

IDENTIFICACIÓN DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS DE LA PROVINCIA DE MISIONES POR HERRAMIENTAS MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES

IDENTIFICATION OF LEAF-CUTTING ANTS FROM THE PROVINCE OF MISIONES BY MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR TOOLS

Fecha de recepción: 27/09/2016 // Fecha de aceptación: 02/05/2017

Gustavo Ángel Bich
María Lorena Castrillo
Fernando Kramer
Laura Lidia Villalba
Pedro Darío Zapata

Instituto de Biotecnología Misiones “Dra. María Ebe Reca”, Universidad Nacional de Misiones. Ruta 12, km 7,5. CP 3300. Posadas, Misiones, Argentina. E-mail gustavobich@gmail.com.

RESUMO

Las hormigas cortadoras de hojas se encuentran entre los principales insectos plaga de las plantaciones forestales en la provincia de Misiones. En la identificación de los insectos plaga tradicionalmente se emplean caracteres morfológicos. Sin embargo, numerosos grupos de insectos son indistinguibles o presentan diferencias muy sutiles entre ellos. Incluso aunque la taxonomía sea un área compleja y en continuo cambio, numerosas claves y bases de datos de identificación están desactualizados dificultando una identificación taxonómica adecuada. En este contexto los datos moleculares se pueden emplear como una herramienta auxiliar a los datos morfológicos. Los objetivos de este trabajo fueron identificar hormigas cortadoras de hojas que atacan a plantaciones forestales de la provincia de Misiones. Fue posible extraer ADN de buena calidad de dos especies de hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*. Y estos datos fueron empleados como herramienta complementaria en la identificación taxonómica de estas hormigas cortadoras de hojas.

Palabras clave: *Atta*, *Acromyrmex*, Citocromo Oxidasa I, taxonomía.

SUMMARY

Leaf-cutting ants are among the major pests in forest plantations in the province of Misiones. Traditionally morphological characters are used to identify insect pests. However, numerous groups of insects are indistinguishable or show very subtle differences between them. Even though the taxonomy is a complex and constantly changing area, numerous identification keys and databases are outdated making it difficult to adequately identify many insects taxonomically. In this context the molecular data can be used as an auxiliary tool to the morphological data. The aim of this study was to identify morphologically and molecularly leaf-cutting ants that affect forest plantations in the province of Misiones. It was possible to extract DNA of good quality of two species of leaf-cutting ants of *Atta* and *Acromyrmex* genera. And these data were used as a complement tool in the taxonomic identification of these leaf-cutting ants.

Keywords: *Atta*, *Acromyrmex*, Cytochrome oxidase I, taxonomy.

INTRODUCCIÓN

La actividad del sector foresto-industrial es una de las principales actividades económicas de la provincia de Misiones (Weber 2005). Dentro de las principales plagas que afectan las plantaciones forestales se encuentran las hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Acromyrmex* y *Atta* (Hymenoptera, Formicidae, Attini) (VIZCARRA SÁNCHEZ 2004).

El principal daño provocado por estos insectos deviene de la actividad de los mismos al defoliar total o parcialmente numerosas especies vegetales (VACCARO Y MOUSQUÉS 1997). Se ha indicado que un hormiguero adulto es capaz de consumir entre 50 y 150 kilogramos de material vegetal por día (LIMA 1992). Daños de suma importancia fueron registrados en el diámetro y altura de plantaciones de pinos y eucaliptos en varios países latinoamericanos, donde se estima que son necesarios 86 árboles de eucalipto o 161 árboles de pino para abastecer como sustrato a un hormiguero adulto durante el transcurso de un año (FORTI Y CASTELLANI BOARETTO 1997).

