve Mesén), fue necesario obtener gráficos de probabilidad de ajuste a la prueba de Probit y gráficos de supervivencia, los cuales se presentan en las figuras 31 (*B. thuringiensis*) y 32 (HEP prometedores).



**Figura 31.** Resumen gráfico de las regresiones lineales de Probit (probabilidad del 95%) de cada una de las 15 cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas por su actividad tóxica obtenida en los bioensayos burdos y una cepa comercial de *B. thuringiensis* subs. *israelensis* activa contra zompopas y usada como control positivo biológico en los bioensayos, para estimar la concentración letal media (LD<sub>50</sub>) de cada cepa: A) *Bti1A*, B) *Bt26*, C) *Bt42*, D) *Bt20*, E) *Bt21*, F) *Bt28*, G) *Bt29*, H) *Bt34*, I) *Bt44*, J) *Bt33*, K) *Bt45*.



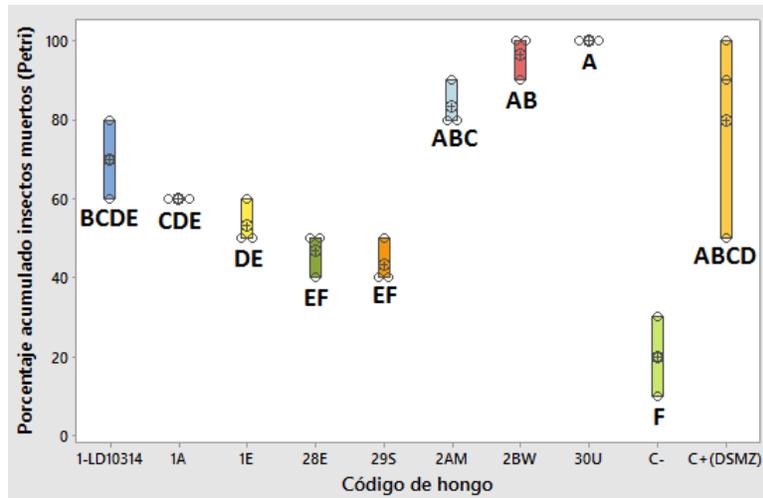
**Figura 32.** Gráficos de probabilidad derivados de la prueba Probit (95% de confianza) de cada uno de los 6 hongos entomopatógenos promisorios para estimar las dosis letales medias (LD<sub>50</sub>): A) cepa de referencia de *M. anisopliae*, DSMZ; B) 29AL, C) 30N, D) 29AI, E) 27A, F) 30U y G) LD10314.

## ANEXO 5

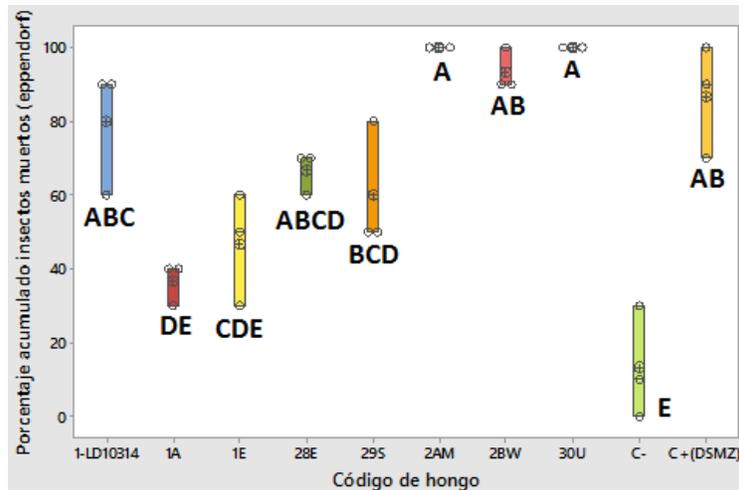
### Resultados preliminares sobre el bioensayo para estandarizar la prueba contacto-dependiente con microinóculos de conidias con placa *Petri* vs. tubo tipo *ependorf*

Miguel Pacheco y Esteve Mesén seleccionaron y reactivaron 4 códigos hongos cada uno (2 microhongos con alta capacidad infectiva probada previamente y 2 cepas que presentaron una bioactividad más baja) en medio PDA. Seguidamente, se establecieron bioensayos contacto-dependientes de esporas, aplicando 1  $\mu\text{L}$  de solución de esporas disuelto en Tween 80® 0,01% (v/v) sobre el mesotórax de zompopas forrajeras, tal como se mencionó en los métodos mencionados en este trabajo; y cada hormiga fue despuesta individualmente en en placas *Petri* o en tubos tipo *ependorf* de 2 mL para comparar cuán efectivos fueron ambos métodos.

Luego de recoger los resultados de ambas pruebas *post*-incubación de las unidades experimentales por 7 días, se llevaron a cabo análisis *One-Way* ANOVA para hacer comparaciones múltiples dentro de grupos y una prueba de *t* de Student para los 2 promedios de mortalidad acumulada bajo ambos métodos de inoculación de las zompopas para hacer comparaciones entre ambos grupos de bioensayos (Figura 33 vs Figura 34).

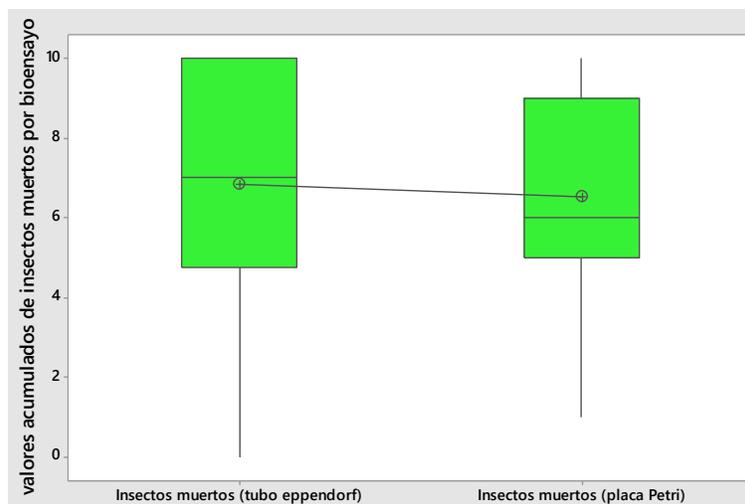


**Figura 33.** Gráfico Box-Plot de la mortalidad producida por las cepas de hongo ensayadas sobre obreras forrajeras de *Atta cephalotes* ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ) bajo bioensayo en placa *Petri*.



**Figura 34.** Gráfico Box-Plot de la mortalidad producida por las cepas de hongo ensayadas sobre obreras forrajeras de *Atta cephalotes* ( $n = 10$ ,  $r = 3$ ), mediante un bioensayo en tubo tipo *ependorf*.

Tal como se aprecia en las figuras 33 y 34, ambos métodos presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) al proceder a preparar el análisis de varianza ANOVA de una vía (una vez que se verificaron los supuestos estadísticos de parametricidad). Ahora bien, si se compara el grado de infectividad de las cepas probadas bajo ambos métodos, se observó que las cepas de hongos estadísticamente más bioactivas contra las obreras fueron 2AM, 2BW y 30U (mortalidad promedio por triplicado entre 80-100%), seguidas la cepa control positivo DSMZ ( $\bar{x} = 80$ -87%) y el código LD10314 ( $\bar{x} = 70$ -80%). En este caso, los controles negativos favorecieron más el alcance de valores de mortandad natural más bajo en tubo *ependorf* ( $\bar{x} = 13\%$ ) que en placa Petri ( $\bar{x} = 20\%$ ).



**Figura 35.** Gráfico Box-Plot de los resultados parciales obtenidos al comparar la mortalidad total de los tratamientos y controles evaluados mediante dos técnicas experimentales (tubo tipo *ependorf* o placa *Petri*).

Finalmente, para comparar si había suficiente evidencia estadística para asegurar que habían diferencias globales entre los contenedores utilizados para almacenar a las obreras sometidas a los diferentes tratamientos con los hongos, se procedió a hacer una prueba de *t* de Student para comparar los promedios acumulados de los 2 métodos (Figura 35) y se averiguó que la probabilidad de que ambos métodos fueran iguales estadísticamente fue de 67,9% ( $t = 0,42 - p = 0,679$ ), por lo que se descarta la hipótesis alternativa y se puede asumir que ambos métodos son similares, tanto a nivel de la patogenicidad alcanzada por los 8 grupos de hongos probados, como la mortalidad natural del control negativo o la alcanzada por el control positivo DSMZ.

### LITERATURA CITADA

- Abril, A.B. y Bucher, E.H. (2007). Genetic diversity of fungi occurring in nests of three *Acromyrmex* leaf-cutting ant species in Córdoba, Argentina. En: *Microbial Ecology*. 54: 417-423. DOI: 10.1603/022.038.0110.
- Ahmed, A.E.S. y Abdelbagi, A.O. (2014). Evaluation of the fumigant action of Garlic (*Allium sativum*) Aqueous Extract Against the Cowpea Seed Weevil *Callosobruchus maculatus*, (F.). En: *Universal Journal of Agricultural Research*. 2(2), 71-82. DOI: 10.13189/ujar.2014.020207.
- Akino, T. (2008). Chemical strategies to deal with ants: a review of mimicry, camouflage, propaganda, and phytomimesis by ants (Hymenoptera: Formicidae) and other arthropods. En: *Myrmecological News*. 11: 173-181. Recuperado de <http://www.behaeacol.amu.edu.pl/students/lectures/sygnaly/styled-5/downloads-15/files/8.1.b.pdf>
- Alean-Carreño, I. (2003). *Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca Aleurotrachelus sociales Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero* (Trabajo de Lic. Microbiología Agrícola y Veterinaria). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 107 p. Recuperado de [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/ipm/pdfs/tesis\\_irina\\_alean.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/ipm/pdfs/tesis_irina_alean.pdf)
- Anglada, M.; Saluso, A.; Ermácora, O.; Maidana, A.; Dans D. y Decuyper, C. (2013). Hormigas podadoras: estudios bioecológicos y alternativas de manejo en sistemas agrícolas y vegetación de monte en Entre Ríos. En: *Ciencia, Docencia y Tecnología*. 3(3): 1-19. Recuperado de [http://www.revistacdyt.uner.edu.ar/suplemento/wp-content/uploads/file/vol3n3/trabajos-completos/2106\\_Anglada.pdf](http://www.revistacdyt.uner.edu.ar/suplemento/wp-content/uploads/file/vol3n3/trabajos-completos/2106_Anglada.pdf)
- Araújo, J.P.M. y Hughes, D.P. (2014). Diversity of entomopathogens Fungi: which groups conquered the insect body? En: *bioRxiv*, 66 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/003756>
- Argôlo-Filho, R.C y Loguercio, L.L. (2014). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. En: *Insects*. 5: 62-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1673/031.010.14146>
- Arrieta, G. y Espinoza, A.M. (2006). Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. En: *Revista Biología Tropical*. 54(1): 13-27. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/449/44920186002.pdf>
- Augustyniuk-Kram, A.; y Kram, K.J. (2012). Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (review). En: J. A. Blanco (Ed.). *Forest Ecosystems – More Than Just Trees* (1<sup>era</sup> edición, p: 265-294). Rijeka, Croacia: InTech. DOI: 10:5772/30596

