

Título: Potencial uso simultáneo de micopatógenos biocontroladores de hormigas cortadoras de hojas.

Autores: Natalia G. Armando, Jorge A. Marfetan, Patricia J. Folgarait

Correo: ng.armando14@gmail.com

Formación (en curso): Licenciatura en Biotecnología

Beca: CIN

Tema: Control biológico de hormigas cortadoras de hojas.

Director: Patricia Julia Folgarait.

Programa donde se inscribe la beca y/o la tesis: Interacciones biológicas: de las moléculas a las comunidades, **Director:** Luis Wall, **Co-Director:** Patricia Folgarait.

Unidad de investigación: Laboratorio de Hormigas, **Directora:** Patricia Folgarait.

Resumen:

En la actualidad las hormigas cortadoras de hojas representan una de las peores plagas herbívoras del Neotrópico. Debido a su gran capacidad de adaptación, estructura social y convivencia con otros organismos, resulta complejo su control. Los pesticidas sintéticos que se usan hoy en día, son ineficientes y contaminadores del medio ambiente por lo tanto se intentan otras formas de solucionar este problema. Uno de los métodos alternativos encontrados es el biocontrol de plagas; existen antecedentes que han demostrado el antagonismo de hongos micopatógenos frente a *Leucoagaricus sp.*, siendo el último el hongo que cultivan las hormigas para utilizarlo como alimento. Se proponen dos ensayos en laboratorio utilizando enfrentamientos en cajas de petri. El primero tiene el objeto de seleccionar las especies más rápidas y compatibles para un crecimiento conjunto de un género de micopatógeno antagonista de *Leucoagaricus*. El segundo a realizar luego del primero, se usará para evaluar niveles de virulencia en enfrentamientos entre todas las especies de M versus *Leucoagaricus*. De esta manera, la/s especie/s más efectiva/s podrían probarse en un futuro como una forma de biocontrol de esta plaga.

Objetivos e Hipótesis:

Se propone como objetivo general encontrar a la/las especie/s del micopatógeno M más virulenta dentro de las especies con las que se cuenta en el Laboratorio de Hormigas (no se nombra la especie por cuestiones de confidencialidad) y ver su accionar contra el hongo *Leucoagaricus sp.*, siendo este hongo el que cultivan las hormigas para su alimentación y por lo tanto para la supervivencia del nido.

El laboratorio de hormigas cuenta con 8 especies de M que fueron obtenidas de diferentes zonas geográficas y especies de hormigas cortadoras de hojas.

Los objetivos específicos son:

- 1) Analizar la cinética de crecimiento de diferentes especies del micopatógeno M enfrentándolas entre ellas de a pares en todas sus combinaciones.
- 2) Evaluar la compatibilidad de las especies de M enfrentadas.
- 3) Determinar los efectos de la/las especie/s más virulenta/s del micopatógeno M frente a *Leucoagaricus sp.*

EL objetivo final propuesto es utilizar estos datos en un futuro para el posible uso de M como biocontrol de estas hormigas plagas.

Metodología:

Para el cultivo de las diferentes cepas se utilizaron placas de petri de vidrio esterilizadas por el método de autoclave y plaqueadas bajo flujo laminar con ágar PDA (ágar de papa y dextrosa).

Para la determinación de la cinética de velocidad entre las especies del micopatógeno M se repicaron las muestras de las especies con las que se cuentan en el Laboratorio de Hormigas y se sembraron de a pares en la placa de petri de manera enfrentada, a una distancia $2L$ entre las dos siembras siendo L la distancia entre la mitad de la placa y el lugar donde se siembra el patógeno aproximadamente, de esta manera se intentó que cada cepa tenga la misma superficie para crecer y que la única variable que se tenga en cuenta en estos casos sea la velocidad de crecimiento frente a la otra cepa. Con la

velocidad en función del tiempo se analizó la cinética de crecimiento de cada especie y el tipo y grado de interacción entre ellas.

Luego se enfrentó a M contra *Leucoagaricus sp.* para comparar la virulencia de cada especie frente al cultivo de las hormigas; el enfrentamiento se realizó con todas las especies con las que se cuenta a pesar de las diferencias obtenidas en el primer ensayo. En este caso el *Leucoagaricus sp.* se inoculó con 30 días de anticipación a la inoculación de M ya que el crecimiento es mucho más lento.

Procedimiento:

En un primer ensayo se realizaron los enfrentamientos entre las especies tomadas de a pares en una misma placa de petri adicionando los controles correspondientes para cada especie por sextuplicado. Para tener precisión en los resultados, se midió con una regla el diámetro de la placa (longitud L) y se marcó la mitad de la misma (longitud L/2), dentro de cada mitad se dibujó un punto de cada lado (longitud L/4) en donde se inoculó cada suspensión de M. Estas suspensiones se realizaron por medio de un conteo de conidios y se estandarizó dentro de un rango para colocar la misma concentración de cada hongo. Cada enfrentamiento se realizó por sextuplicado y se dejó crecer a 26 ° C y 75% de humedad en ausencia de luz durante una semana. Cada 24 hs se marcó sobre la base de la placa con fibra indeleble el área de crecimiento, para cada marca se utilizó un color distinto y se indicó su tiempo. Al finalizar los enfrentamientos (entre 3 y 5 días), se sacó una foto para cada caja de petri. Luego se analizaron las áreas circunscriptas con los diferentes colores, usando el programa Image J, con éste se obtuvo un área para cada cepa enfrentada y para los controles a cada tiempo t. El promedio de estas áreas graficadas en función del

tiempo nos dió información de la cinética de cada especie creciendo sola (control) y creciendo en el enfrentamiento.

