

# ***Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico**

## ***Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* control colonies of *Atta cephalotes* in field better than a chemical insecticide**

Elkin López Arismendy\*, Sergio Orduz Peralta\*

### RESUMEN

Las hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* son una plaga económicamente importante en la agricultura. Estas hormigas utilizan el material cortado para cultivar un hongo del cual se alimentan. En este estudio se aplicaron cebos basados en el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* cepa M-137, *Trichoderma viride* cepa T-26 antagonista del hongo simbiote de *A. Cephalotes*, y una combinación de ambos hongos, para el control de colonias de *A. cephalotes* en campo. Además, se comparó la actividad insecticida de los cebos con hongos con el producto químico Pirimifos Metil, aplicado con insufladora. Las hormigas no detectaron los hongos formulados en forma de cebo, de manera que los cargaron hasta el interior de los nidos sin generar conductas de defensa. La mortalidad de los nidos tratados con los cebos estuvo por encima del 80%, mientras que el tratamiento con Pirimifos Metil sólo alcanzó la muerte del 60% de los hormigueros. Además, después de una semana de la aplicación de los distintos tratamientos, se observaron cambios de comportamiento en los insectos, que se reflejaron principalmente en la ausencia de forrajeo. En conclusión, el hongo *M. anisopliae* fue efectivo para controlar colonias de *A. Cephalotes*, y su potencia fue superior a la del producto químico Pirimifos Metil.

**Palabras clave:** *Atta cephalotes*, hormigas cortadoras de hojas, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma viride*, control biológico, antagonismo.

### ABSTRACT

The leaf-cutting ant *Atta cephalotes* is an economically important pest in agriculture. These ants use the material they cut to cultivate a fungus from which they fed. In this study, baits prepared with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* strain M-137, *Trichoderma viride* strain T-26, antagonist of the symbiont fungus of *A. cephalotes*, and a combination of both fungi were applied in order to control *A. cephalotes* colonies under field conditions. In addition, the insecticide activity of the baits was compared to a chemical product, Pirimifos Metil, which was applied with an air pump. The ants did not detect the fungal agents contained in the baits, and introduced them into their nests without awakening defensive behaviors. The mortality of the bait-treated nests was higher than 80% while the treatment with Pirimifos Metil was effective in only 60% of the nests. Additionally, a week after the application of these treatments, changes in the insects' behavior were observed, reflected mainly in the absence of foraging activity. In conclusion, *M. anisopliae* was effective in controlling *A. cephalotes* colonies, and superior to the chemical product Pirimifos Metil.

**Key words:** *Atta cephalotes*, leaf-cutting ants, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma viride*, biological control, antagonist fungus.

---

\*Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB. Apartado Aéreo 7378, Medellín, Colombia. Fax: (574) 441 55 14. Tel. (574) 441 08 55, e-mail: elopez@cib.org.co, sorduz@cib.org.co

## INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini comprenden doce géneros que agrupan cerca de 200 especies; este tipo de hormigas es dependiente del cultivo de hongos para su alimentación (Chapela *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1999). El mutualismo obligado entre hormigas y hongos comenzó hace aproximadamente 50 millones de años, y se considera que los géneros de hormigas cortadoras de hojas *Atta* y *Acromyrmex* presentan el más complejo y eficiente de los sistemas de monocultivo de hongos conocido (Hinkle *et al.*, 1994; Mueller *et al.*, 1998; Currie *et al.*, 1999).

Las hormigas del género *Atta* son exclusivas de regiones tropicales y subtropicales. Se encuentran distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a una altura máxima de 2000 msnm. Estos insectos están considerados entre las plagas más limitantes en algunos países suramericanos debido a la defoliación que causan en los cultivos atacados. El impacto económico del daño causado por las hormigas cortadoras de hojas depende del estado de desarrollo de la planta y de las condiciones ambientales imperantes en el momento (Cortés, 1986). Además, se considera que un hormiguero adulto puede consumir entre 50 y 150 kilos de hojas por día y las pérdidas podrían exceder los US1.000 millones anuales en Norte y Suramérica (Lima, 1992).