- Auson, K. S. (2011). Oh!m1gas: A biomimetic stridulation environment. En: Ursyn, A (Ed.). *Biologically-Inspired Computing for the Arts: Scientific Data through Graphics* (1<sup>era</sup> edición, p. 59-80). Pennsylvania: IGI Global. Recuperado de [http://kuaishen.tv/Ohm1gas/BiologicallyInspiredComputing\\_.pdf](http://kuaishen.tv/Ohm1gas/BiologicallyInspiredComputing_.pdf)
- Aylward, F.O.; Burnum-Johnson, K.E.; Tringe, S.G.; Teiling, C.; Tremmel, D.M.; Moeller, J.A.; Scott, J.J.; Barry, K.W.; Piehowski, P.D.; Nicora, C.D.; Malfatti, S.A.; Monroe, M.E.; Purvine, S.O.; Goodwin, L.A.; Smith, R.D.; Weinstock, G.M.; Gerardo, N.M.; Suen, G.; Lipton, M.S. y Currie, C.R. (2013). *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutting ant fungus garden. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 79(12): 3770. DOI: 10.1128.
- Azizoglu, U.; Yilmazb, S.; Ayvazc, A. y Karabörklü, S. (2015). Effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 spore-crystal mixture on the adults of egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). En: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 29(4), 653-658, DOI: 10.1080/13102818.2015.1038303.
- Babu, M.N. (2013). *Insecticidal activity of Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin isolates on Periplaneta americana (Linnaeus) and study on mechanism of insect kill* (Trabajo de Doctorado). Andhra University, Pradesh, India, 9 p. Recuperado de <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/8704>
- Back, E.J. (2011). *Insecticidal fusion proteins for the control of coleopteran pests* (Trabajo de Doctorado). Durham University, Durham, UK, 230 p. Recuperado de <http://etheses.dur.ac.uk/3283/>
- Baer, B. (2015). Female choice in social insects. En: A.V. Peretti y A. Aisenberg (Eds.). *Cryptip Female Choice in Arthropods: Patterns, Mechanisms and Prospects* (1<sup>era</sup> edición, p. 461-474). New York: Springer Cham Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-319-17894-3.
- Banderas-Gavilánez, A.E. (2004). *Control de Atta colombica con los hongos Trichoderma harzianum, Beauveria bassiana y el insecticida Malation* (Trabajo de Licenciatura en Ing. Agronómica). Escuela Agrícola Panamerica, Zamorano, Honduras, 18 p. Recuperado de <http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/2103>
- Barbero, E.; Patricelli, M.; Witek, E.; Balletto, L.; Casacci, L.P.; Sala, M. y Bonelli, S. *Myrmica* ants and their butterfly parasites with special focus on the acoustic communication. En: *Psyche: A Journal of Entomology*. Article ID: 725237, 11 p. Recuperado de [http://www.researchgate.net/profile/Francesca\\_Barbero/publication/236667907\\_Myrmica\\_ants\\_and\\_their\\_butterfly\\_parasites\\_with\\_special\\_focus\\_on\\_the\\_acoustic\\_communication/links/0deec518cb05cf1c4a000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Francesca_Barbero/publication/236667907_Myrmica_ants_and_their_butterfly_parasites_with_special_focus_on_the_acoustic_communication/links/0deec518cb05cf1c4a000000.pdf)
- Barta, M. (2010). Pathogenicity assessment of entomopathogenic fungi infecting *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae). En: *Czech Mycology*. 62(1), 67–78. DOI: 10.1093/jisesa/ieu044.
- Baverstock, J.; Roy, H.E. y Pell, J.K. (2010). Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. En: *BioControl*. 55, 89–102. DOI: 10.1007/s10526-009-9238-5.
- Becnel, J.J. (1997). Complementary techniques: Preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. En: L.A. Lacey (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2<sup>nda</sup> edición, p. 337-353). New York: Academic Press.
- Ben-Dov, E.; Saxena, D.; Wang, Q.; Manasherob, R.; Boussiba, S. y Zaritski, A. (2003). Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. En: *Journal of Applied Entomology*. 127: 146-152. DOI: 10.1046/j.1439-0418.2003.00732.x.
- Benckiser, G. (2010). Ants and sustainable agriculture: a review. En: *Agronomy for Sustainable Development*. 30: 191-199. DOI: 10.1051/agro/2009026

- Bender, R. (2009). Introduction to the use of regression models in epidemiology. En: M. Verma (Ed.). *Cancer Epidemiology* (1<sup>era</sup> edición, p. 179-195). New York: Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-59745-416-2\_9.
- Bennet, J.W. (2007). An overview of the genus *Aspergillus*. En: G.H. Goldman y S. A. Osmani (Eds.). *Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods* (1<sup>era</sup> edición, p. 1-13). Florida: CRC Press. DOI: 10.1201/9781420008517.sec1.
- Berbert-Molina, M.A.; Prata, A.M.; Pessanha L.G. y Silveira M.M. (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. En: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35(11), 1397-1404. DOI: 10.1007/s10295-008-0439-1.
- Boaretto, M.A.C. y Forti, L.C. (1997). Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. En: *Scientia Forestalis*. 11(30), 31-46. Recuperado de <http://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr30/cap3.pdf>
- Bolougne, I. (2011). *Évaluation du potentiel insecticide et antifongique sur Acromyrmex octospinosus (Reich) d'une sélection de plantes à usages ethnopharmacologiques TRAMIL*. (Trabajo de Doctorado en Biología). Université des Antilles et de la Guyane, Guadeloupe, Francia, 182 p. Recuperado de [www.theses.fr/2011AGUY0469.pdf](http://www.theses.fr/2011AGUY0469.pdf)
- Bolton, B.; Alpert, G.; Ward, P.S. y Naskrecki, P. (2007). Bolton's catalogue of ants of the World, 1758-2005 (1<sup>era</sup> edición en disco compacto). Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Boomsma, J.J.; Jensen, A.B.; Meyling, N.V. y Eilenberg, J. (2014). Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. En: *Annual Reviews of Entomology*. 59: 467-485. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-162054.
- Böröczky, K.; Wada-Katsumata, A.; Batchelor, D.; Zhukovskaya, M. y Schala, C. (2014). Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(9), 3615-3620. DOI: 10.1073/pnas.1212466110.
- Brandão, C.R.F.; Mayhé-Nunes, A.J. y Sanhudo, C.E.D. (2011). Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. En: Della-Lucia, T.M. (Ed.). *Formigas-cortadeiras da Bioecologia ao Manejo*. (1<sup>era</sup> edición, p. 27-48). Minas Gerais, Brasil: Editora da Universidade Federal de Viçosa.
- Branstetter, M.G. y Sáenz, L. (2012). Las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de Guatemala. En: E.B. Cano y J.C. Schuster (Eds.) *Biodiversidad de Guatemala* (1<sup>era</sup> edición, vol. 2, p. 221-268). Ciudad de Guatemala, Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala. Recuperado de [http://entomology.si.edu/StaffPages/BranstetterM/2012\\_LasHormigasGuatemala.pdf](http://entomology.si.edu/StaffPages/BranstetterM/2012_LasHormigasGuatemala.pdf)
- Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y.; Barnabé, S. & Valéro, J.R. (2007). *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism. En: *Process Biochemistry*. 42(5), 773-790. DOI: 10.1007/s00284-002-3767-9.
- Bravo, A y Silva-Filha, MH. 2002. Capítulo 3: Purificación de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Libro no publicado.
- Bravo, A.; Gill, S.S. & Soberón, M. (2008). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential of insect control. En: *Toxicon*. 49(4), 423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
- Bravo, A.; Gómes, I.; Porta, H.; García-Gómez, B.I.; Rodríguez-Almazan, C.; Pardo, L. & Soberón, M. (2012). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. En: *Microbial Biotechnology*. 6, 17-26. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x.

- Caldera, E.J.; Poulsen, M.; Suen, G. y Currie, C.R. (2009). Insect symbioses: a case study of past, present and future fungus-growing ant research. En: *Environmental Entomology*. 38(1), 78-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/022.038.0110>
- Caldwell, N.D. (2015). *Investigating biopesticides for red imported fire ants (Solenopsis invicta Buren): efficacy and behavioral modifications associated with entomopathogens* (Trabajo de Doctorado). North Carolina State University, Carolina del Norte, Estados Unidos, 86 p. Recuperado de <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/10168/1/etd.pdf>
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Generalidades de los hongos entomopatógenos. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos* (1<sup>era</sup> edición, p. 5-13). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.
- Carrera-Cabezas, M. de L. (2009). *Producción de Bacillus thuringiensis, Berliner a nivel de laboratorio* (Trabajo de Doctorado en Bioquímica Farmacia). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, 87 p. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/214/1/56T00188.pdf>
- Cavalcanti, R.S.; Reis, P.R.; Junior, A.M.; Altoé, B.F.; Franco, R.A. y Botelho de Carvalho, T.M. (2007). Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a três espécies de ácaros em cafeeiro. En: *Coffee Science*. 3(1), 68-75. Recuperado de <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/74>
- Cerdas-Araya, J.F. (2015). Prospección de *Bacillus thuringiensis* en colonias de hormigas zompopas (géneros *Atta* y *Acromyrmex*) para su potencial aplicación como agente de control biológico (Trabajo de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 195 p. Archivo impreso.
- Challacombe, J.F.; Altherr, M.R.; Xie, G.; Bhotika, S.S.; Brown, N.; Bruce, D.; Campbell, C.S.; Campbell, M.L.; Chen, J.; Chertkov, O.; Cleland, C.; Dimitrijevic, M.; Doggett, N.A.; Fawcett, J.J.; Glavina, T.; Goodwin, L.A.; Green, L.D.; Han, C.S.; Hill, K.K.; Hitchcock, P.; Jackson, P.J.; Keim, P.; Kewalramani, A.R.; Longmire, J.; Lucas, S.; Malfatti, S.; Martinez, D.; McMurphy, K.; Meincke, L.J.; Misra, M.; Moseman, B.L.; Mundt, M.; Munk, A.C.; Okinaka, R.T.; Parson-Quintana, B.; Reilly, L.P.; Richardson, P.; Robinson, D.L.; Saunders, E.; Tapia, R.; Tesmer, J.G.; Thayer, N.; Thompson, L.S.; Tice, H.; Ticknor, L.O.; Wills, P.L.; Gilna, P. y Brettin, T.S. (2007). The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. En: *Journal of Bacteriology*. 189, ID Article: 3680e3681. DOI: 10.1128/JB.00241-07.
- Chan, G.S.L.; Tan, L.Y.Y. y Goh, B.P.L. (2013). Development of a toxicity bioassay using fertilisation in the Green Mussel, *Perna viridis*, from exposure to copper and cadmium. En: *Asian Youth Journal of Biology*. 1, 1-12. Recuperado de [http://www.sibiol.org.sg/sites/default/files/AYJB/AYJB\\_2013v01\\_01-12.pdf](http://www.sibiol.org.sg/sites/default/files/AYJB/AYJB_2013v01_01-12.pdf)
- Coll, O.R. (2010). Detección y control de hormigas cortadoras (*Hymenoptera - Formicidae*) en plantaciones forestales en Misiones y noreste de Corrientes. En: *SAGPyA Forestal*. 28, 2-6. Recuperado de <http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/forestacion/revistas/revista28/hormig28.pdf>
- Coombs, M.R. (2013). *The thermal biology and thresholds of Phytoseiulus macropilis Banks (Acari: Phytoseiidae) and Balaustium hernandezii von Heyden (Acari: Erythraeidae)* (Trabajo de Doctorado). University of Birmingham, West Midlands, UK, 179 p. Recuperado de <http://etheses.bham.ac.uk/4913/>
- Conteiro-Castilho, A.M.; Fraga, M.E.; Aguilar-Menezes, E. de L. y da Rocha-Rosa, C.A. (2010). Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaericae* *Atta sexdens* rubropilosa em condições de laboratório. En: *Ciência Rural*. 40(6), 1243-1249. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000100>

- Correa, M.; Silva, P.; Wirth, R.; Tabarelli, M. y Leal, I. (2010). How leaf-cutting ants impact forests: drastic nest effects on light environment and plant assemblages. En: *Oecologia*. 162, 103-115. DOI: 10.1007/s00442-009-1436-4.
- Cortez-Madrugal, H. (2006). Efecto de Coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su Virulencia hacia *Toxoptera aurantii* Boyer. En: *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(1): 59-64. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/612/61224109.pdf>
- Cory, J.S. y Franklin M.T. (2012). Evolution and the microbial control of insects. En: *Evolutionary Applications*. 5(5), 455–469. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2012.00269.x.
- Cruz-Landim, C. y Costa-Leonardo, A.M. (1996). Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*. Río de Janeiro, Brasil: Ministerio de Salud. 91(1), 129-130. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v91n1/23.pdf>
- Herz, H.; de Sedas, A.; Aguilar, A.L.; Quiñones, M.; Wcislo, W.T. (2010). Epidemiología de una población de hormigas arrieras con un hongo parasítico (*Escovopsis* sp.) en sus cultivos. *XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología, del 25 aniversario de la Asociación Panameña para el Avance de la Ciencia*. Ciudad de Panamá, Panamá: Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), 555 p. Recuperado de <http://www.apanac.org.pa/congresos-antiores/xiii-congreso-de-apanac-xxv-anos>
- Currie, C.R. (2001). A community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. En: *Annual Review of Microbiology*. 55, 357-380. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.357.
- Currie, C.R.; Mueller, U.G. y Malloch, D. (1999). The agricultural pathology of ant fungus garden. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 96, 7998-8002. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7998.
- Davidson, E.W. (2012). History of Insect Pathoogy. En: F.E. Vega y H.K. Kaya (Eds.). *Insect Pathology* (2<sup>nda</sup> edición, p. 13-28). New York: Academic Press.
- de Castilhos-Fortes, R.; de Azambuja, A.O.; Pinto, L.M.N. y Fiúza, L.M. (2009). Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* aos insetos sociais. En: *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 38, 40-43. Recuperado de [http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio38/insetos\\_sociais.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio38/insetos_sociais.pdf)
- de Castilhos-Fortes, R.; Matsumura, A.T.S.; Diehl, E. y Fiúza, L.M. (2002). Susceptibility of *Nasutitermes ehrhardti* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies. En: *Brazilian Journal of Microbiology*. 33, 219-222. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000300006>
- De Crecy, E. (2012). Biocontrol microorganisms. *U.S. Patent No. 20150017125*. Recuperado de <http://patents.justia.com/patent/20150017125>
- de Faria, M.R. y Magalhães, B.P. (2009). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. En: *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 38, 18-21. Recuperado de <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio22/fungos.pdf>
- De Fine Licht, H.H. y Boomsma, J.J. (2010). Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. En: *Ecological Entomology*. 35, 259-269. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2311.2010.01193.x/abstract>
- de Maagd, R.A.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, N. y Schnepf, H. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. En: *Annual Review of Genomics*. 37, 409-433. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143042.

