

# Observación de la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en soldados *Nasutitermes* sp. (Isoptera: Termitidae)

Observation of the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* in *Nasutitermes* sp. soldiers (Isoptera: Termitidae)

ANA ISABEL GUTIÉRREZ G.<sup>1</sup>, YAMILÉ SALDARRIAGA O.<sup>2</sup>

Revista Colombiana de Entomología 30 (2): 151-156 (2004)

**Resumen.** Soldados de la termita *Nasutitermes* sp., plaga del árbol del nogal cafetero *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken de la familia Boraginaceae, de gran importancia económica y médica, se inocularon *in vitro* con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml del hongo impregnadas en lonas y papel de filtro. Observaciones del desarrollo de la infección del hongo fueron realizadas con el microscopio de luz. El desarrollo del hongo se observó en placas teñidas con azul de lactofenol, utilizando la técnica de aclaración en soluciones de KOH al 5, 10, 15 y 20%. Las termitas infectadas murieron de 1 a 3 días post-inoculación, el hongo penetrando la cutícula a las 24 h, colonizando el tejido graso a las 72 h e invadiendo los órganos internos (intestino) después de 72 h de la infección. A las 120 h masas compactas de conidióforos empezaron a emerger de la cutícula presentando coloración blanca, ubicándose en las regiones intersegmentales de la superficie ventral (patas, tórax) y partes bucales de los insectos. El micelio se tornó verde a las 144 h de inoculación, y a las 192 h se hizo más oscuro y polvoso, invadiendo totalmente el cuerpo de la termita.

**Palabras clave:** Patógeno. Hyphomycete. Isoptera. Micosis. Inoculación. Invasión.

**Summary.** Soldiers of *Nasutitermes* sp., pests of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken, family Boraginaceae, a tree of great economic and medicinal importance were inoculated *in vitro* with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. impregnated on canvases or filter paper at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/ml. Observations on the development of the fungal infection were made with a light microscope. The development of the fungus was observed on mounted slides with lactofenol blue, using a clarifying technique with KOH solutions at 5, 10, 15 and 20%. Infected termites died 1 to 3 days post-inoculation, the fungus penetrating the cuticle at 24 hours, colonizing the fat tissue at 72 hours and invading the internal organs (gut) after 72 hours of infection. At 120 hours a white compact mass of conidiophores began to emerge from the cuticle at the intersegmental regions of the ventral surface (legs, thorax) and mouthparts of the insects. After 144 hours of inoculation the mycelia changed to green, and at 192 hours the mycelia turned dark and powdery when the termite body was totally invaded.

**Key words:** Pathogen. Hyphomycete. Isoptera. Mycosis. Inoculation. Invasion.

## Introducción

Las termitas se consideran como los insectos más nocivos y destructores en las zonas templadas y tropicales. Atacan la madera, construcciones, plásticos, textiles, cauchos, cultivos agrícolas y forestales (Garcés 1997; Harris 1971).

En el bosque tropical, la mayoría de las termitas que se han encontrado, pertenecen a las familias Kalotermitidae, Rhinotermitidae o Termitidae, de las cuales la subfamilia Nasutitermitinae representa más del 50% de las especies, siendo el género *Nasutitermes* el más abundante (Martius 1994). En Colombia se han registrado las tres familias mencionadas.

*Nasutitermes* spp., exopterigotas Neoptera son insectos sociales, representados en numerosos obreros y soldados no alados (Watson y Gay 1991; Borrer *et al.* 1989). Ata-

can los árboles del nogal cafetero *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken de la familia Boraginaceae, que son de gran importancia económica y médica (Varón y Morales 1997).

Muchos autores han utilizado diferentes organismos en el control biológico de las termitas, como el virus de la polyhedrosis nuclear de *Spodoptera littoralis* (Hassan 1990), bacterias como *Bacillus thuringiensis* (Gavino 1984; Logan *et al.* 1990), nemátodos de la familia Steinernematidae y del género *Steinernema carpocapsae* (Coppel y Liang 1987; Mix y Beal 1985). Así mismo, han sido probados con notable éxito los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Yendol y Paschke 1965; Zoberi y Grace 1990; Sajap y Kaur 1990; Zoberi 1995; Alves *et al.* 1995; Milner *et al.* 1998; Delate *et al.* 1995).

Los hongos son uno de los agentes más promisorios para el uso como insecticidas

biológicos (Milner y Staples 1996). Entre los hongos probados como agentes de control biológico en termitas están *Aspergillus flavus*, *Entomophthora*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Espero 1984; Lj[utikova 1990). Además se utilizaron para controlar poblaciones de *Stromatium fulvum* (Villers) (Coleoptera: Cerambycidae) en plantaciones de Casuarina en Egipto (Hassan 1990). Igualmente *M. anisopliae*, *Aspergillus fumigatus*, *Paezilomyces fumosoroseus* y *P. cicadae* presentaron alta infectividad en termitas *Coptotermes formosanus* (Shiraki) bajo condiciones de laboratorio al aplicar suspensiones acuosas de  $6,0 \times 10^7$  conidios/ml a una termita cebo (Chai 1995). *Conidiobolus coronatus* produjo una mortalidad del 100% sobre esta misma especie de termita después de dos días de aplicación (Wells *et al.* 1995). Por otro lado, se comprobó que el ascomycete *Cordy-*

1 Bióloga. Investigador asociado al Grupo de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. E-mail: anaisaguti@hotmail.com

2 Autor para correspondencia: Licenciada en Biología y Química. M. Sc. Profesor de Micología. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corporación de Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín, Colombia. Fax: 2330120. E-mail: ysaldar@matematicas.udea.edu.co

*cepioideus* es patógeno para las termitas *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) que construyen montículos en Kenya (Ochiel *et al.* 1997).

