

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS:

HONGOS BASIDIOMICETOS CULTIVADOS POR LAS HORMIGAS *Apterostigma dentigerum*, Y LA TASA DE PARASITISMO LARVAL CAUSADA POR LAS AVISPAS PARASITOIDES EN PANAMÁ.

POR:

HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, MARISTEL MABEL

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“HONGOS BASIDIOMICETOS CULTIVADOS POR LAS HORMIGAS *Apterostigma dentigerum*, Y LA TASA DE PARASITISMO LARVAL CAUSADA POR LAS AVISPAS PARASITOIDES EN PANAMÁ”.

Por:

Maristel Hernández Rodríguez

3 – 744 – 785

Maristel Hernández R.

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

Mgter. Nivia Ríos

Mgter. Ariadna Bethancourt

Dr. Hermógenes Fernández

Nivia Ríos
Ariadna Bethancourt
Hermógenes Fernández

Dedicatoria

*A Dios que me brinda sabiduría y
paciencia en todo momento, a todas
aquellas personas que conocí y estuvieron
compartiendo conmigo el camino de
un investigador, gracias por su apoyo.*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO I:.....	13
PLATAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1 JUSTIFICACIÓN	14
1.2 OBJETIVOS	16
General	16
Específicos.....	16
1.3 HIPÓTESIS	16
CAPÍTULO II:.....	17
ANTECEDENTES	17
2.1 Hormigas cultivadoras de hongo: género <i>Apterostigma</i>	18
2.1.1 <i>Ubicación de las especies del género Apterostigma</i>	19
2.2 Dispersión y mantenimiento del hongo basidiomiceto	20
2.3 Agricultura entre los hongos basidiomicetos y las hormigas <i>Attina</i>	21
2.4 Clados de los hongos basidiomicetos cultivados por las hormigas <i>Attina</i>	21
2.5 Historia del hongo basidiomiceto cultivado por el género <i>Apterostigma</i>	22
2.5.1 <i>Cambios en la familia Pterulaceae</i>	23
2.5.2 <i>Diversidad y distribución de las especies del género Myrmecopterula</i>	24
2.6 Interacción hormiga-parasitoide	25
2.7 Familia Diapriidae	27
2.8 Tribu Diapriini	27
2.9 Género <i>Leucopria</i>	28
CAPÍTULO III:.....	30
MARCO METODOLÓGICO	30
3.1 Área de estudio	31
3.2 Recolección de nidos.....	31
3.3 Registros de datos demográficos de los nidos de <i>Apterostigma dentigerum</i> ...	32
3.4 Taxonomía	34
3.5 Aislamiento de jardín de hongos	34

3.6 Identificación molecular	36
3.6.1 <i>Extracción de ADN para el cultivo fúngico</i>	36
3.6.2 <i>Cuantificación del ADN</i>	37
3.6.3 <i>Amplificación del ADN del hongo simbiote</i>	37
3.6.4 <i>Purificación del producto de PCR</i>	38
3.6.5 <i>Secuenciación del producto de PCR</i>	38
3.7 Microscopia óptica	39
3.8 Criopreservación en Glicerol	39
CAPÍTULO IV:	40
RESULTADOS	40
4.1 Registro de datos demográficos de nidos de <i>Apterostigma dentigerum</i>	41
4.2 Prevalencia del parasitismo de avispa	43
4.3 Intensidad del parasitismo de avispa	46
4.4 Aislamiento de los hongos que constituye el jardín	48
4.4.1 <i>Colecta de nidos para el aislamiento del jardín de hongos</i>	48
4.4.2 <i>Aislamiento del jardín de hongos</i>	48
4.4.3 <i>Microscopia óptica</i>	50
4.5 Identificación molecular	51
4.5.1 <i>Amplificación de ADN</i>	51
4.5.2 <i>Secuenciación tipo Sanger y árbol filogenético</i>	53
CAPÍTULO V:	55
DISCUSIÓN	55
5.1 Diversidad de Diapriidae atacando a <i>Apterostigma dentigerum</i>	56
5.2 Intensidad y prevalencia del parasitismo por avispa	57
5.3 Análisis filogenético	58
5.4 Diversidad genética de <i>Myrmecopterula</i>	60
CAPÍTULO VI:	61
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
6.1 Conclusión	62
6.2 Recomendaciones	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1 Demografía de <i>Apterostigma dentigerum</i> de 76 nidos colectados a lo largo del Sendero de Plantación, Parque Nacional Soberanía.	42
Tabla 2 Intensidad de nidos de <i>Apterostigma dentigerum</i>	47
Tabla 3 Total, de nidos colectados para el aislamiento de los hongos que constituye el jardín de <i>Apterostigma dentigerum</i>	48
Tabla 4 Secuencias extraídas de los nidos de <i>Apterostigma dentigerum</i>	53

ÍNDICE DE ILUSTRACIÓN

Ilustración 1 a) Muestra un parasitoide adulto solitario completamente desarrollado, listo para emerger.	33
Ilustración 2 A) Cámara del jardín de hongo basidiomiceto de las hormigas <i>Apterostigma dentigerum</i> ,	35
Ilustración 3 Parasitoides Diapriidae de <i>Apterostigma dentigerum</i> ; vista lateral de <i>Leucropia</i> sp1: e) avispa femenina	42
Ilustración 4 Prevalencia por mes de avispas Diapriidae que atacan a <i>A. dentigerum</i>	43
Ilustración 5 Se presenta una comparación mensual en relación con la cantidad de nidos colectados vs. la cantidad de nidos parasitados por avispas.	44
Ilustración 6 Prevalencia de nidos de hormigas <i>A. dentigerum</i> que estaban infestados con morfoespecies de avispas <i>Leucopria</i>	46
Ilustración 7 Aislamiento puro del jardín de hongo simbiote de <i>Apterostigma dentigerum</i> , mostrando crecimiento a los 15 días e incubado a 27 °C.	50
Ilustración 8 Microscopía óptica. Se observa señalado con flecha una estructura denominada fíbula, también llamada conexión en fíbula (unión en fíbula), en abrazadera o clamp, con un aumento: de 100X y escala: 100 µm.	51
Ilustración 9 Bandas visualizadas de la PCR realizada al ADN genómico del hongo <i>Myrmecopterula velohortorum</i> , en gel de agarosa al 1%.	52
Ilustración 10 Árbol filogenético mediante Inferencia Bayesiana	54

ÍNDICE DE ABREVIATURA

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CE-: Tubo de control

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dNTPs: Trifosfatos de desoxirribonucleótidos

H₂O: Fórmula química del agua

INDICASAT: Instituto De Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá

ITS: Espaciador transcrito interno

ITS4: Primer reverse

ITS5: Primer forward

MgCl₂: Cloruro de magnesio

mM: Milímetro

nrLSU: Subunidad grande del ribosoma nuclear

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Agar de papa y dextrosa

RPB2: Subunidad 2 de la ARN polimerasa B

μL: Microlitro

RESUMEN

De los géneros de hormigas cultivadoras de hongos, el género *Apterostigma* es el único en cultivar múltiples linajes de hongos, incluidos en las familias *Pterulaceae* y *Agaricaceae*. Basado en la diversidad de hongos cultivares, los nidos de las hormigas *Apterostigma* acumulan importantes recursos que son atractivos para una amplia diversidad de organismos como depredadores, patógenos microbianos, parásitos y parasitoides. El objetivo del presente trabajo es describir la diversidad de hongos simbioses asociado con los nidos de la hormiga *Apterostigma dentigerum*, y estimar el efecto de las avispas parasitoides en sus nidos. Para desarrollar este objetivo se colectaron un total de 156 nidos de hormigas *Apterostigma dentigerum* dentro del Parque Nacional Soberanía, entre los meses de marzo y agosto del 2023, de estos nidos se obtuvieron datos demográficos, y se realizaron estudios moleculares para la identificación de los hongos basidiomicetos. Un total de 18 nidos fueron parasitados por el género *Leucopria*, con una tasa de prevalencia de 23.68% y una intensidad del parasitismo de 8.26%. Además, se registraron dos nuevas morfoespecies de este género de avispas. Para identificar el hongo simbiote de las hormigas cultivadoras de hongo de la especie *Apterostigma dentigerum* se amplificó la región ITS1- 5,8S-ITS2 del ADN, y se identificó el hongo simbiote *Myrmecopterula velohortorum*. Recomendando estandarizar mejor el método de extracción para cada hongo basidiomiceto, así se obtiene un material de ADN del hongo con una concentración ideal y conducir estudios sobre la taxonomía de las avispas parasitadas Diapriidae relacionados a la tribu Attini.

Palabras claves: *Myrmecopterula*, Diapriidae, Attini, PCR y microscopia.

INTRODUCCIÓN

Las hormigas son unos de los grupos de insectos más importantes, diversos y abundantes en los ecosistemas terrestres, sus nidos están formados de pocas decenas hasta por millones de individuos, influyendo en la estructura y dinámica de los ecosistemas terrestres, especialmente en las zonas tropicales y de baja altitud. Dentro de este grupo se encuentran las hormigas cultivadoras de hongos de la tribu Attini, incluida la subtribu Attina que comprende 17 géneros existentes, 265 especies descritas, además de cinco especies fósiles. Las hormigas de la subtribu Attina están exclusivamente en el Nuevo Mundo, principalmente son neotropicales en cuanto a su distribución, este grupo monofilético de hormigas ha evolucionado hace unos 66 millones de años. Posiblemente, los ancestros se alimentaban principalmente de caza y recolección de artrópodos, además de coleccionar néctar o exudaciones de plantas. El cambio de alimentación basada en caza y recolección a una alimentada por fungívoros (comer hongos), les permitió formar una relación simbiótica con hongos basidiomicetos, llegando incluso a domesticarlo y desarrollar un sistema agrícola obligatorio (Mueller et al., 2008; Sosa-Calvo et al., 2017; Schultz et al., 2024).

Las especies más evolucionadas de las hormigas Attina, como las cortadoras de hojas, han perfeccionado esta relación mutualista, domesticando el hongo simbiótico, que es completamente clonal e incapaz de sobrevivir fuera de los nidos de hormigas. Sin embargo, las especies más primitivas de las Attina también cultivan hongos basidiomicetos, las cuales pueden ser facultativos, ya que pueden vivir de forma independiente en la naturaleza, sin necesidad de depender del nido de las hormigas (Mehdiabadi et al., 2012).

Las hormigas cultivadoras de hongo cuentan con un sistema de limpieza altamente eficaz, que incluye un aseo personal antes de ingresar al nido y utilizar áreas fuera del nido como vertederos, además de ser capaces de mantener relaciones con bacterias mutualistas llamadas actinomicetos. Sin embargo, existen diversos patógenos que afectan el hongo que cultivan las hormigas, como el parásito fúngico *Escovopsis*, el cual puede tener un impacto drástico en la salud y supervivencia de los jardines de hormigas que cultivan hongos (Christopher et al., 2021).

Los jardines de hongos basidiomicetos son atacados por *Escovopsis*, un género de microhongos (Ascomycota, Hypocreales) que se encuentran asociados con nidos de hormigas cultivadoras de hongos, aunque no hay estructuras parasitarias especializadas, se reportó que este parásito es capaz de matar el hongo cultivado, así como a las hormigas y sus bacterias mutualistas mediante compuestos químicos. Puede crecer rápidamente en los jardines si las hormigas están ausentes, no obstante, bajo algunas condiciones, incluso en presencia de las hormigas, puede devastar completamente las colonias al invadir todo el jardín. Sin embargo, esta especificidad no se mantiene por transmisión junto con el hongo hospedero, ya que los patrones de infección sugieren que *Escovopsis* se transmite horizontalmente entre los nidos, a través, de un mecanismo aún desconocido (Gerardo et al., 2004; Montoya et al., 2019).

Las hormigas *Attina* tienen un sistema de defensa fuerte contra individuos que intentan ingresar a sus nidos, debido a su gran diversidad y abundancia se convierten en una fuente de alimento para una amplia gama de insectos parasitoides, llegando a afectar aspectos biológicos, interacciones ecológicas complejas y las dinámicas de su hospedero. Dentro de este grupo de parasitoides se incluye el grupo de moscas

(Phoridae), así como el grupo de las avispas Diapriinae, la biología de la mayoría de estas especies no es conocida (González et al., 2016). Con algunas excepciones las avispas parasitoides hembras afectan a las crías de las hormigas cultivadoras de hongo, ovipositan sobre o dentro del cuerpo de su hospedero, y todas las etapas juveniles se desarrollan en el hospedero siendo susceptibles a ataque de hormigas. La larva parasitoide se alimenta de los tejidos del hospedero, causándole la muerte de manera progresiva, en su etapa adulta mantiene una vida libre cerca de los nidos de su hospedero (Lachaud et al., 2012). Para evitar ataques y no ser detectadas por parte de las hormigas, es posible que los parasitoides utilicen señales de hidrocarburos cuticulares (CHC). Después de obtener acceso a la sociedad hospedero, los parásitos y sus crías exigen atención y suministro de alimentos de las obreras anfitrionas.

