



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PANAMÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACTINOMICETOS  
AISLADOS DE *Acromyrmex octopinosus* CONTRA HONGOS PARÁSITOS DEL  
JARDÍN DE LAS HORMIGAS CULTIVADORAS DE HONGOS”

Mendoza Moreno, Yamel Gadiel

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

Panamá, República de Panamá

2025

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico  
a todas las personas que confiaron  
en este maravilloso proyecto y sobretodo a los  
que me dieron ese voto de confianza para  
poder concretarlo con éxito.

## **DEDICATORIA**

Me gustaría motivar a las personas que les apasiona la ciencia, que cada paso que se da en la investigación, señalando el hecho de que cada paso que se da en la vida por más pequeño que parezca, es un avance muy importante hacia la comprensión de lo desconocido. No se desanimen por los obstáculos ni por las dudas que pueda aparecer en el camino. La curiosidad es el motor que impulsa el conocimiento y cada pregunta sin respuesta es una oportunidad para descubrir algo nuevo. Tu proyecto tiene el poder de transformar ideas en soluciones, de desafiar lo establecido y abrir puertas hacia el futuro.

Agradezco de manera incondicional a mis padres, Dolaris Moreno y Coriel Mendoza, por siempre apoyar cada proyecto que me he propuesto en esta vida y brindarme esa palabra de aliento para nunca rendirme. Gracias por su sacrificio, paciencia y amor inagotable, ellos me han permitido alcanzar este logro. Sin su ejemplo de esfuerzo y dedicación, este sueño no habría sido posible.

A mis hermanitas Alanis Kristell y Andrea Sofía, por su constante apoyo y motivación y por ser una fuente de alegría y ánimo.

A mis abuelos Aurelina Ayarza, Justo Mendoza y Analida Yangüez, por su amor y sabiduría. Sus consejos y valores han sido una inspiración constante en mi vida. Gracias por motivarme y animarme a tomar en cuenta la importancia de la perseverancia y trabajo duro. Y en especial hasta el cielo a mi abuelo Julio Salazar que siempre tendrá un lugar en mi corazón. Sé que desde el cielo su amor y enseñanzas continúan guiándome cada día. Este logro también es para ti.

A mis tíos Manaure Salazar, Yanina Mendoza y Emir Salazar por su cariño y apoyo incondicional. Sus palabras de aliento y su interés genuino en mi progreso han sido una fuente de motivación constante.

A mis profesores y mentores, quienes han compartido generosamente su conocimiento y

experiencia. En particular, agradezco al Dr. Hermógenes Fernández por su orientación, paciencia y dedicación durante todo este proceso. A la profesora Nivia Ríos por dedicarme de su tiempo, por su valioso apoyo técnico y humano. Su disposición, entusiasmo y compromiso ha sido clave para concretar este trabajo y fortalecer mi crecimiento profesional para poder concretar este hermoso proyecto. A la profesora Rita Bethancour por ser una excelente profesora y siempre brindarle ese amor incondicional a cada uno de sus estudiantes y generarles confianza en cada proyecto que uno se proponga. Y al Dr. Humberto Ortega, quiero expresarle mi profundo agradecimiento por confiar en mis capacidades, por su orientación y compromiso científico. Su constante disposición para guiarme en cada etapa de esta investigación han sido fundamentales para mi desarrollo y culminación exitosa.

Al Indicasat Aip por abrirme las puertas de sus instalaciones y brindarme un ambiente de investigación colaborativo, estimulante y con muchas oportunidades y actividades.

Agradezco profundamente a mis compañeros del Laboratorio de Insectos Sociales: Angela Mendieta, Anel Pérez, Gabriel Araúz y Esther Díaz, por su amabilidad, paciencia y por brindarme la confianza necesaria para aprender y ejecutar con seguridad cada procedimiento requerido. Su disposición para compartir sus conocimientos, resolver dudas y ofrecer su apoyo en todo momento fue fundamental para mi crecimiento académico y personal durante esta etapa.

## Índice

<b>A. RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1 DIVERSIDAD Y ECOLOGÍA DE LAS HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS.....	11
1.2 RELACIÓN MUTUALISTA CON LOS HONGOS .....	11
1.3 CICLO DE VIDA DEL HONGO Y SU ROL NUTRICIONAL PARA LAS HORMIGAS.....	12
1.4 DIVERSIDAD ESPECÍFICA DE <i>ACROMYRMEX</i> Y <i>ATTA</i> E IMPACTOS EN PANAMÁ.....	12
1.5 HONGOS BASIDIOMICETOS: CARACTERÍSTICAS Y REPRODUCCIÓN .....	13
1.6 AMENAZAS DEL MICOPARÁSITO Y MECANISMO DE DEFENSA.....	13
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVOS GENERALES.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
4.1 ANTECEDENTES .....	17
4.2 PRÁCTICAS AGRÍCOLAS ADOPTADAS POR LAS HORMIGAS <i>ATTINE</i> JUNTO A SU HONGO CULTIVADO EN SIMBIOSIS .....	18
4.3 <i>ATTINI</i> .....	18
4.4 <i>ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS</i> .....	19
4.5 <i>ESCOVOPSIS</i> .....	21
4.5.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO <i>ESCOVOPSIS</i> PRESENTES EN PANAMÁ.....	22
4.6 ACTINOMICETOS.....	23
4.6.1 ACTINOBACTERIAS PRESENTES EN HORMIGAS <i>ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS</i> .....	24
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
5.1 ÁREA DE COLECTA.....	25
5.2 COLECTA DE COLONIAS.....	26
5.3 CUIDADO DE LOS NIDOS EN EL LABORATORIO DEL INDICASAT A.I.P .....	27
5.4 AISLAMIENTO DE <i>ESCOVOPSIS</i> PROVENIENTE DE LOS NIDOS DE <i>ACROMYRMEX OCTOSPINOSUS</i> .....	28
5.4 DESPRENDIMIENTO DE LOS ACTINOMICETOS .....	32
5.5 INTERACCIÓN ENTRE <i>ESCOVOPSIS</i> Y ACTINOBACTERIAS.....	34
<b>VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>38</b>
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
7.1 COMPARACIÓN ENTRE CEPAS DEL HONGO <i>ESCOVOPSIS</i> .....	39
7.2 COMPARACIÓN ENTRE CEPAS BACTERIANAS .....	41
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>

## Lista de Tablas

Tabla No. 1: Distribución De Las Colectas Según El Sitio De Muestreo, Especie Identificada, Y Conteo De Las Cámaras Subterráneas Y Nidos Colectados En Diversas Regiones De Panamá .....	26
Tabla No. 2: Registro De Los Aislamientos De <i>Escovopsis</i> Obtenidos A Partir De Colonias De <i>Acromyrmex Octospinosus</i> , Organizado Según Su Localidad De Colecta .....	29
Tabla No. 3: Códigos Asignados A Cepas De <i>Escovopsis</i> , Especie De Hormiga Hospedadora De Las Cuales Fueron Aisladas, Medio De Cultivo Utilizado E Imágenes Representativas De Su Morfología.....	30
Tabla No. 4: Diferencia Morfológica De Actinobacterias Aisladas Provenientes De Hormigas <i>Acromyrmex Octospinosus</i> .....	33
Tabla No. 5: Evidencias Morfológicas De Las Interacciones Entre <i>Escovopsis</i> Y Actinobacterias, Según Códigos De Identificación Bacteriana.....	35
Tabla No. 6 Análisis De Varianza (Anova) Para Las Cepas De <i>Escovopsis</i> .....	39
Tabla No. 7 Resumen Del Modelo Estadístico Para <i>Escovopsis</i> .....	39
Tabla No. 8 Comparación De Medias De Intervalo De Confianza Del 99% Para <i>Escovopsis</i> .....	40
Tabla No. 9 Agrupación De Información Utilizando El Método De Tukey Y Una Confianza De 95% Para Datos De Cepas De <i>Escovopsis</i> .....	40
Tabla No. 10 Comparación Múltiple Por Método Lsd De Fisher.....	41
Tabla No. 10 Análisis De Varianza De Cepas Bacterianas .....	41
Tabla No. 11 Resumen Del Modelo Para Bacterias .....	42
Tabla No. 12 Comparación De Medias Por Tukey (Sin Diferencia Significativa).....	42

## Lista de Figuras

Fig. 1: Áreas De Colectas: A): Pipeline Road, Provincia De Colón, B): Camino De Plantaciones, Provincia De Colón, C): Punta Chame, Provincia De Panamá Oeste, D): El Lirio, Provincia De Panamá Oeste, E): Juan Hombrón, Provincia De Coclé, F): El Caño, Provincia De Coclé, G): Divisa, Provincia De Veraguas, H): Santa Claro, Río Sereno Provincia De Chiriquí .....	25
Fig. 2: Cuidado De Nido En El Laboratorio Del Indicasat Aip: A) Jardín Fúngico Conservado En Un Recipiente Plástico Dentro Del Laboratorio De Insectos De Indicasat Aip. B) Hojas Frescas ( <i>Inga Spp.</i> ) Utilizadas Por Hormigas Para Forrajerar Y Alimentar Al Hongo Simbionte. C) Colocación De Papel Toalla Humedecido Con Agua Estéril; Este Método Permite Simular Un Nivel Adecuado De Humedad Relativa, Favoreciendo Un Ambiente Similar A Su Hábitat Natural Y Facilitando El Cultivo Del Jardín Fúngico Sin Inconvenientes	28
Fig. 3: Cámaras Húmedas Para Extraer Muestras De <i>Escovopsis</i> : Platos Petri Con Muestras De Material Biológico ( <i>Escovopsis</i> Se Ha Colocado Papel Toalla Humedecido Con Agua Estéril Para Proporcionar Las Condiciones De Humedad Necesarias Para El Crecimiento Del Hongo. Cada Plato Está Rotulado Con Códigos Que Indican La Especie De Hormiga, La Fecha De Muestreo Y El Nido De Origen.....	28
Fig. 4: Distribución Superficial De Actinobacteria En Hormiga Mutualista <i>Acromyrmex Octospinosus</i> . Li, H., Sosa-Calvo, J., Horn, H. A., Pupo, M. T., Clardy, J., Rabeling, C., & Currie, C. R. (2018). Convergent Evolution Of Complex Structures For Ant-Bacterial Defensive Symbiosis In Fungus-Farming Ants. <i>Proceedings Of The National Academy Of Sciences</i> , 115(42), 10720-10725.....	33
Fig. 5: Diagrama De Caja Para Las Cepas De <i>Escovopsis</i> .....	40
Fig. 6: Agrupación De Medias De <i>Escovopsis</i> Con Letras (Tukey Cld) .....	41
Fig. 7: Diagrama De Caja Para Cepas Bacterianas.....	42
Fig. 8: Agrupación De Medias De Actinobacterias Con Letras .....	43

## A. RESUMEN

Las hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex octospinosus*, presentes en Panamá, mantienen una relación simbiótica con el hongo cultivado *Leucoagaricus gongylophorus*, esencial para la supervivencia de la colonia. Sin embargo, estos cultivos fúngicos son susceptibles a infecciones por hongos del género *Escovopsis*, cuyo micoparasitismo puede comprometer la estabilidad de la colonia. Para contrarrestar potenciales infecciones, las hormigas han desarrollado una asociación mutualista con bacterias del grupo de los actinomicetos, reconocida por la producción de compuestos antimicrobianos que se encargan de inhibir el crecimiento de *Escovopsis*. Esta investigación tiene como principal objetivo evaluar la diversidad y la capacidad antimicrobiana de los actinomicetos asociados a *Acromyrmex octospinosus* contra cepas de *Escovopsis*, con el fin de comprender su papel en la protección de los jardines fúngicos basidiomicetes. Para ello, se colectaron nidos en campo y, bajo condiciones controladas de laboratorio, se seleccionaron 20 obreras con cobertura visible de actinomicetes. A partir de ellas se realizaron dos procedimientos: **(i)** Lavado: Se realizó una técnica de lavado que contenía agua destilada estéril con 0.1% de Tween 80, con agitación leve para desprender los microorganismos asociados. La solución resultante fue transferida a placas Petri que contenían medio agar Streptomyces. **(ii)** Raspado de los actinomicetes: utilizando una aguja estéril, se realizó un raspado suave de la superficie del tórax de cada hormiga, recolectando biopelículas microbianas visible. El material recolectado fue inoculado directamente en placas con medio agar Streptomyces. Una vez las bacterias actinomicetes fueron creciendo en el medio Streptomyces, se transplantaron las colonias de forma individual a un plato Petri con el medio ISP2. Luego, de 5 días, al presentar un crecimiento notable las colonias fueron transferidas a un plato Petri con medio ISP2, y cepas de *Escovopsis*, para determinar el nivel de interacción.