- De Melo, D.R., Reis, R.C. y Bittencourt, V.R. (2006). *In vitro* patogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). En: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 15(4), 157-62. Recuperado de [http://www.rbpv.ufrj.br/documentos/1542006/c154157\\_162.pdf](http://www.rbpv.ufrj.br/documentos/1542006/c154157_162.pdf)
- De Souza, C.R. (2012). *Perspectivas de utilização do fungo entomopatogênico Beauveria bassiana para controle microbiológico de formigas cortadeiras* (Trabajo de Licenciatura Ciencias Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 88 p. Recuperado de <https://ead.ufsc.br/biologia/files/2014/05/C%C3%A1ssia-Ribeiro-de-Souza.pdf>
- de Souza, D.J.; Lenoir, A.; Kasuya, C.M.; Ribeiro, M.M.R.; Devers, S.; Couceiro, J. da C. y Della-Lucia, T.M.C. (2013). Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. En: Brain, Behavior and Immunity. 28, 182-187. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.11.014.
- de Souza, D. (2008). *Comportement social et réponses immunitaires chez la fourmi Camponotus fellah: Implications de la bactérie endosymbiote Blochmannia* (Trabajo de Doctorado en Ciencias de la Vida). Université François Rabelais de Tours, Francia, 123 p. Recuperado de <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00359092/document>
- De Souza-Cardoso, S.R. (2010). *Morfogênese de ninhos iniciais de Atta spp. (Hymenoptera: formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos* (Trabajo de Doctorado en Agronomía con énfasis en Protección de Plantas). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, Brasil, 49 p. Recuperado de <http://base.repositorio.unesp.br/handle/11449/105448>
- Deist, B.R.; Rausch, M.A.; Fernández-Luna, M.T.; Adang, M.J. y Bonning, B.C. (2014). *Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy*. En: Toxins. 6, 3005-3027. DOI: 10.3390/toxins6103005.
- Della-Lucia, T.M.C (2003). Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. En: F. Fernández (Ed.). Introducción a las hormigas de la región Neotropical (2<sup>da</sup> edición, p. 337-350). Bogotá, Colombia: Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Recuperado de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Fernandez2003Hormigas24.pdf>
- Della-Lucia, T.M.C. y Vilela, E.F. (1993). Métodos atuais de controle e perspectivas. En: T.M.C. Della-Lucia (Ed.). As Formigas Cortadeiras (1<sup>era</sup> edición, p. 163-190). Belo Horizonte, Brasil: Folha de Viçosa.
- del Rincón-Castro, M.C.; Méndez-Lozano, J. e Ibarra, J.E. (2006). Caracterización de cepas nativas de bacillus thuringiensis con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). En: Folia Entomológica Mexicana, 45(2), 157-164. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42445206>
- Devi, K.U.; Padmavathi, J.; Rao, C.U.M. Khan, A.P. y Mohan, M.C. (2008). A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). En: Biocontrol Science and Technology. 18(9/10), 975-989. DOI: 10.1080/09583150802450451.
- Díaz-Ordaz, N.H.; Pérez, N. y Toledo, J. (2010). Patogenicidad de tres hongos entomopatógenos adultos de *Anastrepha obliqua* (Maquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. En: Acta Zoológica Mexicana, 26(3), 481-494. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57515502001>
- Diehl, E. y Junqueira, L.K. (2001). Seasonal variations of metapleural secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens piriventris* Santschi (Myrmicinae: Attini), and lack of fungicide effect on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. En: Neotropical Entomology. 30(4), 517-522. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000400002>

- Dijkstra, M.B.; Nash, D.R. y Boomsma, J.J. (2005). Self-restraint and sterility in workers of *Acromyrmex* and *Atta* leaf-cutter ants. En: *Insect Sociology*. 52, 67-76. DOI: 10.1007/s00040-004-0775-8.
- do Nascimento, R.R.; Schoeters, E.; Morgan, E.D.; Billen, J. y Stradling, D.J. (1996). Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). En: *Journal of Chemical Ecology*. 22(5), 987-1000. DOI: 10.1007/BF02029949.
- Donoso, E.; Tobar, B.D. y Jiménez-Guridi, M.B. (2011). Desarrollo tecnológico y adopción de insumos ecológicos: línea base 2010 y perspectiva 2030. Fitonova Ltd., Comisión Nacional de Agricultura Orgánica, Talca, Chile, 211 p. Recuperado de <http://www.fia.cl/Portals/0/BancoMundial/estudios%20complementarios/insumos%20Ecol%C3%B3gicos%20FIA-BM.pdf>
- Dos Santos, J.C.; Zanetti, R.; de Oliveira, D.F.; Gajo, G.C. y Alves, D.S. (2013). Plant-derived products for leaf-cutting ants control. En: S. Trdan (Ed.). *Development of Safer and More Effective Technologies* (1<sup>era</sup> edición, p. 259-295). Rijeka, Croacia: InTech. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/55035>
- Douglas, A.E. (2012). Alimentary canal, digestion and absorption. En: R.F. Chapman, S.J. Simpson y A.E. Douglas (Eds.). *Insects: Structure and Function* (5<sup>ta</sup> edición, p. 46-80). New York: Cambridge University Press.
- Douglas, A.E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. En: *Functional Ecology*. 23, 38-47. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x/abstract>
- Dowd, P.F. (1992). Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. En: *Journal of Industrial Microbiology*. 9, 149-161. Recuperado de <http://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=24916&content=PDF>
- European Food Safety Authority – EFSA. (2012). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* BIPESCO 5/F52. En: *EFSA Journal*. 10(1), 2498. Recuperado de <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2498.pdf>
- Elizondo-Wallace, D.E. (2012). *Evaluación del efecto antagonista ejercido por diversos aislamientos del hongo parásito Escovopsis sobre el hongo mutualista de las hormigas zompopas para su potencial empleo como agente de control biológico* (Trabajo de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 68 p.
- Elizondo-Wallace, D.E.; Vargas-Ascensio, J.G. y Pinto-Tomás, A. (2014). Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. En: *Microbiology*. 160, 1727-1736. DOI: 10.1099/mic.0.073593-0.
- Engel, P. y Moran, N.A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. En: *Federation of European Microbiological Society*. 37(5), 699-735. DOI: 10.1111/1574-6976.12025.
- Erthal Jr., M.; Silva, C.P. y Samuels, R.I. (2009). Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. En: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 152, 54-59. DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.09.086.
- Erthal Jr., M.; Silva, C.P. y Samuels, R.I. (2007). Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). En: *Journal of Insect Physiology*. 53, 1101-1111. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2007.06.01.
- Erthal Jr., M.; Silva, C.P. y Samuels, R.I. (2004). Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization. En: *Journal of Insect Pathology*. 50, 881-891. Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/8201133\\_Digestive\\_enzymes\\_of\\_leaf-](http://www.researchgate.net/publication/8201133_Digestive_enzymes_of_leaf-)

cutting\_ants\_Acromyrmex\_subterraneus\_%28Hymenoptera\_Formicidae\_Attini%29\_distribution\_in\_the\_gut\_of\_adult\_workers\_and\_partial\_characterization

- Escobar-Durán, R.; García-Cossio, F.; Rentería, N.Y. y Neita, J.C. (2002). *Manejo y control de hormiga arriera (Atta spp. & Acromyrmex spp.) en sistemas de producción de importancia económica en el Departamento del Chocó* (Proyecto de investigación en Recursos Naturales). Universidad del Chocó “Diego Luis Córdoba”, Quibdó, Colombia, 20 p.
- Estrada, C.; Rojas, E.I.; Wcislo, W.T. y Van Bael, S.A. (2014). Fungal endophyte effects on leaf chemistry alter the *in vitro* growth rates of leaf-cutting ants' fungal mutualist, *Leucocoprinus gongylophorus*. En: Fungal Ecology. 8, 37-45. Recuperado de [http://www.tulane.edu/~vanbael25/sunshine/Publications\\_files/Estrada%20et%20al.%20Fungal%20Ecology%202014.pdf](http://www.tulane.edu/~vanbael25/sunshine/Publications_files/Estrada%20et%20al.%20Fungal%20Ecology%202014.pdf)
- Evans, H.C.; Groden, E.; Bishchoff, J.F. (2010) New fungal pathogens of the red ant, *Myrmica rubra*, from the UK and implications for ant invasions in the USA. En: Fungal Biology. 114, 451-466. DOI: 10.1016/j.funbio.2010.03.007.
- Evans, H.C. y Samson, R.A. (1984). *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (*Formicidae*) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (Formicinae) complex. En: Transactions of British mycological Society. 82, 127-150. doi:10.1016/S0007-1536(84)80219-3.
- Fernández, C. y Juncosa, R. (2002). Biopesticidas ¿la agricultura del futuro? En: Phytoma. 141: 14-19. Recuperado de <https://infoxica2.files.wordpress.com/2010/01/1-12-biopesticidas-c2bf-la-agricultura-del-futuro.pdf>
- Fernández-Marín, H.; Nash, D.R.; Higginbotham, S.; Estrada, C.; van Zweden, J.S.; d'Ettorre, P.; Wcislo, W.T. y Boomsma, J.J. (2015). Functional role of phenylacetic acid from metapleural gland secretions in controlling fungal pathogens in evolutionarily derived leaf-cutting ants. En: Proceedings of The Royal Society B. 282(1807), 20150212. DOI: 10.1098/rspb.2009.0184.
- Fernández-Marín, H.; Zimmerman, J.K.; Nash, D.R.; Boomsma, J.J. y Wcislo, W.T. (2009). Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. En: Proceedings of The Royal Society B. 276, 2263-2269. DOI: 10.1098/rspb.2009.0184.
- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J. K., Rehner, S. A. and Wcislo, W. T. (2006). Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. En: Proceedings of The Royal Society B. 273, 1689–1695. DOI: 10.1098/rspb.2006.3492.
- Finney, D.J. (1980). *Probit Analysis* (1<sup>era</sup> edición, 333 p.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Fisher, P.J.; Stradling, D.J.; Sutton, B.C. y Petrini, L.E. (1996). Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. En: Mycological Research. 100(5), 541-546. DOI: 10.1016/S0953-7562(96)80006-2.
- Fisher, P.J.; Stradling, D.J. y Pegler, D.N. (1994). *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. En: Mycological Research. 98(8), 884-888. DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80259-1.
- Fiúza, L.M. (2009). Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. En: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 38, 32-35. Recuperado de <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio38/mecanismo.pdf>
- Frey-Klett, P.; Burlinson, P.; Deveau, A.; Barret, M.; Tarkka, M.; and Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. En: Microbiology and Molecular Biology Reviews. 75(4), 583-609. DOI: 10.1128/MMBR.00020-11.