En los proyectos de sanidad forestal, para lograr un manejo efectivo de las plagas, entre otros requerimientos, es necesaria una correcta identificación de las plagas (FAO 2012). Tradicionalmente para la identificación se emplean insectos adultos, junto a referencias bibliográficas, claves especiales de identificación y fotografías que muestran la estructura morfológica. Sin embargo numerosos grupos de insectos son morfológicamente indistinguibles (especies crípticas) a pesar de que puedan llegar a presentar diferencias a nivel genético (VIVERO et al. 2009; PANPROMMIN et al. 2017). En numerosas ocasiones la identificación rápida de dichas especies se ve dificultada por la escasez de especialistas en los distintos grupos taxonómicos y de herramientas adecuadas (claves dicotómicas, buenas ilustraciones, bibliografía sobre aspectos biológicos de las especies, bases de datos taxonómicas completas y actualizadas), hecho que se agrava cuando sólo se cuenta con ejemplares inmaduros o fragmentos de ellos. Debido a esto, en el caso de algunas plagas de gran importancia económica a nivel internacional, se aplican herramientas de identificación molecular como complemento de las claves de identificación morfológicas (LANTERI 2007).

En los últimos 50 años, las herramientas bioquímicas y moleculares han permitido explorar las diferencias a nivel genético entre individuos (SNOW Y PARKER 1998). La técnica molecular de amplificación de fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite comparar directa o indirectamente diferentes genes, segmentos de genes o segmentos de ADN en el genoma de insectos (ALVAREZ et al. 2005).

Durante la conferencia internacional sobre *Barcoding life*, realizada en Londres en el 2005, se propuso usar una secuencia de nucleótidos del gen

mitocondrial de la Citocromo Oxidasa I (COI), como «identificador universal» para especies animales en analogía con los códigos de barras de uso comercial. Este código de barras del ADN resulta de gran utilidad para la identificación de especies pertenecientes a taxones difícilmente diagnosticables sobre la base de morfología, como para interceptar especies invasoras, que pueden transformarse en plagas en diferentes países (LANTERI 2007).

Por lo expuesto, se plantea como objetivo del presente trabajo, identificar morfológica y molecularmente hormigas cortadoras de hojas que afectan plantaciones forestales de la provincia de Misiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron seleccionados nidos de hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Acromyrmex* y *Atta* que afectaban plantaciones forestales del sur de la provincia de Misiones (Figura 1).

Se colectaron quince insectos adultos de cada uno de los géneros y se transportaron al laboratorio. En primera instancia, se realizó la identificación taxonómica morfológica a nivel de género y luego se realizó la extracción de ADN, empleando técnicas estandarizadas de aislamiento utilizadas en insectos (MARTOS-SCHOTT 2011) para la identificación molecular por ADN. La cuantificación y verificación de la pureza de los ácidos nucleicos extraídos se realizó utilizando técnicas estandarizadas de espectrofotometría. Las muestras fueron cuantificadas a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (SAMBROOK et al. 1989).

Luego, se amplificó la región mitocondrial COI por la técnica PCR. Los cebadores utilizados fueron **LCO1490 F-** (5'-ggTCAACAAATCATAAAGATATTgg-3') y **HCO2198 R-** (5'-TAACTTCAGggTgACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994). Para llevar a cabo la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores universales descriptos anteriormente, se preparó una master mix a volumen final de 20 µL, conteniendo agua libre de DNAsa, Buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 200 µM, 10 pmol de cada uno de los cebadores universales y Taq polimerasa 0,5 unidades (InBio, Argentina). Se utilizó un termociclador Hangzhou Bioer Technology CO (GenePro Thermal Cycler, modelo TC-E-48D, B-48D). El programa de ciclado utilizado, consistió en:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 4 min.
- 35 ciclos: 40 seg a 94°C, 40 seg a 51°C y 40 seg a 72°C.
- Extensión final: 72°C durante 10 min.

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados por el servicio de MacroGen-Korea. Las secuencias de ADN obtenidas fueron empleadas en las bases de datos biológicos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para complementar la identificación morfológica realizada.