Dichas pruebas interacción entre bacteria y hongo mostraron que un porcentaje considerable de las cepas bacterianas generaron a los de inhibición micelial. Los datos obtenidos fueron procesados en el software Minitab® mediante Anova (One-way) y pruebas de comparación múltiple (Tukey y LSD de Fisher). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas *Escovopsis* ( $p < 0.01$ ), siendo Col2 y A04 las que mostraron mayor capacidad inhibitoria, mientras que A05 y Ae02 se situaron en los grupos con menor actividad. En

contraste, no se hallaron diferencias significativas entre las cepas bacterianas ( $p = 0.916$ ), lo cual sugiere una respuesta funcional homogénea entre los aislamientos obtenidos. Éstos hallazgos evidencian que los Actinomicetos asociado a *Acromyrmex octospinosus* representan una fuente natural y funcional de defensa microbiana, con potencial antimicroparasítico, siendo clave en el mantenimiento ecológico de los jardines fúngicos. La interacción simbiótica analizada constituye un ejemplo de defensa microbiana tripartita altamente especializada, donde bacterias productoras de metabolitos secundarios cumplen un rol esencial en la protección del mutualismo hormiga-hongo frente a patógenos especializados como *Escovopsis*.

## ABSTRACT

The leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*, present in Panama, maintains a symbiotic relationship with the cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, which is essential for colony survival. However, these fungal cultivars are susceptible to infections by fungi of the genus *Escovopsis*, whose mycoparasitic activity can compromise colony stability. To counteract such infections, the ants have developed a mutualistic association with actinomycete bacteria, known for their production of antimicrobial compounds that inhibit the growth of *Escovopsis*.

This research aimed to evaluate the diversity and antimicrobial capacity of actinomycetes associated with *Acromyrmex octospinosus* against different *Escovopsis* strains, in order to understand their role in protecting the basidiomycete fungal gardens. To achieve this, nests were collected in the field, and under controlled laboratory conditions, 20 worker ants visibly covered with actinomycetes were randomly selected. Two sampling procedures were carried out: (i) Washing: a gentle washing technique was applied using sterile distilled water with 0.1% Tween 80, with slight agitation to detach associated microorganisms. The resulting solution was plated on Streptomyces agar medium. (ii) Actinomycete scraping: using a sterile needle, a gentle scraping of the thorax surface was performed to collect visible microbial biofilms, which were then directly inoculated onto Streptomyces agar plates.

Once the actinomycete colonies grew on the Streptomyces medium, they were individually transferred to Petri dishes containing ISP2 medium. After five days of notable growth, the

colonies were again transferred to ISP2 plates containing *Escovopsis* strains to evaluate microbial interaction.

These interaction assays revealed that a considerable proportion of the bacterial strains produced clear zones of mycelial inhibition. The data obtained were processed in Minitab® software using one-way ANOVA and post hoc multiple comparison tests (Tukey and Fisher's LSD). Statistically significant differences were detected among *Escovopsis* strains ( $p < 0.01$ ), with strains Col2 and A04 showing the highest inhibitory activity, while A05 and Ae02 were among the least active. In contrast, no significant differences were observed among the bacterial strains ( $p = 0.916$ ), suggesting a homogeneous functional response among the isolates.

These findings demonstrate that the actinomycetes associated with *Acromyrmex octospinosus* represent a natural and functional source of microbial defense, with potential antimycoparasitic properties, and play a key role in the ecological maintenance of fungal gardens. The symbiotic interaction analyzed exemplifies a highly specialized tripartite microbial defense system, in which bacteria producing secondary metabolites play an essential role in protecting the ant–fungus mutualism against specialized pathogens such as *Escovopsis*.

## I. Introducción

La sociabilidad juega un papel crucial en el desarrollo de organismos sociales, proporcionando ventajas evolutivas que se encargan de facilitar la cooperación entre individuos dentro de colonias (Gilbert, M. 2024). Un ejemplo de sociedad notable son las hormigas cultivadoras de hongos, que surgieron hace aproximadamente 66 millones de años al final del Cretácico. Estas hormigas lograron establecer una relación mutualista con hongos, permitiendo la coevolución de ambos durante eventos de extinción masiva. (Schultz et al., 2024).

### 1.1 Diversidad y Ecología de las hormigas Cortadoras de Hojas

Zonas Neotropicales albergan una elevada diversidad biológica que incluyen especies de hormigas cortadoras de hojas o cultivadoras de hongos, pertenecientes a los géneros *Acromyrmex* y *Atta* (Li et al., 2020). Conocidas localmente como arrieras, estas hormigas se encargan de desempeñar un estilo de vida fundamentado en una relación simbiótica con hongos presentes en sus nidos. Su principal función ecológica es, recolectar y transformar material vegetal utilizados como principal fuente de alimento para sus crías (Wetterer et al., 1998). Durante el proceso de forrajeo, estas hormigas seleccionan hojas de una amplia variedad de plantas, que abarcan desde briófitas hasta angiospermas. Su actividad de recolección es intensiva y puede representar hasta el 25% del consumo de tejido vegetal vivo en los ecosistemas donde están presentes. En áreas agrícolas, los nidos densos de estas hormigas pueden generar impactos significativos, ocasionando pérdidas económicas considerables para los productores debido a su alta capacidad de recolección y consumo (Dimarco & Corley, 2023). Estas hormigas pertenecen a uno de los grupos de insectos con mayor diversidad específica y ecológica en las latitudes tropicales, lo cual cumple sus funciones importantes en todos los ecosistemas donde se encuentren presente (Díaz et al., 2009).

### 1.2 Relación Mutualista con los Hongos

En el continente americano, los hongos del grupo Basidiomicetos han desarrollado una relación simbiótica mutualista obligatoria con las hormigas del grupo Attini. La agricultura

de estas hormigas presenta diferentes tipos, basados en la historia evolutiva tanto de las hormigas como de los hongos asociados (Schultz et al. 2010). El grupo más derivado de las hormigas Attini mantiene un sistema mutualista obligatorio con su fuente de nutrientes, los hongos basidiomicetos de la familia (*Agaricaceae: Leptotaceae*). Para el cultivo de este hongo, las hormigas utilizan material vegetal fresco, principalmente hojas y residuos vegetales suaves como ramas y tallos jóvenes (Gómez, 2017).

### 1.3 Ciclo de vida del hongo y su Rol nutricional para las hormigas

Una vez el micelio se desarrolla, se encarga de generar gongilidios que se agrupan en estructuras llamadas estafilas. Estos gongilidios son hifas con una forma bulbosa que se encargan de concentrar cantidades grandes de lípidos azúcares libres, polisacáridos y enzimas. Sirviéndoles de nutrientes a la colonia de hormigas y en especial a la reina (Rodríguez et al., 2024). Estos materiales son procesados dentro del nido y preparados mediante una combinación de secreciones de las glándulas mandibulares, producido por una glándula única de las hormigas Formicidae: cumpliendo con la función de producir antibióticos que protejan el hormiguero contra microorganismos en general (Billen, 2019).

### 1.4 Diversidad Específica de *Acromyrmex* y *Atta* e Impactos en Panamá

En la diversidad de estas hormigas, se encuentran dos géneros más sobresalientes, *Acromyrmex* y *Atta*, conocidas por su desempeño en el cultivar de hongos nutriéndolos con hojas frescas. Hasta la fecha han sido identificadas 24 especies de *Acromyrmex* y 15 de especies de *Atta*. Las especies del primer género (*Acromyrmex*) se distinguen por colonias que residen en nidos con un número pequeño de cámaras, y el número de obreras en un nido pueden alcanzar de 10 y 150 x 10<sup>3</sup> (Cárdenas Murillo, R. 1996). A pesar de ser consideradas plagas, en Panamá el impacto ecológico que estas hormigas producen es considerable, e incalculable. Las actividades diarias realizadas por estas hormigas son múltiples las cuales se inician con el recorte de hojas y transporte al nido, una vez allí la cera exterior de las hojas se elimina y se les añaden enzimas que provienen de las glándulas de las hormigas cuya función es encargarse de disolver la pared celular y acabar con las fitoalexinas, que son moléculas defensivas producidas por las plantas en respuesta a infecciones por bacterias, hongos o virus. Posteriormente, toman trozos de hifas de las porciones más prudente del

jardín fúngico que se encargan de cultivar y las dispersan a alta densidad en el sustrato recientemente listo. Luego este hongo se agranda sobre el sustrato compuesto por las hormigas y luego es utilizado como fuente de nutrientes para las crías (Armbrecht, I. 2018; Patiño Cruz, 2018).

### 1.5 Hongos Basidiomicetos: Características y Reproducción

Los hongos de filo Basidiomycota, conocidos como basidiomicetos, forman parte de distintos tipos de hongos. Su método de reproducción se lleva a cabo mediante estructuras denominadas basidios, localizados en los extremos de las hifas. Este filo de hongos puede dividirse en dos grupos principales: los heterobasidiomicetos, que cuenta con basidios formados por cuatro células, y los homobasidiomicetos que presentan basidios compuesto por una sola célula (Ronald. 2024). Los hongos Basidiomicetos, divididos en heterobasidiomicetos y homobasidiomicetos, presentan estructuras reproductivas denominadas basidios. Los heterobasidiomicetos forman basidios con cuatro células y suelen ser briotróficos, completando su ciclo vital al infectar plantas esencialmente maíz (Kothe, 1996). Por otro lado, los homobasidiomicetos producen cuerpos fructíferos complejos que representan ejemplos notables de evolución morfológica en el reino Fungi (Hibbett & Binder, 2002).

### 1.6 Amenazas del Micoparásito y Mecanismo de Defensa

Estas hormigas viven en constante amenaza debido a la presencia de un micoparásito conocido como *Escovopsis* (Ascomycota: Pezizomycotina) el cual es un hongo patógeno encargado de parasitar los cultivos de hongos de las hormigas. Los hongos cultivados por las hormigas son lo que ha llevado al desarrollo de comportamientos defensivos y asociaciones con bacterias productoras de antibiótico conocido como Actinomicetos (Barke et al., 2010). El ataque de este patógeno es inminente, crea una infección que posee una resistencia de hasta 10 meses sobre el jardín de las hormigas; inmediatamente se prolifera este parásito incrementa el tamaño en el área total del jardín provocando masas de esporas; esto provoca una acción necrotrófica rodeando todas las cámaras subterráneas, y de esta forma la colonia se ve forzada a abandonar su nido. Mesén Porras, E. (2015). La comunidad simbiótica formada por *Acromyrmex*, su hongo alimenticio y el micoparásito *Escovopsis* se mantiene

mediante interacciones estrechas en la que cada organismo cumple su rol esencial. En la última década, se identificó un nuevo integrante clave en esta relación, la bacteria filamentosa *Pseudonocardia sp.*, que parece establecer un vínculo mutualista con las hormigas cortadoras de hojas. En estas especies, *Pseudonocardia* se desarrolla alrededor de los tubérculos cuticulares de las hormigas, donde se cree que sintetiza antibióticos efectivos contra *Escovopsis*, contribuyendo a mantener la sepsia del jardín de hongos (Zucchi et al., 2010).

Según Gutierrez Espinoza, C. A. (2017) los mecanismos de conducta para hacerle frente a este patógeno implican asignaciones específicas para cada casta que se encuentra dentro de la colonia; la erradicación del hongo parásito es realizado por las obreras menores, quienes se encargan de lamer el área del jardín y recoger las esporas en su bolsillo infrabucal, produciendo pellets que posteriormente son colocadas en cámaras destinadas para los desechos dentro del nido. Una sustancia utilizada por las hormigas para controlar posibles parásitos, mediante un mecanismo de antagonismo por antibiosis es la función que cumplen los actinomicetos ubicados en las cutículas de las hormigas (Flórez, L. C. 2011).

Estas Actinobacterias poseen una fisiología diferente y una flexibilidad metabólica con un elevado potencial para crear nuevos compuestos bioactivos y enzimas (Al-Shaibani et al., 2021). Investigaciones similares apuntan que simbiosis microbianos de las hormigas cortadoras de hojas, *Pseudonocardia* y *Streptomyces*, brindan apoyo a las hormigas para poder combatir las infecciones que hacen frente a sus jardines de hongos mediante el suministro de estos compuestos antimicrobianos (Schoenian et al., 2011).

## II. Objetivos

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES

Cuantificar la diversidad y capacidad antifúngica de los actinomicetes aislados de *Acromyrmex octospinosus* contra hongos parásitos *Escovopsis* del jardín de las hormigas cultivadoras de hongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y cultivar actinomicetes asociadas a la cutícula de las hormigas *Acromyrmex octospinosus* en Panamá.
- Evaluar la diversidad de bacterias actinomicetes asociadas a la cutícula de las hormigas *Acromyrmex octospinosus* en Panamá
- Determinar la variación de la capacidad antimicrobiana de los actinomicetes de *Acromyrmex octospinosus* contra hongos *Escovopsis* aislados de nidos fúngicos.

