



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



“DIVERSIDAD DEL HONGO *Escovopsis* EN CUATRO ESPECIES DE  
HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS DEL GÉNERO *Acromyrmex* Y PRIMER  
REGISTRO DEL GÉNERO *Escovopsioides* EN PANAMÁ”

Vega Gibbs, Eyleen Melissa

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

2022

## Dedicatoria

*A todas aquellas personas que estuvieron en los buenos y malos momentos, aquellos que no dejaron de creer que podía lograrlo, fueron mi apoyo en cada momento. Gracias.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Una vez leí que a veces hace falta caer porque el mundo se ve diferente desde el suelo. Y cuando estás ahí supongo que, si quieres moverte, solo te queda la opción de levantarte. Decido comenzar mis agradecimientos con esta frase ya que el camino no ha sido sencillo, muchos buenos momentos y otros no tan buenos, en los que me preguntaba “¿debería seguir?”, y heme aquí en la parte final de este largo camino.

Me gustaría comenzar agradeciéndole a mis abuelos, Leonor Bernal y Leovaldo Camarena, que me han apoyado desde el día cero, motivándome cada día para que siguiera adelante, en definitiva, han sido muy importantes.

A mi hermana, mi fuente de motivación más grande, Marialejandra, gracias por estar siempre para mí en cada momento, este logro también es tuyo.

A mi tía Shindy, tío Franklin, Frank y Lula, familia, gracias por siempre estar para mí, por todas sus palabras de aliento, por recibirme en su casa siempre de la mejor manera, gracias por su apoyo incondicional en esta y muchas etapas de mi vida, gracias por haber estado para mi cada que lo necesite.

A mi tía/madrina Ivonne y Mercedes, por creer en que podía lograrlo, siempre estuvieron allí apoyándome, gracias.

A mi mejor amiga, Diana de la Cruz, mi apoyo incondicional, gracias por aguantar mis quejas, lloraderas, risas, enojos, siempre con las palabras correctas cuando lo necesite, tu más que nadie has estado en este camino, conoces mis nuestras luchas

y pequeñas victorias, gracias por siempre estar, espero haber estado para ti cada que lo has necesitado y más espero seguir estando.

A mi amiga, Katherine Frías, has sido parte de este largo camino, siempre con un “amiga tú puedes”, gracias por todos esos textos dándome aliento y motivándome a que siguiera adelante, eres una gran amiga y gran ser humano.

Para Ana Martínez que fue de muchísima ayuda en las colectas de los nidos de hormigas, por lo consejos y tips a la hora de cada colecta, por la ayuda brindada durante este tiempo en el laboratorio, ha sido un placer trabajar contigo, espero que sigamos en el mismo team en futuros proyectos.

Al Dr. Hermógenes Fernández -Marín por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, y con mucha paciencia enseñarme este fascinante tema, gracias por dedicar parte de su tiempo en compartir sus conocimientos y experiencias conmigo, gracias por motivarme en cada conversación y no dudar de mis capacidades de seguir desarrollando ideas.

A la Dra Yuliana Christopher que desde el día uno no dudo en compartir todo su conocimiento y experiencia, gracias por la paciencia y los jalones de oreja, por creer en mi potencial, por enseñarme de forma correcta el arte de la investigación, gracias por compartir sus conocimientos sobre *Escovopsis* conmigo.

A mi amiga y compañera Mellany Ramos por aguantarme estos 5 años de carrera, donde hubo muchas risas y experiencias que hasta el día de hoy todavía recordamos, estas historias que perduraran en nosotras siempre. Te convertiste en

una persona importante en mi vida, alguien con la que puedo contar, gracias por demostrarme que los amigos verdaderos existen.

A INDICASAT AIP por permitirme el uso de sus instalaciones durante los meses correspondiente y dentro de la institución también agradecer a aquellas personas que me ayudaron sin pensarlo; Masiel por las explicaciones con el uso de los equipos y compartir conmigo algunos de sus conocimientos sobre la micología, a Alejandro Almanza por siempre estar pendiente de que las cosas estuvieran de la mejor manera en mi área de trabajo, al Dr Luis Mejía por permitir el uso de su cámara de electroforesis.

Aunque no lo leerán no puedo dejar de agradecerle a mis mascotas, mis gatitos, sosteniendo mi salud emocional muchísimas veces, en definitiva, la mejor decisión que he tomado en mi vida fue adoptarlos, los amo.

Y, por último, pero no menos importante a la profesora Ariadna Bethancourt desde mi primera clase con ud en microbiología me contagio su amor por los hongos, la manera en que imparte su clase, esa vocación que tiene hace que cada alumno sienta y quiera seguir aprendiendo sobre este maravilloso reino. A las profesoras Brenda de Mayorga y Rita Bethancourt gracias por aceptar ser mis asesoras, por tomarse su tiempo en revisar cada uno de mis avances.

Para mí no es solo un agradecimiento ya que todas las personas mencionadas anteriormente han estado en este largo camino lleno de obstáculos, de altas y bajas y siempre estuvieron ahí.