CAPÍTULO I:
PLATAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 JUSTIFICACIÓN

La relación simbiótica hormiga-hongo establecida en hormigas del género *Apterostigma* ha generado una serie de estudios de análisis filogenético lo que representa una serie de clasificaciones de su hongo cultivar, siendo la de Leal-Dutra et al., 2020 la más aceptada hasta el momento, en su estudio reclasifica y delimitan los hongos de la familia *Pterulaceae*. Otorgándonos piezas a un enigmático rompecabezas de la evolución de los hongos cultivar para el género de *Apterostigma* con el fin de determinar si el hongo simbionte ha variado con los años. El género *Myrmecopterula* ha sido de interés debido a su asociación con hormigas cultivadoras de hongos presentando diferencia de su clado hermano *Pterula* por la presencia del subículo algodónoso (gongylidia, hinchazones de hifas ricas en nutrientes de las que se alimentan las hormigas).

Las hormigas Attini son atacadas por una gran cantidad de enemigos naturales en especial por las avispas diapiirinas al igual que sus hospederos estos parasitoides son abundantes y extensos, pero se sabe poco sobre la biología de la mayoría de las especies. Las avispas que atacan a las hormigas del género *Apterostigma* son de interés para saber si se mantienen los mismos o se da posibles nuevas identificaciones de estos enemigos que atacan a las larvas de estas hormigas, brindando datos cuantitativos sobre el impacto que tienen en sus hospederos (González et al., 2016). Estudios previos han dado a conocer el impacto de los diapiiridos en otras poblaciones de hormigas cultivadoras de hongo, Fernández-Marín et al., (2006b) aportó datos estadísticos indicando que entre el 27 y el 70% de las colonias de 2 especies de *Cyphomyrmex* fueron parasitadas por una especie en Puerto Rico y por hasta 4

morfoespecies concurrentes de Diapriides en Panamá. Por otro lado, el trabajo de Pérez-Ortega et al., 2010 mostró que otra hormiga productora de hongos, *Trachymyrmex* cf. *zeteki*, fueron atacada por una comunidad diversa de diapriidos en Panamá, con una intensidad media de parasitismo larvario por colonia de hormigas del 33,9%, y una prevalencia en todas las poblaciones de hormigas del 27,2% (datos globales para las 6 morfoespecies diapriidas presentes en el sitio de estudio) (Lachaud et al., 2012).

1.2 OBJETIVOS

General

Describir al hongo simbiote asociado con los nidos de las hormigas *Apterostigma dentigerum* mediante análisis morfológicos, moleculares y estimar el efecto de las avispas parasitoides dentro de sus nidos.

Específicos

1. Determinar la prevalencia e intensidad de las avispas parasitoides de la hormiga cultivadora de hongo de *Apterostigma dentigerum*
2. Describir la relación filogenética del hongo simbiote basidiomiceto cultivado en los nidos de las hormigas *Apterostigma dentigerum*.
3. Identificar a través de microscopia óptica el hongo simbiote presente en una especie específica del género *Apterostigma dentigerum*.

1.3 HIPÓTESIS

Los hongos cultivados por las hormigas *Apterostigma dentigerum* no varían genéticamente entre dos poblaciones ni sus parasitoides.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

2.1 Hormigas cultivadoras de hongo: género *Apterostigma*

El género *Apterostigma* fue descrito por el mirmecólogo Ernst Mayr en su trabajo taxonómico de 1865, describió este género basándose en machos y reinas aladas capturados en el Sur de Brasil. En ese momento, se identificaron 45 especies. Posteriormente, varios investigadores han ido ampliando el número de especies del género mediante descripciones aisladas.

El género *Apterostigma* está dividido en dos grandes grupos según las características de las obreras: el grupo *auriculatum* poseen un perfil del clípeo con aspecto transversal y opaco, una franja anterior de cutícula brillante y estriado; metanoto con aristas dorsales, se incluyen: *A. auriculatum*, *A. avium*, *A. bolivianum*, *A. chocoense*, *A. depressum*, *A. epinotale*, *A. pariense*, *A. reburrum*, *A. spiculum*, *A. tachirense*, *A. tholiforme*, y *A. turgidum*; el segundo grupo *pilosum* se caracteriza por tener un perfil anterior del clípeo siempre convexo y con una franja anterior de cutícula brillante, generalmente con finas estrías transversales; metanoto sin aristas dorsales; tibias y escapos lisos, imbricados o con rugosidades, rara vez con finas arrugas transversales, contiene las demás especies del género, dentro de este grupo se reconoce una agrupación de nueve especies nominales muy parecidas y aparentemente emparentadas que no pudieron ser separadas (Lattke, 1997).

Dentro del género *Apterostigma* se incluye *Apterostigma megacephala* como un grupo hermano de los otros dos grandes grupos de este género. *Apterostigma megacephala* comparte las siguientes sinapomorfías con el resto de las *Apterostigma*: (1) cada ojo compuesto está parcial o totalmente montado sobre un tubérculo; (2) presencia de una cresta o lámina cefálica posterior que une los lóbulos occipitales; (3) un lóbulo

anterodorsal que se superpone parcialmente al helcio (es una parte del exoesqueleto de las hormigas, específicamente una placa pequeña y articulada en la región del abdomen que conecta el pecíolo con el resto del cuerpo) del primer tergito gastral. El tubérculo ocular está mucho más desarrollado en *A. megacephala*, siendo más grande que el propio ojo, mientras que en otros *Apterostigma* el ojo siempre es más grande (Lattke, 1999).

Varios autores han clasificado al género *Apterostigma* de diferentes maneras como, Emery (1922:332) lo incluyó como uno de los linajes más primitivos dentro de la tribu Attini, agrupándolo con los géneros *Myrmicocrypta* F. Smith, *Apterostigma* Mayr y *Mycocepurus* Forel. En investigaciones posteriores, Kusnezov (1963) los identificó como Paleoattina, una unidad separada dentro de la tribu, debido a las particularidades de sus nidos y hongos, el tipo de sustrato que utilizan para cultivar los hongos, su polimorfismo y sus comportamientos (Lattke, 1997; Armitage et al., 2012).

2.1.1 Ubicación de las especies del género *Apterostigma*

Se ubican en bosques húmedo, montano tropical o subtropicales, su distribución es extensa va desde Brasil a través de América Central hasta México. Los nidos de estas hormigas se construyen debajo de rocas o raíces, en cavidades del suelo o madera en descomposición, aunque algunas de sus especies son arborícolas construyendo sus nidos en el envés de las hojas.

El jardín de hongos basidiomicetos que cultivan tiene una forma de masa esférica que puede estar o no cubierta por un velo de micelio, esta masa de hongo posee cavidades redondeadas a elipsoide, en cuyo interior se encuentran las formas inmaduras (huevos, larvas y pupas), así como la reina, que está envuelta en el micelio. Las

hormigas suelen abonar el hongo cuidadosamente con sustrato de heces de insectos y materia leñosa muerta; sus nidos son pequeños y rara vez superan los 100 individuos. Cuando el nido es descubierto, las hormigas que se encuentran en el interior del hongo dejan de moverse (Armitage et al., 2012).

2.2 Dispersión y mantenimiento del hongo basidiomiceto

Las hormigas *Attina* poseen una relación simbiótica obligatoria con los hongos basidiomicetos que cultivan, de forma que las hormigas nutren, protegen y dispersan los hongos cultivados como clones en sus nuevos nidos, mientras que se alimentan del hongo como única fuente nutricional de las larvas y usualmente de los adultos, las hormigas son incapaces de sobrevivir sin el hongo que cultivan. Al fundar un nuevo nido, la reina joven toma un fragmento del hongo de la colonia maternal, y lo transportan dentro de su bolsillo infrabucal durante su vuelo nupcial. Una vez que se establece en el nuevo sitio, la reina coloca el fragmento de hongo sobre una plataforma de rocas o realiza la suspensión del hongo cultivar utilizando raicillas que cuelgan sobre la cámara claustra. Durante las primeras semanas, la reina fundadora utiliza materiales frescos, como hojas o huevos tróficos (huevos no fecundados que sirven únicamente para la nutrición) que ellas mismas producen, para hacer crecer el fragmento de hongo. La reina cuida del jardín hasta que se cría la primera generación de obreras, momento en el cual las obreras asumen las tareas de mantenimiento del jardín de hongos. Las hormigas obreras promueven el crecimiento del hongo aplicando pequeñas gotas o "pellets" fecales, mientras que, para el cuidado del micelio, se encargan de extraer las esporas contaminadas y aplicar antibióticos. Este jardín de hongos basidiomicetos se reproduce de forma vertical (Fernández-Marín et al., 2004).

2.3 Agricultura entre los hongos basidiomicetos y las hormigas *Attina*

La evolución de los hongos basidiomicetos cultivado por las hormigas *Attina* comprende cuatro sistemas agrícolas: (1) la agricultura de bajo nivel considerado el sistema ancestral, evoluciono a finales del periodo Cretácico, es un grupo parafilético que incluye 85 especies de hormigas (grupo *pilosum*) cultivadoras del hongo de la familia *Agaricaceae* (*Leucocoprineae*), (2) agricultura de las levaduras incluyen 19 especies de hormigas, crece de una forma similar a las levaduras, se encuentran dentro de la familia *Agaricaceae*, (3) la agricultura de hongos coralinos formado por 30 especies de hormigas (grupo *Apterostigma pilosum*) que cultivan hongos de la familia *Pterulaceae* y (4) el sistema de agricultura superior (sistema de mayor derivación evolutiva) incluye 113 especies de hormigas que cultivan hongos de la familia *Agaricaceae*, el hongo que cultivan producen cuerpos alimenticios conocidos como gongylidia. Este grupo dio origen a las hormigas cortadoras de hojas incluyendo 52 especies, en su mayoría cultivan una sola especie de hongo denominado *Leucoagaricus gongylophorus*, que para algunos autores representa un quinto sistema como agricultura cortadora de hojas. Durante la coevolución la hormiga a domesticado múltiples linajes de hongos de vida libre, como resultado de intercambios de cultivares, a diferencia de la hormiga, los hongos no son monofiléticos (Schultz et al., 2024).

2.4 Clados de los hongos basidiomicetos cultivados por las hormigas *Attina*

Los hongos basidiomicetos de las hormigas *Attina* se dividen en dos clados basándose en relaciones filogenéticas: el clado Neoattina incluye los géneros attines altamente derivados que son la *Acromyrmex* y *Atta*, conocidas como “hormigas cortadoras de hojas” (*Attinas* superiores) debido a su comportamiento de utilizar material fresco como

sustrato para la fungicultura, presentan nidos densamente poblados con muchas cámaras (por ejemplo, los nidos de *Atta* pueden tener cientos de cámaras subterráneas) y polimorfismo en sus obreras. Por otro lado, el clado Paleoattina (linajes filogenéticamente basales), conocidas como attinas inferiores poseen pequeños tamaños corporales, comportamientos y nidos discretos, a diferencia de las hormigas cortadoras de hojas, estas hormigas generalmente no son polimórficas, tienen colonias pequeñas a medianas (de decenas hasta cientos de obreras) teniendo en sus nidos de una a unas pocas cámaras, además, utilizan heces de artrópodos, detritos de plantas, cadáveres de insectos y partes frescas de plantas (por ejemplo, semillas, flores, pulpa de frutas) como sustratos para su hongo basidiomiceto. Ocasionalmente, *Trachymyrmex* y *Sericomyrmex* también pueden cosechar hojas y flores frescas (Ronque et al., 2018; Currie, 2001).

2.5 Historia del hongo basidiomiceto cultivado por el género *Apterostigma*

La relación simbiótica obligatoria entre el hongo basidiomiceto y el género *Apterostigma* ha experimentado varios cambios a lo largo de su coevolución, convirtiéndola en uno de los grupos más especializados dentro de las hormigas Attina.

De los dos principales grupos en los que se divide el género *Apterostigma*, encontramos que algunas especies del grupo *auriculatum* mantienen la asociación ancestral de las hormigas Attini con *Leucocoprineae* de la familia *Agaricaceae*. Mientras que para las otras especies del género *Apterostigma* dentro del grupo *pilosum*, sucedió un evento aleatorio que resultó en el cambio de su hongo simbiótico ancestral por otro completamente distinto, perteneciente a la familia *Pterulaceae*, que se caracteriza por ser hongos coralinos.

