



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Diversidad, prevalencia e intensidad de *Escovopsis* spp. (Hypocreales: Ascomycota) y moscas parasitoides (Díptera: Chloropidae) en nidos de *Apterostigma* (Hymenoptera: Formicidae, Attini) en Panamá

Estudiante:

Mendieta Garcia, Angela Dayian

Trabajo de graduación presentando a la escuela de Biología, como requisito parcial para optar por el Título de Licenciatura en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología

Panamá, República de Panamá

2025



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“Diversidad, prevalencia e intensidad de *Escovopsis* spp. (Hypocreales: Ascomycota) y moscas parasitoides (Díptera: Chloropidae) en nidos de *Apterostigma* (Hymenoptera: Formicidae, Attini) en Panamá

Por:

Angela Dayian Mendieta Garcia
8-935-839

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología

Mgtr. Nivia Ríos

Mgtr. Ariadna Bethancourt

Dr. Hermógenes Fernández Marín

Dedicatoria

Quiero dedicarles esta tesis a mis padres, mis pilares y mi inspiración. Han sido mi motivación en cada paso de mi educación, y gracias a Dios por nunca abandonarme durante este proceso. Simplemente gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por permitirme llegar hasta este día y guiarme a lo largo de mi vida. Le doy gracias por brindarme la oportunidad de estudiar esta carrera, por ser mi luz, mi apoyo y mi guía. También le agradezco por darme la fortaleza necesaria para no rendirme en los momentos difíciles.

Le doy gracias a mis padres Doris y Miguel por apoyarme en todo momento, por los valores que me inculcaron, y por darme la oportunidad de tener una excelente educación. Gracias por confiar en mí.

A mis hermanos por ser parte importante de mi vida, por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo necesitaba.

Agradezco enormemente al Dr. Hermógenes Fernández-Marín, por haberme aceptado en su grupo de trabajo; sin conocerme confió en mí y mis capacidades, por los consejos, por la confianza, apoyo y su tiempo y dedicación para que llegara al final de este proyecto.

También le agradezco a la Dra. Yuliana Christopher por aconsejarme y aportarme de sus conocimientos sobre *Escovopsis*.

Agradezco a Eyleen que desde el principio fue una guía y resolvió mis dudas en todo momento.

A Maristel por haber sido una buena compañera de tesis, por su paciencia necesaria para motivarme en mis momentos de desesperación.

A mis amigas por confiar en mí y por haber hecho de esta etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca olvidare.

Gracias a Angel por entenderme en todo, gracias por tu apoyo incondicional en mi vida.

Agradezco profundamente a mis compañeros del laboratorio de Insectos Sociales: Anel, y Gabriel. Gracias a todos por haberme brindado su apoyo en todo momento y en todo lo que necesité. Sobre todo, gracias por hacer que mi estadía haya sido una experiencia reconfortante.

A mis asesoras Ariadna Bethancourt y Nivia Ríos por aceptar ser mis asesoras, por tomarse su tiempo en revisar cada uno de mis avances.

A INDICASAT -AIP por permitirme usar sus instalaciones para desarrollar mi investigación, y dentro de la institución también agradecer a aquellas personas que me ayudaron sin pensarlo.

Agradezco a la Universidad de Panamá, la institución que ha sido fundamental en mi formación como bióloga. Las experiencias y lecciones académicas impartidas por mis profesores quedarán en mi memoria.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICOS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	21
HIPÓTESIS	22
MARCO TEÓRICO	23
Origen evolutivo de las Attini inferiores.....	23
Historia Natural.....	24
Agricultura de las Attini.....	24
Morfología de las hormigas	26
Características morfológicas de las especies descritas del género <i>Escovopsis</i> y <i>Luteomyces</i> en <i>Apterostigma</i>	26
Parasitoides Phoridae	39
MATERIALES Y METODOLOGÍA	41
Transporte y cuidado de los nidos	43
Registro de datos demográficos de los nidos de las hormigas del género <i>Apterostigma</i> spp.	43
Aislamiento de <i>Escovopsis</i> spp.	44
Identificación por microscopia óptica	45
Criopreservación en Glicerol	46
Identificación molecular de <i>Escovopsis</i> spp.....	46
Extracción de ADN.....	46
Identificación de <i>Escovopsis</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
La visualización de las bandas genómicas mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa	47
Purificación del producto de PCR amplificado (QIAGEN)	47
Secuenciación del ADN.....	48

RESULTADOS.....	49
Identificación y colecta de nidos.....	49
Identificación de las especies de <i>Apterostigma</i> colectadas.....	49
Registro de datos demográficos de los nidos de las hormigas del género <i>Apterostigma</i>	51
Prevalencia del parasitismo en nidos de <i>Apterostigma dentigerum</i>	53
Intensidad del parasitismo en nidos de <i>Apterostigma dentigerum</i>	55
Aislamiento de la diversidad de los morfotipos	57
Prevalencia de los morfotipos.....	59
Identificación por microscopia óptica de los morfotipos brown de <i>Escovopsis</i>	62
Identificación por microscopia óptica de los morfotipos yellow. <i>Luteomyces trichodermoides</i>	65
Identificación Molecular.....	66
Amplificación de ADN	66
Visualización de las bandas genómicas amplificadas por PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa	69
Secuenciación	69
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	51
Tabla.2.	58
Tabla.3	66
Tabla.4	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	53
Gráfico 2	54
Gráfico 3	55
Gráfico 4	56
Gráfica 5	60
Gráfico 6	60
Gráfico 7	61
Gráfico 8	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	27
Figura 2.....	29
Figura 3.....	30
Figura 4.....	32
Figura 5.....	33
Figura 6.....	35
Figura 7.....	37
Figura 8.....	38
Figura 9.....	40
Figura 10.....	41
Figura 12.....	42
Figura 13.....	45
Figura 14.....	50
Figura 15.....	50
Figura 16.....	50
Figura 17.....	62
Figura 18.....	63
Figura 19.....	64
Figura 20.....	65
Figura 21.....	69
Figura 22.....	70
Figura 23.....	72

ABREVIATURAS

N: Numérico

ADN: ácido desoxirribonucleico

APT: *Apterostigma*

CTAB: Bromuro de cetil - trimetil amonio.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Agar papa dextrosa

TAE: Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA.

RESUMEN

Escovopsis (Hypocreales: Ascomycota) micoparásito exclusivos de las hormigas cultivadoras de hongos de la tribu Attini, consume el micelio del hongo simbiote hasta debastar la colonia por completo. La fase anamórfica del micoparásito, *Escovopsis*, fue expuesto por primera vez por Muchovej y Della Lucia en 1990 para sustituir a *Phialocladus Kreisel*, 1972, al que se le consideraba un género inválido, ya que había sido descrito sin ser designado como una especie holotípica. Décadas más tarde fue renombrado como *Escovopsis* con *E. weberi* y *E. aspergilloides* que eran las especies conocidas, estas establecieron la base para la taxonomía actual de *Escovopsis*.

Las hormigas Formicidae no solo han tenido que lidiar con la presencia del micoparásito *Escovopsis*, sino también con la presencia de patógenos sociales, dentro de los insectos se destacan a la moscas de la familia Phoridae (orden Díptera) parasitando a las hormigas cultivadoras de hongos *Apterostigma dentigerum* en la etapa de su desarrollo de larva, solo existe evidencia de un parasitoide de hormiga en la familia Chloropidae (Díptera) *Pseudogaurax paratolmos* nueva especie que parasita a las larvas de la hormiga *Apterostigma dentigerum*.

Este trabajo tiene como objetivo determinar las características ecológicas de parásitos que atacan a las hormigas cultivadoras de hongos del género *Apterostigma* spp. en Panamá. Donde iniciamos con la observación de los nidos para cuantificar la cantidad de larvas parasitadas, como también la realización de cámaras húmedas para lograr observar los morfotipos del micoparásito *Escovopsis*. La prevalencia de los nidos infectados por *P. paratolmos* fue de 13.1% (n =76 nidos) y una intensidad del parasitismo de 27%. Se lograron aislar morfotipos brown (*Escovopsis*), white (*Escovopsis*) y yellow (*Luteomyces trichodermoides*). Los resultados proponen que la población de *Apterostigma dentigerum* podría verse afectada por la presencia de la mosca *P. paratolmos*, que consume toda la larva de la hormiga para desarrollarse. Estos nidos no solo son parasitados por moscas, sino que también por avispas diapiine, lo que podría representar una amenaza para estas especies con el tiempo, ya que los nidos rara vez alcanzan 100 individuos. Nuevas especies de *Escovopsis* y otros géneros están compitiendo por los recursos de su hospedero, lo que revela una variedad de especies asociadas a las hormigas productoras del género *Apterostigma*.

Palabras claves: *Apterostigma*, Attini, *Escovopsis*, parasitoide, simbiosis.

ABSTRACT

Escovopsis (Hypocreales: Ascomycota), a mycoparasite exclusive to fungus-farming ants of the tribe Attini, consumes the mycelium of the symbiotic fungus until it has completely destroyed the colony. The anamorphic phase of the mycoparasite *Escovopsis* was first described by Muchovej and Della Lucia in 1990 to replace *Phialocladus* Kreisel, 1972, which was considered an invalid genus because it had been described without being designated as a holotypic species. Decades later it was renamed *Escovopsis* with *E. weberi* and *E. aspergilloides* being the only known species, establishing the basis for *Escovopsis* taxonomy.

Formicidae ants have not only had to deal with the presence of the mycoparasite *Escovopsis*, but also with the presence of social pathogens. Among the insects, the flies of the Phoridae family (order Diptera) stand out, parasitizing the fungus-growing ants *Apterostigma dentigerum* at the larval stage of development. There is only evidence of one ant parasitoid in the Chloropidae family (Diptera), *Pseudogaurax paratolmos*, a new species that parasitizes the larvae of the ant *Apterostigma dentigerum*.

This work aims to determine the ecological characteristics of parasites that attack fungus-growing ants of the genus *Apterostigma* spp. in Panama. Where we begin with observation of the nests to quantify the number of parasitized larvae, as well as to create humid chambers to observe the morphotypes of the *Escovopsis* mycoparasite. The prevalence of nests infected by *P. paratolmos* was 13.1% (n = 76 nests) and the intensity of the parasites was 27%. Brown (*Escovopsis*), white (*Escovopsis*) and yellow (*Luteomyces trichodermoides*) morphotypes were isolated. The results suggest that the population of *Apterostigma dentigerum* could be affected by the presence of the fly *P. paratolmos*, which consumes the entire larva of the ant to develop. These nests are not only parasitized by flies, but also by diaprine wasps, which could represent a threat to these species over time, since nests rarely reach 100 individuals. New species of *Escovopsis* and other genera are competing for their host resources, revealing a variety of species associated with the producer ants of the genus *Apterostigma*.

Keywords: *Apterostigma*, Attini, *Escovopsis*, parasitoid, symbiosis.

INTRODUCCIÓN

Las hormigas cultivadoras de hongos (Formicidae: Attini) establecieron a lo largo de su origen y evolución una relación simbiótica con los hongos basidiomicetes, los cuales se convirtieron en su principal fuente de alimento. Dentro de la tribu Attini se encuentra la subtribu Attina con alrededor de diecisiete géneros que abarcan más de doscientas sesenta y cinco especies descritas, todas ellas presentes en el nuevo mundo, distribuyéndose desde las regiones neotropicales hasta la neárticas (Schultz & Brady, 2008). Transformaron su rol de depredadores activos y recolectores especializados de pequeños artrópodos y néctar a practicar una agricultura más ancestral que se conoce por ser a base de un monocultivo de hongo, hace aproximadamente unos sesenta millones de años hasta la actualidad (Mueller et al., 2001).

La evolución de las Attini representa un ejemplo de interacciones simbióticas obligatoria entre las hormigas, su hongo simbiótico (Agaricales: Basidiomycota) y una variedad de comunidad microbiana (las bacterias filamentosas Actinomycetes que se alojan en el exoesqueleto de las hormigas para inhibir el crecimiento de *Escovopsis*). Esta asociación ha generado una serie de modificaciones que han involucrado el comportamiento de las hormigas, conduciendo a cambios en la morfología y en la bioquímica en algunos simbioses (Mueller et al., 1998).

Los actinomicetes producen compuestos antibióticos que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias dañinas, permitiendo a las hormigas mantener sus cultivos sanos y productivos, desempeñan un papel ecológico, principalmente en la biodegradación del suelo. Se ha identificado dos compuestos antifúngicos producidos por los actinomicetos asociados a las hormigas cultivadoras de hongo: un antimicótico que no se conocía anteriormente, la *dentigerumicina*, producida por *Pseudonocardia* aisladas de la hormiga basal *Apterostigma dentigerum* y el antimicótico candicidina especie de *Streptomyces* asociada con la hormiga superior *Acromyrmex octospinosus*. Los actinomicetos simbióticos más estudiados en las hormigas Attini y en su jardín de hongos son: *Pseudonocardia*, *Streptomyces* y *Amycolatopsis*. Esta relación simbiótica es un ejemplo fascinante de coevolución entre microorganismos y animales sociales (Barke et al., 2010).

Las hormigas Attini respaldan un origen único del cultivo de hongo, por lo que ahora sabemos que la mayoría de estas cultivan hongos de la Tribu Leucocoprineae, que consta de dos géneros: *Leucoagaricus* y *Leucocoprinus*, en la familia Lepiotaceae. La única excepción son las hormigas

del grupo *Apterostigma pilosum*, que cultivan hongos relacionados de manera distante con la familia de hongos coralinos Pterulaceae. Así mismo las hormigas Attini han desarrollado cinco tipos de agriculturas basadas en los cultivares de hongo; los grupos G1 (familia Lepiotaceae) caracterizado por las cortadoras de hojas, es practicada por dos géneros *Atta* y *Acromyrmex*, la agricultura inferior que incluye a las Attini ancestrales G3 (Leucocoprineae, Lepiotaceae), la agricultura de coral G2 y G4 Pterulaceae donde encontramos hormigas del género de *Apterostigma pilosum*, la agricultura de levadura G5 (Agaricaceae) que es practicada por especies del género de *Cyphomyrmex*, la agricultura superior mejor conocidas como las no cortadoras de hojas que incluye especies del género *Sericomyrmex* y *Mycetomoellerius* (anteriormente llamada *Trachymyrmex zeteki*) (Weber 1940) (Mehdiabadi & Schultz, 2009; Cárdenas et al., 2022).

La familia Pterulaceae ha despertado un mayor interés tras el descubrimiento de dos simbiontes distintos de hormigas cultivadoras de hongos del género *Apterostigma*. Análisis filogenéticos respaldados con datos morfológicos permitieron una reclasificación de Pterulaceae donde se propone la introducción del género *Myrmecopterula* gen nov. que forma un clado distinto asociado a hormigas Attini, separándose del género *Pterula* que es un clado dentro de la familia Pterulaceae. *Myrmecopterula* se divide en siete subclados que representan a los dos mutualistas: *M. nudihortorum* que se reconoce por la ausencia de velo en el jardín de hongo en los nidos de *Apterostigma*, y pinzas hifales abundantes. Esta especie se le conocía anteriormente como cultivar de hormiga G4, donde solo se conocen del nido de hormigas cultivadoras de hongo del grupo *Apterostigma pilosum* en el subclado *A. manni*. *M. velohortorum* se caracteriza por estar cubierto por un velo micelial, posee una tasa de crecimiento más rápida que *M. nudihortorum*. Esta especie se conocía anteriormente como cultivar de hormiga G2. Solo se le conoce de nidos de hormigas cultivadoras de hongos del grupo *Apterostigma pilosum* en el subclado *A. dentigerum* (Leal et al., 2020; Schultz, 2007).

El género *Apterostigma* fue descrito por primera vez por Mayr (1865) basándose en características de los machos y reinas aladas. Este género se dividió en dos grandes grupos: Grupo *auriculatum*, donde se incluyen: *A. andanse*, *A. auriculatum*, *A. avium*, *A. bolivianum*, *A. chocoense*, *A. depressum*, *A. epinotale*, *A. pariense*, *A. ruburum*, *A. spiculum*, *A. tachirensense*, *A. tholifrome*, y *A. turgidum*. Grupo *pilosum*, que contiene las demás especies de este género y

dentro de este se reconoce el complejo *pilosum*, que abarca una agrupación de nueve especies muy parecidas que no logran ser separadas. Construyen sus colonias en madera podrida, en cavidades del suelo, casi siempre entre las rocas o madera. Algunas especies construyen su colonia en el envés de sus hojas (Villesen et al., 2004; Lattke, 1997). Sus jardines de hongos son una masa esférica blanca cubierta por un velo de micelio, con forma redondeada a elipsoidales, dentro se encuentran las formas inmaduras y la reinas. Las colonias son de poco tamaño y rara vez albergan más de 100 individuos (Armitage et al., 2012). En Panamá se han reportado 12 especies nativas de hormigas cultivadoras de hongos del género de *Apterostigma*: *A. auriculatum*, *A. chocoense*, *A. collare*, *A. dentigerum*, *A. gonoides*, *A. ierense*, *A. manni*, *A. mayri*, *A. pilosum*, *A. robustum*, *A. tramitis*, *A. turgidum* (AntWeb. Version 8.90.1).

Escovopsis (Hypocreales: Ascomycota) es un micoparásito exclusivos de las hormigas cultivadoras de hongos de la tribu Attini, este consume el micelio del hongo simbiote hasta desbistar la colonia por completo, crece dentro del jardín de hormigas y es más abundante en las porciones del fondo (más viejo) de los jardines fúngicos (Mueller et al., 2001). Moller (1893) fue el primero en hacer observaciones en hongos que posteriormente serian clasificados dentro del género de *Escovopsis*. Por su parte *Escovopsis* fue inicialmente descrito como *Phialocladus* por Kreisel (1972), quién aisló una cepa de hongos de un nido de *Atta insularis* en Cuba. Sin embargo en 1990 Muchovej y Della Lucia determinaron que el nombre carecía de validez ya que había sido descrito sin ser designado como una especie holotípica. Fueron estos los que propusieron el nuevo nombre del género *Escovopsis* y designaron a la especie como *Escovopsis weberi* en honor a Neil Weber. Más tarde en 1995 se describe una nueva especie *Escovopsis aspergilloides*. Estas especies establecieron la base para la taxonomía de *Escovopsis*.

La morfología y la colocación de la filogenética no se evaluaron lo suficiente, permitiendo que algunos autores sugirieran que *Escovopsis* pertenecía a los Hypocreales, sin embargo esto solo fue una hipótesis. Uno de los primeros análisis filogenéticos de *Escovopsis* confirmó que este género se colocaría como un clado hermano de los Hypocreales: Hypocreaceae (Currie et al., 2003). Aunque más tarde un análisis filogenético más extenso de las cepas de *Escovopsis* asociadas con jardines de hongos de las hormigas *Apterostigma* indicó que el género pertenece a los Hypocreaceae.

Augustin et al., (2013) lograron enfoques morfológicos y filogenéticos para estudiar más a fondo *Escovopsis*, estos se basaron en secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y ARN ribosómico (LSU). Fueron estos mismos autores quiénes describieron a *Escovopsis lentecrescens*, *E. microspora* y *E. moelleri* que formaron un clado monofilético con *E. weberi* y *E. aspergilloides*. Las características más sobresalientes fueron la presencia de conidióforos con vesículas que soportan las fiálides (a partir de los cuales se producen conidios) y durante 30 años el género se definió por estas características morfológicas. Esto cambio con la incorporación de *Escovopsis trichodermoides* (Masiulionis et al., 2015) y *Escovopsis kreiselli* (Meirelles et al., 2015). Estas especies contenían características distintas como conidióforos sin vesículas y con células conidiogénicas mal diferenciadas (células conidiogénicas determinadas holoblásticas y con arreglo sincrónico, en el caso de *Escovopsis trichodermoides* y células conidiogénicas simpodiales (células conidiogénicas prolíficas holoblásticas, en el caso de *Escovopsis kreiselli* en lugar de fiálides. Los análisis filogenéticos producidos permitieron observar que *Escovopsis* estaba más vinculado con Escovopsioides que comparte características morfológicas muy similares, pero difiere de otras como la presencia de vesículas terminales con fiálides largos e hifas con aleuroconidios que con *E. trichodermoides* y *E. kreiselli* (Augustin et al., 2013).

Montoya et al., (2021) revaluó el género *Escovopsis* y describió los nuevos géneros *Luteomyces* y *Sympodiorosea* gen nov. basado en el color exhibido por las colonias (color beige y amarillo) para *Luteomyces* y tonalidades rosas para *Sympodiorosea*. Este estudio reacomodo a *Escovopsis trichodermoides* en el nuevo género *Luteomyces* y *Escovopsis kreiselli* como *Sympodiorosea* sp. separándolos del género *Escovopsis* (que exhibe el color marrón como característica exclusiva de este grupo).

Nuevas especies del género *Escovopsis* están siendo descritas en la actualidad, al menos unas 14 especies han sido descritas y se han reportado al menos unas 5 en Panamá. Las especies descritas incluyen: *E. weberi*, *E. aspergilloides*, *E. moelleri*, *E. atlas*, *E. pseudoweberi*, *E. catenulata*, *E. longivesica*, *E. primorosea*, *E. microspora*, *E. lentecrescens*, *E. clavatus* y *E. multiformis*. Montoya et al., (2019) describió a *Escovopsis clavatus* y *Escovopsis multiformis* como nuevas especies aisladas del jardín de hongo de *Apterostigma*, siendo una característica distintiva de estos linajes es la presencia de células hinchadas en la base de las ramas de los

conidióforos. Se han reportado coinfecciones por *Escovopsis* en Panamá (Gerardo et al., 2006, Taerum et al., 2007; Taerum et al., 2010; Christopher et al., 2021) en hormigas basales y derivadas.

Montoya et al., (2023) describió nuevas especies de *Escovopsis* aislados de los jardines de hongo de *Apterostigma*: *E. chlamydosporosa*, *E. peniculiformis*, *E. diminuta* y *E. rectangula*. Su forma de dispersión de una colonia infectada a una no infectada no está completamente clara, pero se han descartados algunos métodos de dispersión como: producen esporas húmedas por lo que no se dispersa en el aire, no se encuentra presente en el material de jardín llevado en el bolsillo infrabucal de las reinas fundadoras durante su vuelo nupcial, tampoco se encuentra en los jardines de colonias en desarrollo (Currie et al., 1999).

Por otro lado, las hormigas Formicidae a lo largo de su evolución han tenido que lidiar con la presencia de patógenos de insectos sociales, y muchos de estos han evolucionado junto con sus hospederos. Dentro de los insectos se destacan a las moscas de la familia Phoridae (orden Díptera) y avispas parasitoides (Orden Hymenoptera, Superfamilia Diaprioidea y familia Diapriidae) parasitando a las hormigas obreras en la etapa de su desarrollo de larva. La familia Phoridae contiene la gran mayoría de los casos conocidos de moscas parasitoides de hormiga, solo existe evidencia de un parasitoide de hormiga en la familia Chloropidae (Díptera) *Pseudogaurax paratolmos* nueva especie que parasita a las larvas de la hormiga *Apterostigma dentigerum*, en las etapas de desarrollo de la mosca no se sabe el tiempo entre la eclosión del huevo y el momento en que la larva de la mosca se adhiere a la larva de la hormiga (Quevillon, 2018).

Chloropidae (Díptera) es una de las familias más diversa desde el punto de vista ecológico, con especies que difiere en los hábitos de alimentación de las larvas, incluidas las larvas que son saprófagas, fitófagas, depredadores, cleptoparáitas o parásitas. Algunos Chloropidae están asociados con himenópteros, como aquellos encontrados en las celdas de las arañas (Pompilidae), en abejas sudoríferas (Halictidae). Las larvas de *Pseudogaurax* son depredadores de masas de huevos de arañas, pero también se han reportado en huevos de *mantis*, Lepidóptera y Megaloptera, así como en capullos de Lepidóptera (González et al., 2016).

Los trabajos de Fernández- Marín et al., (2006) y Pérez -Ortega et al., (2010) son las únicas referencias sobre las interacciones de Phoridae en hormigas cultivadoras de hongo, se desconoce

el impacto del parasitismo de *Pseudogaurax* a la población del hospedero, y su prevalencia es menor en comparación con la avispa Diapriidae o las moscas Phoridae que parasitan otras hormigas Attini. *Pseudogaurax paratolmos* es el primer ectoparasitoide conocido de hormigas cultivadoras de hongos y solamente el segundo caso documentado de un díptero ectoparasitoide de larvas de hormigas, esto contribuye a un nuevo ejemplo de adaptación para explotar un grupo taxonómico diverso y numeroso. El descubrimiento de *P. paratolmos* sugiere una posibilidad de cambios químicos y de comportamientos a lo largo de todas las etapas de vida de esta mosca. Las hormigas *Apterostigma* protegen sus crías usando micelio de un hongo simbiote para envolverla y sin embargo las larvas o adultos de *P. paratolmos* parecen superar esta barrera de defensa física, posiblemente mediante camuflaje químico para protegerse. En algunas especies de hormigas productoras de hongo, las obreras no distinguen entre crías parasitadas y no parasitadas.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Determinar la diversidad de *Escovopsis* spp. y ectoparasitoides (Díptera: Chloropidae) que atacan a las hormigas cultivadoras de hongos del género *Apterostigma* spp. en Panamá.