# ÍNDICE

I.	RESUMEN .....	8
II.	INTRODUCCIÓN .....	9
III.	OBJETIVOS .....	13
IV.	HIPÓTESIS .....	14
V.	MARCO TEÓRICO .....	15
A.	HISTORIA EVOLUTIVA DE LAS ATTINI .....	15
B.	HORMIGAS ATTINES .....	16
C.	AGRICULTURA DE LAS ATTINI .....	18
D.	HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS .....	19
E.	MICOPARÁSITO DE LAS HORMIGAS QUE CULTIVAN HONGO <i>Escovopsis</i> .....	21
F.	<i>Escovopsis</i> EN EL JARDIN DE LAS HORMIGAS CULTIVADORAS DE HONGOS .....	22
G.	<i>Escovopsioides</i> .....	23
H.	ESPECIES DESCRITAS DEL GÉNERO <i>Escovopsis</i> .....	25
VI.	MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	29
A.	Colecta de colonias .....	29
B.	Sitios de colecta .....	29
C.	Mantenimiento de las colonias en el laboratorio .....	30
D.	Aislamiento de <i>Escovopsis</i> .....	30
E.	IDENTIFICACION MOLECULAR DE <i>ESCOVOPSIS</i> .....	31
1.	Extracción de ADN .....	31
2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de <i>Escovopsis</i> .....	32
3.	Electroforesis en gel de agarosa .....	33
4.	Purificación de ADN (QIAGEN) .....	33
5.	Secuenciación .....	33
F.	Fotografías macroscópicas y microscópicas .....	34
VII.	RESULTADOS .....	35
A.	Colecta de colonias .....	35
B.	Aislamiento de <i>Escovopsis</i> .....	35
C.	Identificación molecular .....	37
-	Amplificación de ADN .....	37

-	SECUENCIACIÓN .....	39
-	Filogenia .....	41
VIII.	DISCUSIÓN.....	43
a.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	43
b.	<b>DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Escovopsis</i> Y <i>Escovopsioides</i></b> .....	45
c.	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA .....	47
IX.	CONCLUSIÓN .....	50
X.	RECOMENDACIONES .....	51
XI.	REFERENCIAS .....	53

## I. RESUMEN

*Escovopsis* es un hongo anamórfico del filo Ascomycota, y es un micoparásito obligatorio de los hongos Basidiomycetes que son la única fuente de alimento para las crías de las hormigas attines. El género *Escovopsis* fue erigido por Muchovej y Della Lucia en 1990 para reemplazar *Phialocladus* por Kreisel (1972) y la especie tipo fue nombrada *Escovopsis weberi*. La identificación de *Escovopsis* se basó principalmente en la forma y disposición del conidióforo, y también la forma y tamaño de los conidios. Existen hasta el momento dentro del género *Escovopsis* cerca de catorce especies descritas, pero solo se han reportado dos especies: *E. weberi* y *E. aspergilloides* de colonias recolectadas en Panamá. El objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente las especies de hongos del género *Escovopsis* que parasitan las hormigas del género *Acromyrmex* (*A. echinator*, *A. octospinosus*, *A. coronatus* y *Acromyrmex* sp.) en Panamá. A partir de 10 colonias por especie de hormigas cortadoras de hojas (*Acromyrmex*) se aislaron cepas de *Escovopsis*. Se identificaron morfológicamente y posteriormente se realizó la extracción de ADN. Se amplificó la región ITS1- 5,8S-ITS2 del ADN. En el cual se registró el aislamiento e identificación de *Escovopsis weberi*, *Escovopsis microspora*, *Escovopsis moelleri* y *Escovopsioides nivea*.



## II. INTRODUCCIÓN

Las hormigas de la tribu Attini (Formicidae: Myrmicinae) practican un estilo de vida agrícola basada en una relación simbiótica con hongos en sus nidos. Las hormigas recolectan y procesan material vegetativo para alimentar su hongo simbiótico, el cual se constituye en su principal fuente de alimento. Las hormigas attines han cultivado hongos durante al menos 50 millones de años (Wilson, EO (1971)). La historia evolutiva de este mutualismo obligatorio ha resultado en asociaciones complejas entre las hormigas, sus hongos simbiosomas basidiomicetes y una diversa comunidad microbiana simbiótica (Schultz, TR y Meier, RA (1995)). Otro miembro de este sistema son las bacterias filamentosas Actinomycetes (Pseudonocardiaaceae) que las hormigas cultivan y crecen en estructuras cuticulares especializadas en su exoesqueleto hormigas attine (Currie et al., 1999, 2003a, b, 2006; Little et al., 2006; Mueller et al., 2008; Mattoso, Moreira y Samuels, 2012). Los hongos cultivados por las hormigas son atacados por hongos patógenos del género *Escovopsis* (Ascomycota: Pezizomycotina) (Muchovej y Della Lucia, 1990) y solo se ha encontrado asociado con las colonias de hormigas cultivadoras de hongos, lo que sugiere que el género ha evolucionado en asociación con las hormigas y sus hongos durante al menos 50 millones de años (Currie, 1999).

