



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

ESCUELA DE POSGRADO

**Desarrollo de una formulación granular base para el control biológico
de las hormigas forrajeras (*Atta spp.*)**

por

Ena Edith Herrera Salazar

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

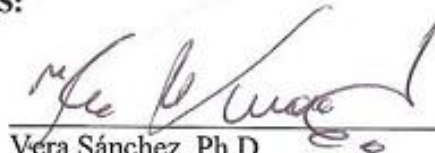
Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Turrialba, Costa Rica, 2009

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

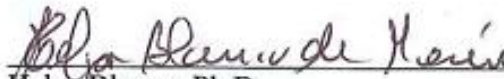
FIRMANTES:



Vera Sánchez, Ph.D.
Consejera Principal



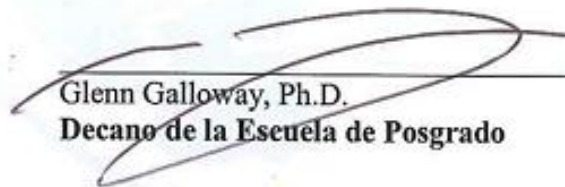
Eduardo Hidalgo, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Helga Blanco, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gabriela Soto, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Ena Edith Herrera Salazar
Candidata

DEDICATORIA

Para ti, que nunca te has apartado de mi lado e incluso en los momentos más difíciles me has brindado apoyo, protección, confianza y amor. Porque todo cuanto fui, soy y seré es por tu gracia y por tu amor. A ti, MI BUEN SEÑOR.

Para mi viejita, Esther Gloria, quien desde el cielo sigue cuidando mis pasos e inspirándome para alcanzar mis metas. Mi viejito, Cecilio Alfonso, por enseñarme la satisfacción del esfuerzo. Gracias a los dos puedo decir que *“realice mis sueños, me enseñaron a volar y que no hay montaña que no puedo escalar; siempre yo los llevo dentro de mi corazón, guían mi camino, son mi inspiración”*. También para mi gordo, Néstor Omar, con quien desde la niñez aprendí a reírme de los errores y a extraer el aprendizaje de ellos. Junto a ustedes, mis tres resplandecientes luceros que iluminan hasta la más oscura de mis noches, mi pequeña inmensa familia, he aprendido que *“cada día brinda la posibilidad de nuevas conquistas”*.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora consejera, **Dra. Vera Sánchez** por su invaluable apoyo y consejos acertados, pero mucho más por su confianza y amistad.

A los miembros del Comité Asesor, **Dra. Helga Blanco, MSc. Gabriela Soto y MSc. Eduardo Hidalgo** por sus aportaciones y la dedicación demostrada para enriquecer este trabajo.

Al **Dr. Wilbert Phillips**, a **Don Alejandro Molina**, a **Don Sergio Coto** y a sus respectivos equipos de trabajo en la finca “La Montaña” y en el campus CATIE por el apoyo en la realización de la fase de campo.

Al **Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICIT**, a través del proyecto Desarrollo de productos alternativos para el manejo ecológico del hongo simbiótico y único alimento de las hormigas cortadoras (zompopas) por su aportación en la presente investigación.

Al **Servicio Alemán de Intercambio Académico, DAAD**, por admitirme en su programa de becarios y becarias y brindarme el apoyo para realizar los estudios de posgrado.

A la **Facultad de Química y Farmacia** de la **Universidad de El Salvador** por tener fe en mí y permitirme afrontar este desafío.

A mis amigos y amigas que viajando a través de cables se introducían al monitor de mi computadora y con su compañía hicieron más resistible la melancolía de la lejanía física. Especialmente a **la amigüis, el bichito, el licenciado y el viejito**. También, al **Lic. Guillermo Castillo** y las licenciadas **María Luisa, María Elisa, Lorena, Nancy** y a todos mis compañeros y compañeras de trabajo de la Facultad de Química y Farmacia de la UES.

A todos y todas de la promoción de **maestría 2008-2009** del CATIE por compartir su cultura, sus conocimientos y cada uno de los momentos que formarán parte de mis recuerdos siempre.

Al personal del CATIE que siempre recordaré con cariño y alegría, especialmente a Manrique González, Arturito Ramírez, Douglas Navarro, Patricia Leandro, Cindy Castillo, José Ángel Segura, Alejandro Solano, Miguel Castillo, Martín Alvarado, Juan Rojas, Marta González, Noily Navarro, Alfonso Marín, Aranjid Valverde y Jeannette Solano. También a Doña Gladys por su cariño y sus palabras de apoyo que llegaban justo en los momentos más indicados.

Especial agradecimiento a todas aquellas personas que con un gesto, con una palabra, y tal vez, hasta sin saberlo siquiera, ahuyentaron mis momentos de desanimo y me hicieron ver el arco iris con los colores más resplandecientes: MIL GRACIAS!!!!

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	V
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE GRAFICOS	XI
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	XII
INTRODUCCIÓN	1
1.1Objetivos del estudio	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.2 Hipótesis del estudio	3
Capítulo 1. Revisión de literatura	4
1. Hormigas micófagas.....	4
1.1 Hormigas forrajeras	5
2. Principales actividades que realiza la colonia.....	10
3. El hongo y las relaciones simbióticas asociadas a su cultivo.....	11
4. Manejo agrícola de las hormigas forrajeras	14
5. Literatura citada	19
Capítulo 2. Formulación, producción y evaluación de la calidad de bases que permitan la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico sobre el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras del género <i>Atta</i>	23
1. Introducción	24
2. Metodología	26
2.1 Formulación y evaluaciones de formulados base	26
2.2 Evaluación de características físicas de los formulados base.....	26
2.3 Selección de los formulados base de acuerdo a la preferencia de acarreo que mostraron las hormigas.....	30
2.4 Evaluación de los formulados seleccionados con diferentes ingredientes activos.....	31
2.5 Selección de los cebos de acuerdo a la preferencia de acarreo que mostraron las hormigas.....	31
2.6Evaluación de las características físicas y biológicas de los cebos que mostraron mayor rapidez de acarreo por las hormigas.....	32
3. Resultados y discusión	34
3.1 Formulación y evaluación de características físicas de los formulados base.....	34
3.2 Formulación y evaluaciones físicas y biológicas de cebos granulados.....	37
3.3 Análisis de costos en la producción de los formulados.....	42
4. Conclusiones y recomendaciones	42
5. Literatura citada	44

Capítulo 3. Establecimiento de nidos artificiales y prueba de eficacia de cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras género <i>Atta</i>	46
1. Introducción	47
2. Metodología	48
2.1 Ubicación geográfica de la investigación.....	48
2.2 Establecimiento de nidos artificiales	48
2.3 Ensayo de eficacia de gránulos en segmentos de jardines fúngicos.....	50
2.4 Selección de nidos de campo y ensayo de eficacia de cebos granulados en nidos de campo.....	52
2.5 Identificación de especímenes	54
3. Resultados y discusión.....	54
3.1 Establecimiento de nidos artificiales	54
3.2 Ensayo de eficacia de gránulos en segmentos de jardines fúngicos.....	55
3.3 Eficacia de cebos granulados en nidos de campo.....	56
3.4 Identificación de especímenes	62
4. Conclusiones y recomendaciones	62
5. Literatura citada	63
Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones generales	65
4.1 Conclusiones.....	65
4.2 Recomendaciones	65
ANEXOS	67

RESUMEN

Las hormigas forrajeras (*Atta* spp.) son capaces de destruir plantaciones completas de cultivos de importancia económica en América Tropical y Subtropical porque cortan el tejido de las plantas y lo transportan a sus nidos subterráneos donde lo utilizan para el cultivo de un hongo *basidiomiceto*, que es su alimento principal. Las numerosas investigaciones que se han enfocado a buscar controladores biológicos y extractos o materiales vegetales para el manejo de estas hormigas no han considerado la estabilidad química biológica del producto en el tiempo; es decir, no se ha tenido una visión clara de ofrecer un producto alternativo para el manejo de esta plaga. Con base en lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue la formulación de gránulos base a los que se pueda incorporar extractos de plantas y hongos con efecto biológico contra el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras del género *Atta*. Se prepararon gránulos con diferentes combinaciones y concentraciones de azúcar, maicena, avena, carboximetilcelulosa, gelatina, talco, bentonita, aceite de soya y agua y se evaluó la citropulpa, el extracto alcohólico de cáscaras de naranja y el aceite de semillas de naranja como atrayentes. Para comprobar la compatibilidad de las formulaciones base con ingredientes activos, se incorporó a los gránulos extracto de *Azadirachta indica* (neem), *Trichoderma* spp. y *Levadura* spp. en diferentes concentraciones. También, se evaluó la calidad de los formulados mediante determinaciones de porcentaje de humedad, porcentaje de absorción de humedad, acidez, concentración o número de conidios, viabilidad, eficacia y estabilidad. La eficacia se evaluó en el campo mediante la aplicación de 10 g de los formulados y del control positivo (sulfloramida) por metro cuadrado de extensión del nido, los nidos se ubicaron en parcelas de café (*C. arabica* L.), cacao (*T. cacao* L.) y campo abierto con zacate localizadas en el cantón Turrialba de la provincia de Cartago en Costa Rica y se registró la actividad de los nidos antes y después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados de la investigación mostraron que la fórmula de los gránulos elaborados con citropulpa como atrayente presenta mayor capacidad de atraer a las hormigas y enmascarar los ingredientes activos, superior rapidez de acarreo, menor costo de producción, estabilidad química aceptable y conservan viable los ingredientes activos evaluados en esta investigación; por lo que se recomienda la utilización de esta fórmula para la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico contra las hormigas forrajera del género *Atta*.

Palabras claves: Atrayentes, *Atta* spp., cebos, citropulpa, control biológico, extractos vegetales, gránulos, hormigas forrajeras, ingredientes activos, jardines fúngicos, nidos artificiales.

Herrera-Salazar, EE. 2009. Desarrollo de una formulación granular base para el control biológico de las hormigas forrajeras (*Atta* spp.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 85 p.

SUMMARY

The leaf cutting ants (*Atta* y *Acromyrmex*) can defoliate complete economically important crops in Tropical and Subtropical America. They cut fresh plant fragments and transport them to the nest where they are used as substrate for the cultivation of a basidiomycete fungus which is their dominant food resource. Many researchers have focused on finding biological control agents and plant extracts or plant metabolites to control the leaf cutting ants without considering biological or chemical stability of the product, so the idea of offering an alternate product to the management of this pest has not been understood. Based on this, the main objective of this study was to formulate a base for producing granules that allow the incorporation of active ingredients with biological effect against the symbiotic fungus cultivated by the leaf cutting ants in the genus *Atta*. The granules were prepared with different concentrations and combinations of sugar, cornstarch, oats, carboxymethylcellulose, gelatin, talc, bentonite, soybean oil and water. Citrus pulp, alcoholic extract of orange peel and orange seed oil were used as attractants. To check the compatibility of base formulations with active ingredients, extract of *Azadirachta indica* (neem), *Trichoderma* spp. and yeast were used in different concentrations. Furthermore, the quality of the granulated baits and the base formulations was evaluated by the determinations of moisture content, percentage of moisture absorption, acidity, number of conidia, efficacy and stability. Efficacy was conducted on nests into coffee plantation (*C. arabica* L.), cocoa plantation (*T. cacao* L.) and open grass field in the canton of Turrialba, Cartago in Costa Rica, by applying 10 g of the granules and the positive control (sulfluramid) per square meter of the nest; the foraging activity was measured and recorded both before and after the application of the treatments. The results show that the base formulation produced using citrus pulp has better ability to attract ants and cover active ingredients. In addition, this formulation is carried to the nest more rapidly, its production cost is lower, the chemical stability is acceptable and also it preserves the viability of the active ingredients evaluated in this investigation; therefore, this formulation is recommended to incorporate active ingredients with biological effect against the symbiotic fungus cultivated by the leaf cutting ants in the genus *Atta*.

Keywords: Attractant, *Atta* spp., baits, citrus pulp, biological control, plant extracts, granules, leaf cutting ants, active ingredients, fungal gardens, artificial nests.

Herrera-Salazar, EE. 2009. Development of a granular base formulation for the biological control of leaf cutting ants (*Atta* spp.). Thesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 85 p.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Diferencias morfológicas entre especímenes y nidos de los géneros de hormigas forrajeras <i>Acromyrmex</i> y <i>Atta</i>	6
Cuadro 1.2 Duración de cada estadio durante la formación de la nueva colonia.....	10
Cuadro 2.1 Composición de los formulados base elaborados usando aceite esencial de semillas de naranja (A), extracto alcohólico de cáscaras de naranja (B) o citropulpa (C) como atraentes.. ..	27
Cuadro 2.2 Rapidez con que los formulados base fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra al nido	35
Cuadro 2.3 Porcentaje de humedad presente en los formulados base determinada por diferencia de peso a 150 °C (promedio de cuatro mediciones)	35
Cuadro 2.4 Acidez promedio (pH) de los formulados base medida a 25 °C en una dilución 1 en 2.5.....	36
Cuadro 2.5. Rapidez con que los formulados base fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra al nido	36
Cuadro 2.6 Composición cuali-cuantitativa de los formulados que por sus características físicas y su velocidad de acarreo son recomendados para formular cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras género <i>Atta</i>	37
Cuadro 2.7 Rapidez con que los cebos con <i>Trichoderma</i> spp. como ingrediente activo fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra (1.00 g) al nido	37
Cuadro 2.8 Rapidez con que los cebos con <i>Levadura</i> spp. como ingrediente activo fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra (1.00 g) al nido	38
Cuadro 2.9 Rapidez con que los cebos con neem (<i>Azadirachta indica</i>) como ingrediente activo fueron acarreados por las hormigas, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra (1.00g) al nido	38
Cuadro 2.10 Porcentaje de humedad presente en los cebos y los testigos determinada por diferencia de peso a 150 °C (promedio de tres mediciones).....	39
Cuadro 2.11 Acidez (pH) de los cebos y los testigos ensayados en campo, medida a 25 °C en una dilución 1 en 2.5 (promedio de cuatro repeticiones).....	40
Cuadro 2.12 Número de conidios promedio en los cebos con <i>Trichoderma</i> spp. a.i. y <i>Levadura</i> spp. a.i., evaluados en campo (promedio de cuatro repeticiones)	40
Cuadro 2.13 Viabilidad de los cebos con ingrediente activo <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Levadura</i> spp. 24, 48 y 72 horas después de su incubación, medida como número de conidios vivos por gramo de cebo	41
Cuadro 2.14 Costos para la producción de un kilogramo de los formulados a pequeña escala, los costos y los precios se reportan en dólares americanos por kilogramo o litro de producto. .	42
Cuadro 3.1 Número de hormigas forrajeando en los nidos tratados, el conteo se realizó en uno de los caminos más activos durante un minuto.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Evolución de las hormigas forrajeras.....	5
Figura 1.2 Ciclo biológico de las hormigas forrajeras.....	7
Figura 1.3 División social de las hormigas forrajeras.	8
Figura 1.4 Relaciones simbióticas en los jardines fúngicos de las hormigas forrajeras.....	14
Figura 2.1 Secuencia de imágenes de la prueba de preferencia acarreo.....	30
Figura 2.2 Esquema de los formulados que se prepararon con diferentes concentraciones de ingredientes activos (i.a.) Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; Tr: <i>Trichoderma</i> spp. a.i.; L: <i>Levadura</i> spp. i.a. y N= neem i.a..	32
Figura 3.1 Las imágenes ilustran el proceso de extracción de un nido de campo.....	49
Figura 3.2 Las imágenes ilustran el proceso que se siguió para el establecimiento de un nido artificial en invernadero.	50
Figura 3.3 La imagen ilustra la forma en que se colocaron las secciones de jardín en los bioensayos de eficacia de los cebos formulados con diferentes ingredientes activos.	51
Figura 3.4 Las imágenes ilustran como se midieron y se delimitaron los nidos en la presente investigación.	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.1 Comportamiento en la absorción de humedad de los cebos y los testigos ensayados mediante la prueba de acarreo, determinada por diferencia de peso a 150 °C medidas a la hora dos y cuatro posteriores de ser colocados en campo (promedio de tres mediciones en cada tiempo).....	41
Gráfico 2.1 Actividad de las hormigas por tratamiento, evaluada cada semana en los tratamientos con cebos formulados con extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayente y <i>Trichoderma</i> spp. BTr7.01x10 ⁷ , <i>Levadura</i> spp. BL5% o neem BN1% como ingrediente activo comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-S®) y el testigo negativo gránulo sin ingrediente activo y extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayente (B).	58
Gráfico 2.2 Actividad de las hormigas por tratamiento, evaluada cada semana en los tratamientos con cebos formulados con citropulpa como atrayente y <i>Trichoderma</i> spp. BTr7.01x10 ⁷ , <i>Levadura</i> spp. BL5% o neem BN1% como ingrediente activo comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-S®) y el testigo negativo gránulo sin ingrediente activo y citropulpa como atrayente (C).	59
Gráfico 2.3 Efecto de los tratamientos en la actividad promedio de las hormigas forrajeras género <i>Atta</i> en los tratamientos con cebos formulados con citropulpa (C) y extracto de cáscaras de naranja (B) como atrayentes y <i>Trichoderma</i> spp. (Tr); <i>Levadura</i> spp. (L) o neem (N) como ingredientes activos a las concentraciones de 7.01x10 ⁷ conidios/g; 5% (p/p) y 1% (p/p) respectivamente; comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-S®) y los testigos negativos gránulo sin ingrediente activo (T).	61

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

a.i.: Ingrediente activo

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

cm: Centímetro

cm³: Centímetros cúbicos

g: Gramo

kg: Kilogramo

m: Metros

m²: Metros cuadrados

mm: Milímetros

msnm: Metros sobre el nivel del mar

INTRODUCCIÓN

Las hormigas forrajeras son originarias de Sudamérica donde han evolucionado con su ambiente natural desde hace millones de años hasta el punto de considerarse los insectos más evolucionados y exitosos. Debido a su herbivoría generalista, se considera que su efecto ecológico en los ecosistemas es equivalente al de los grandes herbívoros (Holldobler & Wilson 1990 citado por Rojas 2001). En los bosques tropicales consumen entre el 12 y el 17% de las hojas producidas (Sánchez y Urcuqui 2006) y causan importantes pérdidas económicas en la agricultura, ya que son capaces de destruir plantaciones completas, representando especial peligro para hortalizas y plantas jóvenes de árboles frutales, forestales y ornamentales de América Tropical y Subtropical (Ricci *et al.* 2005). Pérez (1947) usando información de diferentes países americanos calculó las pérdidas ocasionadas en \$1,005 millones de dólares americanos. En ese momento se creyó que las pérdidas aumentarían al ritmo que aumentaba el desarrollo de la agricultura, porque el incremento de las poblaciones de hormigas estaba correlacionado con la amplificación de los campos de cultivo.

Estudios más recientes revelan que aunque las pérdidas causadas por esta plaga son de gran magnitud no se cuenta con registros sistematizados por país o región. Sin embargo, Fernández (2003) señala que en Brasil al cultivo de caña de azúcar corresponden pérdidas estimadas en 60 millones de dólares por año y el 30% de los gastos en el manejo de plantaciones de eucalipto hasta el tercer ciclo son atribuidos al control de hormigas forrajeras.

Métodos de manejo, principalmente químicos y mecánicos, se han utilizado para mantener a las hormigas forrajeras por debajo de umbrales de riesgo económico para los cultivos agrícolas sin obtener resultados efectivos a largo plazo ni bajo impacto ambiental. El producto más utilizado y eficiente, dodecacloro, conocido comercialmente como Mirex se retiró del mercado por su persistencia en el suelo, alto potencial de movilidad ambiental y su capacidad de acumularse progresivamente en la cadena alimenticia (ATSDR 1995).

En la actualidad, algunos productos químicos disponibles comercialmente en forma de cebos granulares como sulfloramida (Mirex S® y Dinagro S), fipronil (Blitz), clorpirifos (Pikapau y Attamix SB) y aldrín (Hormitox), presentan menor efecto residual en el ambiente pero también son menos eficientes para el manejo de las hormigas, lo que implica un mayor número de aplicaciones, además tienen un precio poco accesible para los pequeños

agricultores. Varón (2006) documentó que en las plantaciones de café en Costa Rica, los dos productos más utilizados son la sulfluramida y el octaborato de sodio, y ambos tienen un precio alto para la mayoría de los pequeños agricultores.

Investigaciones recientes se han enfocado al manejo de las hormigas forrajeras usando controladores biológicos como cepas de hongos antagonistas entre ellas *Trichoderma viride* y entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Escobar *et al.* 2002, López y Orduz 2003, Pérez 2002). Además, se han evaluado extractos y productos vegetales como neem (*Azadirachta indica*), ayote (*Cucurbita maxima*), ricino (*Ricinus communis*), paraíso (*Melia azedarach*) y trichillia (*Trichillia glauca*), entre otros (Caffarini *et al.* 2008, Gruber y Valdix 2003, Palacios y Glandstone 2003); enfocados principalmente en la búsqueda de actividad insecticida.

Hasta la fecha, la mayoría de investigaciones dirigidas en la búsqueda de controladores biológicos y extractos o materiales vegetales para el manejo de hormigas forrajeras han formulado cebos que son aplicados inmediatamente después de prepararse (Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, Naccarata y Jaffe 1989), es decir que no se ha considerado la estabilidad química ni biológica del producto en el tiempo.