Estudios en Australia demostraron que ciertos aislamientos de *M. anisopliae* pueden ser aplicados para matar colonias de termitas en termiteros, árboles y montículos. El método consiste en capturar termitas, infestadas con el patógeno y reintroducirlas al termitero para iniciar el contagio entre ellas (Milner y Staples 1996; Berón 1983). Ensayos *in vitro* para probar la patogenicidad de este hongo en termitas *Microcerotermes* en diferentes concentraciones demostraron que produce una mortalidad del 51% a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml y del 80-100% por encima de dicha concentración (Zuluaga 2002).

*M. anisopliae* (Metsch.) Sor. es un hongo anamórfico (Kirk *et al.* 2001) aislado del escarabajo *Anisoplia austriaca* por Metchnikoff en 1879 y produce la muscardina verde en los insectos, por lo cual dicho hongo ha sido utilizado como agente microbiano contra insectos plaga (Tanada y Kaya 1993; Zimmermann, 1993; Steinhilber 1949). Es un hongo cosmopolita, saprófito, parásito de insectos, con un amplio rango de hospederos, que puede identificarse fácilmente por sus conidios ramificados y por sus conidios cilíndricos verdes, los cuales forman una capa densa y compacta. En el inicio del crecimiento las colonias presentan una coloración blanca y las colonias maduras se tornan amarillentas, verde oliváceas, verde oscuras y crema rosáceas o vináceas (Humber 1997; Tanada y Kaya 1993; Barnett 1967).

*M. anisopliae* posee dos variedades que se diferencian principalmente por el tamaño de sus conidios: la variedad más común *anisopliae* de conidios pequeños (3,5-9,0  $\mu\text{m}$ ) y la variedad *major* de conidios grandes (9,0-18  $\mu\text{m}$ ) (Kirk *et al.* 2001; Domsch *et al.* 1980). Este hongo crece fácilmente en medios sintéticos sólidos y líquidos, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25-30°C y sus conidios pueden sobrevivir liofilizados hasta por 16 años (Tanada y Kaya 1993; Samson 1981; Steinhilber 1949). Produce metabolitos secundarios como destruxinas A, B, C, D, E y una desmetildestroxina B, los cuales son tóxicos y actúan como micotoxinas. Su toxicidad se da por la ingestión y a través del integumento y su efecto varía según la especie de insecto atacado, pudiendo causar parálisis tetánica y flácida *in vivo*, despoliarizando membranas musculares al activar los canales de calcio; afecta varias organelas celulares (mitocondrias, retículos endoplasmáticos y membranas nucleares), paraliza células y causa disfunción del intestino medio, los túbulos de malpigio y los hemocitos. También ejercen una acción inmunodepresora en el insecto e inhiben la encapsulación multicelular del hongo (Aldana 1998; Tanada y Kaya 1993; Burges y Hussey 1971).

Entre los mecanismos de invasión de los hongos entomopatógenos están el de ingestión y el de contacto a través de la cutícula, siendo el más frecuente el de contacto. En éste, el hongo penetra la cutícula del insecto y llega al hemocele, donde libera una serie de metabolitos tóxicos que inhiben el sistema inmune del insecto, el cual finalmente muere debido a los daños mecánicos y fisiológicos sufridos (Boucias y Pendland 1988, 1991; Tanada y Kaya 1993; Aldana 1998). Por ingestión, el hongo ingresa por las partes bucales y el intestino, siendo estos canales alimentarios inhospitalarios a la penetración del hongo debido a los efectos de anaerobiosis, enzimas digestivas, pH adverso, velocidad del alimento y el papel protector de la membrana peritrófica (Dillon y Charnley 1986).

La ontogenia del hongo *M. anisopliae* se observó mediante estudios histológicos en obreros de *Coptotermes curvignathus* Holmgr. en Malasia (Sajap y Kaur 1990). Igualmente se realizaron estudios de infección bucal y a través del tracto digestivo por el hongo *M. anisopliae* de la langosta *Schistocerca gregaria* Forsk (Dillon y Charnley 1986).

El objetivo de este estudio fue evaluar el mecanismo de acción de *M. anisopliae* sobre los soldados y obreros de *Nasutitermes* sp. mediante la técnica de aclaramiento con hidróxido de potasio.

## Materiales y Métodos

### Área de estudio

Se realizaron cuatro colecciones de termitas en la quebrada la Volcana (Loma de los Balsos) sector del Poblado al sureste de Medellín, Antioquia (Colombia) caracterizada por presentar una zona de vida clasificada como bosque húmedo premontano (bh-P) con temperatura promedio de 20°C, precipitación media anual de 1.000-2.000 mm y una faja altitudinal de 1.450 msnm (Espinal 1990).

