

Universidad De Panamá

Facultad De Ciencias Naturales, Exactas Y Tecnología

Escuela De Biología

**“Historia Filogenética de los Hongos Basidiomicetes Cultivados por cuatro especies de
Hormigas Cortadoras de Hojas del Género *Acromyrmex* en Panamá”**

Estudiante:

Martínez C., Ana Raquel

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

2022

Panamá, República de Panamá

DEDICATORIA

“El problema del físico es el problema de los orígenes y las leyes naturales últimas. El problema del biólogo es el problema de la complejidad” – Richard Dawkins

Este trabajo va dedicado a todos los apasionados a la ciencia, a la biología, sobre todo; a aquellos que sienten una imperiosa curiosidad por las arrieras cortadoras de hojas y su complejo, pero interesante sistema con su simbiote.

A mi hermana, que de alguna manera u otra siempre me apoyo a seguir adelante para que encontrara y me dedicara a lo que me hiciera feliz en la vida.

A todos aquellos que les interesa aportar un pedacito más en el gran mosaico de la vida evolutiva.

AGRADECIMIENTOS

A veces pienso en lo afortunada que he sido todo este tiempo, porque pude coincidir con tantas personas, tantos mentores, tantas enseñanzas, tantos “consejos de pasillo” y estoy agradecida con todas las experiencias adquiridas durante este tiempo. Fueron muchos años y estoy segura de que seguirán siendo más...

Gracias a Dios por ponerme en este camino y hacerme coincidir en tiempo y espacio con todas estas personas maravillosas que me han hecho crecer y madurar, para convertirme en quién soy hoy día.

Gracias a mis padres; sé que me dieron lo mejor que podían con lo mejor que tenían.

Agradezco profundamente a mi hermana, Nené, por haberme dado ese impulso cuestionable que, a mi corta edad de cinco años, que me hizo preguntarme qué quería ser de adulta, y sobre todo, por apoyarme a seguir buscando algo que me hiciera feliz.

Gracias a mi hermano menor, Raúl, por haberme aliviado durante mis noches de estudio.

Al Dr. Hermógenes Fernández-Marín, gracias por haber aceptado ser mi mentor y tutor en este proyecto; por los consejos y las largas conversaciones sobre la vida científica, por darme el empujoncito para seguir adelante en este camino como investigador y explotar mi curiosidad. Gracias por responder cada una de mis interrogantes, sé que alguna vez lo abrumé, pero gracias, nada cayó en saco roto.

A la Dra. Yuliana Christopher, gracias por haberme tenido un kilo de paciencia, por las enseñanzas, lecciones, pero aún más importante: por haberme escuchado y aconsejado cuando lo necesitaba, guardo con cariño todo lo aprendido con y de usted.

A mi compañera y colega más cercana, Eyleen Vega, gracias por el apoyo, los abrazos y los mutuos chistes tragi-cómicos, hiciste de esta experiencia un poco más liviana y llevadera.

A mis compañeros del laboratorio de Insectos Sociales: Isis, Mellany, y Gabriel, gracias a todos por haberme ayudado en todo lo que podían, y en todo lo que necesité, por involucrarme y compartirme sus proyectos, pero por encima de todo, gracias por haber hecho de mi estadía una experiencia gratificante y genial.

A los “newbies” del laboratorio, les deseo las mejores de las suertes en sus respectivos proyectos, que siga el ambiente de compañerismo y que la boten fuera del estadio en sus trabajos.

Gracias al Dr. Mejía y a su staff de trabajo por haberme ayudado con el material y los equipos que me facilitaron la vida en este proyecto de tesis.

Gracias a Massiel Sáez por haberme ayudado en todo lo que respecta a microbiología y a su paciencia por enseñarme.

En general, gracias a los laboratorios de INDICASAT AIP, por haberme permitido realizar este proyecto en sus instalaciones, por haberme facilitado el uso de sus equipos de alta tecnología y así darle un valor agregado a mi trabajo.

Gracias a mi profesora, Ariadna Bethancourt, por esa pequeña charla en donde sin querer ni saber, me introduciría un año más tarde en este proyecto; por su incondicional apoyo y su enorme vocación como profesora. Me llenó de un amor increíble por los hongos, gracias.

Gracias al comité de asesores: Prof. Rita y la profesora Brenda, por sus enseñanzas, su vocación y las lecciones enseñadas. Estoy agradecida profundamente por todo ese tiempo dedicado.

“A mis amigos...”, sólo pensar en ustedes me hace chiquito el corazón. Gracias a todos ustedes por estar ahí y seguir conmigo en este camino que es mío, pero en el que ustedes aceptaron ser parte. No puedo explicar con palabras todo el bien que me hicieron sólo con existir. Y aunque, no los mencione uno por uno (porque son muchos y la impresión por hoja está cara), soy muy feliz de haberlos tenido en esta etapa de mi vida.

A los financiadores de este proyecto, el FID 18-079 y el SNI del Dr. Hermógenes Fernández-Marín, así como la Vicerrectoría de Investigación y Posgrado de la Universidad de Panamá, con

la beca CUFI-2021-EG-CNET-011, sin ellos este estudio no hubiese podido ser realizado hasta este nivel. Muchas gracias.

Gracias a la institución responsable de mi educación como bióloga, la Universidad de Panamá. Académicamente, recordaré muchas de las experiencias y lecciones ahí aprendidas de mis profesores.

Un especial gracias a Alexandra Elbakyan, por haber creado Sci-hub, sitio web que me permitió acceder a todos los artículos e información que he citado en esta tesis y sin la existencia de esta web, esta tesis junto a gran parte de muchos otros estudios no se pudiesen realizar a diario. Un verdadero héroe sin capa.

Índice General

I.	RESUMEN.....	8
II.	INTRODUCCIÓN	9
	La Micofagia: Agricultura en Insectos Sociales	10
	A. Las Hormigas de la tribu Attini	12
	B. La Agricultura de las Hormigas Attine	12
III.	MARCO TEÓRICO	15
	A. Las Hormigas Attine: Origen Evolutivo.....	15
	B. Historia Natural de las hormigas Attini	15
	C. Hormigas Cortadoras de Hojas: género <i>Acromyrmex</i>	16
	D. Especies de <i>Acromyrmex</i> en Panamá.....	17
	1. <i>Acromyrmex echinaior</i>	17
	2. <i>Acromyrmex octospinosus</i>	18
	3. <i>Acromyrmex coronatus</i>	18
	4. <i>Acromyrmex</i> sp.....	18
	E. Historia Natural del Hongo Simbionte Cultivar y las Hormigas Attini	18
	F. Cultivo y Mantenimiento del hongo simbionte por las hormigas Attine	20
	G. <i>Escovopsis</i> como patógeno natural del Hongo Cultivar de las Hormigas Attine	21
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
	A. Área De Estudio y Colecta de Especies	23
	B. Aislamiento y Cultivo Puro del Hongo Simbionte	25
	1. Microscopía Óptica	25
	2. Criopreservación en Glicerol	26
	C. Extracción de ADN Fúngico	27
	D. Cuantificación del ADN	27
	E. Amplificación de ADN o PCR	28
	F. Purificación del Producto de PCR.....	29
	G. Secuenciación del ADN Fúngico.....	29
V.	RESULTADOS.....	30
	A. Área De Estudio y Colecta de Especies	30
	B. Aislamiento y Cultivo Puro del Hongo Simbionte	32

1.	Microscopía Óptica	33
C.	Amplificación de ADN	35
D.	Secuenciación	35
VI.	DISCUSIÓN	39
A.	Diversidad Genética	39
B.	Distribución Geográfica <i>versus</i> Distancia Genética	40
C.	Análisis Filogenético.....	41
VII.	CONCLUSIONES.....	43
VIII.	RECOMENDACIONES.....	45
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

I. RESUMEN

Comprender las interacciones biológicas entre los individuos de una misma especie y entre diferentes especies nos permite entender los aspectos básicos y fundamentales sobre los organismos. Todas las especies se encuentran involucradas en dos o más relaciones interespecíficas y éstas se pueden clasificar de acuerdo con los efectos o “resultados” que tienen entre los diferentes organismos envueltos. Actualmente, se sabe que el mutualismo ocurre en numerosos hábitats de todo el mundo, un claro ejemplo de esta relación son las hormigas cortadoras de hojas y su hongo basidiomicete cultivado. Las hormigas cultivadoras de hongo de la tribu Attini, comprenden más de 250 especies descritas. Todas las hormigas attine están obligadas al cultivo de jardines fúngicos para su alimentación; dado a su importancia ecológica, las hormigas cortadoras de hojas representan uno de los principales defoliadores de material vegetal en América, por lo que es de suma importancia profundizar en este trabajo. Este trabajo consistió en la colecta de diez nidos de cuatro especies de *Acromyrmex* en Panamá: *A. coronatus*, *A. octospinosus*, *A. echinatio* y *Acromyrmex* sp. Donde se procedió al aislamiento y cultivo de su hongo simbiote para posteriores análisis moleculares y estudios filogenéticos. Estos resultados alcanzados proponen que la distribución del hongo simbiote a lo largo de las especies estudiadas comprende una sola especie de hongo cultivar: *Leucoagaricus gongylophorus* y el genotipo de este hongo se ve ampliamente extendido entre las colonias de estas hormigas, no obstante, una de las especies, *A. coronatus*, existe un especial confinamiento para el genotipo cultivado por esta especie de hormiga.

II. INTRODUCCIÓN

Las asociaciones simbióticas moldean la evolución de cada organismo y todos sus niveles de organización biológica. En 1879, el botánico alemán Heinrich Anton de Bary, utilizó por primera vez el término “simbiosis” para describir a las relaciones entre hongos y algas en la formación de líquenes. Se refirió a ellas como *“la convivencia de dos organismos diferentes en asociación íntima y generalmente en beneficio de al menos uno de ellos”* (de Bary, 1879). En su mayoría, los organismos de todas las especies se encuentran involucrados en relaciones interespecíficas (Relman, 2008), y varían su nivel de complejidad. La definición aceptada de simbiosis comprende las interacciones positivas, negativas y neutrales que están sujetas a cambios a través del tiempo (Relman, 2008).

Como se ha mencionado antes, las relaciones interespecíficas comúnmente están clasificadas de acuerdo con los efectos o “resultados” que tienen las mismas entre los individuos de diferentes especies que estén involucrados (Holland & Bronstein, 2008). Dentro de estas interacciones se encuentran los mutualismos, los cuales se creía que eran raros y de poca importancia. No obstante, ahora se reconoce que los mutualismos han dado forma a la evolución de la vida superior en la Tierra (Boucher, 1985). Actualmente, se sabe que los mutualismos ocurren en todos los hábitats en el mundo, y los ecólogos reconocen que casi todas las especies se encuentran implicadas en algún tipo de mutualismo. El mutualismo se define como una relación simbiótica entre individuos de diferentes especies que tiene por efectos positivos (beneficiosos) que mejore sus adecuaciones y fitness de las especies involucradas (Holland y Bronstein, 2008).

Así mismo, las relaciones simbióticas mutualistas pueden variar debido al grado de dependencia que posean los organismos involucrados dentro del sistema. Esta dependencia va entre los rangos de mutualismo “obligado” a mutualismo “facultativo” (Sachs y Simms, 2006; Holland y Bronstein, 2008) . Se puede clasificar en obligado-obligado, obligado-facultativo o facultativo-facultativo. Los mutualismos facultativos son aquellos que con frecuencia, involucran interacciones beneficiosas entre potenciales compañeros, debido a que la extinción de un potencial compañero, puede ser poco significativo para la contraparte a largo plazo

(Vandermeer y Boucher, 1978), ya que, la parte superviviente puede cambiar de compañero y buscar nuevas asociaciones. Por otro lado, se cree que los mutualistas obligados están, usualmente, restringidos a las formaciones de nuevas asociaciones, a su vez, esto podría aumentar el riesgo de su extinción posterior a la pérdida de su contraparte mutualista (Briand y Yodzis, 1982).

Se debe hacer una aclaración entre el término “simbiosis” y “mutualismo”, porque, el uso paralelo de ambos términos puede causar confusión en el tipo de interacción que pueden estar llevando los organismos involucrados. A menudo, el término simbiosis describe una asociación íntima entre dos o más individuos de diferentes especies en donde gran parte del ciclo de vida ocurre en asociación cercana con la contraparte. De acuerdo con Holland y Bronstein (2008), un mutualismo puede ser también una simbiosis, y muchas interacciones simbióticas pueden ser mutualistas, no obstante, no todas las relaciones simbióticas son mutualistas.

La Micofagia: Agricultura en Insectos Sociales

De acuerdo con Bronstein (2015), la clase insecta y el reino Fungi a menudo interactúan de forma beneficiosa para ambas partes, generando mutualismos; en otras ocasiones, crean interacciones positivas para uno y neutrales para otros (comensalismo), en otras pocas, tienen interacciones positivas para uno y negativas para el otro (depredación y parasitismo) o se relacionan de forma negativa para ambas partes (interacciones competitivas).