Las hormigas cultivadoras de hongos se distribuyen exclusivamente en el continente americano (Mayhé-Nunes AJ, Jaffé K.1998). Estos insectos cultivan hongos basidiomicetes en las familias (Lepiotaceae, y Tricholomataceae) como principal fuente de alimento para sus crías (Weber NA.1972) y las hormigas presentan distintos tipos de *fungicultura*. Estas hormigas han desarrollado cinco

tipos de agricultura de hongos distintos, caracterizados por un patrón de fidelidad con el simbionte (Chapela et al., 1994). Los cinco grupos agrícolas incluyen 1) cultivo de hongos inferior, 2) cultivo de hongos de coral, 3) forma de crecimiento de levadura 4) cultivo de hongos superior y 5) cultivo de hongos por cortadoras de hojas (Schultz y Brady, 2008). Como subgrupo dentro de las attines superiores, las hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* utilizan hojas y flores frescas como sustrato para nutrir el hongo simbionte.

*Escovopsis* es un hongo anamórfico del filo Ascomycota y es un micoparásito obligatorio del grupo de Basidiomycetes que las hormigas cultivan. El género *Escovopsis* fue erigido por Muchovej y Della Lucia en 1990 para reemplazar *Phialocladus* Kreisel (1972) y la especie tipo fue nombrada *Escovopsis weberi*.

El hongo *Escovopsis* crece dentro del jardín de hormigas y es más abundante en las porciones del fondo (más viejo) de los jardines fúngicos (Currie CR. 2001). La forma en que *Escovopsis* se dispersa de colonias infectadas a no infectadas no está clara, pero se han descartado algunos métodos de dispersión, incluidos los siguientes: *Escovopsis* produce esporas húmedas y, por lo tanto, no se dispersa en el aire; *Escovopsis* no está presente en el material de jardín llevado en el bolsillo infrabucal de las reinas fundadoras durante sus vuelos nupciales, tampoco está presente en los recién establecidos jardines de colonias incipientes (Currie CR, Mueller UG, Malloch D.1999). Se ha propuesto que *Escovopsis* es vectorizado entre colonias, quizás por una (o varias) de las muchas especies de invertebrados que viven en estrecha asociación con las hormigas cultivadoras de hongos. Sin embargo, no hay evidencia directa de esta propuesta.

Varios hallazgos indican que *Escovopsis* está especializado en los jardines de hongos de hormigas, incluido el jardín de hongos y las pilas de basura (Bot ANM, Currie CR, Hart AG, Boomsma JJ. 2001; Currie CR, Mueller UG, Malloch D.1999; Seifert KA, Samson RA, Chapela IH.1995). Además, *Escovopsis* es muy común en las colonias de hormigas attines, habiendo sido aislado de un rango de 33-75% de las más de 500 colonias muestreadas en Panamá (dependiendo de la especie de hormiga y la ubicación geográfica) (Currie CR, Mueller UG, Malloch D.1999; Christopher et al 2021). La virulencia de *Escovopsis* sugiere que está especializado en este hábitat, que la capacidad de infectar los jardines fúngicos requiere adaptaciones especializadas y aparentemente altamente evolucionadas para superar las defensas de las hormigas (Currie CR. 2001; Christopher et al 2021).

Las claves taxonómicas para las distintas especies del género *Escovopsis* se basan principalmente en la forma y disposición de los conidióforos, así como en la forma y tamaño de los conidios (Augustin et al., 2013; Masiulionis et al., 2015). Existen catorce especies descritas en el género *Escovopsis*, y se han identificado al menos 5 especies en Panamá.

Las especies descritas incluyen: *E. weberi*, *E. aspergilloides*, *E. moelleri*, *E. trichodermoides*, *E. kreiselli*, *E. atlas*, *E. pseudoweberi*, *E. catenulata*, *E. longivesica*, *E. primorosea*, *E. microspora*, *E. lentecrescens*, *E. clavatus* y *E. multiformis* (Augustin et al., 2013; Masiulionis et al., 2015; Meirelles et al., 2015, Marfetán et al., 2018; Montoya et al., 2019). Si bien *Escovopsis* podría encontrarse en nidos de numerosas especies de hormigas de la tribu Attini, la mayoría de los reportes y registros de especies de este género se corresponden a nidos de hormigas

colectadas en Brasil. También, se han informado coinfecciones por *Escovopsis* en Panamá (Gerardo et al., 2006, Taerum et al., 2007; Taerum et al., 2010; Christopher et al., 2021) en hormigas basales y derivadas, pero siguen siendo escasos estos reportes.

Hace unos años se descubrieron hongos del género *Escovopsioides* (Ascomycota: Hypocreales) de jardines de hongos de las hormigas cortadoras de hojas (*Acromyrmex niger*, *Acromyrmex subterraneus molestans* y *Acromyrmex subterraneus subterraneus*) (Agustín et al., 2013); ahora muestreado en hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex echinatio* (evg, 2022). Además, este hongo se encontró en 24% a 72% de las colonias muestreadas en Brasil (Agustín et al., 2013; Pereira et al., 2016). *Escovopsioides* comparte algunas características morfológicas con *Escovopsis*, pero difieren en otras, como vesículas terminales con fiálides largas e hifas con aleuroconidios. Los análisis moleculares indican que *Escovopsioides* está relacionado filogenéticamente con *Escovopsis* (Agustín et al., 2013).

### III. OBJETIVOS

#### **Objetivo general**

- ❖ Identificar cepas del hongo *Escovopsis* aisladas de nidos de hormigas del género *Acromyrmex* en las siguientes especies: *A. echinator*, *A. octospinosus*, *Acromyrmex spp.* y *A. coronatus* en diferentes localidades de la República de Panamá.