Por lo anterior, el presente estudio se propuso colaborar con el manejo de las hormigas forrajeras por medio de una formulación granular base para incorporarle extractos de plantas y antagonistas que presenten efecto biológico contra el hongo simbiótico, alimento principal de las hormigas forrajeras (*Atta* spp.), que sea químicamente estable y permita un control eficiente. Además, de tener poco costo, bajo impacto ambiental y riesgo mínimo para la persona que lo aplica.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Desarrollar una formulación de gránulos que permita la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico contra el hongo simbiótico, alimento de las hormigas forrajeras (*Atta* spp.)

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes ingredientes necesarios para la preparación de formulados granulados.
- Seleccionar los formulados que presenten mayor nivel de acarreo para las hormigas forrajeras.
- Evaluar la estabilidad química de los formulados.
- Evaluar la eficacia de los formulados con diferentes ingredientes activos (extractos vegetales y antagonistas) que presenten efecto biológico contra el hongo simbiótico, del cual las hormigas forrajeras se alimentan.

1.2 Hipótesis del estudio

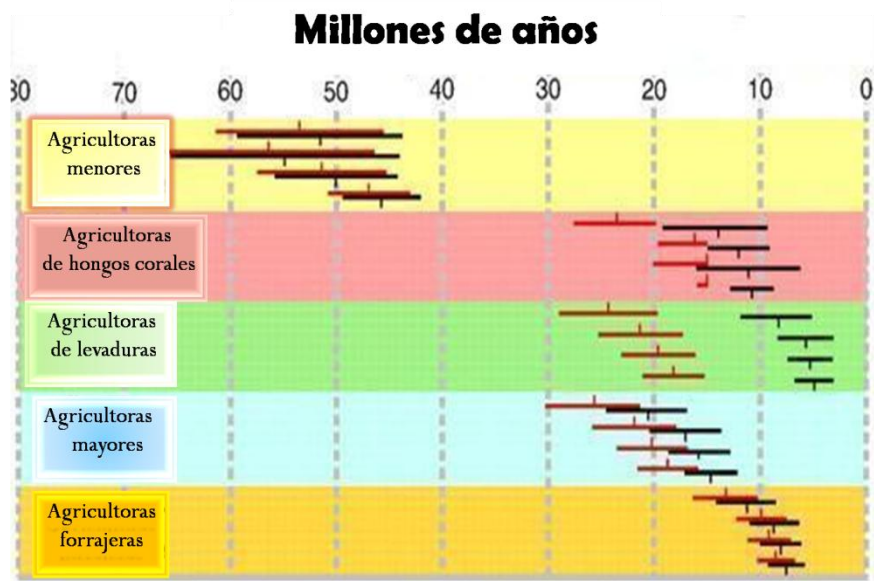
- Los ingredientes utilizados en la formulación de los gránulos presentan características similares.
- Los formulados presentan diferentes niveles de acarreo para las hormigas forrajeras.
- Los formulados son estables químicamente.
- Los cebos con extractos vegetales y antagonistas son eficaces para el manejo de nidos de hormigas forrajeras.

Capítulo 1. Revisión de literatura

Las hormigas son un grupo de himenópteros sociales de gran diversidad, actualmente se conocen alrededor de 11,500 especies descritas en todo el mundo; el neotrópico con un total de 3,100 especies descritas, constituye la región con mayor diversidad (Fernández y Sendoya 2004). De acuerdo con Rojas (2001), la diversidad funcional de las hormigas abarca un amplio espectro de gremios tróficos, y la asignación de una especie a una determinada categoría trófica no siempre es fácil, ya que las preferencias alimenticias pueden cambiar espacial y temporalmente en función de factores intrínsecos (necesidades energéticas de la colonia) o extrínsecos (disponibilidad de un recurso en el ambiente) o ambos. No obstante, varios autores, entre ellos Longino y Hanson (1995), clasifican las especies de hormigas en omnívoras, micófagas, granívoras y depredadoras.

1. Hormigas micófagas

Todas las especies de hormigas micófagas o cultivadoras de hongo (tribu Attini) son exclusivas de América, en su mayoría habitan los bosques húmedos tropicales de Suramérica. (Escobar *et al.* 2002) y se agrupan en 12 géneros y alrededor de 210 especies; el 95% de las especies se ubican en la región neotropical y el 5% en el neártico (Mayhé y Jaffé 1998). Recolectan insectos muertos, excrementos, hojas secas o directamente de las plantas, como sustrato para el cultivo del hongo (Universidad Nacional de Quilmes 2004). Los géneros *Atta* y *Acromyrmex* conocidas comúnmente como hormigas podadoras, arrieras, forrajeras o corta hojas, se diferencian de los otros géneros de hormigas Attini porque cortan material vegetal para el cultivo del hongo; son los géneros evolutivamente más recientes (varios millones de años) y se considera que concentran la más alta evolución de la sociabilidad en los insectos (Escobar *et al.* 2002) (Figura 1.1).



Fuente: Adaptado de Schultz y Brady, 2008.

Figura 1.1 Evolución de las hormigas forrajeras.

1.1 Hormigas forrajeras

Las hormigas forrajeras (*Atta* y *Acromyrmex*) cortan material vegetal para el cultivo del hongo, frecuentemente obtenido de plantaciones agrícolas y forestales por lo que se han convertido en una de las cinco plagas más importantes de América Latina (Ricci *et al.* 2005, Escobar *et al.* 2002, Ortiz y Orduz 2000). Por lo tanto, el conocimiento de aspectos relacionados con la biología y los actores involucrados en el proceso del cultivo del hongo simbiótico, base de la alimentación de esta plaga es muy importante para emprender la búsqueda de alternativas de manejo eficaces y efectivas a largo plazo.

En el género *Acromyrmex* se reconocen 24 especies y en el género *Atta* el número de especies reconocidas es de 15. Ambos géneros se encuentran distribuidos entre los 33° de Latitud Norte y los 33° de Latitud Sur del continente americano (desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina) (Anexo 1). Tienen la distribución de géneros con la mayor riqueza de especies entre las latitudes 20°S y 40°S y se encuentran desde el nivel del mar hasta los 2,000 a 3,000 metros de altura. Con respecto al rango ecológico o plasticidad ecológica, los dos géneros son considerados muy plásticos, por su capacidad de adaptación frente a cambios en el medio que habitan (Escobar *et al.* 2002, Mayhé y Jaffé 1998). Las diferencias morfológicas

entre los especímenes y los nidos de estos géneros, de acuerdo con Argüello y Glanstone (2001) se resumen en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Diferencias morfológicas entre especímenes y nidos de los géneros de hormigas forrajeras *Acromyrmex* y *Atta*

Género <i>Acromyrmex</i>	Género <i>Atta</i>
<i>Acromyrmex octospinosus</i> (Reich, 1793)	<i>Atta cephalotes</i> (Linnaeus, 1758)
	
<ul style="list-style-type: none"> • 4 o 5 pares de espinas dorsales. • Muchas espinas en los lóbulos laterales de la cabeza. • Abdomen con sedas engrosadas, superficie irregular, con tubérculos y siempre opaca. • Poca diferencia de tamaño entre castas. • Obreras miden entre 0.8-1.0 cm. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 pares de espinas dorsales. • No más de 1 espina en los lóbulos laterales de la cabeza. • Abdomen con sedas y superficie lisa, puede ser opaca o brillante. • Notable diferencia de tamaño entre castas. • Obreras miden hasta 1.5 cm.
	
<ul style="list-style-type: none"> • Montículos en forma cónica achatada. • Poca tierra excavada en el conglomerado central. • Escasa actividad visible. • Pocas cámaras internas. • Profundidad de las cámaras de hasta 1 metro. 	<ul style="list-style-type: none"> • Entradas de forma cónica pronunciada. • Gran cantidad de tierra excavada en el conglomerado central. • Actividad intensa. • Muchas cámaras internas. • Profundidad de las cámaras de hasta 3 metros.

Adaptado de Argüello y Glanstone, 2001.

Vergara (2005) y Escobar *et al.* (2002) señalan que el **ciclo biológico** de las hormigas forrajeras tienen metamorfosis completa con un estado inmaduro que dura entre 64 y 91 días:

el estado huevo dura 25 días; la larva de 25 a 52 días; y la ninfa 14 días; el estado maduro dura entre cuatro y siete meses para la mayoría de las castas, exceptuando los soldados que pueden vivir dos años y la reina que sobrevive entre 10 y 25 años (Varón *et al.* 2004) (Figura 1.2).

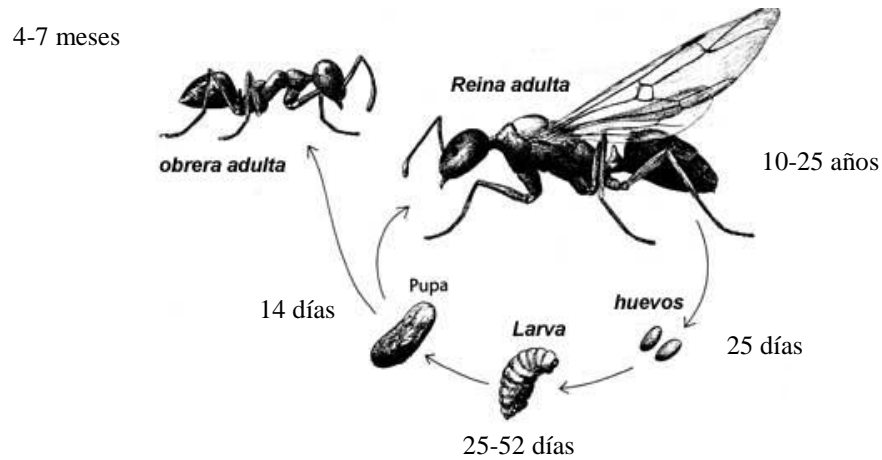
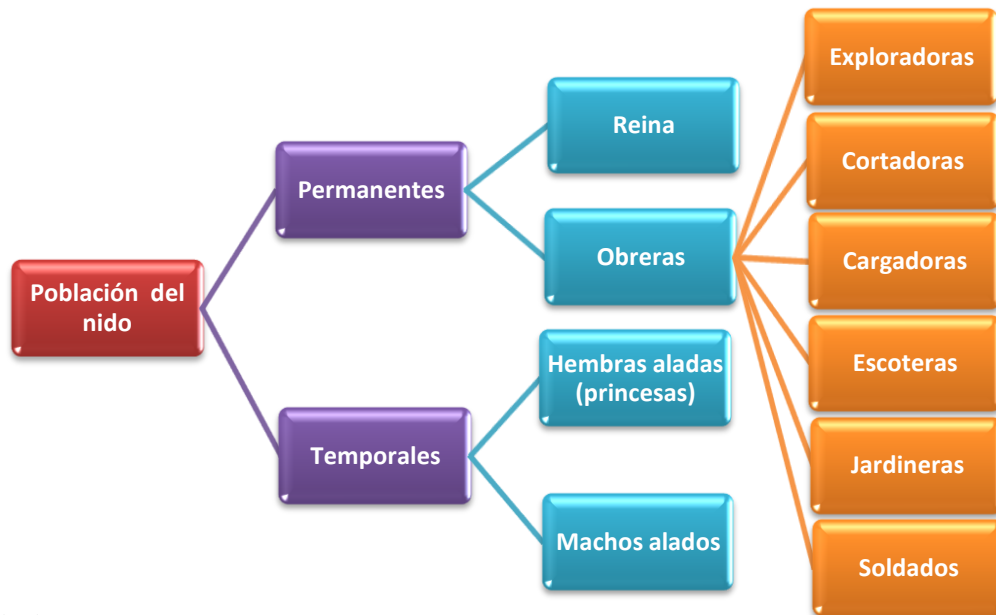


Figura 1.2 Ciclo biológico de las hormigas forrajeras.

Las hormigas forrajeras tienen la **organización social** más completa y mejor estructurada en todo el reino animal (Vergara 2005; Escobar *et al.* 2002). La población del nido se divide en hormigas permanentes (ápteras) y hormigas temporales (aladas); dentro de las hormigas permanentes se encuentran *la reina* y *las obreras*, organizadas en castas formadas por individuos morfológicamente diferentes que desempeñan funciones distintas y específicas a beneficio de la colonia. El tamaño de los individuos pertenecientes a cada casta está relacionado con la función que desempeñan. Fernández (2003) y Escobar *et al.* (2002) señalan que las *obreras*, constituyen el mayor porcentaje de miembros de la colonia. Son hembras estériles y tienen la responsabilidad de alimentar la colonia y cuidar el nido. Las obreras se dividen en seis castas: exploradoras, cortadoras, cargadoras, escoterías, jardineras y soldados; esta última casta solo se presenta en el género *Atta* (Vergara 2005) (Figura 1.3).

En cada nido solo se encuentra una *reina*, es la de mayor tamaño y su función es colocar los huevos (hasta 1,500,000 huevos/año) que darán origen a obreras de todas las castas para desarrollar las actividades necesarias para el establecimiento y mantenimiento del nido y la colonia. (Vergara 2005, Varón *et al.* 2004, Fernández 2003).



Adaptado de Vergara, 2005.

Figura 1.3 División social de las hormigas forrajeras.

Ricci *et al.* (2005) y Escobar *et al.* (2002) describen las castas de hormigas forrajeras, detallando que *las exploradoras* se encargan de examinar el terreno, seleccionar el material vegetal que debe ser cortado y transportado al nido y guiar a las hormigas encargadas del corte y transporte del material vegetal para lo cual usan una comunicación química (feromonas) que perciben a través de las antenas.

Las cortadoras, tienen mandíbulas grandes y su función es cortar fragmentos de material vegetal y en algunos casos transportarlos hasta el nido, aunque el transporte del material vegetal y la extracción de tierra de las distintas cámaras del nido, le corresponde a las hormigas *cargadoras*. Las hormigas que se encargan de limpiar el material vegetal cuando es transportado hacia el nido o dentro del nido para evitar la entrada de insectos y cuerpos extraños, son *las escoteras*.

Las jardineras son hormigas muy pequeñas que se ocupan de cortar en pequeños fragmentos el material vegetal llevado al nido, cultivar el hongo, cuidar y alimentar a la reina y a las larvas, asimismo, trasladar huevos y pupas dentro y fuera del nido. Pueden representar hasta el 60% de la población total del nido.

Los soldados, presentes en el género *Atta*, son las hormigas de mayor tamaño relativo, presentan mandíbulas y cabezas más desarrolladas y fuertes; su función es la defensa del nido y se localizan en las entradas del nido y de los jardines del hongo. Las hormigas temporales, los *machos alados* y las *hembras fértiles aladas* (princesas) copulan durante el vuelo nupcial. Después los machos alados caen al suelo y mueren. Las *hembras aladas* durante el vuelo nupcial copulan con varios machos y acumulan espermatozoides para el resto de su vida, son las responsables de la procreación y perpetuación de la especie al formar nuevas colonias. La proporción de sexos en las hormigas temporales es en promedio de seis machos por cada hembra (Vergara 2005).

El ciclo de vida de una colonia de hormigas forrajeras se divide en tres fases: *fundación, crecimiento y reproducción* (Anexo 2). La *fundación* de una colonia se inicia cuando una reina recién apareada encuentra un lugar de nidificación. Después de su vuelo nupcial, la reina tiene la capacidad de desplazarse hasta 10 kilómetros para fundar una nueva colonia. Al llegar al suelo la reina se desprende las alas con movimientos fuertes contra el suelo o con las mandíbulas, y excava un orificio en el que se entierra y empieza a formar una cámara (25 a 30 cm); que se observa en la superficie del suelo como un montículo de tierra sin orificio. En la cámara, la reina deglute el inoculo del hongo simbiótico que trae en su cavidad infrabucal desde el nido madre, inicia el cultivo del hongo y la ovoposición de varias clases de huevos, algunos huevos son utilizados para la alimentación de la pequeña colonia mientras las obreras salen al exterior a acarrear material vegetal (Varón *et al.* 2008, Vergara 2005, Fernández 2003).

Vergara (2005) y Fernández (2003) manifiestan que la colonia inicia la *fase de crecimiento* cuando la primera generación de obreras entra en maduración. La colonia emerge al exterior y las obreras comienzan a construir el nido y a desarrollar las diferentes actividades de acuerdo a su casta. La función de la reina se reduce a poner huevos y al control feromonal de la colonia. En esta fase, la colonia frecuentemente crece exponencialmente, porque todos los recursos se orientan a la búsqueda de alimento y a la crianza de nuevas obreras (Wilson 1971 y Tschinkel 1993, citado por Fernández 2003) (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Duración de cada estadio durante la formación de la nueva colonia

ESTADIO	TIEMPO
Penetración de la reina en el suelo y formación de la primera cámara	10 horas
Primer huevo al primer adulto	62 a 66 días
Apertura de la primera boca del nido	90 días
Aparición de los soldados	22 meses
Primer vuelo nupcial	38 meses

Adaptado de Vergara, 2005.

Cuando la colonia ha madurado, es decir tiene las densidades poblacionales de las diferentes castas que le permite realizar todas sus actividades, el crecimiento de la colonia se puede disminuir o detener y se inicia la *fase de reproducción*. La reina pone huevos no fertilizados (destinados a ser machos alados) y algunos huevos fertilizados, que mediante nutrición extra, se destinan a convertirse en hembras aladas. Los alados emergen simultáneamente de todos los nidos vecinos, por lo general al inicio de la época lluviosa y cuando las condiciones ambientales son propicias (horas de la madrugada, sin lluvia) vuelan lejos del nido madre para buscar pareja de otros nidos. Durante el vuelo nupcial las hembras (princesas) alcanzan vuelo después de los machos. De cada nido salen alrededor de 18,000 alados (3,000 hembras y 15,000 machos; aproximadamente). Cada hembra es fecundada hasta por ocho machos y acumula en la espermateca —una bolsa anatómica en su abdomen— cantidad suficiente de espermatozoides para garantizar su reproducción durante 10 a 20 años. Los machos mueren después de la cópula y las hembras, como se mencionó antes, buscan un sitio para nidificación, completándose así el ciclo de vida de la colonia (Vergara 2005, Fernández 2003, Vaccaro y Mousques 1997). Longino y Hanson (1995) aseguran que la mortalidad de las reinas al intentar fundar una nueva colonia es cerca del 90%.

2. Principales actividades que realiza la colonia

El corte y acarreo del material vegetal, el cultivo del hongo y la disposición final de desechos son las actividades principales que realiza una colonia de hormigas forrajeras (Anexo 3). En cuanto al *corte y acarreo*, las hormigas forrajeras son capaces de distinguir y seleccionar la calidad de las hojas, pero cuando la abundancia de las hojas preferidas disminuye la colonia puede dirigirse a hojas menos preferidas (Shepherd 1985 citado por Longino y Hanson 1995). También se ha estudiado el contenido de agua y la paleatibilidad de los materiales forrajeados por las hormigas; no obstante, los resultados de estas

investigaciones sugieren que el contenido de agua de las hojas covaria con el contenido de otros compuestos químicos en la planta y las colonias probablemente presentan variaciones en los requerimientos de agua (Longino y Hanson 1995). En cuanto a las horas de mayor forrajeo y ritmo diario de forrajeo frecuentemente se ha observado que estas cambian entre colonias y en una misma colonia (Farji 1993).

En el interior del nido el material vegetal pasa por un elaborado *proceso de preparación* antes de ser incorporado a los jardines del hongo. Primero, se corta en porciones muy pequeñas, se le remueve la superficie cerosa y se macera (Escobar *et al.* 2002). Posteriormente, las hormigas jardineras le agregan material fecal que contiene enzimas proteasas, que han adquirido por el consumo del hongo y que no han sido degradadas en su sistema digestivo; de esta forma, las hormigas distribuyen las enzimas desde donde son producidas hasta donde son más necesarias (Boyd y Martin 1975 citado por Longino y Hanson 1995). El sustrato preparado se coloca en los jardines donde las obreras jardineras lo inoculan con micelio del hongo, que después de 24 horas lo ha cubierto totalmente al penetrar a través de los cortes e invadir el parénquima esponjoso y en empalizada. El alimento de las hormigas son las protuberancias esféricas que miden entre 20 y 30 μm de diámetro llamadas gongilidios que se desarrollan en los extremos de las hifas (Vergara 2005, Mohali 1998).

La disposición final de desechos sucede cuando el sustrato vegetal pierde su valor nutricional y el hongo finaliza su ciclo de vida y ambos son llevados por las obreras cargadoras hacia depósitos o vertederos de desechos; a este sitio son conducidas también las hormigas muertas o enfermas. En el caso de *Atta colombica* Guérin y *Atta mexicana* Smith las pilas de desechos se ubican en el exterior de la colonia mientras que en las otras especies conocidas están internadas en cámaras especiales (Escobar *et al.* 2002).

3. El hongo y las relaciones simbióticas asociadas a su cultivo

El primer informe del hongo simbiótico se remonta a 1874 cuando Thomas Belt descubrió la razón de forrajeo de las hormigas (Escobar *et al.* 2002). Posteriormente Moller en 1895 investigó el hongo cultivado por las hormigas del género *Acromyrmex* y lo clasificó como *Rozites gongylophora*. En 1938 Sthael y Kintzel, de manera individual, concluyeron que el hongo cultivado por varias especies de *Atta* podría ser *R. gongylophora*; sin embargo, no había acuerdo entre otros investigadores (Pérez 1947). Actualmente, se conoce que la mayoría de hongos simbióticos cultivados por las hormigas micófagas pertenecen a la familia

lepiotaceae dentro de la clase basidiomiceto y la tribu leucocoprineae (Kumar *et al.* 2006, Chapela *et al.* 1994, Hinkle *et al.* 1994).