No obstante, la evidencia más antigua de este tipo de relación (insecto-hongo), proviene de los datos moleculares de los escarabajos perforadores de madera (Subfamilia Platypodinae), del escarabajo ambrosia y sus hongos mutualistas (Ascomycota: Ophiostomatales) (Poinar y Vega, 2018; Poinar, Vega, y Legalov, 2019). Se estima que las edades de estas relaciones mutualistas son de aproximadamente 96 Ma (para los escarabajos) y aproximadamente 86 Ma (hongos), respaldadas por un fósil de escarabajo-hongo de 97 Ma (Biedermann y Vega, 2020).

Otro claro ejemplo de esta interacción mutualista obligada sería la relación simbiótica ancestral entre las hormigas de la tribu Attini y su hongo basidiomiceto, agaricales (ejemplo: Leucocoprineae). Donde las hormigas cuidan del hongo proporcionándole las condiciones

óptimas para su crecimiento, incluyendo también dispersión, protección y nutrición. En compensación, el hongo es la principal fuente de alimento para las hormigas.

Tal como menciona Biedermann y Vega (2020), los mutualismos son aquellas relaciones que sirven como un intercambio de servicios, los cuales pueden ser clasificados en tres tipos de acuerdo con los beneficios que brindan a una de las partes o ambas. Estos tipos de mutualismo se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Tipos de Relaciones Mutualistas Insecto-Hongo

Tipo de Servicio	Interacción
a) Nutritiva	Suministro de nutrientes por una parte, directamente (hongos) o indirectamente por el suministro de sustrato (por insectos), por descomposición de compuestos no digeribles o desintoxicación de una fuente de alimento (por hongos).
b) Protectiva	Insectos u hongos defienden a sus compañeros contra la variación ambiental, competidores y/o enemigos naturales.
c) Dispersión	Dispersión por parte de los insectos de esporas u otros propágulos fúngicos.

Adaptado de Biedermann y Vega (2020).

De cierta manera, la fungicultura de las hormigas attini se podría considerar de manera moderna como un tipo de agricultura, pero a diferencia de la agricultura concebida por el hombre hace más de 10 000 años (Diamond, 1998), se cree que la agricultura desarrollada por insectos es un poco más antigua. La agricultura por parte de las hormigas Attini tiene origen en el Terciario temprano, por lo tanto, anterior a la agricultura humana por unos 50-60 millones de años (Mueller, 2002). Esta forma de agricultura es producto de un sistema cuadripartito simbiótico ancestral; una interacción entre tres mutualistas y un parásito (Schultz y Brady, 2008).

Según Mueller (2002), debido a la ancestral historia coevolutiva que tienen las hormigas attine en relación a su agricultura fúngica, hace que las interacciones que se den a lo largo de este

sistema cuatripartito, pero en particular, con su hongo cultivar simbiote sean más complejas de mantener por el nivel obligatorio de la relación, de lo que se espera de sus analogías más jóvenes tal como lo es la agricultura humana y sus cultivos, porque han desarrollado domesticaciones de más de un centenar de especies de organismos.

A. Las Hormigas de la tribu Attini

Las hormigas cultivadoras de hongos de la tribu Attini (subfamilia Myrmicinae), comprenden más de 250 especies descritas, con una distribución únicamente en el Nuevo Mundo, principalmente en el Neotrópico (Schultz y Brady, 2008). Todas las hormigas attine están obligadas al cultivo de jardines fúngicos para su alimentación. Las hormigas cortadoras de hojas, ha evolucionado al punto de poder cortar y procesar material vegetal fresco para servir como sustrato nutritivo para su jardín fúngico simbiote.

Las hormigas cultivadoras de hongos dependen obligatoriamente de sus jardines fúngicos, ya que el hongo sirve como única fuente de alimento para las larvas, mientras que las hormigas obreras complementan su dieta alimentándose de la savia de las plantas (Quinlan & Cherrett, 1979). De acuerdo con Hölldobler y Wilson, (1990), la agricultura de las hormigas attine alcanza su punto máximo evolutivo con las hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* y *Atta*, convirtiéndolas en el pináculo evolutivo de la evolución eusocial, por otro lado, uno de los principales defoliadores de material vegetal en América.

B. La Agricultura de las Hormigas Attine

El sistema ancestral de interacción cuatripartita simbiótica de las hormigas attine se produce entre los mutualistas: las hormigas attine, su hongo cultivar (Leucocoprineae y Pterulaceae) y la bacteria actinomicete filamentosa *Pseudonocardia*. Luego, se incluye a su hongo parásito del género *Escovopsis*, que ha sido aislado únicamente de los jardines fúngicos de las hormigas attine, y es controlado por el antibiótico producido por la bacteria simbiote mutualista (Schultz *et al.*, 2005). No obstante, basados en asociaciones casi monolíticas entre amplios grupos filogenéticos de hormigas attine, jardines de hongos cultivares y hongos parásitos, en particular *Escovopsis*, se puede decir que la “agricultura” que realizan las hormigas attine se ha dividido en cinco sistemas agrícolas biológicamente distintos, de los cuales cada uno representa una

transición importante en la evolución de la agricultura de estos insectos sociales (Schultz y Brady, 2008).

SISTEMAS DE AGRICULTURA ESTABLECIDOS ENTRE LAS HORMIGAS ATTINE Y SU HONGO SIMBIONTE CULTIVADO

- A. Agricultura Inferior: realizada por 84 especies en 11 géneros de hormigas attine, que en su mayoría retienen rasgos primitivos, en donde se cultiva un gran número de especies fúngicas de la tribu Leucocoprineae.
- B. Agricultura de hongos de coral: practicada por especies dentro del grupo “pilosum”, un subgrupo de hormigas attine (género *Apterostigma*), quienes cultivan hongos de la familia Pterulaceae.
- C. Agricultura de levaduras: es realizada por 17 especies de hormigas dentro del “grupo rimosus”, hormigas del género *Cyphomyrmex*, quienes cultivan un clado de hongo distinto leucocoprineaceous, derivado de las hormigas attine inferiores.
- D. Agricultura Generalizada Superior: practicada por especies de tres géneros de hormigas no cortadoras de hojas, conocidas como las hormigas “attini superiores” (110 especies), quienes cultivan un clado diferente de hongo perteneciente a la familia Leucocoprineae, derivado de las attine inferiores.
- E. Agricultura de las hormigas cortadoras de hojas: pertenece a una subdivisión de la agricultura de las attine superiores y es realizada por hormigas del género *Atta* y *Acromyrmex* (50 especies), quienes cultivan un solo tipo de hongo altamente derivado de las especies de los hongos cultivados por las attine superiores (Schultz, 2020).

Así la propagación y mantenimiento de este hongo ocurre cuando la reina joven toma un pequeño trozo del simbionte y lo coloca dentro de su bolsillo infrabucal durante el vuelo nupcial (Mueller, 2002).

En Panamá se han reportado la presencia de seis especies de hormigas arrieras del género *Acromyrmex*, entre ellas tenemos: *Acromyrmex octospinosus* (Weber, 1941; Fernández-Marín, 2003), *Acromyrmex echinatio* (Weber, 1941; Fernández-Marín, 2003; Poulsen y Boomsma, 2005; Mikheyev, Mueller, y Boomsma, 2007), *A. insinator*, *A. volcanus*, *A. coronatus* (Sumner *et al.*, 2004; Fernández-Marín *et al.*, 2004) y una nueva especie no descrita:

Acromyrmex sp. Nuestra hipótesis está dirigida a que especies de hormigas que tengan una distribución geográfica delimitada (*A. coronatus* y *Acromyrmex* sp.) presentarán un alto nivel de especificidad del hongo simbiote cultivador, en comparación con las especies que tengan un amplio rango de distribución (*A. octospinosus* y *A. echinator*) las cuales tendrán un hongo simbiote cultivador menos específico, por lo que éstas últimas tendrían una mayor representación en clados filogenéticos de los hongos cultivados.

Para la realización de este proyecto, se colectaron colonias de *Acromyrmex* spp. en diferentes sitios del país y se tomaron muestras del hongo simbiote de las colonias colectadas, tomando 10 muestras por cada colonia de las cuatro especies de hormigas del género *Acromyrmex* estudiadas. Luego se procedió al aislamiento del hongo simbiote en platos Petri sembrando piezas del jardín de hongo. Consecuentemente, se realizó el proceso de extracción de ADN, luego se realizó la cuantificación y amplificación del mismo. Nuevamente se cuantificó y finalmente, las muestras purificadas fueron enviadas a Macrogen Inc., para su posterior secuenciación.

Este proyecto tiene como objetivo general identificar la historia filogenética de los hongos basidiomicetes cultivados por cuatro especies de hormigas del género *Acromyrmex* previamente mencionadas (*A. coronatus*, *A. echinator*, *A. octospinosus*, y *Acromyrmex* sp.), tomando en cuenta su distribución geográfica en la República de Panamá. A su vez, este estudio tiene como objetivos específicos, coleccionar los diferentes nidos de los cuatro especies de *Acromyrmex* en la República de Panamá, y definir la relación filogenética que poseen los cultivares fúngicos de estos nidos.

III. MARCO TEÓRICO

A. Las Hormigas Attine: Origen Evolutivo

Las hormigas Attine pertenecientes a la subfamilia Myrmicinae, tribu Attini; están comprendidas en un grupo monofilético de más de 250 especies descritas, además de cinco especies fósiles, contenidas en 19 géneros distribuidas principalmente en el Nuevo Mundo, en específico, la zona Neotropical de América (Schultz *et al.* 2005; Schultz, 2020). De acuerdo con Mueller (2002), la fungicultura de las hormigas attine se originó alrededor de hace uno 50-60 millones años. Basado en características morfológicas, genéticas, y en su tipo de agricultura, las hormigas cultivadoras de hongos estaban fueron en dos linajes principales, el Paleoattina, compuesto por 77 especies distribuidas en tres géneros; y el Neoattina con 168 especies distribuidas en 16 géneros. Siendo este último linaje el que incluye a las actuales hormigas cortadoras de hojas (Branstetter *et al.* 2017).

B. Historia Natural de las hormigas Attini

A pesar de los distintos linajes, todas las especies de hormigas pertenecientes a la tribu Attini comparten rasgos y hábitos naturales generales asociados con el cultivo de hongos. Las hormigas cultivadoras de hongos son insectos eusociales, debido a que poseen características como: el cuidado cooperativo de los juveniles (los individuos cuidan de las crías que no son propias), la división reproductiva del trabajo (dividiendo el trabajo entre castas estériles y reproductivas), y la superposición de generaciones, de acuerdo con Hölldobler y Wilson (1990). Por otro lado, las colonias de las hormigas del género *Atta* se conocen como “superorganismo”, debido al nivel de organización y trabajo diferencial que realizan las diferentes subcastas de obreras para el funcionamiento correcto de la colonia, simulando así las células en organismos más evolucionados.

Casi todas las hormigas attine, incluyendo los linajes más basales, tienen una relación simbiótica mutualista obligada con el cultivo de hongos de la tribu Leucocoprinae, Familia Lepiotaceae, Orden Agaricales, Phylum Basidiomycota (Mueller, 2002). La propagación y mantenimiento de este hongo ocurre cuando la reina joven toma un pequeño trozo del hongo cultivar de su nido materno, y lo coloca dentro de su bolsillo infrabucal durante el vuelo nupcial (Fernández-Marín

et al., 2005). Una vez establecida en un sitio, la reina joven cava una cámara claustral donde expele el hongo y comienza a cuidarlo bajo tierra, no obstante, dependiendo de la especie, algunas hormigas inician sus nidos incipientes debajo de hojarasca o rocas, para evitar la contaminación directa del hongo por parte del suelo, la reina fundadora coloca el trozo del jardín sobre una plataforma de rocas o realiza la suspensión del hongo cultivar utilizando raicillas que cuelgan sobre la cámara claustral (Weber, 1972; Schultz, 2020). Durante los primeros 40 a 60 días de la fundación del nido, la reina joven debe forrajear, utilizar los nutrientes de su cuerpo, alimentándose de huevos tróficos (huevos no fecundados que sirven únicamente para la nutrición) y buscar sustrato para el mantenimiento del hongo cultivar hasta que las primeras crías de obreras nazcan (Fernández-Marín, Zimmerman y Wcislo, 2004). Según Eisner y Happ (1962), la reina joven cuida del nuevo jardín hasta que se cría la primera generación de obreras, luego, las obreras asumen las tareas del mantenimiento del jardín de hongos y buscar sustrato para el mismo. La colonia y el hongo cultivar crecen hasta tener suficiente biomasa para la reproducción de otra generación de hormigas obreras. Weber., (1966) menciona que las colonias de las hormigas attine, usualmente viven por muchos años, produciendo individuos sexuales anualmente hasta que la reina muere. Por lo general, en las attines inferiores, el tamaño de la colonia y de las obreras tienden a ser más pequeñas y a no poseer polimorfismo dentro de las obreras. Sin embargo, dentro de las hormigas cortadoras de hojas del género *Atta* no se cumple esta tendencia, ya que este género puede tener colonias con millones de obreras, que pueden ser altamente longevas (más de 10 años) y poseen un polimorfismo muy marcado entre las obreras (Weber, 1972).