Las especies incluidas en el grupo *pilosum* cultivan dos clados distintos de hongos basidiomicetos. Algunas especies de hormigas como *Apterostigma mani* cultivan un hongo del clado *P. nudihortorum*, mientras que otras especies se dedican al cultivo del clado fúngico *P. velohortorum*. Entre ellas se incluyen *A. dentigerum*, *A. dorotheae*, *A. collare* y un subconjunto del complejo *pilosum* descrito por Lattke (1997). Estas son algunas de las especies de *Apterostigma* que cultivan estos hongos, hasta la fecha (Schultz, 2007).

Sin embargo, *Apterostigma megacephala* es la única especie del género *Apterostigma* que presenta un sistema agrícola más avanzado y especializado en comparación con el de la mayoría de las hormigas cortadoras de hojas. Este cambio ocurrió debido a una transferencia horizontal, en la que *Leucoagaricus gongylophorus* (familia *Agaricaceae*) reemplazó al hongo previamente cultivado por *Apterostigma megacephala* un hongo que pertenecía a un cultivar de attino inferior (Dentinger et al., 2009)

2.5.1 Cambios en la familia *Pterulaceae*

La familia *Pterulaceae* ha experimentado varios cambios debido a estudios filogenéticos y ecológicos de diversos autores.

Leal-Dutra et al., (2020) generaron datos de secuencias de numerosos especímenes que no habían sido incluidos en análisis filogenéticos previos de los distintos géneros dentro de *Pterulaceae*. Como resultado, se realizó una reconstrucción filogenética que permitió delimitar seis géneros: *Allantula*, *Coronicium*, *Merulicium*, *Myrmecopterula*, *Phaeopterula*, *Pterula* y *Pterulicium*. Esto dio lugar a la propuesta de un nuevo género llamado *Myrmecopterula* (anteriormente clasificado como *Pterula*), el cual se considera

un clado hermano de *Pterula*, agrupando las dos especies cultivadas por las hormigas attinas del grupo *Apterostigma pilosum* con *M. moniliformis* y varias especies de vida libre no identificadas (Leal-Dutra et al., 2020).

2.5.2 Diversidad y distribución de las especies del género *Myrmecopterula*

Las especies de *Myrmecopterula* se han registrado únicamente en el Neotrópico, asociadas a hormigas Attini. Se han identificado siete especies para este género, de las cuales dos están firmemente respaldadas como hongos cultivados por hormigas Attini, mientras que los demás hongos incluidas en este género se han encontrado creciendo en jardines de hongos basidiomicetos abandonados.

- *Myrmecopterula velohortorum* (Dentinger) Leal-Dutra (2019), Dentinger & Griff (2009).

Basiónimo: *Pterula velohortorum* Dentinger. Índice Fungorum 98: 1 (2014); como 'velohortus', y posteriormente 'velohorta'.

Cuando se encuentra en el campo, se reconoce el jardín de hongo por un velo micelial, generalmente dentro de troncos en descomposición, debajo de la hojarasca o colgando sobre superficies expuestas sobre el suelo. En cultivo, forma micelios aéreos muy algodonosos con presencia de hifas en raqueta (Figura 8).

Esta especie se conocía anteriormente como cultivar de hormigas G2.

- *Myrmecopterula nudihortorum* (Dentinger) Leal-Dutra (2019), Dentinger & Griff (2009).

Basiónimo: *Pterula nudihortorum* Dentinger, Index Fungorum 98: 1 (2014); como 'nudihortus', y posteriormente 'nudihorta'.

En el campo, se reconoce por la ausencia de cualquier velo en el jardín de hongos en nidos de *Apterostigma*, generalmente dentro de troncos en descomposición o bajo tierra. En cultivo, forma muy poco micelio aéreo.

Esta especie se conocía anteriormente como cultivar de hormiga G4.

- *Myrmecopterula moniliformis* (Henn.) Leal-Dutra et al., 2019.

La mayoría de los clados de *Myrmecopterula* menos uno encontrado hasta la fecha tenían alguna asociación con las hormigas attinas (especímenes "de vida libre"), de las cuales las dos especies mutualistas de granja (*M. nudihortorum* y *M. velohortorum*) son las más conocidas.

Las otras cinco especies (incluida *M. moniliformis*) han sido menos estudiadas y podrían estar involucradas en la descomposición de sustratos residuales de los jardines de hongos abandonados, o incluso actuar como micoparásitos de los cultivos de las hormigas. Aunque actualmente no hay evidencia directa que respalde esta hipótesis (Leal-Dutra et al., 2020).

2.6 Interacción hormiga-parasitoide

En los ecosistemas neotropicales, las hormigas son consideradas insectos dominantes que influyen en la estructura y dinámica del suelo y los árboles. Dentro de sus nidos, se pueden observar diversos casos de sociabilidad y parasitismo; muchos otros organismos dependen de estas hormigas a lo largo de toda su vida o gran parte de ella.

Para defenderse de individuos ajenos, las hormigas cuentan con mecanismos de reconocimiento que les permiten identificar a los miembros de su colonia y rechazar a

los forasteros, utilizando mecanismos químicos conocidos como hidrocarburos cuticulares (CHC). Esto les ayuda a prevenir la explotación de la colonia y a asegurar su funcionamiento adecuado. Sin embargo, a pesar de contar con este eficiente sistema, no siempre logran evitar ser engañadas (Pérez-Lachaud et al., 2015; Loiácono et al., 2000).

Los parasitoides diapriidos están altamente adaptados a sus hospederos, presentando tanto adaptaciones morfológicas como de comportamiento que les permiten convivir con las hormigas hospedadoras. Por ejemplo, exhiben un mimetismo morfológico extenso, imitando la coloración de las hormigas, una regresión de los ocelos, escultura similar, la presencia de sustancias apaciguadoras en estructuras especializadas y tricomas, así como comportamientos de trofalaxis (intercambio de alimentos líquidos de boca a boca entre las hormigas), entre otros. Estas adaptaciones les permiten evitar ser detectados o recibir agresiones por parte de las hormigas. Algunas especies incluso presentan apterismo secundario, donde las alas de las avispas son mordidas ya sea por el parásito mismo o por su hospedero (Loiácono et al., 2013).

No obstante, existen pocos datos sobre el comportamiento de las interacciones entre el hospedador y los diapriidos. Se ha sugerido que, a lo largo del tiempo, el ancestro de este grupo cambió sus hospederos de Diptera a Formicidae, lo que se atribuye posiblemente a la necesidad de las hembras diapriidas de buscar hospederos potenciales, lo que facilitó su integración con las hormigas (Yoder, 2007).

2.7 Familia Diapriidae

La mayoría de los parasitoides pertenecen al orden Hymenoptera (que incluye moscas sierras, hormigas, abejas y avispas) o al orden Díptera (moscas verdaderas). En cuanto a los parasitoides que afectan a las hormigas cultivadoras de hongos, se conoce un pequeño grupo de especies de himenópteros, principalmente de la familia Diapriidae, la cual es una población abundante y diversa.

Esta familia es relativamente poco conocida, con alrededor de 4000 especies descritas y se estima que existen en todo el mundo. Sin embargo, solo 121 especies en 34 géneros se han recolectado en asociación con hormigas, y se han registrado 26 especies en 7 géneros con comportamientos parasitoides, aunque menos de la mitad de ellas han sido descritas.

La familia Diapriidae está compuesta por pequeñas avispas parasitarias, que suelen medir entre 2 y 4 mm de largo, tienen una superficie corporal lisa y pulida, y generalmente presentan una coloración negra o marrón oscuro. Estas avispas se distinguen fácilmente de otros himenópteros por sus antenas, que se insertan sobre el clípeo. Aunque las especies más conocidas son principalmente endoparasitoides koinobiontes primarios de larvas o pupas, lo que significa que crecen y se desarrollan dentro de otro organismo u hospedero, mientras este continúa su ciclo de vida durante el parasitismo (Yoder, 2007).

2.8 Tribu Diapriini

Las Diapriini son un gran número de avispas asociadas con varios grupos de hormigas en América Central y del Sur. Son la única tribu que agrupa todos los géneros

mirmecófilos, algunos de los cuales están morfológicamente adaptados a la vida con hormigas. Estas adaptaciones incluyen un mimetismo de largo alcance con las hormigas hospedadoras. La taxonomía a menudo trabaja con especímenes que comúnmente no se pueden identificar más allá del género. Existe un dimorfismo sexual entre machos y hembras, por lo que la morfología y el número de segmentos antenales varían tanto según la especie como según el sexo del individuo (Masner & García, 2002).

2.9 Género *Leucopria*

El género de *Leucopria* se distribuye en las selvas tropicales de tierras bajas de América Central y del Sur (incluido México). Aún se desconoce cuáles son los hospedadores del género *Leucopria*; sin embargo, algunas adaptaciones morfológicas específicas en el sexo femenino sugieren una posible asociación con diversos grupos de hormigas.

Se han documentado dos casos de interacción entre hormigas y *Leucopria* (CNCI). En uno de estos casos, una especie se ha encontrado en el jardín de hongos de *Apterostigma auriculatum* Wheeler, ubicado en Costa Rica. En el otro caso, también en Costa Rica, se registró un posible caso de parasitoide, donde se observó una especie no descrita de *Leucopria* volando cerca de una columna de incursión de *Eciton burchellii* (Westwood) (Ecitonini), lo que demuestra que no son exclusivos del grupo Attini. Por otro lado, Weber & García obtuvieron sus especímenes mediante diversas trampas, sugiriendo que *Leucopria* podría ser nocturna, especialmente en sus hábitos de dispersión. Esto se respalda por la captura de numerosos individuos de ambos sexos en trampas de luz en los bosques lluviosos de tierras bajas de Panamá y Brasil.

Los individuos adultos del género *Leucopria* se diferencia por una gran mancha blanquecina-amarillenta en el ápice del metasoma con las de *Hansona* presente en las hembras; Masner & García reconocen dos grupos de especies dentro de *Leucopria*, estos individuos se puede confundir con *Acanthopria*, sin embargo, se pueden distinguir por la diferencia en la estructura del escutelo (fosa anterior, lados del disco escutelar), además por la presencia de una mancha especializada en S2, y especialmente por el ápice blanquecino-amarillento del metasoma femenino, y en los machos por la disposición de las cerdas en los antenómeros. Finalmente, los miembros de *Leucopria* son generalmente más pubescentes que los de *Acanthopria*, especialmente en el lado ventral del metasoma (Masner & García, 2002).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 Área de estudio

Se recolectaron 156 nidos de hormigas *Apterostigma*, entre los meses de marzo y agosto del 2023 en diferentes localidades dentro y alrededor del Parque Nacional Soberanía en dos senderos: sendero Plantation Loop road (Panamá) y en el Sendero Gamboa Pipeline Road (Colón) y en la Isla Coiba, Distrito de Montijo (Veraguas).

3.2 Recolección de nidos

- Con la ayuda de una linterna, se localizaron los jardines de hongos de las hormigas *Apterostigma*. Estos nidos se encuentran en la naturaleza como una masa esférica blanca, cubierta por un velo de micelio o sobre madera en descomposición. Luego, se limpió el área para extraer el jardín de hongos lo más limpio posible. Utilizando una cuchara y pinzas entomológicas, para extraer la masa esférica con el objetivo de recolectar la mayor cantidad de hormigas posibles, con el fin de mantener los nidos más estables para su transporte, se colocaron en platos Petri con toallitas limpiadoras húmedas.
- Posteriormente, las colonias colectadas fueron transportadas al Laboratorio de Insectos Sociales de INDICASAT. Se colocaron en platos Petri estériles de 100x 15 mm. Luego se retiraron la mayoría de los residuos grandes, como tierra y trozos de madera, entre otros materiales visibles. Para mantener la humedad de los nidos, se empleó una cámara húmeda que consistía en envolver el jardín de hongos con papel toalla humedecida con agua destilada, con el objetivo de mantener los jardines en condiciones adecuadas dentro del laboratorio.

- Se les proporcionó hojuelas de avena de dos a tres veces por semana, de igual manera, se humedecía el papel toalla las veces que fuera necesaria. Los nidos fueron monitoreados y aquellos que presentaron parasitismo fueron marcados para brindarles un cuidado especial. Si alguna avispa parasitoide llegaba a eclosionar, se colocaba en frío con etanol al 95% para su identificación, ya que, si no se retiraba a tiempo, podrían ser atacadas por las hormigas.