Estos insectos han desarrollado diferentes estrategias para mantener el hongo simbionte libre de contaminantes, a pesar de la continua exposición a microorganismos ambientales presentes en el material vegetal que llevan hasta el jardín (Currie *et al.*, 1999). Con el fin de evitar posibles contaminaciones, el interior de los nidos es meticulosamente aseado por las hormigas, de manera que los objetos o partículas de material extraño sean llevados fuera del nido; adicionalmente, las hormigas aplican sobre el hongo simbionte y sobre el sustrato en el que lo cultivan, materia fecal y saliva, que posiblemente contienen agentes antibióticos, que serían responsables de inhibir los contaminantes del jardín (Holldobler y Wilson, 1990; Mueller *et al.*, 1998).

Para el control de las hormigas cortadoras de hojas se han usado principalmente insecticidas químicos; sin embargo, su baja especificidad, alta toxicidad, efectos adversos en el ambiente y la generación de poblaciones de insectos resistentes (Diehl-Fleig *et al.*, 1993; Hebling *et al.*, 1996) han llevado a considerar el uso de

agentes biológicos para su control (Diehl-Fleig y Valim-Labres, 1993; Leathers *et al.*, 1993; Specht *et al.*, 1994; Currie *et al.*, 1999; Currie y Stuart, 2001; Ortiz y Orduz, 2001). Los programas de control microbiológico están basados en la búsqueda de cepas de microorganismos capaces de infectar y causar mortalidad en corto tiempo a un grupo específico de insectos. Además, estos programas incluyen el desarrollo de técnicas de aplicación adecuadas, el conocimiento de las condiciones fisiológicas del insecto y la búsqueda de condiciones apropiadas de microclimas para desarrollo del patógeno (Stimac *et al.*, 1987; Diehl-Fleig *et al.*, 1992a). Los aislamientos de hongos que cumplan con estas condiciones podrían servir para el desarrollo de un micoinsecticida específico, efectivo y económico.

*Metarhizium anisopliae* es un hongo patógeno de insectos que ha sido aislado de un amplio rango de hospederos (St. Leger *et al.*, 1992). Estudios relacionados con la penetración de la cutícula del huésped han demostrado que este hongo inicia la colonización del cuerpo de los insectos mediante la formación de estructuras de presión y la producción de enzimas extracelulares proteolíticas como subtilisina (PR1) y metaloproteasas, así como también enzimas con actividad quitinolítica (St. Leger *et al.*, 1992; Leal *et al.*, 1997; St. Leger *et al.*, 1998).

Los hongos del género *Trichoderma* han sido empleados para el control de microorganismos que causan enfermedades en las plantas, debido a su capacidad antagonista (Geremia *et al.*, 1993; Lorito *et al.*, 1993). También, han sido considerados como candidatos para controlar hormigas cortadoras de hojas por su actividad biocontroladora sobre el hongo simbionte de *A. cephalotes* (Ortiz y Orduz, 2001). *Trichoderma* se encuentra en casi todos los suelos, especialmente en aquellos ricos en materia orgánica, aunque también se encuentran en la rizosfera, en la madera y en material vegetal en descomposición, especialmente cuando es atacado por otros hongos (Cotes, 1993). Su actividad antagónica ha sido asociada con la producción de enzimas líticas como b-1,3- glucanasas, quitinasas, proteasas y lipasas (Chet e Inbar, 1994) y con la producción de antibióticos del tipo de las trichorzianinas (Schirmbock *et al.*, 1994; Correa *et al.*, 1996; Kullnig *et al.*, 2000).

En este trabajo se evaluó la capacidad de *M. anisopliae* y *T. viride*, formulados en cebos, para controlar nidos de la hormiga cortadora *A. cephalotes* en

condiciones de campo, comparando su eficacia contra el producto químico Pirimifos Metil, aplicado con insufladora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Producción de los hongos y preparación de los cebos:** Se utilizó la cepa 26 de *T. viride*, la cual fue seleccionada en un trabajo previo por su alta capacidad antagonista contra *Attamyces* sp. (Ortiz y Orduz, 2001) y la cepa 137 de *M. anisopliae* obtenida de una reina de *A. cephalotes* muerta (López *et al.*, 1999). Estos hongos fueron cultivados durante cuatro días a 30°C y 300 r.p.m. en medio líquido con 25 g de extracto de levadura y 25 g de glucosa por litro, con el fin de obtener micelio (Rombach, 1989). Se inoculó arroz estéril con el micelio de los hongos y se incubó a 25°C por diez días hasta obtener cultivos esporulados con los que se prepararon tres cebos diferentes, uno con *T. viride*, otro con *M. anisopliae* y el tercero fue una combinación de los dos hongos en partes iguales. Se usó salvado de trigo como agente transportador y se agregó jugo de naranja como atrayente en proporción 1:1 al peso seco del cebo (Madrigal *et al.*, 1997). Los tratamientos fueron preparados con 50% (p/p) de cultivo esporulado y con una concentración de  $1 \times 10^9$  conidias/g para las tres aplicaciones que se efectuaron.