#### **Objetivos específicos**

- ❖ Colectar nidos de las especies de *Acromyrmex* (*A. echinator*, *A. octospinosus*, *Acromyrmex spp.* y *A. coronatus*) para el aislamiento de cultivos puros del género *Escovopsis*.
- ❖ Caracterizar morfológica y molecularmente mediante secuenciación tipo Sanger los hongos *Escovopsis* que parasitan las especies de hormigas *Acromyrmex*.
- ❖ Revelar la relación filogenética entre la diversidad de *Escovopsis* con la diversidad de hormigas *Acromyrmex* en Panamá.
- ❖ Proporcionar registros de cepas del género *Escovopsis* en nidos de *Acromyrmex* de Panamá.

#### IV. HIPÓTESIS

Las especies de hormigas *Acromyrmex* de amplia distribución geográfica (*A. echinator*, *A. octospinosus*) serán vulnerables a ser parasitados por especies del hongo *Escovopsis* generalistas, mientras que las especies de hormigas *Acromyrmex* de distribución geográfica limitada (*A. coronatus*, *Acromyrmex* sp.) serán parasitados por especies del hongo *Escovopsis* más especializados.

## V. MARCO TEÓRICO

### A. HISTORIA EVOLUTIVA DE LAS ATTINI

Las hormigas cultivadoras de hongos solo se distribuyen en el Nuevo Mundo, lo que nos indica que el origen y la subsiguiente radiación en todo el neotrópico ocurrieron después de la separación de América del sur de África (Weber 1972). La capacidad de cultivar hongos tiene un solo origen en las hormigas (Weber 1966), evolucionando posiblemente de un ancestro que se cree que fue un recolector generalista (Mueller et al 1998).

Las hormigas productoras de hongos son sociales y forman colonias de individuos estrechamente relacionados. Las colonias de hormigas se han descrito como "superorganismos" (Holldobler & Wilson 1990), con obreras individuales que realizan tareas para el funcionamiento de la colonia como células en organismos superiores. En el entorno las hormigas proveen al hongo de alimento, protección contra patógenos y competidores, además de dispersión (Weber, 1972; Holldobler & Wilson 1990; Currie et al. 1999; Mueller 2002a; Mueller et al. 2005; Fernández et al. 2004; 2006).

Algunas hipótesis han sido propuestas para dilucidar el origen del mutualismo hormiga-hongo (Wheeler, 1910; Bailey, 1920; Weber, 1972; Mueller et al. 2001). Bailey en 1920 sugiere una hipótesis de transmisión, en la cual el hongo pudo haber atraído a las hormigas antes de ser domesticado por ellas, proporcionándoles nutrientes como recompensa para que las hormigas dispersaran sus esporas y/o micelio, colocando al hongo como el factor principal en el origen de este mutualismo hormiga-hongo (micocentrismo).

Por otro lado, Weber en 1972 propone el modelo tradicional más aceptado acerca del origen del mutualismo hormiga-hongo, el cual consta de tres etapas: consumo, cultivo y transmisión del hongo por las hormigas. En la etapa inicial (consumo), se hipotetiza que un hongo no especializado creció accidentalmente en las paredes de nidos de las hormigas, volviéndose parte de su dieta; subsecuentemente las hormigas desarrollaron la habilidad de promover el crecimiento del hongo utilizando sustratos (cultivos) y, finalmente desarrollaron un mecanismo para la transmisión del cultivo fúngico de nidos maternos a nidos hijos (Mueller et al. 2001; Mueller, 2002).

Sea cual sea su origen, la obligada relación entre las hormigas Attini y su cultivo fúngico surgió aproximadamente 60 millones de años atrás, en el Neotrópico. En la actualidad contamos con alrededor de 250 especies descritas y muchas otras por describir, todas exclusivamente de la región tropical del continente americano. Cada una de ellas hasta donde se conoce, practica uno de los cinco tipos de sistemas de agricultura (Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998; Mueller et al. 2001; Schultz & Brady 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2010).

#### B. HORMIGAS ATTINES

A pesar de la diversidad de sus sistemas agrícolas, todas las especies de hormigas attines comparten algunos hábitos generales asociados con el hongo del jardín. Antes de salir de su nido natal para aparearse y encontrar una nueva colonia, una reina hija attina almacena un núcleo de hongo del jardín materno en su bolsillo infrabucal, (Weber 1982; Mueller et al. 2001; Fernández et al. 2004), el cual es un dispositivo de filtración ubicado en la parte inferior de su boca. Una vez que pase el



apareamiento, la reina fundadora establece un lugar de anidación adecuado, donde expulsa el sedimento fúngico (Rissing & Pollock, 1988), el cual lo utilizan para iniciar su propio jardín (Huber, 1905). Los cultivares se propagan vegetativamente, es decir, como clones asexuales, de los de nidos de padres a hijos y dentro de los nidos (Weber, 1982; Mueller et al. 2002; Fernández – Marín et al. 2004). En todos los nidos de *Attini*, la reina fundadora cuida el jardín y cría a la primera generación y, en la mayoría de estos, la fundadora busca sustrato para el cultivo fúngico (nido semiclaustral) (Fernández -Marín et al. 2004).