### Colección y mantenimiento de las termitas

Las termitas *Nasutitermes* sp. se colectaron en un tronco de un árbol que pertenece al género *Cordia* (Familia: Boraginaceae). Se capturaron termitas de diferentes castas (soldados y obreros) realizando incisiones en el termitero y/o colectando trozos de madera del árbol. Las termitas se introdujeron, utilizando pincel, en recipientes plásticos o de vidrio a los cuales previamente se les adicionaron los sustratos provenientes del termitero y se cubrieron con vinilpel durante el transporte hacia el laboratorio.

Para la reproducción en el laboratorio se utilizaron recipientes de fibra de vidrio moldeado de 20 x 25 cm de diámetro; a los recipientes se les agregó una capa de grava gruesa 2 cm de espesor, seguida de una capa de grava fina del mismo espesor, finalmente una capa de 10 cm de tierra del mismo termitero con arena fina (25% en

volumen) (Norme Française 1990). Estos recipientes se cubrieron con muselina; los bordes del recipiente se impregnaron con vaselina para evitar el escape de las termitas.

Las colonias se mantuvieron en oscuridad, con circulación de aire y a una temperatura de 26°C  $\pm$  2°C y 75% de humedad relativa. La humedad de la tierra, la temperatura y la humedad relativa dentro del termitero se controlaron diariamente (Norme Française 1990).

### Cultivo del hongo

La cepa del hongo *M. anisopliae* (Ma 45), aislada de un coleóptero (de una subfamilia de la familia Melolonthidae) fue donada por CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). El hongo se cultivó en tubos y cajas de Petri con medio Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) a temperatura ambiente (21-26°C), durante 10-12 días y se almacenó a 4°C. La cepa se replicó cada quince días en SDA y se observaron los conidios y el micelio al microscopio (Aldana 1998; Zoberi y Grace 1990).

### Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron más termitas soldados que obreros por ser la casta más numerosa dentro de la colonia estudiada. A partir de una solución madre de conidios obtenida de los cultivos del hongo se impregnaron durante 5 min, 10 lonas y 10 papeles de filtro circulares de 100 x 15 mm con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. Las lonas y los papeles de filtro impregnados se introdujeron en frascos medianos que contenían sustrato proveniente del termitero y se adicionaron 5 termitas soldados (de 4 mm) y un obrero (de 3 mm de longitud) y se cubrieron con muselina. La supervivencia de las termitas se verificó diariamente durante ocho días. Como testigos se utilizaron lona y papel de filtro impregnados con agua destilada estéril. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Durante los ensayos se controlaron diariamente las condiciones de oscuridad, temperatura y humedad relativa y se verificó la actividad de las termitas.

En total, en los ensayos, se utilizaron 150 termitas soldados con el inóculo impregnado en el papel de filtro, 150 con el inóculo impregnado en lonas y 100 en cada testigo. Se trataron 30 obreros en cada inóculo y 10 en cada testigo.

Para observar la penetración del hongo en el insecto, se realizó la técnica de aclaramiento de la termita descrita por Stehr (1987), utilizando soluciones de KOH al 5, 10, 15 y 20% a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) de exposición. Luego, los insectos se sumergieron en una solución agua: alcohol (1:3v/v) y después en fenol puro. Posteriormente, se realizaron preparaciones del insecto en portaobjetos que se tiñeron con azul de lactofenol para obser-

var hifas y esporas en las partes internas del cuerpo de la termita.

**Micosis**

Para evaluar el desarrollo del hongo y la presencia de daños en las termitas se colocaron los soldados muertos y obreros, en cajas de Petri estériles, con papel de filtro Whatman N° 1 húmedo, estéril y se observó la aparición de micelio durante ocho días.

**Análisis estadístico**

La mortalidad para los cuatro tratamientos (hongo en papel de filtro y en lona y agua destilada en papel de filtro y en lona) se comparó en cada día utilizando la prueba de homogeneidad de proporciones, la cual se realizó en el paquete estadístico Statxact 4.0.1 (Cytel Software Corporation, Cambridge, Ma).

**Resultados y Discusión**

El porcentaje de mortalidad de los soldados fue diferente tanto entre los tratamientos como entre los días. En efecto, la mortalidad en el primer día fue mayor cuando se usó agua destilada en papel de filtro (46%). En el segundo día la mortalidad mayor (82%) se presentó empleando el papel de filtro impregnado con el *Metarhizium anisopliae* mientras que la lona con el hongo resultó eficaz sólo al tercer día (Tabla 1). En la tabla 2 se presentan los porcentajes de mortalidad para los obreros. No se encontraron diferencias entre tratamientos en ninguno de los tres días. Se observó también que el porcentaje mayor de mortalidad ocurrió en el segun-

do día para todos los tratamientos. La comparación entre tratamientos se realizó para cada día, tanto para los soldados como para los obreros, según la metodología de Snedecor y Cochran 1978.