Las hormigas forrajeras cultivan un clon ancestral de reproducción asexual que ha co-evolucionado junto a ellas y proviene del hongo leucocoprineous cultivado por las attini menores; este hongo en cultivos de agar puede producir esporóforos (cuerpos reproductores) pero en la naturaleza depende completamente de las hormigas para su reproducción debido probablemente a que los genes responsables de la reproducción sexual se expresan en funciones alternativas como la formación de gongilidios, ricos en carbohidratos y proteínas que sirven de alimento único para las larvas y la reina de la colonia y como principal alimento para el resto de castas (Currie 2001, Hinkle *et al.* 1994). Varias investigaciones han demostrado que el hongo cultivado por diferentes especies de *Atta* y *Acromyrmex* presenta baja variabilidad genética y escasa evidencia de intercambio genético en regiones geográficas grandes y que *Atta cephalotes*, *Atta laevigata*, *Atta capiguara*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex hispidus fallax* y *Acromyrmex crassispinus* cultivan *Leucoagaricus gongylophorus* (Mikheyev *et al.* 2007, Silva *et al.* 2004, Fisher *et al.* 1996).

Numerosos investigadores habían observado que los jardines fúngicos en presencia de hormigas jardineras permanecían limpios pero cuando las hormigas eran removidas se contaminan rápidamente, sin embargo Currie *et al.* (1999) fueron los primeros en observar hormigas cubiertas de una bacteria filamentososa que posteriormente se identificó en el género *Pseudonocardia*. Estas bacterias que se hospedan en estructuras especializadas del exoesqueleto de las hormigas, además de promover el crecimiento de los jardines fúngicos, producen metabolitos secundarios, entre ellos antibióticos con potentes propiedades específicas inhibitorias del crecimiento de microorganismos que pueden contaminar el jardín y que las jardineras utilizan para mantener los cultivos del hongo simbiótico libres de contaminantes (Currie *et al.* 1999).

La apariencia de jardines de cultivo de hongo libres de patógenos microbiales, gracias al trabajo y cuidado de las jardineras, prevaleció hasta que Currie *et al.* (1999) descubrieron que en más del 60% de nidos de *Atta colombica*, de uno a dos años de edad, se encontraban presentes micoparásitos especializados pertenecientes al género *Escovopsis* (*Ascomycota*) que no obstante son capaces de devastar rápidamente los jardines del hongo, han desarrollado una relación mutualista que les permite sobrevivir junto a las hormigas. Algunas investigaciones

han demostrado que el crecimiento de *Escovopsis*, es regulado y utilizado por las hormigas como “biocontrol” del hongo simbiótico (Kumar *et al.* 2006, Poulsen *et al.* 2007). Análisis filogenéticos han demostrado un único origen común de *Escovopsis* pero se han encontrado cuatro linajes principales (*Clavicipitaceae*, *Nectriaceae*, *Hypocreacea* y *Escovopsis*) cada uno distintivo de un grupo determinado de hormigas micófagas; siendo *Escovopsis* el linaje que se relaciona con los géneros *Atta* y *Acromyrmex*. En *Atta* spp. se ha reportado la presencia de *Escovopsis weberi* (Currie *et al.* 2003).

También se ha encontrado la presencia de una levadura negra del género *Phialophora* que crece en la cutícula de las hormigas y se encuentra en mayores concentraciones en las partes del cuerpo de las hormigas donde se localiza el crecimiento de la bacteria *Pseudonocardia*. La levadura negra tiene propiedades antagonistas sobre *Pseudonocardia*, es decir, puede inhibir su capacidad antibiótica sobre *Escovopsis* (Little y Currie 2007).

Así mismo, se ha descubierto que en esta simbiosis también participan bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Klebsiella* y *Pantoea*, que las hormigas inoculan en los segmentos de hojas incorporados al jardín y que son capaces de fijar entre el 45 y 61% del nitrógeno requerido por el hongo y necesario en la dieta de las hormigas, ya que la parte central de los jardines fúngicos donde se concentra la mayor parte de los gongilidios, es la más rica en nitrógeno (Pinto-Tomás *et al.* 2009).

De esta forma, actualmente muchos investigadores están de acuerdo en cuanto a la existencia de una asociación mutualista múltiple entre la hormiga micófaga (Attini), el hongo cultivado (Leucocoprineae), micoparásitos especializados (*Escovopsis*), la bacteria productora de antibióticos (*Pseudonocardia*), la levadura negra (*Phialophora*) y las bacterias fijadoras de nitrógeno (*Klebsiella* y *Pantoea*) (Pinto-Tomás *et al.* 2009, Little y Currie 2007; Poulsen *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2006, Gerardo *et al.* 2006) (Figura 1.4).

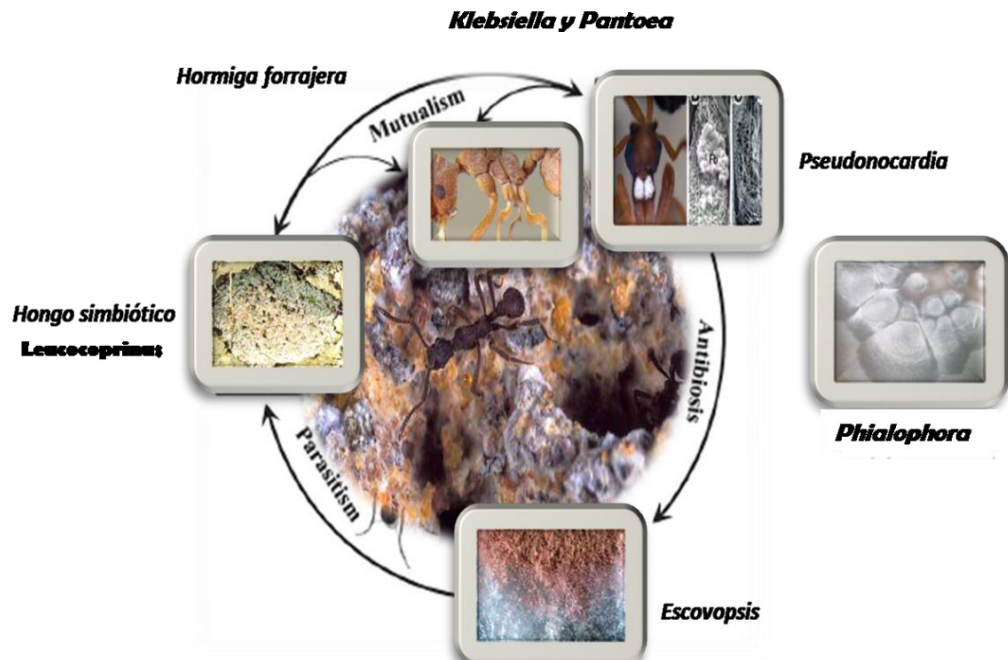


Figura 1.4 Relaciones simbióticas en los jardines fúngicos de las hormigas forrajeras.

4. Manejo agrícola de las hormigas forrajeras

Ugalde (2002) y Patterson (1993) sostienen que la distribución y abundancia de las hormigas forrajeras están asociadas a la modificación de los hábitat terrestres, y se encuentran frecuentemente en territorios disturbados que han sido desprovistos de la vegetación natural para establecer cultivos agrícolas y donde los enemigos naturales, principalmente competidores y depredadores, han sido eliminados.

Según Arguello y Gladstone (2001) el manejo de las poblaciones de hormigas forrajeras requiere el uso de diversas técnicas y productos, es costoso, complicado y rara vez eficaz a largo plazo debido a varios factores, entre ellos: su adaptabilidad y distribución en campos agrícolas y urbanos con diversas características edáficas y climáticas. Además, la compleja estructura interna de los nidos y la limpieza interna continua realizada por las hormigas reduce al mínimo la probabilidad de contaminación microbiana del nido. También es importante considerar que la reina, única responsable de la reproducción de la colonia, se alberga en el interior de las cámaras del nido donde es muy bien protegida por las obreras, lo que asegura su sobrevivencia y las densidades poblacionales de las diferentes castas necesarias para mantener la colonia. Otro factor es el amplio rango de plantas hospedadoras y la facilidad

que tienen las hormigas de cambiar la preferencia en respuesta a la ausencia de una planta específica.

El interés por reducir el daño de las hormigas forrajeras en cultivos y otras plantas de interés económico ha motivado diferentes investigaciones desde hace mucho tiempo. En 1947, Pérez recopiló las estrategias y prácticas de manejo más utilizadas en ese momento, entre las que se incluyó el abandono de campos de cultivos debido a la incapacidad de controlar la invasión de hormigas forrajeras; la promoción del consumo humano de las hormigas reinas y la introducción de enemigos naturales —pájaros, sapos, ranas y algunas especies de mamíferos— eran muy comunes. En la actualidad, medidas de control como la excavación total del nido hasta encontrar a la reina para destruirla, la inundación de los nidos, y el uso de barreras muertas para evitar que las hormigas suban a defoliar las plantas no han caído en desuso y son ampliamente utilizadas (Montoya *et al.* 2007, Vergara 2005, Escobar *et al.* 2002).

El control químico de las hormigas forrajeras se inició en 1900 con el uso de sustancias químicas sintéticas aplicadas con equipos especialmente diseñados o adaptados (Pérez 1947). Desde entonces, innumerables productos químicos se han utilizado para mantener a las hormigas forrajeras por debajo de umbrales de riesgo económico para los cultivos agrícolas sin obtener resultados efectivos a largo plazo ni bajo impacto ambiental. El producto más utilizado y eficiente, fue el dodecacloro conocido comercialmente como Mirex, este producto se retiró del mercado por su persistencia en el suelo, alto potencial de movilidad ambiental y su capacidad de acumularse progresivamente en la cadena alimenticia (ATSDR 1995).

En la actualidad, algunos productos químicos disponibles comercialmente en forma de cebos granulares como Sulfloramida (Mirex S[®] y Dinagro S), fipronil (Blitz), clorpirifos (Pikapau y Attamix SB) y aldrín (Hormitox) presentan menor efecto residual en el ambiente pero también son menos eficientes para el manejo de las hormigas, lo que implica un mayor número de aplicaciones, además tienen un precio poco accesible para los pequeños agricultores. Varón (2006) documentó que en las plantaciones de café en Costa Rica, los dos productos más utilizados son la sulfloramida y el octaborato de sodio, y ambos tienen un precio alto para la mayoría de los pequeños agricultores.

En la búsqueda de alternativas de manejo menos residuales en el ambiente, investigaciones recientes se han enfocado al manejo de las hormigas forrajeras usando

controladores biológicos, así como extractos y otros metabolitos vegetales (Caffarini *et al.* 2008, Gruber y Valdix 2003, Palacios y Glandstone 2003).

Una de las formas de presentación para los productos destinados al manejo de hormigas forrajeras son los cebos; que se describen como formulaciones creadas para atraer plagas y provocarles la muerte y se clasifican como *formulaciones diversas para usos especiales* (OMS-FAO 2004; MAG 1996). Entre las ventajas del uso de cebos se menciona la especificidad, aplicación localizada, poco impacto ambiental y bajo costo económico. Como desventajas se cita que en ocasiones la plaga prefiere los cultivos y pueden ser atractivos para niños y animales domésticos y silvestres (Caffarini *et al.* 2006, MAG 1996).

En la composición de cebos granulados generalmente se incluyen tres tipos de sustancias: **ingrediente activo, atrayente y excipientes, coadyuvantes o portadores inertes** (Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, Naccarata y Jaffe 1989). El atrayente utilizado para la elaboración del cebo debe ser seleccionado cuidadosamente porque de este dependerá que el ingrediente activo pueda ejercer su acción sobre la plaga. En el caso de las hormigas forrajeras, atrayentes alimenticios como las pulpas o aceites esenciales de diferentes especies cítricas, jugo de piña, hojuelas de avena, germen de trigo, melazas, salvado de arroz, harinas y aceites de diferentes leguminosas; han dado buenos resultados para elaborar cebos de aplicación inmediata (Arango y Sinigui 2008, Caffarini *et al.* 2008, Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, López y Orduz 2003, Palacios y Glandstone 2003).

La función de los excipientes o coadyuvantes es facilitar la acción del plaguicida, y a pesar que no poseen actividad biológica sobre la plaga, favorecen la consistencia, forma y estabilidad de la formulación (MAG 2006).

Para evaluar la calidad de una formulación es necesario realizar una serie de ensayos y pruebas fisicoquímicas y toxicológicas que permitan constatar especificaciones de eficacia del producto, la seguridad de la aplicación y el impacto ambiental (OMS-FAO 2004). Algunas de las pruebas que se les realiza a los cebos granulados son contenido de agua, densidad aparente, rango nominal de tamaño, pulverulencia, resistencia a la abrasión, acidez (rango de pH) y estabilidad a temperatura elevada; además de pruebas de identificación y cuantificación del ingrediente activo y descripción física del formulado (FAO 2003).

Sin embargo, en las investigaciones recientes los cebos preparados para verificar el efecto de metabolitos vegetales, hongos entomopatógenos y antagonistas se han formulado para ser aplicados inmediatamente después de prepararse (Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, Naccarata y Jaffe 1989), es decir que se ha considerado exclusivamente la actividad biológica del formulado pero no la estabilidad química ni biológica del producto en el tiempo.

Para formulados bioplaguicidas, o sea aquellos que contienen productos derivados de animales, plantas, bacterias y ciertos tipos de minerales (EPA 2003), se recomienda la evaluación fisicoquímica y biológica. Mazariegos (2003) propone entre los análisis más importantes a evaluar el porcentaje de humedad, rango de acidez, concentración o número de conidios, viabilidad, eficacia y estabilidad.

Las formulaciones biológicas para el manejo de hormigas forrajeras son actualmente una de las alternativas al uso de agroquímicos. Las experiencias más exitosas se han reportado en Cuba y en Colombia. En Cuba, Pérez (2002) manifiesta que se han obtenido efectividades biológicas sobre *Atta insularis* superiores al 90% al utilizar la cepa MB-1 de *Beauveria bassiana* a una concentración de $2,5 \times 10^9$ conidios por gramo. La mayor efectividad se reporta 72 horas después de la aplicación de 15 a 30 gramos del biopesticida directamente a cada entrada activa del nido. López y Orduz (2003) formularon en Colombia, un cebo de aplicación inmediata que contenía como ingrediente activo una mezcla de *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* y produjo una mortalidad del 100% sobre nidos de *Atta cephalotes* Linnaeus.

Varón (2006) formuló en Costa Rica, un cebo utilizando *Paecilomyces* spp. (Cepa 0484) al 1% (p/p) como ingrediente activo y encontró que su eficacia sobre *Atta cephalotes* fue menor comparada con los testigos sulfloramida y octaborato de sodio, pero redujo significativamente la actividad en el nido.

En cuanto a la utilización de metabolitos vegetales se informa que la aplicación de torta molida de neem a nidos de hormigas forrajeras del género *Atta* (2 kg/30 litros de agua/nido) produce una reducción de la actividad de las hormigas después de un mes de tratamiento y una posterior inactividad del mismo, aunque se requiere realizar hasta seis aplicaciones en nidos grandes lo que significa un costo elevado para los agricultores (Gruber y Valdix, 2003).

Aunque existen numerosas investigaciones dirigidas a la búsqueda de ingredientes activos promisorios para el manejo de las hormigas forrajeras se ha priorizado la exploración de ingredientes con acción insecticida (Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, Pérez 2002, Ortiz y Orduz 2000), lo que hace probable que no causen la muerte de la colonia sino únicamente disminuya su actividad por periodos de tiempo cortos mientras nuevas generaciones de hormigas sustituyan a la población que ha sido exterminada.

5. Literatura citada

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. *ATSDR*. 1995. Reseña Toxicológica del Mirex y la Clordecona. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. Consultado 5 dic. 2008. Disponible en http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts66.html
- Arango, JU; Sinigui, A. 2008. Manejo de la sanidad vegetal en el bosque tropical húmedo: el caso de las hormigas arrieras en Chageradó. *Revista de agroecología. LEISA*. Marzo. Pág. 28-31.
- Arguello, H; Gladstone, SM. 2001. Guía ilustrada para la identificación de especies de zompopos (*Atta spp.* y *Acromyrmex spp.*) presentes en El Salvador, Honduras y Nicaragua. PROMIPAC. Carrera Ciencia y producción, Zamorano, Honduras. 34 p.
- Caffarini, P; Carrizo, P; Pelicano, A. 2006. Extractos cítricos como atrayentes para cebos hormiguicidas con sustancias naturales. *Revista Facultad de Ciencias Agrícolas UNCuyo*. 38(1):19-26.
- Caffarini, P; Carrizo, P; Pelicano, A; Roggero, P; Pacheco, P. 2008. Efectos de extractos acetónicos y acuosos de *Ricinus communis* (ricino), *Melia azedarach* (paraíso) y *Trichillia glauca* (trichillia), sobre la hormiga negra común (*Acromyrmex lundii*). *IDESIA* 26(1):59-64.
- Chapela, IH; Rehner, SA; Schultz, TR; Mueller, UG. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus growing ants and their fungi. *Science* 266:1691–1695.
- Currie, CR; Scott, JA; Summerbell, RC; Malloch, D. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *NATURE*. Vol. 398:701-704.
- Currie, CR. 2001. A community of ants, fungi, and bacteria: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. 55:357–380.
- Currie, CR; Wong, B; Stuart, AE; Schultz, TR; Rehner, SA; Mueller, UG; Sung, GH; Spatafora, JW; Straus, NA. 2003. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*. 299:386-388.
- Escobar Duran, R; García Cossio, F; Rentería, NY; Neita M, JC. 2002. Manejo y control de hormiga arriera (*Atta spp* & *Acromyrmex spp*) en sistemas de producción de importancia económica en el departamento del Chocó. Cartilla 1 y 2. Ministerio de Agricultura-PRONATTA-Universidad Tecnológica del Chocó. CO. 53 p.
- Farji Brener, AG. 1993. Influencia de la estacionalidad sobre los ritmos forrajeros de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) en una sabana tropical. *Revista Biología Tropical*. 41(3):897-899.
- Fernández, F. ed. 2003. Introducción a las hormigas de la región neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, CO. XXVI, 398 p.

- Fernández, F; Sendoya, S. 2004. Lista de las hormigas neotropicales (*Hymenoptera: Formicidae*). Biota colombiana. 5(1):1-93. Monográfico.
- Fisher, PJ; Stradling, DJ; Pegler, DN.1994. *Leucoagaricus basidiomata* from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. Mycol. Res 1994; 98: 884–888.
- Gerardo, NM; Jacobs, SR; Currie, CR; Mueller, UG. 2006. Ancient Host–Pathogen Associations Maintained by Specificity of Chemotaxis and Antibiosis. PLoS Biol 4(8): e235 [doi:10.1371/journal.pbio.0040235](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040235)
- Gruber, AK; Valdix, JK. 2003. Control de *Atta spp.* con prácticas agrícolas e insecticidas botánicos. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 67: 87-90.
- Hinkle, G; Wetterer, JK; Schultz, TR; Sogin, ML.1994. Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science* 266:1695–97
- Kumar, H; Patole, MS; Shouche, YS. 2006. Fungal farming: a story of four partner evolution. *Current Science*. 90(11):1463-1464.
- Hölldobler, B; Wilson, EO. 1999. The ants. The Belknap press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 732 p.
- Little, AEF; Currie, CR. 2007. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant–microbe symbiosis. *Biology letters*. 3: 501-504.
- Longino, JT; Hanson, PE. 1995. The ants (*Formicidae*). In Hanson, PE; Gauld, ID. eds. The hymenoptera of Costa Rica. New York. US. p. 588-620.
- López, E; Orduz, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control* 27:194–200.
- Mayhé-Nunes, AJ; Jaffé, K. 1998. On the biogeography of Attini (*Hymenoptera: Formicidae*). *Ecotropicos*. 11(1): 45-54.
- Mazariegos, LA. 2003. Production of biopesticides by the columbian company Laverlam. In Roettger, U; Muschler, Reinhold. Eds. International symposium on biopsticides for developing countries (2003: Turrialba, Costa Rica). PAN, GTZ, CATIE. p. 111-115.
- Mikheyev, AS; Mueller, UG; Boomsma, JJ. 2007. Population genetic signatures of diffuse co-evolution between leaf-cutting ants and their cultivar fungi. *Molecular Ecology* 16:209–216.
- Mohali, S. 1998. Ultrastructural and morphological study of the mutualistic fungus of the ant *Atta cephalotes*. *Rev. Ecol. Lat. Am.* 5(3):1-6
- Montoya Correas, M; Montoya Lerma, J; Armbrecht, I; Gallego Roper, MC. 2007. ¿Cómo responde la hormiga cortadora *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) a la remoción mecánica de sus nidos? *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*. 8(2): 1-8.