Objetivos específicos

- Cuantificar la prevalencia e intensidad de la mosca parasitoides *Pseudogaurax paratolmos* (Díptera: Chloropidae) de 76 nidos colectados de *Apterostigma dentigerum* durante meses de la estación lluviosa en el Parque Nacional soberanía, sendero de Pipeline Road.
- Determinar la prevalencia del micoparásito *Escovopsis* en los jardines de hongo de los nidos de *Apterostigma* spp. en 167 nidos colectados en el Parque Nacional Soberanía (Sendero de plantación, Pipeline Road, Cerro Ancón y Coiba, sendero de los monos) durante la estación lluviosa.
- Identificar morfológica y molecularmente la diversidad de *Escovopsis* spp. en nidos de *Apterostigma* spp.

HIPÓTESIS

Los nidos de *Apterostigma* spp. infectado por la mosca *Pseudogaurax paratolmos* (Díptera: Chloropidae), no están parasitados por el micoparásito *Escovopsis* spp. mientras que los nidos de *Apterostigma* spp. infectado por las mosca parasitoide *Pseudogaurax paratolmos* (Díptera: Chloropidae), presenta coinfecciones del micoparásito *Escovopsis* spp.

MARCO TEÓRICO

Origen evolutivo de las Attini inferiores

Las hormigas Attini incluyen a las hormigas cortadoras de hongos, también conocidas como hormigas superiores, un grupo muy especializado de hormigas cultivadoras de hongos, son muy conocidas por los efectos sobre la vegetación dentro de los sistemas agrícolas humanos y el gran tamaño de sus nidos (Moreira et al., 2004; Bolton, 2021). Dentro de esta subtribu también están las hormigas cultivadoras de hongos inferiores, no son cortadoras de hojas, practican una agricultura más ancestral que se conoce por ser a base de un monocultivo de hongo, donde utilizan otros sustratos para el cultivo de hongo como, material vegetativo, insectos pequeños y tronco sen descomposición (Mehdiabadi & Schultz, 2009; Ronque et al., 2019).

El estudio de las hormigas inferiores es la base para comprender como se ha desarrollado el origen y evolución de las agriculturas en las hormigas (Mueller et al., 1998; Hanisch et al., 2022). Durante las últimas décadas, se han realizado importantes aportes a la comprensión de la historia y la evolución de las hormigas cultivadoras de hongos inferiores, incluyendo la biología de *Apterostigma megacephala* Latke, siendo esta el único sobreviviente del linaje más antiguo que divergió de todas las demás hormigas *Apterostigma*, hace aproximadamente 39 millones de años, cultivando *Leucoagaricus gongylophorus*, un hongo domesticado que tuvo su origen en los jardines de hongos de las hormigas superiores cortadoras de hojas hace 8-11 millones de años. Morfológicamente *Apterostigma megacephala* conserva una combinación única de características de los dos principales grupos de especies (*auriculatum* y *pilosum*) dentro del género *Apterostigma*. Toda la demás especie conocidas del género *Apterostigma* tienen una fórmula palpal reducida mientras que *A. megacephala* conserva la condición ancestral. La fórmula palpal reducida en *Apterostigma* se consideraba una sinapomorfia para el género, derivada de los parásitos sociales distantes *Pseudoatta argentina* y *Mycocepurus castrator* (Sosa-calvo et al., 2017; Rabeling & Bacci, 2010; Schultz, 2007).

Las Attini están ordenadas en dos clados o linajes: el Neoattina, (un clado Monofilético) que incluye, entre otros géneros, los géneros attinos altamente derivados *Acromyrmex* y *Atta*, conocidos como “hormigas cortadoras de hojas”, Paleoattina (linajes filogenéticamente basales) abarca las Attini inferiores (Mehdiabadi & Schultz, 2009).

Historia Natural

Las hormigas Attini se reproducen a través de vuelos nupciales en los que envían a sus machos y hembras sexuales; luego una reina joven transporta un fragmento del hongo de su colonia y lo coloca dentro de su bolsillo infrabucal. Después del apareamiento la reina inocula un pedazo de micelio que se utilizará para establecer un nuevo jardín de hongo, que cuidará hasta que se desarrollen las primeras obreras que le ayudaran con el cuidado de la colonia, e inician a forrajear por sustrato para crecer el hongo Basidiomycota: Orden Agaricales (Müller, 2002). Las hormigas inferiores suelen fingir la muerte para evitar ser atacadas, enroscan su cabeza y las patas pegadas al mesosoma, y el gástoma (estructura que utilizan para almacenar y transportar micelio de hongo) reflejado ventralmente y metido contra las patas traseras y el mesosoma (Kweskin, 2004).

Agricultura de las Attini

Agricultura inferior

Fue el sistema practicado por las primeras Attini y el sistema que dio origen a las demás formas de agriculturas que existen de las Attini. Cultivan una amplia variedad de especies de hongos pertenecientes a la tribu Leucocoprineae. Incluyen especies de hormigas: *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, algunos *Apterostigma* (el grupo *A. auriculatum*), *Kalathomyrmex*, *Paramyctophylax*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, algunos *Cyphomyrmex* (*C. strigatus* y *C. wheeleri*, *Mycetosoritis* y *Mycetagroicus*). Tienen una amplia distribución geográfica que va desde EE. UU hasta el Sur de Argentina (Schultz & Brady, 2008)

Agricultura de coral

Las hormigas conocidas en este grupo es *Apterostigma pilosum* cultivan hongos lejanamente relacionados a las especies de coral con formar de hilo de la Familia Pterulaceae. El género *Apterostigma* está dividido en dos clados hermanos, en uno están las especies del grupo *Apterostigma pilosum* que cultivan hongos coralinos y el grupo *auriculatum* que cultivan hongo Leucocoprineae. La distribución geográfica de las especies del grupo pilosum se encuentra en hábitat boscosos del Neotrópico desde Argentina hasta México (Villesen et al., 2004; (Munkacsi et al., 2004; Dentinger et al., 2009).

Agricultura de levadura

Practicada por el género *Cyphomyrmex* que se divide en dos grupos, el grupo *Cyphomyrmex strigatus* y *Cyphomyrmex rimosus*. Cultivan jardines de levadura que consisten en masas de nódulos amarillentos de un tamaño de 0.25 – 0.50 mm de diámetro aproximadamente. Estos nódulos son un conjunto de células fúngicas en una fase unicelular en lugar de crecer en una fase multicelular típica de todos los demás jardines de Attini. Son capaces de vivir en vida libre, cuando se encuentran en esta fase, crecen como micelio en la hojarasca y producen cuerpos fructíferos, algo típico de los Leucocoprineaceae (Schultz & Brady, 2008; Mueller et al., 1998; VO et al., 2009). Dependiendo de la especie se pueden encontrar en bosques húmedos y sabanas, playas y hábitat perturbadas por humanos, como pastizales y claros. Su distribución geográfica es muy extendida, va desde el Golfo de Estados Unidos, México, América Central y del Sur de Argentina y el Caribe (Fernández & Sendoya, 2004; Schultz et al., 2002).

Agricultura superior generalizada

Se destacan los géneros *Trachymyrmex* y *Sericomyrmex*, que forma un clado parafilético y que practican un sistema de agricultura especializado distinto al de las cortadoras de hojas, se reconocen nuevos géneros *Mycetomoellerius* gen. n. y *Paratrachymyrmex* gen. n. La distribución geográfica el clado *Sericomyrmex* va desde EE. UU hasta Argentina y, en el caso de *Trachymyrmex jamaicensis*, hasta el caribe. (KEMPF, 1972; Weber, 1972; Mayhé-Núñez & Brandao, 2007; Rabeling et al., 2007).

Agricultura de las cortadoras de hojas

Derivada de la agricultura superior, practicada por los géneros *Acromyrmex* y *Atta*. La distribución geográfica va desde el sur de EE. UU hasta América Central y del Sur y Cuba (Fernández & Sendoya, 2004).

Morfología de las hormigas

Dentro de esta investigación estudiamos tres especies de hormigas del género *Apterostigma*.

Apterostigma auriculatum

Cuello relativamente ancho y largo, sin arista mediana: ojos relativamente grandes y prominentes; prominencia humeral en vista dorsal parece a un lóbulo anguloso; peciolo en vista lateral es triangular con los perfiles dorsoanterior y posterior casi iguales en longitud; lóbulos frontales subcuadrados en vista dorso cefálica (Lattke, 1997).

Apterostigma dentigerum

Lóbulos frontales en vista frontal con fuerte ángulo o lóbulo posterolateral; perfil lateroventral del lóbulo frontal sinusoidal: posteriormente convexo y doblado hacia el dorso, sin ningún encorvamiento ventral. Propodeo en vista lateral con perfil anterodorsal largo y muy gradualmente convexo, posteriormente corto y más curvo. Tiene una amplia distribución en América Central y del Sur (Lattke, 1997).

Apterostigma pilosum

Lóbulos frontales variables según la curvatura posterolateral: subcuadrados, convexos o aproximadamente triangulares, casi nunca puntiagudo. Perfil lateroventral de lóbulos frontales en vista lateral anteriormente cóncava, ligeramente convexo apicalmente recto posterior; más ancho posteriormente y recto posterior; más ancho por un ligero encorvamiento. Pilosidad muy variable, desde ausente hasta ejemplares con abundante pelo (Lattke, 1997).

Características morfológicas de las especies descritas del género *Escovopsis* y *Luteomyces* en *Apterostigma*

Escovopsis clavatus

Descripción morfológica según Montoya et al., (2019):

“Etimología “*clavatus*” hace referencia a la forma clavada de sus vesículas. Crece de 20 a 25°.

Descripción: Conidióforos que forman 2–8 vesículas, a veces con células hinchadas, hialinas, de forma irregular, de paredes lisas, alternas u opuestas, formadas sobre hifas aéreas.

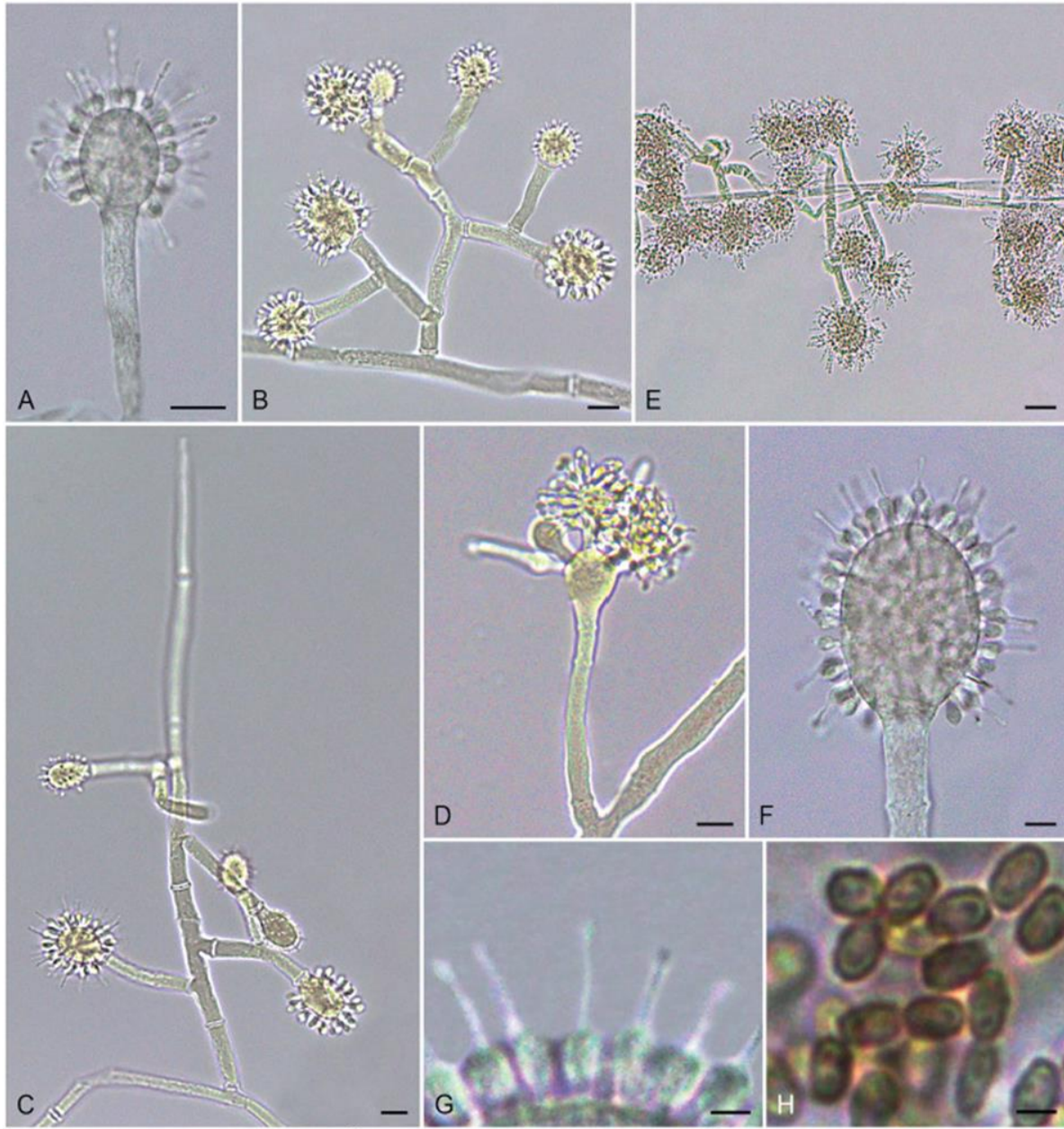


Figura 1. Caracteres morfológicos de *Escovopsis clavatus*. A. Conidióforos monovesiculados. B. Conidióforo polivesiculado. C. Conidióforo con hifa infértil en el ápice. D. Conidióforo con célula hinchada. E. Disposición de los conidióforos sobre micelio aéreo. F. Vesícula clavada con fiálides. G. Fiálides. H. Conidios (Montoya et al.,2023).

Conidióforos monovesiculados 10–50 μm , polivesiculados de hasta 780 μm de largo. Estípites de conidióforos 10–40 $\mu\text{m} \times 5\text{--}8 \mu\text{m}$, con un tabique a 2–9 μm de la célula del pie. El eje del conidióforo suele terminar en una vesícula, a veces en una hifa infértil y con menos frecuencia en una célula hinchada terminal de 10–18 $\times$ 7–9 μm . Las ramas del conidióforo miden entre 16

y 138 μm de largo (generalmente más cortas, a veces tan largas como el eje del conidióforo), formadas en uno o dos niveles, generalmente en ángulos rectos y a veces ligeramente curvadas hacia arriba o hacia abajo, alternas u opuestas. Las células hinchadas forman entre 2 y 4 ramas, de entre 28 y 35 μm de largo, en su mayoría curvadas hacia arriba o con menos frecuencia en ángulos rectos. Los estípites de las ramas miden entre 9 y 38 μm de largo, con un tabique a 2-6 μm del eje del conidióforo. Las vesículas de diversas formas, es decir, globosas, subglobosas, capitadas, ovoides, proladas, espatuladas, predominantemente clavadas, cimbiformes y cilíndricas, de 9 a 27×7 a 20 μm , aseptadas, formadas en las puntas del conidióforo y las ramas. Estípite vesicular 10–30 μm de largo, con dos o seis septos. Fiálides formadas sobre vesículas, 5–8 μm de largo, lageniformes $0,5\text{--}1,5 \times 0,5\text{--}1$ μm en la base, $1,5\text{--}2,5 \times 1\text{--}3$ μm en la sección hinchada, $1,5\text{--}4 \times 0,5$ μm en el cuello. Conidios formados en cadenas, elipsoidales a oblongas, $1,5\text{--}2,5 \times 0,5\text{--}1,5$ μm , de color ocre oliva, con paredes lisas y ligeramente gruesas. Clamidoporas ausentes”

Escovopsis multiformes

Etimología: hace referencia a las diferentes formas de vesículas encontradas presentes. Descripción morfológica según Montoya et al., (2019):

Descripción: Conidióforos que forman 2–9 vesículas, a veces con células hinchadas, hialinas, generalmente de forma irregular, de paredes lisas, alternas u opuestas, formadas sobre hifas aéreas. Conidióforos monovesiculados de 66–130 μm y polivesiculados de 82–290 μm de largo. Estípites de los conidióforos de $16\text{--}56 \mu\text{m} \times 7\text{--}9 \mu\text{m}$, con 1–3 septos, el primer septo a 1–2 μm de la célula del pie. El eje del conidióforo generalmente termina en una vesícula y, a veces, en una célula hinchada de $16\text{--}34 \mu\text{m} \times 9\text{--}20 \mu\text{m}$. Las ramas del conidióforo miden 32–84 μm de largo (generalmente cortas, a veces tan largas como el eje del conidióforo), se forman en uno o tres niveles de ramificación, generalmente en ángulos rectos y a veces ligeramente curvadas hacia arriba, alternas. Las células hinchadas forman 2–6 ramas, de 28–35 μm de largo, en su mayoría curvadas hacia arriba, con menos frecuencia en ángulos rectos. La rama de células hinchadas generalmente termina en una vesícula, pero a veces forma una célula hinchada adicional con 2–4 nuevas ramas. Estípites en las ramas de 22–70 μm de largo, con un septo a 1–2 μm del eje del conidióforo. Vesículas de diversas formas, es decir, globosas, predominantemente subglobosas, capitadas, ovoides, alargadas, espatuladas, cimbiformes y

cilíndricas, de $12\text{--}27 \times 9\text{--}17 \mu\text{m}$, aseptadas, formadas en las puntas del conidióforo y las ramas. Estípites de la vesícula de $22\text{--}70 \mu\text{m}$ de largo, con uno o cuatro septos. Fiálides formadas sobre vesículas, de $6\text{--}10 \mu\text{m}$ de largo, lageniformes, de $1\text{--}2,5 \times 0,5\text{--}1 \mu\text{m}$ en la base, $2,5\text{--}4,5 \times 2\text{--}3,5 \mu\text{m}$ en la sección hinchada, $1\text{--}4,5 \times 0,5\text{--}1 \mu\text{m}$ en el cuello. Conidios formados en cadenas, globosos a oblongos, $2,5\text{--}3,5 \mu\text{m} \times 1,5\text{--}2,5 \mu\text{m}$, de color ocre oliva, con pared lisa y ligeramente gruesa. Clamidosporas ausentes.

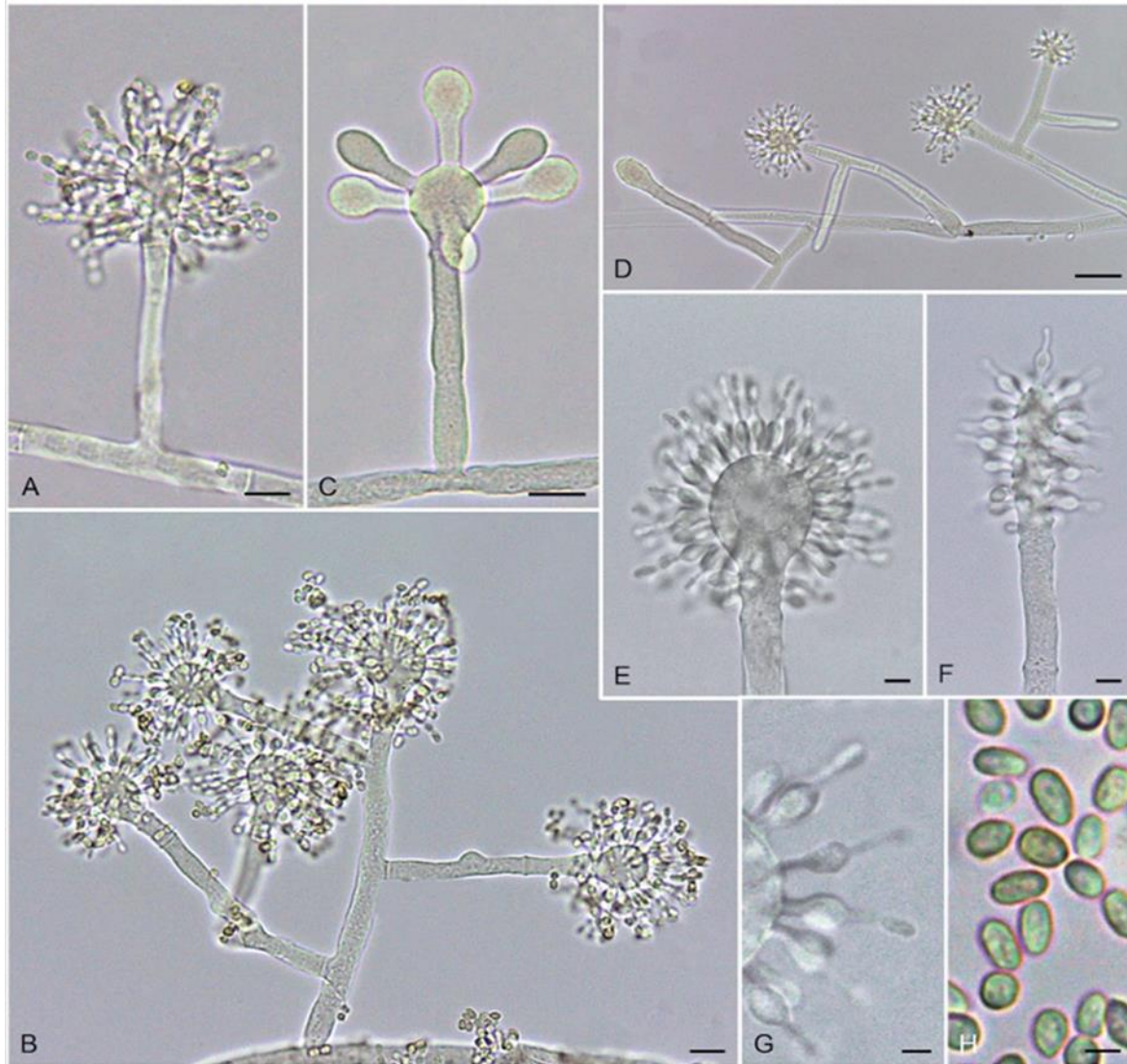


Figura 2. Caracteres morfológicos de *Escovopsis multiformis*. A. Conidióforo monovesiculado. B. Conidióforos polivesiculados. C. Conidióforo con célula hinchada. D. Disposición de los conidióforos sobre micelio aéreo. E. Vesícula capitada con fiálides. F. Vesículas cilíndricas con fiálides. G. Fiálides. H. Conidios (Montoya et al., 2023).

Escovopsis chlamydosporosa

Etimología: “chlamydosporosa” (osa = latín femenino que indica abundancia) en referencia a las abundantes clamidosporas formadas por aislados de esta especie. Descripción morfológica según Montoya et al (2023):

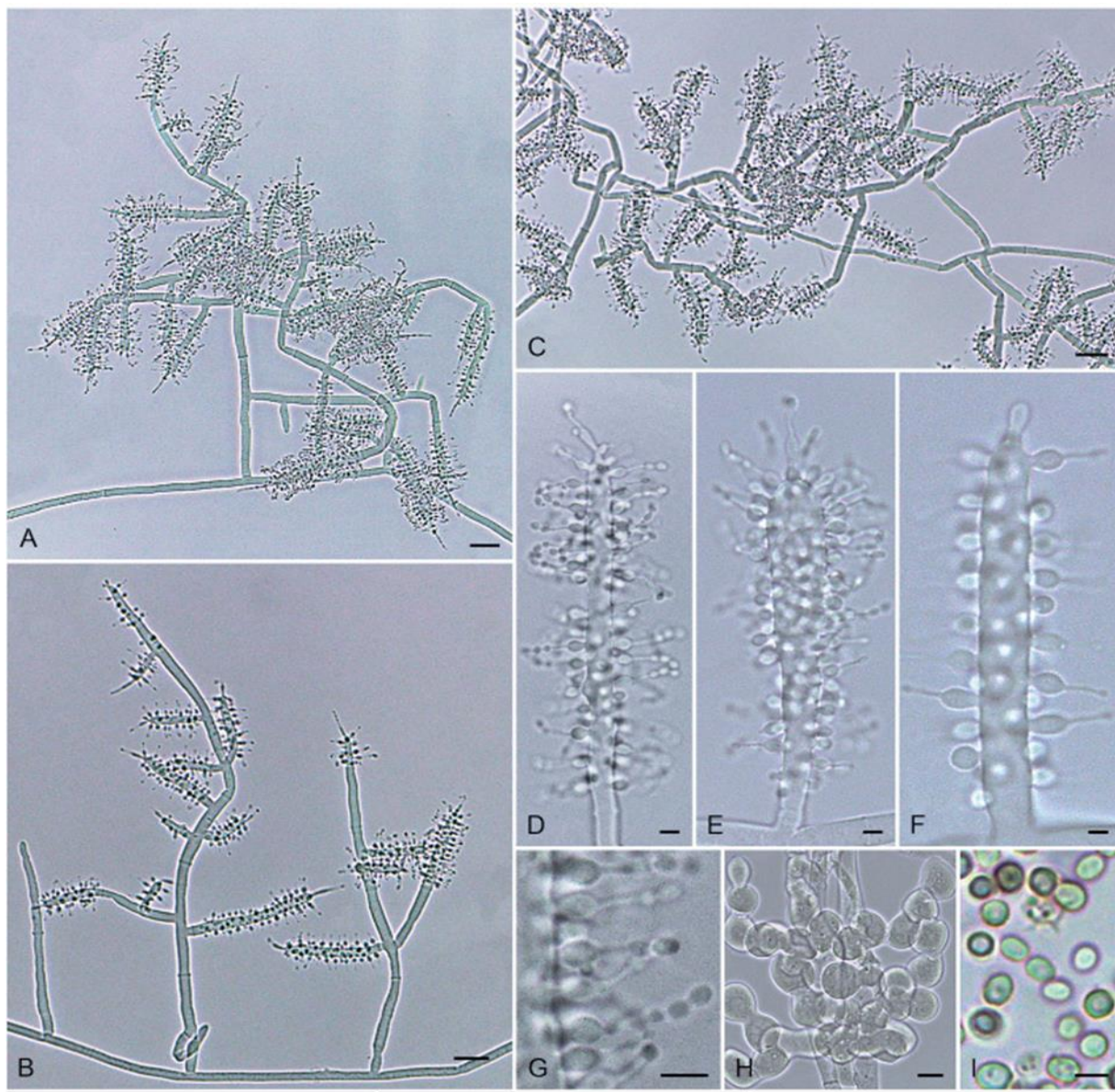


Figura 3. Caracteres morfológicos de *Escovopsis chlamydosporosa*. A, B. Conidióforos polivesiculados. C. Disposición de los conidióforos en micelio aéreo. D. Vesícula cilíndrica septada con fiálides. E. Vesícula clavada con fiálides. F. Vesícula cilíndrica no septada con fiálides. G. Fiálides. H. Clamidosporas. I. Conidios (Montoya et al.,2023).