- Folgarait, P. Goffré, D. y Marfetan, J.A. (2014). Methods for controlling leaf-cutting ants. *U.S. Patent No. 2014/0322339*. Recuperado de <http://www.google.com/patents/WO2013054272A2?cl=en>
- Folgarait, P.; Gorosito, N.; Poulsen, M. y Currie, C.R. (2011). Preliminary *in vitro* insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. *En: Current Microbiology*. 63, 250-258. DOI: 10.1007/s00284-011-9944-y.
- Freddie-Jeanie, R. y Errard, C. (2009). Hygienic behavior, liquid-foraging, and trophallaxis in the leafcutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. *En: Journal of Insect Science*. 63(9), 1-9. DOI: 10.1673/031.009.6301.
- Freitas, D.F. (2010). *Exigências térmicas do fungo cultivado por formigas cortadeiras do gênero Acromyrmex Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae)* (Trabajo de Maestría en Ciencias con énfasis en Entomología). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, 37 p. Recuperado de <http://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/123456789/2086>
- Fuchs, RL; Kishore, GM & MacIntosh, SC. (1993). Method for improving the efficacy of insect toxins. US Patent 5250515. St. Louis, Missouri: Monsanto. Recuperado de <https://www.google.com/patents/US5250515>
- Gabarty, A.; Salem, H.M.; Fouda, M.A.; Abas, A.A. e Ibrahim, A.A. (2014) Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hufn.). *En: Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7, 95-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2013.12.004>
- Gadagkar, R. (2000). The true origin of agriculture: credit goes to the ants. *En: Resonance*. 5(2), 76-79. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02838830>
- Gadau, J.; Helmkampf, M.; Nygaard, S.; Roux, J.; Simola, D.F.; Smith, C.R.; Wurm, Y. y Smith, C.D. (2012). The genomic impact of 100 million years of social evolution in seven ant species. *En: Trends in Genetics*. 28(1), 14–21. DOI: 10.1016/j.tig.2011.08.005.
- Galvanho Da Costa, J.P. (2009). *A interação entre imidaclopride e Beauveria bassiana na reposta comportamental de Acromyrmex subterraneus subterraneus (Hymenoptera:Formicidae:Attini)* (Trabajo de Maestría en Biociencias y Biotecnología. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 61 p. Recuperado de <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp113759.pdf>
- Gao, L., Liu, X.-Z.; Sun, M.-H.; Li, S.-D. y Wang, J.-L. (2009). Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *En: Mycoscience*. 50, 317–321. DOI: 10.1007/s10267-009-0483-3.
- Gillespie, J.P.; Kanost, M.R. y Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *En: Annual Review of Entomology*. 42, 611-643. DOI: 10.1146/annurev.ento.42.1.611.
- Gillis, A.; Dupres, V.; Delestrait, G.; Mahillon, J. y Dufrêne, Y.F. (2012). Nanoscale imaging of *Bacillus thuringiensis* flagella using atomic force microscopy. *En: Nanoscale*. 4(5), 1387-1806. DOI: 10.1039/c1nr11161b.
- Giraldo, C.; Reyes, L.K.; Molina, J.J. (2011). Manejo de artópodos y parásitos en sistemas silvopastoriles intensivos (Manual 2, 51 p). *Proyecto Ganadería Colombiana Sostenible*, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.cipav.org.co/pdf/2.Manejo.Integrado.de.Plagas.pdf>

- Giraldo, S.M.V. (2014). *Efecto de microorganismos entomopatógenos y antagonicos como potenciales agentes de control biológico de hormiga arriera Atta cephalotes (Hymenoptera: Myrmecinae)* (Trabajo de Maestría en Ciencias-Biología). Universidad del Valle, Cali, Colombia, 114.
- Goel, M.K.; Khanna, P. y Kishore, J. (2010). Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. En: *International Journal of Ayurveda Research*. 1(4), 274-278. DOI: 10.4103/0974-7788.76794.
- Goetel, M.S. e Inglis, D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En: L. Lacey (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology* (1<sup>era</sup> edición, p. 213-249). San Diego, Londres: American Press.
- Goffré, D. y Folgarait, P.J. (2015) *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 130, 107-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.008>
- Gökçe, A. y Er, M.K. (2005). Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. En: *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 29, 331-339. Recuperado de <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tbtkagriculture/article/view/5000027326>
- Griffitts, J.S. y Aroian, R.V. (2005). Many roads to resistance: how invertebrates adapt to *Bt* toxins. En: *Bioassays*. 27(6), 614-24. DOI: 10.1002/bies.20239.
- Gronenberg, W. (2006). Structure and function of ant (Hymenoptera: Formicidae) brains: Strength in numbers. En: *Myrmecological News*. 11, 25-36. Recuperado de [http://ftp.eebweb.arizona.edu/faculty/dornhaus/courses/read\\_ECOL597S/AntBrainRev%20MyrmecolNews08.pdf](http://ftp.eebweb.arizona.edu/faculty/dornhaus/courses/read_ECOL597S/AntBrainRev%20MyrmecolNews08.pdf)
- Grund, J. y Hirsch, L. (2010). The potential of entomopathogenic fungi isolates as an environmental friendly management option against *Acanthoscelides obtecus*. En: *Epsilon Archive for Student Projects*. Uppsala, Suecia: Swedish University of Agricultural Sciences, 26 p. Recuperado de <http://stud.epsilon.slu.se/2178/>
- Gutiérrez, A.I. y Saldarriaga, Y. (2004). Observación de la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en soldados *Nasutitermes* spp. (Isoptera: Termitidae). En: *Revista Colombiana de Entomología*. 30(2), 151-156. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v30n2/v30n2a05.pdf>
- Harrison, L.R. y Bonning, B.C. (2010). Proteases as insecticidal agents. En: *Toxins*. 2, 935-953. DOI: 10.3390/toxins2050935.
- Hart, A.G.; Bot, A.N.M y Brown, M.J.F. A colony-level response to disease control in a leaf-cutting ant. En: *Naturwissenschaften*. 89(6), 275-277. Disponible en [http://www.researchgate.net/profile/Mark\\_Brown8/publication/11235494\\_A\\_colony-level\\_response\\_to\\_disease\\_control\\_in\\_a\\_leaf-cutting\\_ant/links/09e41507d79b0b510f000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Mark_Brown8/publication/11235494_A_colony-level_response_to_disease_control_in_a_leaf-cutting_ant/links/09e41507d79b0b510f000000.pdf)
- Hayes, W.J.Jr. (1982). Pesticides derived from plants and other organisms. *Pesticides Studied in Man* (1 edición, p. 75-111). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Headrick, D.H. (2009). Anatomy: head, thorax, abdomen, and genitalia. En: V.H. Resh y R.T. Cardé (Eds.). *Encyclopedia of Insects* (2<sup>nda</sup> edición, p. 11-21). London, Inglaterra: Elsevier. Recuperado de <http://naldc.nal.usda.gov/download/39273/PDF>
- Heinze, J. y Walter, B. (2010). Moribund ants leave their nests to die in social isolation. En: *Current Biology*. 20, 249-252. DOI: 10.1016/j.cub.2009.12.031.

- Heong, K.L.; Tan, K.H.; Fabellar, L.T. y García, C.P.F. (2011). Toxicological statistics. *Research Methods in Toxicology and Insecticide Resistance Monitoring in Rice Planthoppers* (1<sup>era</sup> edición, p. 37-43). Laguna, Las Filipinas: International Rice Research Institute. Recuperado de <http://ageconsearch.umn.edu/handle/164481>
- Herrera, E.E.; Sánchez, V. y Blanco, H. (2013). Formulación de gránulos bases para la incorporación de ingredientes activos con efectos biológicos sobre el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras del género *Atta*. En: *Agronomía Costarricense*. 37(2), 55-69. Recuperado de [www.mag.go.cr/rev\\_agr/v37n02\\_055.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v37n02_055.pdf)
- Herrera, M. y Valenciaga, N. (2011). Peculiaridades de las bibijaguas (*Attini: Acromyrmex* y *Atta*) que hacen difícil su control. En: *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 45(3), 217-225. Recuperado de <http://www.ciencia-animal.org/cuban-journal-of-agricultural-science/articles/V45-N3-Y2011-P217-Madelen-Herrera.pdf>
- Herrera-Salazar, E.E. (2009). *Desarrollo de una formulación granular base para el control biológico de las hormigas forrajeras (Atta spp.)* (Trabajo de Maestría en Agricultura Ecológica). Cartago, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 73.
- Herz, H.; de Sedas, A.; Aguilar, A.L.; Quiñones, M.; Wcislo, W.T. (2010). Epidemiología de una población de hormigas arrieras con un hongo parasítico (*Escovopsis* sp.) en sus cultivos. *XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología, del 25 aniversario de la Asociación Panameña para el Avance de la Ciencia*. Ciudad de Panamá, Panamá: Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), 555 p. Recuperado de <http://www.apanac.org.pa/congresos-antecedentes/xiii-congreso-de-apanac-xxv-anos>
- Herz, H. (2007). Assessing herbivory rates of leaf-cutting ants (*Atta colombica*) colonies through short-term refuse deposition counts. En: *Biotropica*. 39(4), 476-481. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2007.00283.x.
- Hoddle, M.S. (2009). Biological control of pests. En: V.H. Resh y R.T. Cardé (Eds.). *Encyclopedia of Insects* (2<sup>da</sup> edición, p. 91-101). London, Inglaterra: Elsevier. Recuperado de <http://naldc.nal.usda.gov/download/39273/PDF>
- Hoeschle-Zeledon, I.P.; Neuenschwander, P. y Kumar, L. (2013). Regulatory challenges for biological control. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria (SP-IM Secretariat), 43 p.
- Hölldobler, B. y Wilson, O. (2011). The ascent of the leafcutters. En: B. Hölldobler y O. Wilson. *The leaf-cutting ants: civilization by instinct* (1<sup>era</sup> edición, p. 43-75). New York: W. W. Norton & Company.
- Howard, J. (1988). Leaf-cutting ant diet selection: the role of nutrients, water and secondary chemistry. En: *Chemistry*. 68, 503-513. DOI: 10.1017/S0007485300050550
- Hughes, W.O.H; Pagliarini, R. Madsen, H.B.; Dijkstra, M.B. y Boomsma, J.J. (2008). Antimicrobial defense shows and abrupt evolutionary transition in the fungus-growing ants. En: *Evolution*. 62(5), 1252-1257. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2008.00347.x.
- Hughes, W.O.H. y Boomsma, J.J. (2004). Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. En: *Proceedings of the Royal Society London B (Supplementary)*. 271, S104–S106. DOI 10.1098/rsbl.2003.0115.
- Hughes, W.O.H.; Thomsen, L.; Eilenberg, J. Y Boomsma, J.J. (2004) Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 85, 46-53. DOI: 10.1016/j.jip.2003.12.005.
- Humber, R.A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En: L.A. Lacey (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2<sup>da</sup> edición, p. 151-187). New York: Academic Press.

- Hussien-Ibrahim, A.I. (2012). *Evaluación de la bacteria transformada Paenibacillus polymyxa, que expresa la toxina Cry1C de Bacillus thuringiensis, como bioinsecticida y biofertilizante en algodón* (Trabajo de Doctorado). Universidad de Córdoba, Córdoba, España, 123 p.
- Ichinose, K.; Rinaldi, I. y Forti, L.C. (2004). Winged leaf-cutting ants on nuptial flights used as transport by *Attacobius* spiders for dispersal. En: *Ecological Entomology*. 29, 628-631. DOI: 10.1111/j.0307-6946.2004.00640.x.
- Inglis, G.D.; Enkerli, J. y Goettel, M.S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. En: L.A. Lacey (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2<sup>da</sup> edición, p. 189-253). New York: Academic Press.
- Isenring, R. y Neumeister, L. (2010). Insecticides for control of pest insects in FSC certified forests in Brazil – recommendations by technical advisors. *Programa Cooperativo sobre Certificação Florestal, São Paulo, Brasil*, 99 p. Recuperado de [http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA\\_Rec\\_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-Fipronil-Sulfluramid\\_BR\\_2010.pdf](http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA_Rec_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-Fipronil-Sulfluramid_BR_2010.pdf)
- Isman, M.B. (2011). Insect Bioassay Workshop. ADAPPT Annual Meeting. African Dryland Alliance for Pesticidal Plant Technologies, Lusaka, Zambia. Recuperado de [http://projects.nri.org/adappt/docs/M\\_Isman\\_bioassays.pdf](http://projects.nri.org/adappt/docs/M_Isman_bioassays.pdf)
- Iwanaga, S. y Lee, B.L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. En: *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38, 128-150. DOI: 10.1128/9781555816872.ch1.
- Jabbour, R.; Crowder, D.W.; Aultman, E.A. y Snyder, W.E. (2011) Entomopathogen biodiversity increases host mortality. En: *Biological Control*. 59(2), 277-283. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2011.07.016.
- Jaccoud, D.B.; Hughes, W.O.H. y Jackson, C.W. (1999). The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. En: *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 93, 51–61. DOI: 10.1046/j.1570-7458.1999.00561.
- Jackson, M.A.; Dunlap, C.A. y Jaronski, S.T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. En: *BioControl*. 55(1), 129-145. DOI: 10.1007/s10526-009-9240-y.
- Jacob, T.K.; Senthil-Kumar, C.M. y Devasahayam, S. (2014). Entomopathogens as potential weapons for insect pests. En: *Spice India*. 27(7), 12-15. Recuperado de <http://220.227.138.214:8080/dspace/bitstream/123456789/1143/3/Entopathogen.pdf>
- Jisha, V.N.; Smitha, R.B. y Benjamin, S. (2013). An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. En: *Advances in Microbiology*. 3, 462-472. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.35062>
- Johny, S.; Kyei-Poku, G.; Gauthier, D.; van Frankenhuyzen, K. y Krell, P.J. (2012). Characterization and virulence of *Beauveria* spp. recovered from emerald ash borer in southwestern Ontario, Canada. En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 111, 41-49. DOI: 10.1016/j.jip.2012.05.008
- Jurat-Fuentes, J.L. y Jackson, T.A. (2012). Bacterial entomopathogens. En: F.E. Vega y H.K. Kaya (Eds.). *Insect Pathology* (2<sup>nda</sup> edición, p. 265-349). New York: Academic Press.
- Jurenka, R.A. (2008). Insect physiology. *Insect Physiology and Biochemistry* (2<sup>nda</sup> edición, 715 p). Florida: CRC Press.
- Kang, S.K. (2006). *Quantitative evaluation of recovery methods for Listeria monocytogenes applied to stainless steel* (Trabajo de Maestría). Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA, 78 p.