3.3 Registros de datos demográficos de los nidos de *Apterostigma dentigerum*

- Se utilizó un microscopio estereoscópico Leica (10×) para registrar los datos demográficos de cada nido, incluyendo el conteo de huevos, larvas, pupas, obreras, hembras aladas y machos. Se pesó el jardín de hongos y se examinaron minuciosamente todas las crías. También se recopilaron datos sobre la presencia de larvas de avispas endoparásitas.
- Se llevaron a cabo registros sobre la prevalencia e intensidad de los parasitoides; la prevalencia se refiere al porcentaje de nidos parasitados por avispas, mientras que la intensidad corresponde al porcentaje de larvas infectadas en relación con el total de larvas de hormigas dentro de los nidos afectados. Los resultados se expresaron como la media \pm una desviación estándar (Figura 1).
- Fórmulas usadas:

Prevalencia del parasitismo:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de nidos colectados con avispas parasitoides}}{\text{N}^\circ \text{ total de nidos colectados}} \times 100\%$$

Intensidad del parasitismo (por nido):

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas parasitadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de larvas de hormigas}} \times 100\%$$



Ilustración 1 a) Muestra un parasitoide adulto solitario completamente desarrollado, listo para emerger, b) una hormiga *A. dentigerum* transportando una larva parasitada fuera del jardín de hongos, regularmente cada vez que se extraía un pedazo de hongo eran transportadas al igual que las larvas sanas, c) larva de avispa desarrollada cubierta por micelio del hongo dentro del nido cuidada y protegida por obreras, d) avispas adultas dentro del nido sin ser atacadas por las hormigas obreras, se mantiene caminando sobre la masa de hongo.

3.4 Taxonomía

Para identificar las hormigas del género *Apterostigma*, se emplearon las siguientes 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)).
- Identificación de las avispas: Las avispas se montaron en alfileres entomológicos y fotografiaron para la confirmación taxonómica del género basándonos en el trabajo de Masner & García 2002, con el apoyo del magíster en Entomología Gabriel Arauz, las características se visualizaron con un esteromicroscopio Leica del Laboratorio de Biodiversidad de INDICASAT.

3.5 Aislamiento de jardín de hongos

Se extrajo el material fúngico y se aisló “in situ” en platos Petri (entre 3 y 5 réplicas por nidos) preparados con medio de PDA sin antibióticos. Luego, cada placa de PDA se cortó en fragmentos de 10 partes. Para cada aislamiento se realizaron subcultivos para garantizar su pureza y, cuando se detectaron contaminaciones, se hicieron nuevas réplicas y aislamientos bajo condiciones asépticas. A las hormigas no se les suministró material forrajero antes de los aislamientos, con el fin de reducir el riesgo de contaminación cruzada. Las muestras fueron monitoreadas a diario para detectar a tiempo el crecimiento de hongos filamentosos no mutualistas.

Con la ayuda de un bisturí esterilizado, se tomaron cuatro fragmentos del crecimiento fresco del hongo simbiote y se trasplantaron en forma distal a platos Petri (60x15 mm)

con PDA sin antibióticos. Estos platos se incubaron a una temperatura de 25 °C a 27 °C durante 30 días. Después de este período, los platos con cultivos puros fueron utilizados para los procedimientos moleculares. (Figura 2).

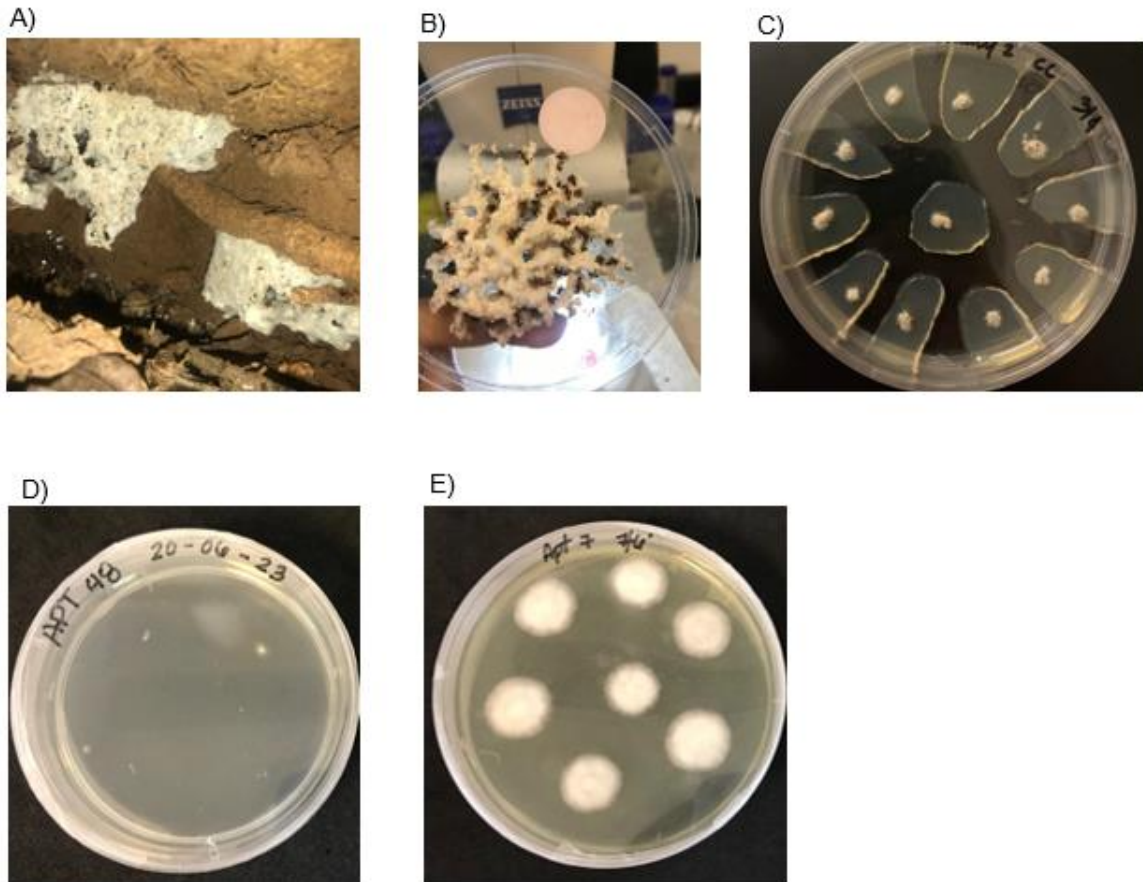


Ilustración 2 A) Cámara del jardín de hongo basidiomiceto de las hormigas *Apterostigma dentigerum*, B) Jardín del hongo de *Apterostigma dentigerum* conservado en el laboratorio en un plato Petri, con las hormigas que integran el nido, C) jardín del hongo basidiomiceto inoculado sobre medio PDA sin antibiótico cortado, D) Siembra de micelio del hongo cultivar sobre PDA sin antibiótico, E) Cultivo axénico a los 20 días (hongo basidiomiceto de *A. dentigerum*).

3.6 Identificación molecular

3.6.1 Extracción de ADN para el cultivo fúngico

Para la extracción de ADN de los hongos basidiomicetos, seguimos el protocolo modificado de extracción con CTAB de Doyle y Doyle (1990). Con un pistilo estéril, se extrajo una porción de micelio de cada cultivo axénico del hongo simbiote y se colocaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (Eppendorf). Para cada muestra se añadieron 500 μ L de solución CTAB y un CE-, solo con el reactivo. Posteriormente se mezcló vigorosamente con el pistilo y se llevó a una incubadora en seco a 65 °C durante 30 min.

Seguidamente, se agregó 400 μ L de fenolcloroformo, hasta homogenizar manualmente los tubos. Los tubos fueron colocados en una microcentrifugadora por 14000 rpm durante 5 min, utilizando el equipo centrifugadora Eppendorf® 5430. En tubos de 1.5 mL (Eppendorf) limpios se agregaron 250 μ L del sobrenadante y se añadieron 250 μ L de isopropanol frío, mezclando bien de arriba-abajo. Los tubos se incubaron en el congelador por 30 min o más a -20 °C.

Luego se centrifugó a 14000 rpm durante 7 min. Se descartó el isopropanol y el *pellet* con el ADN se lavó con 800 μ L de etanol frío al 70%, seguidamente centrifugamos a 14000 rpm por 1 minuto. Después de descartar el etanol, retiramos el exceso de etanol que quedó con ayuda de una micropipeta, dejamos secar a temperatura ambiente. El *pellet* de ADN se resuspendió en 30 μ L de agua de grado molecular y cuantificamos el ADN extraído con la ayuda de un NanoDrop. Por último, los tubos con el ADN extraído fueron almacenados a -20 °C, para su posterior uso en análisis molecular.

3.6.2 Cuantificación del ADN

Se empleó el equipo Nanodrop® ND-1000 and ND-800 8 sample Spectrophotometers, para cuantificar la concentración y determinar la calidad de ADN genómico en ng/μL. Se tomó 1 μL de la solución resuspendida con material genético, y se colocó en el Nanodrop®, luego se realizó la medición.

Se tomó en cuenta la medida de concentración de ácidos nucleicos y la media de ratio de longitud de onda de 260/280 por debajo de 1.6 o encima de 2.3, podría indicar contaminación externa.

3.6.3 Amplificación del ADN del hongo simbiote

Se realizó la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de la región ITS1 – 5,8S-ITS2 del ADN ribosomal. Se utilizaron cebadores, ITS 4 (5'TCCCTCCGCTTATTGATATGC 3') y ITS 5 (5'GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG 3').

Para las reacciones en PCR para el hongo cultivar se realizaron en un volumen total de 18 μL que contenía: 9.2 μL de H₂O, 2.0 μL de Buffer 10x, 0.4 μL de dNTPs, 2.0 μL de ITS5 5mM, 2.0 μL de ITS4 5mM, 2.26 μL de MgCl₂, 0.2 μL de Tap DNA polimerasa, y 0.5 μL de ADN de la muestra.

La reacción de PCR se efectuó en un termociclador empleando las siguientes condiciones:

- 95 °C por cinco minutos.
 - 95 °C por 45 segundos.
 - 50 °C por 45 segundos
 - 72 °C por 1:30 minutos.
 - 72 °C por 10 minutos.
- } 30 ciclos.

Los productos obtenidos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñidos con 1 µL del tapón SYBR® safe con concentración de 10 000X en DMS. Se agregaron 2.8 µL (0.8 µL de tapón 5x Gel Pilot Loading Dye y 2.0 de material genético) a los pocillos del gel de agarosa. Además, se utilizó un marcador de peso molecular Gene Ruler 1 kb plus DNA Ladder Ready-to-use, (Thermo Scientific Fisher®). Para la electroforesis, se conectaron los electrodos de la cámara electroforética a la fuente de poder con un 80 V por 30 minutos.

La visualización de las bandas genómicas se realizó en el transluminador (BIO-RAD ChemiDoc Imaging System®).

3.6.4 Purificación del producto de PCR

La purificación del producto de PCR se realizó siguiendo el protocolo del QIAquick PCR Purification kit. Luego, se midió la concentración de ADN purificado, utilizando el NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8 sample Spectrophotometers.

3.6.5 Secuenciación del producto de PCR

Los amplicones purificados que cumplían los criterios de calidad y concentración, se enviaron a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur), para su secuenciación utilizando el método Sanger.

3.7 Microscopia óptica

Empleamos la técnica de preparación de frotis fresco, montaje directo y tinción con lactofenol para la visualización y confirmación del crecimiento del hongo, empleando un microscopio óptico Olympus Life Science modelo BX.

3.8 Criopreservación en Glicerol

Los platos con hongos simbioses fueron preparados para la cryopreservación. Se cortó porciones de agar de ~ 1 cm² con hongo simbiote y se introdujeron en criotubos que contenían 1.5 mL de glicerol al 75% y se preservaron en congeladores a temperatura de 80 °C.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Registro de datos demográficos de nidos de *Apterostigma dentigerum*

Los nidos de *Apterostigma dentigerum* fueron recolectados en el Parque Nacional Soberanía, a lo largo del sendero Plantation Loop Road, obteniendo un total de 76 nidos. Este sendero presentó una temperatura de 29 °C y una humedad relativa del 74%, en un ambiente de bosque húmedo tropical.

Se observó que las larvas parasitadas ocupaban casi toda la larva de la hormiga, salvo la cutícula. La cutícula de la larva parasitada por la avispa mostraba un tono oscuro, a diferencia del color blanco crema que es común en las crías sanas.

Durante las observaciones de los nidos en el laboratorio, se pudo notar que cuando las avispas emergían, eran atacadas de inmediato por las obreras. Al ser capturadas, eran mordidas, lo que resultaba en la pérdida de alas, antenas o incluso decapitación. Sin embargo, estos incidentes solo ocurrían los fines de semana, cuando las avispas emergían y no eran retiradas a tiempo, lo que provocaba la pérdida de algunos de sus miembros.