Descripción: Conidióforos que forman 2–26 vesículas, escasas, delgadas, hialinas, de forma irregular, de paredes lisas, alternas, formadas en hifas aéreas. Conidióforos monovesiculados de 1,5–65,5 μm , polivesiculados de 45,5–380 μm de largo. Estípites de conidióforos de 4–170 $\mu\text{m} \times 3,5\text{--}5,5 \mu\text{m}$, con un septo a 0–6,5 μm de la célula del pie. Ramas de conidióforos de 16,5–97,5 μm de largo, formadas en uno dos niveles, generalmente en ángulos rectos, alternas. Estípites en las ramas de 1–17,5 μm de largo, con un septo a 1–9,5 μm del eje del conidióforo. Vesículas cilíndricas, 20,5–84,5 $\times$ 4–8 μm , predominantemente aseptadas, con menos frecuencia septadas (un septo), formadas en el eje del conidióforo o en el eje de las ramas. Estípites vesicular de 1–17 μm de largo, septado. Fiálides formadas en vesículas, 5,5–10 μm de largo, lageniformes, 0,5–1,5 $\times$ 0,5–1,5 μm en la base, 2–3,5 $\times$ 1,5–2,5 μm en la sección hinchada, 1,5–5,5 $\times$ 0,5 μm en el cuello. Conidios formados en cadenas, subglobosos, 1–4 $\times$ 1–3 μm , de color ocre oliva, con pared lisa y gruesa. Clamidosporas muy comunes, 10–17 $\times$ 8–16 μm , formadas en cadenas sobre micelio aéreo, intercalares.

Escovopsis diminuta

Etimología: “*diminuta*” (diminuta = reducido en tamaño) en referencia al tamaño reducido de los conidióforos. Descripción morfológica según Montoya et al., (2023):

Descripción: Conidióforos que forman 2–8 vesículas, hialinas, de forma irregular, de paredes lisas, alternas, formadas en hifas aéreas. Conidióforos monovesiculados de 22–80 μm , polivesiculados de 52–130 μm de largo. Estípites del conidióforo de 8–73 $\times$ 3,5–8,5 μm , con un tabique a 0–5 μm de la célula del pie. Ramas del conidióforo de 21–61 μm de largo, formadas en un nivel, en ángulos casi rectos, alternas u opuestas. Estípites en las ramas de 3–30 μm de largo, con un tabique a 0,5–10 μm del eje del conidióforo. Vesículas globosas de 17–30 $\times$ 15–30 μm , aseptadas, formadas en las puntas del conidióforo y las ramas. Estípites de 0,5–10 μm de largo, con dos septos. Fiálides formadas sobre vesículas, de 6–9 μm de largo, lageniformes, de 0–1 $\times$ 1–2 μm en la base, 3–5 $\times$ 2–4 μm en la sección hinchada y 2–4 $\times$ 0,5–1 μm en el cuello. Conidios formados en cadenas, oblongos, de 2–3 $\times$ 1,5–2,5 μm , de color ocre oliva, pared lisa y gruesa. Clamidosporas ausentes.

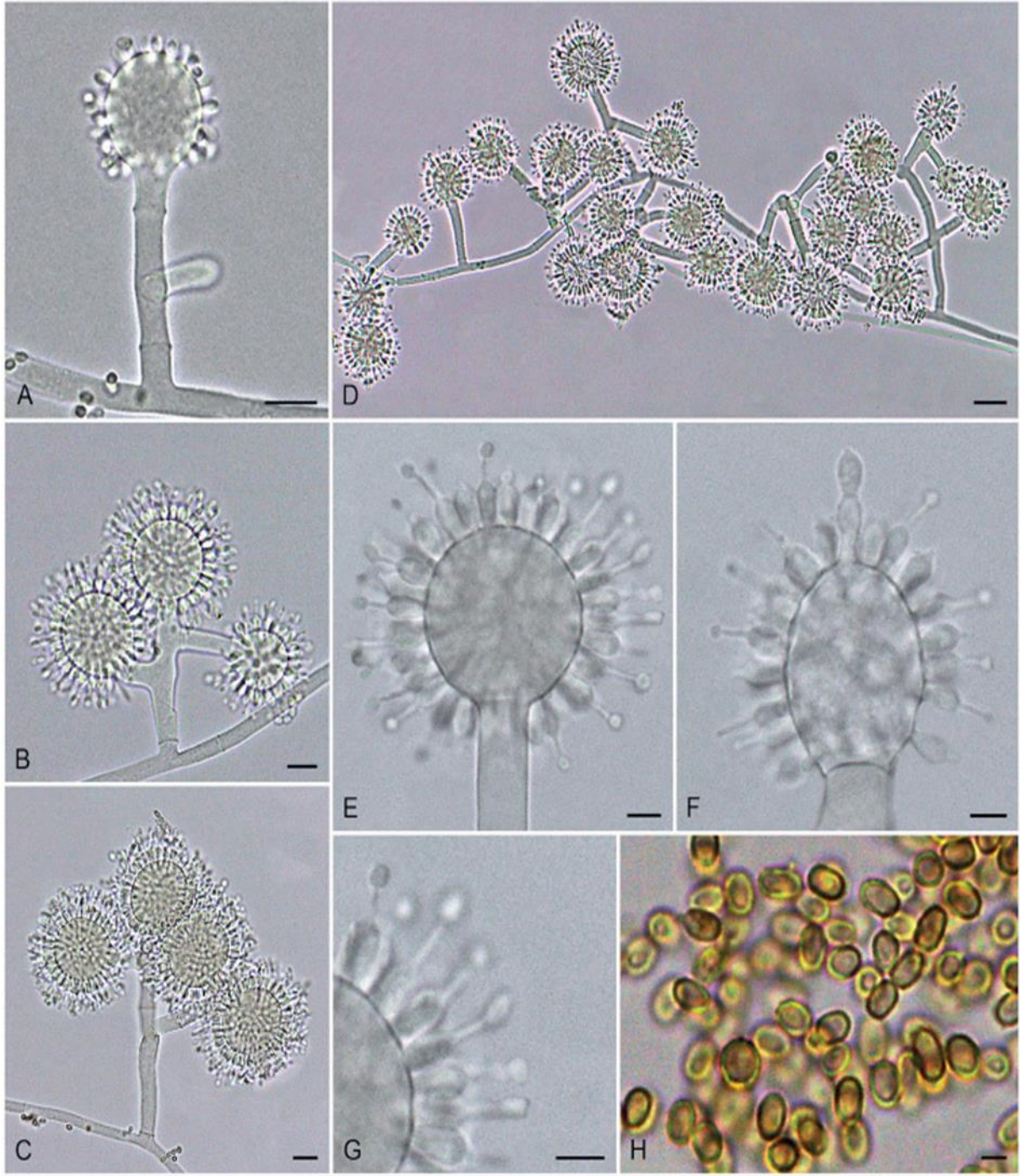


Figura 4. Caracteres morfológicos de *Escovopsis diminuta*. A. Conidióforo monovesiculado. B, C. Conidióforos polivesiculados. D. Disposición de los conidióforos sobre micelio aéreo. E. Vesícula globosa con fiálides. F. Vesícula subglobosa con fiálides. G. Fiálides. H. Conidios (Montoya et al.,2023).

Escovopsis peniculiformis

Etimología: “peniculiformis” (peniculus = plumero, formis = forma) en referencia a la forma de plumero de los conidióforos. Descripción morfológica según Montoya et al., (2023):

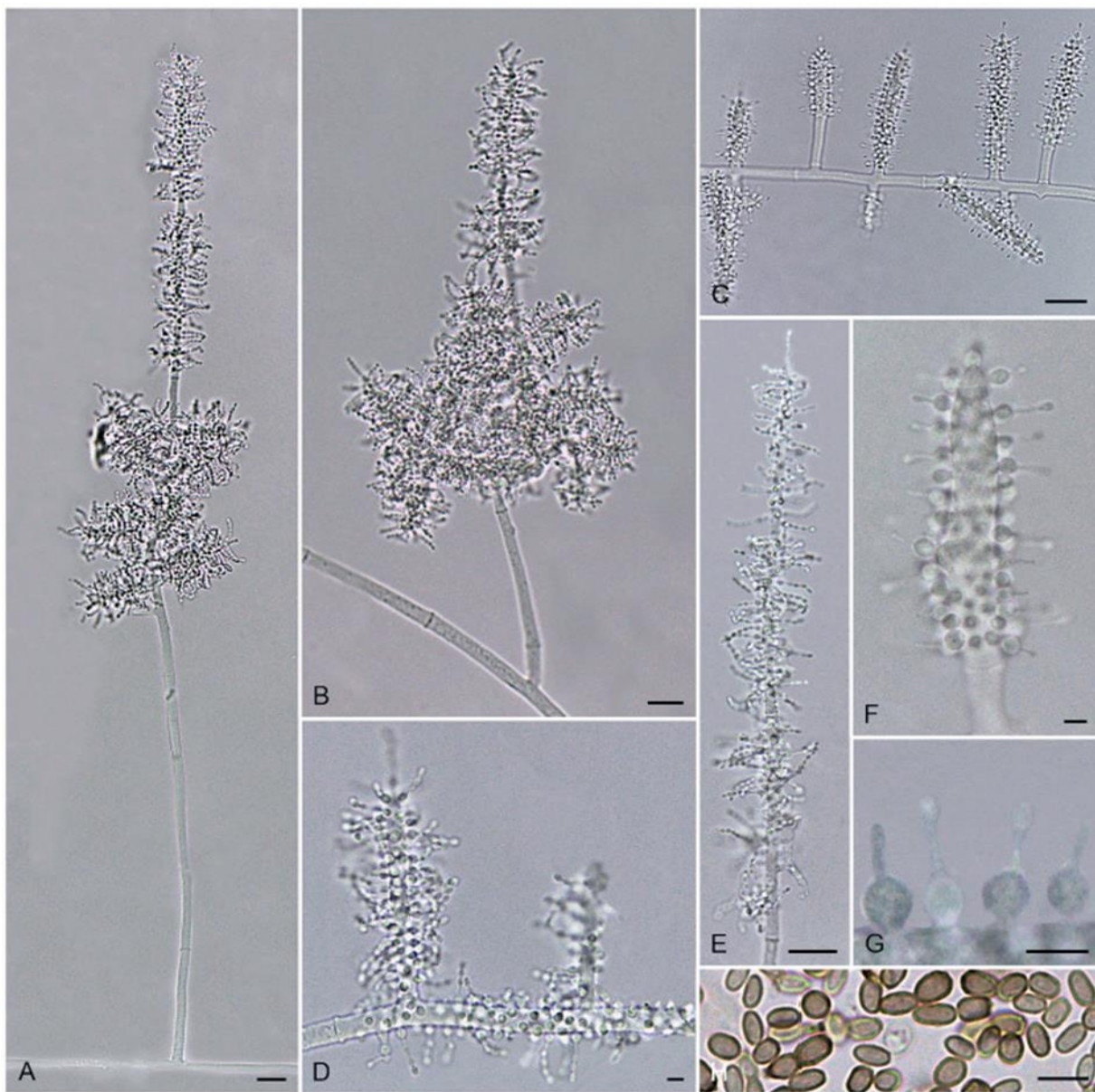


Figura 5. Caracteres morfológicos de *Escovopsis peniculiformis*. A, B. Conidióforos polivesiculados. C. Disposición de los conidióforos monovesiculados sobre micelio aéreo. D. Fiálides sobre vesículas y sobre micelio aéreo. E, F. Vesícula cilíndrica con fiálides. G. Fiálides. H. Conidios (Montoya et al.,2023).

Descripción: Conidióforos que forman 2–25 vesículas, hialinas, generalmente piramidales, de paredes lisas, alternas o con menos frecuencia opuestas, formadas sobre hifas aéreas. Conidióforos monovesiculados de 9–77 μm , polivesiculados de 40–1 380 μm de largo. Estípites de conidióforos de 12– 570 $\times$ 3,5–7 μm , con un septo a 1,5–29,5 μm de la célula del pie. Ramificaciones de conidióforos de 11–86 μm de largo, formadas principalmente por vesículas, rara vez en uno o dos niveles, en ángulos casi rectos, alternas y opuestas. Estípites en las ramas de 1–24 μm de largo, con un septo a 1–9 μm del eje del conidióforo. Vesículas cilíndricas, 12–280 $\times$ 4,5–7 μm , predominantemente aseptadas y con menos frecuencia septadas, predominantemente formadas en el eje del conidióforo, con menos frecuencia en el eje de las ramas. Estípite de la vesícula de 0,5–49 μm de largo, con uno o dos septos. La vesícula terminal es generalmente la más larga y delgada y parece ser una extensión del ápice del conidióforo en lugar de una vesícula. Fiálides formadas principalmente en vesículas y con menos frecuencia en el micelio aéreo, de 4,5–10 μm de largo, lageniformes, de 0,5–1 $\times$ 0,5–1,5 μm en la base, 2–4 $\times$ 1,5–3 μm en la sección hinchada y 1–6 $\times$ 0,5–1 μm en el cuello. Conidios formados en cadenas, elipsoidales, 1,5–3,5 $\times$ 1–2,5 μm , de color ocre oliva, con pared lisa y gruesa. Sin clamidosporas.

Escovopsis rectangula

Etimología: “rectangula” (rectangula = en ángulo recto) en referencia a la forma ligeramente rectangular de los conidióforos formados por cepas de esta especie. Descripción morfológica según Montoya et al., (2023):

Descripción: Conidióforos que forman 2–34 vesículas, hialinas, de forma ligeramente rectangular, de paredes lisas, de forma alternada, formadas en hifas aéreas. Conidióforos monovesiculados de 24–56 μm , polivesiculados de 47–250 μm de largo. Estípite del conidióforo de 2,5–72,5 $\mu\text{m} \times$ 4–6,5 μm , con un septo a 0–12,5 μm de la célula del pie. Ramas del conidióforo de 16,5–220 μm de largo, formadas en uno o dos niveles, generalmente en ángulos rectos, alternas. Estípites en las ramas de 1–87 μm de largo, con un septo a 1–28 μm del eje del conidióforo. Vesículas cilíndricas, 20–58 $\times$ 4–9 μm , predominantemente no septadas, con menos frecuencia septadas (1 septum), formadas en el eje del conidióforo o en el eje de las ramas. Estípite vesicular de 1–12 μm de largo, septado (1 septum). Fiálides formadas en vesículas, de 5–8 μm de largo, lageniformes, 0,5–1 $\times$ 0,5–2 μm en la base, 2–3,5 $\times$ 1–3 μm en la sección

hinchada y $1-5 \times 0,5 \mu\text{m}$ en el cuello. Conidios formados en cadenas, subglobosos, $2-4 \times 1,5-3 \mu\text{m}$, de color ocre oliva, con pared lisa y gruesa. Clamidoporas ausentes.

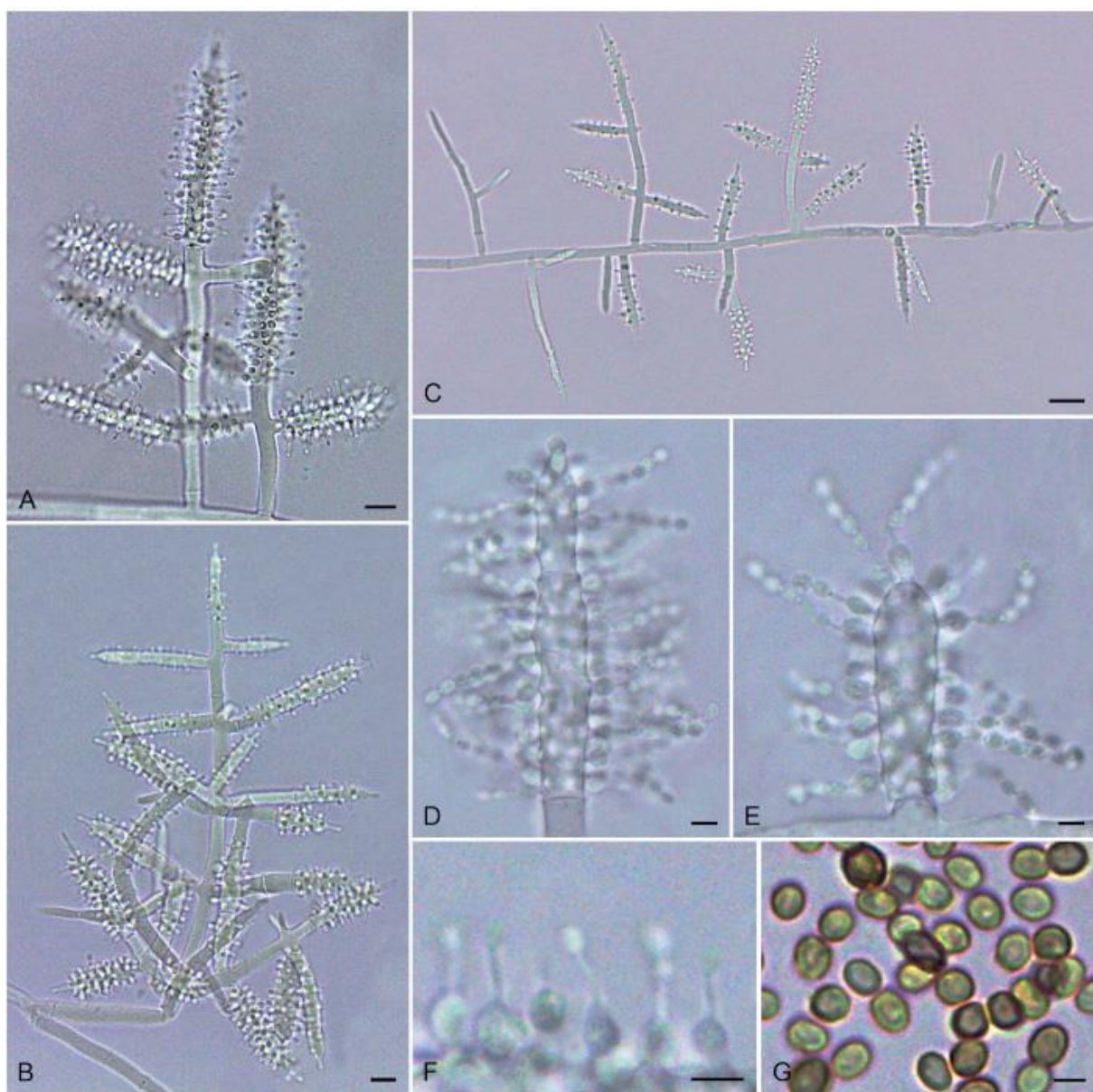


Figura 6. Caracteres morfológicos de *Escovopsis rectangula*. A, B. Conidióforos polivesiculados. C. Disposición de los conidióforos en micelio aéreo. D. Vesícula cilíndrica septada con fiálides. E. Vesícula cilíndrica no septada con fiálides. F. Fiálides. G. Conidios (Montoya et al., 2023).

Escovopsis papillata

Descripción morfológica según Montoya et al., 2019; Masiulionis et al., 2015).

Etimología: “papillata” (papillata = con forma de pezón) en referencia al aspecto en forma de pezón de algunas vesículas inmaduras antes de que formen fiálides.

Diagnóstico: *Escovopsis papillata* suele presentar algunas vesículas que presentan una papila en la parte terminal (en forma de pezón). Esto es más común en vesículas inmaduras cuando estas comienzan a formar las fiálides.

Conidióforos que forman 2–7 vesículas, hialinas, de forma irregular, de paredes lisas, mayormente alternas y menos opuestas, formadas sobre hifas aéreas. Conidióforos monovesiculados de 6,5–116 μm , polivesiculados de 45–170 μm de largo. Estípites de conidióforos de 7–76 $\times$ 3–7 μm , con un septo a 0,5–13 μm de la célula del pie. Ramas de conidióforos de 25–72 μm de largo, formadas en un nivel, en ángulos rectos y menores de 90°, comúnmente opuestas y con menor frecuencia alternas. Estípites en las ramas de 9–84 μm de largo, con un septo a 0–4 μm del eje del conidióforo. Vesículas mayoritariamente obovoides, 18–59 $\times$ 15–31 μm , aseptadas, formadas en las puntas del conidióforo y las ramas. Estípites vesicular de 6,5–115 μm de largo con dos a tres septos. Fialides formadas sobre vesículas, de 5–8 μm de largo, lageniformes, de 0,5–2 $\times$ 1–2 μm en la base, 2,5–5 $\times$ 1,5–3 μm en la célula hinchada y 2–3 $\times$ 0,5–1 μm en el cuello. Conidios formados en cadenas, oblongos, de 2–5 $\times$ 1,5–2,5 μm , de color ocre oliva, pared lisa y gruesa. Clamidosporas ausentes.

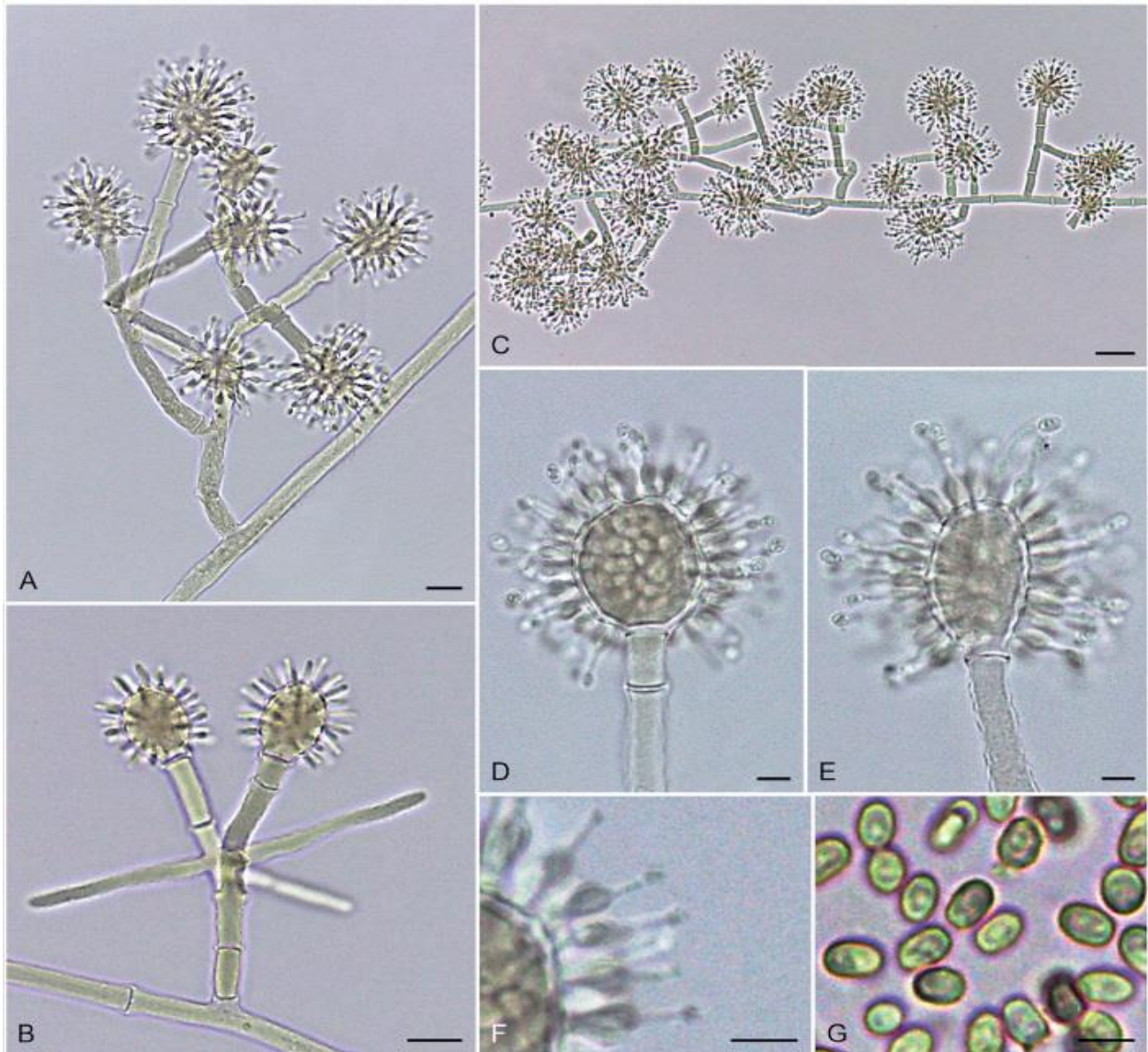


Figura 7. Caracteres morfológicos de *Escovopsis papillata*. A, B. Conidióforos polivesiculados. C. Disposición de los conidióforos en micelio aéreo. D. Vesícula cilíndrica con fiálides. E. Vesícula clavada con fiálides. F. Fiálides. G. Conidios.