### III. HIPÓTESIS

La diversidad funcional de los actinomicetes proveniente de las *Acromyrmex octospinosus* determina diferencias significativas en su capacidad para hacerle frente a las cepas específicas de *Escovopsis*, influyendo en la estabilidad del mutualismo entre hormigas y su hongo.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Antecedentes

Los antecedentes de la agricultura se originaron hace 8,000 y 12,000 años en diferentes áreas del mundo, como el suroeste de Asia, Mesoamérica tropical y Sudamérica tropical (Piperno, 2018). Estos avances en la agricultura han sido fundamentales para el desarrollo de la humanidad debido a que nuestras antiguas civilizaciones se establecieron cerca de grandes ríos y lagos, facilitando la recolección de frutas y semillas y así marcar el inicio de las prácticas agrícolas (Bonnet et al., 2022). La interacción entre las hormigas y el hongo fúngico, cuya función es cultivarlo con material vegetal para así obtener su fuente de alimentos, surgió hace 30 millones de años (Alejandra, 2017). Esto representa una analogía interesante, ya que se puede observar en las hormigas cortadoras de hojas, una notable similitud con los humanos en sus prácticas de recolección. Estas hormigas se encargan de cortar vegetación en pequeños fragmentos para transportarlos a su nido, que puede albergar a más de un millón de obreras. Para sostener estas vastas colonias, las obreras buscan materiales necesarios para el crecimiento del hongo simbiótico que reside en la colonia (Roces, 2002).

Este hongo simbiótico es conocido como *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales, agaricaceae) el cual establece una relación mutualista con las hormigas cortadoras de hojas. Dicho hongo es el socio simbiótico de diversas especies de hormigas *Attini*, que procesan las hojas dentro de sus nidos para cultivar los jardines de hongos (Araújo et al., 2022). En términos generales el hongo simbiote constituye la única fuente de alimento tanto para ellas como para las larvas de las hormigas cortadoras de hojas, estas deben cultivarlos con hojas que posean características favorables para su crecimiento. Por esta razón, seleccionan follaje rico en agua,

## 4.2 Prácticas agrícolas adoptadas por las hormigas Attine junto a su hongo cultivado en simbiosis

Los sistemas de cultivo de las hormigas cortadoras de hojas se dividen en diferentes tipos: (a) agricultura inferior, el sistema agrícola primitivo; (b) agricultura de hongos coralinos; (c) agricultura de levadura; (d) agricultura superior; y (e) agricultura de cortadores de hojas, este último siendo un subtipo derivado de la agricultura superior.

- **Agricultura inferior:** 84 especies de hormigas, pertenecientes a 11 géneros, cultivan hongos parasol como *Leucocoprinus*, *Leucoagaricus* y *Lepiota*, que están en la tribu Leucocoprineae (familia Agaricaceae)
- **Agricultura de hongos coralinos:** 29 especies del género *Apterostigma* de hormigas Attina cultivan hongos del género *Myrmecopterula*, que pertenecen a la familia *Pterulaceae*, fuera de la familia Agaricaceae
- **Agricultura de levaduras:** 17 especies del género *Cyphomyrmex* cultivan hongos que provienen de un ancestro fúngico inferior, desarrollándose en una fase unicelular similar a la levadura
- **Agricultura superior:** 111 especies de hormigas (59 no cortadoras de hojas y 52 cortadoras de hojas) cultivan hongos de un clado derivado de un ancestro fúngico inferior, que se convierte en un simbiote obligado
- **Agricultura de las hormigas cortadoras de hojas:** Forma parte de una subdivisión de la agricultura de las hormigas Attine superiores y es llevada a cabo por hormigas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (50 especies), que cultivan un único tipo de hongo altamente especializado, derivado de las especies cultivadas por las hormigas attine superiores. (Martínez, A. R. 2022)

## 4.3 Attini

Las hormigas de la tribu Attini, usualmente conocidas como hormigas cortadoras de hojas o cultivadoras de hongo, son nativas de los trópicos del Nuevo Mundo. Actualmente, se encuentra una amplia literatura que se encarga de describir las costumbres de este grupo. En su totalidad, todas las especies que comprende la tribu Attini se encargan de cultivar enérgicamente un hongo en sus colonias y este hongo es aprovechado por las hormigas como

su principal y exclusiva única fuente de alimento (Martin, 1970). Generalmente las hormigas Attini necesitan indispensablemente del cultivo de jardines de hongos para suplir sus necesidades alimenticias. Esta dependencia es tan crucial que, cuando una reina joven deja su nido materno, deberá transportar en su boca un núcleo de hongo que servirá como el cultivo madre para así arrancar su nuevo jardín (Schultz & Brady, 2008). El grupo de hongos relacionados con las hormigas Attini superiores proviene de un antecesor fúngico de Attini inferior. Los hongos de Attini inferiores a diferencia de los de Attini superiores no pueden vivir independientemente alejados de sus hongos, lo cual señala una dinámica coevolutiva vigorosa entre las hormigas de Attini superior y sus cultivares (Masiulionis et al., 2014). Una gran cantidad de los hongos attinos, incluyendo los cultivares de levadura, se clasifican en dos géneros: *Leucoagaricus* y *Leucocoprinus*. Estos géneros conforman la tribu *Leucocoprineae* dentro de la familia *Laprotaceae* (Agaricales: Basidiomycota), un grupo especializado en descomponer materia orgánica (Vo et al., 2009). *Leucoagaricus gongylophorus*, un hongo, que ha desarrollado una relación mutualista en la cual el hongo suministra las enzimas necesarias para descomponer los polímeros vegetales y liberar azúcares es utilizada por el hongo para sus necesidades energéticas, mientras que otra parte se almacena como glucógeno en las gongylidia, que estas sirven como fuentes de energía para las hormigas (Maya Yesca, M. E. (2022).

La división del trabajo se reconoce como una de las principales claves del éxito ecológico de los grupos sociales (Birkenfeld et al., 2024). Cuando una población de obreras aumenta a aproximadamente 500 individuos, la distribución de tamaños comienza a transformarse hacia la forma “adulta” que es típica de colonias con una tasa poblacional grande (Wilson, 1983). Uno de las las principales asignaciones de las obreras es el cuidado de la reina y mantenimiento de la colonia, es importante saber que es llevado a cabo mediante un grupo de obreras totalmente estériles y polimórficas el cual incluyen jardineras, nodrizas, cortadoras, cargadoras, colectas y soldados (Montoya-Lerma et al., 2006).

#### 4.4 *Acromyrmex octospinosus*

En 1937, el orden taxonómico de las especies de *Acromyrmex octospinosus* fue revisada por el cinetífico Wheeler y concretó los datos suficiente para su clasificación taxonómica

utilizada para las investigaciones pasadas y describió las siguientes especies: (i) *A. octospinosus octospinosus* de Cayena, Guayana Francesa, (ii) *A. octospinosus echinator* de Senahú Vera Paz, Guatemala, (iii) *A. octospinosus inti* de San Bartolomé, Perú, (iv) *A. octospinosus volcanus* del Volcán de Barba, Costa Rica, (v) *A. octospinosus ekchuah* de Yucatán, México y (vi) *A. octospinosus cubanus* de Cojímar, Cuba (Mera-Rodríguez et al., 2024). El vuelo nupcial de las hormigas *Acromyrmex octospinosus* coincide con el comienzo de la temporada lluviosa. Luego de su apareamiento, las reinas excavan un túnel corto que conduce a una cámara de cría, donde inician un nuevo jardín de hongos. El tiempo mínimo para el proceso de aparición de las primeras obreras jóvenes es de al menos siete semanas, aunque puede prolongarse más. El período entre la fundación del jardín de hongos y la formación de un pequeño montículo de tierra (5-10cm de diámetro) puede extenderse por varias semanas o incluso meses (Lewis, 1975).

Estas hormigas están adaptadas a vivir en áreas con precipitaciones medias desde 700 a 1,200 milímetros anuales. No se ve restringidas por el tipo de suelo donde se ubican, por lo que aprovechan cavidades diminutas para poder construir sus nidos (Cerna et al., 2003). En las colonias las reinas reproductoras aseguran la supervivencia y expansión de la colonia, que puede llegar a vivir hasta dos décadas. Dentro de estas colonias las hormigas se distribuyen en distintas castas (obreras pequeñas, obreras grandes, ginetas/reinas) cada una posee una función importante dentro del nido (Adams et al., 2021). Siguiendo un modo de “cadena de montaje”, las obreras, conocidas también como recolectoras y acarreadoras, se encargan de cortar y trasladar la vegetación en dirección a la colonia. Las de tamaño intermedio cumplen la función de desmenuzar el material vegetal en porciones más pequeñas, mientras que las obreras más diminutas se especializan en manipular el sustrato y prepararle cebo en forma de gránulos. Dicha distribución de funciones resulta esencial para la conservación del nido, el cual constituye su principal recurso alimenticio (Boulogne et al., 2011).

Esta especie de hormigas posee similitud con las abejas melíferas en cuanto a su biología general y rasgos de historia de vida. Por lo general consta de colonias grandes y miles de individuos que suelen estar bajo el dominio de una única reina poliándrica, poseen una fuerte

división del trabajo, las reinas pueden vivir por décadas y la carga de patógenos es significativa (Sirviö et al., 2006).

#### 4.5 *Escovopsis*

Las primeras observaciones de *Escovopsis* se remontan al siglo XIX, cuando Alfred Möller reportó la presencia de diversas especies de hongos en los jardines fúngicos de las hormigas cortadoras de hojas. A lo largo del siglo XX, Kreisel y Weber siguieron con las investigaciones y confirmaron la presencia de los hongos descritos por Möller. No obstante, el género *Escovopsis* y sus dos principales especies fueron formalmente descritas hasta la década de 1990 (Barengo, 2023). *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) pertenece a un género variado de microhongos que solamente ha sido encontrado junto a una asociación con los jardines de hormigas productoras de hongos (Tribu Attini). Es conocido como un microparásito proveniente de los hongos basidiomicetos cultivado por las *Acromyrmex* y utilizada como fuente alimento (Christopher et al., 2021). Este hongo puede limitar aptitudes de una colonia y devastar un jardín en muy poco días. *Escovopsis* ha experimentado un proceso de coevolución en una relación estrecha con las hormigas cultivadoras de hongos y sus cultivos fúngicos. A diferencia de sus parientes cercanos, ha desarrollado un modo de vida totalmente especializado como microparásito, lo que indica pérdida de genes involucrados en la síntesis de enzimas degradadoras de materia vegetal (Dhodary et al., 2018).

A pesar de que este hongo no produce esporas aéreas y aparentemente no es transmitido por las reinas fundadoras, podría ser vectorizado por otros invertebrados que viven en asociación con las hormigas (Reynolds & Currie, 2004). Dicho patógeno ha tenido una evolución significativa para poder evadir el comportamiento higiénico que poseen las hormigas y representa un peligro importante en su sistema agrícola debido a su capacidad de destruir de manera completa los jardines de hongo. *Escovopsis* crece de manera susceptible en sus hospederos, teniendo como resultado el colapso de las estructuras de alimentación (gongylidia) y provocando la inestabilidad de la colonia o hasta la muerte. Por lo que este hongo podría ser un representante como agente de biocontrol para las hormigas porque es un patógeno experto que discrepa la simbiosis específicamente entre las hormigas y su cultivar fúngico (Wallace et al., 2014). *Escovopsis* es sumamente infeccioso y provoca la

reducción de la tasa de crecimiento de los jardines fúngicos, produciendo en ocasiones que las hormigas abandonen sus nidos (Taerum et al., 2007).

#### 4.5.1 Clasificación y Caracterización del género *Escovopsis* presentes en Panamá

1. ***Escovopsis weberi***: Vesículas en forma cilíndrica, los tamaños varían entre 24-45 mm de largo y 16-18 mm de ancho. Los conidios, son ovoides a elipsoidales y tienden a oscurecerse con edad gracias a la formación de una capa externa densamente pigmentada (Augustin et al., 2013).
2. ***Escovopsis aspergilloides***: Poseen hifas con fibulaciones, micelio aéreo escaso, con una tonalidad blanquecina, con un envés pálido. Los conidios presentan color miel y en el resto muestra una tonalidad amilla. Los conidióforos surgen de estolones de hifas aéreas y poseen un estípite de entre 10 y 50  $\mu\text{m}$  de longitud, aunque en algunos casos puede estar ausente. Existen conidióforos policéfalos que pueden alcanzar hasta 1350  $\mu\text{m}$  de longitud, con un ancho de 6.5 a 8  $\mu\text{m}$ , siendo hialinos, lisos, de paredes delgadas y pluriseptados (Seifert et al., 1995).
3. ***Escovopsis lentecrescens***: Conidióforos que desarrollan vesículas hialinas entre 1 y 10 de manera irregular y paredes lisas, organizadas de manera alterna u opuestas. Ápices pueden presentar morfología globosas, subglobosas, espatuladas, oblongas o cilíndricas y sin tabiquetes. Conidios cambian entre formas globosas y oblongas, con dimensiones de

## 4.6 Actinomicetos

Durante Investigaçlonst,

#### 4.6.1 Actinobacterias presentes en hormigas *Acromyrmex octospinosus*

***Streptomyces*:** Este género es perteneciente de la familia *Streptomycetaceae* dentro del orden *Actinomycetales*, compuesto por bacterias grampositivas, filamentosas y aerobias, renombradas por la capacidad que poseen de producir metabolitos secundarios junto a propiedades antibióticas. Dichas bacterias forman un micelio extenso tanto en medio sólido como líquidos, desarrollando hifas vegetativas que presentan diámetros entre 0.5 y 2.0  $\mu\text{m}$ , semejante a la de los hongos filamentosos. *Streptomyces* se distingue por la capacidad de esporulación distintiva en la que se da la formación de esporas en hifas aéreas, contribuyendo así a la propagación en el ambiente (Barka et al., 2016). *Streptomyces* se encuentra altamente distribuido en el suelo y ecosistemas marinos, sitios donde cumple un papel clave en cuanto a la degradación de materia orgánica. En las interacción química mutualistas con artrópodos, se ha identificado su presencia en hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex*, donde contribuyen a la producción de compuestos capaces de inhibir el crecimiento de hongos, bacterias grampositivas e incluso gram negativas (Cambronero-Heinrichs et al., 2019). *Streptomyces* no posee solamente un papel ecológico significativo, sino que también ha sido objeto de numerosas investigaciones gracias a su potencial en la biotecnología. Una estimación de aproximadamente el 75% de los antibióticos implementados en la industria farmacéutica y médica provienen de esta especie, entre los antibióticos están la estreptomicina, eritromicina y tetraciclina. Sus metabolitos secundarios han permitido la identificación de nuevas moléculas con actividades antifúngicas, anticancerígena y antivirales (Genilloud, 2018).