A una obrera *Attini* le toma aproximadamente 25 a 60 días desarrollarse de huevo a adulto (Weber, 1972). Luego de haber pasado este tiempo, las primeras crías emergen como adultos, comienzan a buscar alimento, cuidar a las crías y realizar las tareas de excavación (Weber, 199972: Hölldobler & Wilson, 1990). Cuando ya tiene la fuerza suficiente de trabajo, la reina deja por completo todas sus funciones, excepto la tarea de poner huevos.

El cuidado de las crías es una de las tareas más importantes realizadas en el nido y es llevada a cabo por las obreras (Hölldobler & Wilson, 1990). Los huevos y las larvas de las hormigas cultivadoras de hongo están típicamente embebidos en el jardín fúngico, cubiertos de micelio (Weber, 1972; Schultz & Meier; 1995), lo que en algunas especies de *Attini* puede representar una protección contra enfermedades para las crías (Armitage et al. 2012).

La trofilaxis (mecanismo mediante los insectos sociales se alimentan uno a otros o transfieren feromonas) oral de líquidos entre las obreras *Myrmicinae* y sus larvas (Wilson, 1971; Holldobler & Wilson, 1990), es extremadamente rara en las *Attini*

(Weber, 1972; Murakami & Higashi, 1997), en las cuales las larvas se alimentan exclusivamente de hifas de hongo cultivado por sus hermanas (Weber, 1955; Murakami & Higashi, 1997).

#### C. AGRICULTURA DE LAS ATTINI

**Agricultura basal**, Análisis filogenéticos indican que este fue el primer sistema practicado por las hormigas attine y es el sistema del que surgieron las demás formas de agricultura (Schultz & Brady, 2008). Los agricultores inferiores incluyen *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, algunos *Apterostigma* (el grupo *A. auriculatum*), *Kalathomyrmex*, *Paramycetophylax*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, algunos *Cyphomyrmex* (*C. strigatus* y *C. wheeleri*, *Mycetosoritis* y *Mycetagroicus*). En cuanto a su distribución, tienen una amplia distribución geográfica que va desde EE. UU hasta el Sur de Argentina (Kempf, 1972; Weber, 1972; Fernández & Sendoya, 2004).

**Agricultura del hongo coral**, a diferencia de las demás hormigas que producen hongos que descomponen hojarasca las hormigas conocidas en el grupo *Apterostigma pilosum* cultivan hongos lejanamente relacionados que pertenecen a la especie de coral en forma de hilo; familia Pterulaceae (Munkacsi & al. 2004; Dentinger & al. 2009). El género *Apterostigma* se dividen en dos clados, uno el que contiene todas las especies del grupo *A. pilosum* que cultivan hongos coralinos, y otro en las que están las especies del grupo *A. auriculatum* que cultivan Leucocoprineae (Villesen & al. 2004).

**Agricultura de levaduras**, a diferencia de los jardines de micelio attine, los jardines de levadura consisten en pequeños nódulos de forma irregular compuesto por

cultivares de hongo que crece en fase de levadura unicelular. Se desconoce la presencia de *Escovopsis* en la agricultura de levadura. Este grupo solo se limita a *Cyphomyrmex rimosus*.

**Agricultura superior generalizada**, los géneros *Trachymyrmex* y *Sericomyrmex* incluyen 63 especies conocidas que forman un grado parafilético y practican un sistema agrícola distinto a los géneros de las hormigas cortadoras de hojas. La filogenia de estas hormigas indica que este grado parafilético consiste en una sucesión de tres clados. En cuanto a su distribución geográfica el clado *Sericomyrmex* va desde EE. UU hasta Argentina y, en el caso de *Trachymyrmex jamaicensis*, hasta el caribe. En *Trachymyrmex intermedius* se sabe que se encuentran en bosques y sabanas desde América central hasta el norte de América del Sur (KEMPF, 1972; Weber, 1972; Mayhé-Nuñez & Brandao, 2007; Rabeling & al. 2007a).

**Agricultura de las cortadoras de hojas**, teniendo una biología distintiva, derivada de la agricultura superior se conocen como hormigas cortadoras de hojas, en las que se encuentran dos géneros de hormigas cortadoras *Acromyrmex* y *Atta*, las cuales cultivan su propio hongo cultivar. Erigido en 1916 un tercer género taxonómico en este grupo, *Pseudoatta*, el cual es derivado de *Acromyrmex* (Schultz & Brady, 2008). Las hormigas cortadoras *Acromyrmex* y *Atta* cuentan con una amplia distribución geográfica, desde el sur de EE. UU hasta América Central y del Sur y Cuba (Fernández & Sendoya, 2004).

D. HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS  
*Acromyrmex* (generalidades)

Dentro de esta investigación estudiamos cuatro especies del género *Acromyrmex*:

*Acromyrmex echinator*: *A. echinator* fue descrita como variedad de *Acromyrmex octospinosus* por Forel en 1900, luego fue elevada a subespecie por Wheeler en 1937 y por último elevada a especie por Schultz et al. en 1998, quienes además describen parasitismo incipiente sobre esta especie por parte de *Acromyrmex insinator*. En 1997, Bot y Boomsma encontraron evidencia significativa entre el ancho del pronoto de *Ac. echinator* como especie, inferior al ancho del pronoto en *Ac. octospinosus*. Schultz et al. en 1998 incluyen también características químicas y morfológicas para separar estas dos especies.