Figura 1: Sitios de muestreo de los nidos de hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*.
Figure 1: Sampling sites of leaf-cutting ant nests of *Atta* and *Acromyrmex* genera.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primera instancia, observando los caracteres morfológicos distinguibles en los insectos adultos de las hormigas cortadoras recolectadas, como ser: tamaño de sus castas, número de espinas dorsales y de los lóbulos laterales de la cabeza, tipo de abdomen, color, entre otros, se logró la identificación morfológica de los insectos adultos como pertenecientes a los géneros *Acromyrmex* y *Atta* (Figura 2).

Luego se procedió a la extracción de ADN a partir de las muestras de hormigas cortadoras de hojas de este trabajo y se obtuvieron $8.91 \pm 0.29 \mu\text{g}$ de ADN para el caso de *Acromyrmex*, y $10.57 \pm 0.19 \mu\text{g}$ de ADN para el caso de *Atta*.

A partir de la obtención de ADN en cantidad y calidad adecuada, se realizó la técnica de amplificación por PCR de la región mitocondrial CO I y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 800 pb de buena calidad (Figura 3).

La secuenciación y contrastación con la base de datos del NCBI de los fragmentos de ADN obtenidos, permitió obtener información molecular de ambas especies de insectos y complementar la identificación taxonómica de las hormigas cortadoras de hojas como pertenecientes a las especies *Acromyrmex subterraneus* (Forel) y *Atta sexdens* (Linnaeus).

Actualmente existe un número limitado de secuencias genéticas del gen mitocondrial CO I de hormigas cortadoras en las bases de datos biológicas, por ello las secuencias genéticas obtenidas en este trabajo serán depositadas en la base de datos del NCBI para colaborar con información genética de hormigas cortadoras de hojas propias de la provincia de Misiones (Argentina) que podrán ser utilizadas por otros autores en futuras búsquedas.

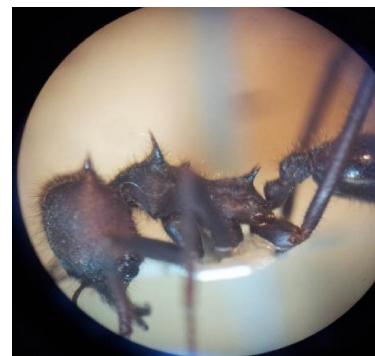


Figura 2: Fotografía en lupa estereoscópica para la identificación de hormigas cortadoras de hojas colectadas en Misiones. a) *Acromyrmex*. b) *Atta*. Flechas indican las espinas dorsales.

Figure 2: Stereoscopic magnified photos for the identification of leaf-cutting ants in Misiones. a) *Acromyrmex*. b) *Atta*. Arrows indicate the spines.

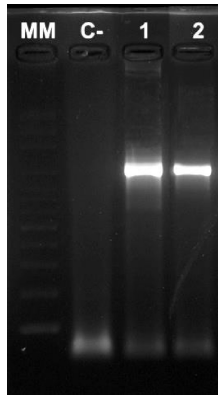


Figura 3. Gel de agarosa al 2% (p/v) de los productos de amplificación por PCR del gen mitocondrial CO I de muestras de hormigas de los géneros *Acromyrmex* y *Atta*. MM: marcador molecular de 100 pb ADN (Fermentas). C-: control negativo. Carril 1: *Acromyrmex*. Carril 2: *Atta*.

Figure 3. Agarose gel 2% (w/v) of PCR amplification products of the mitochondrial CO I gene from ant samples of *Acromyrmex* and *Atta* genera. MM: molecular ladder of 100 bp DNA (Fermentas). C-: negative control. Lane 1: *Acromyrmex*. Lane 2: *Atta*.