Luteomyces trichodermoides

Descripción morfológica según Montoya et al., 2019; Masiulionis et al., 2015).

Los conidióforos carecen de vesículas y son en su mayoría piramidales (muy similares a los de *Trichoderma*). Con uno o con seis niveles cortos de ramificaciones que surgen de ángulos más o menos rectos desde el eje del conidióforo. Esta especie tiene células conidiógenas poco diferenciadas (es decir, células conidiógenas determinadas holoblásticas con disposición

sincrónica, con formas ampuliformes que producen conidios solitarios o hasta tres. Los conidios son subglobosos a obovados, de color marrón amarillento, en su mayoría ornamentados verrugosos y rara vez lisos. Forman vesículas clamidosporas.



Figura 8. Ilustración de las estructuras microscópicas de *Luteomyces trichodermoides*. A Patrón de disposición de los conidióforos sobre el micelio aéreo. B Un conidióforo. C – F Células conidióforas poco diferenciadas (células conidióforas determinadas holoblásticas con disposición sincrónica). G Conidio con ornamentación. H Conidio liso. I Clamidosporas (Montoya et al., 2021).

Parasitoides Phoridae

La definición inicial de “parasitoides” abarca a cualquier organismo cuyas etapas juveniles parasitan un solo hospedero, que servirá como fuente alimento, mientras que los adultos parasitoides viven de forma independiente. Por lo general, las hembras de los parasitoides depositan sus huevos sobre o dentro del cuerpo del hospedero, y uno o más parasitoides pueden desarrollarse en el mismo hospedero. Cualquier fase de desarrollo del hospedero (huevo, larva, ninfa o adulto) puede ser atacada, aunque la mayoría de los parasitoides tienden a preferir una etapa en específica. La larva del parasitoide va matando a su hospedero de manera gradual mientras se alimenta de sus tejidos (Lachaud & Pérez-Lachaud, 2015).

Hasta el momento solo existe evidencia de un parasitoide de hormiga en la familia Chloropidae (Díptera) *Pseudogaurax paratolmos* nueva especie que parasita a las larvas de la hormiga *Apterostigma dentigerum*. Los especímenes de *Pseudogaurax paratolmos* se diferencian de otras especies descritas del género *Pseudogaurax* en el Nuevo Mundo por una combinación de características: presentan un patrón de color escutal con dimorfismo sexual, en su mayoría pleuras torácicas amarillas, patas completamente amarillas y su asociación con nidos de hormigas, algo no observado en otras especies de *Pseudogaurax* (González et al., 2016)

Descripción de *Pseudogaurax paratolmos* Wheeler, 1925.

Machos: por lo general tienen una longitud de 2.5 – 3.3 mm. Parte frontal amarillo- bajo, tan ancho como el ojo a la vista dorsal; triángulo frontal dos tercios tan largos como la parte frontal amarillo brillante, tubérculo ocelar brillante marrón- negro; 8 – 10 largos, fronto -orbitales pálidos; varias setas fronto- orbitales pálidas que incluyen una sola fila de setulas más largas que bordean; setas ocelares más cortas que el ancho del tubérculo ocelar reclinadas; setas externas verticales y no postocelares dos veces más largas que las ocelares, pálidas; la seta vertical interna no se distingue de las setulas circundantes; ojos grandes, densamente peludos; amarillos, altura general de 0.1 veces de altura del ojo, vibrisa, subvibrisal, setas genal anterior larga, pálido; amarillo post- gena, estrecho; amarillo occiputo; cara plana, amarillo pálido; amarillo pedicel, primer flagelómero amarillo, reniforme, más alto que largo, arista marrón, pubescente, setulas más larga tres veces, pálpus amarillo, con setulas distales y ventrales pálidas. Tórax con pronotum distinto en vista dorsal, amarillo pálido; post- pronotum, notopleuron, y margen lateral de escudo amarillo pálido, escudo de color amarillo más oscuro en la región

medial a la intraalar, con una franja marrón media a lo largo de la línea dorsocentral desde justo delante de la sutura hasta el margen posterior, líneas curvadas medialmente por delante del escutelo; setas escutales pálidas, setas pospronotales y notopleurales ligeramente más oscuras; una seta notopleural anterior y dos posteriores; fila de setas prescutelares ligeramente más larga que otras setas escutales; escutelo amarillo con mancha marrón media anteromedialmente, rugoso, con sétulas largas y pálidas; setas escutelares apicales pálidas, divergentes, fuertes, setas escutelares laterales débiles pálidas; pleutritis torácicas de color amarillo pálido, excepto por una mancha anteroventral oscura y brillante en el anepisterno y un ligero sombreado marrón detrás de la base del ala, patas de color amarillo pálido; órgano femoral medio ausente; órgano tibial posterior grande, ovalado, pálido. Ala típica del género; relación del sector costero 1-4: 2.4: 2.75: 1.75: 1, ruptura subcostal indistinta, que aparece como un estrechamiento de la costa, celda c ancha; cabestro amarillo.

Hembras: muy similar al macho, excepto en la longitud total de 2.5 a 4.0 mm. Triángulo frontal con sombreado marrón anterolateral a tubérculo ocular. Escudo amarillo más oscuro lateralmente, con tres rayas marrón- negras que se extienden toda la longitud del escudo; franja mediana estrecha, rayas dorsocentrales al menos el doble de ancho que las franjas medias; las rayas dorsocentrales se expanden lateralmente en un punto marrón; rayas escutales se fusionan posteriormente en una banda prescutelar completa, escutelum con superficie dorsal más ampliamente marrón- negro (González et al., 2016).



Figura.9. *P. paratolmos*, vista dorsal. 1. Macho. 2. Hembra (González et al., 2016).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Identificación y colecta de jardines de hongos.

La colecta de nidos de *Apterostigma* spp. se llevó a cabo en el Parque Nacional Soberanía, específicamente en los Senderos de (Plantation Loop Road y Pipeline Road), Cerro Ancón y La Isla de Coiba (Sendero de los Monos) en la estación lluviosa, entre los meses de mayo, junio, julio y agosto del 2023.

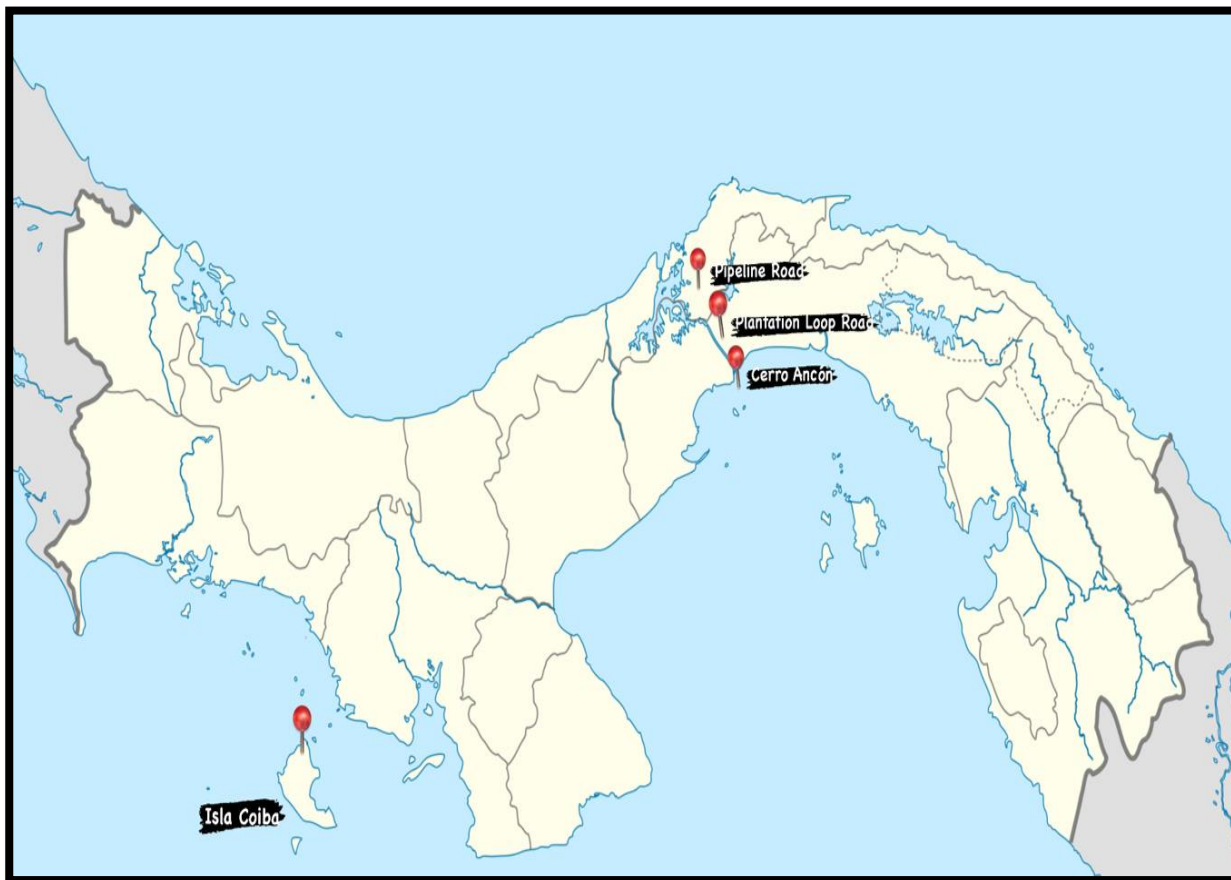


Figura 10. Áreas de Colecta de los jardines de hongo de las hormigas *Apterostigma* spp.

La identificación de los nidos en el campo se realizó mediante observación en cavidades del suelo, hojarascas, madera en descomposición leñosa, en el envés de las hojas y a rocas. Sus jardines de hongos son una masa esférica blanca cubierta con un velo de micelio de consistencia algodonosa siempre colgando. Sus colonias son de poco tamaño y rara vez albergan más de 100 individuos. Suelen estar en cavidades del suelo oscuras entre los 5.0 cm de profundidad, no

obstante, para una mejor identificación fue necesario utilizar linternas para su visualización (Villesen et al., 2004).

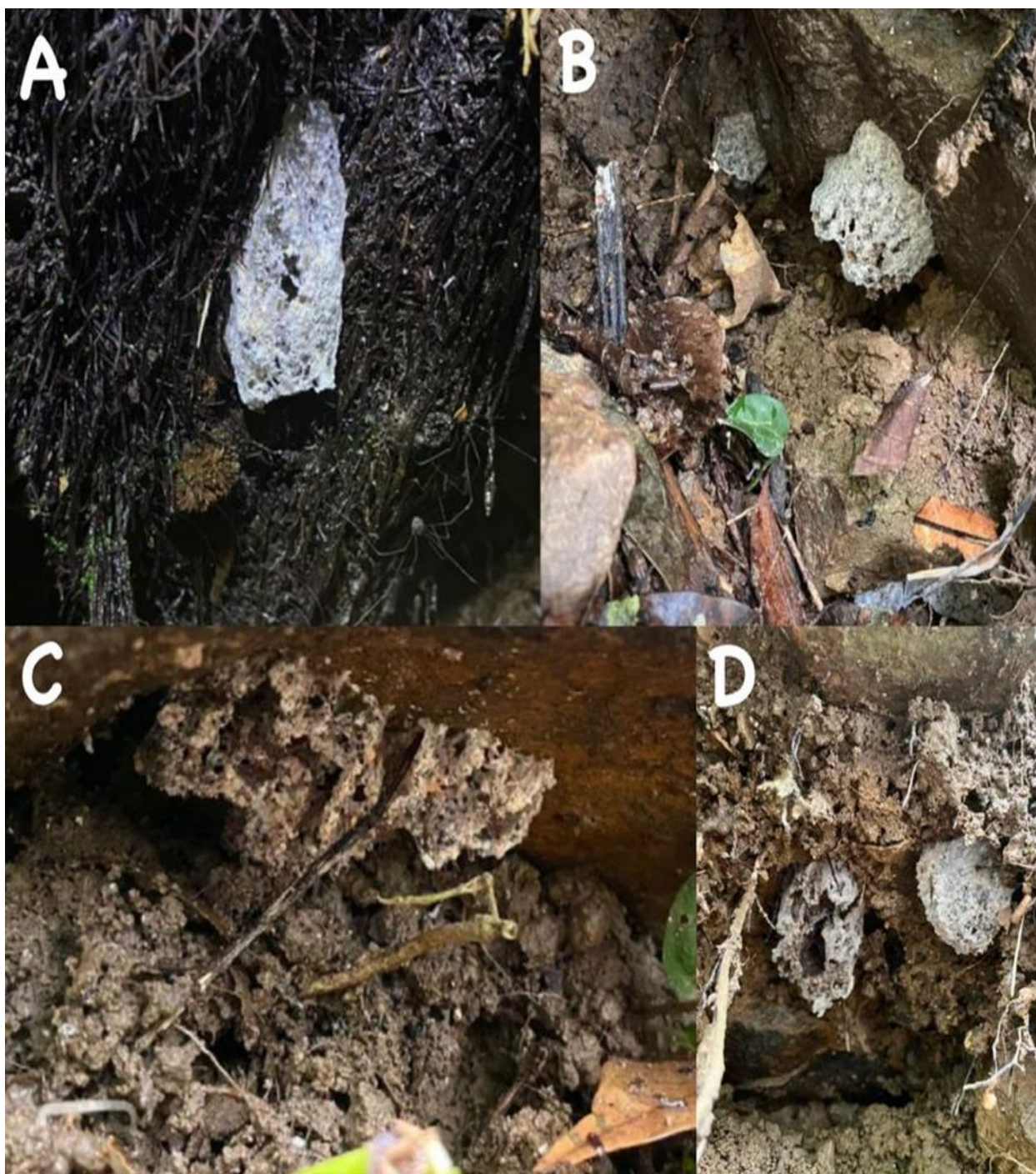


Figura 11. Diferentes sustratos de los nidos de *Apterostigma* spp. A. Nido de *Apterostigma dentigerum* con presencia de velo micelial adheridos a madera en descomposición; B-D. nidos adheridas a rocas, C. Nido de *Apterostigma pilosum* adheridos a roca.

Se colectaron 167 nidos de hormigas cultivadoras de hongos del género *Apterostigma* spp. utilizando cucharas de metal y pinzas para la extracción del jardín fúngico. Cada instrumento fue previamente desinfectado y flameado en mecheros de alcohol. Seguido a esto el jardín fúngico fue colocado en platos Petri limpios de (60 x 15 mm y 100 x 15 mm) para mantener la humedad se le colocó papel kimwipes con agua destilada alrededor, fueron cerrados y rotulados, tomando las coordenadas de cada uno de los jardines y guardados en una caja de cartón.

Transporte y cuidado de los nidos

Los nidos fueron transportados en una caja de cartón al laboratorio de insectos sociales del Intituto De Investigación Científica Y Servicios De Alta Tecnología De Panamá (INDICASAT-AIP), se cambiaron a platos limpios, donde se eliminó residuos grandes de tierra, pedazos de madera. Fueron alimentadas dos a tres veces a la semana con avena triturada. Igualmente, el jardín de hongo se mantuvo humedecido con papel kimwipes remojado con agua destilada auto clavada para evitar cualquier tipo de contaminación, además se limpiaron las colonias para evitar posible contaminación por los desechos producidos por las mismas.

Registro de datos demográficos de los nidos de las hormigas del género *Apterostigma* spp.

Usando un estereomicroscopio Leica (10x), se registraron datos demográficos de cada nido incluyendo la cantidad de huevos, pupas, reinas, obreras, hembras aladas y machos, larvas sanas y larvas ectoparásitas. Se peso el jardín de hongo y se observó cada cría cuidadosamente. Se busco y en el jardín de hongo larvas de moscas ectoparasitarias unidas a larvas de hormigas, que eran fácilmente visibles, pre-pupario o pupario y se cuantificó.

Las larvas de las hormigas sanas son blancas. Las larvas ectoparásitadas por mosca estaban fuertemente segmentadas con una coloración oscura y con forma de frijol con una superficie lisa. Las moscas adultas recién emergidas fueron atacadas por las obreras hasta matarlas. La identificación de la mosca se realizó de acuerdo a los criterios descritos por Gonzáles et al., 2016.

Se registraron datos sobre la prevalencia e intensidad de los parasitoides. La prevalencia: es el porcentaje de nidos parasitados por moscas, mientras que la intensidad: es el porcentaje de larvas infectadas por el total de larvas de hormigas dentro de los nidos atacados. Para medir la prevalencia e intensidad se tomaron solo en consideración los nidos colectados y parasitados del sendero de Pipeline road.

Prevalencia del parasitismo

$$\frac{\text{Nº de nidos colectados con mosca parasitoides}}{\text{Nº total de nidos colectados}} \times 100\%$$

Intensidad del parasitismo por nido

$$\frac{\text{Nº de larvas parasitadas}}{\text{Nº total de larvas}} \times 100\%$$

Para identificar las hormigas del género *Apterostigma* se utilizaron las claves taxonómicas: Clave para la identificación de las subfamilias y los géneros de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de Costa Rica y la revisión del género *Apterostigma* Mayr (Hymenoptera: Formicidae (Lattke, 1997)).

Para esto se conservaron algunos ejemplares en dos secciones: una parte seca con los ejemplares montados en alfileres que se utilizaron para fotografiar y previamente identificar a las hormigas, una parte húmeda: con ejemplares inmersos en etanol al 95% separados (huevos, pupas, reinas, obreras, hembras aladas y machos, larvas sanas y larvas ectoparasitadas por moscas y pupario de moscas).

Aislamiento de *Escovopsis* spp.

Para el aislamiento de *Escovopsis* spp. se extrajo una pequeña porción de jardín fúngico, se le retiraron las hormigas y se colocó en platos petri de (60 x 15 mm y 100 x 15 mm) creando a su alrededor una cámara húmeda (papel kimwipes humedecido con agua destilada) y sellados con parafilm. Se incubaron a una temperatura de 25-37°C durante 5 a 7 días hasta ver crecimiento de micelio fúngico. En una cabina de seguridad, utilizando un asa y agujas, se tomó una pequeña cantidad de micelio que se colocó en el centro de un plato petri que contenían Agar PDA (Agar Papa-Dextrosa) sin antibióticos y sellados con parafilm. Los platos fueron incubados en total oscuridad a una temperatura de 25-37°C durante 5 a 10 días. Se monitorearon diariamente para visualizar su crecimiento y tener cultivos libres de contaminantes.

Se tomaron datos de la presencia-ausencia de *Escovopsis* para analizar la prevalencia e intensidad del micoparásito en los nidos, así como también el color de los morfotipos. La prevalencia: es el porcentaje de nidos infectados por *Escovopsis* spp. Para analizar la prevalencia de *Escovopsis* spp se colectaron 167 nidos, distribuidos en 4 sitios distintos (los Senderos de Plantation Loop Road y Pipeline Road, Cerro Ancón y Sendero de los Monos en Coiba).

Prevalencia de *Escovopsis* por sitio de colecta

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de nidos parasitados por } Escovopsis \text{ spp.}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de nidos colectados}} \times 100\%$$

Prevalencia de los morfotipos de *Escovopsis* por meses de colecta (mayo, junio, julio y agosto).

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de nidos infectados por morfotipo y mes de colecta}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de nidos colectados por sitio}} \times 100\%$$

Identificación por microscopia óptica

Para visualizar los caracteres microscópicos como su morfología se realizaron microcultivos que consistieron en preparar una cámara húmeda, en el fondo se le colocó agua estéril con papel kimwipes, sobre este se colocó portaobjetos y encima bloques de medio de cultivos PDA, que se obtuvieron utilizando un sacabocados. Sobre el bloque de PDA se inoculó micelio de *Escovopsis* con un asa estéril y se le colocó un cubreobjeto encima, fueron sellados con parafilm e incubados por 5-7 días a temperatura de 25°C en total oscuridad. Una vez finalizado el período de incubación, con una pinza se tomó el cubreobjeto y se colocó sobre un portaobjetos limpio con una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio óptico Olympus Life Science modelo BX 53 con objetivos de 10 x, 40x y 100 x. La identificación se realizó de acuerdo a los criterios descritos por (Montoya et al., 2019; Montoya et al., 2023).

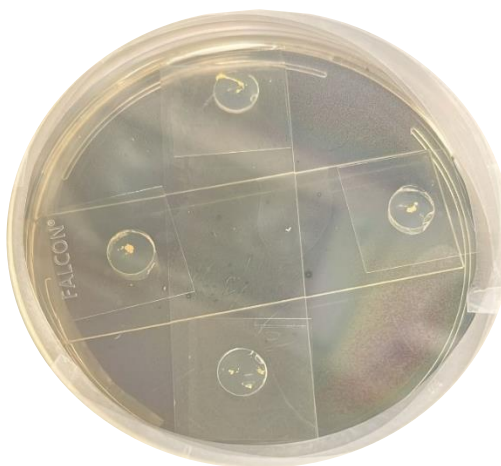


Figura 12. Microcultivo de *Escovopsis* spp. para visualizar sus estructuras.

Criopreservación en Glicerol

Para conservar los ejemplares de *Escovopsis* spp. se utilizaron tubos de criopreservación de 1.8 mL que fueron llenados con 1.5 mL de glicerol al 75%, y luego se introdujo en ellos trozos de agar de ~ 1.5 cm² con micelio de *Escovopsis* y se preservaron en congeladores a una temperatura de -80°.

Identificación molecular de *Escovopsis* spp.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se tomó como referencia el protocolo de extracción a base de CTAB modificado de Moller et al., (1992), se tomó micelio de aproximadamente 3 cm² de micelio proveniente de los platos petri con cultivo axénicos del micoparásito *Escovopsis*, con un pistilo se tomó micelio y fue colocado en un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL. Luego se añadió 500 µL de CTAB (TEKNOVA), posteriormente se macero con un pistilo hasta obtener una mezcla homogénea. Los tubos fueron incubados a 65°C durante 30 minutos. En el baño seco (Labnet International, Inc). Trascurrido los 30 minutos se agregó 400 µL de fenol cloroformo isoamílico, invirtiendo suavemente varias veces el tubo para homogeneizar la muestra, para luego ser llevada a la microcentrífuga (Thermo |EC) a 14 000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente en tubos nuevos de 1.5 ml se transfirieron 250 µL de sobrenadante y se añadieron 250 µL de isopropanol frío (SIGMA ALDRICH) y se incubaron por una hora a temperatura de -20°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugo a 14 000 rpm por 7 minutos. Se descarto el isopropanol y se realizó un lavado con 800 µL de etanol al 70% seguido de una centrifugación a 14 000 por 1 minuto. Después se descartar el etanol, y los tubos se dejaron secando a temperatura ambiente aproximadamente por 1 hora. El pellet que estaba contenido en el fondo del tubo de 1.5 ml se resuspendió en 30 µL de agua ultrapura de grado molecular, luego se cuantificó el ADN extraído, utilizando el NanoDrop, tomando en cuenta la medida de concentración de ácidos nucleicos y la medida de radio de longitud de onda de 260/280. Los tubos con el ADN fueron almacenados a -20°C.

Identificación de *Escovopsis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron los espaciadores ITS (espaciador interno transcrito) de la región ITS1 y ITS2 del gen ribosomal 5.8S. De acuerdo con Begerow et al., (2010), región utilizada con frecuencia como marcador molecular en hongos para determinar el nivel de especie. Los cebadores

utilizados para la detención de Escovopsis fueron: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT GCT AAC AAG G-3') ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (White et al., 1990).

Para los volúmenes de cada reacción de PCR se usó un volumen total de 25 µL, distribuido de la siguiente manera: 5.0 µL de Qsln, 12.25 µL de H₂O, 0.5 µL de primer 10x (Forward/ reverse), 0.25 µL Taq DNA polimerasa, 2.5 µL de Buffer 10x, 0.5 µL de dNTPs 10mM, 3.0 µL de MgCl₂, 0.5 y 0.5 de ADN de muestra (Meirelles et al., 2015).

Para las condiciones de reacción de PCR que se efectuaron en el termociclador para ITS 4/5 fueron las siguientes: 3 minutos de desnaturalización a 96°C, por 35 ciclos de 1 minuto por 94°C, 1 minutos por 55°C y 2 minutos de extensión a 72°C (Christopher et al., 2021; Meirelles et al., 2015). Para ITS 1/4 fueron las siguientes: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 0.30 s a 95°C, 0.30 s a 60°C y 1.3 minutos a 72°C y una extensión de 72°C por 10 minutos (Agustin et al., 2013).

La visualización de las bandas genómicas mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de las bandas, se preparó un gel de agarosa al 2%, donde se pesó 0.8 g de agarosa, diluido en 40 mL de TAE 1x, teñido con 2 µL tampón SYBR. Cada pocillo fue cargado con 2 µL de producto de PCR más 0.8 de gel pilot loading Dye 5x. Uno de los pocillos fue cargado con 0.7 µL de marcador molecular, luego de cargar todas las muestras, se corrió el gel por 40 minutos a 80V en la cámara de electroforesis. La visualización de las bandas genómicas se realizó usando el equipo de transiluminación (BIO RAD ChemiDoc Imaging System).