Las termitas obreros y soldados presentaron mortalidad al segundo día debido a la acción del hongo *M. anisopliae*, que se observó mediante la técnica de aclaración en KOH (10 y 15%) dentro el cuerpo de éstos, resultados que concuerdan con los estudios realizados por Sajap y kajur (1990); Milner *et al.* (1998) y Delate *et al.* (1995). Igualmente, los testigos presentaron mortalidad debido a factores como: la fragilidad natural (no permite ser sometidos a técnicas de asepsia en el laboratorio antes de los bioensayos) y a contaminantes naturales como *Aspergillus flavus* y *Serratia marcescens* (entomopatógenos) que habitan en su mismo nicho ecológico (Steinhaus 1949; Tanada y Kaya 1993; Martius 1998). Así mismo, los testigos se sometieron a la técnica de aclaración en KOH (10 y 15%) y no mostraron invasión en sus tejidos por el hongo *M. anisopliae*.

En cuanto a la forma de invasión del hongo *M. anisopliae* en las termitas, a las 24 h post-inóculo los conidios se observaron sobre la cutícula, superpuestos y estrechamente unidos a las setas y poros de las setas (Fig. 1), en las patas, en el fémur y tibia; tibia y tarsómeros, uñas tarsales y tergitos abdominales. Luego, éstos formaron tubos germinales continuando su crecimiento. Esto concuerda con los estudios realizados por Boucias y Pendland (1988) con *M. anisopliae* y *B. bassiana* donde se

demonstró que la topografía y propiedades químicas de la epicutícula facilitan la adhesión conidial y la orientación del tubo germinal, encontrando que los conidios de estos hongos tienen preferencia por toda la región del cuerpo del insecto y la superficie de la cutícula que contiene espinas cuticulares cortas.

Además, la forma de invasión, iniciando en la cutícula, concuerda con los resultados descritos por Sajap y Kaur (1990) y Quarles y Bucks (1995) quienes realizaron ensayos en termitas *Coptotermes curvignathus* donde los conidios de *M. anisopliae* germinaron sobre la cutícula y el tubo germinal penetró dentro de la cutícula a las 24 h post-inoculación y luego en el exoesqueleto.

La interacción conidio-cutícula (unión de los carbohidratos del hongo *M. anisopliae* y las proteínas de la cutícula del insecto) no ha sido totalmente esclarecida (Latge *et al.* 1988).

Los tubos germinales formados por micopatógenos en artrópodos producen células apesoriales que secretan sustancias mucilaginosas y exoenzimas que ayudan a la penetración del hongo a través de la cutícula del insecto (Zacharuk (1970b); Schabel (1978); Travland (1979); Fargues (1984); Charnley (1984); Persson *et al.* 1984; St. Leger *et al.* 1986; Murrin y Nolan (1987); St. Leger *et al.* (1989a y b); sin embargo, dicha estructura no se observó en este estudio.

McCauley *et al.* (1968) y Zacharuck (1970a) observaron que los conidios de *M.*

**Tabla 1.** Mortalidad de los soldados *Nasutitermes* sp. con el hongo *Metarhizium anisopliae* según el tratamiento aplicado (porcentaje)

Tiempo (Días)	Hongo en papel de filtro (N = 150) %	% de mortalidad acumulada	Hongo en lona (N = 150)	% de mortalidad acumulada	Testigo en papel de filtro (N = 100)	% de mortalidad acumulada	Testigo en lona (N = 100)	% de mortalidad acumulada	Probabilidad (P)
1	17,3	17,3	6	6	46	46	12	12	< 0,001
2	82,0	99,3	34	40	54	100	64	76	< 0,001
3	0,7	100	60	100	0	100	24	100	< 0,001

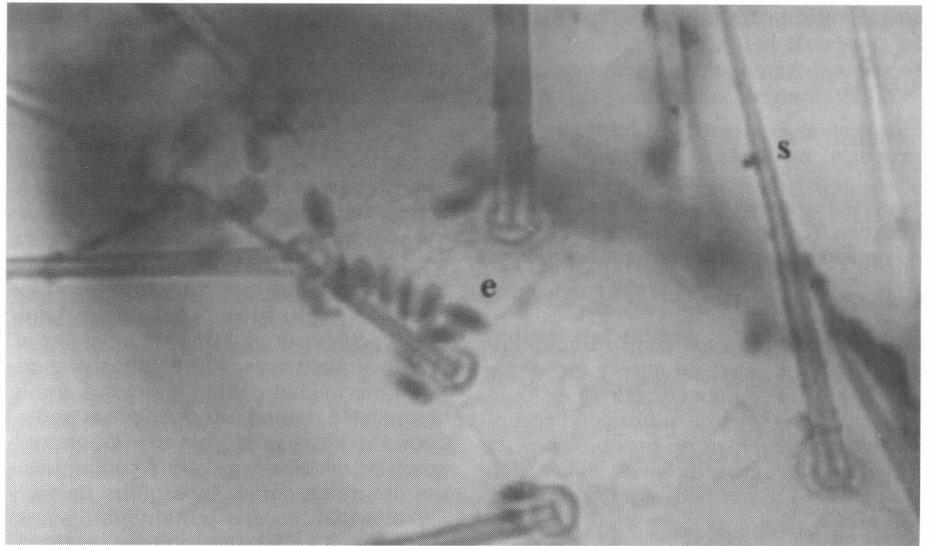
**Tabla 2.** Mortalidad de los obreros *Nasutitermes* sp. con el hongo *Metarhizium anisopliae* según el tratamiento aplicado (porcentaje)