De las larvas parasitadas que emergieron, se obtuvieron un total de 21 avispas adultas, las cuales no presentaron daños causados por las hormigas obreras. Estos individuos fueron utilizados para la identificación, una vez emergían se mantenían inmóviles dentro del jardín de hongos, mientras que otros se encontraron fuera de dicho jardín (Figura 3).

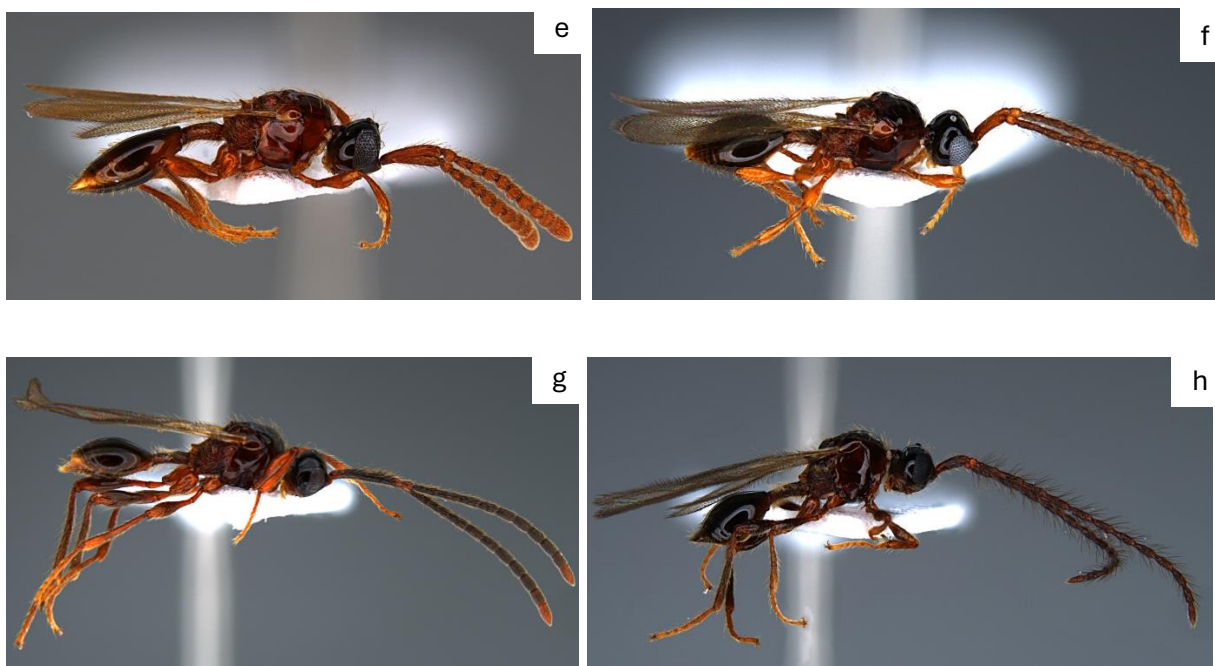


Ilustración 3 Parasitoides Diapriidae de *Apterostigma dentigerum*; vista lateral de *Leucropia* sp1: e) avispa femenina, f) avispa masculina. Vista lateral de *Leucropia* sp 2: g) avispa femenina, h) avispa masculina. Barras de escala: 5 mm.

Tabla 1 Demografía de *Apterostigma dentigerum* de 76 nidos colectados a lo largo del Sendero de Plantación, Parque Nacional Soberanía. Los datos se dan como media \pm una desviación estándar, con los ámbitos indicados a continuación entre paréntesis.

Mes (2023)	Colonias colectadas	Huevos	Larvas	Pupas	Obreras
Mayo	43	2.51 \pm 1.93 (0-11)	4.00 \pm 3.13 (0-17)	2.09 \pm 1.90 (0-6)	11.9 \pm 9.42 (0-59)
Junio	4	0 0	1 \pm 0.9 (0-2)	2.5 \pm 2.0 (0-5)	5.29 \pm 5.01 (0-12)
Julio	16	0.98 \pm 1.23 (0-3)	3.19 \pm 2.09 (0-13)	1.24 \pm 1.19 (0-4)	10.34 \pm 9.95 (0-40)
Agosto	13	1.31 \pm 1.90 (0-4)	1.76 \pm 1.23 (0-6)	2.81 \pm 3.05 (0-10)	8.66 \pm 8.11 (3-33)

Durante el periodo de estudio, se hallaron huevos y crías en los nidos recolectados, excepto en el mes de junio, cuando solo se obtuvieron cuatro nidos, una cantidad insuficiente para obtener datos significativos, lo que explica la ausencia de huevos en ese mes. De esta manera, se observaron los diferentes ciclos de vida de *Apterostigma dentigerum*, los cuales presentaron tasas bajas durante los cuatro meses de recolección (Tabla 1).

4.2 Prevalencia del parasitismo de avispas

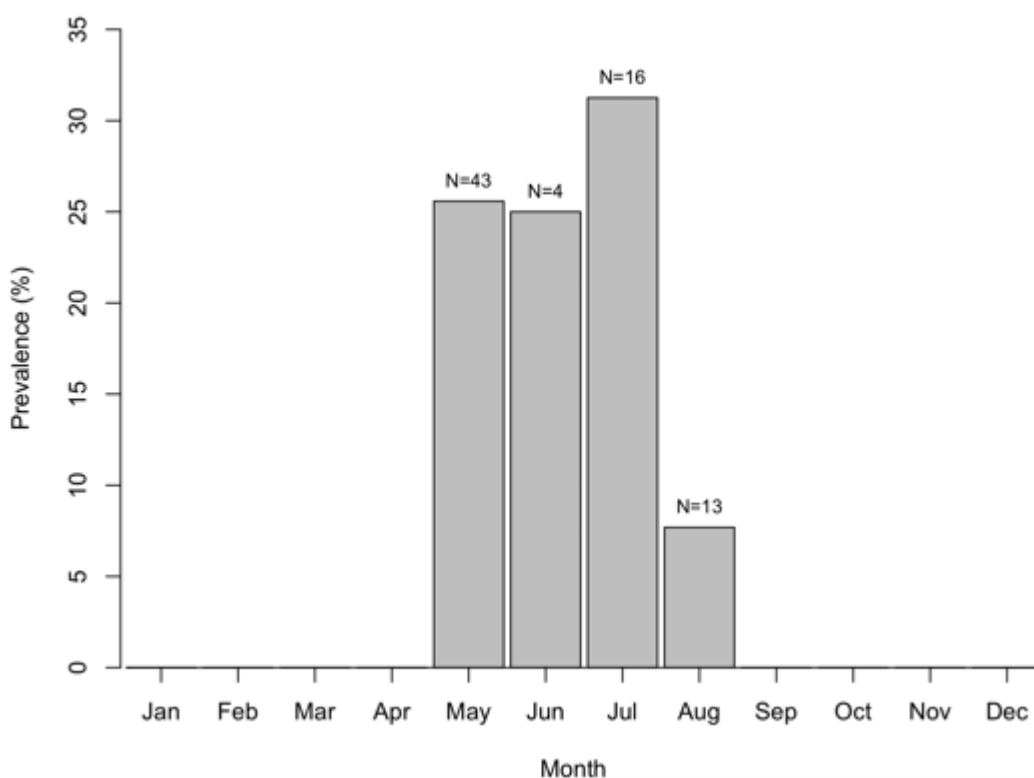


Ilustración 4 Prevalencia por mes de avispas Diapriidae que atacan a *A. dentigerum*, hormigas cultivadoras de hongos a lo largo del camino de Plantación. Donde N es el número de nidos colectados por mes.

La prevalencia general de las avispas Diapriidae en las colonias se define como el porcentaje de nidos colectados con avispas parasitoide en relación con el total de nidos

colectados. De los 76 nidos recolectados, se encontró que 18 nidos habían sido parasitados, representando el 23.68% (figura 5).

La prevalencia mensual se determina como el porcentaje de nidos colectados durante el mes en relación con la cantidad de nidos colectados cada mes. En mayo, se recolectaron 43 nidos, de los cuales 11 contenían larvas parasitadas, lo que representa un 25.58%. En junio, se encontraron 4 nidos, y solo 1 estaba parasitado, lo que corresponde al 25%. En julio, se recolectaron 16 nidos, de los cuales 5 tenían larvas parasitadas, lo que equivale a un 31.25%. Por último, en agosto, se colectaron 13 nidos, y solo 1 estaba parasitado, lo que representa un 7.69% (figura 4).

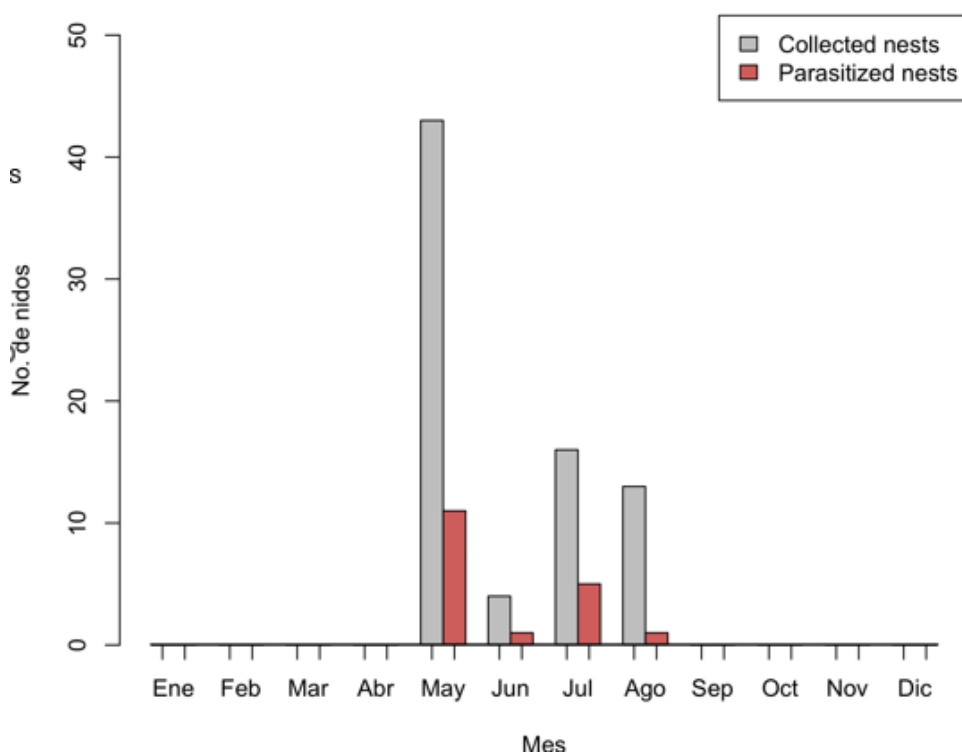


Ilustración 5 Se presenta una comparación mensual en relación con la cantidad de nidos colectados vs. la cantidad de nidos parasitados por avispas.

De las larvas parasitadas obtenidas, emergieron un total de 21 avispas, las cuales no mostraron daños causados por las hormigas obreras de *Apterostigma dentigerum*. Estas avispas fueron identificadas dentro del género *Leucopria*. Las morfoespecies observadas son distintas a las especies previamente descritas en estudios taxonómicos sobre las Diapriidae.

Las morfoespecies identificadas en este estudio se han denominado *Leucopria* sp1 y *Leucopria* sp2. Para calcular la prevalencia por morfoespecies, se determina el porcentaje de cada morfoespecie presente en los nidos en relación con el total de nidos recolectados; en este caso, se colectaron un total de 76 nidos.

Se identificaron 4 ejemplares de *Leucopria* sp1, representando el 5.26% del total, y 12 de *Leucopria* sp2, equivalentes al 15.79% (Figura 6). Sin embargo, no fue posible identificar las avispas de dos nidos con larvas parasitadas debido a daños en sus cuerpos.

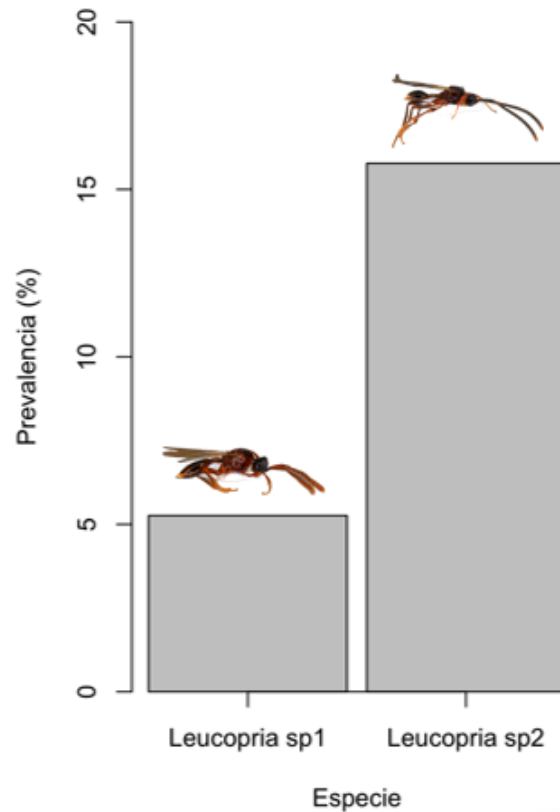


Ilustración 6 Prevalencia de nidos de hormigas *A. dentigerum* que estaban infestados con morfoespecies de avispa *Leucopria*.