- Naccarata, V; Jaffe, K. 1989. Formulación y desarrollo de un cebo atractivo tóxico para control de bachacos, *Atta spp.* (Hymenoptera: formicidae) en Venezuela. Boletín de Entomología de Venezuela. 5(11): 81-88.
- Organización Mundial de la Salud-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. OMS-FAO. 2004. Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas. FAO, IT. 271 p.
- Ortiz, A; Orduz, S. 2000. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. Micopathologia.150:53-60.
- Palacios, FY; Gladstone, S. 2003. Eficacia del farnesol y de un extracto de semilla de ayote como repelentes de *Atta mexicana*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 68: 89-91.
- Patterson, RS. 1993. Biological control of introduced ant species. San Francisco, US. Consultado 1 nov. 2008. Disponible en [www.ars.usda.gov/sp2UserFiles/Place/66151015/publications/Patterson-1994\(M-2837\).pdf](http://www.ars.usda.gov/sp2UserFiles/Place/66151015/publications/Patterson-1994(M-2837).pdf)
- Pérez Alcalá, R. 1947. El problema de las hormigas del genero *Atta* Fabr. en la América. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, CR. Tesis 74 p.
- Pérez Álvarez, RP. 2002. Lucha biológica contra la bibijagua (*Atta insularis* Güerin). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Laboratorio de Manejo de Plagas. La Habana, CU. Disponible en <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/ATTA-BIO.htm>
- Pinto-Tomás, AA; Anderson, MA; Suen, G; Stevenson, DM; Chu, FST; Cleland, WW; Weimer, PJ; Currie, CR. 2009. Symbiotic Nitrogen Fixation in the Fungus Gardens of Leaf-Cutter Ants. *Science* 326(5956): 1029-1148.
- Poulsen, M; Erhardt, DP; Molinaro, DJ; Lin, TL; Currie, CR. 2007. Antagonistic Bacterial Interactions Help Shape Host-Symbiont Dynamics within the Fungus-Growing Ant-Microbe Mutualism. *Plos ONE* 2(9):e960.
- Ricci, M; Benítez, D; Padin, S; Maceiras, A. 2005. Hormigas argentinas: comportamiento, distribución y control. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. AR. 27 p.
- Rojas Fernández, P. 2001. Las hormigas del suelo en México: diversidad, distribución e importancia (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. Número especial 1:189-238.
- Schultz, TR; Brady, SG. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of America*. 105(14):5435-5440.
- Silva-Pinhati, ACO; Bacci, MJ; Hinkle, G. 2004. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Brazilian journal of medical and biological research*. 37:1463-1472.

- Ugalde, JA. 2002. Avispas, abejas y hormigas de Costa Rica: una introducción a las familias de los himenópteros. Santo Domingo de Heredia, CR, INBio. 180 p.
- Universidad Nacional de Quilmes. 2004. Guía para identificación de hormigas cortadoras de la provincia de Buenos Aires. Programa de investigaciones en interacciones biológicas. Centro de estudios e investigaciones. Buenos Aires, AR Consultado 12 nov 2008. Disponible en http://www.antzgroup.com/cor_identificacion.htm (1 of 8) [9/26/2004 10:39:19 PM].
- Vaccaro, NC; Mousques, JA. 1997. Hormigas cortadoras (Géneros *Atta* y *Acromyrmex*) y taurúes en Entre Rios. *XII jornadas forestales de Entre Rios. Concordia, Argentina*. Octubre 1997.
- Varón, EH; Hanson, P; Borbón, O; Carballo, M; Hilje, L. 2004. Potencial de hormigas como depredadoras de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 73:42-50.
- Varón, EH. 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. Tesis PhD. Idaho, US. University of Idaho. 145 p.
- Varón, EH; Hilje, L; Eigenbrode, SD. 2008. Un enfoque agroecológico para el manejo de zompopas en cafetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, CR. 14 p.
- Vergara Castrillón, JC. 2005. Biología, manejo y control de la hormiga arriera. Santiago de Cali, CO, Imprenta departamental del Valle de Cauca.

Capítulo 2. Formulación, producción y evaluación de la calidad de bases que permitan la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico sobre el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras del género *Atta*

Resumen

Las hormigas forrajeras (*Atta* spp.) son capaces de destruir plantaciones completas de hortalizas y de otras plantas de importancia económica en América Tropical y Subtropical, dado que cortan el tejido de las plantas y lo transportan a nidos subterráneos, donde cultivan un hongo de la clase *basidiomiceto*, que es su alimento principal. En la actualidad, no se cuenta con una estrategia efectiva de manejo de esta plaga. La mayoría de productos disponibles comercialmente no proporcionan resultados efectivos a largo plazo; son residuales en el ambiente y tienen un precio poco accesible para los pequeños agricultores. Investigaciones recientes se han enfocado en la búsqueda de controladores biológicos y extractos o materiales vegetales para el manejo de hormigas forrajeras. Sin embargo, la mayoría de los ingredientes activos evaluados se han formulado como cebos que son aplicados inmediatamente después de prepararse, es decir que se ha considerado únicamente la actividad biológica del formulado pero no la estabilidad química biológica del producto en el tiempo. Bajo este contexto, la presente investigación se propuso evaluar diferentes ingredientes necesarios para la preparación y selección de formulados granulados que presentaron mayor nivel de acarreo y potencial para la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico contra el hongo simbiótico y las hormigas forrajeras. Se prepararon gránulos con diferentes combinaciones y concentraciones de azúcar, maicena, avena, carboximetilcelulosa, gelatina, talco, bentonita, aceite de soya y agua para obtener gránulos bases a los que se pudiera incorporar ingredientes activos como extractos de plantas y hongos con efecto biológico contra el hongo simbiótico que cultivan las hormigas. Además se evaluó citropulpa, extracto alcohólico de cáscaras de naranja o aceite de semillas de naranja como atrayentes. Para comprobar la compatibilidad de las formulaciones base con ingredientes activos, se incorporó a los gránulos extracto de *Azadirachta indica* (neem), tres cepas de *Trichoderma* spp. y *Levadura* spp. en diferentes concentraciones. Se evaluó la calidad de los gránulos mediante determinaciones de porcentaje de humedad, porcentaje de absorción de humedad, acidez, concentración o número de esporas, viabilidad y estabilidad. Se encontró que los cebos formulados con citropulpa como atrayente son capaces de mantener estable la acidez con los

tres ingredientes activos y además, conservan la viabilidad de las cepas de *Trichoderma* spp. y *Levadura* spp. por más tiempo que los formulados elaborados con extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayente. Además, el gránulo a base de citropulpa presentó un costo de producción más bajo y conserva las características visuales de color y textura sin alteración aparente por más tiempo. Por lo tanto, los resultados de esta investigación permiten concluir que el formulado con citropulpa como atrayente es una base apropiada para la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico contra el hongo simbiótico que cultivan las hormigas forrajeras y tiene potencial como base para un producto comercial eficiente para el manejo de esta plaga.

1. Introducción

Las hormigas forrajeras (*Atta* spp.) son herbívoros generalistas capaces de destruir plantaciones completas de cultivos agrícolas, forestales y ornamentales de América Tropical y Subtropical (Ricci *et al.* 2005) por lo que se consideran una de las cinco plagas más importantes de América Latina (Ortiz y Orduz 2000). Desde 1900 se adoptaron diversas técnicas y productos para su manejo en cultivos, siendo lo más usados la aplicación de productos químicos sintéticos (Pérez 1947). El producto más eficiente para el manejo de hormigas forrajeras conocido comercialmente como Mirex (dodecacloro) se retiró del mercado por su persistencia en el suelo, alto potencial de movilidad ambiental y su capacidad de acumularse progresivamente en la cadena alimenticia (ATSDR 1995). En la actualidad, la mayoría de productos disponibles comercialmente entre ellos sulfluramida, fipronil, clorpirifos y aldrín, no proporcionan resultados efectivos a largo plazo, son residuales en el ambiente y tienen un precio poco accesible para los pequeños agricultores (Varón 2006). El control biológico del insecto y el hongo simbiótico se ha considerado como alternativa de manejo por su menor daño ambiental. De esta forma investigaciones utilizando antagonistas, extractos y otros metabolitos vegetales mezclados con atrayentes, aplicados en la mayoría de los casos inmediatamente después de prepararse, no han considerado la estabilidad química ni biológica del formulado en el tiempo y por lo tanto no han tenido una visión clara de ofrecer al mercado un producto alternativo eficiente para el manejo de esta plaga (Caffarini *et al.* 2008, Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, Gruber y Valdix 2003, Palacios y Glandstone 2003, Naccarata y Jaffe 1989).

Los cebos son una forma de presentación de plaguicidas creadas para atraer plagas y provocarles la muerte (MAG 1996). Entre las ventajas de los cebos, se consideran su especificidad, la aplicación localizada, el poco impacto ambiental y el bajo costo económico.

En la composición de cebos granulados generalmente se incluyen tres tipos de sustancias: *ingredientes activos, atrayentes y excipientes o ingredientes inertes* (Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, Naccarata y Jaffe 1989). El atrayente debe ser apropiadamente seleccionado para asegurarse que el ingrediente activo pueda ejercer su acción sobre la plaga. Las pulpas o aceites esenciales de diferentes especies cítricas, hojuelas de avena, germen de trigo, harinas y aceites de diferentes leguminosas se han informado como buenos atrayentes de hormigas forrajeras (Arango y Sinigui 2008, Caffarini *et al.* 2008, Caffarini *et al.* 2006, Varón 2006, López y Orduz 2003, Palacios y Glanstone 2003). Los excipientes o ingredientes inertes sirven para facilitar la acción de los ingredientes activos y a pesar que no poseen actividad biológica sobre la plaga, favorecen la consistencia, forma y estabilidad de la formulación (MAG 1995).

Para asegurar la calidad y comprobar las especificaciones de eficacia, la seguridad de la aplicación y el impacto ambiental de formulados como los cebos, se deben realizar diferentes ensayos y pruebas fisicoquímicas y toxicológicas (OMS-FAO 2004). Algunas de las pruebas que se debe realizar a los cebos granulados son contenido de agua, densidad aparente, rango nominal de tamaño, pulverulencia, resistencia a la abrasión, rango de acidez y estabilidad a temperatura elevada; además de pruebas de identificación y cuantificación del ingrediente activo y descripción física del formulado (FAO 2003). Para formulados bioplaguicidas, es decir aquellos que contienen productos derivados de animales, plantas, bacterias y ciertos tipos de minerales (EPA 2003), se recomienda realizar pruebas fisicoquímicas y biológicas, como el porcentaje de humedad, rango de acidez (pH), concentración o número de conidios, viabilidad, eficacia y estabilidad (Mazariegos 2003). El *contenido de agua* es importante para prevenir la degradación del formulado y garantizar la estabilidad en almacenamiento. La *medición de la acidez (pH)* se realiza con el propósito de prever el potencial de descomposición de los ingredientes activos, el deterioro de las características físicas del formulado y el posible deterioro del envase contenedor del formulado. Para determinar el número de estructuras reproductivas de microorganismos por gramo de formulado se deben realizar conteos directos del *número de esporas*; además de

evaluar la *viabilidad* para determinar el número de esporas capaces de germinar en diferentes momentos después de la inoculación (OMS-FAO 2004). Para asegurar que las propiedades plaguicidas del formulado no sean afectadas adversamente durante el almacenamiento, el formulado se debe someter a un procedimiento de almacenamiento acelerado, *estabilidad*, colocando el producto en estufa por un número de días determinados que dependerán de la temperatura utilizada. Un estudio de estabilidad también se puede realizar a largo plazo o en tiempo real, al almacenar el formulado en condiciones similares de temperatura, humedad relativa y luz a las que tendrá en el mercado. No obstante, no existen métodos estandarizados para realizar el ensayo de estabilidad acelerada de formulados biológicos (OMS-FAO 2004).

La presente investigación se propuso evaluar diferentes ingredientes necesarios para la preparación de gránulos base y seleccionar los formulados granulados que fueran más rápidamente acarreados por las hormigas forrajeras hasta sus nidos y que además fueran estables físicamente y permitieran la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico contra el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras.

2. Metodología

La investigación se realizó en los laboratorios y el campus del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón Turrialba de la provincia de Cartago, Costa Rica; localizado a 9°52' Norte y 83°38' Oeste, a una altura de 602 msnm, con un rango de temperatura que oscila entre los 22 y 28 °C, con precipitación promedio anual de 2600 mm y 87% de humedad relativa.

2.1 Formulación y evaluaciones de formulados base

Para la *formulación* de los gránulos base se consideraron las materias primas y los ingredientes utilizados en la elaboración de cebos artesanales preparados en el momento de ser aplicados, que además fueran de fácil adquisición en el mercado y de bajo costo. Se seleccionaron como atrayentes citropulpa, aceite esencial de semillas de naranja y extracto alcohólico de cáscaras de naranja y como coadyuvantes se usó azúcar pulverizada, maicena, avena, carboximetilcelulosa, gelatina, talco, bentonita, aceite de soya y agua en diferentes proporciones. El aceite esencial de semillas de naranja y el extracto alcohólico de cáscaras de naranja se seleccionaron como atrayentes porque numerosas investigaciones afirman que los aceites esenciales y los extractos de especies cítricas son atrayentes para las hormigas, incluyendo las hormigas forrajeras. La citropulpa se utilizó porque con cierto grado de éxito

formó parte de las materias primas en la formulación de gránulos producidos con anterioridad en el laboratorio de patología de CATIE; además, favorece la dureza y consistencia del gránulo, y es un producto disponible en el mercado local.

El azúcar y la maicena ayudan a la dureza del gránulo. Además, el azúcar puede ser un atrayente adicional. La avena se ha utilizado como atrayente para la elaboración de cebos artesanales para el manejo de hormigas forrajeras (Arango y Sinigui 2008, Varón 2006). La carboximetilcelulosa y la gelatina actúan como aglutinantes y el talco como deslizante evitando que los polvos se adhieran a las paredes del equipo granulador. La bentonita es un material de soporte y le aporta dureza al gránulo. La función del aceite de soya es como atrayente y proporciona una leve propiedad hidrofóbica al gránulo. El agua se usa para complementar el mojado y aglutinar los polvos (Anexo 4).

Se elaboró un total de 24 diferentes formulados base; 13 utilizando citropulpa (C), 5 usando aceite esencial semillas de naranja (A) y 6 empleando extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayentes (B) (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Composición de los formulados base elaborados usando aceite esencial de semillas de naranja (A), extracto alcohólico de cáscaras de naranja (B) o citropulpa (C) como atrayentes.

A1		A2	
Maicena.....	400g	Azúcar.....	300g
Bentonita.....	400g	Bentonita.....	600g
Aceite de soya.....	150g	Aceite de soya.....	100g
Talco.....	10g	Agua destilada.....	350g
Agua destilada.....	250g	Aceite esencial de semillas de naranja.....	2mL
Aceite esencial de semillas de naranja.....	2mL		
A3		A4	
Avena.....	300g	Azúcar.....	400g
Bentonita.....	500g	Bentonita.....	400g
Aceite de soya.....	150g	Talco.....	10g
Agua destilada.....	150g	Aceite de soya.....	150g
Aceite esencial de semillas de naranja.....	2mL	Agua destilada.....	150g
		Aceite esencial de semillas de naranja.....	5mL
A5		B1	
Azúcar.....	200g	Azúcar.....	475g
Maicena.....	200g	Maicena.....	475g
Bentonita.....	400g	Talco.....	10g
Aceite de soya.....	150g	Agua destilada.....	250g
Agua destilada.....	200g	Extracto de alcohólico de cáscaras de naranja....	50mL
Aceite esencial de semillas de naranja.....	5mL		

...Continuación Cuadro 2.1

B2		B3	
Maicena.....	200g	Azúcar.....	470g
Bentonita.....	220g	Maicena.....	470g
Gelatina.....	150g	Talco.....	10g
Aceite de soya.....	350g	Agua destilada.....	100g
Extracto de alcohólico de cáscaras de naranja....	100mL	Extracto de alcohólico de cáscaras de naranja.....	50mL
B4		B5	
Azúcar.....	350g	Azúcar.....	300g
Maicena.....	350g	Maicena.....	300g
Talco.....	20g	Bentonita.....	100g
Aceite de soya.....	200g	Aceite de soya.....	200g
Extracto de alcohólico de cáscaras de naranja...	100mL	Extracto de alcohólico de cáscaras de naranja...	100mL
B6		C1	
Azúcar.....	200g	Azúcar.....	245g
Maicena.....	200g	Maicena.....	245g
Bentonita.....	250g	Citropulpa.....	500g
Gelatina.....	50g	Talco.....	10g
Aceite de soya.....	200g	Agua destilada.....	150g
Extracto de alcohólico de cáscaras de naranja...	100mL		
C2		C3	
Maicena.....	30g	Maicena.....	70g
Citropulpa.....	800g	Citropulpa.....	835g
Talco.....	30g	Talco.....	30g
Aceite de soya.....	50g	Aceite de soya.....	70g
Agua destilada.....	400g	Agua destilada.....	400g
C4		C5	
Maicena.....	500g	Azúcar.....	245g
Citropulpa.....	470g	Citropulpa.....	730g
Talco.....	30g	Talco.....	25g
Agua destilada.....	200g	Agua destilada.....	325g
C6		C7	
Azúcar.....	285g	Citropulpa.....	680g
Citropulpa.....	680g	Celite.....	285g
Carboximetilcelulosa.....	23g	Carboximetilcelulosa.....	23g
Talco.....	23g	Talco.....	23g
Agua destilada.....	360g	Agua destilada.....	555g
C8		C9	
Azúcar.....	185g	Maicena.....	33g
Citropulpa.....	555g	Citropulpa.....	880g
Gelatina.....	20g	Talco.....	33g
Talco.....	20g	Aceite de soya.....	55g
Aceite de soya.....	185g	Agua destilada.....	300g
Agua destilada.....	185g		
C10		C11	
Citropulpa.....	800g	Citropulpa.....	700g
Maicena.....	50g	Bentonita.....	100g
Bentonita.....	50g	Carboximetilcelulosa.....	30g
Aceite de soya.....	100g	Aceite de soya.....	170g
Agua destilada.....	250g	Agua destilada.....	550g

...Continuación Cuadro 2.1

C12		C13	
Citropulpa	700g	Citropulpa.....	800g
Bentonita	100g	Bentonita.....	100g
Gelatina	30g	Aceite de soya.....	100g
Aceite de soya	150g	Agua destilada.....	450g
Agua destilada	450g		

Las fórmulas que se muestran en negrita corresponden a los gránulos evaluados en campo seleccionados por presentar mejor apariencia, dureza y resistencia a la hidratación.

Todos los ingredientes se pesaron en una balanza analítica y se mezclaron en recipientes plásticos; los polvos se mezclaron primero y luego se les agregó las materias primas líquidas hasta obtener una masa levemente húmeda que permitiera ser compactada con la presión ejercida con los dedos índice y pulgar. La masa se colocó sobre la bandeja alimentadora del equipo granulador y se obtuvieron gránulos tubulares de aproximadamente 0.25 cm de diámetro y de longitud variable. Los gránulos tubulares se secaron a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, rotando cada día para lograr un secado homogéneo y se fragmentaron hasta un largo no mayor de un centímetro (Anexo 5).

Basados en la apariencia, dureza, resistencia a la hidratación y preferencia de acarreo de los gránulos obtenidos se eligieron seis formulaciones, tres elaboradas con citropulpa y tres con aceite esencial de semillas de naranja, para realizar la prueba de preferencia de acarreo en campo y las determinaciones de porcentaje de humedad y acidez (pH). La composición de los formulados base evaluados en campo se presentan en negrita en el cuadro anterior (Cuadro 2.1)

2.2 Evaluación de características físicas de los formulados base

Para determinar el *porcentaje de humedad* se pesó una cantidad aproximada de 1.00 g de cada formulado base y por diferencia de peso se obtuvo la pérdida de humedad después de ser sometido a una temperatura de 150°C hasta peso constante. Las mediciones se repitieron cuatro veces y se calculó la diferencia de peso antes y después del calentamiento como porcentaje de humedad presente en cada formulado.

La *acidez* se midió en una suspensión de 10 g de cada formulado y 25 mL de agua destilada libre de dióxido de carbono; y se leyó el valor de pH directamente en el potenciómetro (Modificación método CIPAC MT 75.3). El procedimiento se repitió tres veces para cada formulado.

2.3 Selección de los formulados base de acuerdo a la preferencia de acarreo que mostraron las hormigas

Se ubicaron cuatro nidos y se seleccionaron diez caminos que mostraron forrajeo activo, en cada camino se colocaron muestras de cada formulado y un testigo. Las muestras se colocaron en cajitas plásticas a 50 cm de la entrada al nido, cada cajita contenía una cantidad aproximada de 1.00 g de uno de los formulados a evaluar. Como testigo de acarreo se usó Sulfloramida (Mirex-S®), producto que se recomienda para el control de hormigas forrajeras. Se colocaron siete cajitas plásticas (cuatro al lado derecho y tres al lado izquierdo) en cada camino activo, seis con los formulados y una con el testigo, separadas por 10 cm. El orden de ubicación de los tratamientos (formulados y testigo) en el camino fue completamente al azar. En la figura 1 se muestra en imágenes la secuencia de la prueba de preferencia acarreo.

Se midió el tiempo en minutos que las hormigas tardaron en sacar todos los gránulos del formulado de la caja para ser llevados dentro del nido (modificación del método propuesto por Delabie *et al.* 2000). Los resultados de esta prueba permitieron seleccionar los formulados base con cada atrayente que fueron acarreados con mayor rapidez.

Para evaluar la prueba de preferencia de acarreo de los formulados base, se utilizó el diseño en bloques completamente aleatorizado. A los datos obtenidos se les analizó la varianza (ANAVA) usando el programa de estadística Infostat versión 2009 (Di Rienzo *et al.* 2009).