*Acromyrmex octospinosus*: La reina de esta especie posee la espina pronotal inferior corta, ancha y de punta roma. Así mismo, el primer opistotergo posee un par de tubérculos prominentes, uno a cada lado y hacía unos 2/3 del segmento. Estos rasgos son primordiales para separarlo de los demás géneros.

*Acromyrmex coronatus*: sus características generales de la casta reina de Myrmicinae y cabeza, escultura y pilosidad como la obrera mayor, excepto por la presencia de tres ocelos bien definidos. Espinas pronotales laterales e inferiores presentes, ambas rectas y agudas, a pronotal lateral un poco más larga que el diámetro máximo del ojo, la pronotal inferior un poco más corta que el diámetro del ojo. Espinas propodeales conspicuas, claramente curvadas hacia abajo. Base del cuerpo castaño claro con numerosas manchas negras sobre el cuerpo; las del escudo son tres bandas, una media anterior, dos laterales posteriores, las del opistogáster tienden a formas bandas transversas.

Goncalves en 1961 menciona que existe variación en color y tamaño de las espinas propodeales medias en ejemplares de Brasil; aunque Goncalves sinonímica algunos nombres subespecíficos con *coronatus*, todavía persisten cinco subespecies, una de los cuales, *A. coronatus panamensis* (Forel), se conoce de Costa Rica, Panamá y Perú.

*Acromyrmex* sp.

Especies no descrita.

E. MICOPARÁSITO DE LAS HORMIGAS QUE CULTIVAN HONGO *Escovopsis*  
Moller (1893) fue el primero en observar hongos que luego serian descritos en el género *Escovopsis*, este realizo dibujos de los micros caracteres morfológicos de varias especies de este género. Este género fue descrito por primera vez como *Phialocladus* por Kreisel (1972), quien aisló una cepa de un nido de *Atta insulares* en Cuba. Más tarde Muchovej & Della Lucia (1990) determinaron que el nombre *Phialocladus* era invalido y cambiaron el nombre del género *Escovopsis*, llamando a la especie *E. weberi* en honor a Neil Weber.

La historia de *Escovopsis* aún le falta mucho por conocerse; como se ha señalado, este hongo solo se ha aislado de los jardines de hormigas cultivadoras de hongos y de sus pilas de basura. Este hongo solo crece dentro del jardín de hongo y aparentemente no produce esporas dentro del jardín a menos que este haya sido abrumado (Currie, 2001). Dentro de los jardines de las cortadoras de hojas *Atta colombica*, este es más abundante en la parte más antigua de los jardines (Currie, 2001).

*Escovopsis* esporula fácilmente en las pilas de basura, tanto en el laboratorio como en el campo. Su forma de dispersión aun es desconocida para nosotros, se desconoce cómo llega de colonias infectadas a colonias no infectadas, sin embargo, se puede descartar algunos métodos de dispersión. *Escovopsis* produce esporas húmedas, por lo tanto, no se dispersa por el aire. Además, Currie, CR et. al 2001 observo que *Escovopsis* no se encuentra presente en el material de jardín llevado en el bolsillo infrabucal de las reinas fundadoras durante sus vuelos nupciales, ni está presente en los jardines recién establecidos de colonias incipientes (Currie et al., 1999). Sin embargo, se demostró que no se transmite de forma vertical (es decir, de colonias de padres a descendientes), ya que se encontró en más del 50% de las colonias de 1 a 2 años de la misma población.

Varios estudios nos indican que *Escovopsis* es especialista en jardines de hormigas que cultivan hongo, Además de ser un hongo no mutualista común, *Escovopsis* se ha aislado solo de hábitats asociados con hormigas productoras de hongos, incluidos así el jardín de hongo y las pilas de basura (Currie, 2001; Seifert, 1995). Se ha demostrado que *Escovopsis* es común en las colonias de attines, en el estudio realizado por Currie (2001) en Panamá donde se aisló de un rango de 33 a 75% de más de 200 colonias muestreadas.

F. *Escovopsis* EN EL JARDIN DE LAS HORMIGAS CULTIVADORAS DE HONGOS  
*Escovopsis* puede tener un impacto drástico en la salud y supervivencia de los jardines de hormigas que cultivan hongos. *Escovopsis* puede crecer rápidamente en los jardines si las hormigas están ausentes (Currie et al., 1999). Sin embargo, es

importante señalar que, bajo algunas condiciones, incluso en presencia de las hormigas, puede devastar completamente las colonias al invadir todo el jardín.