- Recuperado de <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-04132006-125533/unrestricted/Thesis.Kang.ETD.Final.05.06.pdf>
- Kaltenpoth, M. y Engl, T. (2014). Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. En: *Functional Ecology*. 22(2), 315-327. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2435.12089/abstract>
- Kaya, H.K. y Vega, F.E. (2012). Scope and basic principles of insect pathology. En: F.E. Vega y H.K. Kaya (Eds.). *Insect Pathology* (2<sup>nda</sup> edición, p. 1-12). New York: Academic Press.
- Keller, S.; Kalsbeek, V. y Eilenberg, J. (1999). Redescription of *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresenius. En: *Sydowia*. 51(2), 197-209. Recuperado de [http://www.landesmuseum.at/pdf\\_frei\\_remote/Sydowia\\_51\\_0197-0209.pdf](http://www.landesmuseum.at/pdf_frei_remote/Sydowia_51_0197-0209.pdf)
- Khan, S.; Guo, L.; Maimaiti, Y.; Mijit, M. y Qiu, D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. En: *Molecular Plant Breeding*. 3(7), 63-79. doi: 10.5376/mpb.2012.03.0007.
- Klingenberg, C. (2006). *Estudo taxonômico e de aspectos dabiologia do Attini monomórfico Mycetophylax (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae)* (Trabajo de Doctorado en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología). Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil, 498 p.
- Kolczarek, R. (2015). The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from cultivated perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). En: *Journal of Ecological Engineering*. 16(1), 32-37. DOI: 10.12911/22998993/583.
- Kondo, S.; Ohba, M. y Ishii, T. (1995). Comparative susceptibility of chironomid larvae (Dipt., Chironomidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* with special reference to altered susceptibility due to food difference. En: *Journal of Applied Entomology*. 119, 123-125. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1995.tb01256.x.
- Konrad M.; Vyleta M.L.; Theis F.J.; Stock M.; Tragust S.; Klatt, M.; Drescher, V.; Marr, C.; Ugelvig, L.V. y Cremer, S. (2012) Social Transfer of Pathogenic Fungus Promotes Active Immunisation in Ant Colonies. En: *PLoS One*. 10(4), e1001300. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001300.
- Kooij, P.W.; Liberti, J.; Giampoudakis, K.; Schiøtt, M. y Boomsma, J.J. (2014). Differences in forage-acquisition and fungal enzyme activity contribute to niche segregation in Panamanian leaf-cutting ants. En. PLoS ONE: 9(4), [e94284]. DOI: 10.1371/journal.pone.0094284.
- Krishnan, V. (2013). *Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium Bacillus thuringiensis* (Trabajo de Doctorado). University of Sussex, South East England, Reino Unido, 260. Recuperado de <http://sro.sussex.ac.uk/47169/>
- Lachaud, J.-P.; Lenoir, A. y Witte, V. (2012). Ants and their parasites. En: *Psyche*. Article ID: 342157. 5 p. DOI: 10.1155/2012/342157
- Lacerda, S.G. (2009). Defense mechanisms in social insects against pathogens. En: *Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde*. 4(1), 31-50. Recuperado de <http://www.faculadadedofuturo.edu.br/revista/2009/pdfs/ARTIGOFABRICIA.pdf>
- Lacey, L. A. (2006). *An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology*, (3rd ed.). Society for Invertebrate Pathology
- Ortiz, A. y Orduz, S. (2000). *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. En: *Mycopathologia*. 150: 53-60. DOI: 10.1023/A:1010843413085.

- Landa, V.; Šula, J.; Marec, F.; Matha, V. y Soldán, T. (1991). Methods for assessing exposure of insects. En: R.G. Tardiff y B.D. Goldstein (Eds.). *Methods for assessing exposure of human and non-human biota* (1 edición, vol. 24, p. 249-266). Chichester, New York: SCOPE, John Wiley & Sons Ltd.
- Lange, L. (2014). The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. En: *IMA Fungus*. 5(2), 463-471. DOI: 10.5598/imafungus.2014.05.02.10.
- Lemus, Y.A.; Rodríguez, G.M.; Cuervo, R.A.; Durán-Venegas, J.A.; Zuluaga, C.L. y Rodríguez, G. (2008). Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). En: *Revista Científica Guillermo de Ockham*. 6(1), 91-98. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=105312257007>
- Lecadet, M.M.; Blondel, M.O. y Ribier, J. (1980). Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. Berliner 1715 using bacteriophage CP-54Ber. En: *Journal of General Microbiology*. 121, 203-212. Recuperado de <http://mic.sgmjournals.org/content/121/1/203.long>
- Lenoir, A.; Cuisset, D. y Hefetz, A. (2001). Effects of social isolation on hydrocarbon pattern and nestmate recognition in the ant *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera, Formicidae). En: *Insects Sociaux*. 48, 101-109. DOI: 10.1007/PL00001751.
- Levin, D.B. (2009). Human health effects resulting from exposure to *Bacillus thuringiensis* applied during insect control programmes. En: A.E. Hajek, T.R. Glare y M. O'Callaghan. (Eds.). *Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods*. (1<sup>era</sup> edición, vol. 6, p. 291-303). New York, US, Springer Publishing.
- Lingathurai, S.; Pushpalatha, M.; Raveen, R.; Vinolaya-Priyatharsini, P.; Sathikumar, R. y Sathya-Narayanan, P.C. (2015). Ecotoxicological performances and biochemical effect of selected pesticides on *Trichogramma chilonis* Ishii. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). En: *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 3(1), 109-114. Recuperado de <http://www.entomoljournal.com/vol3Issue1/pdf/2-6-3.1.pdf>
- Link, D. (1997). Hormigas cortadoras, hábitos y su control. *XII Jornadas Forestales Entre Ríos*, Entre Ríos, Argentina, 8 p. Recuperado de [http://64.76.123.202/new/0-0/forestacion/\\_archivos/\\_biblioteca/68%20%20link%2097.pdf](http://64.76.123.202/new/0-0/forestacion/_archivos/_biblioteca/68%20%20link%2097.pdf)
- Little, A.E.F.; Murakami, T.; Mueller, U.G. y Currie, C.R. (2006). Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus garden. En: *Biology Letters*. 2, 12-16. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2003.12036.x.
- Liu, H.-P., Skinner, M., Brownbridge, M., Parker, B.L., 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 82, 139–147. DOI: 10.1080/09583157.2014.931351.
- Lopez, E. y Orduz, S. (2003). *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. En: *Biological Control*. 27, 194-200. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964403000057>
- López-Riquelme, G.O. y Ramón, F. (2010). El mundo feliz de las hormigas. En: *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 13(1), 35-48. Recuperado de <http://www.revistas.unam.mx/index.php/tip/article/view/43129>
- Loureiro, E. de S. y Monteiro, A.C. (2005). Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera : Formicidae). En: *Árvore*. 29(4), 116-127. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000400007>.

- Loreto, R.G.; Elliot, S.L.; Freitas, M.L.R.; Pereira, T.M., y Hughes, D.P. (2014). 3D mapping of disease in ant societies reveals a strategy of specialized parasite. En: *bioRxiv*, 26 p. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1101/003574>
- Machado, V. y Fiúza, L.M. (2009). Evolução e manejo da resistência de insetos. En: *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 38, 68-74. Recuperado de <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio38/evolucao.pdf>
- Mahr, S.E.R.; Cloyd, R.A.; Mahr, D.L. y Sadof, C.S. (2001). Overview of biological control of greenhouse pests. *Biological Control of Insects and Other Pests of Greenhouse Crops* (1<sup>era</sup> edición, p. 88-92). Madison: University of Wisconsin Press.
- Mandal, L.; Verma, S.K. y Katara, J.L. (2015). *Bacillus thuringiensis*: Importance and Present Scenario. En: *Popular Kheti*. 2(2): 188-197. DOI: 10.1093/ps/84.3.385.
- Mangone, D.M. y Currie, C.R. (2007). Garden substrate preparation behaviours in fungus-growing ants. En: *Canadian Entomology*. 139, 841-849. DOI: <http://dx.doi.org/10.4039/n06-105>
- Martin, J.S. y Martin, M.M. (1970). The presence of protease activity in the rectal fluid of *Attine* ants. En: *Journal of Insect Physiology*. 16, 227-232. Recuperado de <http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/32816/0000190.pdf?sequence=1>
- Mascarin, G.M. (2015). *Production by solid-state and liquid fermentation and formulation of virulent strains of the fungal entomopathogens Beauveria bassiana and Isaria fumosorosea* (Trabajo de Doctorado en Entomología). University of São Paulo, São Paulo, Brasil, 187 p. Recuperado de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-28042015-111429/en.php>
- Masiulionis, V.E. (2013). *Fungi associated with Acromyrmex and basal Attini ants from Argentina and Brasil* (Trabajo de Maestría en Ciencias Biológicas con énfasis en Microbiología Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Río Claro, Brasil, 171 p. Recuperado de [http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103971/masiulionis\\_ve\\_dr\\_rcla.pdf?sequence=1](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103971/masiulionis_ve_dr_rcla.pdf?sequence=1)
- Mattoso, T.C.; Moreira, D.D.O. y Samuels, R.I. (2011). Symbiotic bacteria on the cuticle of leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. En: *Biology Letters*. 8, 461-464. DOI: 10.1098/rsbl.2005.0371.
- McGuire, M.R.; Galan-Wong, L.J. y Tamez-Guerra, P. (1997). Bacteria: bioassay of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran larvae. En: L. Lacey (Ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology* (1<sup>era</sup> edición, p. 91-99). San Diego, Londres: American Press.
- Mehdiabadi, N.J. y Schultz, T.R. (2010). Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). En: *Myrmecological News*. 13, 37-55. Recuperado de [http://entomology.si.edu/StaffPages/Mehdiabadi/2010\\_Mehdiabadi&Schultz\\_MyrNew.pdf](http://entomology.si.edu/StaffPages/Mehdiabadi/2010_Mehdiabadi&Schultz_MyrNew.pdf)
- Meirelles, L.A., Mendes, T.D.; Solomon, S.E.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C. y Rodrigues, A. (2014). Broad *Escovopsis*-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. En: *Environmental Microbiology Reports*. 6(4), 339-345. DOI: 10.1111/1758-2229.12132.
- Merino, L.; France, A. y Gerding, M. (2007). Selection of native fungi strains pathogenic to *Vespula germanica* (Hymenoptera: Vespidae). En: *Agricultura Técnica (Chile)*. 67(4), 335-342. DOI: 10.4067/S0365-28072007000400001.