C. Hormigas Cortadoras de Hojas: género *Acromyrmex*

El género *Acromyrmex* tiene una distribución que va desde el sur de los Estados Unidos, atravesando Centroamérica y Sudamérica, incluyendo Cuba, especialmente la zona Neotropical del continente (Weber, 1972). Las hormigas cortadoras de hojas pueden ser encontradas en diferentes tipos de hábitats, incluyendo bosques húmedos profundos, claros del bosque, sabanas y desiertos que reciben lluvias estacionales, además de áreas de playa. Algunas especies de *Acromyrmex* pueden ser encontradas en altitudes de más de 2500 m de elevación (Mehdiabadi y Schultz, 2009). De acuerdo con Fernández-Marín (2004), los nidos de

Acromyrmex también pueden ser encontrados a lo largo de laderas de arroyos y caminos, teniendo las entradas de los nidos siempre cubiertas con granos de tierra excavados y compactados.

Las hormigas *Acromyrmex* tienen un tamaño de colonia que va entre 17 500 a 270 000 obreras, dependiendo de la especie, según Wetterer, Gruner y Lopez (1998). El polimorfismo obrera-reina es mucho más pronunciado en este género que en el género *Trachymyrmex*, pero mucho menos marcado que en las especies del género *Atta*, por lo que podría decirse que se encuentra en un término medio entre ambos géneros (Mehdiabadi y Schultz, 2009). Por otro lado, en ciertos hábitats, algunas especies del género *Acromyrmex* pueden contar con subcastas, no obstante, para *Acromyrmex* y *Atta*, las pequeñas subcastas tienden a cuidar a las crías y al jardín de hongos, mientras que las castas más grandes se dedican al forrajeo de la vegetación, y en el caso de *Atta*, las castas aún más grandes son soldados y su función consiste en repeler los invasores (Weber, 1972; Hölldobler y Wilson, 1990).

Las reinas fundadoras de *Acromyrmex* forrajean para el mantenimiento del hongo cultivar. Para el establecimiento del jardín del hongo cultivar, las reinas jóvenes colocan el trozo sobre raicillas en la cámara claustral, además de utilizar al hongo simbiote como plataforma para la colocación de los huevos y larvas juveniles (Fernández-Marín, Zimmerman, y Wcislo, 2004). De acuerdo con Corrêa y otros (2010) las hormigas cortadoras de hojas son los herbívoros más exitosos de la naturaleza, porque utilizan una amplia variedad de plantas para preparar el sustrato donde crece su hongo simbiote.

D. Especies de *Acromyrmex* en Panamá

1. *Acromyrmex echinatio*

De acuerdo con Schultz (1999), la distribución de esta especie comprende Centroamérica desde México hasta Panamá. Las obreras mayores de esta especie tienden a presentar mayor pilosidad en su cuerpo como pelos en el propodeo, y los tubérculos de la cabeza (Fernández, Castro-Huertas, y Serna, 2015).

2. *Acromyrmex octospinosus*

Las hormigas de esta especie presentan una ausencia de espinas pronotales anteriores junto con crestas en el dorso del propodeo y pilosidad escasa. La reina de esta especie posee la espina pronotal inferior corta, ancha y de punta roma; de la misma manera, el primer opistotergo posee un par de tubérculos prominentes, uno a cada lado y hacia unos dos tercios del segmento (Fernández, Castro-Huertas, y Serna, 2015). A diferencia de las hormigas de *A. echinator*, los individuos de *A. octospinosus* poseen pelos en el dorso del pecíolo.

3. *Acromyrmex coronatus*

Las hormigas de la especie *A. coronatus* poseen una amplia distribución desde México hasta Brasil, y es fácilmente reconocida por una combinación de cabeza estrecha posterior a las espinas supraoculares, mientras que espinas occipitales están dirigidas hacia afuera y a los lados y las espinas pronotales laterales son más largas que la mesonotale. Otra importante característica de esta especie es que las obreras mayores y, sobre todo, las reinas poseen un color base marrón junto con algunas manchas negras en todo el dorso del cuerpo (Fernández, Castro-Huertas, y Serna, 2015). Esta especie de hormiga forma nidos poco profundos con techitos de paja (Bollazzi, Römer, y Roces, 2021).

4. *Acromyrmex* sp.

Para esta especie no existe información.

E. Historia Natural del Hongo Simbionte Cultivar y las Hormigas Attini

La gran mayoría de las hormigas attine cultivan un hongo de la tribu Leucocoprinae (Familia: Lepiotaceae, Orden: Agaricales, Phylum o División: Basidiomycota) (Mueller, 2002; Mehdiabadi y Schultz, 2009; Schultz, 2020), exceptuando a las hormigas pertenecientes al grupo de especies de *Apterostigma pilosum*, un grupo monofilético, quienes cultivan un hongo coral, perteneciente al género *Pterula* (Pterulaceae, Agaricales, Basidiomycota) (Schultz, 2020). Por otro lado, la filogenia del hongo simbionte se ha mantenido un poco incierta, debido a su rara

producción de cuerpo fructífero, lo que impide su clasificación taxonómica, no obstante, cuando se han producidos estas estructuras, este hongo se asigna a las familias Cortinariaceae, Agaricaceae o Lepiotaceae, en el orden Agaricales, subdivisión Basidiomycota (Chapela *et al.*, 1994).

De acuerdo con Mueller (2002), la familia Lepiotaceae son hongos saprófitos descomponedores, que se encuentran abundantes en los suelos húmedos de la zona Neotropical, por lo que esto sugiere que la asociación entre las hormigas attine y los hongos saprófitos comenzó en los suelos húmedos de los bosques lluviosos tropicales. No obstante, el origen de la fungicultura de las hormigas attine se ve obstaculizado debido al hecho de que todas las asociaciones entre estas hormigas y el hongo son de carácter mutualista obligado y no existen asociaciones facultativas que puedan reflejar las primeras etapas de esta interacción. (Currie, 2001; Mueller *et al.*, 2001).

Chapela y otros (1994), suponen que la simbiosis entre hormigas y hongo ha resultado en la evolución de una compleja serie de modificaciones fisiológicas y de comportamiento en las hormigas, lo que condujo a cambios morfológicos y bioquímicos en algunos simbioses involucrados en este sistema. La domesticación de varios cultivares fúngicos y el intercambio entre ellos, puede ser considerado como los primeros comportamientos ancestrales de las hormigas y sus inicios en las relaciones facultativas con los hongos (Mueller, Rehner y Schultz, 1998). Como ya se ha mencionado antes, algunos cultivares fúngicos parecen más estrechamente relacionados a organismos de vida libre Leucocoprinus; en adición, las filogenias hormigas-hongos son topológicamente incongruentes, lo que nos sugiere que estos patrones son inconsistentes con el escenario de un evento único de domesticación individual a causa de una propagación clonal estricta (Mueller, Rehner, y Schultz, 1998).

Basado en la consistencia de las asociaciones entre el hongo cultivar simbiote y las hormigas, la agricultura de las hormigas attine se ha dividido en cinco grandes “sistemas de agricultura”. Según menciona Schultz y Brady, (2008) y Schultz, (2020), en la agricultura de las attine inferiores, las hormigas cultivan múltiples especies de hongos leucocoprináceos que son simbioses facultativas capaces de vivir libremente en el exterior de la simbiosis. Por otro lado,

la agricultura del grupo pilosum, cultivan dos clados distintivos de especies de hongos del género *Pterula*, que están relacionados estrechamente con la especie de vida libre *Pterula moniliformis*; en un tercer sistema, está la agricultura de levaduras cultivadas por el género *Cyphomyrmex*, quienes cultivan algunas especies de hongos leucocoprináceos, que cuando están asociados con hormigas, crecen en una fase unicelular. El cuarto sistema de agricultura de las hormigas attine, agricultura general superior, representa el producto de la mayor transición evolutiva donde especies de hongos leucocoprináceos de vida libre, se “domesticar” (Schultz , 2020). En este tipo de agricultura, las hormigas no cortadoras de hojas “attine superiores” (110 especies), cultivan otro clado de hongos leucocoprináceos derivado separadamente de los cultivados por las hormigas attine inferiores; el quinto sistema es una subdivisión de la agricultura general de las attine superiores, llamada agricultura de las attine cortadoras de hojas, practicada por 50 especies descritas, donde predominan ecológicamente dos géneros: *Atta* y *Acromyrmex*, donde ambos géneros forrajean activamente en búsqueda de substrato vegetal fresco para el cultivo y mantenimiento de su hongo cultivar (Schultz, *et al.*, 2005; Schultz y Brady, 2008; Mehdiabadi y Schultz, 2009; Schultz , 2020).

F. Cultivo y Mantenimiento del hongo simbiote por las hormigas Attine

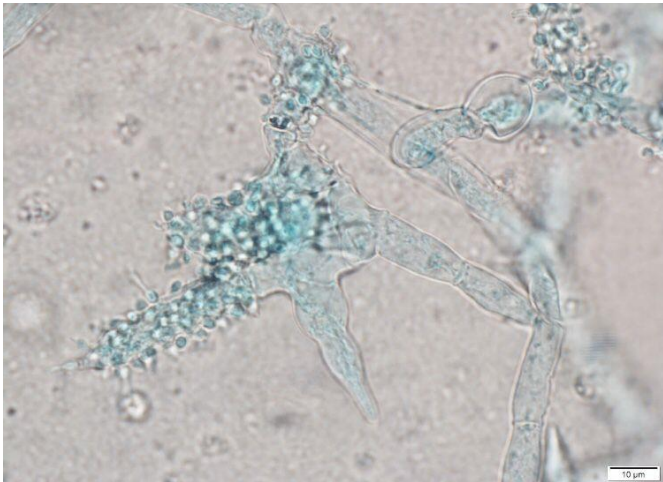
Los cultivares fúngicos son propagados de manera vegetativa, desde el nido maternal maduro hasta el nuevo nido fundado por la joven reina. (Mehdiabadi y Schultz, 2009). Dentro de un nido maduro, estable, la manipulación física ocurre notablemente durante el trasplante del hongo cultivar desde otros jardines fúngicos viejos para la preparación de nuevos jardines dentro del nido; las obreras inoculan un pequeño trozo del hongo a nuevos jardines mediante la preparación y la desinfección parcial del mismo (Mueller, 2002). Las hormigas mejoran el crecimiento del hongo a través de la aplicación de pequeñas gotas o “pellets” fecales (Poulsen y Boomsma, 2005), aseo del micelio para la extracción de esporas contaminantes y la extirpación de fragmentos contaminados dentro del jardín (Currie y Stuart, 2001; Mueller, 2002), y la aplicación de antibióticos (Fernández-Marín , Zimmerman, y Wcislo, 2004).

De acuerdo con Weber (1972), una vez el substrato vegetal ha sido llevado a la colonia, las hormigas comienzan el proceso de descomposición masticando el material, rompiéndolo en pedacitos. Este proceso de rompimiento y preparación del substrato es vital para el

mantenimiento del cultivar fúngico por varias razones: a) ayuda a eliminar algunos de los microorganismos presentes en el material vegetal que podrían representar una competencia o podrían parasitar al hongo cultivar, b) el masticado del substrato vegetal promueve el establecimiento del hongo cultivar sobre el material, ya que algunas hojas forman una barrera física contra la invasión fúngica (Agrios, 1998). Cuando el jardín alcanza la madurez, los hongos cultivares de las hormigas *Attine* superiores producen nódulos conspicuos llamadas estáfilas, estructuras que forman un conglomerado de los racimos de hifas. De acuerdo con Mueller, (2002), los hongos cultivares de las hormigas *attine* superior son los únicos en producir estáfilas verdaderas, ya que hongos cultivares de *attines* inferiores parecen cosechar por medio de micelio; las obreras de las hormigas *attine* superior toman las estáfilas para consumo alimenticio, mientras que las hifas con gongilidios son consumidas por las larvas a través de las obreras. Estas estructuras son sacos producidos en las puntas de las hifas de los cultivares fúngicos pertenecientes a las hormigas *attine* superiores; estas estructuras están llenas de vacuolas ricas en nutrientes donde las hormigas pueden cosechar y alimentarse (Mueller, 2002).

G. *Escovopsis* como patógeno natural del Hongo Cultivar de las Hormigas *Attine*

Escovopsis (Hypocreaceae, Hypocreales, división Ascomycota) es un género de hongos extraído únicamente de los jardines fúngicos de las hormigas *attine*, donde es considerado un parásito patógeno compitiendo con las hormigas por su jardín del hongo cultivar (Currie, Mueller, y Malloch, 1999). De acuerdo con Currie (2001), *Escovopsis* puede rápidamente superponerse en el jardín fúngico, en ausencia de las hormigas, no obstante, bajo ciertas condiciones este patógeno puede devastar completamente los nidos creciendo de manera excesiva sobre todo el jardín fúngico.