**Ensayos en campo:** Los hormigueros se encontraban localizados en el municipio Girardota (1.450 msnm), a 20 km al norte de Medellín, Colombia. Se seleccionaron al azar cinco colonias para cada uno de los tratamientos, incluyendo el control. Se determinó el área de los nidos midiendo la distancia entre los orificios más lejanos en direcciones perpendiculares. Los ensayos se dividieron en cuatro períodos, de acuerdo con la semana en que se hicieron las aplicaciones de los cebos (véase tabla 1).

La aplicación de los cebos se realizó después de las 5:00 p.m. cuando la actividad de las hormigas

aumenta y la intensidad solar disminuye. Se colocaron 20 g del preparado por cada m<sup>2</sup> del área del nido a 15 cm de las bocas que habían presentado actividad forrajera, con el fin de que las hormigas los llevaran hasta el interior de los hormigueros. A los nidos empleados como control se les colocó salvado de trigo con el atrayente. El producto químico Pirimifos Metil, comercializado como polvo espolvoreable para el control de hormigas cortadoras de hojas, fue aplicado con insufladora hasta saturar completamente el hormiguero. Se emplearon entre 15 y 20 g de Pirimifos Metil por cada m<sup>2</sup> del área del nido.

Una vez por semana, y por triplicado, se registró el número de hormigas que entraban y salían del nido por minuto en cada una de las bocas, y se determinó el flujo promedio de hormigas/nido/minuto/semana. Este registro también se realizó después de las 5:00 p.m. cuando la actividad de las hormigas aumenta y la intensidad solar disminuye (Da Silva y Diehl-Fleig, 1988; Specht *et al.*, 1994). Antes de aplicar los tratamientos se evaluó el flujo normal de hormigas por minuto en cada uno de los nidos y se realizó la observación del comportamiento normal de las hormigas (primer período). Se consideró que un hormiguero estaba muerto cuando no se encontró flujo de hormigas durante cuatro semanas consecutivas; después de este tiempo se procedió a excavarlos y a recolectar muestras de los jardines de los hormigueros para identificar la contaminación por el hongo antagonista y determinar la presencia de hormigas y reinas infectadas por el hongo entomopatógeno.

**Análisis estadístico:** Los valores del flujo de hormigas/nido/minuto/semana fueron transformados a porcentaje y se tomó como el 100% el promedio del primer período en cada uno de los tratamientos. Además, los datos obtenidos de cada período en cada tratamiento fueron sometidos a análisis de varianza y a la prueba de Tukey con el programa estadístico SAS.

## RESULTADOS

Los nidos empleados en los diferentes tratamientos tenían un área entre 4 y 289 m<sup>2</sup>. El cebo aplicado a los hormigueros no generó en las hormigas ninguna conducta de defensa o rechazo, y fue cargado al interior de los nidos. Se observó una disminución

**Tabla 1.** Períodos de estudio de acuerdo con las aplicaciones de los cebos con los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* y del producto químico Pirimifos Metil para el control de hormigueros de la hormiga cortadora de hojas, *Atta cephalotes*<sup>1</sup>.

Período 1 <sup>1</sup>	Período 2	Período 3	Período 4
Semanas 1 a 6	Semanas 7 a 13	Semanas 14 a 18	Semanas 19 a 23

<sup>1</sup> Se aplicaron los tratamientos al comienzo de cada uno de los períodos, excepto en el período 1.

estadísticamente significativa en el número de hormigas/nido/minuto/semana después de las aplicaciones, excepto para *T. viride* y Pirimifos Metil (Tukey  $\alpha = 0,05$ ) (véase tabla 2).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de flujo de hormigas entre el control y el tratamiento con *M. anisopliae*, específicamente entre los períodos 2 y 3. En el período 4 se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control y todos los tratamientos (Tukey  $\alpha = 0,05$ ) (datos no mostrados). Además, después de la primera aplicación de los hongos y Pirimifos Metil, en el segundo período del experimento se presentó 100% de mortalidad en las colonias tratadas con *M. anisopliae*, pero no murió ninguno de los nidos tratados con Pirimifos Metil. Con la segunda apli-

cación, la mortalidad acumulada fue del 100% en las colonias tratadas con el cebo combinado, mientras en los nidos tratados con producto químico sólo se alcanzó el 20% (véase tabla 3). No se presentó la muerte de ninguno de los hormigueros empleados como control.