Como se ha señalado, *Escovopsis* puede formar una infección persistente (Currie et al., 1999), y su presencia resulta en una reducción significativa en la tasa de crecimiento de la colonia infectada en términos de biomasa tanto del hongo como de las hormigas (Currie et al., 2001). Se requiere una gran biomasa de jardín cultivar para apoyar la producción de alados reproductivos (tanto reinas vírgenes como machos), una reducción en el crecimiento del cultivar podría tener un impacto en la aptitud de las colonias infectadas al causar un retraso en alcanzar el tamaño para reproducirse. De hecho, algunas colonias infectadas por *Escovopsis* experimentan una pérdida neta de biomasa con el tiempo, lo que sugiere que este patógeno puede impedir que algunas colonias alcancen el tamaño de colonia suficiente para producir nuevos reproductores (Currie et al., 2001). Si una colonia no puede eliminar a *Escovopsis*, la infección puede conducir a la pérdida gradual de toda la biomasa del jardín de la colonia, lo que eventualmente resultara en la muerte de la colonia o también este hecho puede obligar a los trabajadores a intentar obtener nuevos cultivares de colonias vecinas. Por lo tanto, la devastación de los jardines de hongo por *Escovopsis* puede resultar en la transferencia lateral de cultivares entre colonias (Adams et al., 2001; Mueller et al., 1998).

#### *G. Escovopsioides* Descripción

Agustín et al., 2013 describieron *Escovopsioides nivea* en donde nos indican que a utilizar medios como PCA y OA obtuvieron un crecimiento rápido, de 6-7 cm de diámetro en 7 días a 25°C, con micelio aéreo blanco, como algodón, con producción de cadenas de clamidosporas que se unen en cuerdas o hebras plateadas blancas como la nieve. Mientras que, en PDA (Agar Papa Dextrosa y MA (Agar Malta), con diámetro de 3.5-4 cm después de 14 días.

Chamydospores sensu lato hialina, lisa y de paredes delgadas globosas, de 15-18 um de diámetro, producida lateralmente a partir de hifas hinchadas en cadenas o racimos monilioides. Aleuriconidia producida como hinchazón lateral de las paredes del micelio aéreo, abundante; sub-hialino, esférico, 3-4um, de paredes lisas y gruesas. Conidióforos que surgen del micelio aéreo: hialinos, de paredes lisas, multiseptados, cilíndricos, de 40-70um de longitud, 5um de diámetro en la base que se estrechan hacia el ápice antes de hincharse en una vesícula globosa 8-10um de diámetro, a menudo proliferando terminalmente para producir varias vesículas intercalares en sucesión. Fiálides se forman en pequeños grupos en vesículas, pero también individualmente hinchadas lateralmente discretas; septados en la base, a veces proliferando terminal y lateralmente, puede variar su forma y tamaño: lageniforme, disminuyendo gradualmente a un cuello romo o largo y delgado; ocasionalmente anfuliforme con un cuello corto. Conidios en cadenas largas y persistentes; hialinas, de paredes lisas y delgadas, limónea a clavada, terminando abruptamente en o disminuyendo a una base truncada.

El primer micólogo en observar este hongo fue Moeller en 1893 y su monografía presenta dibujos precisos de este nuevo género, incluyendo tres tipos de esporas.



Inicialmente, el paratipo se distinguió como un morfotipo separado ya que producía solo aleurioconidia y chlamydospores s. l. Posteriormente, se encontró que la esporogénesis era un carácter altamente variable, ya que las fiálides y los conidios se desarrollaron intermitentemente en subculturas. La especie tipo de este nuevo género tiene relativamente pocas características morfológicas en común con las especies de *Escovopsis*, aparte de producir fiálides en vesículas. La forma de la fialida y la morfología conidial, especialmente las cadenas largas, comparten más similitudes con las especies del género *Paecilomyces*, en particular, *P. variotii* Bain. Sin embargo, la combinación de fialidas lageniformes en vesículas terminales e intercalares hace que *Escovopsioides nivea* sea único. De hecho, la especie se puede identificar fácilmente en ilustraciones proporcionadas en una disertación sobre los hongos asociados con nidos de hormigas cortadoras de hojas en Brasil (Rodrigues, 2004), donde figura como *Moniliella suaveolens* (Lindner ex Lindner) Arx. Nos referimos a las esporas hinchadas producidas en las cadenas monilioides como chlamydospores s. l., porque estas no son células de paredes gruesas producidas endógenamente (Kirk et al., 2008), y su función es oscura. Kreisel (1972) se refiere a estructuras similares encontradas en su aislado de *Escovopsis* (*Phialocladus*) de Cuba, como "makroconidien", que no se encontraron en el supuesto tipo "coespecífico" de Brasil (Muchovej & Della, 1990).

#### H. ESPECIES DESCRITAS DEL GÉNERO *Escovopsis*

##### 1. *Escovopsis weberi*

*Escovopsis weberi* produce vesículas de forma cilíndrica similares a las de *E. moelleri*, que son más cilíndricas, de forma menos variable y más largas (43–58×11–14 µm) que *E. moelleri*, aunque cabe señalar que las descripciones e ilustraciones posteriores también incluyen vesículas claramente claviformes, con fiálidas más pequeñas, normalmente globosas (3,0–4,5 µm de diámetro, en la base). Sin embargo, las especies se separan más fácilmente según el tamaño de los conidios. En cultivo, el crecimiento de *E. weberi* se describió como lento, pero sin datos cuantitativos; por el contrario, Seifert et al. reportaron un rápido crecimiento de esta especie, cubriendo una placa de 9 cm de diámetro en 5 días a 25°C en la mayoría de los medios.