Escovopsis weberi microscopía de luz con tinción de azul lactoglicerol 100X



Escovopsis sp. en plato Petri con agar PDA (papa dextrosa agar)

Figura 1. Fotografías ilustrativas del hongo ascomicete *Escovopsis*, patógeno dentro del sistema Cultivar-hormiga.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Área De Estudio y Colecta de Especies

El trabajo de campo de este proyecto se realizó durante los meses de septiembre del 2021 a marzo del 2022. Se colectaron cámaras del jardín fúngico del simbionte pertenecientes a cuatro especies de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* en distintas áreas de la República de Panamá. Se realizaron estas colectas en cinco provincias: Colón (Gamboa), Chiriquí (Reserva Forestal Fortuna, Cordillera), Panamá Oeste (Río Congo), Veraguas (Santa Fe), Coclé (Aguadulce, Juan Hombrón). La identificación de estos nidos en campo se realizó mediante la observación de la arquitectura del nido, especialmente la estructura de la entrada del nido, ya que estas hormigas crean montículos de formas irregulares, consistentes con cráteres dispersos en forma de medialuna (Verza *et al.*, 2007).



Figura 2. Áreas de Colecta de nidos de hormigas *Acromyrmex*

Distribución de las áreas en donde se realizaron las colectas de los nidos de las cuatro especies de hormigas *Acromyrmex*. En color verde, Gamboa (Colón); naranjado, Santa Fe (Veraguas); azul, Río Congo (Panamá Oeste); morado, Aguadulce y Juan Hombrón (Coclé); amarillo, Reserva Forestal Fortuna y Cordillera (Chiriquí).

Los nidos pertenecientes a *A. octospinosus*, tienden a presentarse como nidos poco profundos, localizados en áreas con contacto directo con materia orgánica, formando montículos entre árboles leñosos (Wetterer, Gruner y Lopez, 1998; Bollazi, Römer y Roces, 2021). Aunque de igual manera, esta especie puede exhibir nidos con techo de paja o restos de hojas secas

(Weber, 1969), similares a los que muestra la especie *A. coronatus* (Bollazzi, Römer, y Roces, 2021), como se muestra en la Figura 3. Por otro lado, los nidos de *A. echinator* fueron identificados como pequeños cráteres con tierra removida donde se exhibe una sola cámara (Weber, 1941). Sin embargo, esta especie también demuestra tener nidos poco profundos con una gran cantidad de cámaras con poca biomasa del jardín fúngico (A.R. Martínez, observación personal, 18 de febrero de 2022). Los nidos de *Acromyrmex* sp. fueron localizados por la formación de montículos con tierra removida o siguiendo el rastro de las obreras. Estos nidos contienen múltiples cámaras con poca biomasa del jardín fúngico, situadas en lo profundo de la tierra (A.R. Martínez, observación personal, 24 de febrero de 2022). No obstante, para una mejor identificación, se procedió a tomar un individuo directamente del nido y a través de la utilización de una lupa entomológica y el reconocimiento de caracteres morfológicos se pudo dictaminar la especie en campo.

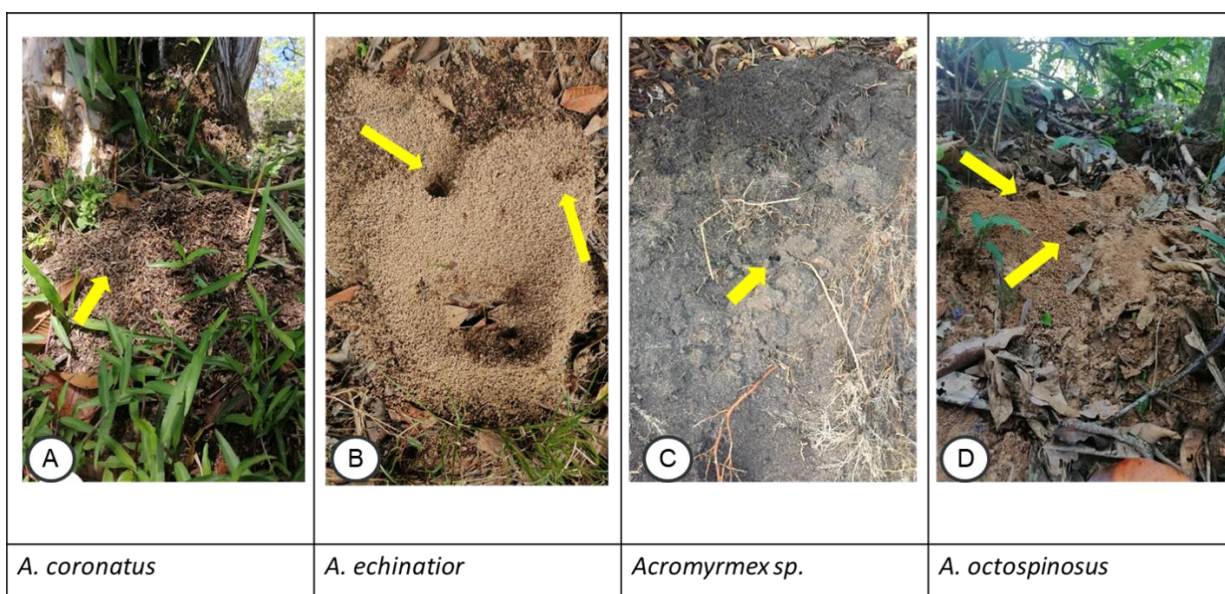


Figura 3. Tipos de nidos de hormigas *Acromyrmex*.

Se presentan los diferentes tipos de nidos y su arquitectura. A) Los nidos de *A. coronatus* suelen encontrarse contruidos a nivel del suelo solapados con un techo de hojas cortadas y material seco (flecha amarilla indica el techo cubierto de hojas cortadas secas). B) Los nidos de *A. echinator* presentan tierra removida, y múltiples entradas (flecha amarilla) en donde las hormigas pueden entrar a los túneles (flecha roja). C) *Acromyrmex* sp. presenta nidos contruidos sobre arena y D) *A. octospinosus* presenta nidos con más de una entrada en suelos arcillosos.

Se colectaron 10 colonias por cada especie. Una vez localizados los nidos, se procedió a marcarlos utilizando cintas de señalización, luego fueron excavados empleando una piqueta geológica, pinzas y palas de jardín. Los instrumentos fueron previamente limpiados y esterilizados antes de su uso. La cámara del jardín del hongo simbiote fue colectada utilizando un cucharón plástico. Con precaución, evitando que la tierra circundante y otras perturbaciones estructurales y ambientales pudiesen contaminarlo. Luego, el jardín fúngico fue trasladado a cajas de plástico de zapatos, con los bordes engrasados previamente, utilizando aceite vegetal, para evitar el escape de las hormigas.

Para el mantenimiento de estas colonias dentro del laboratorio, las mismas fueron transferidas a recipientes de plástico limpios, donde fueron alimentadas cinco días a la semana, con trozos de manzana, hojuelas de avena, granos de arroz o harina de maíz. Igualmente, el jardín fúngico se mantenía humedecido utilizando papel toalla absorbente remojado con agua, además de contar con una limpieza diaria de la colonia para evitar posible contaminación por los desechos producidos por la misma.

B. Aislamiento y Cultivo Puro del Hongo Simbiote

En la realización de esta parte del ensayo, se tomaron trocitos muy pequeños de la estructura del jardín fúngico y fueron sembrados en platos Petri (90 x 14 mm) con roquetas de Agar PDA (Agar Papa-Dextrosa) marca Merck® sin antibióticos. Luego se mantuvieron en la oscuridad por 30 días a una temperatura de 17°C con una humedad relativa de 60%.

Después, se pasó a tomar con un bisturí previamente esterilizado, cuatros trozos del crecimiento fresco del hongo simbiote y se transplantó de manera distal a platos Petri (60 x15 mm) con Agar PDA sin antibióticos. Estos platos pasaron a ser incubados en total oscuridad, a una temperatura de 25°C-27°C, con 80% de humedad relativa, por 30 días. Pasado este tiempo, estos platos con cultivos puros fueron utilizados para los procedimientos moleculares.

1. Microscopía Óptica

Posterior a este tiempo, se realizaron observaciones en placa de dichos cultivos. Se utilizó la técnica de preparación de frotis fresco, montaje directo y tinción con lactofenol para la visualización y confirmación del crecimiento del hongo

Leucoagaricus gongylophorus, empleando un microscopio óptico Olympus Life Science modelo BX 53. Y la cámara DP73 con aumento de 10x y 60x.

2. Criopreservación en Glicerol

Los platos restantes con cultivo del hongo simbiotes fueron empleados para su criopreservación. Se utilizaron tubos de criopreservación de 1.8 mL que fueron llenados con 1.5 mL de glicerol al 75%, y luego se introdujo en ellos trozos de agar de $\sim 1 \text{ cm}^2$ con hongo simbiote y se preservaron en congeladores a una temperatura de -80°C .

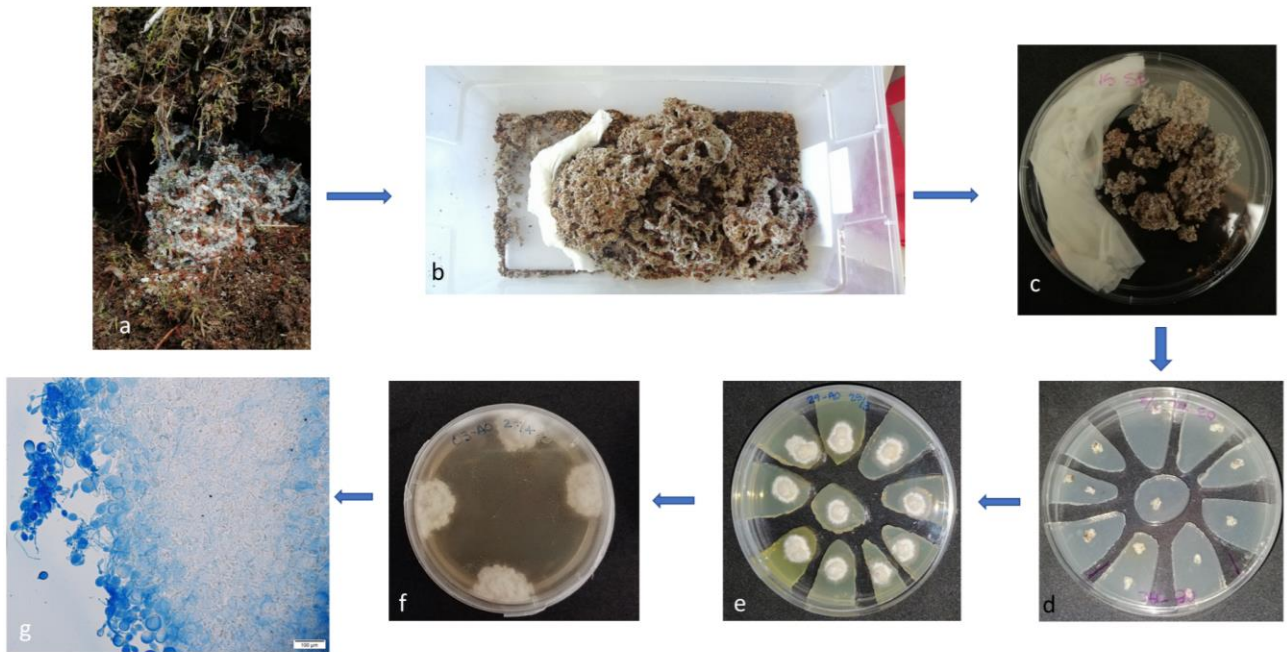


Figura 4. Proceso de aislamiento del jardín fúngico del hongo simbiote.

En la Figura 4 se muestra el procedimiento para el aislamiento y cultivo puro del jardín fúngico simbiote. a) Cámara del hongo cultivar perteneciente a las hormigas *Acromyrmex octospinosus*; b) La cámara fue extraída y colocada en cajas de plástico, con trozos de papel absorbente previamente humedecidos con agua; c) se realizó una cámara húmeda donde se separan las obreras, larvas y huevos del trozo del hongo cultivar; d) se colocan trocitos pequeños en rosetas de agar PDA; e) pasados los 30 días, el hongo simbiote creció dentro del plato Petri; f) se tomó un pequeño pedacito del nuevo jardín y se colocó de manera distal en platos Petri con agar PDA y luego se incubaron a una temperatura de 17°C por otros 40 días; g) Se realizó una placa utilizando la técnica de azul de lactoglicerol para la observación al microscopio óptico del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*.

C. Extracción de ADN Fúngico

Para la extracción de ADN de los hongos se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción de ADN con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) de Doyle y Doyle, (1990). En donde se tomó $\sim 2 \text{ cm}^2$ de micelio proveniente de los platos Petri con cultivo axénicos del hongo simbiote con un bisturí, luego fue añadido a un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL. Se le añadió 500 μL de solución CTAB Extraction Solution TEKNOVA® (2.0% CTAB, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20mM EDTA, pH 8.0, 1.4M Cloruro de Sodio). Dichos tubos se incubaron a 65°C por 30 minutos en baño seco, utilizando el equipo Labnet International AccuTherm *dry bath*.

Posteriormente, se le agregó 350 μL de fenol cloroformo alcohol isoamílico (SIGMA®) y se homogenizaron manualmente los tubos. De inmediato, se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 minutos, utilizando el equipo centrifugadora Eppendorf® 5430. Luego, se tomaron 250 μL del sobrenadante a un tubo de microcentrifugación nuevo y estéril. A dicho tubo con sobrenadante, se le añadieron 250 μL de isopropanol frío (4°C) y se llevó a congelar por una hora a una temperatura de -20°C.