***Pseudonocardia*:** El género *Pseudonocardia* perteneciente a la familia Pseudonocardiaceae dentro del orden *Actinomycetales* está compuesta por bacterias grampositivas, aeróbicas e inmóviles, con un crecimiento relativamente lento. Su morfología es propia debido a la presencia de hifas totalmente ramificadas, que se diferencian en hifas de sustrato y aéreas. Las colonias de *Pseudonocardia* presentan tonalidades de color naranja, con hifas aéreas blancas que forman esporas. En contraste las hifas de sustrato suelen fragmentarse en elementos baciliformes, adaptándose a condiciones variables del ambiente (Whatmough et al., 2024). Los antibióticos producidos por *Pseudonocardia* incluyen compuestos poliénicos y macrólidos con propiedades antifúngicas y antibacterianas. Estos metabolitos

han sido ampliamente investigados por su potencial uso en la industria farmacéutica. Además, se ha registrado que diversas especies de *Pseudonocardia* poseen mecanismos de resistencia a sus propios antibióticos, lo que sugiere una coevolución con sus hospederos y resalta la importancia de desarrollar estrategias para preservar la eficacia de sus compuestos bioactivos en el entorno natural (Mangamuri et al. 2015).

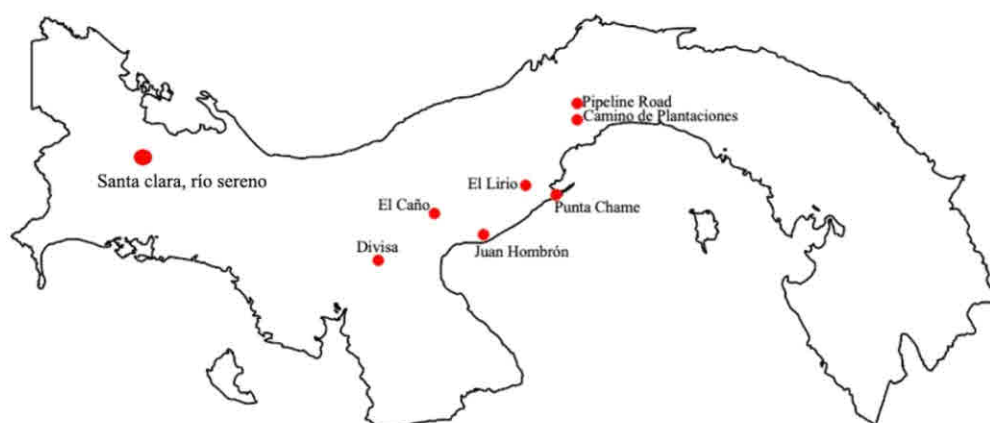
## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de colecta

Las muestras fueron previamente colectadas entre la temporada lluviosa del 2024 y la temporada seca del 2024.

Las colectas de las hormigas se realizaron en varios puntos específicos de la Ciudad de Panamá donde destacan:

- Pipeline Road Gamboa, Provincia de Colón
- Camino de Plantación, Provincia de Colón/Panamá
- Punta Chame, Provincia de Panamá Oeste
- El Lirio, Provincia de Panamá Oeste
- Juan Hombrón, Provincia de Coclé
- El Caño, Provincia de Coclé
- Divisa, Provincia de Veraguas
- Santa clara río sereno, Provincia de Chiriquí



**Fig. 1: Áreas de Colectas:** a): Pipeline Road, provincia de Colón, b): Camino de plantaciones, provincia de Colón, c): Punta Chame, Provincia de Panamá Oeste, d): El Lirio, Provincia de Panamá Oeste, e): Juan Hombrón, Provincia de Coclé, f): El Caño, Provincia de Coclé, g): Divisa, Provincia de Veraguas, h): Santa clara, río sereno Provincia de Chiriquí.

## 5.2 Colecta de Colonias

El reconocimiento de los nidos se llevó a cabo observando la estructura del mismo, con un enfoque particular en la zona de la entrada. Estas hormigas del género *Acromyrmex* se caracterizan por elaborar sus nidos con montículos pronunciados de tierra suelta, hojarasca y raíces que permiten reforzar la estructura de su colonia. Luego de detectar la entrada de las hormigas se procedió a excavar un aproximado de 1.3 m de profundidad para topar la primera cámara del hongo simbionte. En total se colectaron 15 colonias de *Acromyrmex octospinosus*, cada colonia estaba compuesta por un aproximado de 2 a 3 cámaras, estas excavaciones se realizaron en temporadas seca y lluviosa. A la hora de excavar se utilizaron 3 piquetas geológica de diferentes tamaños, para poder excavar sin ningún tipo de inconveniente. Se extrajo el hongo simbionte, se hizo el uso de cuchara sopera de plástico y una pinza de laboratorio de 15 pulgadas; con la cuchara se procedió a extraer el hongo, luego se colocó en bandejas plásticas previamente engrasadas con aceite de cocinar en la parte superior de las bandejas para así evitar que las hormigas se salieran y luego se procedió a cerrar la bandeja con su respectiva tapa, se le colocó cinta adhesiva blanca y así luego terminar rotulando.

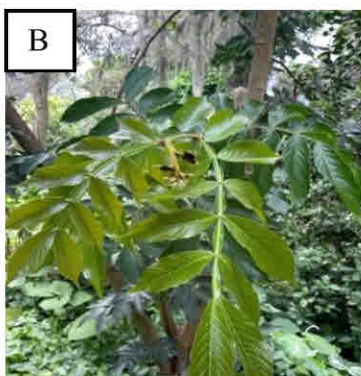
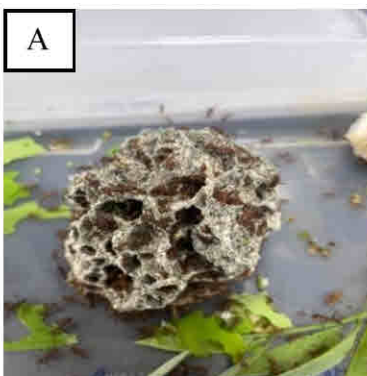
**Tabla No. 1:** Distribución de las colectas según el sitio de muestreo, especie identificada, y conteo de las cámaras subterráneas y nidos colectados en diversas regiones de Panamá.

Género	Especie	Colecta	Sitio	Nidos	Cámaras
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	El Lirio, Chorrera	1	2
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	El Lirio, Chorrera	2	3
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	El Lirio, Chorrera	3	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	El Lirio, Chorrera	4	2
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	El Lirio, Chorrera	5	2
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	El Lirio, Chorrera	6	3
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	1	Santa clara río sereno, Chiriquí	1	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	2	Santa clara río sereno, Chiriquí	1	2
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	2	Santa clara río sereno, Chiriquí	1	2
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	2	Santa clara río sereno, Chiriquí	1	3
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	3	Juan Hombrón, Coclé	1	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	3	Juan Hombrón, Coclé	2	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	3	Juan Hombrón, Coclé	3	3
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	3	Juan Hombrón, Coclé	4	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	3	Juan Hombrón, Coclé	5	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	4	Punta Chame, Panamá Oeste	1	1
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	4	Punta Chame, Panamá Oeste	2	1

<i>Acromyrmex octospinosus</i>	4	Punta Chame, Panamá Oeste	3	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	4	Punta Chame, Panamá Oeste	4	1
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	4	Punta Chame, Panamá Oeste	5	1
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	5	Divisa, Veraguas	1	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	5	Divisa, Veraguas	2	1
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	5	Divisa, Veraguas	3	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	5	Divisa, Veraguas	4	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	5	Divisa, Veraguas	5	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	6	El Caño, Coclé	1	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	6	El Caño, Coclé	2	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	6	El Caño, Coclé	3	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	6	El Caño, Coclé	4	1
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	6	El Caño, Coclé	5	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	7	Pipeline Road, Colón	1	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	7	Pipeline Road, Colón	2	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	7	Pipeline Road, Colón	3	1
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	7	Pipeline Road, Colón	4	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	8	Camino de plantaciones, Colón	1	3
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	8	Camino de plantaciones, Colón	2	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	8	Camino de plantaciones, Colón	3	2
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	8	Camino de plantaciones, Colón	4	1

### 5.3 Cuidado de los nidos en el laboratorio del INDICASAT A.I.P

Estos nidos se mantuvieron en cajas plásticas dentro del laboratorio de insectos sociales del Indicasat, donde cada dos días se les dió mantenimiento de limpieza para evitar cualquier tipo de contaminación, de igual forma se le colocaron hojas suaves como *Inga spp.* y *Enterolobium spp.* para que las hormigas alimentaran al hongo fúngico que estaban trabajando. La humedad fue muy necesaria por lo que se les colocó papel toalla absorbente humedecido con agua alrededor del hongo fúngico ya que esto les proporciona la humedad necesaria para poder germinar sus esporas.



**Fig. 2: Cuidado de nido en el laboratorio del Indicasat Aip:** a) Jardín fúngico conservado en un recipiente plástico dentro del laboratorio de insectos de Indicasat Aip. b) Hojas frescas (*Inga spp.*) utilizadas por hormigas para forrajear y alimentar al hongo simbiote. c) Colocación de papel toalla humedecido con agua estéril; este método permite simular un nivel adecuado de humedad relativa, favoreciendo un ambiente similar a su hábitat natural y facilitando el cultivo del jardín fúngico sin inconvenientes.

5.4 Aislamiento de *Escovopsis* proveniente de los nidos de *Acromyrmex octospinosus*  
Para el aislamiento del *Escovopsis* constó de cámaras húmedas con pequeñas porciones fúngicas extraídas del jardín (sin hormigas) proveniente de las colonias de *Acromyrmex* que se colectaron, se colocaron en platos Petri con un tamaño de 90x15mm que tenían papel kimwipes con agua destilada alrededor de las porciones del hongo y se sellaron con Parafilm. Se fueron monitoreando cada 3 días hasta que se dio con la identificación de los *Escovopsis*. Ya con dicha aparición se procedió a pasar los *Escovopsis* a medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se colocaron en la incubadora a una temperatura de 27°C durante 10 días. Luego cada *Escovopsis* que presentó crecimiento exitoso se pasó a un medio de cultivo puro de PDA para que así se diera el crecimiento del *Escovopsis* sin ningún tipo de contaminación.






**Fig. 3: Cámaras húmedas para extraer muestras de *Escovopsis*:** Platos Petri con muestras de material biológico (*Escovopsis* se ha colocado papel toalla humedecido con agua estéril para proporcionar las condiciones de humedad necesarias para el crecimiento del hongo).

Cada plato está rotulado con códigos que indican la especie de hormiga, la fecha de muestreo y el nido de origen.

Tabla No. 2: Registro de los aislamientos de *Escovopsis* obtenidos a partir de colonias de *Acromyrmex octospinosus*, organizado según su localidad de colecta.

Género	Especie	Cantidad de Platos	Colecta	Sitio	Coordenadas
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	30	1	El Lirio, Chorrera	9°1'4'' N 79° 46'24''O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	20	2	Santa clara río sereno, Chiriquí	8°49'50.3"N 82°48'28.7"O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	25	3	Juan Hombrón, Coclé	8°19'20.3"N 80°11'41.1"O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	25	4	Punta Chame, Panamá Oeste	8° 37'26''N 79°49'38''O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	25	5	Divisa, Veraguas	8° 9'9''N 80°45'42'' O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	20	6	El Caño, Coclé	8°24'27.0"N 80°31'32.0"O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	15	7	Pipeline Road, Colón	9°07'44.6"N 79°42'55.9"O
<i>Acromyrmex</i>	<i>octospinosus</i>	25	8	Camino de plantaciones, Colón	9°5'3" N 79°39'26"O

Tabla No. 3: Códigos asignados a cepas de *Escovopsis*, especie de hormiga hospedadora de las cuales fueron aisladas, medio de cultivo utilizado e imágenes representativas de su morfología.