Tiempo (Días)	Hongo en papel de filtro (N = 150) %	% de mortalidad acumulada	Hongo en lona (N = 150)	% de mortalidad acumulada	Testigo en papel de filtro (N = 100)	% de mortalidad acumulada	Testigo en lona (N = 100)	% de mortalidad acumulada	Probabilidad (P)
1	30,0	30,0	10,0	10,0	0	0	10	10	0,10
2	63,3	93,3	53,3	63,3	90	90	60	70	0,65
3	6,7	100	36,7	100	10	100	30	100	0,06

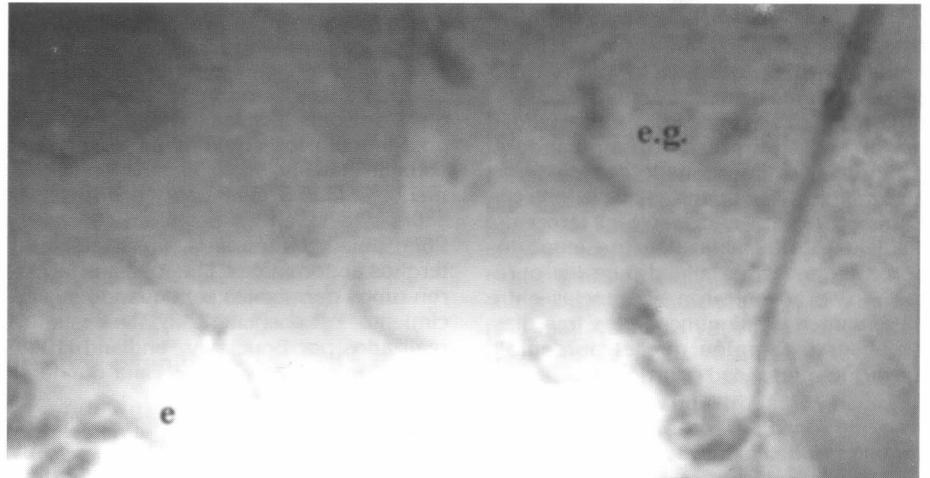
*anisopliae* se pueden unir a toda la superficie cuticular, remover fácilmente y permanecer unidos a la epicutícula asociada con pliegues protegidos. Sólo algunos micopatógenos terrestres reconocen específicamente la cutícula hospedante. Además, se encontró que los conidios de un linaje de *M. anisopliae* aislados del Scarabaeido (Scarab) *Cetonia aurata* se unen fácilmente a la cutícula de *C. aurata*, pero no a las larvas del Scarab *Oryctes rhinoceros* (Fargues 1984). En este estudio se observó claramente que los conidios de *M. anisopliae* se unen a la cutícula de *Nasutitermes* sp. (Fig. 1).

Una vez que los conidios llegan al interior de la cavidad del cuerpo, el hongo crece y mata el insecto. Aunque se ha observado que a las 48 h post-inoculación los cuerpos hifales son abundantes en el hemocele de las termitas, en las placas aclaradas con KOH y teñidas con azul de lactofenol, no se encontraron hifas en el hemocele debido a que la técnica de aclaramiento con KOH no permitió observar la invasión del hongo en el hemocele y a las 72 h de la infección se detectaron hifas invadiendo principalmente el tejido graso (Fig. 2) e intestino (Fig. 3), continuando hacia los tejidos musculares, nervioso y aparato digestivo, mostrando una invasión fúngica en todos los órganos de la termita *Nasutitermes* sp. Observaciones que concuerdan con los resultados obtenidos por Sajap y Kaur (1990) y Tanada y Kaya (1993) en las termitas *C. curvignathus*, donde el hongo *M. anisopliae* invadió extensivamente el tejido graso, los tejidos musculares e intestino en el período comprendido entre 60-72 h después de la infección.

Aunque las termitas *Nasutitermes* sp. murieron entre 1-3 días después de la inoculación del hongo entomopatógeno, no se observó el micelio emergiendo de la



**Figura 1.** Esporas de *M. anisopliae* sobre la cutícula de soldados *Nasutitermes* sp. e: esporas. s: setas. 100X.



**Figura 2.** Esporas germinadas de *M. anisopliae* invadiendo el tejido graso de soldados *Nasutitermes* sp. e: esporas. eg: espora germinada. 100X.