Pasado este tiempo, se centrifugó a 14 000 rpm durante cinco minutos y se descartó el sobrenadante. Seguido de esto, se le añadió al tubo 400 μL de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por un minuto. Luego de visualizar claramente el *pellet* con ADN, se dejó secar el tubo por una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se resuspendió en 30 μL de agua grado molecular.

D. Cuantificación del ADN

Para la lectura de las concentraciones de ADN, se empleó el equipo Nanodrop® ND-1000 and ND-8000 8 Sample Spectrophotometers, para cuantificar la calidad y cantidad de ADN genómico en ng/ μL . Se procedió a tomar 2 μL de la solución resuspendida con material genético, y se colocó en el equipo Nanodrop®, luego se tomó la espectrofotometría.

Se tomó en cuenta la medida de concentración de ácidos nucleicos y la medida de radio de longitud de onda de 260/280. Donde un radio de 260/280 $\sim 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ es considerado, generalmente, como ADN puro (aceptado). Por encima de estos valores, podría indicar contaminación externa.

E. Amplificación de ADN o PCR

Con los productos obtenidos de la extracción de ADN se llevó a cabo la amplificación del ADN del hongo simbionte. Se amplificaron los espaciadores ITS (espaciador interno transcrito, siglas en inglés) de la región ITS1 y ITS2 que flanquean el gen ribosomal 5.8S. De acuerdo con Begerow y otros (2010), es una región utilizada con frecuencia como marcador molecular en hongos para determinar el nivel de especie.

Para la amplificación de esta región se emplearon los cebadores ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT GCT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990).

Los tubos se estandarizaron para tener un volumen final de 25 μ L, dispuestos de la siguiente manera en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Componentes para la preparación de la solución para la PCR.

Componente	Volumen (μ L)
Qtaq	0.75
Buffer 10x	2.25
MgCl ²	2.25
Dntps	2.25
ITS5	1.25
ITS4	1.25
H ₂ O	14
ADN	1

La reacción de PCR se efectuó en un termociclador AB Applied Systems® 2720 Thermal Cycler empleando las siguientes condiciones:

- 95°C por cinco minutos.
 - 95°C por 45 segundos.
 - 50°C por 45 segundos.
 - 72°C por 1.5 minutos.
 - 72°C por 10 minutos.
- } 30 ciclos

Los productos obtenidos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñidos con 4 μL del tampón SYBR® Safe con concentración de 10 000X en DMS. Se agregaron 7 μL (2 μL de tampón 5x Gel Pilot Loading Dye y 5 μL de material genómico, previamente mezclado) 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, marca Thermo Scientific Fisher® El proceso de amplificación mediante electroforesis tomó 30 minutos.

La visualización de las bandas genómicas se realizó usando el equipo de transiluminación (BIO-RAD ChemiDoc Imaging System®). Donde se obtuvieron bandas oscilantes entre 600 a 750 bp (Lugo *et al.*, 2013; Bich *et al.*, 2016; Viguera *et al.*, 2017).

F. Purificación del Producto de PCR

Luego de haber obtenido el producto de PCR se procedió a la purificación del mismo. La purificación del producto de PCR se hizo siguiendo el protocolo del QIAquick PCR Purification Kit. Después, se procedió a medir nuevamente la concentración de ADN, utilizando el Nanodrop® ND-1000 and ND-8000 8 Sample Spectrophotometers y se verificó que tuviese como mínimo una concentración de 50 ng/ μL y un ratio 260/280 de 2.00.

G. Secuenciación del ADN Fúngico

Posteriormente de haber obtenido los amplicones purificados con material genético, estas muestras se enviaron a la empresa Macrogen Inc., ubicados en Corea del Sur, para su posterior secuenciación utilizando el método de Sanger.

V. RESULTADOS

A. Área De Estudio y Colecta de Especies

En la ejecución de este proyecto, se obtuvieron colonias provenientes de varias provincias del país, como: Panamá Oeste, Colón, Coclé, Veraguas, Chiriquí; las cuales estaban ubicadas en diferentes zonas boscosas con variación con relación a la temperatura y humedad relativa del sitio. El Cuadro 3 especifica el lugar de la colecta, junto a la colonia recolectada y los factores abióticos durante la colecta de los nidos.

Cuadro 3. Colecta de nidos de *Acromyrmex* en Panamá.

Lugar (Coordenadas)	Nido	Especie	Temperatura (°C); Humedad Relativa (%)	Observaciones
Colón, Gamboa (9°07'09.1"N 79°42'20.5"W)	20210928-01Ae	<i>A. echinator</i>	30°C; 80%	Parcialmente nublado. Bosque secundario. Altura 15 m.
	20210928-02Ae	<i>A. echinator</i>		
Pmá. Oeste, Chame	20211004-01Asp	<i>A. spp</i>	--	--
Pmá. Oeste, Río Congo	20211021-03Ae	<i>A. echinator</i>	--	--
	20211021-05Ae	<i>A. echinator</i>		
	20211021-06Ae	<i>A. echinator</i>		
Veraguas (N 8°20'73.40"; W 81°02'14.3")	20211117-07Ae	<i>A. echinator</i>	28°C; 86%	Parcialmente nublado, área cubierta por potreros y praderas. Altura 318 m.
Veraguas (N 8°20'73.40"; W 81°02'14.10")	20211117-08Ae)	<i>A. echinator</i>	28°C; 90%	Soleado, área cubierta por potreros, y praderas. Altura 200 m.
	20211117-09Ae	<i>A. echinator</i>		
Chiriquí (N 8°43'33.20"; W 82°14'23.80")	20211118-01Ac	<i>A. coronatus</i>	23°C; 100%	Nublado, bosque nuboso, dentro de la Reserva Forestal de Fortuna. 1218 m de altura.
	20211118-02Ac	<i>A. coronatus</i>		
Coclé, Aguadulce (N 08°15.032'; W 80°35.261')	20220218-10Ae	<i>A. echinator</i>	34°C; 37%	Soleado, área de potreros, pradera con ganado. Altura 108 m.
	20220218-11Ae	<i>A. echinator</i>		
Chiriquí, Cordillera (N 08°14.669' W 080°01.972)	20220219-03Ac	<i>A. coronatus</i>	24°C; 49%	Soleado, área rural, con praderas. Altura 1189 m
	20220219-04Ac	<i>A. coronatus</i>		
Chiriquí, Cordillera (N 08°43.820' W 082°36.110')	20220219-05Ac	<i>A. coronatus</i>	29°C; 50%	Soleado, área rural. Altura 1286 m
Chiriquí, Cordillera (N 08°44.090' W 082°36.119')	20220219-06Ac	<i>A. coronatus</i>	29°C; 50%	Soleado, área rural. Altura 1305 m
Chiriquí, Cordillera (N 08°44.750'; W 82°36.846')	20220219-07Ac	<i>A. coronatus</i>	27°C; 56%	Soleado, área rural, praderas con ganado. Altura 1358 m
Chiriquí, Cordillera (N 08°45.563'; W 082°26.052')	20220220-01Ao	<i>A. octospinosus</i>	26°C; 60%	Soleado, área rural. Altura 1129 m
Chiriquí, Cordillera (N 08°42.491'; W 82°36.067')	20220220-02Ao	<i>A. octospinosus</i>	25°C; 67%	Soleado, área rural, praderas con ganado. Altura 1101 m
Chiriquí, Cordillera (N 08°43.676'; W 082°36.143')	20220220-08Ac	<i>A. coronatus</i>	25°C; 64%	Soleado, área rural. Altura 1255 m.
Chiriquí, Cordillera (N 08°44.117'; W 082°36.543')	20220220-09Ac	<i>A. coronatus</i>	25°C; 64%	Soleado, praderas con ganado. Altura 1289 m.
Chiriquí, Cordillera (N 08°45.014'; W 082°36.729')	20220220-10Ac	<i>A. coronatus</i>	26°C; 73%	Soleado, praderas con ganado. Altura 1413 m

Coclé, Juan Hombrón(N 8°14.669'; W 80°01.972')	20220224-02Asp	<i>A. spp</i>	33°C; 37%	Soleado, lote com tierra árida. Altura 17 m.
	20220224-03Asp	<i>A. spp</i>		Soleado, nido encontrado bajo la sombra de un árbol. Altura 19 m.
	20220224-04Asp	<i>A. spp</i>		Soleado, nido encontrado en tierra con alta porción de arena. Altura 5 m.
Coclé, Juan Hombrón (N 08°19.106'; W 080°12.174')	20220317-06Asp	<i>A. spp</i>	32°C; 85%	Soleado, nidos encontrado con alta porción de arena. Altura 13 m.
	20220317-07Asp	<i>A. spp</i>		
	20220317-08Asp	<i>A. spp</i>		
	20220317-09Asp	<i>A. spp</i>		
Coclé, Juan Hombrón (N 08°19.306'; W 080°11.784')	20220318-10Asp	<i>A. spp</i>	33°C; 88%	Soleado, nidos encontrado cerca de plantas y jardines recién regados con agua fresca. Altura 12 m.
	20220318-11Asp	<i>A. spp</i>		
Colón, Gamboa (N 08°19.329'; W 080°11.733')	20220323-03Ao	<i>A. octospinosus</i>	34°C; 94%	Soleado. Nido encontrado cerca de la raíz de un árbol. Altura 115 m.
	20220323-04Ao	<i>A. octospinosus</i>		
	20220323-05Ao	<i>A. octospinosus</i>		
	20220323-06Ao	<i>A. octospinosus</i>		
	20220323-07Ao	<i>A. octospinosus</i>		

Se colectaron 47 nidos de cuatro especies de *Acromyrmex*, de los cuales 40 fueron mantenidos en condiciones artificiales dentro del laboratorio para su posterior procesamiento en técnicas moleculares como la extracción de ADN, su amplificación o PCR, purificación del ADN y su secuenciación como se ve en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Nidos colectados para el procesamiento filogenético

	NIDOS COLECTADOS	NIDOS AISLADOS*	ADN EXTRAÍDO	ADN AMPLIFICADO (PCR)	ADN PURIFICADO	ADN SECUENCIADO
<i>A. echinator</i>	13	12	12	12	11	8
<i>A. octospinosus</i>	7	7	7	7	6	6
<i>A. coronatus</i>	15	11	11	11	8	9
<i>A. spp</i>	12	10	10	10	8	9

*Se refiere a los nidos que sobrevivieron después de la colecta y el traslado al laboratorio para su posterior mantenimiento en condiciones artificiales.

B. Aislamiento y Cultivo Puro del Hongo Simbionte

Para el aislamiento y cultivo puro del hongo simbionte, se tomó un trozo pequeño del jardín previamente aislado, el cual tenía al menos 30 días de haber sido sembrado en el plato Petri, posterior a este período se incubaron 10 platos de cada nido aislado; cinco platos a temperatura de 17°C con una humedad relativa del 60%, mientras que el resto de los platos fueron sometidos a una incubadora con una temperatura entre 25-29°C con una humedad relativa de 80%. Se

comprobó que el segundo grupo de platos creció con mucha mayor facilidad y en menor tiempo que los que fueron incubados a temperatura y humedad relativa baja (17°C; 60%), tal como se muestra en la Figura 5.

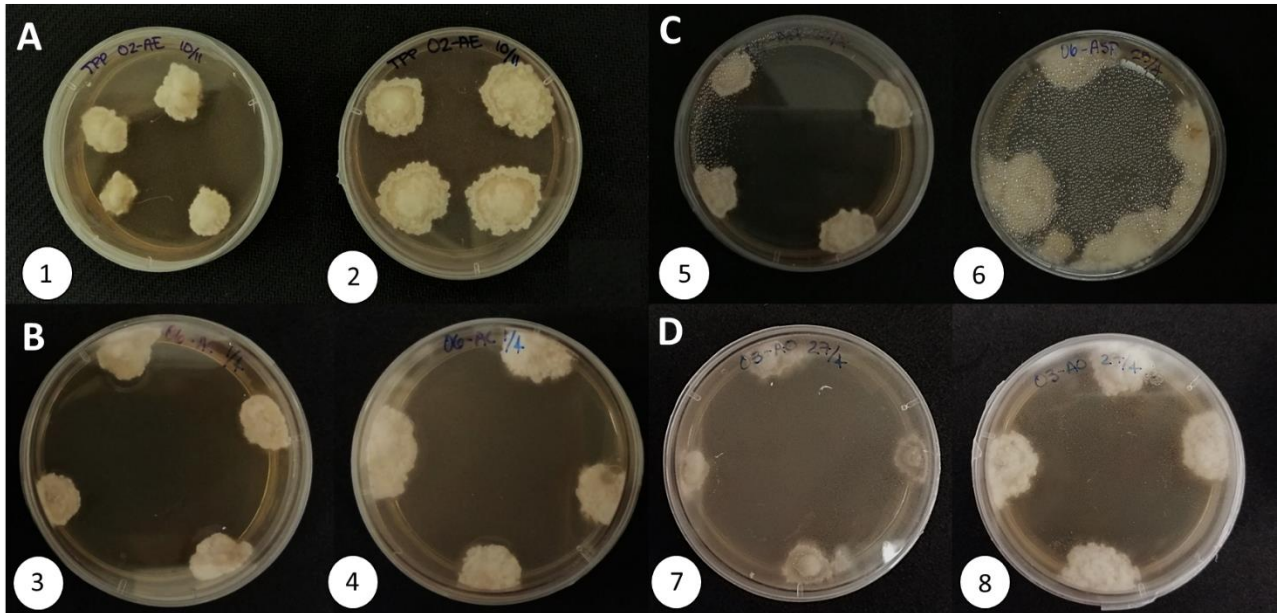


Figura 5. Crecimiento del hongo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* en platos de agar PDA bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa.