Figura 2.1 Secuencia de imágenes de la prueba de preferencia acarreo.

2.4 Evaluación de los formulados seleccionados con diferentes ingredientes activos

La etapa anterior permitió seleccionar el formulado base preparado con citropulpa (C) y con aceite de semillas de naranja (A) por la rapidez de acarreo observada. Sin embargo, debido a escasez del aceite de semillas de naranja en el mercado local, para esta evaluación se le sustituyó el atrayente por extracto alcohólico de cáscaras de naranja (Anexo 6).

La sustitución se avaló mediante la realización de la prueba de preferencia de acarreo en cinco caminos con forrajeo activo. En esta prueba se comparó la rapidez de acarreo de la fórmula original con atrayente aceite de semillas de naranja (A) y dos formulaciones a las que sólo se les sustituyó el atrayente extracto alcohólico de cáscaras de naranja al 2% (B1) y extracto alcohólico de cáscaras de naranja al 3% (B2).

Con la fórmula seleccionada de los dos gránulos base C y B, se elaboraron un total de 16 cebos granulados, cuatro con cepas *Trichoderma* spp, seis con *Levadura* spp. y seis con extracto de *Azadirachta indica* (neem). La *Levadura* spp. y el extracto *A. indica* utilizados, se encuentran disponibles en el mercado local con los nombre de Saf instant y Triact 64 EC, respectivamente. Como antagonista se usó una mezcla de tres cepas de *Trichoderma* spp. en proporciones iguales que fueron previamente evaluadas *in vitro*, para asegurarse que no fueran antagonistas entre sí. Las tres cepas de *Trichoderma* spp. fueron proporcionadas por el laboratorio de patología del CATIE y se eligieron porque mostraron agresividad contra el hongo simbiótico de las hormigas forrajeras al ser evaluadas en platos Petri.

2.5 Selección de los cebos de acuerdo a la preferencia de acarreo que mostraron las hormigas

A los 16 cebos granulados, con el respectivo ingrediente activo se les evaluó la *preferencia de acarreo* según la metodología descrita para los formulados base (ver acápite 2.2).

El esquema de la Figura 2.2 muestra como se evaluaron los diferentes ingredientes activos y sus concentraciones. De esta prueba se seleccionaron los seis cebos que presentaron mayor rapidez de acarreo.

Para evaluar la prueba de preferencia de acarreo de los cebos granulados, se utilizó el diseño en bloques completamente aleatorizado. Los datos obtenidos se examinaron mediante

el análisis de varianza (ANAVA) usando el programa de estadística Infostat versión 2009 (Di Rienzo *et al.* 2009).



Figura 2.2 Esquema de los formulados que se prepararon con diferentes concentraciones de ingredientes activos (i.a.) Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; Tr: Trichoderma spp. a.i.; L: Levadura spp. i.a. y N= neem i.a.

2.6 Evaluación de características físicas y biológicas de los cebos que mostraron mayor rapidez de acarreo por las hormigas

A los seis cebos granulados seleccionados BTr, CTr, BL, CL, BN y CN se le hicieron análisis de porcentaje de humedad, porcentaje de absorción de humedad en campo, acidez y estabilidad; además, a los cebos con microorganismos (Tr y L) se les determinó la concentración o número de conidios y la viabilidad.

El **porcentaje de humedad** y la **acidez** se determinaron siguiendo las metodologías detalladas para los formulados base (acápite 2.2). Para determinar el **porcentaje de absorción de humedad en campo**, se colocaron muestras de los formulados en platos Petri sin tapa directamente sobre el suelo. En cada plato se colocó aproximadamente 30 g de cada uno de los cebos BTr, CTr, BL, CL, BN y CN; además de los formulados base sin ingrediente activo (B y C) y el granulado comercial sulfluramida (Mirex-S®) como testigos, o sea en total se colocaron nueve platos en fila y en orden completamente aleatorizado. No se dejó distancia entre platos y la distancia entre filas fue de 15 cm. Se colocaron dos filas iguales y los platos de una misma fila se recolectaron dos y cuatro horas después de ser colocados, se transportaron al laboratorio e inmediatamente se realizó la determinación del porcentaje de humedad, por diferencia de peso (ver acápite 2.2). El proceso se repitió con la segunda fila.

La **concentración o número de conidios** se determinó por el método de conteo directo. Se pesó 1.00 g del cebo pulverizado y se le adicionaron 9 mL de agua destilada estéril. Se agitó vigorosamente y con una pipeta Pasteur se tomó una gota de la dilución que se colocó en un hematocimetro (cámara de Neubauer). Se realizaron los conteos de esporas en el número de campos secundarios necesarios hasta tener un conteo de más de 100 esporas, para disminuir el error por variabilidad en el conteo (Pariona *et al.* 2007). El conteo se repitió hasta obtener cuatro datos por muestra.

La determinación de **viabilidad** se realizó a los tratamientos con *Levadura* spp. (L) por el método de conteo de unidades formadoras de colonias en placas en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Para la inoculación de los medios de cultivo, se pulverizó una cantidad de aproximadamente 50 g del cebo, se pesó 1.00 g del polvo del cebo y se preparó una suspensión 10^{-2} con agua destilada estéril, se agitó vigorosamente la suspensión y se inocularon con 0.2 mL de esta dilución. Las placas de PDA se incubaron a 26 °C y el número de células capaces de formar una colonia se determinó 48 horas después de inocular las placas (Modificación método propuesto por Mazariegos 2003). Este análisis se realizó por triplicado. En el caso de los cebos formulados con *Trichoderma* spp. (T) se evaluó la germinación de esporas en suspensión líquida. Se tomó de la dilución 1 en 10 con una pipeta Pasteur, y se colocó en la ranura lateral de la cámara de Neubauer. Se realizaron los conteos de las esporas germinadas a 26 °C; 24, 48 y 72 horas después de preparada la dilución. La lectura se realizó en 5 campos secundarios de la cámara de Neubauer y por cuadruplicado.

Para estimar la *estabilidad* de los cebos en el tiempo, se pesó en bolsas plásticas blancas, 100 g de cada uno de los cebos granulados y se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco durante nueve semanas. Transcurrido ese tiempo se realizaron los análisis de humedad, acidez, concentración o número de conidios y viabilidad (OMS-FAO 2004) siguiendo las metodologías descritas con anterioridad.

3. Resultados y discusión

3.1 Formulación y evaluación de características físicas de los formulados base

Los análisis de los resultados mostraron con probabilidad del 95% diferencias en el tiempo de acarreo de los formulados base. Sin embargo, los gránulos C1, C2 y C3 no presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí, siendo acarreados antes que la sulfluramida (Mirex-S®). Por lo tanto, los diferentes componentes de cada formulado no influyeron en el acarreo, lo que permite suponer que es la citropulpa la que tiene el efecto más importante.

En el caso de los formulados con aceite de semillas de naranja (A) como atrayente únicamente el A1 se pudo incluir en el análisis dado que los formulados A2 y A3 se excluyeron del análisis estadístico porque el formulado A2 fue acarreado parcialmente durante el tiempo que duro la prueba, mientras que el formulado A3 fue acarreado fuera del camino. Sin embargo, el A1 no mostró diferencia estadística significativa en el tiempo de acarreo respecto a la sulfluramida (Mirex-S®) (Cuadro 2.2). Por lo tanto, se puede concluir que los formulados con atrayente citropulpa fueron los mejores en cuanto a la rapidez con que fueron llevados por las hormigas al nido. Al parecer el pH ligeramente ácido y el contenido de carbohidratos, nitrógeno, vitaminas y microelementos hace de la pulpa de naranja un sustrato capaz de satisfacer los requerimientos nutricionales del hongo simbiótico cultivado por las hormigas (Boaretto y Forti 1997) y es considerado el atrayente más utilizado en los cebos para el manejo de hormigas forrajeras (Boaretto *et al.* 2003). Preocupados por la posible pérdida o disminución del poder atrayente de la citropulpa obtenida industrialmente, a causa del proceso a que es sometida, Verza *et al.* (2006) investigaron el poder atrayente para *Atta sexdens rubropilosa* de la citropulpa obtenida industrialmente y el albedo de naranja elaborado de forma artesanal y no encontraron diferencias significativas entre ambos, por lo que concluyen que el proceso industrial de obtención de la citropulpa no influye en su poder atrayente para las hormigas forrajeras.

Cuadro 2.2 Rapidez con que los formulados base fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra al nido

Formulado base	Promedio de tiempo de acarreo (minutos)	n	
C1	33.53	10	a
C2	43.37	9	a
C3	47.46	8	a
A1	71.38	8	b
Mirex-S _o	72.04	9	b

Prueba LSD Fisher $\alpha=0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas. C representa las formulaciones que contienen citropulpa como atrayente y A aceite de semillas de naranja.

El rango de *porcentaje de humedad* de los formulados base evaluados fue de 4.01 a 18.10% (Cuadro 2.3). Aunque no existen límites establecidos para prevenir la degradación de formulados bioplaguidas y garantizar la estabilidad en almacenamiento, a manera de ejemplo la OMS-FAO (2004) señala que para gránulos dispersables de larvicidas bacterianos el contenido de agua no debe exceder el 5% expresado en g de agua por kg de formulado. No obstante, que se puede considerar que la mayoría de los formulados evaluados presentaron porcentajes de humedad altos se observó que los formulados con porcentaje de humedad menor o ligeramente mayor a 12%, conservaron sus características físicas durante todo el tiempo de la investigación. Además, en futuras investigaciones se debe considerar aumentar el tiempo de secado para disminuir la humedad de la citropulpa antes de formular el gránulo.

Cuadro 2.3 Porcentaje de humedad presente en los formulados base determinada por diferencia de peso a 150 °C (promedio de cuatro mediciones)

Formulado base	% Humedad Promedio
C1	18.10
C2	10.29
C3	7.46
A1	4.01
A2	8.38
A3	7.84

C representa las formulaciones que contienen citropulpa como atrayente y A aceite de semillas de naranja.

La *acidez* de los seis formulados base, en general, fue alta (Cuadro 2.4). Sin embargo, los gránulos C1, C2 y C3 presentaron el pH más bajo; esto podría explicarse al considerar la acidez de la citropulpa y la cantidad utilizada para su elaboración. Estos resultados permiten suponer que la acidez de los ingredientes se debe considerar en la elaboración de cebos, principalmente en el caso de ingredientes activos no estables a pH ácidos.

Cuadro 2.4 Acidez promedio (pH) de los formulados base medida a 25 °C en una dilución 1 en 2.5

Formulado base	pH Promedio
C1	3.8
C2	3.7
C3	3.7
A1	4.4
A2	3.8
A3	4.7

C representa las formulaciones que contienen citropulpa como atrayente y A aceite de semillas de naranja.

Los resultados del análisis de varianza del tiempo acarreo de la sustitución del aceite de semillas de naranja por el extracto alcohólico de cáscaras de naranja, se muestra en el Cuadro 2.5. Se observa que el formulado con atrayente extracto alcohólico de cáscaras de naranja al 3% (v/p) presenta la mayor rapidez de acarreo.

Cuadro 2.5. Rapidez con que los formulados base fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra al nido

Formulado base	Promedio del tiempo de acarreo (en minutos)		
A1	49.03	b	
B2%	33.88	b	a
B3%	27.15		a

Prueba LSD Fisher $\alpha=0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas. Donde A es la formulación que contienen aceite de semillas de naranja como atrayente y B extracto alcohólico de cáscaras de naranja; 2% y 3% se refiere al volumen del atrayente por cada 100 g del formulado.

La composición de los formulados base A, B y C que se detalla en el Cuadro 2.6, corresponde a los gránulos que se recomiendan para formular cebos con ingredientes activos destinados al manejo de hormigas forrajeras por presentar características físicas adecuadas y mayor rapidez de acarreo por las hormigas forrajeras género *Atta*.

Cuadro 2.6 Composición cuali-cuantitativa de los formulados que por sus características físicas y su velocidad de acarreo son recomendados para formular cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras género *Atta*

Formulado Base	Composición	
A (atrayente Aceite esencial de semillas de naranja)	Aceite esencial de semillas de naranja.....	5 mL
	Azúcar pulverizada.....	200 g
	Maicena	200 g
	Bentonita.....	400 g
	Aceite de soya.....	150 g
	Agua.....	200 g
B (atrayente extracto alcohólico de cáscaras de naranja)	Extracto alcohólico de cáscaras de naranja.....	30 mL
	Azúcar pulverizada.....	200 g
	Maicena.....	200 g
	Bentonita.....	400 g
	Aceite de soya.....	150 g
	Agua.....	175 g
C (atrayente citropulpa)	Citropulpa	555 g
	Azúcar pulverizada.....	185 g
	Gelatina.....	20 g
	Talco.....	20 g
	Aceite de soya.....	185 g
	Agua destilada.....	185 g

3.2 Formulación y evaluaciones físicas y biológicas de los cebos granulados

Según los resultados obtenidos, con probabilidad del 95%, los tiempos de acarreo de los cebos CTr 2.34×10^7 , CTr 7.01×10^7 , BTr 2.34×10^7 y BTr 7.01×10^7 (con ingrediente activo *Trichoderma* spp.) son estadísticamente iguales entre si, pero diferentes a la sulfluramida (Mirex-S®) (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7 Rapidez con que los cebos con *Trichoderma* spp. como ingrediente activo fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra (1.00 g) al nido

Cebo	Promedio de tiempo de acarreo (minutos)	Error estándar	
CTr 2.34×10^7	42.72	9.18	a
CTr 7.01×10^7	34.80	9.26	a
BTr 2.34×10^7	48.09	9.30	a
BTr 7.01×10^7	43.09	9.04	a
Mirex-S®	67.12	9.34	b

Medias ajustadas Prueba LSD Fisher $\alpha = 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas. Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; 2.34×10^7 y 7.01×10^7 : concentraciones evaluadas.

Los cebos BL5%, BL10% y BL20% fueron estadísticamente iguales en cuanto a la rapidez con que fueron acarreados, pero si fueron estadísticamente diferentes (más rápido

acarreo) a la sulfluramida (Mirex-S®). Los cebos CL5% y CL10% no mostraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al tiempo de acarreo en comparación con la sulfluramida; mientras que el cebo CL20% presentó mayor tiempo de acarreo que la sulfluramida y son estadísticamente diferentes (Cuadro 2.8). Estos resultados muestran que los cebos más rápidamente acarreados fueron los BL, independientemente de la concentración de levadura, mientras que el cebo CL20 % fue el más lentamente acarreado.

Cuadro 2.8 Rapidez con que los cebos con *Levadura spp.* como ingrediente activo fueron acarreados por las hormigas forrajeras, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra (1.00 g) al nido

Cebo	Promedio de tiempo de acarreo (minutos)	Error estándar		
CL5%	34.15	3.74		b
CL10%	41.18	4.44	a	b
CL20%	55.51	6.85	a	
BL5%	23.87	3.12		c
BL10%	24.86	3.15		c
BL20%	24.52	3.14		c
Mirex-S®	40.31	4.23		b

Medias ajustadas. Prueba LSD Fisher $\alpha= 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas. Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; L: *Levadura spp.* a.i.; 5%,10% y 20%: concentraciones evaluadas.

El cuadro 2.9 muestra los resultados obtenidos sobre la rapidez de acarreo de los cebos CN0.4%, CN0.6%, CN1%, BN0.4%, BN0.6% y BN1% (ingrediente activo extracto de *A. indica*). Se puede observar que no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí; sin embargo, todos difieren de la sulfluramida (Mirex-S®).

Cuadro 2.9 Rapidez con que los cebos con neem (*Azadirachta indica*) como ingrediente activo fueron acarreados por las hormigas, medida como minutos que tardaron en acarrear toda la muestra (1.00g) al nido

Cebo	Promedio de tiempo de acarreo (minutos)	Error estándar		
CN0.4%	21.11	2.81		a
CN0.6%	19.42	2.85		a
CN1%	22.93	2.80		a
BN0.4%	19.80	2.93		a
BN0.6%	20.10	2.81		a
BN1%	22.50	3.00		a
Mirex-S®	40.42	3.09		b

Medias ajustadas. Prueba LSD Fisher $\alpha= 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas. Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado base con citropulpa; N: *neem spp.* a.i.; 0.4%, 0.6% y 1%: concentraciones evaluadas.

El promedio del porcentaje de humedad de los cebos (Cuadro 2.10) y de los gránulos testigos sugiere que los formulados que incluyen citropulpa deben secarse durante un periodo de tiempo mayor para disminuir la humedad hasta aproximadamente 12%. Por lo tanto, se recomienda que la citropulpa se seque antes de usarse para que el secado de los cebos se realice en menor tiempo y evitar una posible disminución en la actividad del ingrediente activo. Además, se observó que las diferencias del promedio de porcentaje de humedad no son afectadas al almacenar los formulados durante nueve semanas a temperatura ambiente.

Cuadro 2.10 Porcentaje de humedad presente en los cebos y los testigos determinada por diferencia de peso a 150 °C (promedio de tres mediciones)

Cebos	% Humedad Promedio	
	Semana cero	Semana nueve
BT	9.00	9.90
BTr7.01x10 ⁷	11.28	10.73
BN1%	8.92	9.78
BL5%	13.43	11.75
CT	20.28	18.95
CTr7.01x10 ⁷	21.13	23.45
CN1%	19.82	20.01
CL5%	17.37	17.23
Mirex-S®	11.48	13.88

Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S®: control positivo y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

El valor promedio de acidez de la suspensión 1:2.5 de los gránulos testigos y los cebos presentó valores aceptables para garantizar la estabilidad de los principios activos en los cebos y con excepción del cebo BN1%, el pH no presentó variaciones importantes en ninguno de los formulados cuando fueron almacenados a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco durante nueve semanas (Cuadro 2.11).

Cuadro 2.11 Acidez (pH) de los cebos y los testigos ensayados en campo, medida a 25 °C en una dilución 1 en 2.5 (promedio de cuatro repeticiones)

Cebos	pH Promedio	
	Semana cero	Semana nueve
BT	3.3	3.0
BTr7.01x10 ⁷	6.2	5.4
BN1%	4.7	2.9
BL5%	5.3	5.2
CT	4.9	4.9
CTr7.01x10 ⁷	5.1	4.8
CN1%	4.5	4.6
CL5%	5.2	4.7
Mirex-S®	4.6	4.8

Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S®: control positivo y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

Con respecto al conteo del número de conidios de los cebos, el mezclado de las materias primas durante la producción o durante la toma de la muestra para realizar el análisis pudo tener incidencia en la variación observada en el conteo de la semana nueve del número de conidios en el cebo CTr7.01x10⁷ (Cuadro 2.12).

Cuadro 2.12 Número de conidios promedio en los cebos con *Trichoderma* spp. a.i. y *Levadura* spp. a.i., evaluados en campo (promedio de cuatro repeticiones)

Cebos	Número de conidios Promedio (10 conidios/g)	
	Semana cero	Semana nueve
BTr7.01x10 ⁷	5.6x10 ⁷	8.87x10 ⁷
CTr7.01x10 ⁷	5.86x10 ⁷	1.02x10 ⁸
BL5%	8.46x10 ⁷	5.68x10 ⁷
CL5%	8.42x10 ⁷	7.71x10 ⁷

Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

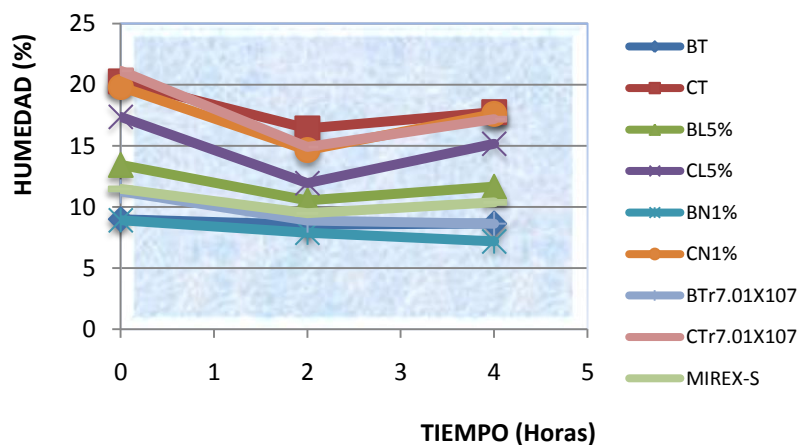
La viabilidad máxima en los cebos BTr7.01x10⁷ y CTr7.01x10⁷ se obtuvo a las 72 y 48 horas después de incubar una suspensión 1 en 10 a 26 °C respectivamente. Sin embargo, en el cebo BTr7.01x10⁷ el número de conidios viables fue inferior (33.52%) en comparación con el cebo CTr7.01x10⁷ donde el 100% de conidios fue capaz de esporular (Cuadro 2.13).

Cuadro 2.13 Viabilidad de los cebos con ingrediente activo *Trichoderma* spp. y *Levadura* spp. 24, 48 y 72 horas después de su incubación, medida como número de conidios vivos por gramo de cebo

Tiempo de incubación (horas)	Viabilidad medida como número promedio de conidios vivos por gramo de cebo			
	BTr7.01x10 ⁷	CTr7.01x10 ⁷	BL5%	CL5%
	Semana cero			
24	DP	DP		
48	DP	DP	1.76x10 ⁴	4.8x10 ³
72	DP	DP		
	Semana nueve			
24	2.75x10 ⁶	2.81x10 ⁶		
48	3.62x10 ⁶	7.45x10 ⁷	2.69x10 ⁶	3.65x10 ⁵
72	2.35x10 ⁷	9.48x10 ⁷		

DP= Dato perdido; B: Extracto alcohólico de cáscaras de naranja al 3%; C: citropulpa; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; 7.01x10⁷: concentración expresada como conidios en un gramo de cebo; 5%: concentración expresada como gramos por cada 100 gramos de cebo.