Una vez que la actividad de los nidos disminuyó por completo, éstos fueron excavados y se aisló *T. viride* a partir de muestras tomadas de algunos de los jardines de los hormigueros, el cual cubría el hongo simbiote en forma de velo de color blanco. También fue posible aislar *M. anisopliae* a partir de cadáveres de obreras de todos los nidos tratados con *M. anisopliae*. Además, en los hormigueros en los que se aplicaron los diferentes tratamientos con hongos se encontraron muy pocos restos del hongo simbiote y ausencia de

formas inmaduras de las hormigas. En los nidos tratados con Pirimifos Metil se encontraron hormigas muertas, e igualmente pocos restos del jardín de las hormigas. Al excavar uno de los hormigueros tratados con el cebo combinado, se encontró la reina moribunda, que murió 24 horas después en el laboratorio, y de la cual se aisló *M. anisopliae* a los seis días.

También se hicieron algunas observaciones cualitativas de cambios de comportamiento de las hormigas después de la aplicación de los tratamientos con hongos; éstas presentaron desplazamiento rápido y descoordinado en los caminos, mientras que alrededor de las bocas de los nidos se notaba una quietud poco usual. En algunos hormigueros las hormigas cerraron o abandonaron la entrada al nido cerca de la cual fueron colocados los cebos. Al mismo tiempo, se observó transporte de cadáveres, de hormigas moribundas, de pupas y de huevos desde y hacia el interior del nido, y desplazamiento de gran número de hormigas sin carga por los caminos. También se incrementó la labor de sacar lodo del interior del nido y los restos de cebo que quedaban cerca del nido

**Tabla 2.** Actividad de los hormigueros de *Atta cephalotes* tratados con *M. anisopliae*, *T. viride* y Pirimifos Metil medido como el porcentaje de disminución del flujo de hormigas por minuto.

Porcentaje del flujo de hormigas por períodos (datos en porcentaje del flujo inicial)				
Período <sup>1</sup>				
Tratamiento	1	2	3	4
<i>M. anisopliae</i>	100 a <sup>2</sup>	17,7 b	0,0 b	0,0 b
<i>T. viride</i>	100 a	64,4 a	50,0 a	42,1 a
<i>M. anisopliae</i> – <i>T. viride</i>	100 a	79,4 ab	38,3 bc	1,8 c
Pirimifos Metil	100 a	70,8 a	104,6 a	23,0 a
Control	100 a	114,3 a	132,1 a	112,2 a

<sup>1</sup> Período 1: 6 semanas anteriores a la primera aplicación de hongos; período 2: después de la primera aplicación entre las semanas 7 y 13; período 3: entre las semanas 14 y 18 después de la segunda aplicación, y período 4: entre las semanas 19 y 23 después de la tercera aplicación.

<sup>2</sup> Los promedios dentro de una misma fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

**Tabla 3.** Porcentaje acumulado de colonias de *Atta cephalotes* muertas después del tratamiento con cebos de hongos en cada uno de los períodos estudiados.

Períodos <sup>1</sup>	<i>M. anisopliae</i>	<i>T. viride</i>	<i>M. anisopliae</i> - <i>T. viride</i>	Pirimifos Metil	Control
1	0	0	0	0	0
2	100	20	20	0	0
3	100	40	100	20	0
4	100	40	100	60	0

<sup>1</sup> Período 1: 6 semanas anteriores a la primera aplicación de hongos; período 2: después de la primera aplicación entre las semanas 7 y 13; período 3: entre las semanas 14 y 18 después de la segunda aplicación, y período 4: entre las semanas 19 y 24 después de la tercera aplicación.

fueron cubiertos con tierra. Los hormigueros fueron cubiertos por hierba a medida que las hormigas disminuían su actividad. En los nidos empleados como tratamiento control no se observaron cambios en la actividad o en la apariencia, como sí se encontró en los grupos de nidos tratados con hongos o con el producto químico.