Cód. de <i>Escovopsis</i>	Especie proveniente	Medio de Cultivo	Imágen morfológica
Cód. C2:N6 (A06)	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	PDA	
Cód. C2: N4 (A04)	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	PDA	
Cód. C2:N3 (A03)	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	PDA	

Cód. C5:N1 (A01)

*Acromyrmex octospinosus*

PDA



Cód. C3:N5 (A05)

*Acromyrmex octospinosus*

PDA



Cód. C7: N2  
(A04)

*Acromyrmex octospinosus*

PDA



Cód. C5: N4  
(A04)

*Acromyrmex octospinosus*

PDA



Cód. C1: N4  
(A04)

*Acromyrmex*  
*octospinosus*

PDA



---

#### 5.4 Desprendimiento de los actinomicetos

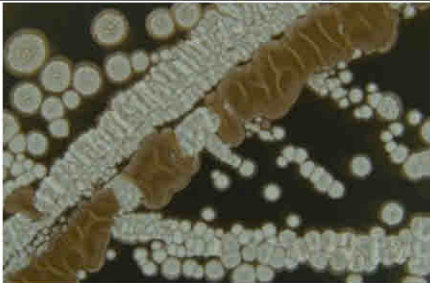

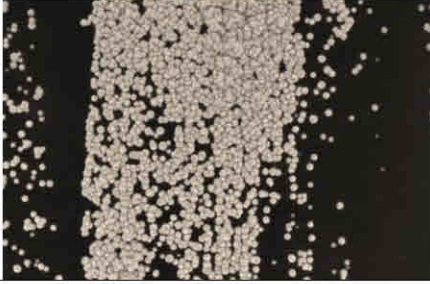
Se seleccionaron 10 obreras de *Acromyrmex octospinosus* con presencia visible de actinomicetos en sus cutículas. Bajo condiciones asépticas, las hormigas fueron manipuladas cuidadosamente utilizando pinzas previamente esterilizadas y posteriormente frotadas suavemente sobre la superficie de platos petri que contenían medio Streptomyces Isolate Agar suplementado con antibióticos antimicóticos (Nistatina y Pimaricina) para evitar la proliferación de hongos contaminantes.

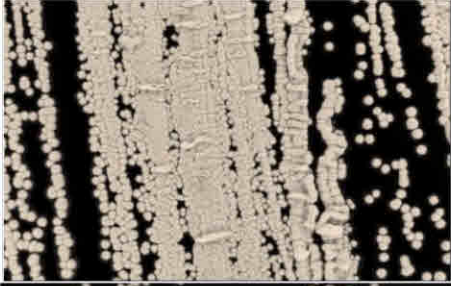

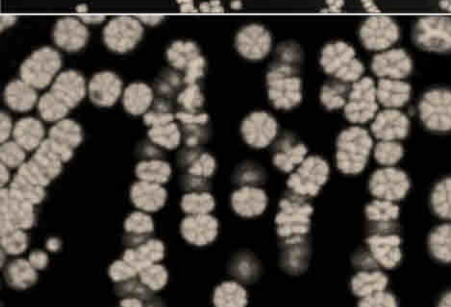
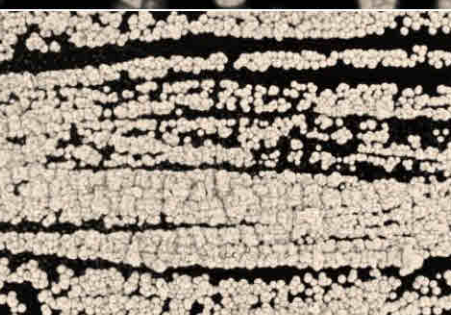
Los platos fueron sellados herméticamente con Parafilm® e incubadas a temperatura ambiente durante una semana. Transcurrido este periodo, se observaron colonias características de actinomicetos, reconocibles por su crecimiento filamentososo y su morfología seca o aterciopelada. Las colonias fueron seleccionadas y transferidas al medio ISP2 (International Streptomyces Medium 2) para obtener cultivos puros y libres de contaminación, destinados a las pruebas de interacción microbiana posteriores.



**Fig. 4: Distribución superficial de Actinobacteria en hormiga mutualista *Acromyrmex octospinosus*.** Li, H., Sosa-Calvo, J., Horn, H. A., Pupo, M. T., Clardy, J., Rabeling, C., ... & Currie, C. R. (2018). Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10720-10725.

Tabla No. 4: Diferencia morfológica de actinobacterias aisladas provenientes de hormigas *Acromyrmex octospinosus*.

Bacterias	Hormigas	Diferencia morfológicas
Aisladas		
Actinobacteria Cod. (5-12 A01)	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	
Actinobacteria Cod. (5-12 Actr01 C5 N1)	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	
Actinobacteria Cod. (5-12 Actr05 C4 N5)	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	

<b>Actinobacteria</b> <b>Cod. (6-12 1A</b> <b>N1)</b>	<i>Acromyrmex</i> <i>octospinosus</i>	
<b>Actinobacteria</b> <b>Cod. (6-12 2A</b> <b>2N)</b>	<i>Acromyrmex</i> <i>octospinosus</i>	
<b>Actinobacteria</b> <b>Cod. (6-12 2A)</b>	<i>Acromyrmex</i> <i>octospinosus</i>	
<b>Actinobacteria</b> <b>Cod. (FiD23-</b> <b>7-24 A05 - N5)</b>	<i>Acromyrmex</i> <i>octospinosus</i>	

### 5.5 Interacción entre *Escovopsis* y Actinobacterias

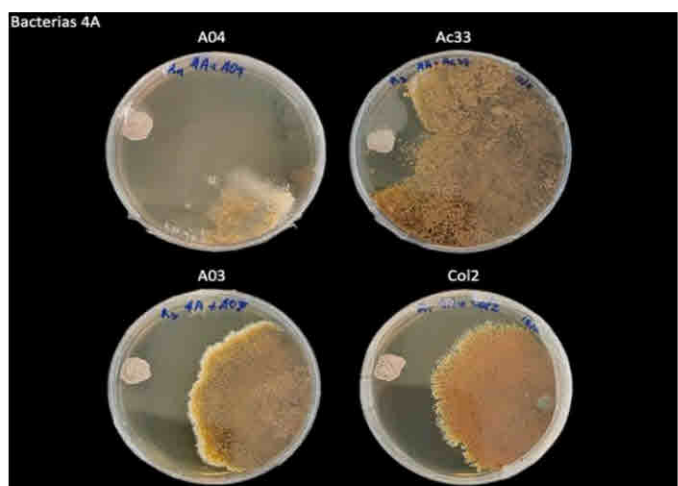
Las cepas bacterianas previamente aisladas fueron cultivadas en medio sólido Agar Streptomyces. Tras observar su crecimiento adecuado, se transfirió un fragmento micelial de 1mm de diámetro mediante un sacabocado estéril hacia los platos con medio ISP2 (International Streptomyces Project Medium 2), con el objetivo de promover la adaptación al nuevo sustrato. Estos platos fueron incubados durante 5 días mediante una temperatura regulada de (25-28°C). Simultáneamente, las cepas de *Escovopsis* fueron cultivadas en medio Agara Papa Destroxa (PDA) hasta alcanzar un crecimiento activo. Posteriormente, se extrajó

un fragmento micelial de 1 mm de diámetro y se inoculó en las placas de ISP2 que ya contenían la cepa bacteriana previamente adaptada. Los platos fueron incubados por un período de hasta dos semanas para permitir la interacción entre ambos microorganismos. Durante este tiempo se observaron signos de antagonismo como halos de inhibición, reducción en el crecimiento fúngico o modificaciones morfológicas en la zona de interacción. Para los controles positivos de crecimiento, se inocularon un fragmento tanto de *Escovopsis* como de Actinobacteria con 1mm de diámetro en platos con ISP2, ambos incubados bajo las mismas condiciones. Este control permitió evaluar el crecimiento natural de ambas cepas en el medio y contrastarlo con el observado en las placas de interacción.

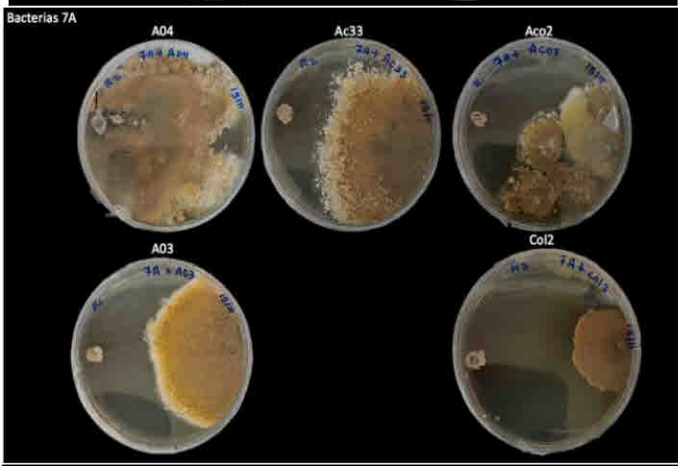
Tabla No. 5: Evidencias morfológicas de las interacciones entre *Escovopsis* y actinobacterias, según códigos de identificación bacteriana.

Cód. de Bacterias	Cód. de <i>Escovopsis</i>	Imágenes
1A	A03, A05, Ac33, Col2	
2A	Col2, Ac33, A04	