La determinación de absorción de humedad en campo durante cuatro horas mostró que todos los formulados, exceptuando el cebo BN1%, presentaron una disminución en la hidratación en las primeras dos horas y un aumento en las próximas dos. Sin embargo, el aumento en los porcentajes de humedad de los cebos no fue significativo durante las cuatro horas de la prueba. El Gráfico 1.1 muestra el comportamiento en la absorción de humedad.



Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S_®: control positivo y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

Gráfico 1.1 Comportamiento en la absorción de humedad de los cebos y los testigos ensayados mediante la prueba de acarreo, determinada por diferencia de peso a 150 °C medidas a la hora dos y cuatro posteriores de ser colocados en campo (promedio de tres mediciones en cada tiempo).

3.3 Análisis de costos en la producción de los formulados

Las materias primas necesarias para la formulación de los gránulos son de bajo costo y de fácil adquisición en el mercado local. Al preparar los formulados a mediana escala los costos asociados a su elaboración tendrían una disminución porque los precios de las materias primas serían menores y el salario pagado por mano de obra se mantiene constante; sólo se incrementan los costos por energía eléctrica y agua. Sin embargo, en el Cuadro 2.14 únicamente se representa el costo de producción para un kilogramo de los formulados evaluados considerando los precios de las materias primas a pequeña escala, cotizadas en un supermercado local.

Cuadro 2.14 Costos para la producción de un kilogramo de los formulados a pequeña escala, los costos y los precios se reportan en dólares americanos por kilogramo o litro de producto.

FORMULADO	COSTO POR Kg (US \$)	Precio DE MATERIAS PRIMAS POR Kg o L (US \$)	
B	2.00	Gelatina	14.18
C	1.24	Azúcar pulverizada	1.36
BTr7.01x10 ⁷	3.09	Maicena	2.45
CTr7.01x10 ⁷	2.33	Talco	1.64
BL5%	2.45	Bentonita	2.08
CL5%	1.69	Citropulpa	0.23
BN1%	2.20	Extracto alcohólico de cáscaras de naranja*	1.12
CN1%	1.44	Aceite de soya	2.27
		Agua destilada	0.15
		Saf instant (levadura)	9.09
		Triact 64 EC (extracto de <i>Azadirachta indica</i>)	12.86
		Trichoderma spp (1X10 ⁹ conidios/g)	10.91

*No se incluye el costo del tiempo de trabajo para su preparación

No se incluyen los costos asociados a los salarios de la mano de obra, ni a los servicios de energía eléctrica y agua. 1 kg de Mirex-S® (sulfluramida) tiene un precio entre \$9.00 y \$10.00 (US) en el mercado local.

4. Conclusiones y recomendaciones

Con base en los resultados se puede concluir que los formulados base que contienen citropulpa como atrayente son los más eficaces para ser utilizados en la formulación de cebos con ingredientes activos con efecto biológico contra el hongo simbiótico cultivado por las hormigas forrajera del género *Atta*. Además, estos formulados son capaces de mantener la acidez con el extracto vegetal y los microorganismos y de conservar viable los

microorganismos evaluados como ingredientes activos en esta investigación, además su costo de producción es menor. Sin embargo, en regiones donde la citropulpa no está disponible, el gránulo B puede ser una opción como soporte de ingredientes activos, aunque se recomienda realizar análisis para verificar la estabilidad del principio activo y de ser necesario agregar estabilizadores a la formulación.

La mayoría de los cebos formulados evaluados mediante la prueba de preferencia de acarreo presentaron mayor rapidez de acarreo que el testigo de acarreo (sulfluramida, Mirex-S®). Únicamente los cebos CL10% y CL20% fueron acarreados en mayor tiempo que la sulfluramida aunque estadísticamente no existen diferencias significativas entre ellos ($\alpha=0.05$).

Los cebos con ingrediente activo neem (*A. indica*) y *Trichoderma* spp. fueron los más rápidamente acarreados por las hormigas y presentaron diferencias estadísticas significativas comparadas con el testigo de acarreo (sulfluramida, Mirex-S®) ($\alpha=0.05$).

Para ofrecer un producto comercialmente alternativo para el manejo de las hormigas forrajeras género *Atta*, se deben realizar evaluaciones de calidad que garanticen la vida de anaquel del cebo y la homogeneidad entre lotes. Algunos de los análisis recomendados son densidad aparente, rango nominal de tamaño, pulverulencia, resistencia a la abrasión y otros análisis que dependerán del origen del ingrediente activo en el cebo. Además, se recomienda efectuar los análisis realizados en este trabajo.

5. Literatura citada

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. *ATSDR*. 1995. Reseña Toxicológica del Mirex y la Clordecona. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. Consultado 5 dic. 2008. Disponible en http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts66.html
- Arango, JU; Sinigui, A. 2008. Manejo de la sanidad vegetal en el bosque tropical húmedo: el caso de las hormigas arrieras en Chageradó. *Revista de agroecología. LEISA*. Marzo. Pág. 28-31.
- Boaretto, MAC; Forti, LC. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Departamento de Defesa Fitossanitária da FCA/UNESP. Série técnica IPEF. 11(30): 31-46.
- Boaretto, MAC; Forti, LC; Lopes, JFS; Nagamoto, NS; de Andrade, APP; Moreira, AA; Viana, AES; Ramos, VM. 2003. Response of the grass-cutting ant *Atta capiguara* gonçalves, 1944 (hymenoptera: formicidae) to sugars and artificial sweeteners. *Scientia Agricola*, 60(3):505-509.
- Caffarini, P; Carrizo, P; Pelicano, A. 2006. Extractos cítricos como atrayentes para cebos hormiguicidas con sustancias naturales. *Revista Facultad de Ciencias Agrícolas UNCuyo*. 38(1):19-26.
- Caffarini, P; Carrizo, P; Pelicano, A; Roggero, P; Pacheco, P. 2008. Efectos de extractos acetónicos y acuosos de *Ricinus communis* (ricino), *Melia azedarach* (paraíso) y *Trichillia glauca* (trichillia), sobre la hormiga negra común (*Acromyrmex lundii*). *IDESIA* 26(1):59-64.
- Delabie, JHC; Della Lucia, T; Pastre, L. 2000. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no Campo Brasil. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 29(4): 843-848.
- Di Rienzo, JA; Casanoves F; Balzarini, MG; González L; Tablada M; Robledo CW. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, AR.
- Gruber, AK; Valdix, JK. 2003. Control de *Atta* spp. con prácticas agrícolas e insecticidas botánicos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 67:87-90.
- López, E; Orduz, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control* 27:194–200.
- Naccarata, V; Jaffe, K. 1989. Formulación y desarrollo de un cebo atractivo tóxico para control de bachacos, *Atta* spp. (Hymenoptera: formicidae) en Venezuela. *Boletín de Entomología de Venezuela*. 5(11): 81-88.
- Organización Mundial de la Salud-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. OMS-FAO. 2004. Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas. FAO, IT. 271 p.

- Ortiz, A; Orduz, S. 2000. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Micopathologia*.150:53-60.
- Palacios F; Gladstone, S. 2003. Eficacia del farnesol y de un extracto de semilla de ayote como repelentes de *Atta mexicana*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 68: 89-91.
- Pariona, N; Castellanos, P; León, E. 2007. Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). *Revista Peruana de Biología*. 14(2): 253-257.
- Pérez Alcalá, R. 1947. El problema de las hormigas del genero *Atta* Fabr. en la América. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, CR. Tesis 74 p.
- Ricci, M; Benítez, D; Padin, S; Maceiras, A. 2005. Hormigas argentinas: comportamiento, distribución y control. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. AR. 27 p.
- Varón, EH. 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. Tesis PhD. Idaho,US, University of Idaho. 145 p.
- Verza, SS; Forti, LC; Matos, CAO; García, MG; Nagamoto, NS. 2006. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 47(2): ¿?

Capítulo 3. Establecimiento de nidos artificiales y prueba de eficacia de cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras género *Atta*.

Resumen

La alta evolución de los géneros de hormigas *Atta* y *Acromyrmex* ha obligado que las investigaciones dirigidas a la búsqueda de ingredientes activos para su control sean constantes, sin tener hasta la fecha un producto comercial efectivo a largo plazo. Algunos investigadores aseguran que el establecimiento de nidos artificiales constituye una herramienta de importancia para el desarrollo de productos eficaces porque permite el monitoreo del desarrollo y comportamiento de las colonias y pueden ser utilizados para identificar el mecanismo de acción o la eficacia de un ingrediente activo sobre las hormigas, el hongo simbiótico o ambos. Esta investigación se propuso evaluar la eficacia de diferentes cebos granulados formulados con diferentes ingredientes activos (extractos vegetales y antagonistas) que se han mencionado con efecto biológico sobre el hongo simbiótico que cultivan las hormigas forrajeras. Con este propósito, se extrajeron 18 nidos de hormigas forrajeras del género *Atta* de parcelas de café (*Coffea arabica* L.) y cacao (*Theobroma cacao* L.) de la finca comercial “La Montaña” para establecer nidos artificiales en los invernaderos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ambos sitios ubicados en el cantón Turrialba de la provincia de Cartago en Costa Rica. Se observó que los nidos que tenían un volumen de hongo superior a 6 cm de diámetro tuvieron éxito en su establecimiento. Además, se desarrolló una metodología de segmentos de jardines fúngicos para probar y seleccionar formulados granulados que se evaluaron en una etapa posterior en nidos en el campo. La evaluación en el campo se realizó en parcelas de café (*C. arabica* L.), cacao (*T. cacao* L.) y campo abierto con zacate, se aplicaron cebos granulados de *Trichoderma* spp. 7.01×10^7 conidios/g, *Levadura* spp. 5% y extracto de neem (*Azadirachta indica*) 1%. Se aplicó 10 g de cebo por metro cuadrado de extensión del nido y se usaron como atrayentes citropulpa y extracto alcohólico de cáscaras de naranja. Como controles negativos se utilizaron las formulaciones base de cada atrayente sin ingrediente activo y el control positivo fue sulfluramida, uno de los cebos más utilizados en Costa Rica para el control de esta plaga. La actividad del nido se registró antes y después de la aplicación de los tratamientos y los resultados mostraron que la actividad de la colonia disminuyó entre la tercera y la quinta semana posteriores a la aplicación de todos los tratamientos, exceptuando los controles negativos.

1. Introducción

Una colonia de hormigas forrajeras de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (tribu Attini) se inicia cuando una reina recién apareada encuentra un lugar para nidificación y excava un túnel de 25 a 30 cm de profundidad en el que se entierra, forma una cámara y deglute en su interior el inoculo del hongo que trae en su cavidad infrabucal desde el nido madre e inicia su cultivo y la ovoposición de varias clases de huevos. Algunos huevos son utilizados para la alimentación de la pequeña colonia mientras las primeras obreras emergen al exterior y comienzan a desarrollar las diferentes actividades de acuerdo a su casta. (Varón *et al.* 2008, Vergara 2005, Fernández 2003).

Los nidos recién establecidos de hormigas forrajeras del género *Atta* se observan como un montículo de tierra suelta, generalmente de forma cónica, en la superficie del suelo. Conforme aumenta la población de hormigas surgen nuevos montículos de tierra con orificios para entrada de forraje o salida de tierra producto de la formación de nuevas cámaras. Los montículos forman el conglomerado central del nido y bajo él se encuentran diferentes cámaras de cultivo interconectadas entre sí. Las hormigas cosechan material vegetal fresco para el cultivo del hongo basidiomiceto, que se observa en las cámaras como un conglomerado de hifas de diferentes coloraciones naranjas y grisáceas. Los cuerpos esféricos que se desarrollan en los extremos de las hifas se conocen como gongilidios y en ellos se basa, casi exclusivamente, la alimentación de las hormigas (Kumar *et al.* 2006, Valderrama *et al.* 2006, Vergara 2005, Escobar *et al.* 2002).

El material vegetal cosechado por las hormigas forrajeras para el cultivo del hongo frecuentemente es obtenido de plantaciones agrícolas y forestales, donde estos insectos se han convertido en una plaga muy importante. Fernández (2003) señala que en Brasil el cultivo de caña de azúcar presenta pérdidas estimadas en 60 millones de dólares por año y el 30% de los gastos en el manejo de plantaciones de eucalipto hasta el tercer ciclo se atribuye a esta plaga. El nivel de evolución de las hormigas forrajeras, su capacidad de aprendizaje, la arquitectura y limpieza interna constante de sus nidos y la relación simbiótica que han establecido con una bacteria productora de antibióticos (*Pseudonocardia*) hacen de estos insectos una plaga difícil de controlar (Poulsen *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2006, Gerardo *et al.* 2006, Arguello y Gladstone 2001).

Actualmente, la búsqueda de ingredientes activos para el manejo de hormigas forrajeras se está dirigiendo a productos de origen biológico entre ellos hongos antagonistas, entomopatógenos y metabolitos vegetales. A manera de ejemplo, se reporta que la cepa MB-1 de *Beauveria bassiana* a una concentración de 2.5×10^9 conidios/g muestra efectividad superior al 90% sobre *Atta insularis*, 72 horas después de la aplicación de 15 a 30 g del biopesticida directamente a cada entrada activa del nido (Pérez 2002). López y Orduz (2003) encontraron que una mezcla de *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* a una concentración de 1×10^9 conidios/g produjo una mortalidad acumulada del 100% sobre nidos de *Atta cephalotes* Linnaeus; después de realizar tres aplicaciones de 20 gramos por metro cuadrado del nido. Varón (2006) utilizó la cepa 0484 de *Paecilomyces* spp. al 1% (p/p) y encontró reducción significativa en la actividad de nidos de *Atta cephalotes*. También, se reporta que la aplicación de torta molida de neem en nidos de hormigas del género *Atta* (2 kg/30 litros de agua/nido) produce una reducción de la actividad después de un mes de tratamiento que continua hasta una posterior inactividad (Gruber y Valdix, 2003).

2. Metodología

2.1 Ubicación geográfica de la investigación

La investigación se realizó en los invernaderos y laboratorios, parcelas de investigación de cacao y plantación de café de la finca comercial “La Montaña” y en el área verde del campus central del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón Turrialba de la provincia de Cartago, Costa Rica. Localizado a 9°52’ Norte y 83°38’ Oeste, a una altura de 602 msnm, con un rango de temperatura que oscila entre los 22 y 28 °C, con precipitación promedio anual de 2600 mm y 87% de humedad relativa.

2.2 Establecimiento de nidos artificiales

Para coleccionar los especímenes fundadores, se localizaron nidos, en fase de crecimiento, de hormigas forrajeras del género *Atta*, que presentaran entre uno y dos montículos de tierra de aproximadamente 10 a 15 cm de alto, preferiblemente nidos ubicados sobre los costados de drenajes de agua por la facilidad que ofrecen para realizar la extracción. Los nidos se excavaron cuidadosamente entre 20 a 30 cm hasta llegar a la cámara de cultivo. Se colectó el jardín fúngico y la mayor cantidad posible de hormigas de las diferentes castas, entre ellas la reina, en una caja plástica de 12x12x10 cm con la ayuda de una espátula o cuchara. En otra caja plástica de 30x20x20 cm, agujerada a 5 cm del borde superior en cada uno de los lados,

cubierta con malla se colocó tierra del sitio de extracción del nido. A la tapa de la caja se le hizo, previamente, una ventana 15x26 cm cubierta con malla con el objetivo de tener ventilación en la cámara sin permitir la huida de hormigas. Ambas cajas se identificaban y se trasladaban al invernadero (Figura 3.1).

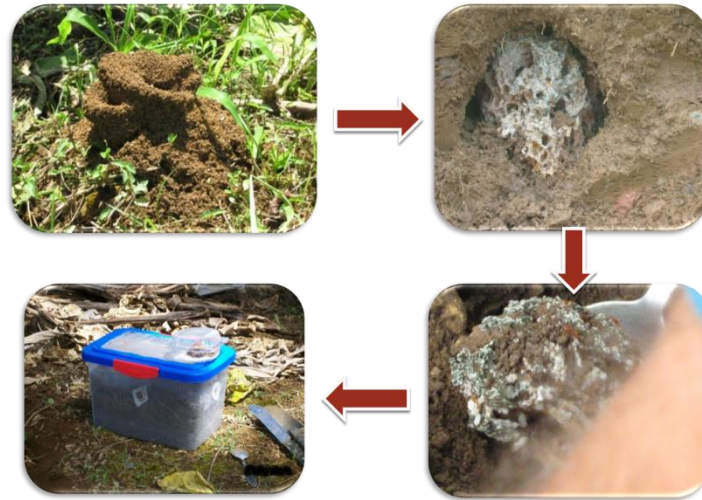


Figura 3.1 Las imágenes ilustran el proceso de extracción de un nido de campo.

En el invernadero, la reina, las hormigas y el jardín se transfirieron a la caja más grande que contenía la tierra del sitio de extracción. La caja se tapó y se dejó tres días para que las hormigas organizaran su nuevo nido.

El cuarto día posterior a la extracción, a la cámara de cultivo se le adaptaban dos cajas plásticas de 20x15x18 cm mediante conexiones con mangueras plásticas de 25 cm de longitud. Una de las cajas funcionaba como cámara de forrajeo y la otra como cámara de desecho. En la cámara de forrajeo se colocaron hojas frescas de almendro (*Terminalia cattapa*), croton (*Codiaeum variegatum*) o cítricos (*Citrus spp*). A la cámara de desechos se transfirieron desperdicios de follaje, hongo y hormigas muertas que las hormigas descartaban en la superficie de la cámara de cultivo para que las hormigas se acostumbraran a llevar los nuevos desechos a ese lugar (Figura 3.2).

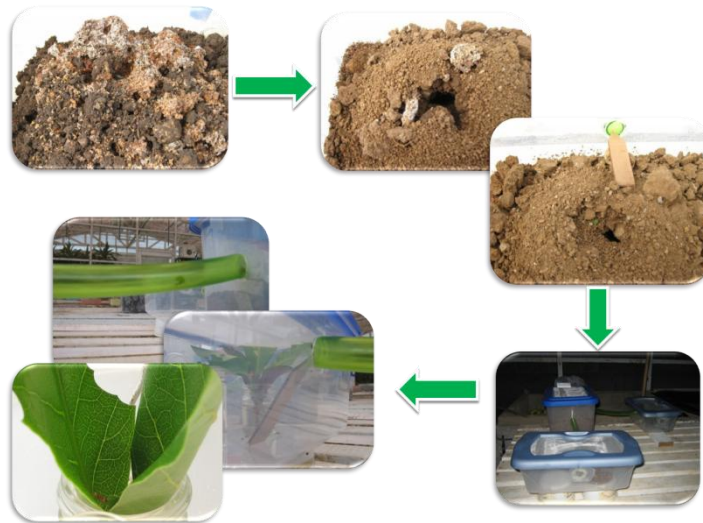


Figura 3.2 Las imágenes ilustran el proceso que se siguió para el establecimiento de un nido artificial en invernadero.

En la cámara de forrajeo cada dos días se colocaron hojas frescas de almendro, croton o cítricos. Las hojas de las diferentes especies vegetales ofrecidas a los nidos se alternaban basándose en la disponibilidad de las plantas y en el acarreo de las hormigas. Este régimen alimenticio se mantuvo durante el transcurso de la investigación. Cada semana se observaba la superficie de la cámara de cultivo y se retiraba cualquier residuo que no fuera acarreado por las hormigas a la cámara de desechos y se regaba el suelo usando un atomizador cargado con agua potable fresca. La cámara de desechos se limpió cada semana. Se registraron las actividades que realizaron los nidos (forrajeo, limpieza o ampliación) por semana y se anotaban como escasa actividad los nidos en los que se observaba poca actividad de forrajeo y ninguna otra actividad. También se registró la temperatura y la humedad relativa en el invernadero tres veces diarias (mañana, mediodía y tarde).

2.3 Ensayo de eficacia de gránulos en segmentos de jardines fúngicos

El ensayo de efectividad de gránulos inició con la extracción de jardín fúngico y hormigas de nidos de campo, para esto se localizaron nidos activos, que presentaran más de dos montículos de suelo; se excavaban cuidadosamente hasta llegar a la(s) cámara(s) de cultivo, se extrajo todo el jardín fúngico de la cámara y la mayor cantidad posible de hormigas de las diferentes castas y se colocaban en una caja plástica de 30x20x20 cm con la ayuda de una espátula o cuchara. La caja fue previamente agujerada a 5 cm del borde superior en cada

uno de los lados y cubierta con malla. En la tapa de la caja también se hizo una ventana de 15x26 cm que se cubrió con malla con el objetivo de tener ventilación sin permitir la huida de hormigas. Cada caja fue rotulada y trasladada al laboratorio, donde se dejaron tres días, para que las hormigas limpiaran el jardín fúngico.