## DISCUSIÓN

El uso del jugo de naranja como atrayente favoreció que las hormigas cargaran el cebo hacia el interior del nido, logrando en esta forma enmascarar la presencia de los hongos y evadir la capacidad de las hormigas para detectar agentes tóxicos o nocivos para la colonia (Littlelyke y Cherrett, 1978; Machado *et al.*, 1988; Diehl-Fleig y Lucchese, 1991; Rocas, 1994). La adición de productos con olores atractivos en el diseño de estrategias para el control de hormigas cortadoras de hojas de hojas fue documentada por Littlelyke y Cherrett (1978), quienes evaluaron la capacidad de las hormigas para detectar olores y desencadenar conductas de aceptación o de rechazo. Esta forma de introducir contaminantes en los nidos de las hormigas fue también evaluado en un estudio realizado por Specht *et al.* (1994) en el que el hongo *Beauveria bassiana* fue aceptado y cargado al interior de los nidos por hormigas obreras de las especies *Acromyrmex striatus*, *A. heyeri* y *A. crassispinus* cuando se formuló con extractos de las plantas *Hovenia dulcis* y *Alurites fordii*, mientras que *B. bassiana* sin atrayente, usado como control, no fue aceptado.

Independientemente del flujo inicial de hormigas en cada nido, la mayoría de los tratamientos con hongos mostraron eficacia al disminuir el flujo de hormigas hasta reducirlo completamente y conseguir un 100% de control de las colonias tratadas (excepto en el tratamiento con *T. viride*) (véase tabla 2).

En campo se han realizado algunos estudios, principalmente en Brasil, en donde se consiguió la reducción total de la actividad en nidos de *A. sexdens piriventris* 60 días después de aplicar una suspensión acuosa de conidias de diferentes cepas de *M. anisopliae* o *B. bassiana* (Da Silva y Diehl-Fleig, 1988). Posteriormente, en Rio Grande do Sul, Diehl-Fleig *et al.* (1992b) lograron controlar el 72% de los nidos de diferentes especies de *Acromyrmex* en una plantación de *Eucalyptus*

*grandis* utilizando la cepa Bsa de *B. bassiana* en polvo y formulada con cáscara de naranja como atrayente. También, Diehl-Fleig *et al.* (1993) obtuvieron la muerte del 83 y 87% de los nidos de *Acromyrmex* spp. en plantaciones de frutales y de *Eucalyptus saligna*, respectivamente, empleando conidias de la cepa Bsa de *B. bassiana* en polvo, sin formulación. En Colombia, Madrigal *et al.* (1997) obtuvieron la muerte hasta del 60% de los nidos de *A. cephalotes* en campo utilizando cepas de cualquiera de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* o *T. harzianum* aplicado en polvo con insufladora, pero alcanzaron el control del 100% de las colonias tratadas utilizando las mismas cepas de los hongos preparados en forma de cebo. Los resultados de los trabajos mencionados y los conseguidos en este estudio son comparables en cuanto a la eficacia obtenida en el control de los nidos.

Al comparar la efectividad de los cebos basados en hongos para controlar los nidos de las hormigas con Pirimifos Metil, fue posible notar que el efecto de Pirimifos Metil es más rápido que el de los tratamientos con hongos, pero menos duradero; esto se debe posiblemente a que *M. anisopliae* produce una enfermedad que se disemina en la población de hormigas causando una epizootia y *T. viride* coloniza y destruye los jardines del hongo simbiote. Por tanto, el establecimiento de estos hongos dentro de los nidos de las hormigas cortadoras de hojas puede simular un efecto residual. Este resultado se observó a pesar de que Pirimifos Metil se aplicó con insufladora, logrando con este procedimiento una alta penetración del producto químico en los túneles más profundos del nido, cuando la forma de aplicación tradicional es el espolvoreo en los caminos de acceso al hormiguero. En contraste, el uso de los cebos favoreció la penetración de los hongos, ya que las hormigas se encargan de transportarlo hacia el interior, donde ejercen su acción. En los tratamientos control no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje del flujo de hormigas por minuto en los períodos estudiados.