4.3 Intensidad del parasitismo de avispa

La intensidad media general se define como el porcentaje de larvas parasitadas en relación con el total de larvas de hormiga, lo que equivale a 8.26%.

Mientras la intensidad por nido de las avispa Diapriidae que se encuentran parasitando a las larvas de *Apterostigma dentigerum* se define como el porcentaje de larvas parasitadas por el total de individuos de la colonia, los valores obtenidos de cada nido parasitado están representados en la tabla 2.

Tabla 2 Intensidad de nidos de *Apterostigma dentigerum* parasitados por las larvas de avispas durante los meses de estudio colectados a lo largo del sendero Plantation Loop Road.

Colonias	Larvas sanas	Larvas parasitadas	Total de individuos	Intensidad (%)
20230517-APT14	8	3	41	7.317073171
20230517-APT18	1	1	5	20
20230517-APT20	1	1	12	8.333333333
20230517-APT22	2	2	35	5.714285714
20230517-APT23	1	1	21	4.761904762
20230526-APT36	6	3	36	8.333333333
20230526-APT37	1	1	59	1.694915254
20230526-APT38	2	1	29	3.448275862
20230526-APT39	0	2	10	20
20230526-APT46	12	5	38	13.15789474
20230526-APT52	3	1	11	9.090909091
20230609-ATP78	1	1	20	5
20230717-APT105	1	1	7	14.28571429
20230717-APT107	9	2	30	6.666666667
20230717-APT113	3	1	49	2.040816327
20230717-APT114	10	3	34	8.823529412
20230717-APT116	2	1	34	2.941176471
20230814-APT143	1	1	14	7.142857143

En la intensidad por mes, para mayo se registraron once nidos parasitados, lo que representa el 9.26% del total. En junio, se observó un nido parasitado, equivalente al 5%. Durante julio, se identificaron cinco nidos parasitados, representando el 6.95%. Finalmente, en agosto, se detectó un nido parasitado, que corresponde al 7.14%.

4.4 Aislamiento de los hongos que constituye el jardín

4.4.1 Colecta de nidos para el aislamiento del jardín de hongos

Los nidos de *Apterostigma dentigerum* usados para el aislamiento del jardín de hongos fueron obtenidos de tres lugares: del Parque Nacional Soberanía incluyen el sendero Plantation Loop road, Panamá y el Sendero Gamboa Pipeline Road, Colón; además de la Isla Coiba, los nidos fueron conservados durante un mes en una incubadora a una temperatura de 27 °C, proporcionándoles el cuidado necesario. Cuando fue necesario, este período se extendió hasta que el jardín de hongos muriera.

Tabla 3 Total, de nidos colectados para el aislamiento de los hongos que constituye el jardín de *Apterostigma dentigerum*.

Especie	Nidos por sitios	Nidos aislados	ADN extraídos	ADN amplificado (PCR)	ADN purificado
<i>Apterostigma dentigerum</i>	S. de Plantación	22	19	11	2
	S. de Gamboa	28	25	15	9
	Isla de Coiba	4	3	2	1
Total		54	47	28	12

4.4.2 Aislamiento del jardín de hongos

Durante el período de aislamiento, el micelio mostró principalmente un color blanco en las primeras semanas. Su tasa de crecimiento fue lenta, tomando aproximadamente un mes para alcanzar un desarrollo notable, que se observa en la Figura 7. En el cultivo se puede observar un tejido formado por hilos de micelio que generan un velo, el cual se supone es producido por las hormigas.

Se recolectaron un total de 156 nidos de los tres sitios de estudio: 76 nidos de Plantation Loop Road, 76 nidos de Gamboa Pipeline Road y solo 4 nidos de la Isla de Coiba. Durante el traslado de los nidos desde la isla al laboratorio, algunos no llegaron en las mejores condiciones.

De estos nidos recolectados se aislaron 54 hongos basidiomicetos cultivados por las hormigas *Attini*. Además, los nidos también fueron utilizados para el aislamiento de *Escovopsis*. Sin embargo, durante el proceso de aislamiento, los nidos con poca cantidad de hongo no eran aptos para realizar replicaciones, o eran demasiado pequeños para mantenerse en el laboratorio el tiempo necesario para obtener aislamientos.

Por otro lado, en el proceso de amplificación del ADN se lograron obtener un total de 28 hongos, de los cuales únicamente el ADN de 12 muestras completó con éxito los procesos de purificación. Durante el proceso de extracción y purificación, las muestras estuvieron varios meses en refrigeración, lo que provocó que su concentración inicial disminuyera gradualmente con el tiempo, afectando el resultado final (Tabla 3).

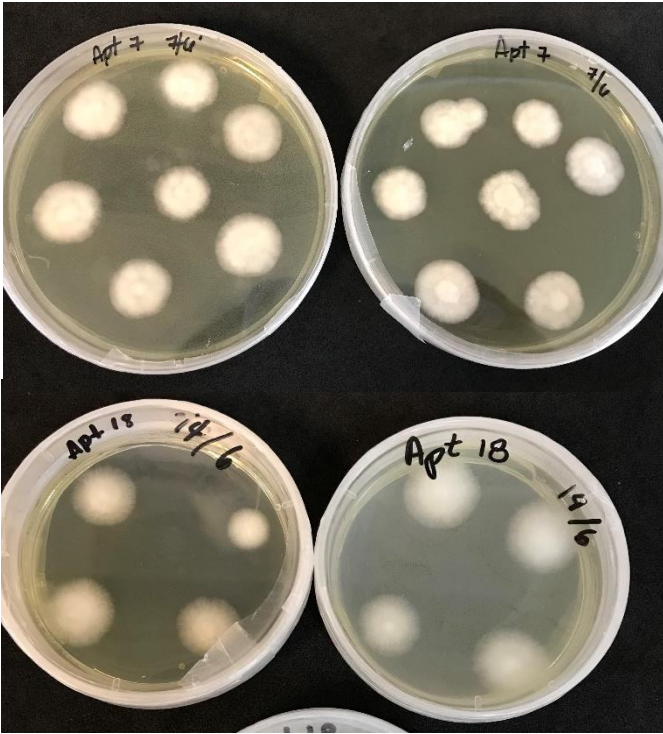


Ilustración 7 Aislamiento puro del jardín de hongo simbiote de *Apterostigma dentigerum*, mostrando crecimiento a los 15 días e incubado a 27 °C.

4.4.3 Microscopia óptica

Se prepararon placas frescas para la observación de estructuras fúngicas del hongo *Myrmecopterula velohortorum*, mediante tinción con azul de lactoglicerol.

La orientación del crecimiento es distinta, ya que el micelio crece en forma de red, densamente ramificado, con una textura algodonosa a partir de la cual se generan hifas o cuerpos fructíferos. Además, en cada hifa se pueden observar estructuras conocidas como conexiones de pinza (fíbula), las cuales son grandes y abundantes (figura 8).

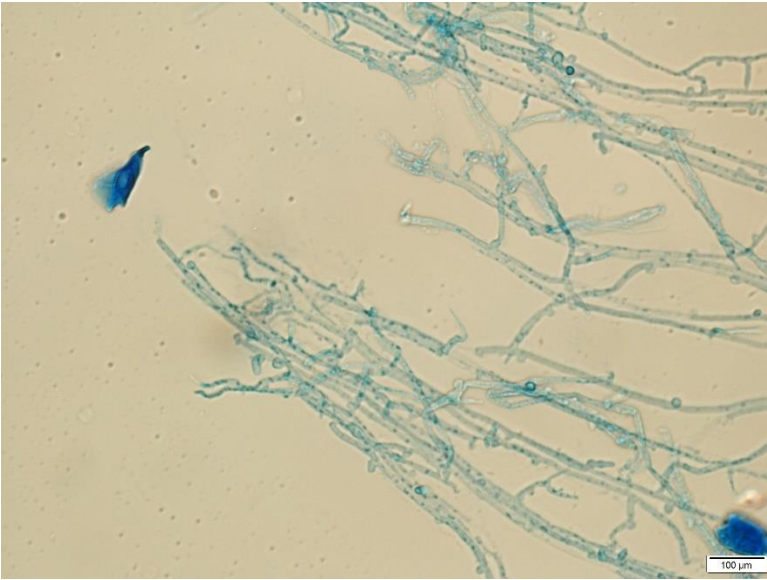


Ilustración 8 Microscopia óptica. Se observa señalado con flecha una estructura denominada fibula, también llamada conexión en fibula (unión en fibula), en abrazadera o clamp, con un aumento: de 100X y escala: 100 µm.

4.5 Identificación molecular

4.5.1 Amplificación de ADN

La amplificación del ADN alcanzó un peso molecular de entre 600 y 700 pb. A partir de ahí, se logró extraer ADN genómico del micelio de cada cepa fúngica aislada,

obteniendo así el ADN genómico del hongo de *Myrmecopterula velohortorum* utilizando cebadores de la región ITS1 – ITS2 del gen ribosomal 5,8S produciendo bandas del tamaño entre 600 y 700 pb. Las bandas se pudieron visualizar luego de realizar la electroforesis en gel de agarosa (Figura 9).

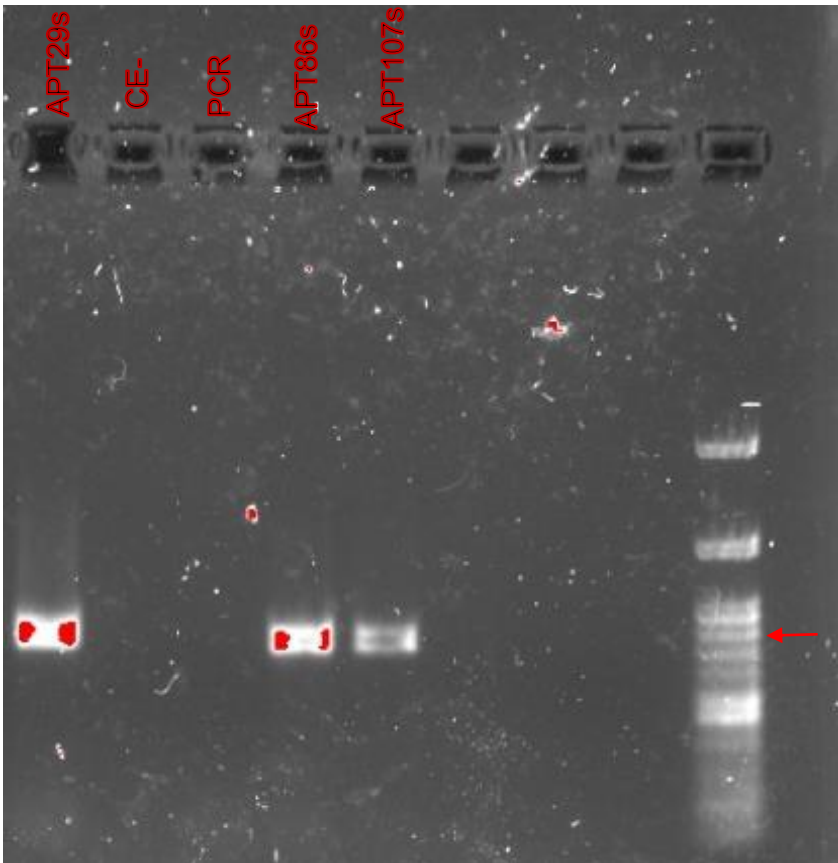


Ilustración 9 Bandas visualizadas de la PCR realizada al ADN genómico del hongo *Myrmecopterula velohortorum*, en gel de agarosa al 1%. Las muestras amplificaron dentro del rango del tamaño de interés de 700 pb (señalado con flecha roja).

Tabla 4 Secuencias extraídas de los nidos de *Apterostigma dentigerum* con su concentración de ADN genómico y absorbancia 260/280, tanto en la extracción como la purificación y su volumen final el cual fue enviada a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur).