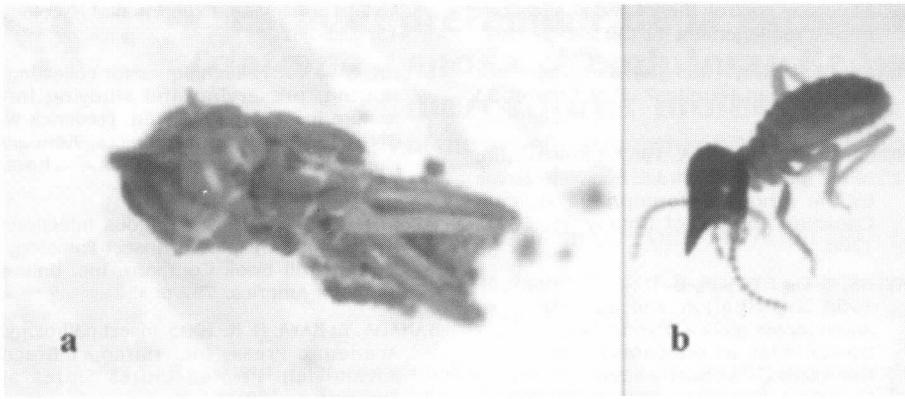


**Figura 3.** Hifa de *M. anisopliae* invadiendo el intestino de soldados *Nasutitermes* sp. i: intestino. h: hifa. 100X.

cutícula del insecto hasta 96 h post-inoculación (Fig. 4a), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Sajap y Kaur (1990) en *C. curvignathus* en los que la emergencia del micelio se presentó a las 100 h post infección.

En este estudio se logró la infección de soldados termitas adultos que tienen cuerpos esclerotizados (Fig. 4b), los cuales ofrecen cierta resistencia hacia la acción fúngica ya que la cutícula melanizada es relativamente resistente al ataque enzimático por hongos (Charnley y St. Leger 1991). Los hongos usualmente causan mortalidades por uno de los siguientes aspectos: deficiencia nutricional, invasión y destrucción de tejidos (que puede ser antes o después de la muerte del insecto) y liberación de toxinas (Tanada y Kaya 1993).

La micosis se evaluó durante ocho días después de la inoculación del hongo *M. anisopliae*. El micelio en el cuerpo de la termita tomó coloraciones desde blanca hasta verde oliva claro, verde oliva oscuro con tin-



**Figura 4.** a. Un cadáver de soldado de *Nasutitermes* sp. completamente cubierto con conidióforos llevando conidios. b. Termita sana. 10X.

tes grisáceos hasta verde oscuro, con un aspecto algodonoso al inicio del crecimiento hasta polvoso en la fase final. A las 96 h se observó micelio en forma de filamentos hialinos sobre la parte ventral del tórax y sobre las patas. A las 120 h las termitas presentaron un micelio blanco en forma de hilos transparentes ocupando todo el cuerpo de la termita. El hongo se encontró invadiendo la superficie ventral de la cabeza (gula mentón, prementón, ligula, palpos labiales; maxilas: galea, lacinia, palpos maxilares y mandíbulas). El micelio se observó de una coloración blanca con un aspecto algodonoso en la cabeza (gena y postgena), en forma de un escudo en la cervix, en la parte posterior del protórax, dorso-pleura, prosternum, mesosternum y metasternum, y en las articulaciones de las patas anteriores, medias y posteriores (articulaciones entre fémur y tibia, tibia y tarsómeros y uñas tarsales). El hongo no se encontró invadiendo la termita dorsalmente; solamente se observó micelio blanco en uno de los tergitos abdominales posteriores en la membrana intersegmental.

A las 144 h de la inoculación, el micelio blanco se tornó de color verde ocupando las mismas partes que se mencionaron anteriormente y el nasuto empezó a cubrirse de micelio en su parte apical. A las 168 h, la superficie dorsal del cuerpo de la termita se cubrió totalmente de un micelio hialino y en los tergitos abdominales posteriores se encontró micelio blanco. El micelio verde empezó a tomar una coloración verde oliva que proliferó en partes bucales, superficies dorso y ventro-laterales del tórax y en las articulaciones de las patas. A las 192 h el micelio verde se tornó más oscuro pero de consistencia polvosa e inició la invasión de la cabeza (piezas bucales, genas, postgenas), prosternum, mesosternum, metasternum y patas. El hongo llenó los tergitos torácicos y comenzó a cubrir los tergitos abdominales posteriores. Finalmente, la termita quedó invadida totalmente por el hongo.

### Conclusión

• El mecanismo de invasión del hongo *M. anisopliae* en la termita *Nasutitermes* sp.

es vía integumentaria, iniciándose con la adherencia de la espora a la cutícula, la penetración al intestino y al tejido graso conllevando a la muerte del insecto y su posterior esporulación.

### Agradecimientos

Los autores expresan los más sinceros agradecimientos al profesor Jaime Calle por la revisión y corrección del manuscrito, a los profesores Constantino Mantilla, Sandra Uribe S., Fabio Pineda G., José Rincón, Luis Carlos Mejía, Abel Díaz C. y a los compañeros del laboratorio de Micología y Microbiología del Instituto de Biología y del Pos-grado de Entomología de la Universidad Nacional Sede Medellín que contribuyeron a la ejecución de este trabajo. También al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), al Instituto de Biología Universidad de Antioquia y a la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por la financiación y apoyo a este trabajo.