Pasados tres días de la extracción, el jardín fue dividido en porciones semejantes y cantidad similar de hormigas, que se colocaron en cajas transparentes de 12x12x8 cm a la que se adaptaba una cajita circular de aproximadamente 6 cm de diámetro, con tapa transparente, conectadas por una manguera de 7 cm de longitud y 1 cm de diámetro, donde se colocaba el tratamiento. Los bioensayos se diseñaron completamente al azar con 3 repeticiones, donde el jardín se consideró un bloque o sea con cada jardín se hicieron suficientes porciones como para evaluar todos los tratamientos, incluyendo el testigo (Figura 3.3), esto para evitar el error debido a características particulares de cada jardín y asegurar que estas características se reflejaran en todos los tratamientos. Cada tres días se observaron los jardines fúngicos usando un estereoscopio y se anotaron los cambios en la apariencia del hongo (color, textura, tamaño, etc.) y la actividad de las hormigas.



Figura 3.3 La imagen ilustra la forma en que se colocaron las secciones de jardín en los bioensayos de eficacia de los cebos formulados con diferentes ingredientes activos.

Siguiendo la metodología anteriormente detallada se evaluó el efecto de la aplicación de cinco tratamientos sobre segmentos de jardines fúngicos de nidos jóvenes. Los tratamientos evaluados fueron formulado base con atrayente citropulpa, C; formulado base con extracto

alcohólico de cáscaras de naranja, B; un control positivo con follaje de cítricos, F; un control negativo con sulfluramida, Mirex-S®; y un testigo sin tratamiento, T. El ensayo se prolongó por 30 días realizando observaciones cada tres días. Cada semana se colocaban, en la caja destinada para colocar el tratamiento, 0.50 g del tratamiento correspondiente a cada segmento de jardín. Se realizaron tres repeticiones para los tratamientos B, C y F; dos repeticiones para el control negativo Mirex-S® y una para el testigo sin tratamiento T. El bioensayo se diseñó completamente al azar y únicamente se registró el tiempo en días en que el jardín fue consumido por las hormigas y los cambios en la apariencia del hongo (color, textura, tamaño, etc.) y la actividad de las hormigas.

2.4 Selección de nidos de campo y ensayo de eficacia de cebos granulados en nidos de campo

Se seleccionaron un total de 27 nidos de hormigas forrajeras del género *Atta*, nueve nidos en plantaciones de café (*Coffea arabica L.*), nueve en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao L.*) y nueve en campo abierto con zacate. Se prefirieron nidos de tamaños similares que no midieran más de 100 metros cuadrados. Se midió la distancia entre los montículos o los túneles más distantes en las dos direcciones perpendiculares de los nidos seleccionados (ancho x largo) y se delimitaron con cinta plástica cuatro meses antes de realizar la prueba con el propósito de que no tuvieran ningún efecto residual por la aplicación de plaguicidas (Figura 3.4).

La actividad de forrajeo en cada nido seleccionado, se evaluó un día por semana, durante las dos semanas previas a la aplicación de los tratamiento y el día de la aplicación, como número hormigas que pasan en un minuto por un punto del camino más activo. Los tratamientos (diferentes cebos formulados) se colocaron a 15 cm de la entrada, en los caminos con mayor actividad de forrajeo. Por cada tratamiento se colocó una dosis de 10 g del cebo por metro cuadrado del nido (Vergara 2005). El día siguiente a la aplicación se verificó que las hormigas no hubieran retirado el cebo del interior del nido (Delabie *et al.* 2000). La actividad del nido se registró un día por semana un total diez semanas.



Figura 3.4 Las imágenes ilustran como se midieron y se delimitaron los nidos en la presente investigación.

Los tratamientos ensayados fueron los cebos formulados con atrayente principal citropulpa (C) y extracto alcohólico de cáscaras de naranja (B) denominados BTr 7.01×10^7 , CTr 7.01×10^7 , BL5%, CL5%, BN1% y CN1%, con concentraciones de ingredientes activos *Trichoderma* spp 7.01×10^7 conidios/g, *Levadura* spp. 5% y extracto de neem (*Azadirachta indica*) 1%, como control positivo se usó la sulfluramida (Mirex-S®) que es uno de los cebos comerciales más utilizados en plantaciones agrícolas; y como control negativo, los gránulos bases (sin ingrediente activo) formulados con atrayente citropulpa y extracto alcohólico de cáscaras de naranja. Los tratamientos fueron distribuidos completamente al azar en cada parcela (sitios). Durante todo el ensayo se midió la temperatura y humedad en los sitios donde se seleccionaron los nidos.

Las variables medidas en este ensayo fueron la temperatura y la humedad relativa en los sitios donde se seleccionaron los nidos y la actividad de las hormigas medida como el número de hormigas que pasa en un minuto por un punto del camino más activo del nido. A los nidos que al ser evaluados no estaban forrajeando, pero estaban realizando otras actividades de exploración, limpieza, ampliación de galerías o mostraban evidencia de forrajeo nocturno (segmentos de hojas abandonadas a lo largo del camino) se asignó como constante

un número de 5 hormigas por minuto, y únicamente se registró cero hormigas por minuto en los nidos que no mostraron señales de actividad.

El modelo estadístico para evaluar el ensayo corresponde a un diseño de parcelas divididas en bloques completamente aleatorizados, donde la parcela principal representa los tratamientos y la subparcela representa las medidas repetidas en el tiempo. La temperatura, la humedad relativa y el tamaño de los nidos se utilizaron como covariables. Se realizó un análisis de covarianza para la variable respuesta número de hormigas que pasaron durante un minuto por un punto del camino. Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico Infostat versión 2009 (Di Rienzo *et al.* 2009).

2.5 Identificación de especímenes

Se tomaron entre cinco y seis especímenes de la casta cargadora o soldado de todos los nidos en campo, se colocaron en tubos de ensayos con alcohol etílico 70%, se identificaron con el código del nido y el nombre del lugar de recolección y los tubos se enviaron al Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica, INBio, donde fueron identificados y clasificados hasta especie.

3. Resultados y discusión

3.1 Establecimiento de nidos artificiales

Del total de nidos que se extrajeron (18 nidos), 5 se establecieron exitosamente. Los nidos que se colectaron con una población de hormigas mayor de 100 individuos y un volumen de hongo superior a 6 cm de diámetro presentaron mayores probabilidades de éxito en su establecimiento en condiciones artificiales. No obstante, Valderrama *et al.* (2006) recomiendan que para establecer nidos artificiales se extraigan los nidos cuando el jardín fúngico presenta una dimensión no inferior a 512 cm^3 , según los investigadores esto sucede cuando las colonias presentan entre tres y cuatro montículos de tierra, en la presente investigación no se consideró el tamaño del jardín como criterio para la selección de nidos, lo que se consideró fue el tamaño de los nidos y se prefirieron nidos pequeños donde la reina fuera fácil de localizar y colectar junto con el resto de la colonia. Todos los nidos colectados tenían una sola cámara donde la reina se ubicaba en los bordes del jardín fúngico.

En algunos de los nidos establecidos artificialmente, las hormigas después de forrajear y realizar labores de limpieza en la cámara de cultivo, aproximadamente un mes, redujeron su actividad hasta que la colonia se murió. Esto debido posiblemente, a los amplios rangos de

variación de temperatura ambiental en periodos relativamente cortos (superior a 30 °C durante el día e inferior a 18 °C por la noche), que se observaron en el lugar donde fueron colocados (invernadero).

Se observó que el riego debe ser muy cuidadoso, para evitar que los nidos se contaminen por una mosca blanca muy pequeña de la familia phoridae (diptera), que según diversos autores es parasitoide de varios géneros de hormigas y si las condiciones son apropiadas, puede incluso ocasionar la muerte de la colonia completa (Tonhasca 1996, Bragança *et al.* 2003, Seid y Brown 2009). En Costa Rica Brown (¿?) informó que se han reportado 90 especies de fóridos, muchas de ellas asociadas a hormigas forrajeras. Tonhasca en 1996 consideró que *Neodohniphora declinata* Borgmeier, de la familia phoridae podría ser un controlador biológico importante para *Atta sexdens rubropilosa* ya que ovoposita sus larvas en la extremidad posterodorsal de la cabeza de las hormigas, luego migran hacia los músculos mandibulares y se alimentan de ellos, produciendo la muerte de la hormiga y después de 24 a 25 días emergerá un nuevo adulto alado. Cuando la humedad en los nidos se controló la población de estas moscas parasítoides se mantuvo en niveles que no significaron riesgo para la colonia.

Los nidos que se adaptaron bien a las condiciones artificiales, realizaron sus funciones básicas de forrajeo, cultivo de hongo y limpieza, sobrevivieron todo el tiempo que duró la investigación y en dos de los cinco nidos fue necesaria la adaptación de nuevas cámaras de cultivo debido a que la población de hormigas aumentó. Frecuentemente se encontraban hormigas que forrajeaban fuera del invernadero y regresaban con el forraje colectado a la caja que servía como cámara de cultivo, probablemente debido a que la población de hormigas creció y algunas hormigas se quedaban sin funciones que realizar dentro del nido.

3.2 Ensayo de eficacia de gránulos en segmentos de jardines fúngicos

Los bioensayos en cajitas con secciones de jardín resultaron una metodología muy valiosa para evaluar y seleccionar los gránulos de diferentes formulaciones base y cebos con diferentes ingredientes activos que fueron llevados al campo en una etapa posterior. Sin embargo, se sugiere vigilar las fluctuaciones de temperatura y humedad relativa del lugar donde se desarrolla el ensayo; así como proporcionar oscuridad a las cajas cubriéndolas con un paño o tela oscura para asemejar las condiciones de luz de una cámara de cultivo en campo.

El tratamiento Mirex-S® provocó la muerte de las hormigas y la posterior muerte del jardín fúngico, entre el día tres y seis de iniciado el tratamiento, a causa de la contaminación por la falta de la limpieza realizada por las hormigas. Sin embargo, los jardines fúngicos del tratamiento C, B y F sobrevivieron 27 días; mientras que los jardines con tratamiento T fueron consumidos por las hormigas forrajeras entre los días quince y veintiuno del ensayo. Un resumen de las observaciones del ensayo con segmentos de jardines fúngicos se muestra en el Anexo 7.

3.3 Eficacia de cebos granulados en nidos de campo

El área de los nidos seleccionados en este ensayo varió en un rango de 2.25 a 105 m²; sin embargo, el área del 80% de los nidos (22 nidos) fue inferior a 50 m².

Los resultados de la eficacia de los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 3.1. El número de hormigas que circulan por un punto del camino como variable usada para evaluar la actividad en los nidos señalan que los tratamientos Mirex-S®, BT, CN1% y CTr7.01x10⁷ presentaron mayor efecto en la reducción de la actividad de las hormigas y no presentaron diferencias significativas entre ellos (prueba LSD de Fisher con $\alpha=0.05$). Sin embargo, se debe señalar que dos de tres nidos con el tratamiento BT se inundaron lo que impidió que presentaran el comportamiento esperado para el testigo negativo. Uno de los nidos con el tratamiento BT murió y otro redujo notablemente su actividad de forrajeo, probablemente porque durante el ensayo se trasladó a aproximadamente 1 metro de la ubicación original. Una situación similar informaron López y Orduz (2003), que perdieron durante la fase de campo de la investigación un nido testigo por inundación y atribuyeron su muerte a la susceptibilidad del hongo simbiótico a la humedad, que probablemente favoreció la contaminación microbiana del hongo simbiótico y provocó la muerte del nido.

El tratamiento testigo Mirex-S® fue efectivo para el control de nidos pequeños (área menor de 18 m²) pero no para nidos de mayor tamaño (38 m²). El efecto insecticida del tratamiento Mirex-S® se comprobó al excavar uno de los dos nidos inactivos, y se observó la reina y otras hormigas muertas; así como porciones del hongo simbiótico seco en el interior de la única cámara que formaba el nido. En los nidos grandes la posibilidad de la muerte de la reina por el efecto insecticida que posee la sulfluramida, fue limitado posiblemente debido a que el cebo no es acarreado a todas las cámaras de cultivo del nido. La población de hormigas en los nidos grandes se recuperó paulatinamente y el nido recobró su actividad normal.

Cuadro 3.1 Número de hormigas forrajeando en los nidos tratados, el conteo se realizó en uno de los caminos más activos durante un minuto

Tratamiento	Numero de hormigas forrajeando / minuto ¹	Desviación Estándar				
Mirex-S®	9.43	1.94	a			
BT	10.08	1.68	a	b		
CN1%	11.46	3.66	a	b	c	
CTr7.01x10 ⁷	13.27	2.53	a	b	c	d
CL5%	17.2	3.38		b	c	d
CT	20.1	3.82			c	d e
BL5%	22.21	4.52			c	d e
BTr7.01x10 ⁷	24.93	5.56				d e
BN1%	31.19	5.71				e

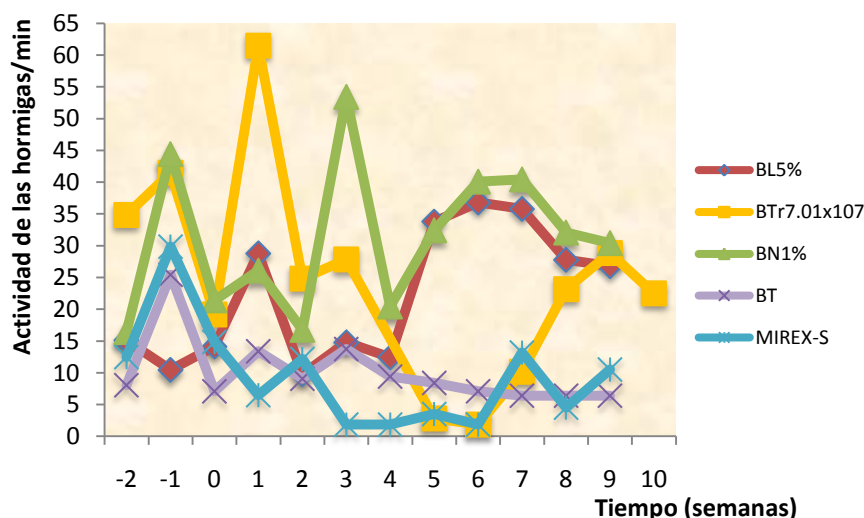
¹Medias ajustadas Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$)

Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado base con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S®: control positivo y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

Los tratamientos CN1%, BN1% y CTr7.01x10⁷ a pesar que fueron acarreados casi en su totalidad fueron posteriormente parcialmente retirados del interior del nido y depositados en los montículos de tierra suelta y cubiertos con ésta. Estos tratamientos causaron la muerte de ninguno de los nidos pero provocaron que las hormigas desplazaran las entradas más activas a distancias aproximadas de 5 m de su ubicación inicial. Este comportamiento se reporta como síntoma inicial de daño al realizar aplicaciones de cebos de *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* o mezcla de ambos en nidos de campo y de laboratorio de *Atta cephalotes* (López y Orduz, 2003).

Farji (1993) señala que no existe un patrón de comportamiento generalizado para la actividad de forrajeo de hormigas *Atta laevigata* y su actividad responde a factores intraespecíficos de cada colonia más que a factores ambientales. Esta información coincide con lo observado en esta investigación, la tendencia errática en la actividad de los nidos, se observa en los gráficos 1 y 2, y el análisis estadístico reveló que no existe efecto de la temperatura ni la humedad relativa en la actividad de forrajeo de las colonias analizadas ($\alpha=0.05$).

En el Gráfico 2.1, se observa la variación en la actividad de los nidos tratados con cebos formulados con extracto alcohólico de semillas de naranja como atrayente y *Trichoderma* spp., *Levadura* spp. o neem como ingrediente activo comparados con el tratamiento testigo negativo (BT) y testigo positivo (Mirex-S®), en este tratamiento, en la tercera semana después de iniciado el tratamiento, la actividad de las hormigas desciende y se mantiene hasta la semana seis. La tendencia de la actividad de las hormigas en el tratamiento con Mirex-S® es semejante a la observada en el tratamiento BTr7.01x10⁷, en el que la actividad desciende en la semana quinta, pero se incrementa nuevamente en la semana siete. La actividad de las hormigas en los nidos con los tratamientos BL5% y BN1% es errática y los descensos no pueden atribuirse a efecto de los tratamientos. El comportamiento en el tratamiento BT puede ser atribuido a la inundación de dos de los tres nidos a los que se aplicó.



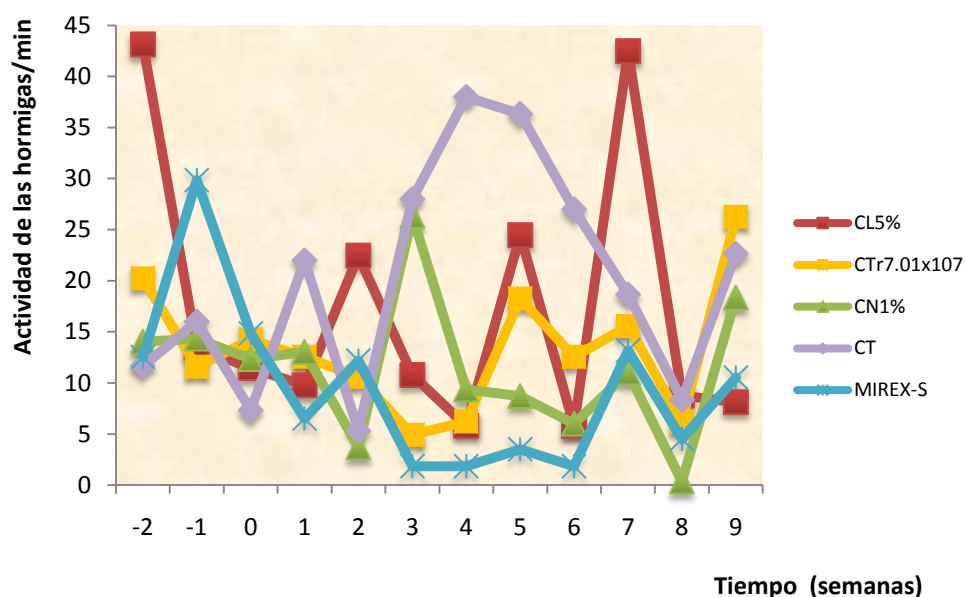
Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S: control positivo y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

Gráfico 2.1 Actividad de las hormigas por tratamiento, evaluada cada semana en los tratamientos con cebos formulados con extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayente y *Trichoderma* spp. BTr7.01x10⁷, *Levadura* spp. (BL5%) o neem (BN1%) como ingrediente activo comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-S®) y el testigo negativo granulo sin ingrediente activo y extracto alcohólico de cáscaras de naranja como atrayente (B).

En el Gráfico 2.2 se muestran los resultados de la actividad de las hormigas en los nidos tratados con cebos con citropulpa (C) como atrayente y *Trichoderma* spp, *Levadura* spp. o neem como ingrediente activo comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-

S®) y el testigo negativo granulo sin ingrediente activo y citropulpa como atrayente (CT). Se observa que CT alcanza máximos entre las semanas segunda y octava por lo que los descensos observados para los tratamientos CL5%, CTr7.01x10⁷, CN1% y Mirex-S® podrían atribuirse al tratamiento.

En los tratamientos CL5% y CTr7.01x10⁷ se observa un descenso de la actividad que inicia en la segunda semana y se prolonga hasta la cuarta semana para ambos tratamientos. Sin embargo, la actividad menor se observa en el tratamiento CTr7.01x10⁷.



Donde C: formulado base con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S: control positivo y 7.01x10⁷, 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

Gráfico 2.2 Actividad de las hormigas por tratamiento, evaluada cada semana en los tratamientos con cebos formulados con citropulpa como atrayente y *Trichoderma* spp. BTr7.01x10⁷, *Levadura* spp. BL5% o neem BN1% como ingrediente activo comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-S®) y el testigo negativo gránulo sin ingrediente activo y citropulpa como atrayente (C).

Si se aumenta la concentración y la dosis del tratamiento CTr7.01x10⁷ se considera que los resultados de esta investigación podrían ser comparables a los reportados por López y Orduz (2003) quienes al realizar la primera de un total de tres aplicaciones de *Trichoderma viride* en nidos *Atta cephalotes* obtuvieron mortalidades entre 20% y 40%. Sin embargo, la mortalidad acumulada al realizar las tres aplicaciones fue de 100% en nidos menores de 54 m² pero en nidos con áreas de hasta 289 m² no superó el 40%, los resultados obtenidos por López

y Orduz (2003) fueron al utilizar 20 g del cebo por cada m² de área del nido en cada aplicación y en los nidos menores de 54 m² las primeras dos aplicaciones fueron de 1x10⁸ conidios/g cada siete semanas y la última aplicación de 1x10⁹ conidios/g, seis semanas después de la segunda aplicación; en los nidos con áreas de hasta 289 m² las tres aplicaciones fueron de 1x10⁹ conidios/g (una aplicación cada diez semanas).