- Merzendorfer, H. y Zimoch L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. En: *The Journal of Experimental Biology*. 206, 4393-4412. DOI: 10.1242/jeb.00709.
- Mena-Córdoba, S.V. (2010). *Evaluación de hongos entomopatógenos como potencial biocontrolador de la hormiga arriera Atta colombica (G.) del municipio de Lloró-Chocó*. (Trabajo de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Entomología). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 88 p. Recuperado de <http://core.ac.uk/download/pdf/11054236.pdf>
- Mikheyev, A.S.; Mueller, U.G.; y Boomsma, J.J. (2007). Population genetic signatures of diffuse evolution between leaf-cutting ants and their cultivar fungi. En: *Molecular Ecology*. 16, 209-216. DOI: 10.1086/393867.
- Miori de Zarzuela, M.M.; Leite, L.G.; Marcondes, J.E. y de Carvalho-Campos, A.E. (2012). Entomopathogens isolated from invasive ants and tests of their pathogenicity. En: *Psyche*. Article ID: 975069, 9 p. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2012/975069>
- Miranda-Duarte, A.P. (2010). *Fungos fitopatógenos associados às formigas cortadeiras (Formicidae: tribo Attini)* (Trabajo de Bachillerato en Ecología). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Río Claro, Brasil, 84 p.
- Moreira, A.A.; Forti, L.C.; Boaretto, M.A.C.; Andrade, A.P.P.; Lopes, J.F.S. y Ramos, V.M. (2004). External and internal structure of *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) nests. En: *Journal of Applied Entomology*. 128, 204-211. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2004.00839.x.
- Morgan, R.C. (2008). Natural history notes and captative management of leaf-cutting ants in the genus *Atta*. *Invertebrates in Conservation and Education Conference Proceedings* (p. 77-93). Cincinnati Zoo & Botanical Garden, Cincinnati, Ohio. Recuperado de <http://www.antweb.org/antblog/Leaf%20cutting%20ants-IECC%2008.pdf>
- Motta-Delgado, P.A. y Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. En: *Ambi-Agua*. 6(2), 77-90. DOI: 10.4136/ambi-agua.187.
- Mouatcho, J.C. (2010). *The use of entomopathogenic fungi against Anopheles funestus Giles (Diptera: Culicidae)* (Trabajo de Doctorado). University of the Witwatersrand, Johannesburg, Sudáfrica, 162 p. Recuperado de <http://wiredspace.wits.ac.za/bitstream/handle/10539/9309/Joel%20PhD%20thesis%20final.pdf?sequence=5>
- Mueller, U.G.; Scott, J.J.; Ishak, H.D.; Cooper, M. y Rodrigues, A. (2010). Monoculture of leafcutter ant gardens. En: *PLoS ONE*. 5(9): ID Article: e12668. Recuperado de <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0012668&representation=PDF>
- Mueller, U.G. (2002). Ant versus fungus versus mutualism: ant-Cultivar conflict and the deconstruction of the *Attine* ant-fungus symbiosis. En: *The American Naturalist*. 160, 567-598. DOI: 10.1086/342084.
- Mueller, U.; Schultz, T.; Currie, C.; Adams, R. y Malloch, D. (2001). The origin of the *Attini* ant-fungus mutualism. En: *The Quarterly Review of Biology*. 76(2), 169-197. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/2664003>
- Navon, A. (2003). Bioassays of *Bacillus thuringiensis*. En: A. Navon. y K.R.S. Ascher. (Eds). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* (1<sup>era</sup> edición, p. 1-24). Wallingford, England: CABI Publishing.

- Nester, E.W.; Thomashow, L.S.; Metz, M. y Gordon, M. (2002). 100 years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. American Society for Microbiology, Washington D.C., Estados Unidos, 20 p. Recuperado de <http://academy.asm.org/images/stories/documents/100yearsofbtcolor.pdf>
- Nicholls-Estrada, C.I. (2008). Generalidades. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico* (1<sup>era</sup> edición, p. 1-9). Medellín, España: Editorial Universidad de Antioquia.
- Nickele, M.A.; Pie, M.R.; Filho, W.R. y Penteadó, S. do R. C. (2013). Formigas cultivadoras de hongos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. *En: Pesquisa Forestal Brasileira*. 33(73), 53-72.
- Nireesha, G.R.; Divya, L.; Sowmya, C.; Ventkateshan, N.; Babu, M.N. y Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freeze drying – a review. *En: International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*. 3(4), 87-98. Recuperado de [http://www.ijntps.org/File\\_Folder/0047.pdf](http://www.ijntps.org/File_Folder/0047.pdf)
- Nobua-Behrmann, B.E. (2014). *Interacciones tróficas entre dos especies simpátricas de hormigas cortadoras y el ensamble de plantas en El Monte central* (Trabajo de Doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 117 p. Recuperado de [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_5456\\_NobuaBehrmann.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5456_NobuaBehrmann.pdf)
- Novak, S. y Cremer, S. (2015). Fungal disease dynamics in insect societies: optimal killing rates and the ambivalent effect of high social interaction rates. *En: Journal of Theoretical Biology*. 372, 54-64. DOI: 10.1016/j.jtbi.2015.02.018.
- O'Callaghan, M.; Glare, T.R. y Lacey, L.A. (2012). Bioassay of bacterial entomopathogens against insect larvae. *En: L.A. Lacey (Ed.). Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2<sup>nda</sup> edición, p. 101-127). New York: Academic Press.
- Obata, F.; Tanaka, S.; Kashio, S.; Tsujimura, H.; Sato, R. y Miura, M. (2015). Induction of rapid and selective cell necrosis in *Drosophila* using *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and its silkworm receptor. *En: BMC Biology*. 13:48: 10 p. DOI: 10.1186/s12915-015-0160-2.
- Oi, D.H. y Valles, S.M. (2009). Fire ant control with entomopathogens in the USA. *En: A.E. Hajek, T.R. Glare y M. O'Callaghan (Eds.). Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods* (1<sup>era</sup> edición, vol. 6, p. 237-257). New York: Springer Publishing.
- Onofre, S.B.; Kasburg, C.R.; de Freitas, D.; Damin, S.; Vilani, A.; Queiroz, J.A. y Kagimura, F.Y. (2011). Fungicide toxicity against the growth of lineages of fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Mestch.) Sorokin. *En: Journal of Yeast and Fungal Research*. 2(6), 88-92. DOI: 10.5897/JYFR11.011.
- Onstad, D.W.; Fuxa, J.R.; Humber, R.A.; Oestergaard, J.; Shapirollan, D.I.; Gouli, V.V.; Anderson, R.S.; Andreadis, T.G. y Lacey, L.A. (2006). An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology (3<sup>era</sup> edición, 38 p). *Society for Invertebrate Pathology*. New York: American Press.
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N.O. (2013). Action on surface: entomopathogenic fungi *versus* the insect cuticle. *En: Insects*. 4, 357-374. DOI: 10.3390/insects4030357.
- Ospina-Penagos, C.M.; Hernández-Restrepo, R.J.; Rincón, E.A.; Sánchez-Ocampo, F.A.; Urrego-Mesa, J.B.; Rodas-Peláez, C.A.; Ramírez-Cardona, C.A. y Riaño-Herrera, N.M. El Pino pátula. *Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Blanecolor S.A.S: Manizales, Colombia, 105 p. Recuperado de <http://www.cenicafe.org/es/publications/pinus.pdf>
- Pagnocca, F.C.; Masiulionis, V.E. y Rodrigues, A. (2012). Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of *Attine* ants. *En: Psyche*. Article ID: 905109, 9 p. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2012/905109>

- Palma, L.; Muñoz, D.; Berry, C.; Murillo, J. y Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. En: *Toxins*. 6, 3296-3325. DOI: 10.3390/toxins6123296.
- Parral, C. (2012, 3 de octubre). Científicos desarrollan insecticidas naturales contra plagas agrícolas. *Portal de la Investigación de la Universidad de Costa Rica*. Recuperado de [http://www.vinv.ucr.ac.cr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1331:cientificos-desarrollan-insecticidas-naturales-contra-plagas-agricolas&catid=1&Itemid=68](http://www.vinv.ucr.ac.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=1331:cientificos-desarrollan-insecticidas-naturales-contra-plagas-agricolas&catid=1&Itemid=68)
- Pardo-López, L.; Soberón, M. y Bravo, A. (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. En: *Federation of European Microbial Societies*. 37(1), 3-22. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x.
- Parisien, A.; Allain, B.; Zhang, J.; Mandeville, R. y Lan, C.Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. En: *Journal of Applied Microbiology*. 104, 1-13. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x.
- Pereira, A.S. (2014). *Fungos associados e ação do imunossupressor ciclosporina A sobre formigas-cortadeiras* (Trabajo de Maestría en Producción Vegetal). Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brasil, 81 p. Recuperado de <http://www.site.uft.edu.br/producaovegetal/dissertacoes/Aline%20Silvestre%20Pereira.pdf>
- Pérez, S.P. (2009). Riesgo potencial de la hormiga cortadora de hojas *Acromyrmex lobicornis* para las plantaciones forestales de la Patagonia. En: J.M. Villacide y J.C. Corley (Eds.). *Manejo Integrado de Plagas Forestales* (6<sup>ta</sup> edición, 14 p). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina.
- Piccinin, G.G.; Donel, A.A.; de Lucca e Braccini, A.; de Morais Dan, L.G.; Hossa, K.R.; Bazo, G.L. y Godinho, F.B. (2013). Use of Biotechnology in the control of insects-prague. En: S. Trdan (Ed.). *Insecticides Development of Safer and More Effective Technologies* (1<sup>era</sup> edición, p. 505-520) Rijeka, Croacia: InTech. Recuperado de <http://library.umac.mo/ebooks/b28046092.pdf>
- Pinto, L.M.N.; Azambuja, A.O.; Diehl, E. y Fiuza, L.M. (2003). Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). En: *Brazilian Journal of Biology*. 63(2), 301-306. DOI: 10.1590/S1519-69842003000200015.
- Porcar, M.; Gómez, F.; Gruppe, A.; Gómez-Pajuelo, A.; Segura, I. y Schröder, R. (2008). Hymenopteran specificity of *Bacillus thuringiensis* strain PS86Q3. En: *Biological Control*. 45, 427-432. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.02.002.
- Poulsen, M. y Currie, C.R. (2009). On ants, plants and fungi. En: *New Phytologist*. 182, 785-788. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02863.x.
- Poulsen, M.; Hughes, W. and Boomsma, J. (2006). Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinatior* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. En: *Insectes Sociaux*. 53: 349-355.
- Poulsen, M.; Bot, A.N.M.; Nielsen, M. y Boomsma, J.J. (2002). Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. En: *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 52, 151-157. DOI: 10.1007/s00265-002-0489-8.
- Poutasse, R. (2010). *The spatial distribution of Attini ant nests on the Firestone Center for Restoration Ecology, Costa Rica* (Trabajo de Bachillerato en Biología). Claremont Graduate University, California, U.S., 26 p. Recuperado de [http://costarica.jsd.claremont.edu/pdf/Summer%20Research%20Reports/Spatial%20Distribution%20Attini%20Ants\\_Poutasse\\_2010.pdf](http://costarica.jsd.claremont.edu/pdf/Summer%20Research%20Reports/Spatial%20Distribution%20Attini%20Ants_Poutasse_2010.pdf)

- Povey, S.; Cotter, S.C.; Simpson, S.J.; Lee, K.P. y Wilson, K. (2009). Can the protein costs of bacterial resistance be offset by altered feeding behaviour? En: *Journal of Animal Ecology*. 78, 437-446. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2008.01499.x
- Punja, Z.K. (1997). Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. 19(3), 315-323. DOI: 10.1080/07060669709500531.
- Price, D.R.G. & Gatehouse, J.A. (2008). RNAi-mediated crop protection against insects. En: *Trends in Biotechnology*. 26(7), 393-400. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.004>.
- Price, S.L.; Murakami, T.; Mueller, U.G.; Schultz, T.R. y Currie, C.R. (2003). Recent findings in fungus-growing ants: evolution, ecology, and behavior of a complex microbial symbiosis. En: T. Kikuchi, N. Azuma y S. Higashi (Eds.). *Genes, Behaviors, and Evolution of Social Insects* (1<sup>era</sup> edición, p. 255-280). Sapporo, Japón: Hokkaido University Press. Recuperado de [http://www.sbs.utexas.edu/muelleru/pubs/Price\\_EtAl\\_BookChapter\\_2003.pdf](http://www.sbs.utexas.edu/muelleru/pubs/Price_EtAl_BookChapter_2003.pdf)
- Pržić, D.S.; Ružić, N.L.J. y Petrović, S.D. (2004). Lyophilization – the process and industrial use. En: *Chemistry & Industry*. 58(12), 552-562. DOI 10.2298/HEMIND0412552P.
- Rabeling, C.; Cover, S.P.; Johnson, R.A. y Mueller, U.G. (2007). A review of North American species of the fungus-gardening ant genus *Trachymyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). En: *Zootaxa*. 1664, 1-53. Recuperado de <http://www.asu.edu/clas/sirgtools/Zootaxa%20-%20Trachymyrmex%20North%20America.pdf>
- Raja-Rishi, R.; Borah, R.K.; Kumar, R. y Pandey, S. (2013). Isolation, identification and mass production of soil microbes and their utility for biocontrol. En: *International Journal of Advanced Life Sciences*. 6(3), 168-173. Recuperado de [http://unitedlifejournals.com/ms\\_files/ijals/MS07-IJALS-Iss-3-May-2013-\\_Isolation-identification-and-mass-Raja-Rishi.pdf](http://unitedlifejournals.com/ms_files/ijals/MS07-IJALS-Iss-3-May-2013-_Isolation-identification-and-mass-Raja-Rishi.pdf)
- Ravnborg, H.M.; De la Cruz, A.M.; Guerrero, M. de P. y Westermann, O. (2002). Collective action in ant control. En: R.S. Meinzen-Dick, A. Knox, F. Place y B.M. Swallow (Eds.). *Innovation in natural resource management: The role of property rights and collective action in developing countries* (1<sup>era</sup> edición, p. 257-271). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Raymond, B.; Johnston, P.R.; Nielsen-LeRoux, C.; Lereclus, D. y Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? En: *Trends in Microbiology*. 18(5): 189-194. DOI: 10.1016/j.tim.2010.02.006.
- Reber, A.; Purcell, J.; Buechel, S.D.; Buri, P. y Chapuisat, M. (2011). The expression and impact of antifungal grooming in ants. En: *Journal of Evolutionary Biology*. 24, 954-954. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2011.02230.x.
- Ribeiro, M.M.R.; Amaral, K.D.; Seide, V.E.; Souza, B.M.R.; Della-Lucia, T.M.C.; Kasuya, M.C.M. y de Souza, D.J. (2012). Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. En: *Psyche*. Article ID: 389806. Recuperado de <http://www.hindawi.com/journals/psyche/2012/389806/>
- Roberts, D.W. y Humber, R. (1981). Entomogenous fungi. En: G.T. Cole y B. Kendrick (Eds.). *Biology of Conidial Fungi* (2<sup>nda</sup> edición, vol. 2, p. 201-236). New York: Academic Press.
- Roberts, D.W. y St. Leger, R.J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. En: *Advances in Applied Microbiology*. 54: 1-70. DOI: 10.1016/S0065-2164(04)54001-7.
- Rodrigues, A.; Passarini, M.R.Z.; Ferro, M.; Nagamoto, N.S.; Forti, L.C.; Bacci Jr., M.; Sette, L.D. y Pagnocca, F. (2014). Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. En: *Journal of Basic Microbiology*. 54, 1186–1196. DOI: 10.1002/jobm.201200458.