Comparando el crecimiento micelial de las estériles cuando estos platos se incubaron por 40 días en condiciones diferentes. Platos 1-3-5-7, fueron incubados a una temperatura de 17°C, mientras que los platos 2-4-6-8, fueron incubados a una temperatura de 28°C-29°C con una humedad relativa del 80%. A) platos de la especie *Acromyrmex echinator*; B) platos de la especie *Acromyrmex coronatus*; C) platos pertenecientes a la especie *Acromyrmex* sp. y D) platos pertenecientes a la especie *Acromyrmex octospinosus*.

1. Microscopía Óptica

Durante la realización de este experimento, se hicieron placas frescas para la observación de las estructuras fúngicas del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, y así tener un conocimiento óptimo del cultivo axénico del hongo aislado.

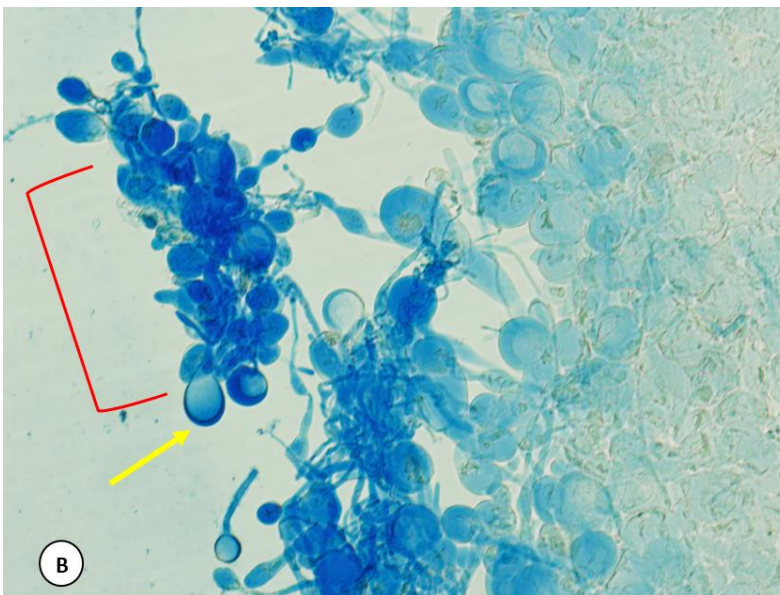
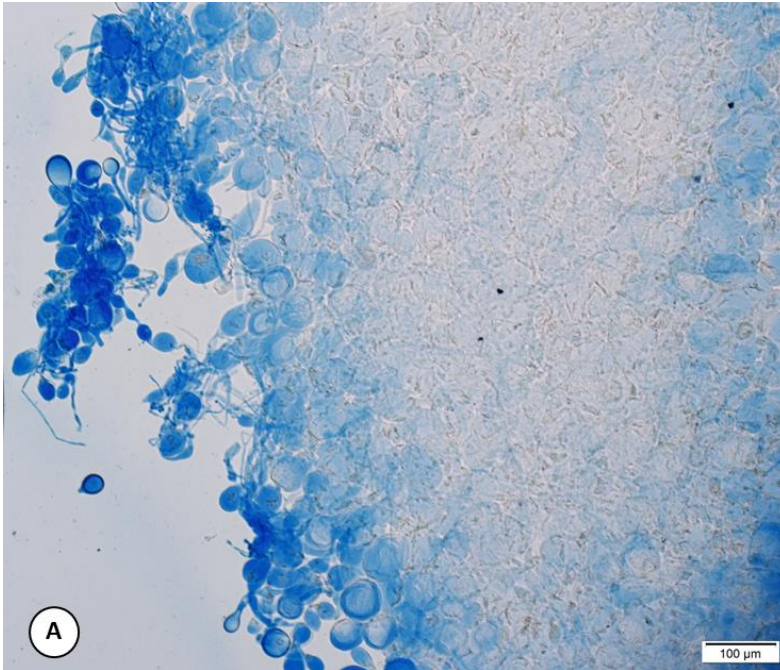


Figura 6. Observación de placas de microscopías de luz con tinción de azul de lactoglicerol.

En la figura 6A, se tiñeron las estructuras fúngicas utilizando la tinción de azul de lactoglicerol y se observó tejido del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, con un aumento de 100X. Para la figura 6B, se puede observar las estáfilas (señalado con rojo) y las puntas de las hifas (flecha amarilla) con estructuras vacuolizadas, llamadas gongilidios, utilizando un aumento de 60x.

C. Amplificación de ADN

El ADN extraído fue utilizado para su amplificación, además de poder realizar la reacción en cadena de la polimerasa. Para el hongo, *Leucoagaricus gongylophorus*, y la región objetivo entre los espaciadores ITS1 e ITS2, que flanquean el gen ribosomal 5.8S, el fragmento de ADN alcanzó un peso molecular de 600 a 700 bp. Todas las muestras amplificadas en este proyecto fueron sometidas a una electroforesis que después fue llevada a un transiluminador para la corroboración de las bandas como se muestra en la Figura 7.

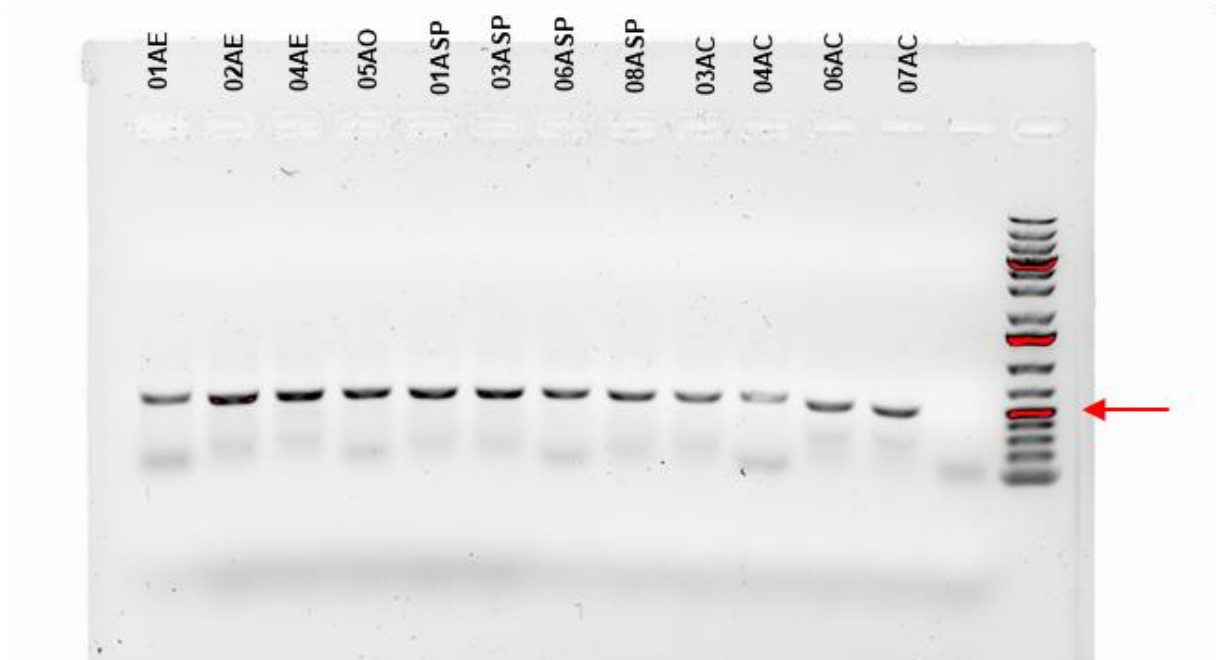


Figura 7. Bandas genómicas pertenecientes a *L. gongylophorus* en gel de agarosa al 1%.

Las muestras expuestas amplificaron al tamaño de interés de 700 bp (señalado con la flecha roja). Se utilizó un marcador de peso molecular Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, marca Thermo Scientific Fisher®.

D. Secuenciación

Se secuenciaron 40 hongos aislados, aproximadamente 10 hongos por cada una de las cuatro especies de *Acromyrmex*, de los cuales se obtuvieron 32 secuencias lo suficientemente limpias para ser utilizadas dentro de los análisis de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (Cuadro 4). Los análisis de relación de parentesco obtenidos de estas secuencias dieron como resultado la distribución de la diversidad total para: ocho muestras de hongo simbiote de

Acromyrmex echinator; seis muestras de *A. octospinosus*; nueve muestras para *A. coronatus* y nueve muestras para *Acromyrmex* sp. Todas las muestras secuenciadas obtenidas de las diferentes colonias fueron comparadas y revisadas en la base de datos del NCBI GenBank, utilizando el blastn, donde se mostraron que las secuencias tenían alta similitud ($\geq 96\%$) con muestras previamente secuenciadas de otros hongos simbioses dentro del género *Leucoagaricus* pertenecientes a diferentes especies de hormigas attine superiores. Las secuencias de nucleótidos conseguidos en estudio tenían un peso molecular de 600 a 700 bp, lo que corresponde a la región ITS1-5.8S-ITS2.

Ambos análisis filogenéticos generaron de manera consistente una topología consonante con respecto a la distribución de la diversidad genética de estos hongos simbioses (Figura 8 y 9), Dentro de estos análisis se incluyeron secuencias del hongo *Leucoagaricus gongylophorus* pertenecientes a otras especies de hormigas cortadoras de hojas (*Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex*, *Paratrachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Mycetomoellerius*), además se añadieron formas de vida libre del género *Leucoagaricus*. Para ambos análisis se utilizó como grupo externo la secuencia de *Lepiotaceae* EF527343.

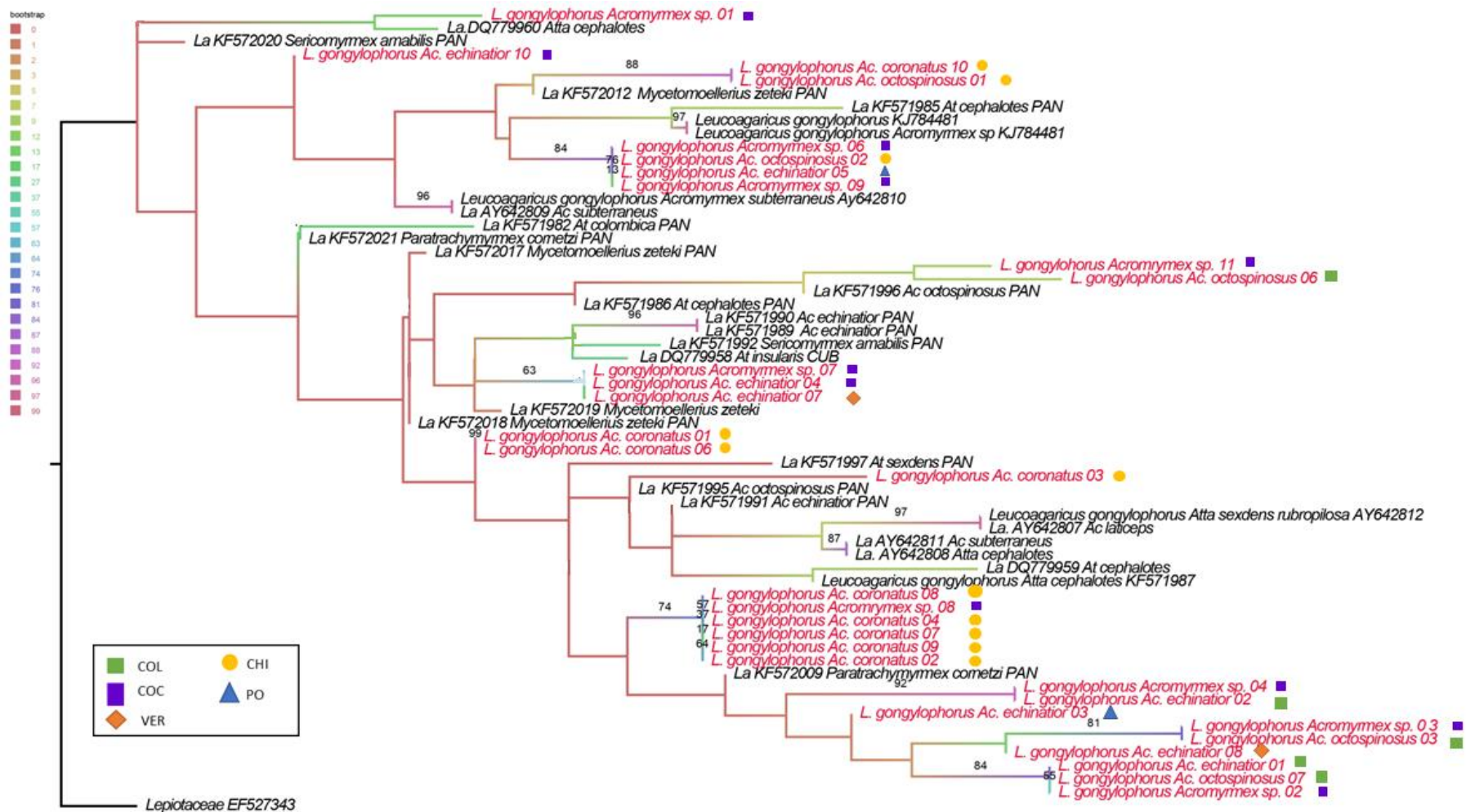


Figura 8. Relación filogenética de los hongos simbios de *A. coronatus*, *A. octospinosus*, *A. echinator* y *Acromyrmex* sp. de Panamá

La topología del árbol filogenético obtenido por el análisis de Máxima Verosimilitud, va de un rango de 1 a 100%, representa la reconstrucción basada en las secuencias de los espaciadores intergénicos ITS1/ITS2 y el gen 5.8S ribosomal. La distribución por provincia está dada por un código iconográfico: Colón (COL), Coclé (COC), Veraguas (VER), Chiriquí (CHI), Panamá Oeste (PO).