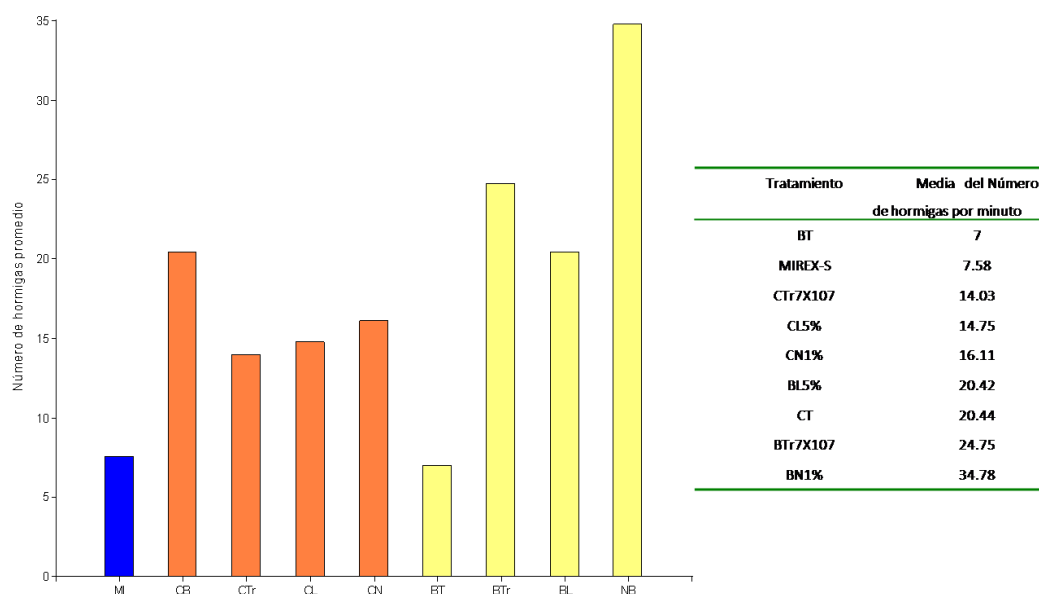
La tendencia errática mostrada por el tratamiento CL5% no permite atribuir la disminución en la actividad a efecto del tratamiento. Para el tratamiento CN1% se percibe una disminución en la actividad entre las semanas cuarta y sexta. Gruber y Valdix (2003) reportan que al realizar hasta seis aplicaciones de torta de neem (2 kg /30 litros de agua/nido) en nidos de hormigas del género *Atta* se obtiene una reducción de la actividad después de un mes de tratamiento que continua hasta una posterior inactividad; el número de aplicaciones realizadas en la investigación de Gruber y Valdiz dependió del tamaño del nido y se realizó una aplicación cada vez que se observaba actividad en los nidos. Basada en los resultados anteriores se puede presumir que la dosis y la realización de una sola aplicación del tratamiento CN1% fue insuficiente para inactivar la colonia, aunque el agua utilizada en las aplicaciones de la torta molida de neem probablemente incidió en la inactividad de los nidos porque la inundación de nidos es una práctica de manejo de las hormigas forrajeras documentada desde la antigüedad con cierto grado de efectividad (Pérez 1947).

No obstante, el tratamiento Mirex-S[®] redujo más rápidamente la actividad de las hormigas que el resto de tratamientos, el efecto de todos los tratamientos no es inmediato y aparece generalmente en la tercera semana posterior a la aplicación de los tratamientos. Este comportamiento es considerado como deseable para los cebos tóxicos con acción insecticida para los que se refiere deben presentar una mortalidad no mayor del 15% en los primeros días posteriores a su aplicación y debe sobrepasar el 85% de mortalidad de insectos después del decimo cuarto día de aplicación (Boaretto y Forti 1997).

Aunque estadísticamente el promedio de la actividad de las hormigas por semana es independiente del tratamiento aplicado, se encontraron diferencias en la actividad entre los tratamientos con extracto de cascara de naranja, los tratamientos con citropulpa como atrayente y el testigo positivo (Mirex-S[®]). No obstante, que ningún tratamiento fue superior a Mirex-S[®] los tratamientos con citropulpa como atrayente mostraron una mayor eficacia en la reducción de la actividad de las hormigas forrajeras género *Atta* comparados con los

tratamientos con extracto alcohólico de cáscaras de naranja. Posiblemente la mayor reducción de la actividad observada en los tratamientos con citropulpa comparada con los tratamientos con extracto de cáscara de naranja como atrayente sea atribuible a la capacidad de la citropulpa de conservar viables o estables los diferentes ingredientes activos evaluados o a la mayor cantidad acarreada por las hormigas hasta el nido. No se encontró diferencia entre los ingredientes activos de los tratamientos con citropulpa como atrayente (Gráfico 2.3).

Al realizar la prueba de hipótesis secuenciales se encontró que la actividad de las hormigas no dependió de la localización (plantaciones de café, plantaciones de cacao y campo abierto con zacate) ni del tamaño del nido.



Donde B: formulado con extracto alcohólico de cáscaras de naranja; C: formulado base con citropulpa; T: control negativo; Tr: *Trichoderma* spp. a.i.; N: neem a.i.; L: *Levadura* spp. a.i.; Mirex-S[®]: control positivo y 7.01×10^7 , 1% y 5%: concentraciones evaluadas.

Gráfico 2.3 Efecto de los tratamientos en la actividad promedio de las hormigas forrajeras género *Atta* en los tratamientos con cebos formulados con citropulpa (C) y extracto de cáscaras de naranja (B) como atrayentes y *Trichoderma* spp. (Tr); *Levadura* spp. (L) o neem (N) como ingredientes activos a las concentraciones de 7.01×10^7 conidios/g; 5% (p/p) y 1% (p/p) respectivamente; comparados con el tratamiento testigo positivo (Mirex-S[®]) y los testigos negativos gránulo sin ingrediente activo (T).

3.4 Identificación de especímenes

Según la clasificación realizada en el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica, INBio, todos los nidos evaluados en campo son de la especie de hormigas forrajeras *Atta cephalotes*, esto concuerda con lo reportado por Varón (2006) para la localidad del cantón Turrialba de la provincia de Cartago en Costa Rica.

4. Conclusiones y recomendaciones

La presente investigación permitió concluir que todos los tratamientos ensayados tienen la capacidad de atraer a las hormigas y enmascarar los ingredientes activos que contienen; ya que fueron acarreados al nido.

Los ingredientes activos evaluados (*Trichoderma* spp., *Levadura* spp. y neem) no presentaron diferencia estadística en la actividad de las hormigas ($\alpha=0.05$), dado que la actividad de las hormigas antes y después de la aplicación de los tratamientos fue errática. Por lo que se recomienda para futuras investigaciones ampliar el número de variables a medir como indicadores de actividad de la colonia porque la falta de actividad de acarreo no es indicativo absoluto de la actividad disminuida o de muerte de la colonia. El número de entradas, la abertura de nuevos caminos y la medición de actividad en varios caminos, en los nidos que lo permitan, entre otras se propone incluirse para evaluar la actividad de las hormigas.

También se concluye que el registro de la actividad de los nidos antes de la aplicación de los tratamientos y el número de repeticiones por tratamiento son factores importantes para garantizar la confiabilidad de los resultados de ensayos biológicos, especialmente cuando los organismos estudiados presentan evidentes variabilidades intrínsecas y extrínsecas, que originan patrones diarios erráticos de la actividad de forrajeo ocasionada posiblemente por la fase reproductiva de cada colonia y por factores climáticos. Se sugiere que antes de la aplicación de los tratamientos se registre la actividad de los nidos por lo menos durante seis semanas y realizar cinco repeticiones de cada tratamiento.

Se sugiere aumentar la dosis, la concentración y el número de aplicaciones de los tratamientos en los nidos de campo para descartar o avalar el efecto de los ingredientes activos. Además, las aplicaciones se deben realizar cada cinco semanas para tener mayores posibilidades de ocasionar la muerte de los nidos.

5. Literatura citada

- Arguello, H; Gladstone, SM. 2001. Guía ilustrada para la identificación de especies de zompopos (*Atta spp.* y *Acromyrmex spp.*) presentes en El Salvador, Honduras y Nicaragua. PROMIPAC. Carrera Ciencia y producción, Zamorano, Honduras. 34 p.
- Boaretto, MA; Forti, LC. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Departamento de Defesa Fitossanitária da FCA/UNESP. Série técnica IPEF. 11(30): 31-46.
- Brown, B. ¿?. Fóridos de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica, INBio. Santo Domingo de Heredia, CR. Disponible en <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/Texto37.html>
- Delabie, JHC; Della Lucia, T; Pastre, L. 2000. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex spp.* e *Atta spp.* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no Campo Brasil. An. Soc. Entomol. Brasil. 29(4): 843-848.
- Di Rienzo, JA; Casanoves F; Balzarini, MG; González L; Tablada M; Robledo CW. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, AR.
- Escobar Duran, R; García Cossio, F; Rentería, NY; Neita M, JC. 2002. Manejo y control de hormiga arriera (*Atta spp* & *Acromyrmex spp*) en sistemas de producción de importancia económica en el departamento del Chocó. Cartilla 1 y 2. Ministerio de Agricultura-PRONATTA-Universidad Tecnológica del Chocó. CO. 53 p.
- Farji Brener, AG. 1993. Influencia de la estacionalidad sobre los ritmos forrajeros de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Foricidae) en una sabana tropical. Revista Biología Tropical. 41(3):897-899.
- Fernández, F. ed. 2003. Introducción a las hormigas de la región neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, CO. XXVI. 398 p.
- Gerardo, NM; Jacobs, SR, Currie, CR; Mueller, UG. 2006. Ancient Host–Pathogen Associations Maintained by Specificity of Chemotaxis and Antibiosis. PLoS Biol 4(8): e235 [doi:10.1371/journal.pbio.0040235](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040235)
- Gruber, AK; Valdix, JK. 2003. Control de *Atta spp.* con prácticas agrícolas e insecticidas botánicos. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 67: 87-90.
- Kumar,H; Patole, MS; Shouche , YS. 2006. Fungal farming: a story of four partner evolution. Current Science. 90(11):1463-1464.
- López, E; Orduz, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. Biological Control 27:194–200.

- Mazariegos, LA. 2003. Production of biopesticides by the columbian company Laverlam. *In* Roettger, U; Muschler, Reinhold. Eds. International symposium on biopsticides for developing countries (2003: Turrialba, Costa Rica). PAN, GTZ, CATIE. p. 111-115.
- Pérez Alcalá, R. 1947. El problema de las hormigas del genero *Atta* Fabr. en la América. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Turrialba, CR. Tesis 74 p.
- Pérez Álvarez, RP. 2002. Lucha biológica contra la bibijagua (*Atta insularis* Güerin). Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Laboratorio de Manejo de Plagas. La Habana, CU. Disponible en <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/ATTA-BIO.htm>
- Poulsen, M; Erhardt, DP; Molinaro, DJ; Lin, TL; Currie, CR. 2007. Antagonistic Bacterial Interactions Help Shape Host-Symbiont Dynamics within the Fungus-Growing Ant-Microbe Mutualism.
- Valderama, EI; Giraldo, C; Montoya Lerma, J; Armbrecht, I; Calle, Z. 2006. Guía para el establecimiento y manejo de colonias artificiales de hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: myrmicinae). Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle. 7(2):7-16.
- Varón, EH. 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. Tesis PhD. Idaho,US, University of Idaho. 145.
- Varón, EH; Hilje, L; Eigenbrode, SD. 2008. Un enfoque agroecológico para el manejo de zompopas en cafetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, CR. 14 p.
- Vergara Castrillón, JC. 2005. Biología, manejo y control de la hormiga arriera. Santiago de Cali, CO, Imprenta departamental del Valle de Cauca.

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones generales

4.1 Conclusiones

La presente investigación permite concluir que los formulados base evaluados son capaces de atraer a las hormigas forrajeras y ser acarreados hasta el nido por ellas.

Estadísticamente, la mayoría de los formulados base evaluados presentaron mayor rapidez de acarreo y ninguno mostró menor rapidez de acarreo que la sulfluramida (Mirex-S®).

Todos los cebos evaluados tienen la capacidad de atraer a las hormigas y enmascarar los ingredientes activos que contienen.

Los cebos con citropulpa como atrayente fueron más estables químicamente y tienen mayor capacidad de conservar viables los ingredientes activos utilizados en esta investigación.

La mayor eficacia en la reducción de la actividad de las hormigas forrajeras *Atta cephalotes* en nidos de campo se obtuvo con los cebos con citropulpa como atrayente.

No se encontraron diferencias entre los ingredientes activos incorporados a una misma formulación base.

En resumen, la fórmula base de los gránulos elaborados con citropulpa como atrayente es la más recomendada para que se utilice en investigaciones dirigidas a la búsqueda de ingredientes activos con efecto biológico para el control de hormigas forrajeras del género *Atta*, debido a su capacidad de atraer a las hormigas y enmascarar los ingredientes activos, la rapidez de acarreo, el menor costo de producción, su estabilidad química y su capacidad de conservar viable los ingredientes activos evaluados en esta investigación.

4.2 Recomendaciones

Se sugiere formular un cebo con una concentración más alta de *Trichoderma* spp., aumentar la dosis y el número de aplicaciones para descartar o avalar el efecto del ingrediente activo. Además, las aplicaciones se deben realizar cada cinco semanas para tener mayores posibilidades de ocasionar la muerte de los nidos.

La combinación de ingredientes activos biológicos con efectos insecticidas y fungicidas en un mismo cebo o la aplicación de un cebo insecticida una semana después de la

aplicación de un cebo fungicida podría ser una estrategia para provocar una inactividad rápida en colonias de hormigas forrajeras.

Si se proyecta ofrecer un producto comercialmente alternativo para el manejo de las hormigas forrajeras se deben incluir en la evaluación de calidad análisis adicionales a los realizados en esta investigación para garantizar la vida de anaquel del cebo y la homogeneidad entre lotes.

ANEXOS

Anexo 1. Distribución geográfica de las hormigas forrajeras



Anexo 2. Ciclo de vida de una colonia de hormigas forrajeras



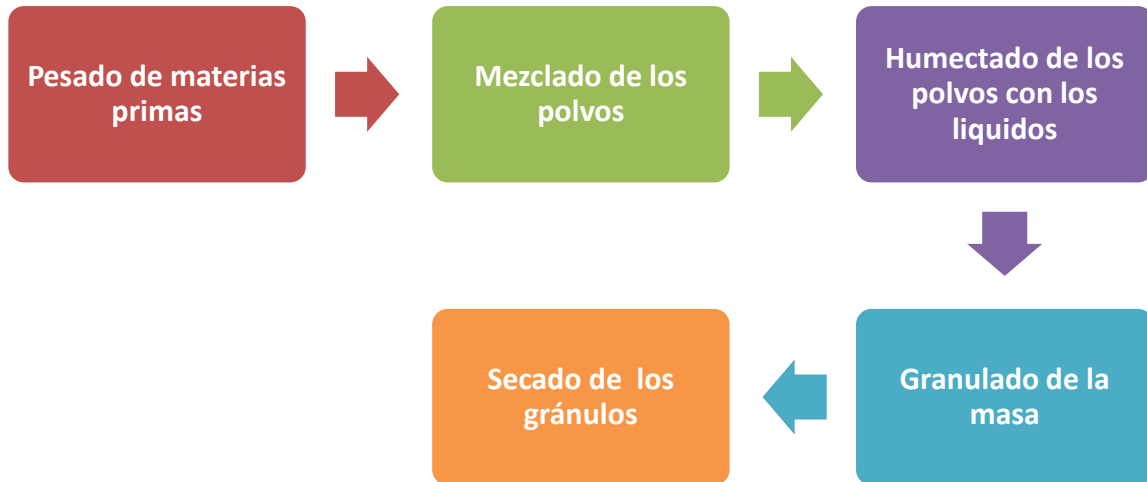
Anexo 3. Actividades de una colonia de hormigas forrajeras



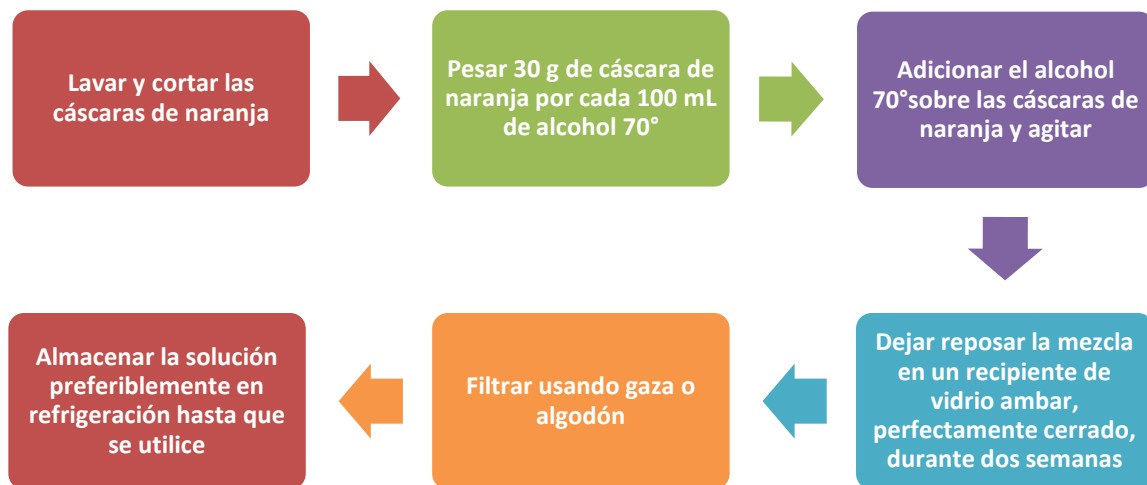
Anexo 4. Descripción y usos de las materias primas utilizadas para la elaboración de los gránulos base y los cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras

Nombre de materia prima	Descripción	Usos
Aceite de soya	Es un aceite vegetal abundante en ácidos grasos poliinsaturados obtenido del prensado de la soya (<i>Glycine max</i>). Presenta color amarillento y es poco denso.	En la industria alimenticia se usa como emulsificante. Se reconoce su uso en la fabricación de cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras.
Agua destilada	Es el agua des ionizada mediante destilación.	Es vehículo y diluyente para muchos ingredientes activos en la industria farmacéutica.
Bentonita	Es un silicato de aluminio hidratado coloidal que se presenta como un polvo muy fino color crema, inodoro y con leve sabor terreo.	Se usa como agente aglutinante en la producción de pellets y como soporte en pesticidas y herbicidas favoreciendo la distribución homogénea de los ingredientes activos.
Carboximetilcelulosa sódica	Polvo o gránulos de color blanco a crema.	Es un agente suspensor y viscosante muy utilizado como material de relleno de productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios.
Citropulpa	Es el residuo que se obtiene de la deshidratación de cáscaras y semillas de frutos cítricos.	Es usado para alimentación animal. Se reconoce su uso como atrayente en la fabricación de cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras.
Gelatina	Es un polvo de grueso a fino, color ámbar o amarillo.	En la industria farmacéutica y alimenticia se usa como emulsificante. También se usa en el recubrimiento de capsulas.
Maicena	Es la harina fina de maíz, fécula o almidón de maíz.	Es usada como espesante alimenticio y como excipiente en la elaboración de tabletas y capsulas.
Sacarosa (Azúcar)	Son cristales incoloros o blancos o polvo cristalino blanco obtenido de <i>Saccharum officinarum</i> Linneo, <i>Beta vulgaris</i> Linneo y otras fuentes adicionales. Es inodoro y tiene sabor dulce.	Además de ser usado como edulcorante, confiere viscosidad a los líquidos y consistencia a los sólidos.
Talco	Es un silicato de magnesio hidratado que puede contener una proporción pequeña de silicato de aluminio; se presenta como un polvo cristalino muy fino color blanco o blanco grisáceo. Es untuoso al tacto y libre de asperezas.	Es usado como lubricante en la fabricación de comprimidos y como agente anti aglutinante en alimentos para animales.

Anexo 5. Proceso de producción de gránulos base y cebos granulados para el manejo de hormigas forrajeras



Anexo 6. Procedimiento para la preparación del extracto alcohólico de cáscaras de naranja



Anexo 7. Observaciones del efecto de los tratamientos en los segmentos de jardines fúngicos

Tiempo (días)	Observaciones del efecto de los tratamientos en los segmentos de jardines fúngicos
3	El tratamiento Mirex-S® ha provocado la muerte de las hormigas y se observa pérdida de humedad en el hongo. Pequeños fragmentos de los gránulos de los tratamientos B y C se observan en la superficie de los jardines. En los tratamientos B, C, F y T no se aprecian cambios en el comportamiento de las hormigas ni en el aspecto del hongo.
6	Los jardines correspondientes al tratamiento Mirex-S® se ven deshidratados. En el tratamiento T se presenta mayor cantidad de desechos que en los tratamientos B,C y F.
9	Los jardines correspondientes al tratamiento Mirex-S® fueron contaminados por microorganismos. Los tratamientos B, C y F fueron acarreados parcialmente por las hormigas e incorporados al jardín fúngico.
12	La disminución en el tamaño del jardín con tratamiento T es considerable. Se observa que algunos de los jardines han perdido humedad pero ésta no se encuentra relacionada con un tratamiento específico.
15	No hay evidencias de acarreo de los tratamientos B, C ni F. La disminución en el tamaño del jardín y el aumento de desechos en el tratamiento T continúa.
18	El jardín con tratamiento T fue consumido casi totalmente por las hormigas; algunas hormigas se observan dentro del montículo de desechos. Se observa una disminución de tamaño en los jardines asignados a los tratamientos B, C y F.
21	Las hormigas han consumido completamente el jardín del tratamiento T, y se observan varias hormigas muertas. Continúa la disminución de tamaño en los jardines asignados a los tratamientos B, C y F.
24	Uno de los jardines asignados a los tratamientos B y F; y dos jardines del tratamiento C han sido consumidos completamente.
27	Todos los jardines han sido completamente consumidos por las hormigas.
30	Aun se observan algunas hormigas vivas dentro del montículo de desechos.