- Rodríguez, A.; Mueller, U.G.; Ishak, H.D.; Bacci Jr, M. y Pagnocca, F.C. (2011). Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (*Hymenoptera: Formicidae*): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. En: Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology. 78, 244-255. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01152.x.
- Rodríguez, A.; Silva, A.; Bacci Jr, M.; Forti, L.C. y Pagnocca, F.C. (2010). Filamentous fungi found on foundress queen of leaf-cutting ants (*Hymenoptera: Formicidae*). En: Journal of Applied Entomology. 134, 342-345. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0418.2009.01466.x/abstract>
- Rodríguez, A.; Solis, D.R.; Fox, E.G.P.; Pagnocca, F.C. y Bueno, O.C. (2010). Preliminary list of microfungi found in *Paratrechina longicornis* (*Hymenoptera: Formicidae*). En: Florida Entomologist. 93(4): 651-653. DOI: 10.2307/27896087.
- Rodríguez, J.; Calle, Z y Montoya-Lerma, J. (2008). Herbivoría de *Atta cephalotes* (*Hymenoptera: Myrmicinae*) sobre tres sustratos vegetales. En: Revista Colombiana de Entomología. 34(2), 156-162. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882008000200004](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882008000200004)
- Rodríguez, M.; Gerding, M.E. y France, A. (2006). Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) (*Lepidoptera: Gelechiidae*). En: Agricultura Técnica (Chile). 66(2), 159-165. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072006000200005>
- Rojas-Ruíz, N.E.; Vázquez-Cruz, C.; Sánchez-Alonso, P.; Sansinenea-Royano, E. (2010). Análisis poblacional de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en interacción *in vitro* con bacterias del suelo. En: Agrociencia. 44, 941-953. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02098.x.
- Römer, D. y Roces, F. (2013). *Poster: Taking out the trash: the role of olfactory cues in leaf-cutting ant waste management*. University of Würzburg, Würzburg, Alemania. Recuperado de <http://www.iussi2014.com/program/posters/Poster140.pdf>
- Rostas, M. y Blassman, K. (2009). Insects had it first: surfactants as a defence against predators. En: Proceedings of the Royal Society B. 276, 633-638. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2011.02230.x.
- Salazar-Magallón, J.A.; Hernández-Velázquez, V.M.; Alvear-García, A.; Arenas-Sosa, I. y Peña-Chora, G. (2015). Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. En: Bulletin of Insectology. 68(1), 103-109. Recuperado de <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol68-2015-103-109salazar-magallon.pdf>
- Salinas, E.A. y Arias-Ruiz-Díaz, O.R. (2011). Control de la hormiga cortadora "Akeke" *Acromyrmex landolti* con hongos entomopatógenos. En: Investigación Agraria. 13(1), 27-32. Recuperado de <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/208>
- Salmerón-Cordero, J. (2009). Relaciones simbióticas protegen a las zompopas. En: Crisol. 225, 1-4. Recuperado de <http://www.odi.ucr.ac.cr/medios/documentos/suplemento-crisol/Crisol225.pdf>
- Salzet, M. (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. En: Trends in Immunology. 22, 285-288. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01895-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01895-6).
- Samson, R.A.; Evans, H.C. y Latgé, J.-P. (1988). Taxonomy of entomopathogenic fungi. *Atlas of Entomopathogenic Fungi* (1<sup>era</sup> edición, p. 5-16). Berlín, Alemania: Springer-Verlag.
- Sánchez-Peña, S.R.; Sánchez-Ovalle, M.R.; Gallegos-Morales, G. y Sánchez-Arizpe, A. (2008). *In vitro* antagonism of actinomycetes isolated from fungus-growing ants against plant pathogenic fungi. En: Phytoparasitica. 36(4), 322-325. DOI: 10.1007/BF02980811.

- Sánchez-Peña, S.R. (2005). *Essays on organismal aspects of the fungus-growing ant symbiosis: ecology, experimental symbiont switches and fitness of Atta, and a new theory on the origin of ant fungiculture* (Trabajo de Doctorado). University of Texas at Austin, Texas, Estados Unidos, 155. Recuperado de <https://repositories1.lib.utexas.edu/handle/2152/1713>
- Sanchis, V. y Bourguet D. (2008). *Bacillus thuringiensis*: application in agriculture and insect resistance management. A review. En: *Agronomy of Sustainable Development*. 28, 11-20. DOI: 10.1051/agro:2007054.
- Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.; Capell, T. & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. En: *Plant Biotechnology Journal*. 9, 283-300. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x.
- Santi, L.; Beys da Silva, W.O.; Berger, M.; Guimarães, J.A.; Schrank, A. y Vainstein, M.H. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. En: *Toxicon*. 55(4), 874-880. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.12.012.
- Santi, L. (2009). *Relação patógeno-hospedeiro: análise bioquímica e proteômica da interação do fungo Metarhizium anisopliae e seus hospedeiros artrópodes* (Trabajo de Doctorado Biología Celular y Molecular). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brasil, 171 p. Recuperado de <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17064/000704366.pdf?...1>
- Santos, A.V.; de Oliveira, B.L. y Samuels, R.I. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). En: *Mycopathologia*. 163: 233-240. DOI: 10.1007/s11046-007-9009-8.
- Saraswathy, N. y Kumar, P.A. (2004). Protein engineering of  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En: *Electronic Journal of Biotechnology*. 7(2), 180-190. DOI: 10.2225/vol7-issue2-fulltext-3.
- Sauka, D.H. y Benintende, G.B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. En: *Revista Argentina de Microbiología*. 40, 124-140. Recuperado de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412008000200013](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412008000200013)
- Schiøtt, M.; De Fine Licht, H.; Lange, L. y Boomsma, J.J. (2008). Towards a molecular understanding of symbiont function: identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. En: *BMC Microbiology*. DOI: 10.1186/1471-2180-8-40.
- Schoenian, I.; Spiteller, M.; Ghaste, M.; Wirth, R.; Herz, H. y Spiteller, D. (2011). Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(5), 1955-1960. Recuperado de <http://www.pnas.org/content/108/5/1955.full.pdf+html>
- Schultz, T. y Brady, S. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. En: *Proceedings of the Academy of Natural Science USA*. 105, 5435-5440. 8: 40, 10 p. DOI: 10.1073/pnas.0711024105.
- Schultz, T.R.; Mueller, U.G.; Currie, C.R. y Rehner, S.A. (2005). Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. En: F.E. Vega y M. Blackwell (Eds.). *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution* (1<sup>era</sup> edición, p. 149-190). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Schünemann, R.; Knaak, N. y Fiuza, L.M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. En: *ISRN Microbiology*. Article ID: 135675, 12 p. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2014/135675>

- Scott, J.J.; Budsberg, K.J.; Suen, G.; Wixon, D.L.; Balser, T.C. y Currie, C.R. (2010). Microbial community structure of leaf-cutting ant fungus gardens and refuse dumps. En: *PLoS One*. 5(3): e9922. DOI: 10.1371/journal.pone.0009922.
- Shah, F.A.; Ansari, M.A.; Prasad, M. y Butt, T.M. (2007). Evaluation of black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) control strategies using *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of insecticides in separate horticultural growing media. En: *Biological Control*. 40, 246-252. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2006.10.005.
- Shahid, A.A.; Rao, A.Q.; Bakhsh, A. y Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. En: *Archives of Biological Science*. 64(1), 21-42. Recuperado de <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0354-4664/2012/0354-46641201021S.pdf>
- Shapiro-Ilan, D.I.; Fuxa, J.R.; Lacey, L.A.; Onstad, D.W. y Kaya, H. K. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 88, 1-7
- Shishir, A.; Roy, A.; Islam, N.; Rahman, A.; Khan, S.N. y Hoq, Md. M. (2014). Abundance and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Bangladesh and their cry genes profile. En: *Frontiers in Environmental Science*. 2(20), 1-10. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00020.
- Sileshi, A.; Sori, W. y Dawd, M. (2013). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against termite, *Macrotermes* (Isoptera: Termitidae). En: *Asian Journal of Plant Sciences*. 12(1), 1-10. DOI: 10.3923/ajps.2013.1.10.
- Silva, A.; Bacci Jr, M.; Gomes de Sequeira, C.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C. y Hebling, M.J.A. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. En: *Journal of Insect Physiology*. 49, 307-313. DOI: 10.1016/S0022-1910(03)00004-0.
- Sims, S.R. (1997). Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* protein: effects on Lepidoptera, Diptera and non-target arthropods. En: *Southwestern Entomologist*. 22(4), 395-404. Recuperado de [http://sswe.tamu.edu/PDF/SWE\\_V22\\_N4\\_P395-404.pdf](http://sswe.tamu.edu/PDF/SWE_V22_N4_P395-404.pdf)
- Singh-Sandhu, S.; Sharma, A.K.; Beniwal, V.; Goel, G.; Bratra, P.; Kumar, A.; Jaglan, S.; Sharma, A.K. y Maholtra, S. (2012). Myco-biocontrol of insect pests: factors involved mechanism and regulation. En: *Journal of Pathogens*. Article ID: 126819. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/126819>
- Sinia, A. (2012). *Evaluation of the fungi Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, and Clonostachys rosea bio-control agents against the honey bee parasitic mite, Varroa destructor* (Trabajo de Doctorado Ciencias Ambientales). The University of Guelph, Ontario, Canadá, 164 p. Recuperado de [https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/7457/Sinia\\_Alice\\_201308\\_PhD.pdf?sequence=6](https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/7457/Sinia_Alice_201308_PhD.pdf?sequence=6)
- Smith, C.R.; Dolezal, A.; Eliyahu, D.; Holbrook, T. y Gadau, J. (2009). Ants (Formicidae): models for social complexity. En: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 4(7), 07/2009. DOI: 10.1101/pdb.emo125, 5 p.
- Sookar, P. (2013). *Study of two potential entomopathogenic fungi, Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana for the biocontrol of fruit flies (Diptera: Tephritidae) of economic importance in Mauritius* (Trabajo de Doctorado en Ciencias). University of Mauritius, Moka, Mauritius, 298 p. Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/261645183\\_Study\\_of\\_Two\\_Potential\\_Entomopathogenic\\_Fungi\\_Metarhizium\\_anisopliae\\_and\\_Beauveria\\_bassiana\\_for\\_the\\_Biocontrol\\_of\\_Fruit\\_Flies\\_%28Diptera\\_Tephritidae%29\\_of\\_Economic\\_Importance\\_in\\_Mauritius](http://www.researchgate.net/publication/261645183_Study_of_Two_Potential_Entomopathogenic_Fungi_Metarhizium_anisopliae_and_Beauveria_bassiana_for_the_Biocontrol_of_Fruit_Flies_%28Diptera_Tephritidae%29_of_Economic_Importance_in_Mauritius)
- Spiteller, P. (2015). Chemical ecology of fungi. En: *Natural Product Reports*. 32(7), 971-993. DOI: 10.1039/c4np00166d.