Sitio de colecta	Extracción		Purificación		Vol final
	Concentración	Ratio	Concentración	Ratio	
Sendero Gamboa	26.3 ng/ μ L	2.22	46.1 ng/ μ L	1.92	11.8 μ L
Sendero Plantación	58.5 ng/ μ L	2.18	14.7 ng/ μ L	1.89	21.6 μ L
Sendero Gambo	39.1 ng/ μ L	2.1	18.7 ng/ μ L	1.71	27 μ L
Sendero Gambo	43.4 ng/ μ L	2.15	35.8 ng/ μ L	1.89	26 μ L

4.5.2 Secuenciación tipo Sanger y árbol filogenético

Se secuenciaron 12 de los hongos aislados, de los cuales se obtuvieron 4 secuencias lo suficientemente limpias como para ser empleadas en los análisis de inferencia Bayesiana (Tabla 3).

Las secuencias fueron obtenidas únicamente de jardines de hongos basidiomicetos de las hormigas *Apterostigma dentigerum*. Todas las muestras secuenciadas provenientes de los nidos fueron comparadas y revisadas en la base de datos del NCBI GenBank, utilizando el BLAST. Los resultados mostraron que las secuencias presentaban una alta similitud ($\geq 97.85\%$) con muestras previamente secuenciadas de otros simbioses del género *Myrmecopterula*, asociados con la domesticación de hormigas por especies del género *Apterostigma*.

En nuestros análisis se incluyeron secuencias de hongos pertenecientes a *Apterostigma pilosum*, provenientes de dos sitios: una de Brasil y otra de Panamá. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Pterulaceae* MN898493. Así, la construcción del árbol filogenético mediante Inferencia Bayesiana fue verificada manualmente, y las secuencias se ensamblaron y editaron utilizando el software GENEIOUS 10.0.2 (Tabla 4).

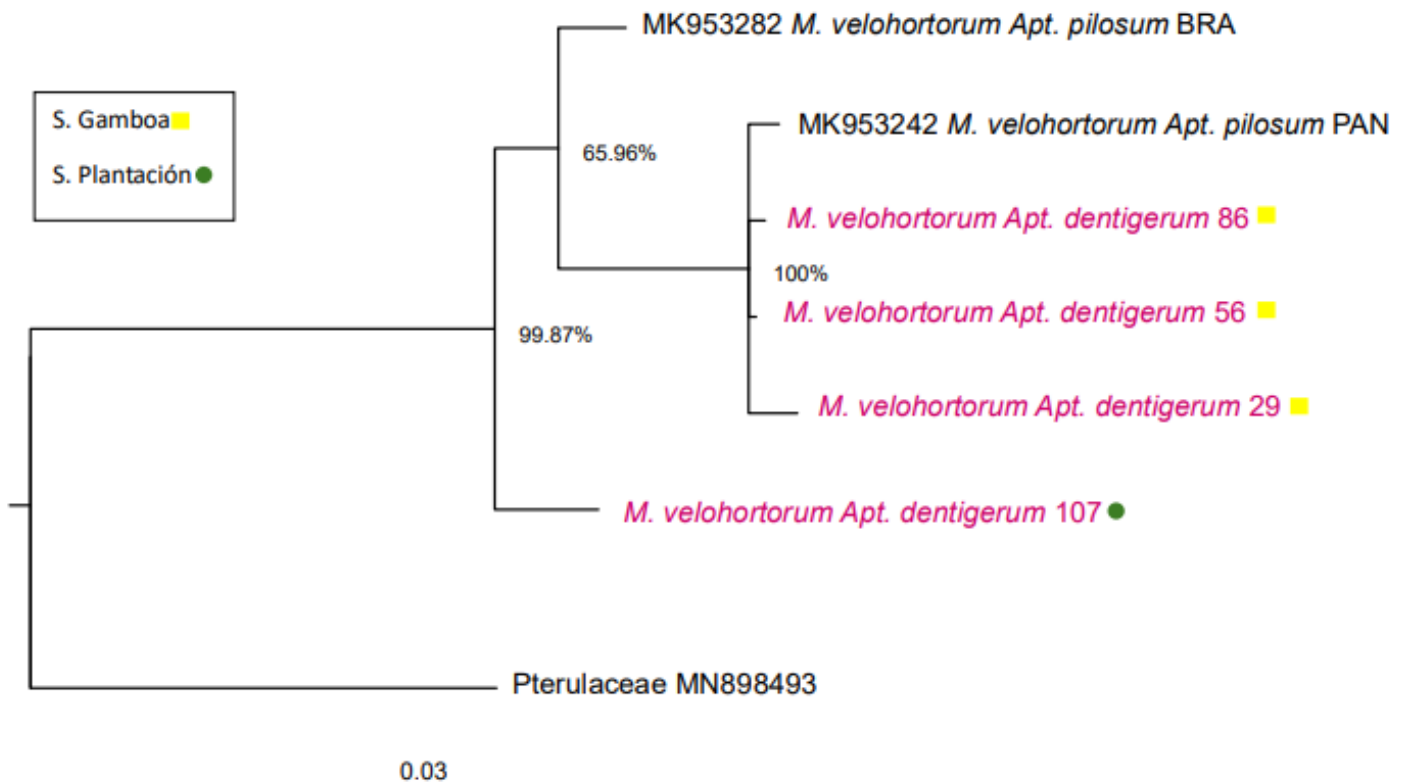


Ilustración 10 Árbol filogenético mediante Inferencia Bayesiana, basado en la reconstrucción de las secuencias espaciadoras intergénicas ITS1/ITS2 y el gen ribosomal 5.8S, seleccionado para el hongo *Myrmecopterula velohortorum* de la especie *Apterostigma dentigerum*. La distribución por provincia está dada por un código iconográfico: el sendero Plantation Loop road (S. Plantación) y en el sendero Gamboa Pipeline Road (S. Gamboa). Los números sobre las ramas indican los valores de bootstrap

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1 Diversidad de Diapriidae atacando a *Apterostigma dentigerum*

El conocimiento biológico y el comportamiento de los parasitoides Diapriidae mirmecófilos, así como la naturaleza de sus interacciones con las hormigas cultivadoras de hongos, ha avanzado gracias a nuevas investigaciones en Panamá. Nuestros resultados han identificado dos nuevas morfoespecies, aún no descritas, involucradas en la asociación directa con *Apterostigma dentigerum*.

En el caso de *Leucopria* sp1 y *Leucopria* sp2, se presentan como nuevos registros para el género *Leucopria*. De manera similar, los trabajos realizados por Masner & García (2002) nos brindan una visión sobre la riqueza y diversidad de este grupo, lo que genera la expectativa de descubrir y describir nuevos especímenes como base para futuras investigaciones. Esto es, a excepción de los especímenes descritos directamente como parasitoides de las hormigas cortadoras de hojas, las cuales representan un problema para el sector agrícola. En este sentido, se han reportado hallazgos por otros autores como: Loíacono MS. (1987), quien documentó un diáprido parasitoide de larvas de *Acromyrmex ambiguus*; Loíacono M & C Margaría (2009), quienes describieron avispas parasitoides atacando jardines de hongos de *Acromyrmex lobicornis* Emery; Loíacono MC. (2013b), que presentó una nueva especie de *Szelenyopria fabritius* atacando larvas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*; Mattoso et al., (2021), quienes reportaron *Szelenyopria talitae* atacando larvas de hormigas cortadoras *Acromyrmex subterraneus*; Pérez–Ortega et al., (2010), quienes documentaron avispas parasitoides atacando larvas de *Trachymyrmex cf. Zeteki*; y Fernández–Marín et al., (2006b), quienes describieron el género de avispas

Acantopria y *Mimopriella* atacando larvas de *Cyphomyrmex*. Estas avispas de la familia Diapriidae están directamente asociadas con hormigas cultivadoras de hongos.

Es evidente que existen más estudios enfocados en hormigas superiores en comparación con las hormigas basales, así como en los parasitoides que atacan los nidos de hormigas cultivadoras de hongos del género *Apterostigma*. Aportamos más evidencia respecto a las avispas diapriinas asociadas con hormigas cultivadoras de hongos de la especie *Apterostigma dentigerum*, que albergan parasitoides dentro de sus pequeñas colonias.

5.2 Intensidad y prevalencia del parasitismo por avispas

Se recolectaron un total de 76 nidos en el sendero de Plantación, Parque Nacional Soberanía, de los cuales se lograron obtener evidencia significativa de como las avispas del género de *Leucopria* están afectando las pequeñas colonias de hormigas inferiores, casi el 8.26% de las larvas de los nidos de *Apterostigma dentigerum* fueron atacadas por parasitoides, mientras que 18 de los nidos se encontraron parasitados representando un 23.68% de nidos atacados.

Nuestros resultados muestran una alta abundancia del género *Leucopria* en los nidos de *Apterostigma dentigerum*, lo que implica un alto costo para sus hospederos. Estos hallazgos son similares a los observados en la tasa de prevalencia de colonias de hormigas superiores, como en *Acromyrmex subterraneus*, reportado por Mattoso et al., (2021). En su estudio, se encontró una tasa de parasitismo promedio de 53 nidos recolectados entre los años 2015 y 2018, encontrando 12 nidos (media 22,6%; rango 14,3% a 29,4%) siendo parasitados. Luego, se utilizaron 6 nidos para analizar la

intensidad de parasitismo dentro de los nidos, demostrando que nuestros datos son inferiores en comparación, ya que el número promedio de larvas de estos nidos fue de 1145 (entre 639 y 1822) y la mayoría de las larvas ($66,3\% \pm 12,9\%$) fueron atacadas por parasitoides, oscilando entre $54,6\%$ y $82,8\%$. A pesar de que *Apterostigma dentigerum* son hormigas basales con pocos individuos, nuestros resultados muestran niveles altos de parasitismo en estos pequeños nidos, lo que podría tener un impacto negativo en el futuro, reduciendo la cantidad de individuos que conforman el nido (larvas, obreras y aladas), afectando la colonia a gran escala.

Otro punto para resaltar es la diversidad de parasitoides dentro de la población hospedadora. Un estudio previo de González et al., (2016) proporciona la primera documentación e incluye una nueva familia en la lista de parasitoides asociados directamente a las larvas de hormigas: un nuevo ectoparasitoide de la familia Chloropidae (Diptera), denominado *Pseudogaurax paratolmos* Wheelde, encontrado exclusivamente en larvas de *Apterostigma dentigerum* en Panamá.

En definitiva, estos casos de parasitoides observados aquí indican que tanto endoparásitos como ectoparásitos tienen un efecto nocivo sobre la salud de los nidos de *Apterostigma dentigerum*, lo que podría impactar negativamente en su dinámica de supervivencia y reproducción.

5.3 Análisis filogenético

La filogenia del género *Myrmecopteura* en este estudio se reconstruyó mediante las secuencias de ITS obtenidas de dos hongos cultivados por las hormigas del género *Apterostigma* (cultivos *Myrmecopterula nudihortorum* y *Myrmecopterula velohortorum*)

provenientes de dos lugares distintos, Panamá y Brasil, junto con datos generados del GenBank.

Las cuatro secuencias que obtuvimos se agruparon en un mismo clado, mostrando una relación cercana del 100% con las secuencias de Panamá, excepto una secuencia del Sendero de Plantación, que tuvo un 99.87%, posiblemente debido a su proceso de ensamblaje y edición. Todas las demás secuencias del Sendero de Gamboa mostraron un 100%, lo que demuestra que nuestro clado está fuertemente respaldado por los datos previos en el árbol filogenéticos propuesto por Leal-Dutra et al., (2020), confirmando que *Apterostigma dentigerum* cultiva cepas del hongo *Myrmecopterula velohortorum*. Sin embargo, las otras muestras obtenidas durante el estudio no pudieron ser utilizadas, ya que no cumplían con los requisitos necesarios para los análisis filogenéticos.

Las muestras tenían que cumplir con una concentración de 50 ng/μL y una ratio de 260/280 superior a 1.8, siendo este el valor óptimo (Crossley et al., 2020), para obtener una secuencia limpia. Otro factor que podría haber influido es el uso de un solo juego de cebadores. En este caso solo se utilizaron cebadores del tipo ITS para amplificar la región ITS1 e ITS2 y flaquear el gen ribosomal 5.8s. En el estudio de Leal-Dutra et al., (2020), para este mismo organismo, se utilizaron cebadores adicionales, como la nrLSU y RPB2, lo que podría haber permitido obtener otros sitios de unión con los cebadores, mejorando así la discrepancia en la relación genética del hongo del género *Myrmecopterula* dentro del árbol filogenético.