Purificación del producto de PCR amplificado (QIAGEN)

Este ensayo se hizo siguiendo el protocolo del QIAquick PCR Purification Kit. Se midió el volumen total de cada uno de los tubos y se multiplico por 2, dicho resultado fue el volumen agregado de Buffer PB, y se mezcló vigorosamente con el producto de PCR. Luego se transfirió a una columna de 2 mL y se centrifugo a 10 000 rpm por 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se reinserto la columna nuevamente al tubo, se le añadió 650 µL de buffer (W1) y se centrifugo por 2-3 minuto por 14 000 rpm. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se reinserto en un tubo de 1.5 mL, seguido se agregó 30 µL de agua molecular y se incubo a 37°C por 30 minuto. Pasado este tiempo se centrifugo por 2 minutos por 14 000 rpm, se descartó la columna y se

cuantifico el ADN contenido en el tubo de 1.5 mL. Los tubos con el contenido purificado fueron guardados a -20°C para su uso a largo plazo.

Secuenciación del ADN

Luego de la purificación, se procedió a medir el volumen de cada uno de los tubos y se dividió entre 2. Ya dividido el volumen de ADN en tubos de 1.5 mL, se le añadió 5 µL de primer 10X correspondiente F (forward) y R (reverse). Estas muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur para su posterior secuenciación. Una vez obtenido los resultados, se realizaron análisis de identidad utilizando el software Geneious para editar, alinear y compararla las secuencias obtenidas con la base de datos genómicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS

Identificación y colecta de nidos

Se colectaron 167 nidos de hormigas cultivadoras de hongos del género *Apterostigma* spp. dentro y en los alrededores del Parque Nacional Soberanía, específicamente en los Senderos de (Plantation Loop Road y Pipeline Road), Cerro Ancón y La Isla de Coiba (Sendero de los Monos) en la temporada lluviosa entre los meses de mayo, junio, julio y agosto del 2023.

En el sendero de Plantation Loop Road se colectaron 77 nidos, sendero de Pipeline Road 76 nidos, en Cerro Ancón 10 nidos y en Coiba (Sendero de los monos) 4 nidos.

Los nidos eran pocos profundos, la mayoría de ellos colgando debajo de las hojas, dentro de cavidades del suelo y de árboles y cubiertos de velo micelial característico de *Apterostigma dentigerum*, *Apterostigma pilosum* y *Apterostigma auriculatum* se reconoció por la ausencia de velo micelial, localizo debajo de troncos en descomposición. Se colectaron 165 nidos de *Apterostigma dentigerum*, solo un nido de *Apterostigma pilosum* y uno nido de *Apterostigma auriculatum*.

Identificación de las especies de *Apterostigma* colectadas

Se lograron identificar tres especies distintas de *Apterostigma* (*A. dentigerum*, *A. pilosum*, *A. auriculatum*) en el laboratorio utilizando la clave para la identificación de las subfamilias y los géneros de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) de Costa Rica (Gutiérrez, 2014) y la revisión del género *Apterostigma* Mayr (Hymenoptera: Formicidae (Lattke, 1997)).

Estas pertenecen a la familia Myrmicinae y una de las característica del género de *Apterostigma* es: dorso pronotal inerme o con pequeños tubérculos irregulares. Unión entre el pronoto y el mesonoto marcadamente estrecho en vista lateral. Su superficie dorsal del nodo del peciolo inerme.

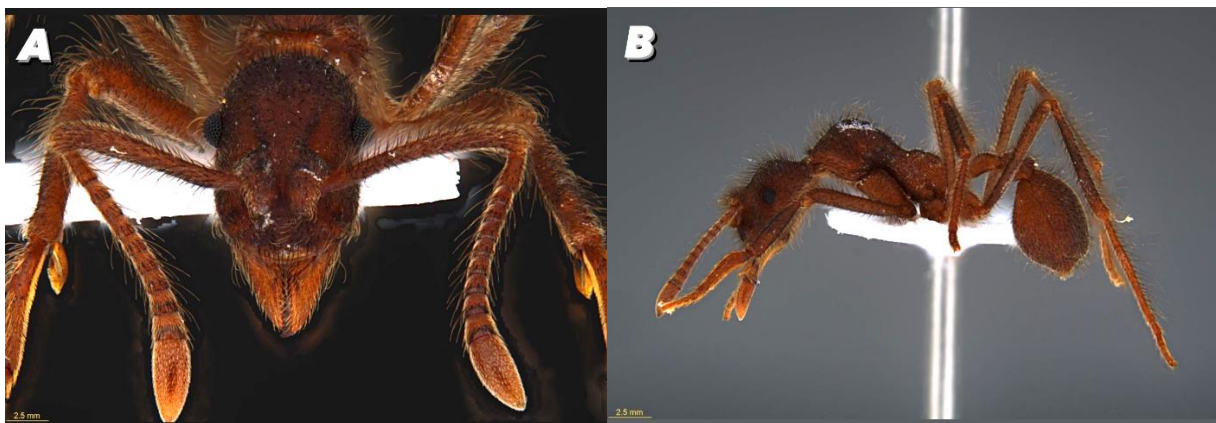


Figura 13. A. *Apterostigma dentigerum* en vista frontal. B. vista lateral.



Figura 14. A. *Apterostigma pilosum* en vista frontal. B. vista lateral.



Figura 15. A. *Apterostigma auriculatum* en vista frontal. B. vista lateral.

Registro de datos demográficos de los nidos de las hormigas del género *Apterostigma*

Solo se tomaron los datos demográficos de los nidos colectados en el Parque Nacional Soberania (Sendero de Pipeline Road) entre los meses de mayo, junio, julio y agosto del 2023 de *Apterostigma dentigerum* en la temporada lluviosa.

Tabla 1. Datos demográficos de los nidos de *Apterostigma dentigerum* parasitados por *P. paratolmos* en el 2023.

Código de nido	Peso del jardín (gramos)	Obreras	Reina	Huevos	Larvas Sanas	Larvas Parasitadas	Total de larvas	Pupas	Aladas Hembras	Aladas Machos	Total de individuos
20230526-APT33	0.06	6	0	0	1	1	2	0	0	0	8
20230609-ATP53	0.66	6	0	0	0	1	1	4	2	1	14
20230609-ATP60	0.89	19	0	1	0	1	1	2	1	0	24
20230609-ATP62	2.68	30	1	0	1	2	3	1	0	0	35
20230609-ATP69	1.78	28	0	0	7	1	8	1	0	0	37
20230609-ATP70	0.87	2	0	0	0	4	4	1	0	0	7
20230609-ATP71	0.44	13	0	0	0	2	2	0	0	0	15
20230717-APT83	0.6	2	1	1	2	2	4	0	0	0	8
20230717-APT93	0.45	8	0	1	2	1	3	1	1	1	15
20230814-APT130	0.87	13	0	0	1	2	3	2	0	0	18

Fueron encontrados 10 nidos parasitados por moscas en el estadio de pupario; las mismas fueron cuidadas durante el tiempo de eclosión, ya que las hormigas no son capaces de reconocer si se trata de una larva sana o una larva parasitada, si no hasta el momento que emerge la mosca, estadio donde es inmediatamente detectada por las obreras y eliminada del nido. Se desconoce el mecanismo que utilizan para no ser detectadas durante su desarrollo. Un total de 17 larvas parasitadas se logra cuantificar entre las fases de pre-pupario y pupario. Solo cuatro de estas moscas lograron emerger, pero fueron inmediatamente atacadas por las obreras. Los ejemplares capturados fueron guardados en etanol al 95% en tubos eppendorf de 1.5 ml.

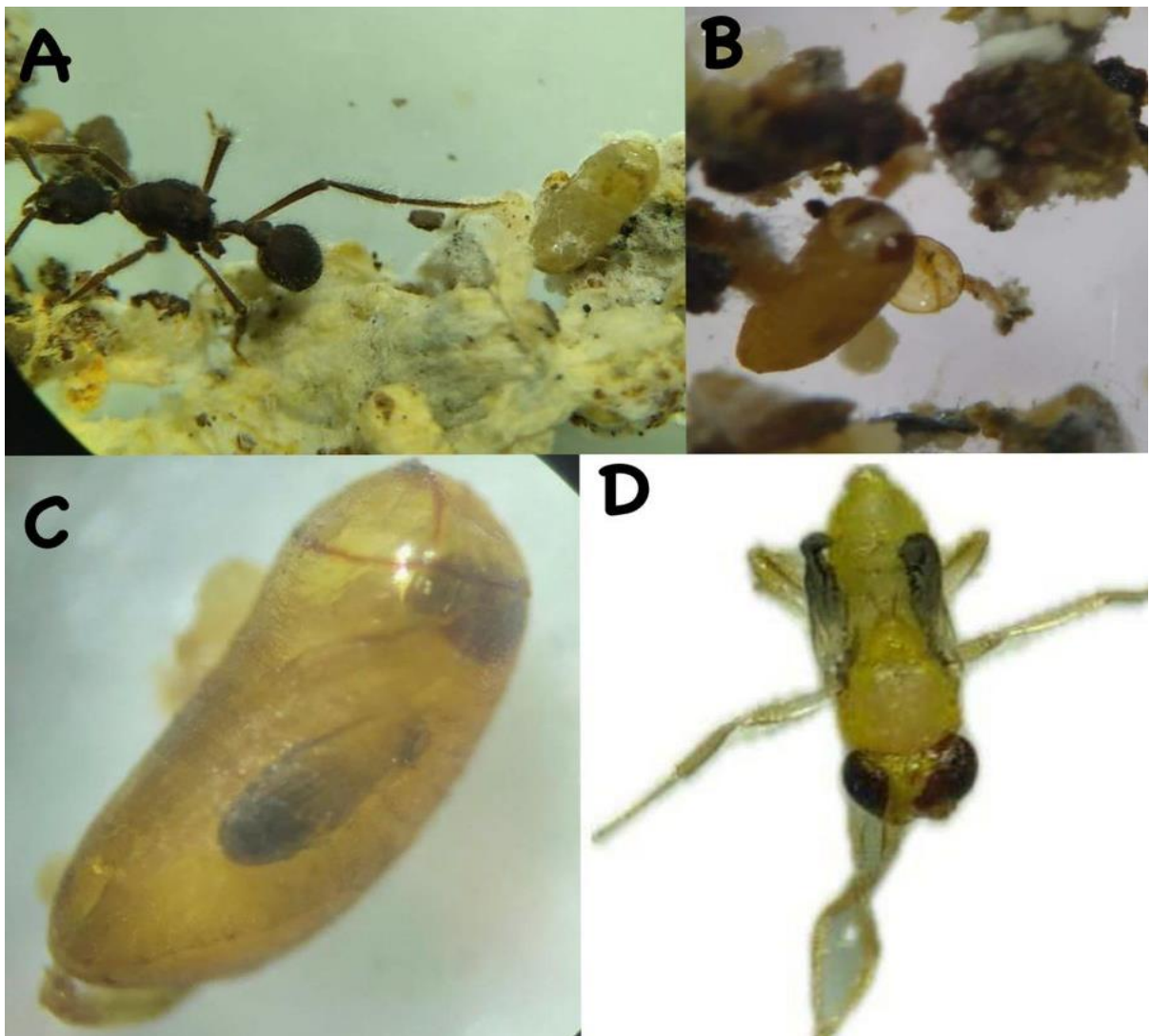


Figura 16. A. Reina cuidando un pre-pupario. B. Mosca saliendo del pupario. C. Pupario de *P. paratolmos* (Chloropidae). D. Juvenil macho de *P. paratolmos*.

Prevalencia del parasitismo en nidos de *Apterostigma dentigerum*

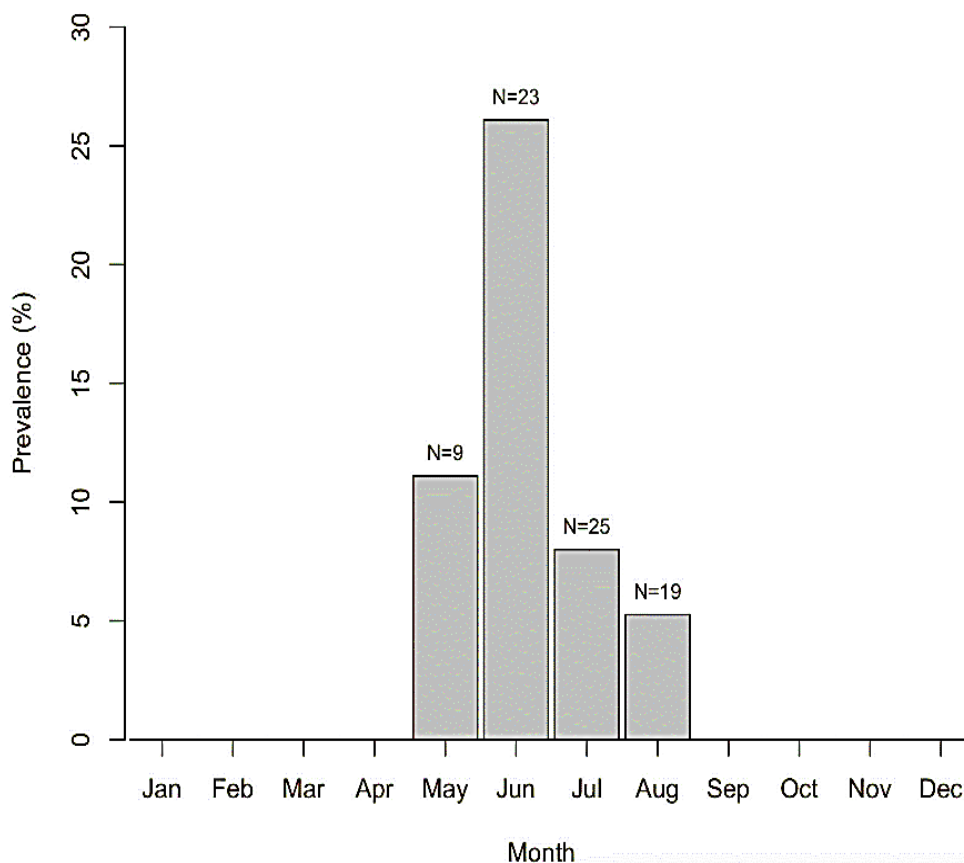


Gráfico 1. Prevalencia por mes del parasitismo en nidos colectados de *Apterostigma dentigerum*.

En mayo la prevalencia del parasitismo fue de 11.8% (n=9 nidos), junio 30.2% (n=23 nidos), julio 32.9% (n=25 nidos), agosto 25% (n=19 nidos). En la temporada de lluvias, la prevalencia global de nidos infectados por larvas de *Pseudogaurax paratolmos* fue del 13.1% (n = 76 nidos), mientras que la intensidad del parasitismo fue 24.3%. y para la población total fue de 1.31%.

Todos los estados inmaduros de las moscas fueron tratados por las hormigas y recibieron el cuidado típico de una cría. Las larvas de mosca y las pupas estaban cubiertas por micelio fúngico para cubrir las larvas o pupas de hormigas (Armitage et al.,2012). Cada larva de mosca consumió casi toda la larva de hormiga. Una vez eclosionaba una mosca, esta era rápidamente atacada por las hormigas hasta matarla; las restantes larvas no logran alcanzar a eclosionar debido a que el nido fue atacado por *Escovopsis*, este micoparásito consumió todo el hongo, ocasionando que

las hormigas dejaron de cuidar sus estadios, ya que estas suelen estar envueltas en micelio. Sin el cuidado necesario, las larvas no lograron cumplir su ciclo de vida.

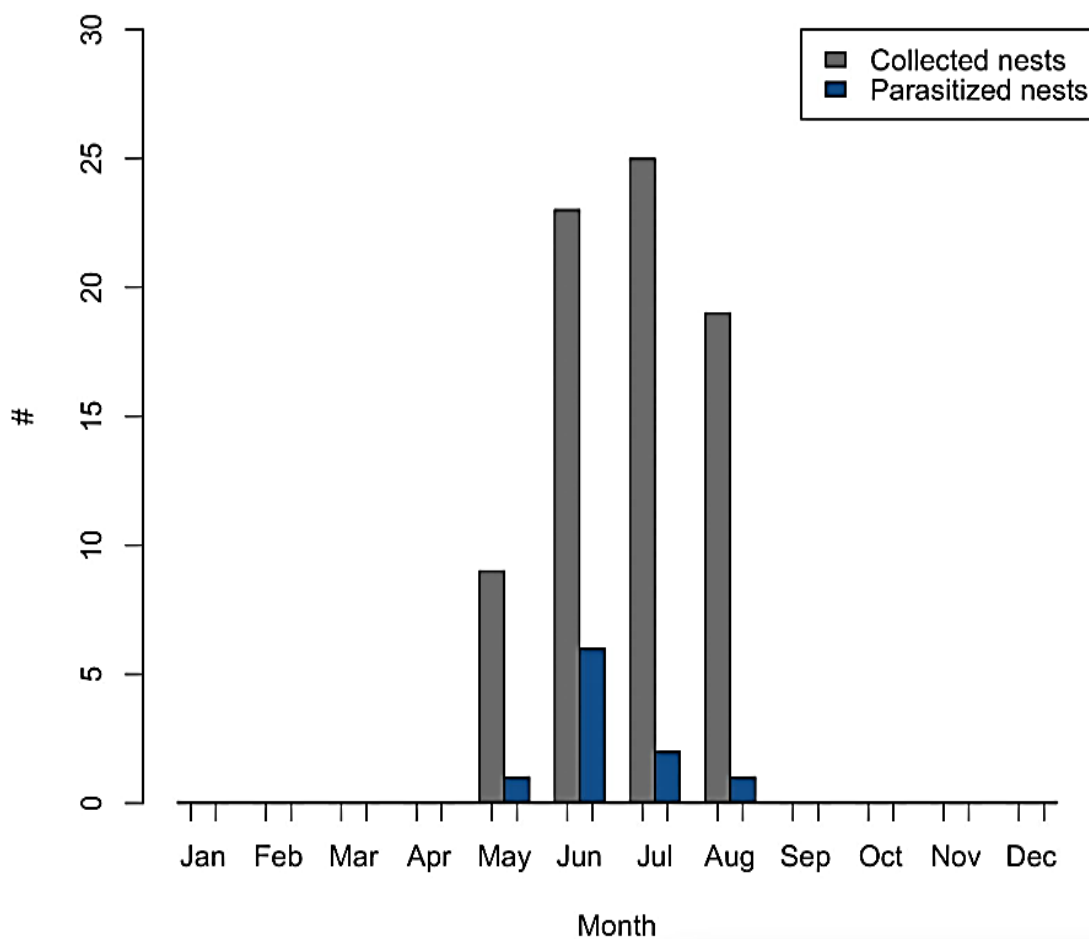


Gráfico 2. Prevalencia de número de nidos colectados vs nidos parasitados de *Apterostigma dentigerum* durante la temporada lluviosa.

En total 66 nidos de *A. dentigerum* no contenían larvas parasitadas por *Pseudogaurax paratolmos*, la prevalencia de los nidos no parasitados fue de 86.9 % durante la estación lluviosa.

Intensidad del parasitismo en nidos de *Apterostigma dentigerum*

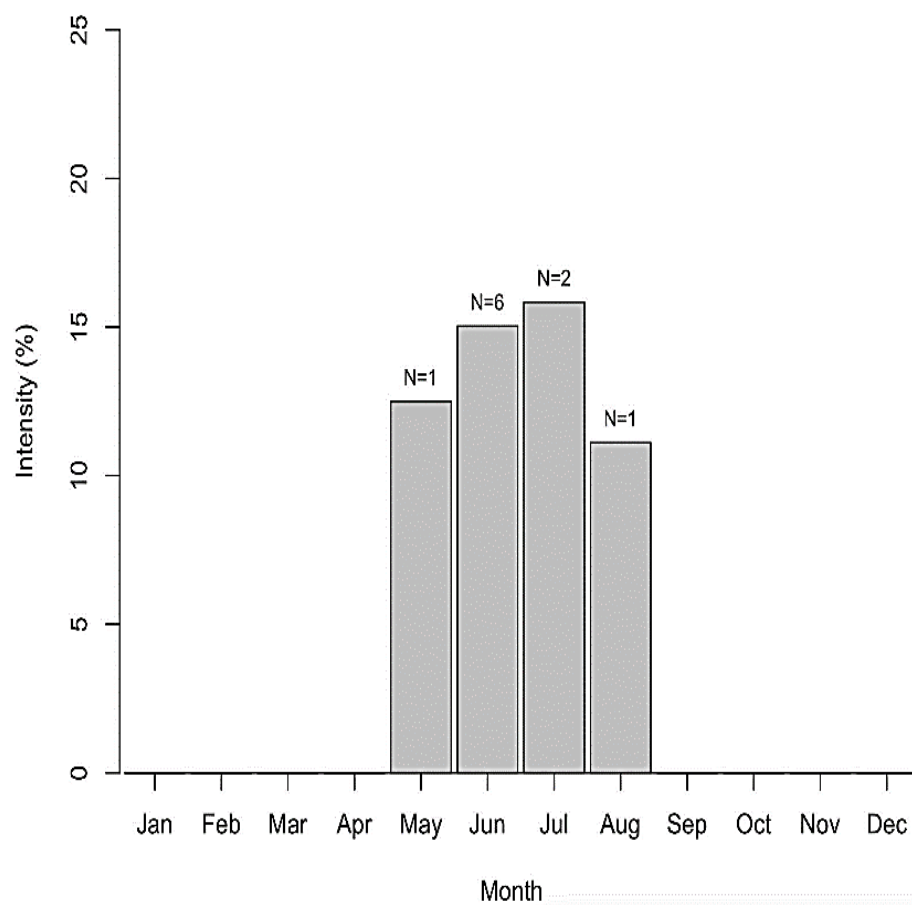


Gráfico 3. Intensidad del parasitismo por mes de colectados en nidos de *A. dentigerum*.

La intensidad por mes fue de: mayo (**n=1 nidos**) fue de 12.5%, junio (**n=6 nidos**) 15.3%, julio (**n=2 nidos**) 15.8%, agosto (**n=1 nidos**) 11.1%.

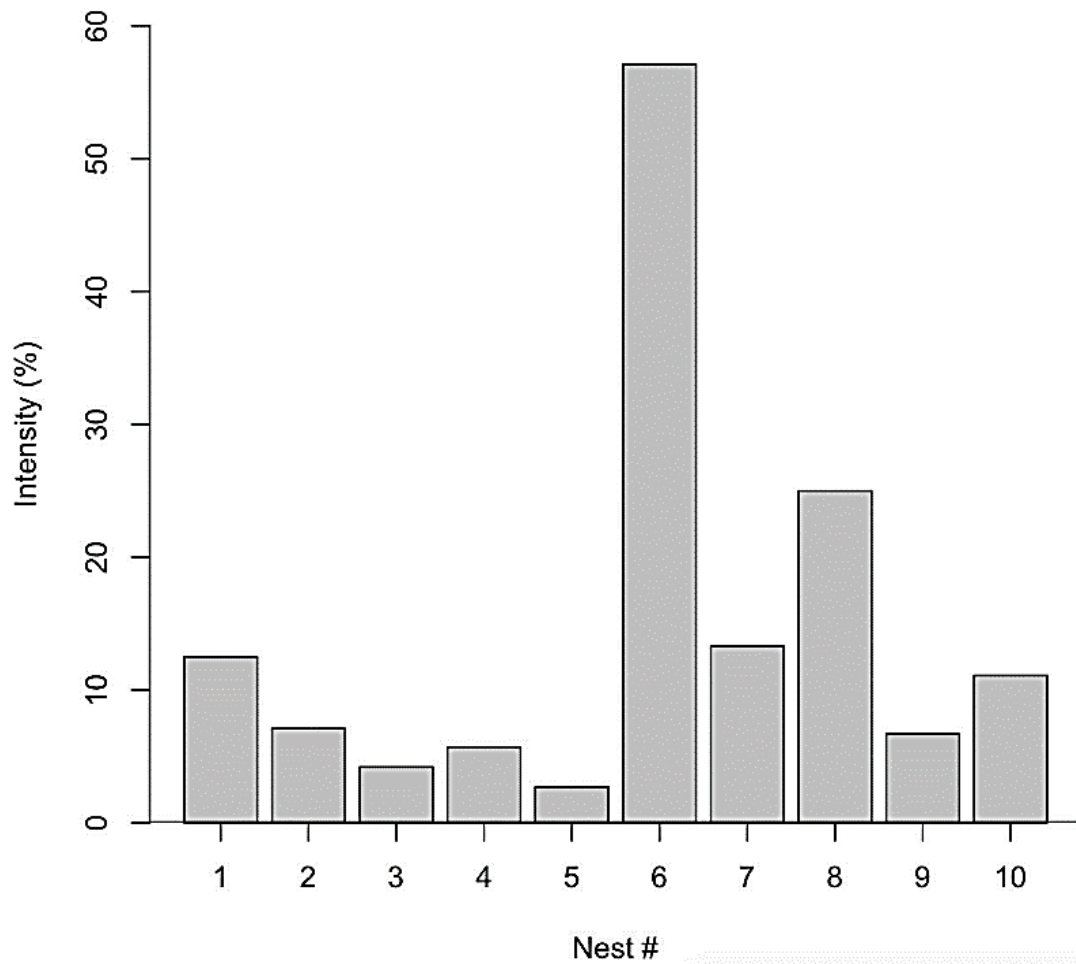


Gráfico 4. Intensidad de los nidos parasitados por *P. paratolmos* en hormigas cultivadoras de hongo *A. dentigerum*.