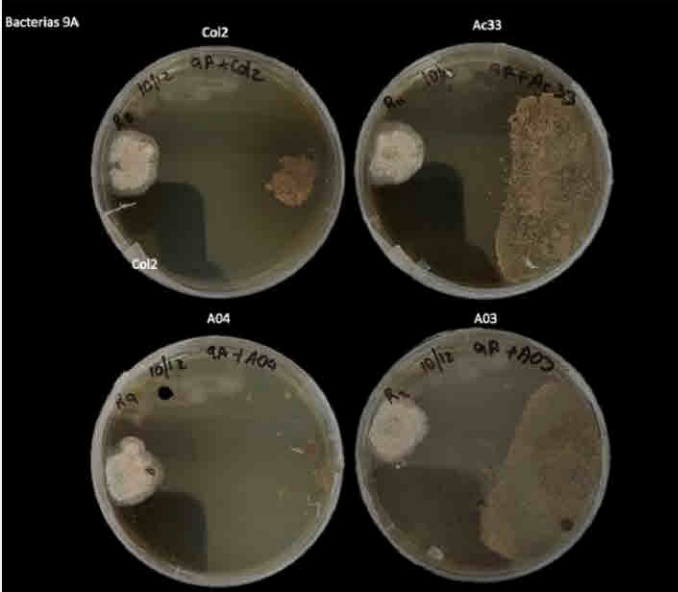
4A A04, Ac33, A03, Col2



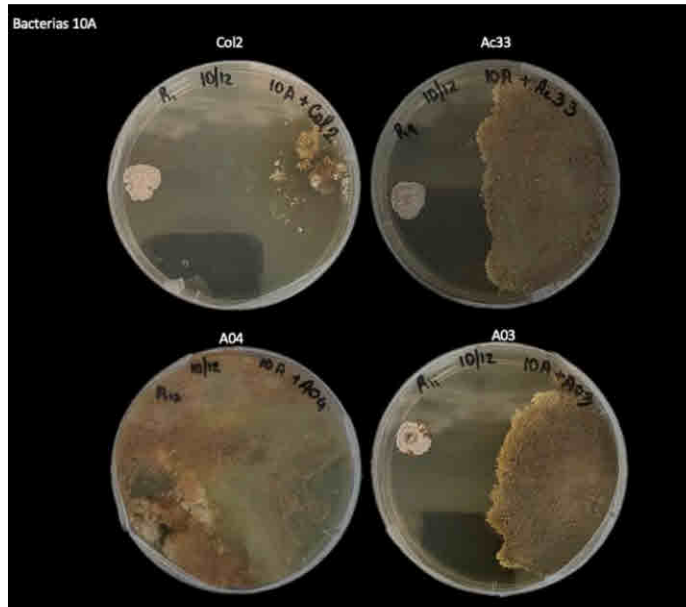
7A A04, Ac33, Aco2, A03, Col2



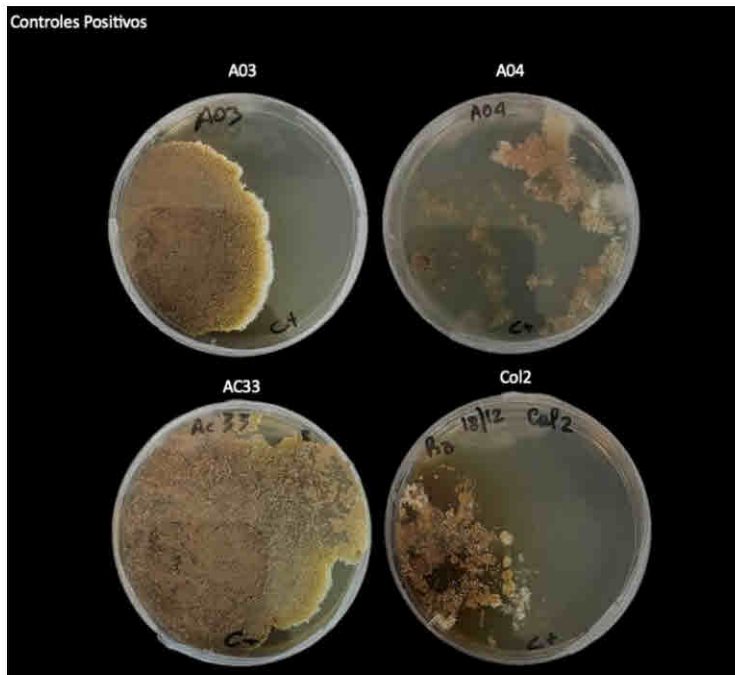
9A Col2, Ac33, A04, A03



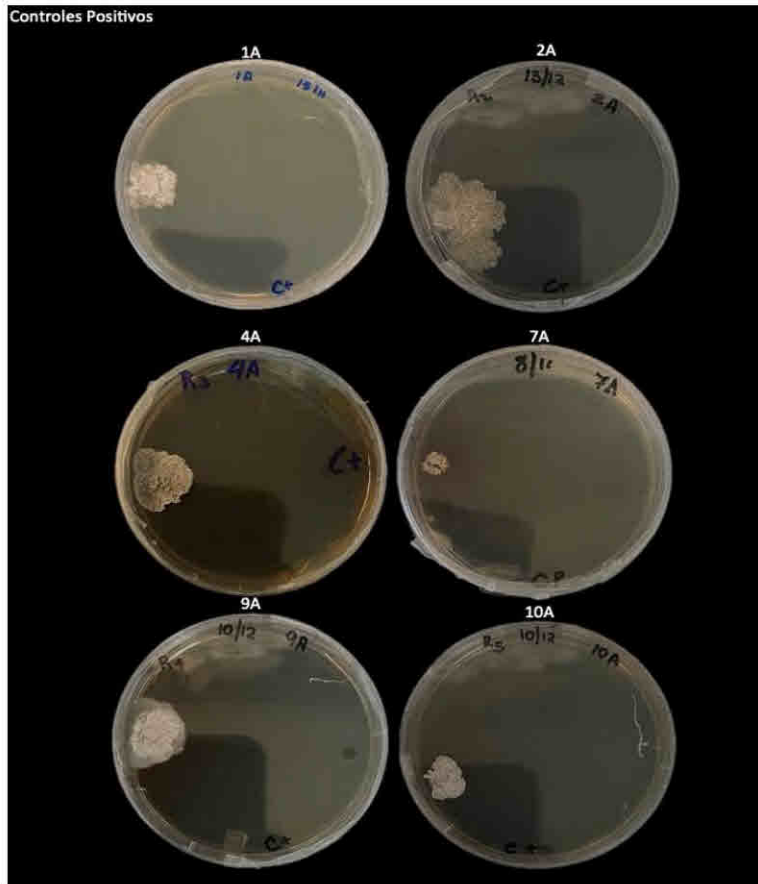
10A Col2, Ac33,  
A04, A03



Controles Positivos  
(Hongos)



## Controles Positivos (Bacterias)



## VI. Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto antagonista entre las cepas bacterianas y fúngica de *Escovopsis* y se procedió a aplicar un análisis cuantitativo basado en mediciones de áreas de inhibición y crecimiento obtenidas a partir de cultivos en platos Petri.

Inicialmente, se utilizó una hoja de papel bond con un dibujo exacto de un plato Petri de 90 mm de diámetro para así poder estimar visualmente las áreas de inhibición tanto de la bacteria como del hongo. Sobre dicha representación se procedió a realizar un trazado cuadrículado que permitió calcular de forma aproximada el área ocupada por el crecimiento o la inhibición de cada organismo evaluado. Esta técnica fue validada como herramienta para medir diferencias entre tratamientos de manera sistemática.

A partir de estas mediciones, se obtuvo el valor de área promedio y su respectiva desviación estándar para cada una de las seis cepas del hongo *Escovopsis* y seis cepas bacterianas. Posteriormente, estos valores fueron introducidos en el software estadístico Minitab® Statistical Software para el procesamiento estadístico. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA one-way) con el objetivo de determinar si existían diferencias

estadísticamente significativas entre la medida de las distintas cepas, tanto *Escovopsis* como bacterias, con respecto a la variable cuantificada que sería el área de inhibición. Se presentó un tratamiento independiente con 6 repeticiones.

Los supuestos del modelo (independencia de datos, homogeneidad de varianza y normalidad de los residuos) fueron asumidos conforme a los criterios establecidos para diseños experimentales balanceados. El nivel de significancia establecido fue  $\alpha = 0.01$ .

Cuándo se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.01$ ), se procedió a realizar pruebas de comparación múltiple mediante los siguientes métodos:

- **Tukey HSD** (Honest Significant Difference) con intervalo de confianza del 95%, que controla el error tipo I en todas las comparaciones por pares.
- **LSD de Fisher** (Least Significant Difference) como prueba complementaria más sensible, usada para confirmar tendencias de diferencia entre pares de media.

Finalmente, se analizó la calidad del modelo mediante los estadísticos  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado y  $R^2$  predicho, así como el error estándar (S). Esta información permitió interpretar la proporción de la variabilidad explicada por la cepas en cada experimento. Todos los resultados fueron representados mediante tablas de análisis de varianza ANOVA, agrupación de media y boxplots para facilitar la visualización e interpretación.

## VII. Resultados

### 7.1 Comparación entre cepas del hongo *Escovopsis*

Se realizó un ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias significativas entre las seis cepas del hongo *Escovopsis*. Los resultados indicaron un valor  $F = 13.17$  y un valor  $p = 0.000$ , cual permite rechazar la hipótesis nula, concluyendo que existen diferencias estadísticamente significativas entre la cepas (Tabla 6).

Tabla No. 6 Análisis de varianza (ANOVA) para las cepas de *Escovopsis*.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Escovopsis</i>	5	88.63	17.727	13.17	0.000
Error	30	40.39	1.346		
Total	35	129.02			

El modelo mostró un  $R^2$  Ajustado del 63.48%, indicando un ajuste adecuado los datos.

Tabla No. 7 Resumen del modelo estadístico para *Escovopsis*

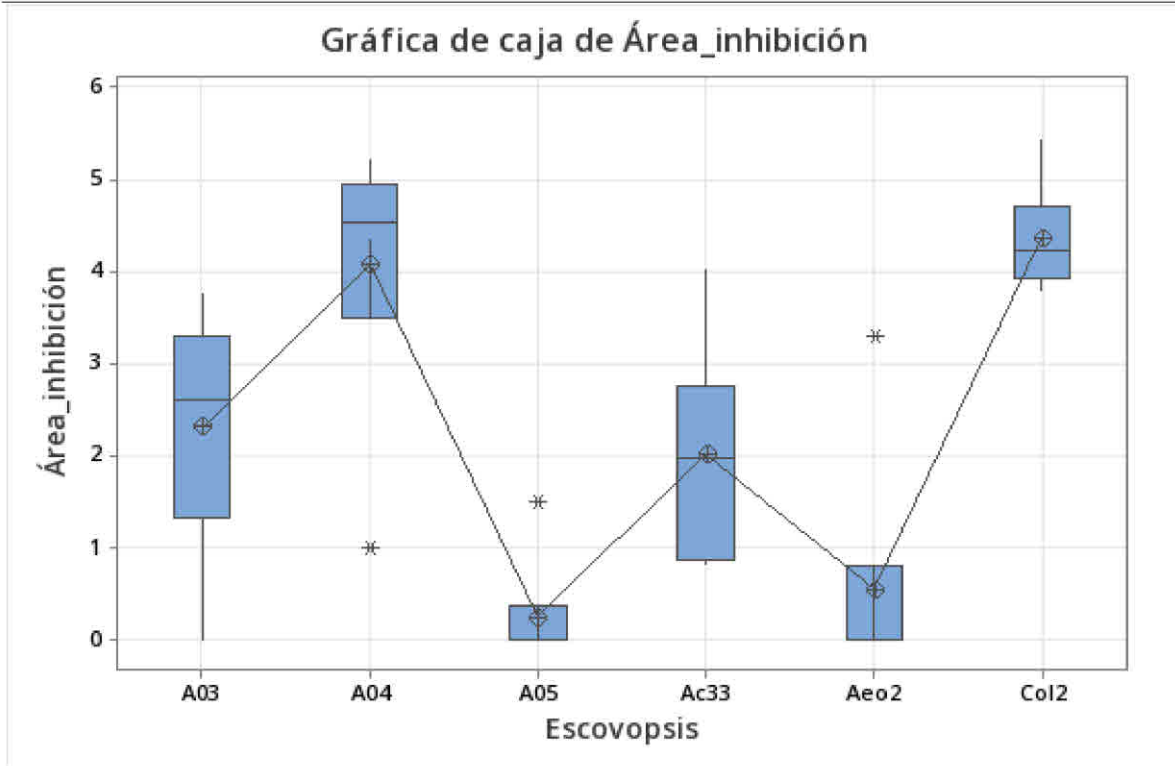
<b>S (Error estándar)</b>	<b><math>R^2</math>(%)</b>	<b><math>R^2</math> ajustado (%)</b>	<b><math>R^2</math> predicho (%)</b>
---------------------------	----------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------

1.16030

68.70

63.48

54.92



**Fig. 5:** Diagrama de caja para las cepas de Escovopsis.

Tabla No. 8 Comparación de medias de intervalo de confianza del 99% para *Escovopsis*.

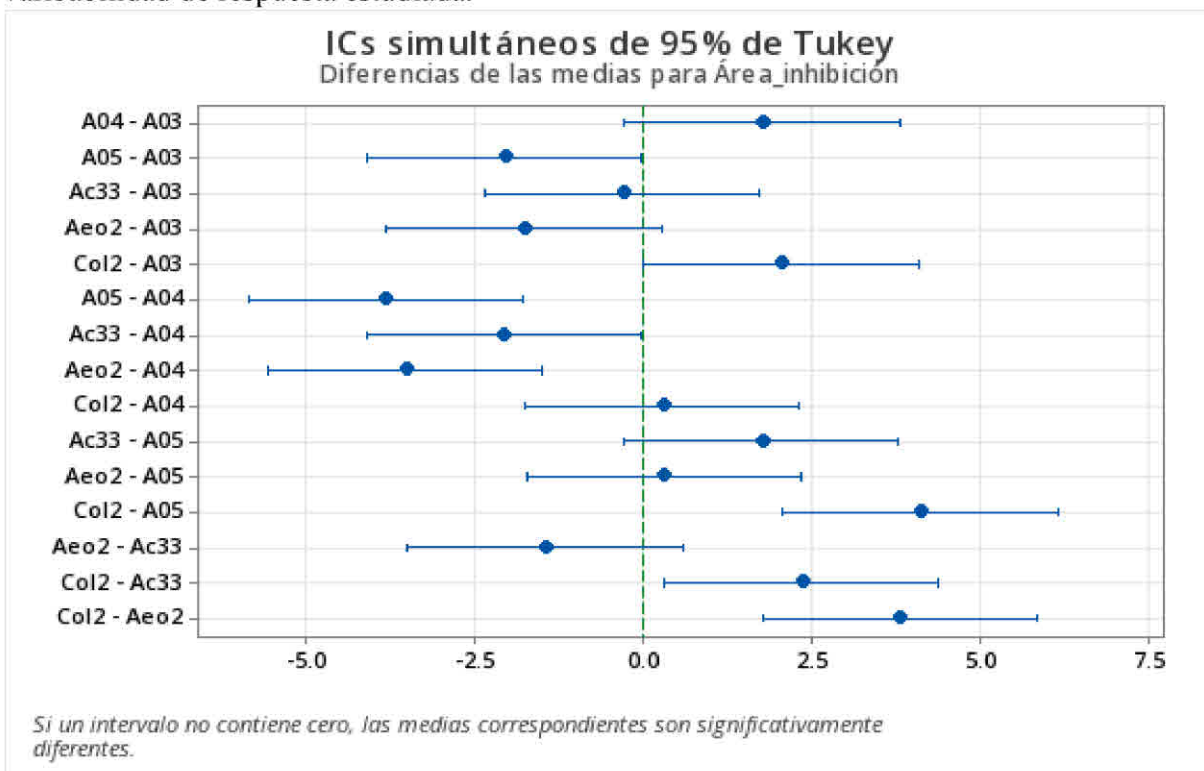
Cepa	N	Media	Des.Est.	IC 99% inferior	IC 99% superior
A03	6	2.316	1.355	1.014	3.619
A04	6	4.080	1.538	2.777	5.383
A05	6	0.248	0.607	-1.055	1.550
Ac33	6	2.008	1.175	0.706	3.311
Ae02	6	0.547	1.341	-0.755	1.850
Col2	6	4.360	0.575	3.058	5.663

Desv.Est. agrupada = 1.16030

Tabla No. 9 Agrupación de información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para datos de cepas de *Escovopsis*.

<i>Escovopsis</i>	N	Media	Agrupación			
Col2	6	4.360	A			
A04	6	4.080	A	B		
A03	6	2.316		B	C	
Ac33	6	2.008			C	D
Ae02	6	0.547			C	D
A05	6	0.248				D

Esto indica que las cepas que no comparten letras difieren significativamente entre sí. El modelo sugiere que ciertas cepas de *Escovopsis* tienen mayor capacidad (o menor) según la variabilidad de respuesta estudiada.