- Srivastava, C.N.; Maurya, P.; Sharma, P. y Mohan, L. (2009). Prospective role of insecticides of fungal origin: review. En: *Entomological Research*. 39, 341-355. DOI: 10.1111/j.1748-5967.2009.00244.x.
- Stroeymeyt, Q.; Casillas-Pérez, B. y Cremer, S. (2014). Organisational immunity in social insects. En: *Insect Science*. 3, 1-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.001>
- Suárez-Gómez, H.D. (2012). Desarrollo del control microbiológico en Colombia/ Penetración del patógeno al cuerpo del insecto. *Control Microbiológico de Insectos* (1<sup>era</sup> edición, p. 8-13) Valledupar, Colombia: Editorial Académica Española.
- Suárez-Gómez, H.D. y Tofiño-Rivera, A. (2012). La hormiga arriera en el departamento de Cesar. *Guía para el Manejo de la Hormiga Arriera*. Universidad Popular del Cesar, Valledupar, Colombia, 35 p. Recuperado de <https://www.scribd.com/doc/100247538/La-Hormiga-Arriera-en-El-Departamento-Del-Cesar>
- Suckling, D.M.; Stringer, L.D.; Stephens, A.E.A.; Woods, B.; Williams, D.G.; Baker, G. y El-Sayed, A.M. (2014) From integrated pest management to integrated pest eradication: technologies and future needs. En: *Pest Management Science*. 70, 179-189. DOI: 10.1002/ps.3670.
- Sumana, A. y Starks, P.T. (2004). Grooming patterns in the primitively eusocial wasp *Polistes dominulus*. En: *Ethology*. 110, 825-833. DOI: 10.1111/j.1439-0310.2004.01024.x.
- Sun, Q. y Zhou, X. (2013). Corpse management in social insects. En: *International Journal of Biological Sciences*. 9(3), 313-321. DOI: 10.7150/ijbs.5781.
- Talaei-Hassanloui, R.; Bakhshaei, R.; Hosseininaveh, V. y Khorramnezhad, A. (2013). Effect of midgut proteolytic activity on susceptibility of lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. En: *Frontiers in Physiology*. 4, 406. DOI: 10.3389/fphys.2013.00406.
- Talkhan, F.N.; Abo-assy, H.H.; Soliman, K.A.; Abdel-Razek, A.S.; Azzam, M.M. y Abdelsalam, A.Z.E. (2007). Effect of UV treatments on the activity of delta-endotoxin protein crystals in *Bacillus thuringiensis*. En: *Journal of Genetic Engineer and Biotechnology*. 5(1), 33-42. Recuperado de <http://www.jgeb.eg.net/pdf/vol5-n1-2/5.pdf>
- Talukdar, D. (2013). Modern biotechnological approaches in insect research. En: *International Research Journal of Science & Engineering*. 1(3), 71-78. Recuperado de <http://oaji.net/articles/2014/731-1396633799.pdf>
- Then, C. (2010). Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis* – synergism, efficacy, and selectivity. En: *Environmental Science and Pollution Research*. 17, 791-797. DOI: 10.1007/s11356-009-0208-3.
- Toledo J.; Campos S.E.; Flores S.; Liedo P.; Barrera J.F.; Villasenor A. y Montoya, P. (2007). Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. En: *Journal of Economic Entomology*. 100, 291-297. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/100.2.291>
- Torres-Barragán, A.; Anaya, A.L.; Alatorre, R. y Toriello, C. (2004). Entomopathogenic fungi from 'El Eden' Ecological Reserve, Quintanaroo, México. En: *Mycopathologia*. 158, 61-71. DOI: 10.1023/B:MYCO.0000038424.01369.c8.
- Tsutsui, N.D. (2013). Dissecting ant recognition systems in the age of genomics. En: *Biology Letters*. 14(7), 212. DOI: 10.1098/rsbl.2013.0416.

- Tranter, C.; Graystock, P.; Shaw, C.; Lopes, J.F.S. y Hughes, W.O.H. (2014). Sanitizing the fortress: protection of ant brood and nest material by worker antibiotics. En: *Behavioral Ecology & Sociobiology*. 68(3), 471-499. DOI: 10.1007/s00265-013-1664-9.
- Uribe-Celis, S. (2013). *Fóridos (Díptera: Phoridae) asociados al hábitat del hormigas cortadoras de hojas (Atta cephalotes y Acromyrmex octospinosus) y sus patrones de localización en un bosque seco tropical Andino* (Trabajo de Maestría en Ciencia-Entomología). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 72 p. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9278/>
- Vaccaro, N.C. y Mousques, J.A. (1997). Hormigas cortadoras (géneros *Atta* y *Acromyrmex*) y tacurúes Entre Ríos. *XII Jornadas Forestales Entre Ríos*, Entre Ríos, Argentina, 7 p. Recuperado de [http://64.76.123.202/new/0-0/forestacion/\\_archivos/\\_biblioteca/69%201%20a%20vaccaro%20sin%20dib%2097.pdf](http://64.76.123.202/new/0-0/forestacion/_archivos/_biblioteca/69%201%20a%20vaccaro%20sin%20dib%2097.pdf)
- Vachon, V.; Laprade, R.; Schwartz y J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 111: 1-12. DOI: 10.1016/j.jip.2012.05.001.
- Valicente, F.H. y Mourão, A.H.C. (2008). Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. En: *Neotropical Entomology*. 37(6), 702-708. Recuperado de <http://scielo.br/pdf/ne/v37n6/a12v37n6.pdf>
- Van Bael, S.A.; Estrada, C. y Wcilso, W.T. (2011). Fungal-fungal interaction in leaf-cutting ant agriculture. En: *Psyche*. Article ID: 617478, 9 p. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2011/617478>
- van Frankenhuyzen, K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. En: *Jornal of Invertebrate Pathology*. 114, 76-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>
- van Gils, H.A.J.A. (2011). *Los factores ambientales en relación con la hormiga arriera (Atta sexdens) en el Sur del trapezoido amazónico* (Trabajo de Doctorado en Ciencias Agropecuarias). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 236 p. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/3996/1/07-797045.2011.pdf>
- Varón, E.; Hilje, L. y Eigenbrode, S.D. (2008). Un enfoque agroecológico para el manejo de zompapas en cafetales. *Material de apoyo del proyecto: Distribución de la hormiga cortadora de hojas Atta cephalotes en paisajes que incluyen plantaciones de café como una base para optimizar su manejo a través de métodos ambientalmente benignos*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Cartago, Costa Rica, 13 p. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2309E/A2309E.PDF>
- Varón-Devia, E.H. (2006). *Distribution and foraging by the leaf-cutting ant, Atta cephalotes L., in coffee plantations with different types of management and landscape contexts, and alternatives to insecticides for its control* (Trabajo de Doctorado). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Cartago, Costa Rica, 1736 p. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0976I/A0976I.PDF>
- Vázquez, L.L.; Alfonso, J.; Ramos, Y.; Martínez, A.; Moreno, D. y Matienzo, Y. (2012). Relaciones de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) con el suelo del cafetal como base para su manejo agroecológico. En: *Agroecología*. 7, 81-90. Recuperado de <http://revistas.um.es/agroecologia/article/view/171041/146241>
- Vega, F.E.; Meyling, N.V.; Luangsa-ard, J.J. y Blackwell, M. (2012). Fungal Entomopathogens. En: F.E. Vega y H.K. Kaya (Eds.). *Insect Pathology* (2<sup>nda</sup> edición, p. 171-220). New York: Academic Press.

- Vellinga, E.C. (2004). Ecology and distribution of Lepiotaceous fungi (Agaricaceae): a review. En: *Nova Hedwigia*. 78, 273-299. DOI: 10.1127/0029-5035/2004/0078-0273.
- Vergara-Castrillón, J.C. (2005) *Biología, manejo y control de la hormiga arriera* (1<sup>era</sup> edición, 20 p). Santiago de Cali, Colombia: Imprenta Departamental del Valle del Cauca.
- Vergara-Ruiz, R. (2004). Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. *Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente* (34 p.). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. Recuperado de <https://www.scribd.com/doc/52984170/ENFOQUE-AGROECOLOGICOVERGARA>
- Vieira, E.A. (2010). Controle biológico de formigas cortadeiras como opção de manejo sustentável. En: *PRACS: Revista de Humanidades do Curso de Ciências Sociais da UNIFAP*. 3, 243-244. Recuperado de <http://periodicos.unifap.br/index.php/pracs/article/view/89/n3Vieira.pdf>
- Walker, T.N. y Hughes, W.O.H. (2009). Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. En: *Biology Letters*. 5, 446-448. DOI: 10.1098/rsbl.2009.0107.
- Ward, P.S. (2014). The phylogeny and evolution of ants. En: *Annual Reviews*. 45, 23-43. DOI: 10.1146/annurev-eolsys-120213-091824.
- Weber, N. (1973). Fungus-growing ants. En: J. Brewer y M. Harrison (Eds.). *Readings in Insect-Plant Disease Relationships* (1<sup>era</sup> edición, p. 81-114). New York: Miss Information Corporation.
- Williams, D.F. y deShazo, R.D. (2004). Biological control of fire ants: an update on new techniques. En: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 93, 15-22. Recuperado de [http://afsrweb.usda.gov/sp2UserFiles/Place/60360510/publications/Williams\\_and\\_deShazo%28M-3897%29.pdf](http://afsrweb.usda.gov/sp2UserFiles/Place/60360510/publications/Williams_and_deShazo%28M-3897%29.pdf)
- Wilson, E.O.; y Nowak, M.A. (2014). Natural selection drives the evolution of ant life cycles. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12585-12590. DOI: 10.1073/pnas.1405550111.
- Wilson, K. y Cotter, S.C. (2013). Host-parasite interactions and the evolution of immune system. En: H.J. Brockmann, T.J. Roper, M. Naguib y L. Barret (Eds.). *Advances in the Study of Behavior* (1<sup>era</sup> edición, p. 81-174). New York: Academic Press. Recuperado de <http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>
- Wilson-Rich, N.; Spivak, M.; Fefferman, N.H. y Starks, P.T. (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. En: *Annual Review of Entomology*. 54, 405-23. DOI: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093301.
- Wu, Y.; Lei, C.-F.; Liu, P.-M. & Gao, M.-Y. (2011). Novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin active against *Locusta migratoria manilensis*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 77(10), 3227-3233. DOI: 10.1128/AEM.02462-10.
- Xiao, G.; Ying, S.-H.; Zheng, P.; Wang, Z.-L.; Zhang, S.; Xie, X.-Q.; Shang, Y.; St. Leger, R.J.; Zhao, G.-P.; Wang, C. y Feng, M.-G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. En: *Scientific Reports*. Article 2: 483. DOI: 10.1038/srep00483
- Yan, H.; Simola, D.F.; Bonasio, R.; Liebig, J.; Berger, S.L. y Reinberg, D. (2014). Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. En: *Nature Reviews*. 15, 677-688. DOI: 10.1038/nrg3787.
- Yanagawa, A.; Yokohari, F. y Shimizu, S. (2009). The role of antennae in removing entomopathogenic fungi from cuticle of termite, *Coptotermes formosanus*. En: *Journal of Insect Science*. 9(6), 1-9. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1673/031.009.0601>

- Yek, S.H. (2012). *Disease challenges and defences in leaf-cutting ants* (Trabajo de Doctorado). University of Copenhagen, København, Dinamarca, 147 p. Recuperado de <http://www2.bio.ku.dk/bibliotek/phd/Sze%20Huei%20Zoe.pdf>
- Yek, S.H.; Nash, D.R.; Jensen, A.B. y Boomsma, J.J. (2012). Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. En: *Proceedings of the Royal Society B*. 279(1745), 4215-22. DOI: 10.1098/rspb.2012.1458
- Zanetti, R.; Zanuncio, J.C.; Santos, J.C.; Paiva da Silva, W.L.; Ribeiro, G.T. y Lemes, P.G. (2014). An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. En: *Forests*. 5: 439-454. Recuperado de <http://www.mdpi.com/1999-4907/5/3/439>
- Zanetti, R.; Dias, N.; Reis, M.; Souza-Silva, A. y Alves-Moura, M. (2004). Eficiência de iscas granuladas (sulfloramida 0,3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (1908) (Hymenoptera: Formicidae). En: *Ciência e Agrotecnologia*. 28(4), 878-882. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542004000400021>
- Zhang, Y.J.; Zhang, S.; Liu, X.Z.; Wen, H.A. y Wang, M. (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. En: *Letters in Applied Microbiology*. 51, 114-118. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x
- Zhukovskaya, M.; Yanagawa, A. y Forschler, B. (2013). Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. En: *Insects*. 4, 609-630. DOI: 10.3390/insects4040609.
- Zucchi, T.D.; Guidolin, A.S. y Cônsoli, F.L. (2011). Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). En: *Microbiological Research*. 166, 68-76. DOI: 10.1016/j.micres.2010.01.009.