Intensidad de los nidos parasitados: (n=1) 12. 5%, (n=2) 7.1%, (n=3) 4.2%, (n=4) 5.7%, (n=5) 2.7 %, (n=6) 57.1%, (n=7) 13.3%, (n=8) 25.0%, (n=9) 6.7%, (n=10) 11.1%.

Aislamiento de la diversidad de los morfotipos

Para el aislamiento de *Escovopsis* se tomaron en consideración los 167 nidos colectados de los siguientes sitios: Parque Nacional Soberanía (Sendero Plantation Loop Road, Pipeline Road), Cerro Ancón y La Isla de Coiba (Sendero de los Monos). De tres especies distintas de *Apterostigma* (*A. dentigerum*, *A. pilosum*, *A. auriculatum*).

Para los aislamientos de *Escovopsis* se realizaron 3 réplicas de cámaras húmedas, las mismas fueron incubadas y monitoreadas durante 7 días, hasta observar el crecimiento micelial de *Escovopsis* spp. Para cultivar el hongo en medio de cultivo PDA se realizaron 5 réplicas por cada nido, se incubaron durante 10 días y se monitorearon hasta tener un cultivo puro (cultivo axénico). Durante el crecimiento los cultivos axénicos presentaron un crecimiento micelial con una coloración de esporas amarillo con blanco, en ocasiones con un crecimiento de esporas en todo el plato Petri, incluyendo la parte superior del plato y cubriendo por completo el PDA, en otro escenario el micelio solo creció en la parte inferior del PDA y también presentaron una coloración de esporas chocolate con tonalidades blancas.

Se lograron ver coinfecciones de *Escovopsis* spp. donde se visualizó ambos morfotipos en un mismo jardín de hongo (morfotipo yellow y morfotipo brown). Se tomaron datos sobre la presencia y ausencia de *Escovopsis* en los jardines de las hormigas cultivadoras de hongo del género *Apterostigma* spp. visualizando los morfotipos en las cámaras húmedas, y en algunas ocasiones en los jardines de hongos colectados que no sobrevivían, inmediatamente eran atacados por el micoparásito lográndose observar el color de las esporas.

Se identificaron un total de tres morfotipos que se clasificaron en función del color de las esporas nido (morfotipo yellow, morfotipo brown y morfotipo white). Los morfotipos brown y yellow fueron aislados de jardines de hongos de hormigas *Apterostigma dentigerum* y el morfotipo blanco fue aislado de *Apterostigma pilosum* y *Apterostigma dentigerum*.

Tabla.2. Nidos colectados por sitio de colecta y morfotipos visualizados.

	Nidos colectados	Morfotipos brown	Morfotipos yellow	Morfotipos white	Coinfecciones
Sendero Plantation Loop Road	77	23	12	0	1
Sendero Pipeline Road	76	29	11	1	4
Cerro Ancón	10	4	5	0	2
Coiba Sendero de los monos	4	4	0	0	0
Total	167	60	28	0	7

En total en el sendero de Plantation Loop road (n=36 nidos) fueron infectados por *Escovopsis* spp. donde se observaron (n=23 nidos) morfotipos brown, (n=12 nidos) morfotipos yellow, (n=1 nidos) morfotipo white, aislados de las hormigas cultivadoras de hongo *Apterostigma dentigerum* y *Apterostigma pilosum*.

Sendero de Pipeline Road fueron infectados (n=41 nidos) por *Escovopsis* spp. (n=29 nidos) morfotipos brown, (n=11 nidos) morfotipos yellow, (n=0 nidos) morfotipo white, aislados de las hormigas cultivadoras de hongo *Apterostigma dentigerum*.

Cerro Ancón (n=9 nidos) fueron infectados por *Escovopsis* spp. (n=4 nidos) morfotipos brown, (n=5 nidos) morfotipos yellow, (n=0 nidos) morfotipo white, aislados de las hormigas cultivadoras de hongo *Apterostigma dentigerum*

Coba, sendero de los monos fueron infectados (n=4 nidos), morfotipo brown (n=4 nidos) aislados de las hormigas cultivadoras de hongo *Apterostigma dentigerum*

Prevalencia de los morfotipos

En el sendero de Plantation Loop Road la prevalencia de *Escovopsis* spp. por mes fue de: en mayo morfotipo brown (n=18 nidos) 41.9%, morfotipo yellow (n=9 nidos) 20.9 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %. En junio: morfotipo brown (n=1 nidos) 25.0 %, morfotipo yellow (n=0 nidos) 0 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %. Julio: morfotipo brown (n=5 nidos) 31.2 %, morfotipo yellow (n=0 nidos) 0 % y morfotipo white (n=0 nidos). En agosto: morfotipo brown (n=0 nidos) 0 %, morfotipo yellow (n=0 nidos) 0 % y morfotipo white (n=1 nidos) 7.1%.

En el sendero de Pipeline road se logró cuantificar la presencia de *Escovopsis* spp. en 41 nidos en el mes de mayo: morfotipo brown (n=2 nidos) 22.2 %, morfotipo yellow (n=2 nidos) 22.2 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %. En junio: morfotipo brown (n=13 nidos) 56.5 %, morfotipo yellow (n=3 nidos) 13.0 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %. Julio: morfotipo brown (n=7 nidos) 28.0 %, morfotipo yellow (n=5 nidos) 20.0 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %. En agosto: morfotipo brown (n=7 nidos) 38.8 %, morfotipo yellow (n=1 nidos) 5.3 % y morfotipo white (n=1 nidos) 5.3 %.

En el Cerro Ancón se logró cuantificar la presencia de *Escovopsis* spp. en 9 nidos en el mes de agosto: morfotipo brown (n=4 nidos) 40.0 %, morfotipo yellow (n=5 nidos) 50.0 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %.

En el sendero de los monos Coiba se logró cuantificar la presencia de *Escovopsis* spp. en 4 nidos en el mes de mayo: en junio: morfotipo brown (n=4 nidos) 100 %, morfotipo yellow (n=0 nidos) 0 % y morfotipo white (n=0 nidos) 0 %.

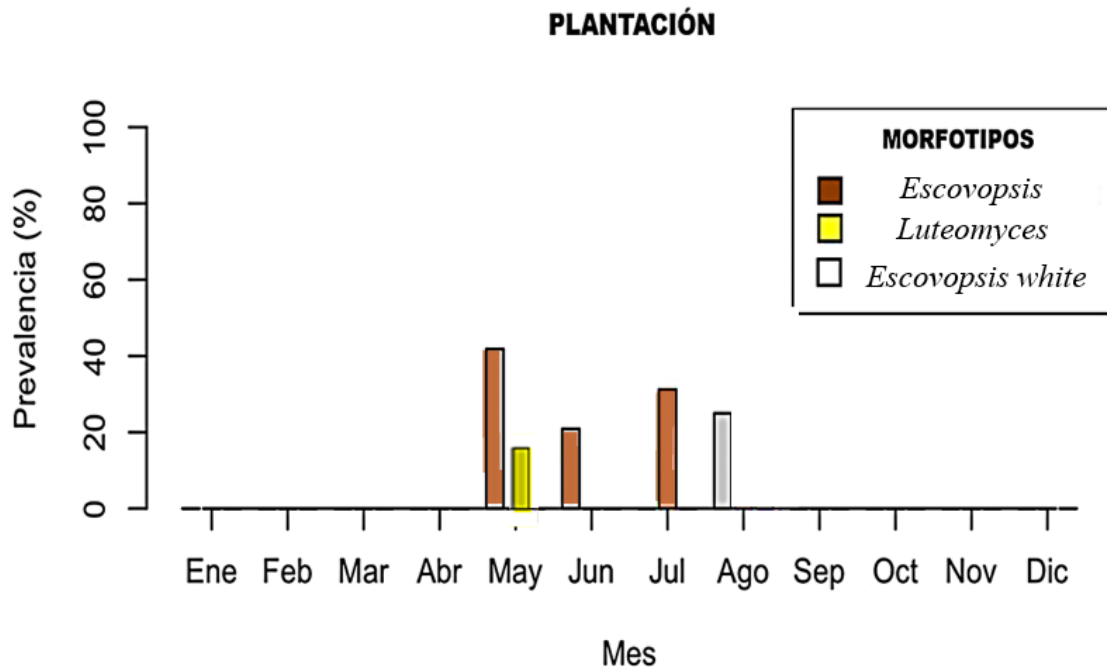


Gráfico 5. Prevalencia de morfotipos por mes de colecta en el sendero de Plantation.

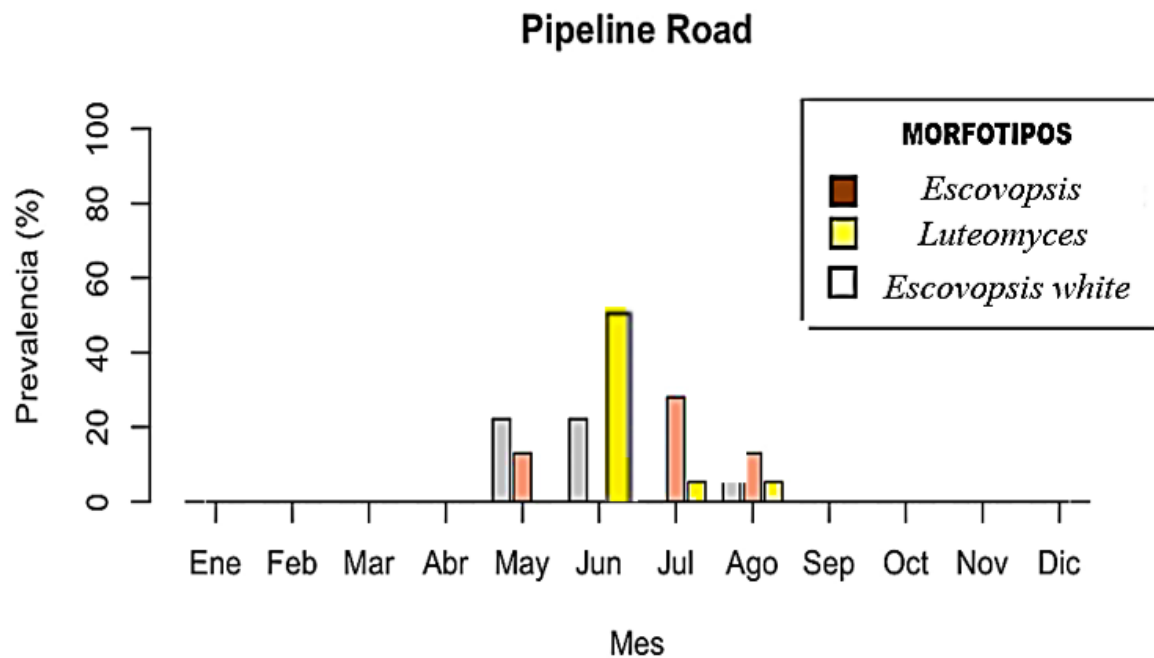


Gráfico 6. Prevalencia de morfotipos por mes de colecta en el sendero de Pipeline road.

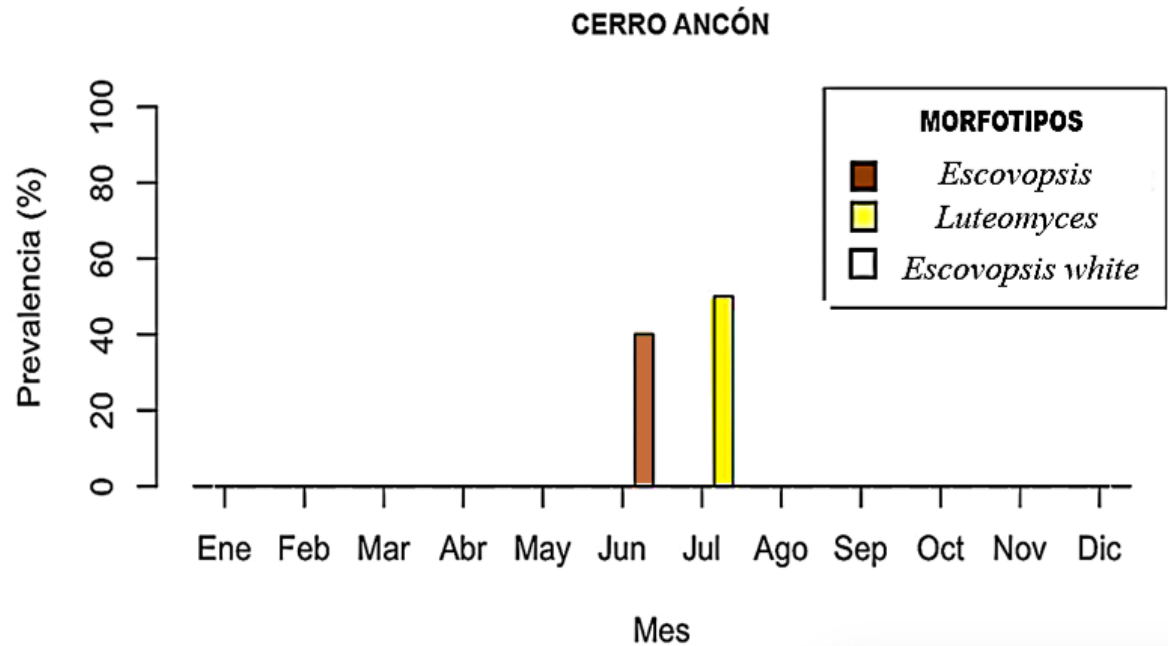
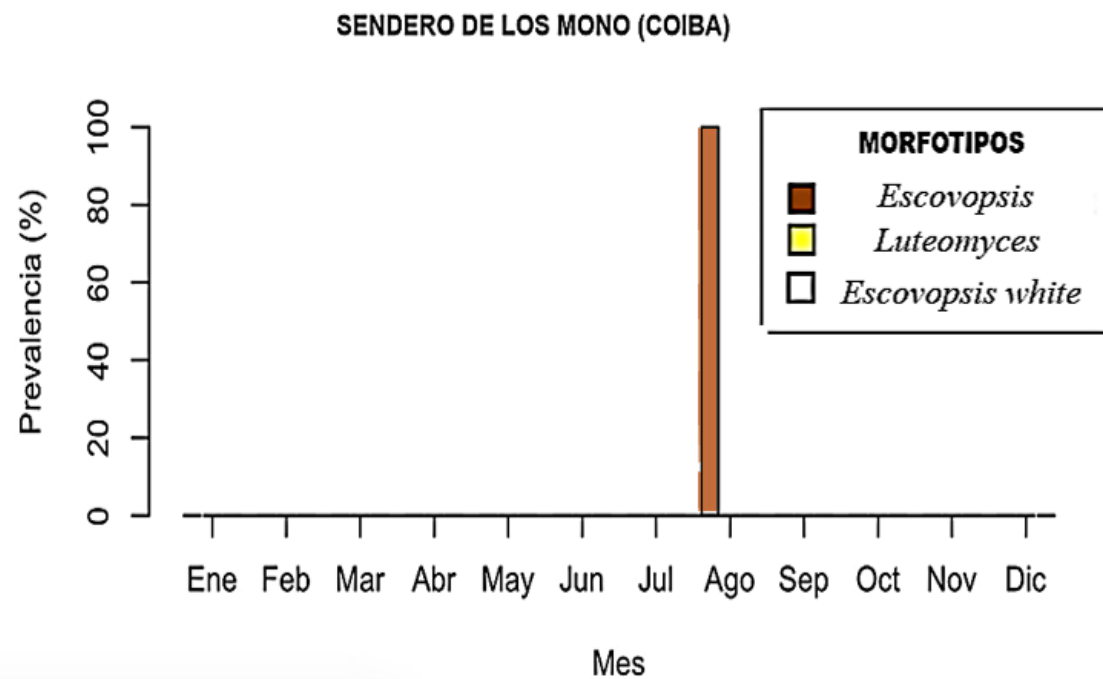


Gráfico 7. Prevalencia de morfotipos por mes de colecta en Cerro Ancón.



Gráfica 8. Prevalencia de morfotipos por mes de colecta en Coiba, Sendero de los Monos.

Identificación por microscopia óptica de los morfotipos brown de *Escovopsis*

Con base en el análisis morfológico, se distinguen claramente dos grupos diferentes de hongos en el género *Escovopsis*: *E. clavatus* y *E. multiformis*.

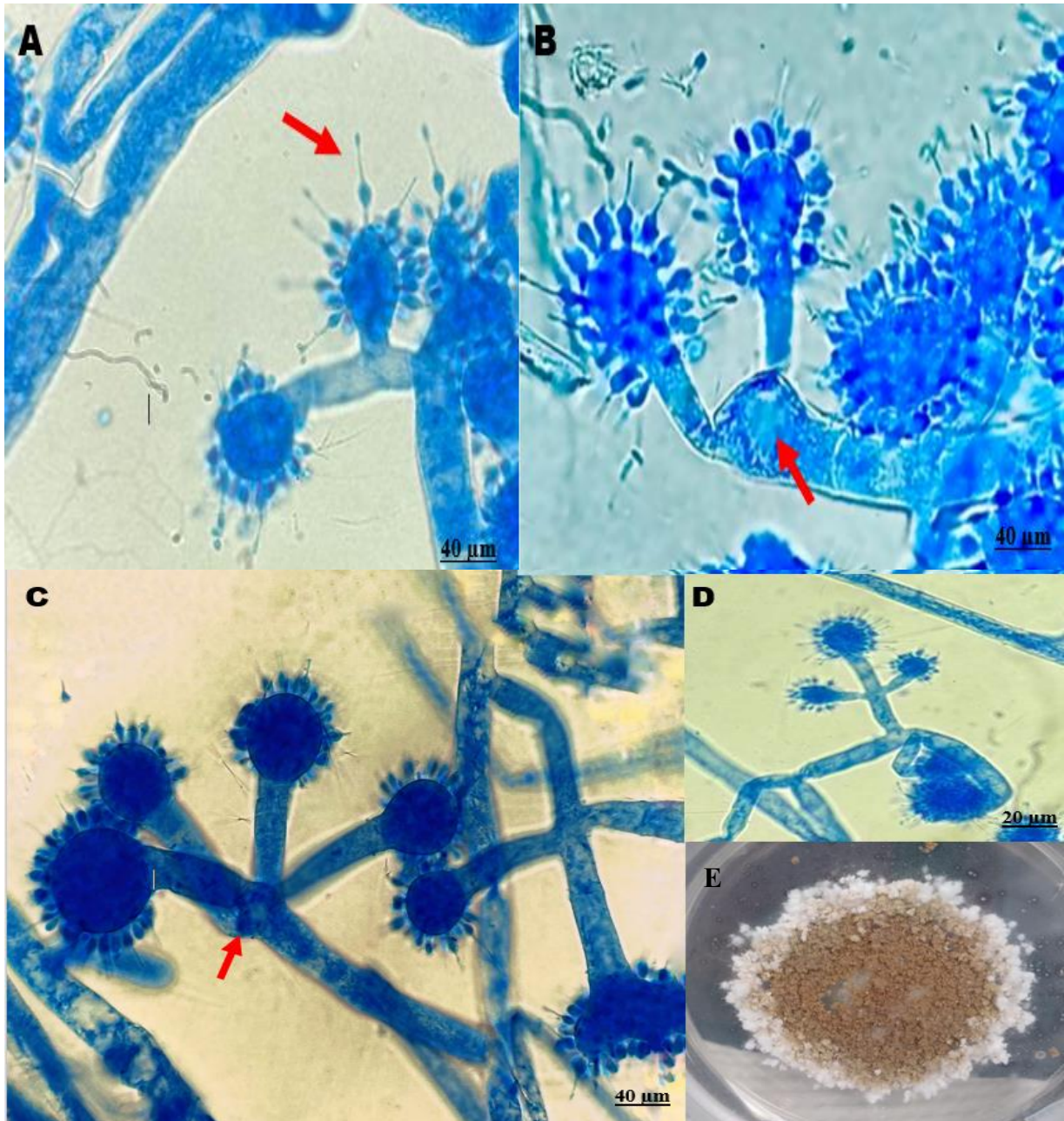


Figura 17. Conidióforo de *Escovopsis clavatus*. Aislado de *Apterostigma dentigerum*. A. Vesículas de diversas formas con patrón de fiálides (flecha roja). B-C. Las flechas indican un conidióforo con células hinchadas. D. Conidióforo sin células hinchadas. E. Fotografía macroscópica del morfotipo brown.

Para la identificación microscópica se utilizó un microscopio de luz con cámara DP73 OLUMPUS BX53, empleando las técnicas de microcultivo y tinción de azul de lactoglicerol para poder teñir las estructuras y poder observarlas más claras. La principal característica que presente esta especie con respecto a las demás especies de *Escovopsis*, es la presencia de células hinchadas en los conidióforos (Montoya et al., 2019).

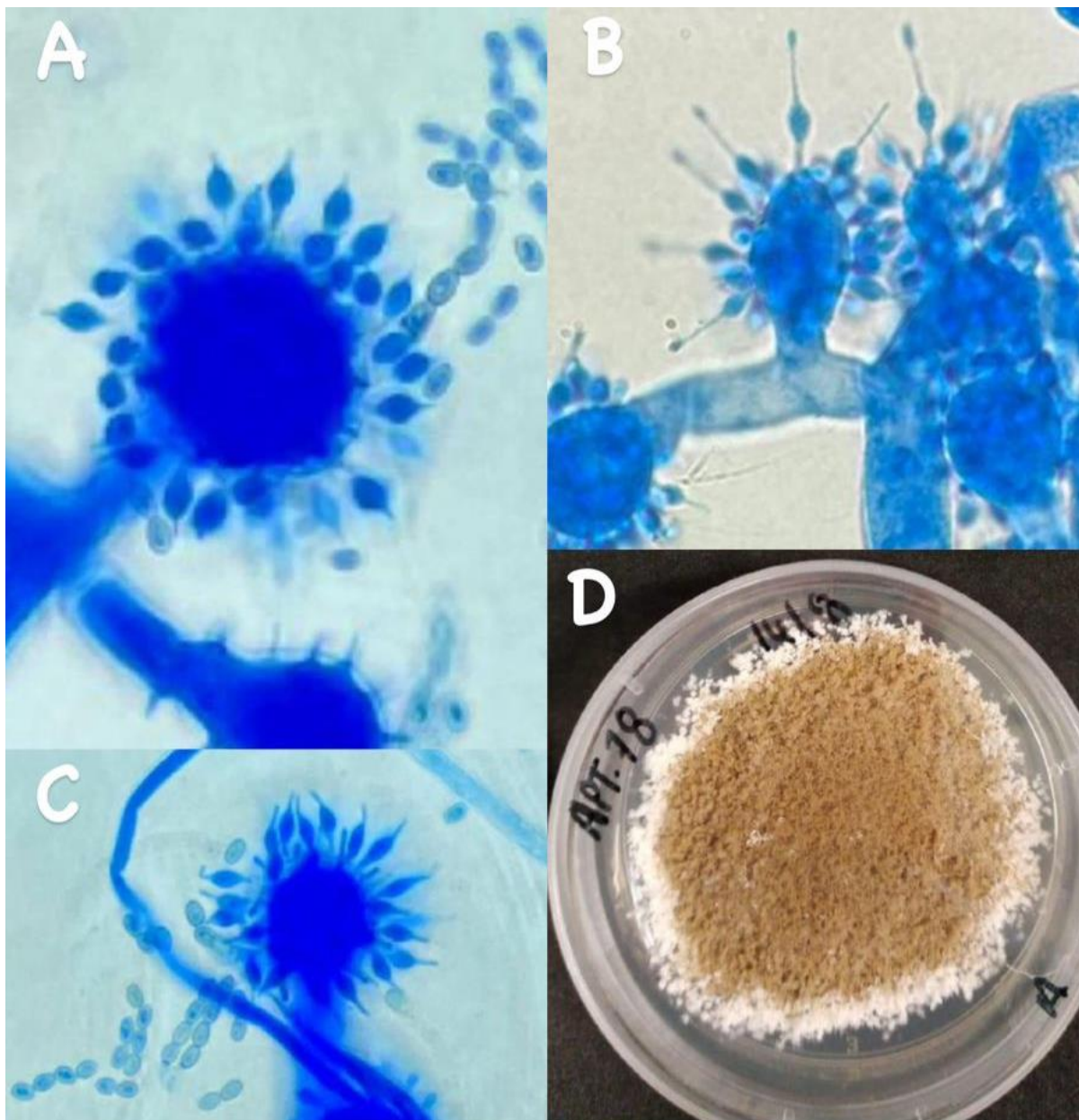


Figura 18. Conidióforo de *Escovopsis multififormis*. Aislado de *Apterostigma dentigerum*. A-C. Conidióforos mono y policéfalos con células hinchadas. B-C. Vesículas de diversas formas con patrón de fiálides y conidios formados en cadenas. D. Morfotipo brown.