**Fig. 6:** Agrupación de medias de *Escovopsis* con letras (Tukey CLD)

Tabla No. 10 Comparación múltiple por método LSD de Fisher

<i>Escovopsis</i>	Media	Agrupación
Col2	4.360	A
A04	4.080	A
A03	2.316	B
Ac33	2.008	B
Ae02	0.547	C
A05	0.248	C

## 7.2 Comparación entre cepas bacterianas.

El ANOVA para las seis cepas de bacterias no mostró diferencias significativas ( $F = 0.29$ ,  $p = 0.916$ ), por lo que se concluye que no existe efecto diferencial entre las cepas en la variable evaluada (Tabla 10)

Tabla No. 10 Análisis de varianza de cepas bacterianas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Bacteria	5	5.914	1.183	0.29	0.916
Error	30	123.110	4.104		
Total	35	129.024			

Tabla No. 11 Resumen del modelo para bacterias

S (Error estándar)	R <sup>2</sup> (%)	R <sup>2</sup> ajustado (%)	R <sup>2</sup> predicho (%)
2.02575	4.58	0.00	0.00

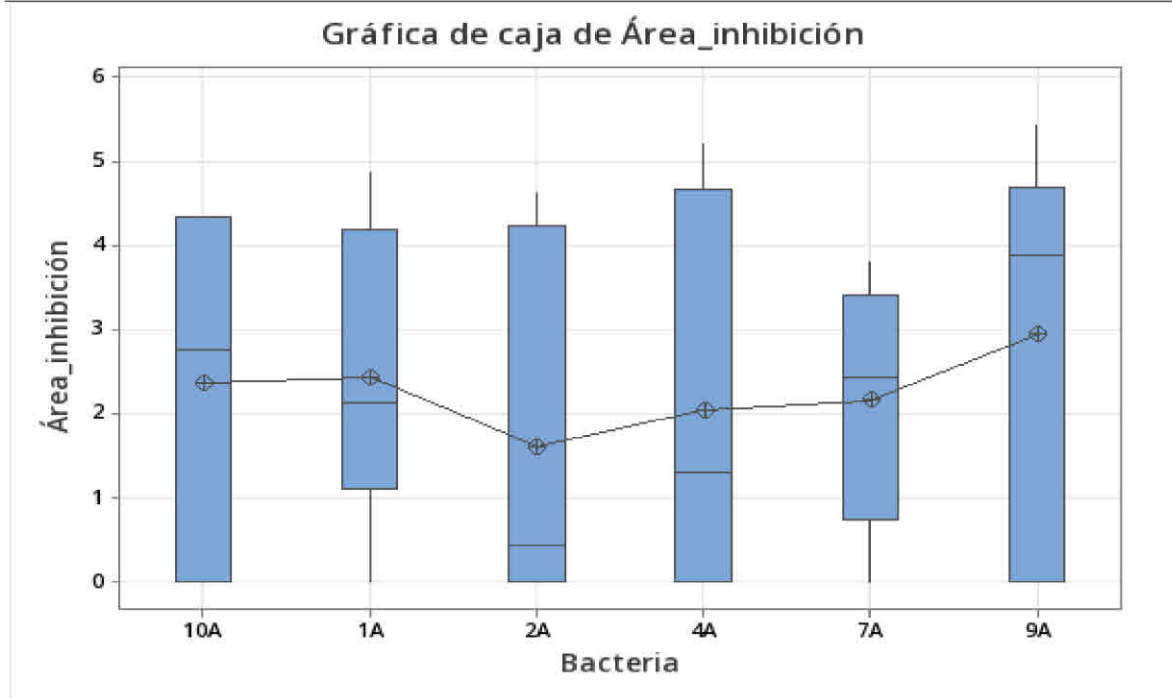
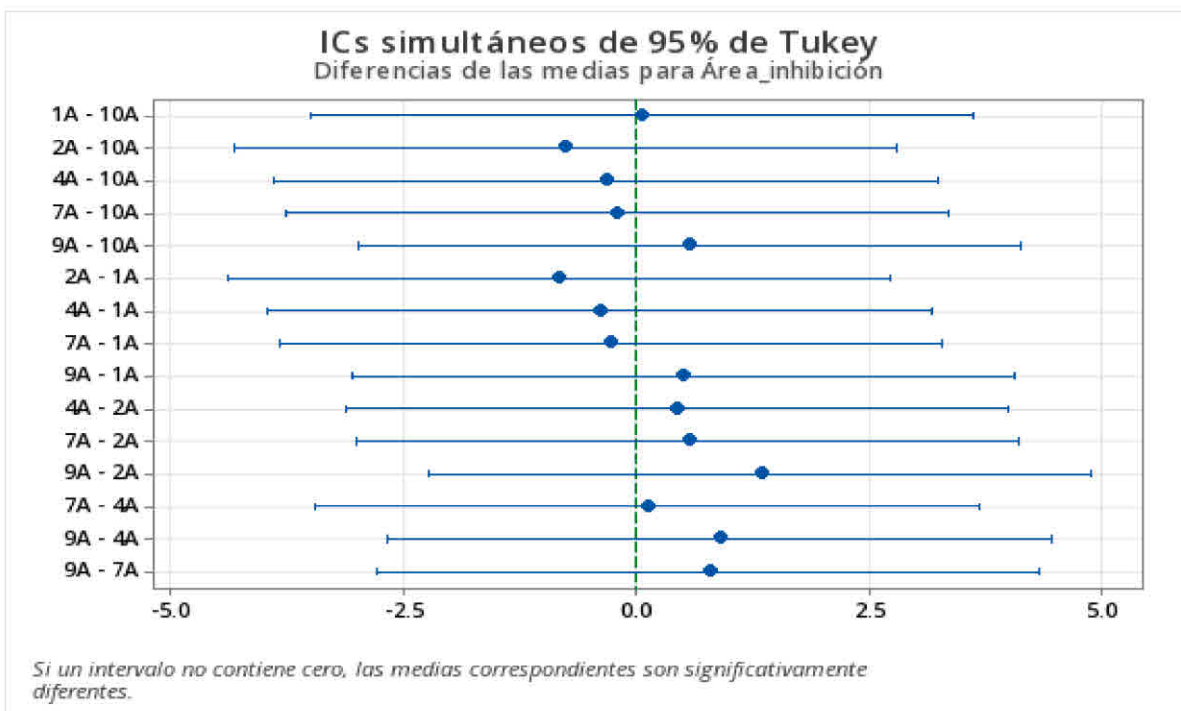


Fig. 7: Diagrama de caja para cepas bacterianas

Tabla No. 12 Comparación de medias por Tukey (Sin diferencia significativa)

Cepa	Media	Agrupación
9A	2.940	A
1A	2.433	A
10A	2.370	A
7A	2.163	A
4A	2.047	A
2A	1.607	A

Estos resultados nos indican que las cepas bacterianas presentaron un comportamiento estadísticamente homogéneo respecto a la variable analizada.



**Fig. 8:** Agrupación de medias de actinobacterias con letras

## VIII. Discusión

El análisis estadístico realizado permitió evaluar la diversidad funcional entre cepas del hongo *Escovopsis* y sepas bacterianas en relación con la variable de respuesta evaluada (probablemente inhibición, crecimiento o actividad antagonista, según el diseño experimental).

En primer lugar, el análisis de varianza (ANOVA) evidenció que las cepas de *Escovopsis* denotan diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0.000$ ), lo que indica una variabilidad funcional considerable entre cepas. Éste hallazgo es consistente con estudios previos que destacan la plasticidad fenotípica de *Escovopsis* en relación con su capacidad de adaptación a distintos hospederos o condiciones del ambiente microbiano (Aylward et al., 2012). La alta proporción de la varianza explicada ( $R^2 = 68.70\%$ ) sugiere que la variabilidad entre cepas es un factor determinante en el comportamiento observado.

Las comparaciones múltiples mediante el método de Tukey revelaron que sepas como Col2 y A04 presentar una respuesta significativamente mayor, mientras que cepas como A05 y Ae02 mostraron los valores más altos. Éste patrón sugiere diferencias en la virulencia, crecimiento o interacción con otros microorganismo lo cual podría estar relacionado con su perfil metabólico o adaptación ecológica en el sistema de cultivo de hongos.

En contraste, el análisis de la cepa bacteriana mostró ausencia de diferencia significativa ( $P = 0.916$ ), lo que indica un comportamiento homogéneo entre las cepas en la variable medida. La capacidad explicativa del modelo ( $R^2 = 4.58\%$ ) sugiere que las diferencias entre cepas bacterianas no explican la variabilidad observada, posiblemente debido a que todas las cepas comparten un perfil funcional similar o que la variable medida no es sensible para detectar diferencias reales. Además, el método de Tukey agrupó todas las bacterias dentro de una sola categoría, confirmando esta homogeneidad.

Estos resultados pueden interpretarse bajo la hipótesis de que las cepas de *Escovopsis* poseen una mayor diversidad funcional o fenotípica, posiblemente por su especialización como patógenos o antagonista en ecosistemas complejos como los jardines de hormigas cultivadoras de hongos. Por otro lado, las bacterias estudiadas podrían representar un grupo funcionalmente más conservado, lo cual puede limitar su diferenciación estadística bajo las condiciones experimentales.

## IX. Conclusión

Los resultados obtenidos evidencian diferencias significativas entre las cepas del hongo *Escovopsis*, lo cual pone en evidencia una alta variabilidad funcional entre los aislamientos evaluados. Esta variabilidad podría estar asociada a diferencias intrínsecas en su fisiología, velocidad de crecimiento, secreción de metabolitos secundarios o mecanismo de competencia interespecíficas. El resultado sugiere que *Escovopsis* no actúa como un género homogéneo, sino que posee una diversidad fenotípica activa, capaz de influir de forma diferenciada en el contexto de interacciones microbianas.

Las cepas Col2 y A04 mostraron los valores promedio más alto de la variabilidad media (área de inhibición o crecimiento), posicionados estadísticamente en el grupo a según el análisis post hoc de Tukey, y diferenciándose significativamente de cepas como A05 y Ae02, que conformaron los grupos inferiores. Esto refuerza la hipótesis de que ciertas cepas de *Escovopsis* podrían tener ventaja competitiva en escenarios donde compiten por espacio o recursos, convirtiéndolas en potencialmente modelos para estudiar la dominancia fúngica o incluso el diseño de agentes antifúngicos naturales si se caracterizan sus metabolitos secundarios.

Por otro lado, el análisis de varianza aplicada a las cepas bacterianas reveló ausencia de diferencia significativa entre los tratamientos, con un valor  $p = 0.916$  y un  $R^2$  ajustado de 0.00%. Esta uniformidad en el comportamiento estadístico indica que las cepas bacterianas presentan una respuesta homogénea, al menos bajo las condiciones experimentales establecidas. Esta falta de variabilidad puede deberse a que las bacterias evaluadas pertenecen a un grupo filogenético similar, a una baja expresión de mecanismo antagonismo, o a una limitación en la sensibilidad del método empleado para detectarlos.

En conjunto, los resultados sugieren que *Escovopsis* desempeña un rol más dinámico y variable en la interacción microbiana evaluada que las bacterias, siendo posiblemente el organismo dominante en el antagonismo. Este hallazgo abre nuevas posibilidades para investigar a este hongo micoparasitario no sólo como patógeno especializado, sino también como un competidor activo en sistema microbianos complejos, como los jardines de hormigas cultivadores de hongos. La identificación de cepas con alta capacidad podría aportar a futuros estudio de control microbiológicos, competencia microbiana dirigida hoy incluso aplicaciones en biotecnología y mico parásitos útiles.

## X. Referencias Bibliográficas

1. Gilbert, M. (2024). neuropeptides specify and reprogram elaborate division of labor in leafcutter ants Doctoral dissertation, University of Pennsylvania).
2. 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., . . . Doyle, V. P. (2024). The coevolution of fungus-ant agriculture. *Science*, 386(6717), 105-110.
3. Wetterer, J. K., Gruner, D. S., & Lopez, J. E. (1998). Foraging and nesting ecology of *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) in a Costa Rican tropical dry forest. *Florida Entomologist*, 61-67.
4. Li, H., Sun, C., Fang, Y., Carlson, C. M., Xu, H., Ješovnik, A., Sosa-Calvo, J., Zarnowski, R., Bechtel, H. A., Fournelle, J. H., Andes, D. R., Schultz, T. R., Gilbert, P. U. P. A., & Currie, C. R. (2020). Biomineral armor in leaf-cutter ants. *Nature Communications*, 11(1).
5. Vega Gibbs, E. M. (2022). Diversidad del hongo *Escovopsis* en cuatro especies de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* y primer registro del género *Escovopsioides* en Panamá (Doctoral dissertation, Universidad de Panamá).
6. Dimarco, R. D., & Corley, J. C. (2023). Ecología, daño económico y organismos locales de control biológico de las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta* en plantaciones de *Pinus taeda* y *Eucalyptus grandis* de la provincia de Misiones.
7. P, J. D., Molano, C., & Gaviria, J. (2009). Diversidad generica de hormigas (hymenoptera: formicidae) en ambientes de bosque seco de los montes de maria, sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 279-285.
8. Mehdiabadi, Nueva Jersey y Schultz, TR (2010). Historia natural y filogenia de las hormigas productoras de hongos (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Novedades Mirmecológicas* , 13 , 37-55.
9. Gómez, N. A. M. (2017). Hormigas cortadoras de hojas en el departamento del Vaupés, Colombia: Una propuesta de manejo integrado. *Revista Vaupés Innova*, 1, 18-41. Reader.