En los hormigueros fue posible establecer características comunes de comportamiento de las hormigas en respuesta a la acción de los hongos utilizados. Los cambios de comportamiento observados, como el desplazamiento rápido de las hormigas, quietud en las entradas del nido, el abandono de

caminos de forrajeo, el cubrimiento de los restos de cebo con tierra y otras conductas descritas anteriormente, habían sido también observadas en trabajos realizados por Machado *et al.* (1988) y Diehl-Fleig y Lucchese (1991), cuando introdujeron *B. bassiana* en hormigueros de algunas especies de la hormiga cortadora *Acromyrmex* sp. Debido a la capacidad que tienen las hormigas de presentar diferentes respuestas frente a determinados estímulos, es posible que modificaciones en las condiciones ambientales, la ausencia de la reina y la actividad de los hongos (entomopatógenos o antagonistas) dentro de los nidos, provocara cambios en el comportamiento de las hormigas. Bass y Cherret (1994) encontraron que en el jardín usualmente están presentes un 30% de las obreras, que realizan un proceso de descontaminación, y de acuerdo con Ortiz (1998), esta actividad aumenta hasta ocupar un 80% de las hormigas cuando el jardín fue contaminado con *T. viride* cepa 26. Este cambio de actividad conlleva a una fuerte disminución en la cantidad de hormigas que forrajean, como fue posible observar en este trabajo. Estos resultados contrastan con el estudio publicado por Currie *et al.* (1999), en el cual aplicaron una cepa no identificada de *Trichoderma* a nidos de *A. colombica* y no obtuvieron resultados de la acción del antagonista sobre el hongo simbiote, aparentemente debido a la falta de selección previa de una cepa adecuada de *Trichoderma*. Además, como lo demostraron Ortiz y Orduz (2001), algunas cepas de *Trichoderma* pueden estimular el crecimiento del hongo simbiote de la hormiga *A. cephalotes*. También se ha indicado que los hongos del género *Escovopsis*, que son patógenos especializados del hongo simbiote de *A. Colombica*, podrían ser utilizados en control biológico de las hormigas cortadoras (Currie *et al.*, 1999).

En este trabajo se consiguió la muerte de todas las colonias tratadas con hongos, excepto con *T. viride*, debido posiblemente a una subestimación del tamaño del nido, y por tanto a la aplicación de una dosis menor. Por la misma razón, es posible explicar que una sola aplicación de los hongos no fue suficiente para matar los nidos, y por consiguiente, fue necesario incrementar el número de dosis, con el fin de que el inóculo fuera suficiente para vencer las defensas sanitarias de las hormigas y obtener la reducción total de la actividad de los nidos (Da Silva y Diehl-Fleig, 1988; Currie y Stuart, 2001).

## CONCLUSIONES

Este trabajo presenta el control exitoso de colonias de *A. cephalotes* con el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* y con el hongo antagonista *T. viride* aplicado en cebos. Además, muestra que la metodología para introducir los hongos contaminantes dentro de los nidos fue apropiada, y que éstos podrían ser desarrollados en el futuro como producto comercial, ya que su eficacia fue mayor que la del producto químico.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Corporación para Investigaciones Biológicas—CIB de Medellín, y fue co-financiado por Colciencias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bass, M. and Cherrett, J. 1994. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera:Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecol. Entomol.* 19:215-220.
- Chapela, I. H., Rehner, S. A., Schultz, T. R., Mueller, U. G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science.* 266:1691-1694.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48:37-43.
- Correa, A., Roquebert, M. F. and Bettucci, L. 1996. Trichorzianins activity on mycelial growth of *Sclerotium cepivorum* under laboratory conditions *in vitro*. *Cryptogamie Mycol.* 17:123-128.
- Cortes, M. M. 1986. Control de hormigas cortadoras. Seminario Universidad Nacional de Colombia. Seccional Medellín. 34p.
- Cotes, A. M. 1993. Study of common bean protection against damping-off by treatment of seeds with *Trichoderma koningii* Oudemans. Ph. D Thesis. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Unité de Pathologie Vegetale. Belgique. 120 p.
- Currie, C. R. and Stuart, A. E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. R. Soc. London. B. Biol. Sci.* 268:1033-1039.