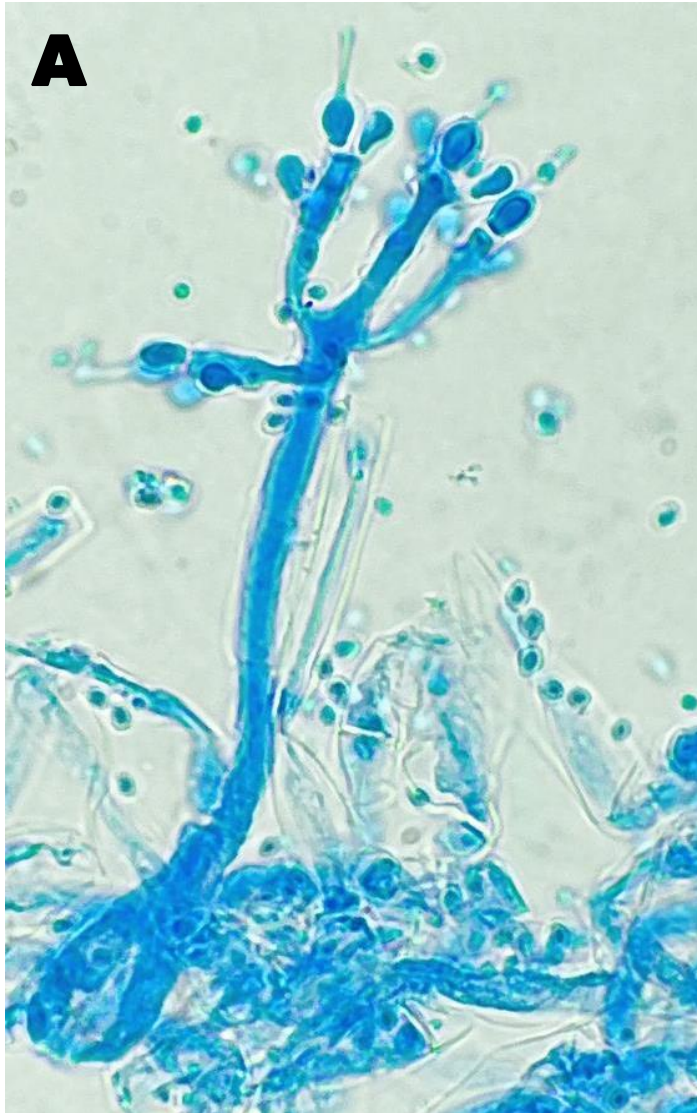


Figura 19. A. Conidióforo se asemeja a la forma de una mano. B. Morfotipo white aislado de *Apterostigma pilosum* y *Apterostigma dentigerum*.

Identificación por microscopia óptica de los morfotipos yellow. *Luteomyces trichodermoides*.

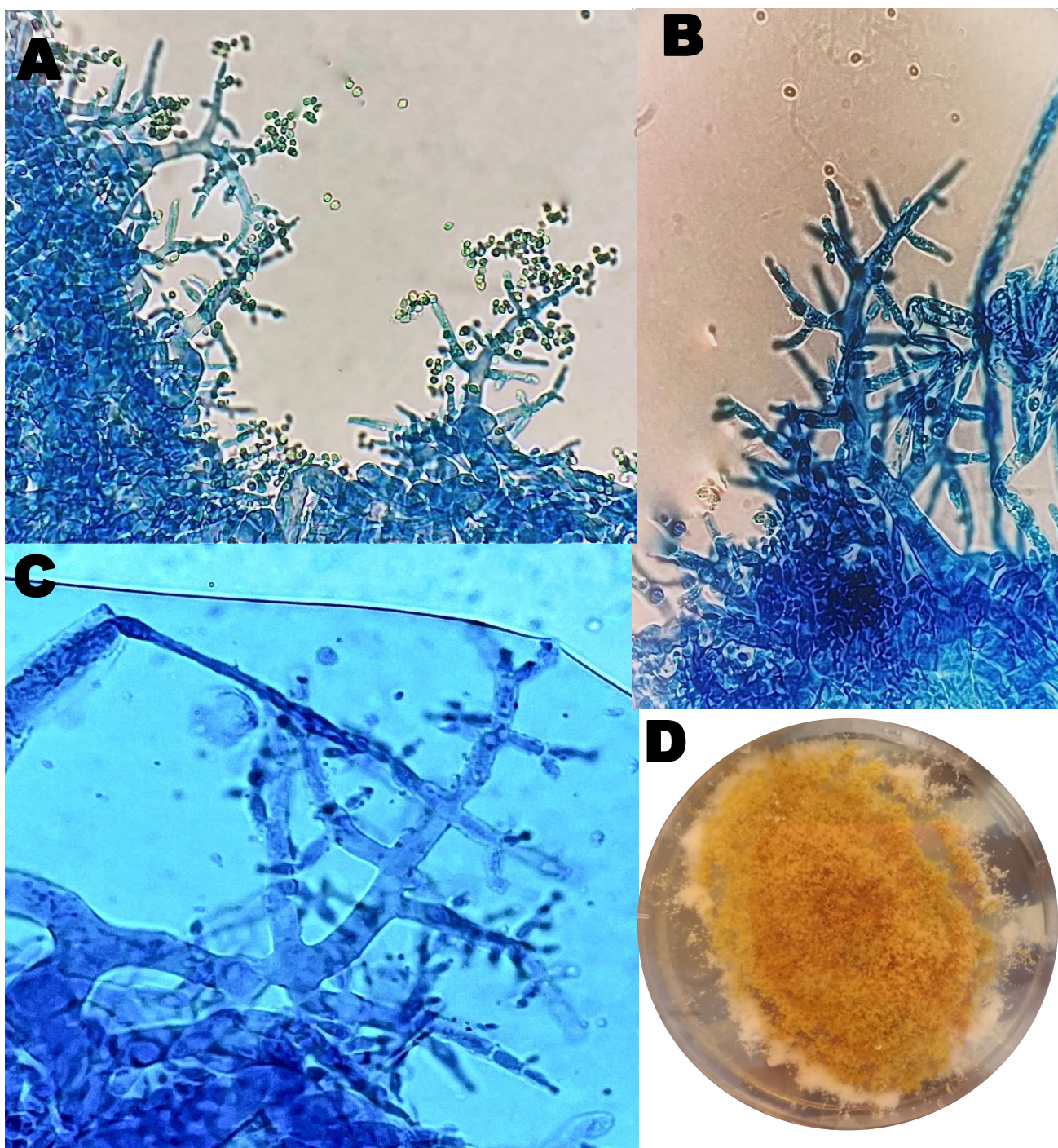


Fig.20. *Luteomyces trichodermoides*. Morfotipo yellow aislado de *Apterostigma dentigerum*
A. Disposición de conidióforos en micelios aéreos. B-C. Un conidióforo. D. Fotografía
macroscópica del morfotipo yellow.

Identificación Molecular

Amplificación de ADN

El ADN genómico extraído a partir de micelio fúngico asilado fue utilizado para la amplificación, además de poder realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el micoparásito *Escovopsis*, y la región ITS1- ITS2 del gen ribosomal 5.8s. El fragmento de ADN alcanzó un peso molecular de 600 a 700 bp. Todas las muestras amplificadas en este proyecto fueron sometidas a una electroforesis que después fue llevada a un transiluminador para la observación de las bandas.

Se logro realizar la extracción de ADN de 39 cepas fúngicas de *Escovopsis* aislados de *A. dentigerum* y *A. pilosum*, 26 del morfotipo brown, 13 del morfotipo yellow y 1 del morfotipo white. Solo 28 de las cepas fúngicas lograron amplificar, al momento de su purificación se cuantificado la concentración de ADN y solo 15 muestras se enviaron a la empresa Macrogen Inc., las demás no contaban con la concentración adecuada para el envío.

	Nidos colectados	Nidos aislados	Extracción de ADN	Producto de PCR amplificado (ADN)	ADN purificado	ADN secuenciado
<i>Apterostigma dentigerum</i>	165	55	36	27	14	14
<i>Apterostigma auriculatum</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Apterostigma pilosum</i>	1	1	1	1	1	1

Tabla.3. Nidos colectados y procesados para el análisis molecular.

De 167 nidos colectados, se aisló un total de 56 *Escovopsis* de los distintos morfotipos, de los cuales 37 fueron utilizados para realizar extracción de ADN, obteniendo 28 muestras amplificadas (Producto de PCR), los cuales solo 15 obtuvieron una buena concentración de ADN (15 ng/ μ L hacia delante) adecuada para enviar a secuenciar

Tabla.4. Datos de los nidos colectados y características del ADN genómico extraído de los hongos *Escovopsis* spp. asociados.

	Sitio de colecta	Hormiga	Concentración de ADN	280/260	Volumen de PCR	Concentración de purificación
20230510-APT05	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	70.3 ng/ μ L	1.55	4.0 ng/ μ L	18.3 ng/ μ L
20230510-APT12	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	47.5 ng/ μ L	2.23	4.8 ng/ μ L	15.6 ng/ μ L
20230517-APT15	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	59.7 ng/ μ L	2.25	3.8 ng/ μ L	15.0 ng/ μ L
20230526-APT25	S. Pipeline Road	<i>A. dentigerum</i>	33.1 ng/ μ L	2.21	7.0 ng/ μ L	15.8 ng/ μ L
20230526-APT37	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	42.7 ng/ μ L	1.96	5.5 ng/ μ L	63.8 ng/ μ L
20230526-APT39	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	38.7 ng/ μ L	2.19	6.0 ng/ μ L	18.8 ng/ μ L
20230526-APT44	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	53.9 ng/ μ L	2.27	4.3 ng/ μ L	22.0 ng/ μ L
20230609-ATP54	S. Pipeline Road	<i>A. dentigerum</i>	61.2 ng/ μ L	2.17	3.8 ng/ μ L	21.7 ng/ μ L
20230609-ATP72	S. Pipeline Road	<i>A. dentigerum</i>	46.9 ng/ μ L	2.00	4.9 ng/ μ L	15.8 ng/ μ L
20230717-APT94	S. Pipeline Road	<i>A. dentigerum</i>	32.8 ng/ μ L	2.13	7.1 ng/ μ L	20.7 ng/ μ L
20230717-APT111	S. Plantación	<i>A. dentigerum</i>	52.2 ng/ μ L	2.22	4.4 ng/ μ L	83.0 ng/ μ L
20230814-APT122	S. Pipeline Road	<i>A. dentigerum</i>	18.3 ng/ μ L	2.22	12.8 ng/ μ L	23.7 ng/ μ L
20230814-APT131	S. Pipeline Road	<i>A. dentigerum</i>	220.0 ng/ μ L	2.17	1.0 ng/ μ L	28.3 ng/ μ L

20230823-APT160	Cerro Ancón	<i>A. dentigerum</i>	129.8 ng/ µL	2.1	2.1 ng/ µL	40.1 ng/ µL
20230823-APT163	S. Plantación	<i>A. pilosum</i>	25.6 ng/ µL	2.18	9.2 ng/ µL	21.3 ng/ µL

Visualización de las bandas genómicas amplificadas por PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa

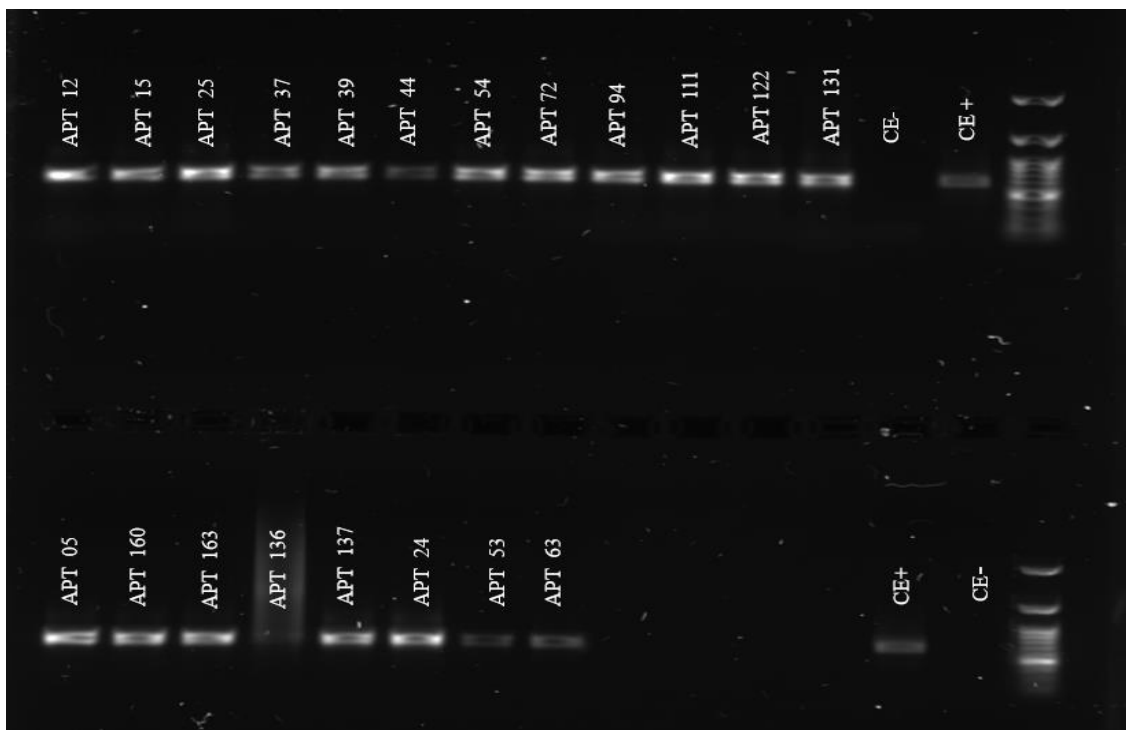


Figura 21. Gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 80V. Se visualizan las bandas obtenidas al amplificar la región ITS de las muestras de hongos *Escovopsis spp.*, CE+: Control, CE-: Control y marcador de peso molecular de 100 pb.

Secuenciación

El 15% de los hongos secuenciados fueron limpiados y organizados correctamente para su análisis filogenético. Solo el 8% lograron ser secuenciadas exitosamente. Las muestras restantes no fueron analizadas debido a que no cumplían con la calidad mínima para realizar el análisis, es común que durante la manipulación las muestras de ácido nucleico se contaminen. La pureza del ácido nucleico puede determinarse midiendo la absorbancia a diferentes longitudes de onda.

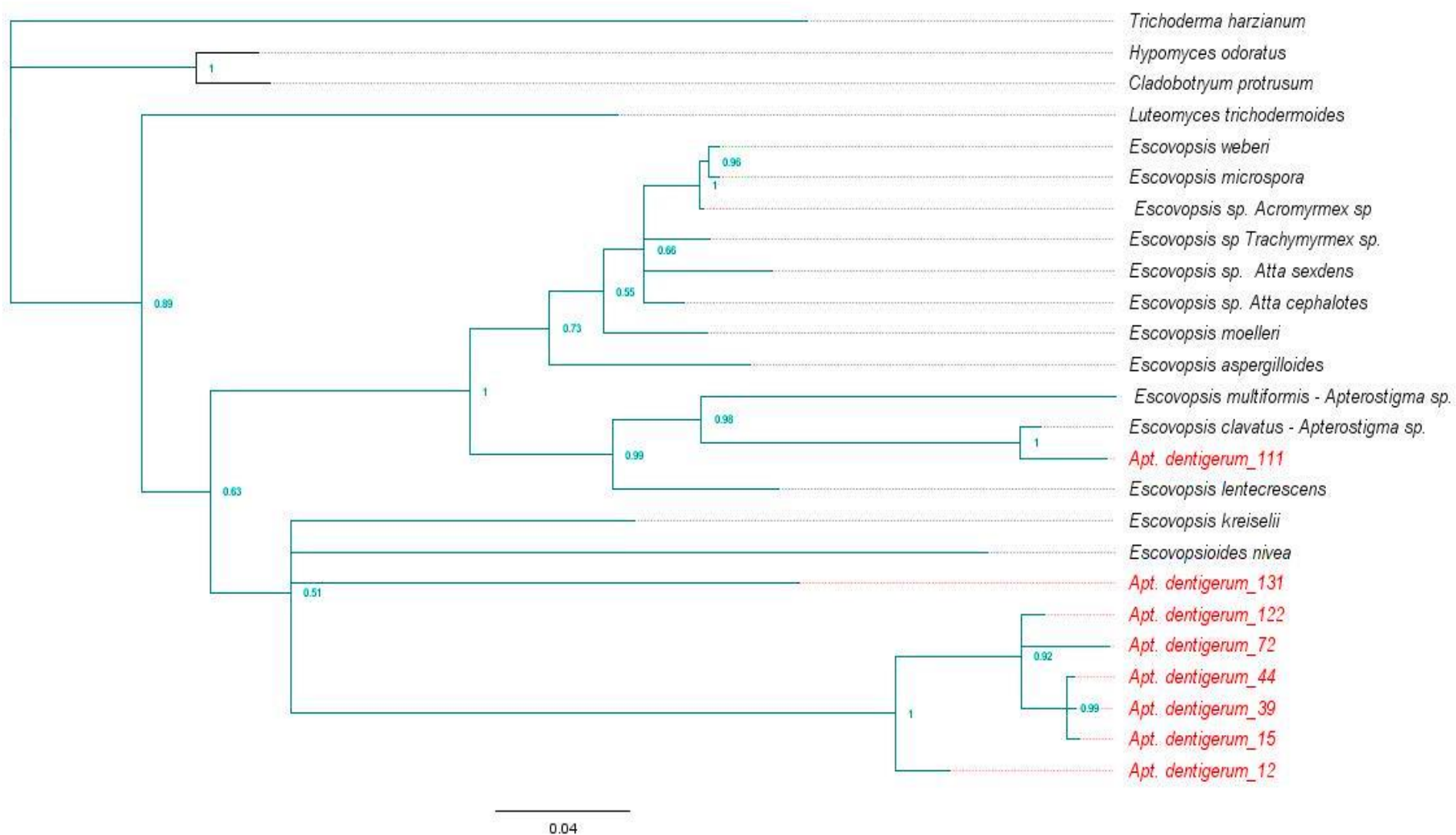


Figura 22. Árbol filogenético obtenido a partir del del análisis RAXML con las secuencias ITS 1-5.8S-ITS2 del ADNr de 8 aislamientos en estudio y de las secuencias seleccionadas de la base de datos del género *Escovopsis* y *Luteomyces*.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando en el Geneious para conocer la calidad de las secuencias sentido y antisentido obtenidas. La secuencia consenso generadas de cada muestra fue comparada en la base de datos NCBI BLAST, y se verifico la identidad en su mayoría fueron mayor de 97%. Seguidamente se alinearon las secuencias (forward/reverse) para la generación de los árboles filogenéticos. Se descargaron secuencias de especies de *Escovopsis* spp. del Genbank para compararlas con las secuencias obtenidas y generar un **árbol filogenético**. Los árboles filogenéticos finales se editaron en FigTree v.1.4.

Las secuencias fueron trabajadas en el software de Geneious. Primero se limpiaron los extremos con ruidos y picos múltiples para mejor la calidad de la secuencia. En algunas fue necesario unir las secuencias forward con reverse para mejorar la calidad. Seguidamente se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias. El diseño de árbol filogenético se realizó utilizando el marcador molecular ITS, combinando las secuencias del GenBank. El árbol filogenético generado incluye secuencias cepas de las cepas *Escovopsis*, producto de este trabajo, de *Escovopsioides nivea* y otras especies de hongos Hypocreales como *Hypomyces* y *Trichoderma*, también incluye como grupo externo la especie *Hypomyces odoratus*.

Los árboles se reconstruyeron bajo inferencias bayesianas y de máxima verosimilitud. Los números en las ramas indican las probabilidades a posteriori y los valores de soporte bootstrap, respectivamente. Todas las especies de *Escovopsis* descritas previamente se indican en color negro y las especies que se resaltan en rojo indican las secuencias trabajadas.

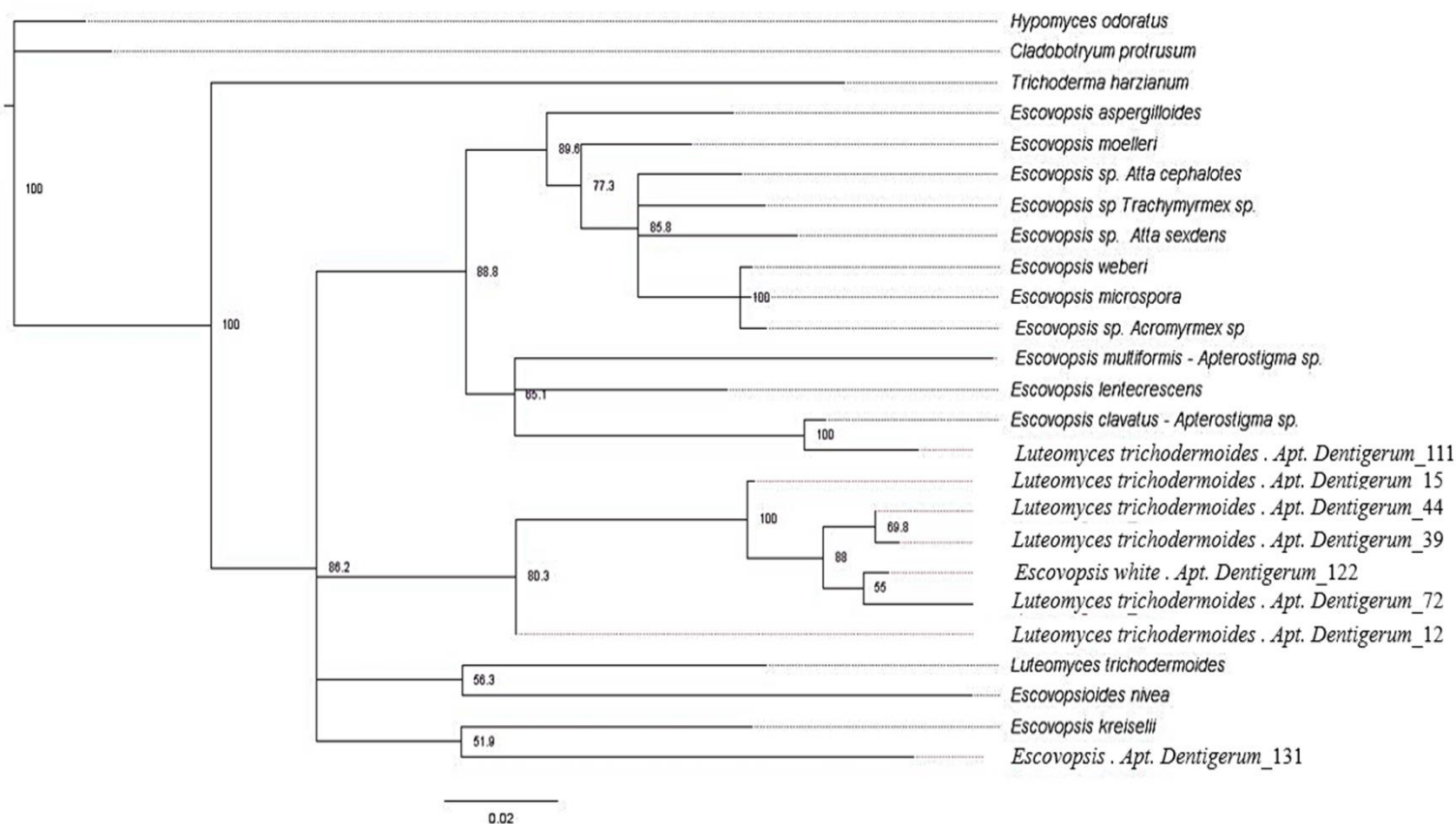


Figura 23. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de inferencia bayesiana con las secuencias ITS 1-5.8S-ITS2 del ADNr de 8 aislamientos en estudio y de las secuencias seleccionadas de la base de datos del género *Escovopsis* y *Luteomyces*

DISCUSIÓN

Parasitismo por *Pseudogaurax paratolmos*

De las tres especies colectadas de *Apterostigma* (*A. dentigerum*, *A. auriculatum*, *A. pilosum*), solo *A. dentigerum* fue atacada por (Díptero: Chloropidae) *Pseudogaurax paratolmos*. Los resultados son consistentes con los datos publicados por (González et al., 2016) demostrando que este ectoparasitoide sigue prevaleciendo en los jardines de hongo de estas hormigas, siendo capaces de cruzar las barreras de defensa, por lo tanto han logrado no ser detectadas por las hormigas durante su desarrollo, utilizando un camuflaje químico para no ser percibidas por las hormigas (Akino, 2008). En su estudio realizado la prevalencia general del parasitismo en 203 nidos colectados fue del 6,8 % de 203 nidos durante la temporada lluviosa, y la intensidad del parasitismo osciló entre el 18,2%. También se tomaron datos durante la estación seca, donde obtuvieron una prevalencia de 10.4% y una intensidad de 62.6%. No se encontraron diferencias estacionales entre la prevalencia e intensidad durante ambas estaciones.

La coincidencia entre estos patrones del parasitismo sugiere que este fenómeno podría mantenerse estable en distintas localidades donde se encuentre *Apterostigma dentigerum*. En este estudio se observó una mayor prevalencia del parasitismo en menos nidos colectados, posiblemente por diferencias en el entorno ecológico o en condiciones específicas del muestreo. *Pseudogaurax paratolmos* ha sido observada parasitando nidos de *Apterostigma collare*, sin embargo estos datos aun no han sido publicados.