Para el segundo ensayo, se realizaron los enfrentamientos de cada especie M contra *Leucoagaricus sp.* para evaluar la virulencia de las especies del micopatógeno M. Se enfrentaron todas las cepas de M. El *Leucoagaricus sp.* que se utilizó es de una especie plaga de hormiga cortadora existente en el Laboratorio de Hormigas. El proceso es similar respecto al anteriormente descrito, salvo que el *Leucoagaricus sp.* se inoculó con 30 días de anticipación por su lento crecimiento hasta alcanzar un diámetro del micelio de unos 5 centímetros y las placas que se utilizaron fueron plásticas (por lo tanto más pequeñas) para disminuir el riesgo de contaminación ya que este hongo debía mantenerse estéril por un lapso máximo de 45 días (30 días de crecimiento y 15 días aproximados para el enfrentamiento). La inoculación de M se realizó con el mismo método de suspensiones y la misma cantidad para los controles. En este caso se midieron las áreas cada 12 horas, porque se intentó detectar qué ocurría al momento del contacto de M con *Leucoagaricus sp.* y si medíamos cada 24 hs se corría el riesgo de no poder detectarlo.

El análisis se realizó con el mismo software utilizando fotografías de las placas. Las áreas de cada especie se compararon estadísticamente entre sí utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Resultados:

Para analizar los resultados colocaremos un número a cada micopatógeno M para poder diferenciarlos entre ellos.

El primer ensayo nos arrojó como primer resultado que todos los M son compatibles entre sí ya que no se observó degradación de ningún tipo. El análisis estadístico se realizó comparando las áreas de crecimiento de cada M en cada tiempo. En el único tiempo en el que se observaron diferencias significativas fue a las 24 hs, ésto se debió a que algunos de los M crecieron más rápido que otros pero al pasar el tiempo y una vez que entran en contacto ya no se observa esta diferencia salvo M4 que creció más lento respecto al resto.

En base al segundo ensayo, pudimos observar que todos los M crecieron sobre el micelio de *Leucoagaricus sp.* muriendo el último, lo cual podría sugerir una interacción del tipo. Sin embargo, no se pudo discernir/observar claramente si ocurrió degradación o si la muerte de *Leucoagaricus sp.* fue por falta de espacio y/o competencia por el sustrato. Para verificar este problema se realizaron otros ensayos que exceden esta ponencia.

Finalmente en base a las áreas finales y el tiempo que tardó cada M en llegar a cubrir la placa, se calcularon las velocidades de crecimiento y se compararon estadísticamente con el mismo test estadístico. En el siguiente gráfico se señalan los resultados obtenidos.

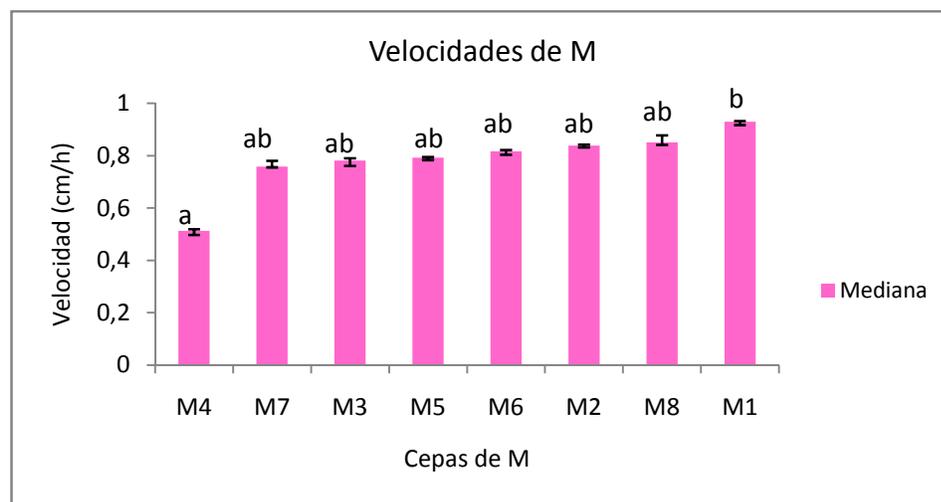


Gráfico: Velocidades de crecimiento de cada M (enfrentamiento en placa versus *Leucoagaricus sp.*). Los resultados se compararon estadísticamente (Kruskal-Wallis), letras distintas representan diferencias significativas (K-W= 32,401 y $p < 0,00175$)

Conclusiones:

Encontramos que hay diferencias en la velocidad de crecimiento entre cepas de un mismo M y que los mismos tienen comportamiento antagonista respecto a *Leucoagaricus sp.*

Además podemos concluir que es posible el crecimiento de diferentes M en simultáneo permitiendo el uso de más de un controlador al mismo tiempo o en forma secuencial.

Particularmente para nuestro Laboratorio, nos sirve descartar a M4 para futuros ensayos por su marcada lentitud en su velocidad de crecimiento.