### Literatura citada

- ALDANA, R. 1998. Evaluación de polimorfismo genético y de la producción de toxinas en cuatro aislados del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. Pos-grado Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Universidad de Antioquia. 44 p.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO, A.; STIMATIC, J. L.; PEREIRA, R. M. 1995. Uso de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de *Cornitermes cumulans* em pastagens. Ecosistema. Facultad de Agronomía "Manoel Carlos Gonçalves". Brasil. 20: 50-57.
- BARNETT, H. L. 1967. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis (U.S.A.). 225 p.
- BERÓN W. C. 1983. Daños y control de termitas. Seminario como trabajo de investigación. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 68 p.
- BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. 1989. An introduction to the study of insects. p. 234-241. Saunders College Publishing. 6 ed. Fort Worth, United States of America. 875 p.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. 1988. Non specific factors involved in the attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Applied and Environmental Microbiology 54 (7): 1795-1805.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: The initial event of mycoses in arthropods hosts. p 101-127. En: G. T. Cole and Harvey C. Hoch (eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press. New York - London. 555 p.

BURGESS, H. D.; HUSSEY, N. W. 1971. Microbial control of insects and mites. Academic Press. Great Britain. p. 398-401. 861 p.

CHAI, Y. Q. 1995. Preliminary studies on the pathogenicity of some entomogenous fungi to *Coptotermes formosanus*. Chinese Journal of Biological Control 11 (2): 68-69.

CHARNLEY A. K. 1984. Physiological aspects of pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. En: Anderson J. M., Rayner A. D. M., Walton D. (eds.). Invertebrate: Microbial Interactions, British Mycological Symposium. University Press, Cambridge. 6: 229-271.

CHARNLEY A. K.; ST. LEGER R. J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. p. 267-283. En: G. T. Cole and Harvey C. Hoch (eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press. New York-London.

COPPEL, H. C.; LIANG, M. C. 1987. Rhabditoid nematodes associated with subterranean termites. Forestry Research Notes. USA. Nº 274, 5 p.

DELATE, K. M.; GRACE, J. K.; TOME C. H. M. 1995. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). Journal of Applied Entomology 119 (6): 429-433.

DILLON R. J.; CHARNLEY, A. K. 1986. Invasion of the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* through the guts of germ-free desert locust, *Schistocerca gregaria*. Mycopathologia 96: 59-66.

DILLON, R. J.; CHARNLEY, A. K. 1991. The fate of fungal spores in the insects gut. p. 129-156. En: G. T. Cole and Harvey C. Hoch (eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press. New York- London. 555 p.

DOMSCH, K. H.; GAM, W. AND. ANDERSON, T.-H. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press. Vol 1. 859 p.

ESPERO, L. V. 1984. Survey of entomogenous fungi associated with termites (Philippines). Scientific Journal 6 (1): 23-24.

ESPINAL, L. S. 1990. Zonas de Vida de Colombia. Universidad Nacional de Colombia Seccional Medellín. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias p. 61-62. 121 p.

FARGUES, J. 1984. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. p. 90-110. En: Infection Processes of fungi (D. W. Roberts and J. R. Aist, (ed.). Rockefeller Foundation Conference Report.