10. Rodríguez, D. A. I., Narváez, A. C. V., Villanueva, J. L. M., Carrión, G., Mehltreter, K., Lachaud, J. P., ... & Valenzuela-González, J. (2024). In vitro culture of *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricaceae), symbiont fungus of the leaf-cutting ant *Atta mexicana* (Hymenoptera, Formicidae), using solid and plant-supplemented culture media. *Acta Botánica Mexicana*, (131), 50.
11. Billen, J. (2019). Hormigas de Colombia: Capítulo 7. Diversidad y morfología de las glándulas exocrinas. Recuperado de
12. Cárdenas Murillo, R. (2018). Manejo de la hormiga arriera (*Atta cephalotes* L.) en zonas cafeteras de Colombia.
13. Armbrrecht, I. (2018). Principales hormigas plaga. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Cali, Colombia.
14. Cruz, H. P. (2018). Los sistemas selváticos, un marco de referencia ecológica para el manejo fitosanitario en el trópico. *Sabia Revista Científica*, 4(1), 150-164.
15. Ronald, R. S. E. (2024, November 1). Resistencia de la madera de *Dracryodes peruviana* (Loes) H.J Lam preservada y natural, sometida a condiciones extremas del clima, Tambopata -Madre de Dios.
16. Kothe, E. (1996). Tetrapolar fungal mating types: Sexes by the thousands. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(1), 65–87.
17. Hibbett, D. S., & Binder, M. (2002). Evolution of complex fruiting–body morphologies in homobasidiomycetes. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 269(1504), 1963–1969.
18. Barke, J., Seipke, R. F., Gruschow, S., Heavens, D., Drou, N., Bibb, M., et al. (2010). A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*, 8, 109.
19. Mesén-Porras, E. (2015). Evaluación de la actividad entomopatógena de diversos aislamientos de hongos y cepas de *Bacillus thuringiensis* para el potencial desarrollo de un bioformulado contra las hormigas cortadoras de hojas de la especie *Atta cephalotes* (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

20. Zucchi, T. D., Guidolin, A. S., & Cônsoli, F. L. (2010). Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiological Research*, 166(1), 68–76.
21. Gutierrez Espinoza, C. A. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de la capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas (Formicidae: Myrmicinae: Attini). Flórez, L. C. (2011). Evaluación del efecto de hongos entomopatógenos para el control de *Atta mexicana* (Hymenoptera: Formicidae) (Tesis de maestría). Instituto de Ecología A.C., Xalapa, México.
22. Al-Shaibani, M. M., Radin Mohamed, R. M. S., Sidik, N. M., Enshasy, H. A. E., Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N. A., & Zin, N. M. (2021). Biodiversity of Secondary Metabolites Compounds Isolated from Phylum Actinobacteria and Its Therapeutic Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15), 4504.
23. Schoenian, I., Spiteller, M., Ghaste, M., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2011). Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 1955–1960.
24. Piperno D. R. (2018). A model of agricultural origins. *Nature human behaviour*, 2(7), 446–447. *Dolores R. Piperno Smithsonian Tropical Research Institute, Panama and Smithsonian National Museum of Natural History, Washington, DC, USA.*
25. Alejandra, M. G. N. (2017, 1 febrero). *Hormigas cortadoras de hojas en el departamento del Vaupés, Colombia: Una propuesta de manejo integrado.*
26. Roces F. (2002). Individual complexity and self-organization in foraging by leaf-cutting ants. Zoologie II, Universität Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany. *The Biological bulletin*, 202(3), 306–313.
27. Araújo, S., Seibert, J., Ruani, A., Alcântara-de la Cruz, R., Cruz, A., Pereira, A., Zandonai, D., Forim, M., Silva, M. F., & Bueno, O. (2022). The Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae) as a Target Organism to Control Leaf-Cutting Ants. *Insects*, 13(4), 359. Rio Claro y São Carlos, São Paulo, Brasil: Universidade Estadual Paulista (UNESP) y Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

28. Rodríguez, J., Calle, Z., & Montoya-Lerma, J. (2008). Herbivoría de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) sobre tres sustratos vegetales. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 156-162 Departamento de Biología, Universidad del Valle, A. A. 25360 Cali-Colombia
29. Carvajal, V. (2020). *Introducción a los hongos del bosque y su relación con los insectos* (pp. 1–8). Quito, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional.
30. Martínez, A. R. (2022). *Historia filogenética de los hongos basidiomicetes cultivados por cuatro especies de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* en Panamá* (Doctoral dissertation, Universidad de Panamá).
31. Martin, M. M. (1970). *The biochemical basis of the fungus-attine ant symbiosis*. *Science*, 169(3940), 16–20. Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos: Universidad de Michigan.
32. Schultz, T. R., & Brady, S. G. (2008). *Major evolutionary transitions in ant agriculture*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5435–5440. Washington, D.C., Estados Unidos: Smithsonian Institution.
33. Masiulionis, V. E., Rabeling, C., De Fine Licht, H. H., Schultz, T., Bacci Jr, M., Santos Bezerra, C. M., & Pagnocca, F. C. (2014). *A Brazilian population of the asexual fungus-growing ant *Mycocepurus smithii* (Formicidae, Myrmicinae, Attini) cultivates fungal symbionts with gongylidia-like structures*. *PLOS ONE*, 9(8), e103800. Rio Claro, São Paulo, Brasil: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
34. Vo, T. L., Mueller, U. G., & Mikheyev, A. S. (2009). Free-living fungal symbionts (Lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). *Mycologia*, 101(2), 206-210.
35. Maya Yescas, M. E. (2022). *Crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus*, simbionte de *Atta mexicana*, usando sustratos lignocelulósicos y la detección de enzimas lignocelulolíticas* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. Recuperado de
36. Birkenfeld, V., Gorb, S. N., & Krings, W. (2024). Mandible elemental composition and mechanical properties from distinct castes of the leafcutter ant *Atta*

- laevigata* (Attini; Formicidae). *Interface Focus*, 14(2), 20230048. Kiel, Alemania: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
37. Wilson, E. O. (1980). *Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta)*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 7(2), 157–165. Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos: Harvard University.
  38. Valderrama, E. I., Giraldo, C., Montoya-Lerma, J., Armbrrecht, I., & Calle, Z. (2006). Guía para el establecimiento y manejo de colonias artificiales de hormiga arriera *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 7(2), 7-16.
  39. Mera-Rodríguez, D., Fernández-Marín, H., & Rabeling, C. (2024). Phylogenomic approach to integrative taxonomy resolves a century-old taxonomic puzzle and the evolutionary history of the *Acromyrmex octospinosus* species complex. *Systematic Entomology*.
  40. Lewis, T. (1975). Colony size, density and distribution of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) in cultivated fields.
  41. Rivera Cerna, J. A., Fuentes Benavides, J. S., & Vanegas Vanegas, N. D. (2003). *Diagnóstico de especies de hormigas defoliadoras (zompopos) en el departamento de San Miguel El Salvador* (Doctoral dissertation, FMO, UES)
  42. Adams, R. M., Larsen, R. S., Stylianidi, N., Cheung, D., Qiu, B., Murray, S. K., ... & Boomsma, J. J. (2021). Hairs distinguish castes and sexes: identifying the early ontogenetic building blocks of a fungus-farming superorganism (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 31, 201-216
  43. Boulogne I, Germosen-Robineau L, Ozier-Lafontaine H, Jacoby-Koaly C, Aurela L, Loranger-Merciris G. *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) management. Parte 1: Efectos de los extractos de plantas insecticidas de TRAMIL. *Plagas de la Ciencia*.
  44. Sirviö, A., Gadau, J., Rueppell, O., Lamatsch, D., Boomsma, J. J., Pamilo, P., & Page Jr, R. E. (2006). High recombination frequency creates genotypic diversity in colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinatio*. *Journal of evolutionary biology*, 19(5), 1475-1485.

45. Barengo, M. P. (2023). Caracterización de cepas fúngicas de escovopsis nativas de misiones antagonistas de leucoagaricus para control biológico de hormigas cortadoras de hojas.
46. Christopher, Y., Aguilar, C., Gálvez, D., Wcislo, W. T., Gerardo, N. M., & Fernández-Marín, H. (2021). Interactions among *Escovopsis*, Antagonistic Microfungi Associated with the Fungus-Growing Ant Symbiosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(12), 1007
47. Dhodary, B., Schilg, M., Wirth, R., & Spiteller, D. (2018). Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants. *Chemistry - A European Journal*, 24(17), 4445-4452.
48. Reynolds, H. T., & Currie, C. R. (2004). Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, 96(5), 955-959.
49. Wallace, DEE, Asensio, JGV y Tomás, AAP (2014). Correlación entre virulencia y estructura genética de cepas de *Escovopsis* de colonias de hormigas cortadoras de hojas en Costa Rica. *Microbiología* , 160 (8), 1727-1736.
50. Taerum, SJ, Cafaro, MJ, Little, AE, Schultz, TR y Currie, CR (2007). Baja especificidad huésped-patógeno en la simbiosis hormiga cortadora de hojas-microbio. *Actas de la Royal Society B: Ciencias Biológicas* , 274 (1621), 1971-1978.
51. Augustin, J. O., Groenewald, J. Z., Nascimento, R. J., Mizubuti, E. S. G., Barreto, R. W., Elliot, S. L., & Evans, H. C. (2013b). Yet More “Weeds” in the Garden: Fungal Novelties from Nests of Leaf-Cutting Ants. *PLoS ONE*, 8(12), e82265
52. Seifert, K. A., Samson, R. A., & Chapela, I. H. (1995). *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia*, 87(3), 407-413.
53. Montoya, Q. V., Martiarena, M. J. S., & Rodrigues, A. (2023). Taxonomy and systematics of the fungus-growing ant associate *Escovopsis* (Hypocreaceae). *Studies In Mycology*, 106(1), 349-397.
54. Bich, G. Á., Randon, D. N., Castrillo, M. L., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2020). Aislamiento y caracterización morfológica y molecular de cepas de *Escovopsis* aisladas de nidos de hormigas cortadoras de hojas de Argentina. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91.

55. Dângelo, R. A. C., De Souza, D. J., Mendes, T. D., Da Cruz Couceiro, J., & Della Lucia, T. M. C. (2016). Actinomycetes inhibit filamentous fungi from the cuticle of *Acromyrmex* leafcutter ants. *Journal Of Basic Microbiology*, *56*(3), 229-237.
56. Andersen, S. B., Yek, S. H., Nash, D. R., & Boomsma, J. J. (2015). Interaction specificity between leaf-cutting ants and vertically transmitted *Pseudonocardia* bacteria. *BMC evolutionary biology*, *15*, 27.
57. Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C., & Malloch, D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, *398*(6729), 701-704.
58. Zulueta Rodríguez, R. 4., Trejo Aguilar, D. 4., & Trigos Landa, A. R. 4. (2007). *El maravilloso mundo de los hongos*. Xalapa, Ver. : Universidad Veracruzana.
59. Victorero, T. C., & Fueyo, E. F. (2018). Simbiosis hormigas attine-hongos-actinomicetos. *Revista Española de Micología*, *39*(1), 15-22.
60. Seipke, R. F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D. W., Goss, R. J., & Hutchings, M. I. (2011). A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS one*, *6*(8), e22028.
61. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 1-43.
62. Cambroner-Heinrichs, J. C., Matarrita-Carranza, B., Murillo-Cruz, C., Araya-Valverde, E., Chavarría, M., & Pinto-Tomás, A. A. (2019). Phylogenetic analyses of antibiotic-producing *Streptomyces* sp. isolates obtained from the stingless-bee *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini). *Microbiology*, *165*(3), 292-301.
63. Genilloud, O. (2018). Mining actinomycetes for novel antibiotics in the omics era: are we ready to exploit this new paradigm?. *Antibiotics*, *7*(4), 85.
64. Whatmough, B., Holmes, N. A., Wilkinson, B., Hutchings, M. I., Parra, J., & Duncan, K. R. (2024). Microbe Profile: *Pseudonocardia*: antibiotics for every niche. *Microbiology*, *170*(9).

65. Mangamuri, U. K., Vijayalakshmi, M., Poda, S., Manavathi, B., Bhujangarao, C., & Venkateswarlu, Y. (2015). Bioactive metabolites produced by *Pseudonocardia endophytica* VUK-10 from mangrove sediments: isolation, chemical structure determination and bioactivity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 629-636.
66. Li, H., Sosa-Calvo, J., Horn, H. A., Pupo, M. T., Clardy, J., Rabeling, C., ... & Currie, C. R. (2018). Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10720–10725.
67. Aylward, F. O., Burnum, K. E., Scott, J. J., Suen, G., Tringe, S. G., Adams, S. M., ... & Currie, C. R. (2012). Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *The ISME Journal*, 6(9), 1688–1701.