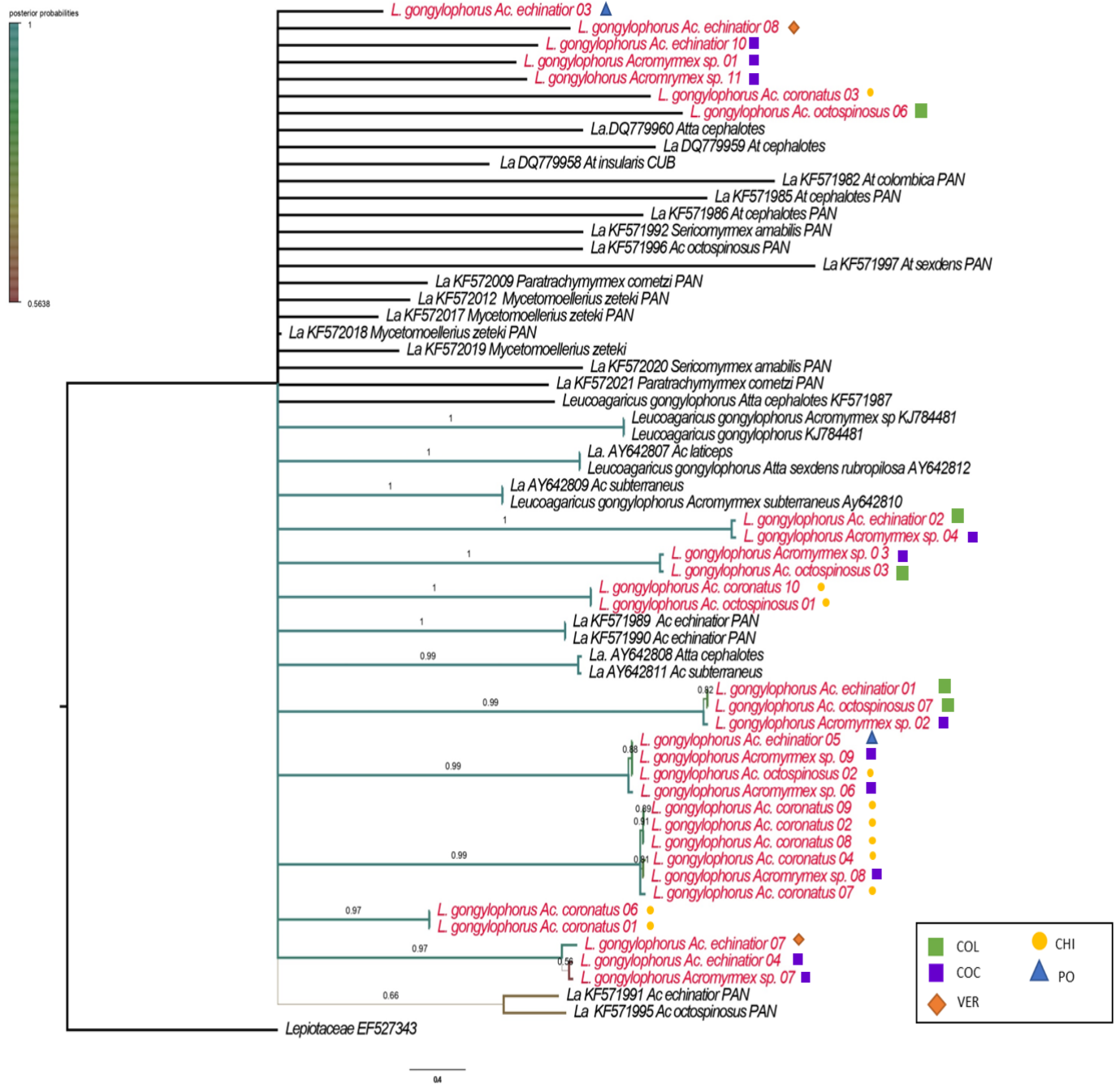


Figura 9. Árbol filogenético por Inferencia Bayesiana para el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* de las especies *A. coronatus*, *A. octospinosus*, *A. echinator* y *Acromymex* sp. en Panamá.

La topología del árbol filogenético obtenido por el análisis de Inferencia Bayesiana va de un rango de 0 a 1 y representa la reconstrucción basada en las secuencias de los espaciadores intergénicos ITS1/ITS2 y el gen 5.8S ribosomal. La distribución por provincia está dada por un código iconográfico: Colón (COL), Coclé (COC), Veraguas (VER), Chiriquí (CHI), Panamá Oeste (PO).

VI. DISCUSIÓN

A. Diversidad Genética

La filogenia del género *Leucoagaricus* fue reconstruida utilizando las secuencias de ITS obtenidas de los cultivos axénicos empleados en este estudio, y data generada del GenBank, mostrada en la Figura 8 para la Estimación de Máxima Verosimilitud y la Figura 9 para el análisis de Inferencia Bayesiana.

Con respecto a la ubicación taxonómica y sistemática del género *Leucoagaricus*, nuestros resultados son consistentes con los resultados previamente publicados, donde se utiliza secuencias ITS (Lugo *et al.*, 2013; Bich *et al.*, 2016), demostrando que el hongo cultivado por el género *Atta* y *Acromyrmex* pertenecen a un sólo clado, lo que sugiere que las cepas de *Leucoagaricus gongylophorus* cultivadas por hormigas del género *Acromyrmex* en Panamá presentan una diversidad genética reservada, similar a lo que sucede con las cepas obtenidas de diversas regiones de Sudamérica para los géneros de *Atta* y *Acromyrmex* (Lugo *et al.*, 2013).

El hecho de que las cepas aisladas en este proyecto se agrupen en un solo clado podría indicar la conservación de la estrecha relación filogenética de estas cepas del hongo simbiote. Debemos recordar que la transmisión de este hongo, se da por lo general de manera vertical produciendo así clones asexuales (Currie, 2001; Lugo *et al.*, 2013; Bich *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2017), sin embargo, varias observaciones a nivel filogenético demostraron inconsistencias con la reproducción clonal estricta. Sugiriendo que estas hormigas de diferentes especies simpátricas a veces cultivan clones de cultivares genéticamente idénticos, lo que indica un intercambio reciente de clones de hongos simbiotes, entre nidos de diferentes especies de hormigas o la transferencia lateral entre comunidades de hormigas cortadoras de hojas, por medio del robo entre jardines o por la dispersión de cultivares a través de vectores desconocidos (Mueller *et al.*, 2017). Lo que en términos generales, explicaría la reservada diversidad genética entre estas poblaciones de hormigas tomando en cuenta su distribución geográfica y las diferentes condiciones ambientales de cada sitio de colecta.

B. Distribución Geográfica *versus* Distancia Genética

Durante la realización de este estudio, se tomaron muestras de diferentes provincias de la República de Panamá, como: Colón (Gamboa), Chiriquí (Fortuna, Cordillera), Panamá Oeste (Río Congo), Coclé (Juan Hombrón, Aguadulce). Todos los lugares visitados presentaban condiciones climatológicas y vegetación diferentes (Cuadro 3).

Sin embargo, los nidos colectados en la provincia de Chiriquí, específicamente para la especie de *Acromyrmex coronatus*, y las secuencias obtenidas para su cepa de *Leucoagaricus gongylophorus*, ubican a estas muestras estrechamente cercanas entre ellas, sugiriendo que esta cepa es bastante específica para los nidos aislados de esta zona. De acuerdo con Wetterer (1995), las colonias de *Acromyrmex coronatus* son comunes en alturas que van de 1300 a 1600 m, pero ausentes en suelos bajos, para Costa Rica. Las colonias aisladas de Chiriquí estaban ubicadas en un rango de 1101 a 1809 m sobre el nivel del mar. De acuerdo con Fernández, Castro-Huertas, y Serna (2015), la abundancia de hormigas cortadoras de hojas va disminuyendo a medida que aumenta la altura, por lo que estas hormigas raramente se encuentran a elevaciones desde 2000 – 2500 m. Es lógico pensar que a medida que la abundancia de estas hormigas disminuye conforme aumenta la altitud, por lo que se podría sugerir que la cepa del hongo cultivar que manejan ha recibido poca variación genética, en base a su dispersión. Las colectas realizadas de estos nidos se dieron a una distancia no mayor de 40.72 Km (distancia en línea recta entre los puntos más distantes de colecta: Cordillera y la Reserva Forestal de Fortuna), por lo que estos resultados son congruentes con los publicados por Mueller y otros (2017), en donde la identidad del genotipo del hongo cultivar que ha sido colectado en nidos de la misma especie de hormiga que se encuentran en un radio de 50 Km de distancia o menos entre sí, producirán muestras “duplicadas”, debido a la proximidad cercana que tienen entre ellos; lo cual es consistente con la transmisión vertical del hongo, la herencia vertical de los clones del hongo simbiote, y la poca diversidad de hormigas encontradas en el sitio.

Mientras que las cepas aisladas de las colonias colectadas de Colón (excluyendo *A. octospinosus* 01) y Coclé para *A. echinatio* y *Acromyrmex* sp., parecen poseer una cepa genotípica del cultivar más generalista o menos reservada que la presentada por la del grupo de *Acromyrmex*

coronatus aislada en Chiriquí, debido a la distribución de estas cepas se ve dispersada entre diferentes especies a través de diferentes nichos. Por lo cual, se propone lo ya expuesto por Mueller y otros (2017), es decir, que existe la posibilidad de que el hongo simbiote pueda dispersarse de manera independiente de las hormigas, donde no necesariamente se esté tomando clones asexuados de nidos maternos, además de que la estructura genética del hongo *Leucoagaricus gongylophorus* está fuertemente correlacionada con su distribución geográfica.

A pesar de que *Acromyrmex* sp. pertenecía al grupo de especies con delimitada distribución geográfica (área costera pacífica de Coclé), esta especie no presentó el patrón aislado o “reservado” que obtuvo *Acromyrmex coronatus*, y las muestras que fueron colectadas en Chiriquí. Ya que estos nidos fueron colectados con una distribución espacial, menor a los 40 Km de distancia. Sospechamos que puede ser debido a la presencia de otras especies en el área de colecta, como *Acromyrmex echinator*, y bajo este contexto, el robo de jardines, la transferencia horizontal y la dispersión del hongo simbiote por medio de vectores desconocidos, podría encajar, de acuerdo a lo postulado por Mueller y otros (2017).

C. Análisis Filogenético

Los resultados presentan que el 80% de los hongos secuenciados se pudieron analizar filogenéticamente. El resto de las muestras no fueron tomadas en cuenta, ya que no cumplían con los requisitos demandados por los análisis filogenéticos. Las muestras debían tener una concentración de 50 ng/μL con una ratio de 260/280 superior a 1.8 sería el caso óptimo (Crossley *et al.*, 2020) para la obtención de una secuencia limpia. Por lo que al momento de ser secuenciadas estas muestras presentaron múltiples copias divergentes, traducidas en el cromatograma como múltiples picos de secuencia o mejor llamadas, ruido. Esta divergencia no permite la edición de las secuencias, por lo tanto, no se pudieron incluir dentro de los análisis.