- Currie, C. R., Mueller, U. G. and Malloch, D. 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:7998-8002.
- Da Silva, M. E. and Diehl-Fleig, E. 1988. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera:Formicidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 17:263-269.
- Diehl-Fleig, E. and Lucchese, M. 1991. Reações comportamentais de operárias de *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera:Formicidae) na presença de fungos entomopatogênicos. *Rev. Bras. Entomol.* 35:101-107.
- Diehl-Fleig, E., Da Silva, M. E., Valim-Labres, M. E. and Specht, A. 1992a. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. no Rio Grande do Sul. *Acta Biol. Leopoldensia.* 14:99-104.
- Diehl-Fleig, E., Da Silva, M. E., Specht, A. and Bortolas, E. P. 1992b. Em prego do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em iscas para o controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. em floresta implantada de *Eucalyptus grandis*. 7o Congresso Florestal Estadual. 2:1139-1150.
- Diehl-Fleig, E., Da Silva, M. E., Specht, A. and Valim-Labres, M. E. 1993. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera:Formicidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 22:281-285.
- Diehl-Fleig, E. and Valim-Labres, M. E. 1993. Fungi isolated from leaf-cutting ants *Atta sexdens piriventris* and *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera:Formicidae): *Mucor* spp. Effects on *Beauveria bassiana* entomopathogen. *Cien. Cult.* 45:143-143.
- Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S., Montagu, M. V., Herrera-Estrella, A. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8:603-613.
- Hebling, M. J., Maroti, P. S., Bueno, O. C., Da Silva, O. A., Pagnocca, F. C. 1996. Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera:Formicidae). *Bull. Entomol. Res.* 86:253-256.
- Hinkle, G., Wetterer, J. K., Schultz, T. R., Sogin, M. L. 1994. Phylogeny of the Attine ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science.* 266:1965-1967.
- Holldobler, B. and Wilson, E. 1990. *The ants*. The Belknap Press, Harvard University Press. Cambridge. 732p.
- Kullnig, C., Mach, R. L., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2232-2234.
- Leal, S. C. M., Bertiolo, D. J., Butt, T. M., Carder, T. H., Burrows, P. R. and Peberdy, J. F. 1997. Amplification and restriction endonuclease digestion of the *Pr1* gene for the detection and characterization of *Metarhizium anisopliae* strains. *Mycol. Res.* 101:257-265.
- Leathers, T. D., Gupta, S. C. and Alexander, N. J. 1993. Mycopesticides: status, challenges and potential. *J. Ind. Microbiol.* 12:69-75.
- Lima, P. P. 1992. Palestra sobre formigas cortadeiras. En: Memória de Reuniao de Especialistas em Controle Alternativo de Cupins e Formigas. Ibama, Brasil. 23-24.
- Littleddyke, M. and Cherrett, J. 1978. Olfactory responses of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera:Formicidae) in the laboratory. *Bull. Entomol. Res.* 68:272-282.
- López, E., Romero, M., Ortiz, A. and Orduz, S. 1999. Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinas de *Atta cephalotes* (Hymenoptera:Formicidae) en Colombia. *Rev. Col. Entomol.* 25: 49-56.
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., Di Prieto, A. 1993.

- Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathol.* 83:302-318.
- Machado, C. A., Diehl-Fleig, E., Da Silva, M. E. and Lucchese, M. 1988. ReaVoes observadas em colonias de algumas especies de *Acromyrmex* (Hymenoptera:Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogenicos. *Cien. Cult.* 40:1106-1108.
- Madrigal, C. A., Yepes, R. F. and Acevedo, D. P. 1997. Evaluación de tres hongos y dos especies vegetales para el control de la hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera:Formicidae). Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín. Facultad de Ciencia y Ciencias Agropecuarias, 43 p.
- Mueller, U. G., Rehner, S. A., Schultz, T. R. 1998. The evolution of agriculture in ants. *Science.* 281:2034-2038.
- Ortiz, A. 1998. Selección y evaluación de una cepa de *Trichoderma* o *Gliocladium* para el control de *Atta cephalotes* en condiciones de laboratorio. Tesis M.Sc. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Ortiz, A. and Orduz, S. 2001. *In vitro* evaluation in *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathol.* 150:53-60.
- Roces, F. 1994. Odour learning and decision-making during food collection in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *Ins. Soc.* 41:235-239.
- Rombach, M. C. 1989. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga.* 34:45-52.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. and Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4364-4370.
- Specht, A., Diehl-Fleig, E. and Da Silva, M. E. 1994. Atratividade de iscas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a formigas do genero *Acromyrmex* (Hymenoptera:Formicidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 23:99-104.
- St. Leger, R. J., May, B., Allee, L. L., Frank, D. C., Staples, R. C. and Roberts, D. W. 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 60:89-101.
- St. Leger, R. J., Joshi, L. and Roberts, D. W. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:709-713.
- Stimac, J. L., Alves, S. B. and Camargo, M. T. V. 1987. Sucetibilidade de *Solenopsis* spp. a diferentes especies de fungos entomopatogenicos. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 16:377-378.