Tantos los parasitoides himenópteros como los dípteros utilizan una diversa gama de señales ambientales para localizar a sus hospederos o su hábitat. Los parasitoides Phoridae de las hormigas, por ejemplo, han desarrollado habilidades para explorar los sistemas de comunicación de sus hospederos (Feener & Brown, 1997; Mathis & Philpott, 2012). Las hembras Phoridae son atraídas por las feromonas liberadas por las glándulas mandibulares de las obreras, especialmente cuando las obreras se encuentran peleando, heridas o bajo cualquier estrés (Feener et al., 1996). Uno de los compuestos que desencadenan el comportamiento de búsquedas de hospedero en los Phoridae es la 4-metil-3-heptanona (Feener et al., 1996), también está presente en *Pseudogaurax villosa* (Duffield & Blum, 1973). Algunas especies parecen ser

oportunistas y utilizar una variedad de hospedadores, sin embargo, se sabe poco sobre las historias de vida de varias especies de *Pseudogaurax* (Barnes et al., 1992)

La población de *Apterostigma dentigerum* podría verse afectada por la presencia de la mosca *P. paratolmos*, esta consume toda la larva de la hormiga para desarrollarse. Estos nidos no solo son parasitados por moscas, sino que también por avispas diapriine, lo que podría representar una amenaza para estas especies con el tiempo, puesto que los nidos rara vez alcanzan 100 individuos (Villesen et al., 2004; Fernández et al., 2006). La prevalencia de los nidos no parasitados en el sendero de Pipeline road fue 86.84% y la prevalencia de los nidos parasitados fue de 13.16%. Gonzáles et al., (2016) en su estudio reveló que las moscas parásitas estaban en el 6.8% de los 203 nidos que recolectaron y analizaron en los senderos de Plantation Loop road y Pipeline road de los jardines de hongo de *Apterostigma dentigerum*. Estos tenían una capa de micelio fúngico que las cubría y fueron encontrados expuestos en las laderas cercanas a los ríos y arroyos, y en el bosque bajo raíces y rocas. No se reportaron presencia de parasitoides en jardines de hongos en *Apterostigma pilosum*, ni *Apterostigma auriculatum*.

Diversidad de los morfotipos aislados

En esta investigación mediante la observación se logró identificar un total de tres morfotipos que se clasificaron en función del color de las esporas (morfotipo yellow, morfotipo brown y morfotipo white (blanco)). Los morfotipos brown (marrón) y yellow(amarillo) fueron aislados de jardines de hongos de hormigas *Apterostigma dentigerum* y el morfotipo blanco fue asilado de *Apterostigma pilosum* y *Apterostigma dentigerum*. en el caso de *Apterostigma auriculatum* no se logró visualizar ningún morfotipo, ya que las colonias no fueron muy resistentes y murieron.

En un estudio realizado por Gerardo et al., (2016) en hormigas del género de *Apterostigma*, logró clasificar las muestras de *Escovopsis* aisladas de colonias infectadas en cuatro morfotipos según el color de las esporas: marrón, amarillo, blanco y rosa. Mas tarde Christopher et al, (2021) aisló morfotipos brown y yellow de *Apterostigma dentigerum* y morfotipos **yellow y brown** de *Apterostigma pilosum*; en su estudio realizado reporto una prevalencia de 11.4% y 23.07% de prevalencia en sus morfotipos asilados en un total de 48 aislados. Sin embargo en

esta investigación se obtuvo una prevalencia de 53.39% del parasitismo por *Escovopsis* y *Luteomyces* en 56 aislados.

Esta diferencia en podría atribuirse a varios factores obtenidos entre ellos el numero de muestras analizadas. Condiciones ambientales del área de estudio, el método de asilamiento empleado o incluso la especificidad del hongo y hormigas asociadas.

no fue posible observar la presencia de este morfotipo yellow ni morfotipo brown en *Apterostigma pilosum*, más sin embargo no se ha reportado la presencia del morfotipo white en *A. pilosum* ni en *A. dentigerum*. Se han informado coinfecciones por *Escovopsis* en Panamá (Gerardo et al., 2006, Taerum et al., 2007; Taerum et al., 2010; Christopher et al., 2021) en hormigas basales y derivadas.

Diversidad de los morfotipos de *Escovopsis* y *Luteomyces*

Los morfotipos brown fueron descritos por Montoya et al., (2019), como *Escovopsis clavatus* y *Escovopsis multiformis*, consideradas nuevas especies aisladas del jardín de hongo de *Apterostigma*, siendo una característica distintiva de estos linajes es la presencia de células hinchadas en la base de las ramas de los conidióforos. Los morfotipos **yellow (amarillo)** fueron considerados durante mucho tiempo, como especies del Género *Escovopsis*, sin embargo, Montoya et al., (2021) reevaluó el género *Escovopsis* y describió los nuevos géneros *Luteomyces* donde *Escovopsis trichodermoides* paso a ser *Luteomyces trichodermoides* por las diferencias morfológicas en sus estructuras. Los morfotipos white aislados de *Apterostigma pilosum* y *A. dentigerum* no ha sido reportados.

Solo hay información, en la literatura, sobre el color de las colonias de los *Escovopsis* blanco, pero se desconocen las características microscópicas de este clado. Debido a la falta de información sobre los *Escovopsis* white, no se lograron cuantificar correctamente, a simple vista eran muy parecidos a hongos contaminantes que se encuentran en asociación con los jardines de hongos de las Attini, muchas otras especies han sido recientemente descritas y la falta de información sobre ejemplares nuevos dificulta poder identificar los especímenes. Dado que se lograron aislar el morfotipos white en hormigas cultivadoras de hongos *A. dentigerum* y *A. pilosum*, es posible inferir que nuevas especies de *Escovopsis* y otros géneros están compitiendo por los recursos de su hospedero.

No obstante, hay diferencias en la prevalencia de cepas de *Escovopsis* que infectan colonias de *Apterostigma dentigerum* y *A. pilosum*, así como en la capacidad de los cultivares para suprimir el crecimiento de especies patógenas y en el grado en que estas especies patógenas desencadenan comportamientos defensivos en las hormigas (Christopher et al., 2021). Las colonias de *A. dentigerum* y *A. pilosum* se infectaron frecuentemente con múltiples cepas de *Escovopsis* un fenómeno que también se observó en relación con colonias de otras especies de hormigas que cultivan hongos (Taerum et al., 2010). De acuerdo con la teoría, se espera que los parásitos coinfectantes compitan entre sí por los recursos del hospedador (supresión competitiva), aunque también podrían, de manera incidental, superar conjuntamente las defensas del hospedador (Abdullah et al., 2017; Bashey, 2015). El efecto de la coinfección puede estar influenciado por la similitud genética entre los parásitos coinfectantes (Read & Taylor, 2001) y por las

modificaciones en el comportamiento del parásito cuando otros parásitos están presentes (Rayner, 1991). Si las coinfecciones con *Escovopsis* se caracterizan por una supresión competitiva, esto podría disminuir la virulencia general de la infección.

Las hormigas suelen eliminar la porción de jardín que está infectada por el micoparásito, este comportamiento se logró observar en *A. dentigerum*, *A. pilosum* y *A. auriculatum*. Las respuestas variables de las hormigas frente a diferentes parásitos indican que podrían ser capaces de distinguir entre distintas cepas de *Escovopsis*, como se ha sugerido anteriormente (Goes et al., 2020). No obstante, aún no sabemos si la atención de las hormigas a ciertos morfotipos puede alterarse al añadir o eliminar otros morfotipos o patógenos de *Escovopsis*.

Análisis filogenéticos

El 15% de los hongos secuenciados fueron limpiados y organizados correctamente para su análisis filogenético. Solo el 8% lograron ser secuenciadas exitosamente. Este porcentaje subraya un desafío común en los estudios de secuenciación de ácidos nucleicos, ya sea por su preservación y la calidad de la muestra. La pureza de las muestras sigue siendo un factor crucial para interpretar buenos resultados filogenéticos. La filogenia nos muestra un clado parafilético entre los *Luteomyces* y *Escovopsis* white, posiblemente se trate de una especie nueva dentro del género.

La relación entre las absorbancias a 260 (A260) y 280 nm (A280) es ampliamente aceptada como un método para evaluar la contaminación con proteínas de una muestra de DNA purificado. La relación A260/A280 de una muestra que contiene DNA puro sin contaminación por proteínas debe estar entre 1,8 y 2,0, con valores por debajo de 1,8 indicando contaminación por proteínas y relaciones por encima de 2,0 indicando contaminación por RNA. Una relación A260/A280 baja también puede ser indicativa de la presencia de fenol, un aditivo usado en algunos métodos de purificación de DNA

Las muestras que no fueron enviadas a secuenciar pudieron haberse visto afectada por presencia de fenol al momento de la purificación, ya que la relación 260/280 presentaban valores por debajo de 1,8 indicando contaminación por proteínas o incluso por la presencia de fenol.

Esta investigación mostró una gran diversidad a pesar de solo haber utilizado un único conjunto de cebadores, específicamente los cebadores ITS para amplificar la región ITS 1 5-8S ITS 2.

Sin embargo, en otras investigaciones se han empleado cebadores diferentes, como los de subunidad larga (LSU), factor de elongación (*tef1*), subunidad *rpb1* y *rpb2* (Montoya et al., 2021; Agustín et al., 2013; Christopher et al., 2021; Meirelles et al., 2015)

En el análisis RAXML la secuencia *Apt. dentigerum*_111 (morfo tipo yellow) se agrupó con *Escovopsis clavatus* que se caracteriza por el patrón de color brown (marrón), este análisis mostró que la especie anterior es un clado hermano de *E. multiformis* y *E. clavatus*, dichas especies se caracterizan por la presencia de células hinchadas, sin embargo los morfotipos yellow carecen de células hinchadas y de vesículas, lo que podría tratarse de una nueva especie.

CONCLUSIONES

Este estudio proporciona un contexto valioso para comprender un poco más sobre hormigas cultivadoras de hongos (Hymenoptera: Formicidae: Attini: Attina) del género *Apterostigma*, que han sido objeto de investigación biológica durante muchos años, el éxito de su mutualismo y su constante evolución han permitido comprender el mutualismo hormiga-fúngico-micoparásito, incluidos parásitos sociales.

Se obtuvieron mediante observación microscópica 2 especies de *Escovopsis*, 1 aislado del género *Luteomyces* y el posible grupo nuevo al que llaman “*Escovopsis White*”. La demografía de los nidos se ve afectada por la presencia del micoparásito *Escovopsis* y por la presencia de patógenos sociales, dentro de los insectos se destacan a las moscas de la familia Phoridae. En este estudio los nidos de *Apterostigma dentigerum* colectados en el Parque Nacional Soberanía (sendero de Pipeline road) presentaron una prevalencia del parasitismo por *Pseudogaurax paratolmos* de 13.1% y una intensidad de 24.3% y una prevalencia global del micoparásito de 53.39%.

En cuanto a la identificación molecular se logró identificar 2 especies (*Escovopsis clavatus* y *Luteomyces trichodermoides*) a partir de 8 secuencias de colonias de hormigas *Apterostigma*. En cuanto al ectoparasitoide de la mosca solo se identificó una sola especie (*Pseudogaurax paratolmos*).

Sin importar la presencia de mosca ectoparasitoides, se puede encontrar parasitismos por *Escovopsis*, además nuestros resultados nos indican coinfecciones por *Escovopsis* u otros géneros hermanos en los nidos infectados por la mosca *Pseudogaurax paratolmos*.

Los jardines de hongos de las hormigas Attini contienen una gran diversidad de *Escovopsis* que aún no ha sido descubiertas, ni descritas. El uso de dos o más conjuntos de cebadores diferentes a los empleados en esta investigación podría aportar una mejor resolución en la identificación de los hongos aislados y así obtener una determinación de la diversidad de *Escovopsis* más profunda. Los datos obtenidos en este estudio proporcionan una base útil para la continuación de investigaciones similares.

Es complicado determinar cuál rasgo fenotípico se podría considerar característico o distintivo para este género. Los análisis filogenéticos nos confirman que el color no determina la especie,

sin embargo, las características morfológicas sí. Aunque se conoce poco sobre su taxonomía, este estudio indica que los jardines de hongos de las hormigas Attini contienen una amplia diversidad de *Escovopsis* que aún no ha sido identificada ni descritas.

Los hongos micoparásito del género *Escovopsis* (Ascomycota: Hipocreales) son considerados fundamentales en el control biológico de las hormigas cortadoras de hojas, debido a su capacidad para destruir al *Leucoagaricus* (Basidiomycota: Agaricales), la principal fuente alimento de estas hormigas, en lo cual radica su importancia para investigaciones futuras, ya que el éxito de su aplicación en el control biológico ha generado un creciente interés en la identificación genética de cepas específicas y en las diferencias moleculares que existen entre ellas.

RECOMENDACIONES

- Realizar colectas en las distintas regiones de la República de Panamá, incluyendo las islas, para explorar la diversidad de *Escovopsis*, hormigas y parasitoides que están interactuando en los jardines de hongos de las Attini.
- Determinar si la extracción de estos nidos altera las interacciones simbióticas, o el equilibrio ecológico del lugar.
- Aumentar la cantidad de colonias analizadas.
- Emplear otros cebadores moleculares o primers que faciliten la identificación de diferentes especies de *Escovopsis*.
- En Panamá, la información sobre la taxonomía de *Escovopsis* es limitada, por lo que los estudios realizados deben ser publicados para aportar al conocimiento de la comunidad científica, que actualmente carece de datos en este ámbito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah, AS, Moffat, CS, Lopez-Ruiz, F., Gibberd, MR, Hamblin, J. y Zerihun, A. (2017). Guerra entre hospedador y múltiples patógenos: interacciones entre patógenos en plantas coinfectadas. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>.

Akino, T. (2008). Chemical strategies to deal with ants: A review of mimicry, camouflage, propaganda, and phytomimesis by ants (Hymenoptera: Formicidae) and other arthropods. *Myrmecol News* 11: 173–181.

AntWeb. Version 8.90.1. California Academy of Science, online at <https://www.antweb.org>. Accessed 08 February 2024.

Armitage, S.A.O., H. Fernandez-Marin, W. T. Weislo, and J. J. Boomsma. (2012). An evaluation of the possible adaptive function of fungal brood covering by attine ants. *Evolution* 66: 1966–1975.

Augustin JO, Groenewald JZ, Nascimento RJ, Mizubuti ES, Barreto RW, Elliot SL, Evans, HC. (2013). Aún más "malas hierbas" en el jardín: novedades fúngicas de nidos de hormigas cortadoras de hojas. *Pag. 8 (12)*, e82265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082265>

Barke J., Seipke RF., Gruschow S., Heavens D., Drou N., Bibb MJ., Hutchings MI. (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC biology*, 8(1), 109.

Barnes JK, Higgins LE, Sabrosky CW (1992) Life histories of *Pseudogaurax* species (Diptera: Chloropidae), descriptions of two new species, and ecology of *Nephila clavipes* (Linnaeus) (Araneae: Tetragnathidae) egg predation, *Journal of Natural History*, 26:4, 823-834, DOI: 10.1080/00222939200770501

Bashey, F. (2015). Interacciones competitivas dentro del hospedador como mecanismo para el mantenimiento de la diversidad de parásitos *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370**, 20140301. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0301>

Bolton, B. (2021). An online catalog of the ants of the world. (<https://antcat.org>). (Accessed 29 Marzo 2024)

Cardenas CR, Luo AR, Jones TH, Schultz TR, Adams RMM. (2022). Utilizando un enfoque taxonómico integrador para delimitar una especie hermana, *Mycetomoellerius mikromelanos* sp. nov. (Formicidae: Attini: Attina) PeerJ 9: e11622 <https://doi.org/10.7717/peerj.11622>

Christopher Y, Wcislo WT, Martínez Luis S, Hughes WOH, Gerardo NM, Fernández Marín H. (2021). Disease management in two sympatric *Apterostigma* fungus-growing ants for controlling the parasitic fungus *Escovopsis*. *Ecol Evol*; 00:1–12.

Currie CR, Mueller UG, Malloch D. (1999). The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7998–8002

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.

Dentinger, B.T.M., D. J. Lodge, A. B. Munkacsi, D. E. Desjardin, and D. J. McLaughlin. (2009). Phylogenetic placement of an unusual coral mushroom challenges the classic hypothesis of strict coevolution in the *Apterostigma pilosum* group ant-fungus mutualism. *Evolution* 63: 2172–2178.

Duffield RM, Blum MS. (1973). 4-Methyl-3-heptanone: identification and function in *Neoponera villosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 66: 1357.

Feener DH Jr, Brown BV. (1997). Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology* 42: 73–97.

Feener DH Jr, Jacobs LF, Schmidt JO. (1996). Specialized parasitoid attracted to a pheromone of ants. *Animal Behaviour* 51: 61–66.

Fernández F, Sendoya SF (2004) List of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biota Colombiana* 5: 3–109.

Fernández-Marín, H., J. K. Zimmerman, and W. T. Wcislo. (2006). *Acanthopria* and *Mimopriella* parasitoid wasps (Diapriidae) attack *Cyphomyrmex* fungus-growing ants (Formicidae, Attini). *Naturwissenschaften* 93: 17–21.

Gerardo NM, Mueller UG, Currie CR (2006) Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. BMC Evol Biol 6:88.

Goes, AC, Barcoto, MO, Kooij, PW, Bueno, OC y Rodrigues, A. (2020). ¿Cómo reconocen las hormigas cortadoras de hojas los microbios antagonistas en sus cultivos de hongos? Frontiers in Ecology and Evolution, 8, 95. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00095>

González, C., Wcislo, W., Cambra, R., Wheeler, T. & Fernández-Marín, H. (2016). A New Ectoparasitoid Species of *Pseudogaurax* Malloch, 1915 (Diptera: Chloropidae), Attacking the Fungus-Growing Ant, *Apterostigma dentigerum* Wheeler, 1925 (Hymenoptera: Formicidae). Annals of the Entomological Society of America, Volume 109, Pages 639–645, <https://doi.org/10.1093/aesa/saw023>

Hanisch PE., Sosa-Calvo J., Schultz TR. (2022) ¿La última pieza del rompecabezas? Posición filogenética e historia natural del género monotípico de hormigas cultivadoras de hongos *Pramyctophylax* (Formicidae: Attini). Insect Systematics and Diversity, Volumen 6:1.

Kempf WW (1972) Catálogo abreviado das Formigas da Região Neotropical (Hym. Formicidae). Studia Entomologica 15: 3–344.

Kreisel H (1972) Pilze aus Pilzgärten von *Atta insularis* en Kuba. Z Allg Mikrobiol 12:643–654. <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120805>

Lachaud, J.-P., and G. Perez-Lachaud. (2015). Ectaheteromorph ants also host highly diverse parasitic communities: A review of the Neotropical genus *Ectatomma*. Insectes Soc. 62: 121–132.

Lattke, J. E. (1997). Revisión del género *Apterostigma* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). Arq. Zool 34: 121–221.

Leal CA., Griffith GW, Neves MA. (2020). Reclasificación de Pterulaceae Corner (Basidiomycota: Agaricales) introduciendo el género asociado a hormigas *Myrmecopterula* gen. nov., *Phaeopterula* Henn. y la familia corticioide Radulomycetaceae. nov. IMA Fungus 11, 2. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0022-6>

- Masiulionis, V. E., Cabello, M. N., Seifert, K. A., Rodrigues, A. y Pagnocca, F. C. (2015). *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107, 731-740.
- Mathis KA, Philpott SM. (2012). Current understanding and future prospects of host selection, acceptance, discrimination, and regulation of phorid fly parasitoids that attack ants. *Psyche* 2012: Article ID 895424
- Mayhé-Nuñez, A.J. & Brandão, C.R.F. (2007). Revisionary studies on the attine ant genus *Trachymyrmex* FOREL. Part 3: The Jamaicensis group (Hymenoptera: Formicidae). – *Zootaxa* 1444: 1-21.
- Mehdiabadi NJ., Schultz, TR (2009). Historia Natural y Filogenia de las hormigas cultivadoras de hongo (Hymenoptera: Formicidae: Mirmicinae: Attini).
- Meirelles, L. A., Montoya, Q. V., Solomon, S. E. y Rodrigues, A. (2015). New light on the systematics of fungi associated with Attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. *Plos One*, 10, e0112067.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH (1992) Un protocolo simple y eficiente para el aislamiento de ADN de alto peso molecular de hongos filamentosos, cuerpos fructíferos y tejidos vegetales infectados. *Nucleic Acids Res* 20:6115–6116
- Montoya QV, Martiarena, MJS, Bizarria JR. (2021). Hongos que habitan en colonias de hormigas attinas: reevaluación del género *Escovopsis* y descripción de los genes *Luteomyces* y *Sympodiorosea*. noviembre. *IMA Hongo* 12, 23 <https://doi.org/10.1186/s43008-021-00078-8>
- Montoya QV., Martiarena MJS. Rodrigues A. (2023). Taxonomy and systematics of the fungus-growing ant associate *Escovopsis* (Hypocreaceae). *Studies in Mycology* 106: 349–397.
- Montoya, QV., Martiarena MJS., Augusto DP, Akazu S., Rodrigues A. (2019). More pieces to a huge puzzle: Two new *Escovopsis* species from fungus gardens of attine ants. *MycoKeys*, (46), 97–118. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.46.30951>
- Moreira, AA, Forti, LC, Boaretto, MAC, Andrade & Lpes, JFS. (2004). Arquitectura de nido de *Atta laevi* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *Estudios sobre Fauna Neotropical y medio ambiente* 39: 109- 116.

Muchovej JJ, Della Lucia TMC (1990) *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomen invalidum. *Mycotaxon* 37: 191–195.

Mueller UG, Rehner SA, Schultz TR. (1998). The evolution of agriculture in ants. *Science* 281:2034–38

Mueller UG., Schultz TR., Currie CR., Adam RMM., Malloch D (2001). Origin of the ant-fungus mutualism attine. *Quarterly journal of biology*, p. 97.

Mueller, U.G., (2002). Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant-Cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attine Ant-Fungus Symbiosis.

Munkacsi, A. B., J. J. Pan, P. Villesen, U. G. Mueller, M. Blackwell, and D. J. McLaughlin. (2004). Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271:1777–1782.

Pérez-Ortega, B., H. Fernández- Marín, M. S. Loiacono, P. Galgani, and W. T. Wcislo. (2010). Biological notes on a fungus-growing ant, *Trachymyrmex* cf. *zeteki* (Hymenoptera, Formicidae, Attini) attacked by a diverse community of parasitoid wasps (Hymenoptera, Diapriidae). *Insectes Soc.* 57: 317–322

Quevillon LE. (2018). Ecología, epidemiología y evolución de parásitos que infectan a las hormigas (Hymenoptera: Formicidae).

Rabeling C, Bacci M (2010) A new workerless inquiline in the Lower Attini (Hymenoptera: Formicidae), with a discussion of social parasitism in fungus-growing ants. *Syst Entomol* 35:379–392. doi:10.1111/j.1365-3113.2010. 00533.x

Rabeling, C., Cover, S.P., Johnson, R.A. & Mueller, U.G. (2007): A review of the North American species of the fungus gardening ant genus *Trachymyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). – *Zootaxa* 1664: 1-54.

Read, AF y Taylor, LH (2001). La ecología de infecciones genéticamente diversas. *Science*, 292, 1099-1102. <https://doi.org/10.1126/science.1059410>.

Ronque M.U.V., R.M. Feitosa, P.S. Oliveira. (2019). Natural history and ecology of fungus-farming ants: an old study in Atlantic rainforest. *Insects Soc.* 66: 375–387

Santos AV., Dillon RJ., Dillon V M., Reynolds SE., Samuels RI (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Microbiology Letters*, 239, 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.005>

Schultz TR, Solomon SA, Muller UG, Villesen P, Boomsma JJ, Adams RMM, Norden B. (2002). Especiación críptica en las hormigas productoras de hongos *Cyphomyrmex longisca* pus WEBER y *Cyphomyrmex muelleri* SCHULTZ y SOLO MON, nuevas especies (Formicidae: Attini). *Insectes Sociaux* 49: 331- 343.

Schultz, T.R. & Brady, S.G., (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14), pp.5435–5440.

Schultz, TR (2007). The fungus-growing ant genus *Apterostigma* in Dominican amber. In: *Memoirs of the American Entomological Institute. Memoirs of the American Entomological Institute*, pp. 425–436

Seifert KA, Samson RA, Chapela IH. (1995). *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia* 87:407–13

Sosa-Calvo, J., A. Ješovnik, C.T. Lopes, A. Rodrigues, C. Rabeling, M. Bacci Jr., H. L. Vasconcelos, T. R. Schultz. (2017). Biology of the relict fungus-farming ant *Apterostigma megacephala* Lattke, including descriptions of the male, gyne, and larva. *Insectes Soc.* 64: 329–346

Taerum SJ, Cafaro MJ, Currie CR (2010) Presencia de infecciones multiparasitarias en colonias individuales de hormigas cortadoras de hojas. *Environ Entomol* 39:105–113. <https://doi.org/10.1603/EN09137>

Taerum SJ, Cafaro MJ, Little AEF, Schultz TR, Currie CR. (2007). Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. *Proc R Soc Lond B*; 274:1971–8

Villesen, P., Mueller, UG, Schultz, TR, Adams, RMM & Bouck, MC. (2004). Evolución de la especialización de cultivares de hormigas y el cambio de cultivares en hormigas productoras de hongos *Apterostigma*- *Evolución* 58: 2252-2265.

Vo TL, Mueller UG, Mikheyev AS (2009) Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). *Mycologia* 101: 206–210.
<https://doi.org/10.3852/07-055>

Weber NA (1972). Gardening ants, the attines. Memoirs of the American Philosophical Society, Philadelphia

Weber NA. (1940). La biología de las hormigas cultivadoras de hongos. Parte VI. Clave para *Cyphomyrmex*, nueva Attini y una nueva hormiga huésped. *Revista de Entomologia*, Rio de Janeiro: 11 :406-427

White, TJ, TD Bruns, SB Lee y JW Taylor. (1990). Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN ribosómico fúngico para filogenética.