De acuerdo con Kooij y otros (2015), todos los núcleos de los simbioses de las hormigas cortadoras de hojas parecen ser indistintamente poliploides, ya que dentro este sistema, los hongos simbioses; a diferencia del resto de los basidiomicetos, no poseen conexiones de abrazaderas o fíbulas, para mantener el mismo número de núcleos haploides genéticamente diversos en las divisiones de células somáticas. Por lo tanto, la poliploidía parece ser una variable

entre cepas individuales. La reservada diversidad presentada en este estudio puede ser debido a la utilización de un solo juego de cebadores, en este caso sólo se emplearon cebadores del tipo ITS para amplificar la región ITS1 e ITS2 y flanquear el gen ribosomal 5.8S; en otros estudios realizados para este mismo organismo (Mikheyev, Mueller, y Abbot, 2006; Kooij *et al.*, 2015), se utilizaron otro tipo de cebadores como Subunidad Larga (LSU), BIP3, Factor de Enlogación 1 alfa (EF1- α), se podría obtener otros sitios de unión con los cebadores y por ende, una mejor discrepancia entre la relación genética de estos simbioses dentro de los árboles filogenéticos. Los análisis de Estimación de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana podrían tener una mejor resolución si se hubiesen tenido en cuenta las secuencias de *Acromyrmex coronatus* de otros estudios realizados a lo largo de su distribución en América a razón de las muestras que están distribuidas a través de los árboles filogenéticos sin aparente clado, no obstante, para este estudio se tomaron secuencias de simbioses de hormigas cortadoras de hojas superiores, en vez de ser focalizados solamente para el género *Acromyrmex*.

VII. CONCLUSIONES

Se logró determinar la historia filogenética entre hongos simbioses cultivados por diferentes especies de hormigas del género *Acromyrmex* que variaban su distribución geográfica a lo largo del Istmo de Panamá. Donde se obtuvo la secuenciación de 32 muestras que denotaban que para las hormigas de este género se cultivaba la cepa del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, y que ellas se distribuyen dentro de un solo cladograma.

En el caso de la especie de *Acromyrmex coronatus*, se demostró que la ubicación geográfica sí está correlacionada con el patrón filogenético obtenido. Ya que, las hormigas colectadas para Chiriquí estaban más estrechamente relacionadas que con las otras cepas del hongo simbiote cultivados por las demás especies de *Acromyrmex* estudiadas en esta investigación. No obstante, el estudio y los análisis realizados en este proyecto no dan una clara distribución del genotipo del hongo cultivar, sin embargo, nos otorga un patrón filogenético que nos permite entender la distribución de los genotipos de las cepas de este hongo simbiote. Se necesita realizar estudios en los locis de los genes para poder establecer una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de estos hongos y sus respectivas colonias de hormigas.

La utilización de dos o más juegos de cebadores diferentes a los utilizados dentro de esta investigación podría ayudar a alcanzar una mayor resolución o profundidad para la determinación de la diversidad filogenética de este hongo simbiote y las hormigas de este género. No obstante, los datos obtenidos sirven de referencia para la continuidad de estudios similares, en donde se tomen en cuenta un mayor número de individuos por especie, la distancia geográfica dentro de los puntos de colecta, además de los nichos en donde se colecten los nidos y la consideración de la inclusión de otras especies no contempladas en estudio, como los *Acromyrmex volcanus* y *Acromyrmex insinuator*.

Finalmente, en este estudio se destaca la importancia de entender la relación que mantienen las cortadoras de hojas con su hongo cultivar, y cómo esta simbiosis se puede ver afectada por las diferentes variables como lo son su distribución geográfica y las condiciones climáticas que pueden tener. Es primordial reconocer que las hormigas cortadoras de hojas del género

Acromyrmex, al igual que de *Atta*, se representan como las principales defoliadoras dentro de América, moldeando los bosques tropicales, generando así miles de kilogramos de detritos a los suelos de las selvas. Por lo tanto, la comprensión entre los individuos involucrados (hormiga-hongo) en esta relación e incluso el resto del sistema cuadripartita, podría darnos luces sobre la relación mutualista que comprenden las hormigas cortadoras de hojas para poder dejar de ser consideradas como una importuna plaga para la agricultura y así poder desarrollar estrategias, productos y biocontroles amigables a los suelos y a los entornos en donde se puedan encontrarse.

VIII. RECOMENDACIONES

- Es necesario ampliar el número de nidos colectados con el fin de poder confirmar si el patrón encontrado de diversidad de cepas para el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* se conserva o sigue siendo consistentes con los resultados ya obtenidos dentro de esta investigación.
- La creación de un cepario, que permita la conservación del ADN de los hongos extraídos con el fin de poder ser utilizados posteriormente, para estudios de investigación o para la docencia. Esto ayudaría a tener una base de datos de este hongo, ya que su aislamiento y extracción satisfactoria de ADN es muy complicado debido a la naturaleza de este.
- Es necesario la utilización de otros juegos de cebadores para la amplificación de sitios de unión diferentes a la región ribosomal ITS1, 5.8S, ITS2, así se podría confirmar el patrón de distribución ya obtenido por esta investigación.
- Recomendamos la inclusión de otras especies de *Acromyrmex* para una mayor magnitud de alcance y comparación de la distribución de su hongo simbiote.
- Conviene el estudio descriptivo y molecular de las hormigas *Acromyrmex* sp. provenientes de esta investigación, ya que esto podría ayudarnos a discernir entre las especies que estamos tratando.
- Se recomienda la siembra de los fragmentos del jardín fúngico antes de los siete días de haber colectado la colonia, ya que posterior a este tiempo, el aislamiento se dificulta debido al aumento de microorganismos contaminantes propios de la colonia y al declive que tienen las obreras con la limpieza de la misma.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. (1998). *Plant Pathology*. San Diego, , CA: Academic.
2. Aylward, F. O., Burnum-Johnson, K. E., Tringe , S. G., Teiling, C., Tremmel, D. M., Moeller, J. A., . . . Currie, C. C. (2013). Leucoagaricus gongylophorus Produces Diverse Enzymes for the degradation of Recalcitrant Plant Polymers in Leaf-cutter Ant Fungus Gardens. *American Society for Microbiology*, 3770-3778.
3. Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., & Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99-108.
4. Bich, G. A., Castrillo, M. L., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2016). Isolation of the symbiotic fungus of Acromyrmex pubescens and phylogeny of Leucoagaricus gongylophorus from leaf-cutting ants. *Saudi Journal of Biological Sciences* .
5. Biedermann, P. H., & Vega, F. E. (2020). Ecology and Evolution of Insect-Fungus Mutualisms. *Annu. Rev. Entomol.*, 65: 21.1-22.25.
6. Bollazzi, M., Römer, D., & Roces, F. (2021). Carbon dioxide levels and ventilation in Acromyrmex nests: significance and evolution of architectural innovations in leaf-cutting ants. *Royal Society Open Science*.
7. Boucher, D. (1985). *The Biology of Mutualism: Ecology and Evolution*. New York: Oxford Univ. Press.
8. Briand, F., & Yodzis, P. (1982). The phylogenetic distribution of obligate mutualism, evidence of limiting similarity and global instability. *Oikos*, 273-275.
9. Bronstein, J. L. (2015). *Mutualism*. Great Britain: Oxford University Press.
10. Chapela, I. H., Rehner, S. A., Schultz, T. R., & Mueller, U. G. (1994). Evolutionary History of the Symbiosis Between Fungus-Growing Ants and their Fungi. *Science*.
11. Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., . . . Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and Molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 767-775.
12. Currie, C. R. (2001). A Community of Ants, Fungi, and Bacteria: A Multilateral Approach to Studying Symbiosis . *Annu. Rev. Microbiol.* , 357-380.
13. Currie, C. R., Mueller, U. G., & Malloch, D. (1999). The Agricultural Pathology of Ant Fungus Gardens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 96. pp 7998-8002.
14. de Bary, H. (1879). Die Erscheinung der Symbiose (Karl J. Trubner, Strasburg, 1879).

15. Diamond, J. (1998). Ants, crops and history. *Science* , 1974-1975.
16. Doyle , J., & Doyle , J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue . *Focus*, 13-15.
17. Fernández, F., Castro-Huertas, V., & Serna, F. (2015). *Acromyrmex coronatus*. En F. Fernández, V. Castro-Huertas, & F. Serna, *Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: Acromyrmex & Atta (Hymenoptera: Formicidae)* (págs. 51-54). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
18. Fernández-Marín , H., Zimmerman , J. K., & Wcislo, W. T. (2004). Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biological Journal of the Linnean Society* , 39-48.
19. Fernández-Marín, H., Zimmerman, J. K., Wcislo, W. T., & Rehner, S. A. (2005). Colony foundation, nest architecture and demography of a basal fungus-growing ant, *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Natural History*, 39:20, 1735-1743.
20. Gómez, E. (2014). [Tesis de licenciatura no publicada]. *Diversidad Genética de los Hongos Simbiontes Cultivados por 5 Especies Simpátricas de Hormigas Attini del Género Trachymyrmex en Panamá* . Panamá , Panamá , Panamá : Universidad de Panamá.
21. Gonçalves , C. R. (1961). O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia Ent.*, vol.4.
22. Holland , J. N., & Bronstein, J. L. (2008). Mutualism. *Elsevier*.
23. Hölldobler , B., & Wilson, E. O. (1990). *The Ants* . Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
24. Kooij, P. W., Aanen, D. K., Schiott, M., & Boomsma, J. J. (2015). Evolutionarily advanced ant farmers rear polyploid fungal crops. *J. EVOL. BIOL.*, 1911-1924.
25. Lugo, M. A., Crespo, E. M., Cafaro, M., & Jofré, L. (2013). Hongos Asociados con Dos Poblaciones de *Acromyrmex lobicornis* (Formicidae) de San Luis, Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 5-15.
26. Mehdiabadi, N. J., & Schultz, T. R. (2009). Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, 37-55.
27. Mikheyev, A. S., Mueller, U. G., & Abbot, P. (2006). Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. *PNAS*.

28. Mueller, U. G. (2002). Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant-cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attine Ant-Fungus Symbiosis. *The American Naturalist*, s67-s98.
29. Mueller, U. G., Ishak, H. d., Bruschi, S. M., Smith, C. C., Herman, J. J., Solomon, S. E., . . . Bacci Jr., M. (2017). Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. *Molecular Ecology*, 6921-6937.
30. Mueller, U. G., Rehner, S. A., & Schultz, T. R. (1998). The Evolution of Agriculture in Ants. *Science*.
31. Piepenbring, M. (2015). Basidiomycota . En M. Piepenbring, *Introducción a la Micología en los Trópicos* (págs. 25-136). St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society .
32. Poulsen, M., & Boomsma, J. J. (2005). Mutualistic Fungi Control Crop Diversity in Fungus-growing Ants. *SCIENCE*.
33. Quinlan, R. J., & Cherrett, J. M. (1979). The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, 151-160.
34. Relman, D. (2008). 'Til death do us part': coming to terms with symbiotic relationships . *Nature*, 721-724.
35. Schultz, T. D., Mueller, U. G., Currie, C. R., & Rehner, S. A. (2005). A comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. (F. E. Vega, & M. Blackwell, Edits.) *Oxford University Press*.
36. Schultz, T. R. (1999). Ant, plants and antibiotics. *Nature*, 747-748.
37. Schultz, T. R. (2020). Fungus-Farming Ants (Attini in Part). *Encyclopedia of Social Insects* .
38. Schultz, T., & Brady, S. (2008). Major Evolutionary Transitions in Ant Agriculture. *PNAS*, 5435-5440.
39. Sosa-Calvo, J., Jesovnik, A., Okonski, E., & Schultz, T. (2015). Locating, collecting, and maintaining colonies of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology*, 300-320.
40. Sumner, S., Aanen, D. K., Delabie, J., & Boomsma, J. J. (2004). The Evolution of Social Parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emery's rule . *Insect Soc.*
41. Vandermeer, J. H., & Boucher, D. H. (1978). Varieties of mutualistic interaction in population models . *J. Theor. Biol.* , 549-558.
42. Verza, S. S., Forti, L. C., Lopes, J. S., & Hughes, W. O. (2007). Nest Architecture of the leaf-cutting ant *Acromyrmex rugosus* . *Insect. Soc.* , 303-309.

43. Viguera, G., Paredes-Hernández, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernández, R., & Le Borgne, S. (2017). Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf-cutting ant *Atta mexicana*, on cellulose and lignocellulose biomass. *Letters in Applied Microbiology*.
44. Weber, N. (1972). Gardening Ants: The Attines. *Am. Philos. Soc.*
45. Weber, N. (1941). The Biology of the fungus-growing ants. Part VII. The Barro Colorado Island, Canal Zone, species. *Rev. de Entomología*, 93-130.
46. Weber, N. A. (1966). Fungus-Growing Ants: A symbiotic relationship exists between an insect and a plant, involving an effective culturing technique. *Science*.
47. Weber, N. A. (1969). A comparative Study of the Nests, Gardens and Fungi of the Fungus-growing Ants, Attini. *Proceedings of the VI Congress of the International Union for the Study of Social Insects* (págs. 299-307). Bern, Switzerland: Organizing Committee of the VI Congress IUSI.
48. Wetterer, J. K. (1995). Forager size and ecology of *Acromyrmex coronatus* and other leaf-cutting ants in Costa Rica. *Oecologia*, vol. 104, p. 409-415.
49. Wetterer, J. K., Gruner, D. S., & Lopez, J. E. (1998). Foraging and Nesting Ecology of *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rican Tropical Dry Forest. *Florida Entomological Society*, 61-67.
50. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. Innis, H. Gelfand, J. Sninsky, & T. J. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (págs. 315-322). New York: Academic Press Inc. .