5.4 Diversidad genética de *Myrmecopterula*

Nuestro hallazgo proporciona más pruebas sobre la evolución del mutualismo entre *Myrmecopterula* – *Apterostigma*. Actualmente, se sabe que *Myrmecopterula nudihortorum* y *Myrmecopterula velohortorum* solo están distantemente relacionados dentro del clado, actualmente no está claro si la asociación mutualista es ancestral. Estas dos especies están relacionadas sólo lejanamente con los demás cultivares, demostrando que, a diferencia de las hormigas, los cultivares no son monofiléticos.

Es claro que el género *Apterostigma* mantiene una amplia asociación con diversos hongos basidiomicetos, como resultado de intercambios evolutivos de cultivares. En el trabajo de Leal-Dutra et al., (2020), se proponen dos hipótesis para explicar cómo se ha dado esta evolución: la primera plantea que ocurrió de manera independiente en dos ocasiones, mientras que la segunda sugiere una condición ancestral común para todos los *Myrmecopterula*.

Sin embargo, la hipótesis que mayor apoyo sostiene los resultados de este trabajo para la domesticación de diversos hongos basidiomicetos por parte de las hormigas del género *Apterostigma*, es la posibilidad de que las hormigas no son capaces de diferenciar sus hifas de especies estrechamente relacionadas, lo que explicaría por qué el género *Apterostigma* cultiva dos especies de hongos: *Myrmecopterula nudihortorum* y *Myrmecopterula velohortorum*.

CAPÍTULO VI:
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusión

- En este estudio, presentamos dos nuevas morfoespecies no descritas para el género de *Leucopria*, como resultado confirmamos la implicación directa de estas especies con las hormigas cultivadoras de hongo *Apterostigma dentigerum*, en relación con la interacción de hormiga-parasitoide.
- Los nidos de *Apterostigma dentigerum* son pequeños y generalmente se encuentran cerca de la superficie del suelo, con pocos trabajadores y etapas inmaduras. Por lo tanto, el acceso de las hembras *Leucopria* a los nidos con cría suele ser más fácil, debido a la escasa presencia de obreras que protejan a sus larvas, lo que explica nuestros resultados con tasas de parasitismo muy elevadas, en comparación con nidos que presenta mayor cantidad de hormigas de attinas superiores.
- Aunque varios estudios filogenéticos han demostrado que el género *Apterostigma* mantiene asociación con diversos cultivares, nuestros resultados confirman que *Apterostigma dentigerum* sigue cultivando la misma cepa de hongo, *Myrmecopterula velohortorum*.
- Los enemigos naturales conocidos de *Apterostigma dentigerum* son los agrodepredadores, *Megalomyrmex* spp. (Formicidae) (Brandão 1990), un ectoparasitoide de la familia Chloropidae (Diptera), descrito como *Pseudogaurax paratolmos* (Gonzalez et al., 2016), y las dos avispas diapriinas endoparásitas del género *Leucopria* reportadas en este estudio. Sin embargo, el jardín de hongos de algunas especies de *Apterostigma* también albergan patógenos del género *Escovopsis*, como *Escovopsis clavatus* y *Escovopsis multiformis*, como especies

aisladas de estos jardines (Montoya et al., 2019), además de la hipótesis de que algunos miembros del clado hermano de *Myrmecopterula* actúen como micoparasitarias, lo que podría afectar también al hongo cultivado por las hormigas (Leal-Dutra et al., 2020). Es probable que los nidos de *Apterostigma dentigerum* se vean afectados por la presencia de diversos organismos, ya sean micoparásitos o patógenos fúngicos, lo que representaría una amenaza para la especie con el paso del tiempo impactando en su demografía, la biología de la población y la estructura de la comunidad de hormigas.

6.2 Recomendaciones

- Estandarizar mejor el método de extracción para cada hongo basidiomiceto, así se obtiene un material de ADN del hongo con una concentración ideal.
- Emplear un mejor método de preservación de las muestras de ácidos nucleicos y así evitar la degradación. Los ciclos de congelación – descongelación dañan el ADN, por lo cual, se recomienda trabajar con alícuotas y preservar la solución madre.
- Un juego de primers no es suficiente para determinar las variaciones necesarias para determinar las relaciones filogenéticas, el uso de más primers tiene mayor resolución a nivel genético. Aunque para el uso de más de un primers se necesita recursos económicos abundantes.
- Un juego de primers no es suficiente para determinar las variaciones necesarias a nivel genómico y las relaciones filogenéticas.
- Para evitar el desmembramiento de las hormigas a las avispar que van emergiendo es recomendable tomar un pedazo del mismo jardín de hongo y colocarlo en otro plato Petri con las larvas parasitadas.
- Conducir estudios sobre la taxonomía de las avispas parasitadas Diapriidae relacionadas a la tribu Attini.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armitage S. A., Fernández-Marín H., Wcislo W. T., & Boomsma J. J. (2012). An evaluation of the possible adaptive function of fungal brood covering by Attine ants. *Evolution; international journal of organic evolution*, 66(6), 1966–1975. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01568>.
2. Brandão FRC. (1990). Revisión sistemática del género de hormigas neotropicales *Megalomyrmex Forel* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), con la descripción de trece nuevas especies. *Arq. Zool.* 31: 411.
3. Christopher Y., Wcislo WT, Martínez-Luis S., Hughes W., Gerardo NM. & Fernández-Marín H. (2021). Disease management in two sympatric *Apterostigma* fungus-growing ants for controlling the parasitic fungus *Escovopsis*. *Ecology and Evolution*, volumen 11, issue 11, p. 6041-6052. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ece3.7379>
4. Currie C.R. (2001). A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual review of microbiology*, 55, 357–380. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.357>
5. Dentinger BTM., Lodge D.J., Munkacsi A.B., Desjardin D.E & McLaughlin D.J. (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(8):2172–8. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00697.x>
6. Emery C. (1922). Hymenoptera, Fam. *Formicidae*, subfam. Myrmicinae. 174; 1-397.
7. Fernández-Marín, H., Zimmerman, JK. & Wcislo WT. (2004). Rasgos ecológicos y secuencia evolutiva del establecimiento de nidos en hormigas cultivadoras de

- hongos (Hymenoptera, Formicidae, Attini), Biological Journal of the Linnean Society., Volumen 81, Número 1, páginas 39–48, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00268.x>
8. Fernandez-Marin, H., Zimmerman J.K., & Wcislo W.T. (2006b). *Acanthopria* and *Mimopriella* parasitoid wasps (Diapriidae) attack *Cyphomyrmex* fungus growing ants (Formicidae, Attini). *Naturwissenschaften*
 9. Gerardo N.M., Mueller U.G., Price S.L. & Currie C.R. (2004) Explotación de un mutualismo: especialización de parásitos en cultivares dentro de la simbiosis de hormigas que cultivan hongos. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 271: 1791–179
 10. 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>
 11. Sosa-Calvo, J., Ješovnik, A., Lopes, C. T., Rodrigues, A., Rabeling, C., Bacci, M., Vasconcelos, H. L., & Schultz, T. R. (2017). Biology of the relict fungus-farming ant *Apterostigma megacephala* Lattke, including descriptions of the male, gyne, and larva. *Insectes Sociaux*, 64(3), 329-346. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0550-2>
 12. Kusnezov N. (1963). Zoogeografía de las Hormigas en Sudamérica. *Acta zoológica Lilloana*, 19:25-186.
 13. Lachaud J.P & Pérez-Lachaud G. (2012). "Diversity of Species and Behavior of Hymenopteran Parasitoids of Ants: A Review", *Psyche: A Journal of Entomology*, vol. 2012, Article ID 134746, 24 pages, <https://doi.org/10.1155/2012/134746>

14. Lattke J.E. (1997) Revisión del género *Apterostigma* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). Arq. Zool (San Pablo) 34: 121 – 221.
15. Lattke J.E. (1999). A new species of fungus-growing ant and its implications for attine phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). 24(1), 1–6. DOI: <https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3113.1999.00061.x>
16. Leal-Dutra C.A., Griffith G.W., Neves M.A., MacLaughlin E.G, Clasen L.A. & Dentinger BTM. (2020). Reclassification of *Pterulaceae* Corner (Basidiomycota: Agaricales) introducing the ant-associated genus *Myrmecopterula* gen. nov., *Phaeopterula* Henn. and the corticioid *Radulomycetaceae* fam. nov. IMA Fungus. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0022-6>
17. Loíacono, MS, 1987. Un nuevo diáprido (Hymenoptera) parasitoide de larvas de *Acromyrmex ambiguus* (Emery) (Hymenoptera: Formicidae) en el Uruguay. Revista de la Sociedad Entomológica de Argentina, 44: 129-136.
18. Loíacono M.S., Margaría C.B., Quirán E.M. and Corró Molas B.M. (2000). Diápridos (Hymenoptera) parasitoides de larvas de la hormiga cortadora *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) en la Argentina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 59: 7-15.
19. Loíacono M., & Margaría C. (2009). A note on *Szelenyiopria pampeana* (Liácono) n. comb., parasitoid wasps (Hymenoptera: Diapriidae) attacking fungus growing ant, *Acromyrmex lobicornis* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Attini) in La Pampa, Argentina. Zootaxa, 2105: 63-65. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2105.1.5>.
20. Loíacono, M. S., Margaría C.B, & Aquino D.A. (2013). Diapriinae wasps (Hymenoptera: Diaprioidea: Diapriidae) associated with ants (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. Psyche 2013: Article ID320590

21. Loíacono M., Margaría C., Moreira DDO. & Aquino D.A. (2013b). A new species of *Szelenyiopria* Fabritius (Hymenoptera: Diapriidae), larval parasitoid of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) from Brazil. *Zootaxa*, 3646: 228-234. DOI: <https://mapress.com/zt/article/view/zootaxa.3646.3.2>
22. Masner L., Garcia J. (2002). The genere of diapriinae (Hymenoptera: Diapriidae) in the nwe World. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2-125.
23. Mehdiabadi N. J., Mueller U. G., Brady S. G., Himler A. G., & Schultz T. R. (2012). Symbiont fidelity and the origin of species in fungus-growing ants. *Nature communications*, 3, 840. <https://doi.org/10.1038/ncomms1844>
24. Montoya Q.V., Martiarena MJS., Polezel D.A., Kakazu S. & Rodrigues A. (2019) More pieces to a huge puzzle: Two new *Escovopsis* species from fungus gardens of attine ants. *MycKeys* 46: 97–118.
25. Mueller U.G., Dash D., Rabeling C. & Rodrigues, A. (2008). Coevoluciónentre hormigas attinas y bacterias actinomicetos: una reevaluación. *Evolución*, 62 (11),2894-2912
26. Pérez-Ortega B., Fernández-Marín H., Loíacono M.S., Galgani P. & 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). *Insect. Soc.* 57, 317–322 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00040-010-0086-1>
27. Pérez-Lachaud, G., Bartolo-Reyes, J. C., Quiroa-Montalván, C. M., Cruz-López, L., Lenoir, A., & Lachaud, J. P. (2015). How to escape from the host nest: imperfect chemical mimicry in eucharitid parasitoids and exploitation of the ants' hygienic

- behavior. *Journal of insect physiology*, 75, 63–72.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.03.003>
28. Ronque M.U., Fourcassié V.J. & Oliveira P S. (2018). Ecology and field biology of two dominant *Camponotus* ants (Hymenoptera: Formicidae) in the Brazilian Savannah. *Journal of Natural History* 52 (3-4).
https://www.researchgate.net/publication/322638454_Ecology_and_field_biology_of_two_dominant_Camponotus_ants_Hymenoptera_Formicidae_in_the_Brazilian_savannah
29. Schultz T.R. (2007) The fungus-growing ant genus *Apterostigma* in Dominican amber. In: Snelling R, BL Fisher, PS Ward (ed) *Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson – 50 years of contributions.*, vol 80. *Memoirs of the American Entomological Institute*. American Entomological Institute, Gainesville, FL, pp. 425–436.
30. Schultz, T. R., Sosa-Calvo, J., Kweskin, M. P., Lloyd, M. W., Dentinger, B., Kooij, P. W., Vellinga, E. C., Rehner, S. A., Rodrigues, A., Montoya, Q. V., Fernández-Marín, H., Ješovnik, A., Niskanen, T., Liimatainen, K., Leal-Dutra, C. A., Solomon, S. E., Gerardo, N. M., Currie, C. R., Bacci, M., Jr, Vasconcelos, H. L., Doyle, V. P. (2024). The coevolution of fungus-ant agriculture. *Science (New York, N.Y.)*, 386(6717), 105–110. <https://doi.org/10.1126/science.adn7179>
31. Yoder, M.J. (2007). *Advances in diapiiid (Hymenoptera: diapiiidae) systematics, with contributions to cybertaxonomy and the analysis of rRNA sequence data.*

Doctoral dissertation, Texas A&M University. Available electronically from <https://hdl.handle.net/1969.1/ETD-TAMU-1301>