- GAO, D. R.; ZHU, B. Z.; GAN, B. R.; HE., S. S.; YUAN, S. X. 1985. A new toxic bait for the control of forest-infecting termites. *Journal of the Nanjing Institute of Forestry, China* 3: 128-131.
- GARCÉS, J. E. 1997. Generalidades sobre las principales plagas insectiles en plantaciones forestales de Colombia (Guía de campo). Trabajo Final de Especialización. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias y Ciencias Agropecuarias. Pos-grado en Entomología. Medellín, p. 293- 311.
- GAVINO, A. A. 1984. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillae, biochem product) as biological insecticide against subterranean termites Philippines. *Scientific Journal* 6 (1): 25.
- HARRIS, W. V. 1971. Termites. Their recognition and control. Longman. Second ed. London, Great Britain. 186 p.
- HASSAN, F. A. 1990. Important insects pests of Casuarina in Egypt. p. 102-109. En: *Advances in casuarina research and utilization. Proceedings of the Second International Casuarina Workshop. Cairo, Egipto.*
- HUMBER, R. A. 1997. Fungi Identification. p. 153-185. En: L. Lacey (ed.). *Manual of techniques in insect pathology.* USDA, ARS, Academic Press (Great Britain).
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C AND J. A. STALPERS. 2001. *Ainsworth & Bisby 's Dictionary of the fungi.* Edited Cabi Publishing. 624 p.
- LATGE, J. P.; MONSIGNY, M.; PROVOST, M. C. 1988. Visualization of exocellular lectins in the entomopathogenic fungus *Conidiobolus obscurus*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 36: 1419-1424.
- L[J]UTIKOVA, L. I. 1990. Entomogenous fungi as control agents for termite *Anacanthotermes ahngerianus* Jacobs (Isoptera, Hodotermitidae). p. 634-635. En: G.K. Veeresh; B. Mallick; C.A. Viraktamath (eds.). *Social insects and the environment.*
- LOGAN, J. W. M.; COWIE, R. H.; WOOD, T. G. 1990. Termite (Isoptera) control in agriculture and forestry by non-chemical methods: a review. *Bulletin of Entomological Research* 80 (3): 309-330.
- MCCAULEY, V. J. E.; ZACHARUK, R.Y.; TINLINE, R.D. 1968. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 12: 444-459.
- MARTIUS, C. 1994. Diversity and ecology of termites in Amazonian forest. *Pedobiologia* 3 (5): 407-428.
- MARTIUS, C. 1998. Perspectivas do controle biológico de cupins (Insecta: Isoptera). *Revista Brasileira de Entomologia* 41: (2-4): 179-194.
- MILNER, R. J.; STAPLES, J. A. 1996. Biological control of termites: results and experiences within a CSIRO project in Australia. *Biocontrol Science and Technology* 6 (1): 3-9.
- MILNER, R. J.; STAPLES, J. A.; LUTTON, G. G. 1998. The selection of an isolate of the Hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biological control: theory and applications in pest management* 11 (3): 240-247.
- MIX, J.; BEAL, R. H. 1985. Can nematodes halt subterranean termites?. *Pest Control* 53 (2): 22-23.
- MURRIN, F.; NOLAN, R. A. 1987. Ultrastructure of the infection of spruce budworm larvae by the fungus *Entomophaga aulicae*. *Canadian Journal of Botany* 65: 1694-1706.
- MYLES, T. G.; STRACK, B. H.; FORSCHLER, B. 1998. Distribution and abundance of *Antennopsis gallica* (Hyphomycete: Gloeohaustoriales), an ectoparasitic fungus, on the eastern subterranean termite in Canada. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72 (2): 132-137.
- NORME FRANÇAISE N. F. 1990. Détermination de l'efficacité préventive contre *Reticulitermes santonensis* de Feytaud (Méthode de laboratoire). *European Standard Comite Europeen de Normalisation*. 15 p.
- OCHIEL, G. S.; EVANS, H. C.; EILENBERG, J. 1997. *Cordycepioideus*, a pathogen of termites in Kenya. *Mycologist* 11 (1): 7-9.
- PEARCE, M. J. 1999. *Termites and Pest management.* Cab International. Printed and bound in the UK at the University Press, Cambridge p. 127-137.
- PERSSON, M.; HALL, L.; SODERHALL, K. 1984. Comparison of peptidase activity in some fungi pathogenic to arthropods. *Journal of Invertebrate Pathology* 44: 342-348.
- QUARLES, W.; BUCKS, C. 1995. Non toxic termite treatments (include related articles). *Organic Gardening*. Dec: 44-50.
- SAJAP, A. S.; KAUR, K. 1990. Histopathology of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus infection in the termite, *Coptotermes curvignathus*. *Pertanika*. Malaysia 13 (3): 331-334.
- SAMSON, R. A. 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. p. 93-105. En: H. D. Burges (ed.). *Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980.* Academic Press Inc. Ltd. London (Great Britain).
- SCHABEL, H. G. 1978. Percutaneous infection of *Hylobius paaes* by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 31: 180-187.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. 1978. *Métodos estadísticos.* Cecsa. México. p. 297-302.
- St. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M.S.; STAPLE, R. C.; ROBERTS, D. W. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 295-302.
- St. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M.S.; STAPLE, R. C.; ROBERTS, D. W. 1989a. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13: 274- 288.
- St. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M.S.; STAPLE, R. C.; ROBERTS, D. W. 1989b. Synthesis of proteins including a cuticle degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13: 253-262.
- STEHF, F. W. 1987. Techniques for collecting, rearing, preserving and studying immature insects. p. 7-18. En: Frederick W. Stehr (ed.). *Immature Insects.* Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque Iowa, U.S.A.
- STEINHAUS, E. A. 1949. *Fungous Infections (Mycoses). Principles of Insect Pathology.* McGraw-Hill Book Company, Inc. United States of America. 757 p.
- TANADA, Y.; KAYA, H. K. 1993. *Insect pathology.* Academic Press, Inc. Harcourt Brace Javanovich. Printed Unites States of America. p. 359-361.
- TRAVLAND, L. B. 1979. Initiation of infection of mosquito larvae (*Culiseta inornata*) by *Coelomyces psorophorae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 33: 95-105.
- VARÓN, P. T.; MORALES, S. L. 1997. *Árboles de Aburrá.* Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Editorial Colina. Medellín. p 137.
- WATSON, J. A. L.; GAY, F. J. 1991. *Isoptera (Termites).* p. 330-347. En: *The Insects of Australia.* (ed.) Csiro. Vol II. Cornell University Press. Ithaca, New York.
- WELLS, J. D.; FUXA, J. R.; HENDERSON, G. 1995. Virulence of four fungal pathogens to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Entomological Science* 30 (2): 208-215.
- YENDOL, W. G.; PASCHKE, J. D. 1965. Pathology of an *Entomophthora* infection in the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Journal of Invertebrate Pathology* 7: 414-422.
- ZACHARUK, R. Y. 1970a. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 63-80.
- ZACHARUK, R. Y. 1970b. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and appressoria. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 81-911.
- ZOBERI, M. H. 1995. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mycologia* 87 (3): 354-359.
- ZOBERI, M. H.; GRACE, J. K. 1990. Isolation of the pathogen *Beauveria bassiana* from *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 16 (3): 289-296.
- ZIMMERMANN, G. 1993. The entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science Great Britain*. 37: 375-379.
- ZULUAGA, M. P. 2002. *Susceptibilidad de Microcerotermes sp. (Isoptera: Termitidae) a Metarhizium anisopliae (Metsch) Sor. en plantaciones de Eucalyptus tereticornis.* Tesis presentada para obtener el título de Bióloga. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Instituto de Biología. 56 p.