Cabe destacar que desde hace varios años, los diferentes grupos de investigación buscan trabajar con una “taxonomía integrada” (DAYRAT 2005), que implica el uso de distintas fuentes de caracteres (incluido el ADN) para descubrir, delimitar y realizar identificaciones de las especies y de los taxones naturales en todos los niveles. Resulta importante destacar que las técnicas moleculares no reemplazan, ni eliminan la necesidad de utilizar herramientas de taxonomía clásica o convencional, sino que por el contrario, deben ser usadas a fin de complementar los estudios para alcanzar una identificación completa, acertada y lo suficientemente descriptiva, especialmente cuando se propone llegar a una identificación a nivel de especie (CASTRILLO 2015).

A través de una taxonomía integrada los taxónomos podrán proporcionar al resto de la comunidad científica información que le permitan identificar a las especies y taxones superiores, aplicando la tecnología de diagnóstico molecular como complemento de las claves morfotaxónicas (WILL et al. 2005).

CONCLUSIÓN

Empleando la metodología descripta fue posible identificar morfológica y molecularmente los insectos adultos de hormigas cortadoras de hojas recolectados como pertenecientes a los géneros

Acromyrmexsubterraneus (Forel) y *Atta sexdens* (Linnaeus).

Los resultados indican que las herramientas moleculares constituyen una fuente de información útil de ser utilizada como complemento de la caracterización morfológica para la identificación y clasificación taxonómica de los insectos que afectan a plantaciones de interés forestal.

AGRADECIMIENTOS

Castrillo posee una beca de investigación de postgrado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET). Y Bich posee una beca cofinanciada del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) y el Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT) de Misiones.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARES J., Menalled F., Hoy M. 2005. Las herramientas moleculares en el control biológico. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 74, pp 4-11.

CASTRILLO M.L. 2015. Caracterización de celulasas secretadas por aislamientos de *Trichoderma*, nativos de la provincia de Misiones (Argentina) aplicables en la etapa de sacarificación. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina. 275 pp.

DAYRAT B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biology Journal of Linnaeus Society*. 85, pp 401-415.

FAO. 2012. Cap 3: Buenas prácticas de protección de la sanidad forestal. En Guía para la aplicación de normas fitosanitarias en el sector forestal. ESTUDIO FAO: MONTES. 164.

FOLMER O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3, pp 294-299.

FORTI L.C., Castellani-Boaretto, M.A.C. 1997. Formigas cortadeiras. Biología, ecología, danos e controle. Botucatu. 61pp.

LANTERI A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista Sociedad Entomologica Argentina*. 66, pp 15-25.

LIMA P.P. 1992. Palestra sobre Formigas cortadeiras. Memória de Reunião de Especialistas em

Controle Alternativo de Cupins e Formigas. Ibama, Brasil. Pp 23-24.

MARTOS-SCHOTT Y. 2011. Caracterización de una región del gen COI para la identificación molecular de dípteros (“DNA Barcoding”) de la familia Sarcophagidae en la provincia de Misiones. Tesina de Licenciatura en genética. Universidad Nacional de Misiones. Misiones, Argentina. 80 pp.

PANPROMMIN D., Panprommin N. 2017. Assessment of the DNA barcoding for identification of *Trigonostigma somphongsi*, a critically endangered species in Thailand. *Biochemical Systematics and Ecology*. 70, pp 200-204.

SAMBROOK J., Fritschi E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 545 pp.

SNOW A., Parker P. 1998. Molecular markers for population biology. *Ecology*. 79, pp 359-360.

VACCARO C.N., Mousques A.J. 1997. Hormigas cortadoras (géneros *Atta* y *Acromyrmex*) y taurúes en Entre Ríos. Concordia XII Jornadas Forestales de Entre Ríos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 34, pp 7.

VIVERO R.J., Contreras-Gutiérrez M.A., Bejarano E.E. 2009. Cambios en el extremo carboxilo terminal de citocromo b como carácter taxonómico en *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 35, pp 83-88.

WEBER E. 2005. Densidad básica de madera de *Pinus taeda* L. Marion de diferentes edades, Misiones, Argentina. *Floresta*. 35, pp 2.

WILL K., Mishler B., Wheeler Q. 2005. The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*. 54, pp 844-851.