## 2. *Escovopsis aspergilloides*

Presenta micelio aéreo, blanquecino, pálido. Las masas conidiales son de color miel, en el resto son de color amarillo pálido. El Conidióforo surge de estolones aéreos, un tallo de 10-50 m de largo o más ausente, (conidiophora polycephala registra hasta 1350 Portata de ~m de largo), 6.5-8 ~m de ancho, hialina, ligera, cubierta finamente varias tabicadas. Las cabezas suelen tener entre 50 y 75 µm de diámetro, completamente cubierto con cadenas radiales de conidios. Conidios hasta diez encadenados, elipsoidales, a veces ligeramente en ambos lados truncado, 2.5-3 7 x 1,5-2 m.

## 3. *Escovopsis microspora*

Se distingue de *Escovopsis moelleri* y *E. weberi* por los conidios ornamentados de manera similar, pero más pequeños; y de ambos por secuencias de ADN.

Conidióforos formados a partir de micelio aéreo, cilíndrico; ortogonal ramificado, cruzado opuesto al monopodial; hasta 200um de largo, 6-8um de ancho, formando vesículas lateral y apálicamente. Vesículas predominantemente cilíndricas, ocasionalmente clavado, cubierto con una capa de fiálides. Sus fiálides son globosa en la base, con cuello estrecho en forma de aguja. Conidios producidos en cadenas basipetales persistentes, subalinos que se vuelven de paredes gruesas, marrones y verrugosos. Las clamidosporas se formaron ocasionalmente en cultivo; hialina, globosa, raramente sub-globosa, como hinchazón terminal de hifas dicotómicamente ramificadas; coalescencia en placas o laminas en la superficie del agar.

#### 4. *Escovopsis moelleri*

Difiere de la especie tipo, *Escovopsis weberi*, en la morfología de las esporas (los conidios de *E. moelleri* son mucho más grandes y están muy ornamentados) y de *E. aspergilloides* en el clavado hasta las vesículas cilíndricas, y ambos por secuencias de ADN.

Conidióforos formados a partir de hifas aéreas, cilíndricas; ramificación ortogonal cruciforme a monopodial, 55-90x10-16um, lisa, hialina a subalina. Vesículas producidas lateral y apicalmente en las ramas principalmente clavado, también cilíndrico y de hasta 80 um de largo. Fiálides dispuestas en filas uniseriadas a lo largo de las vesículas; anfuliforme, con un cuello corto

y estrecho. Conidios producidos en cadenas basipetales cortas, no persistentes; inicialmente hialina y lisa, volviéndose marrón, de paredes gruesas y visiblemente verrugosa (Agustin, JO et al. 2013).

5. *Escovopsis lentecrescens*

Especies similares a *Escovopsis aspergilloides* en la posesión de vesículas globosas: fácilmente separadas por caracteres culturales, especialmente el lento crecimiento de colonias, y en micromorfología por los conidios más grandes y fuertemente ornamentados, y por las secuencias de ADN.

Conidióforos cilíndricos; ortogonal ramificado, cruzado opuesto al monopodial; hialina, de hasta 200-300 um de longitud y 9-10um de diámetro. Vesículas producidas lateral y terminalmente en ramas laterales cortas, consistentemente 2-3 septadas; de forma variable, principalmente globosa y aspergiloide, ocasionalmente clavado. Fialides subglobosa, con un cuello corto, abrupto, en forma de espiga; también se producen estructuras aberrantes en algunas vesículas, que se extienden para formas ampollas a fialidas cilíndricas con cuellos largos y estrechos. Conidios en cadenas basipetales, ovoides a subglobosas; volviéndose marrones y equinulados a verruculosos, conidios más viejos con una cubierta exterior suelta y oscura o velo.

## VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### A. Colecta de colonias

La identificación de estos los nidos, se realizó mediante observación de la estructura del nido, específicamente la entrada de estos; las hormigas del género *Acromyrmex* tienen nidos superficiales, algunos pueden presentar montículos que construyen con tierra suelta, material vegetal y desechos, mientras que otras especies utilizan las raíces de los árboles como protección para sus entradas. Se realiza una excavación de aproximadamente 0.5m para encontrar la primera cámara, en la cual se encuentra el hongo simbiote.

Se colectaron 12 colonias por cada especie. Una vez identificados los nidos, se marcaron utilizando flagging tapes, luego se procedió a excavarlos utilizando una piqueta geológica y pala de jardín. Cada uno de estos instrumentos fue limpiado y desinfectado previamente.

Para la colecta del hongo simbiote se utilizó un cucharón plástico; con mucho cuidado, evitando tomar gran cantidad de tierra y otras partículas presentes, que pudieran contaminarlo. Luego, el jardín fúngico fue colocado en cajas plásticas, con los bordes previamente engrasados con aceite vegetal, para evitar el escape de las hormigas.

### B. Sitios de colecta

Se realizaron colectas en distintas locaciones de la República de Panamá entre ellos:

- Gamboa, provincia de Panamá

- Rio Congo, provincia de Panamá Oeste
- Cordillera y Fortuna, provincia de Chiriquí
- Aguadulce, provincia de Coclé.
- Juan hombrón, Rio Hato, provincia de Coclé

#### C. Mantenimiento de las colonias en el laboratorio

Para el mantenimiento de estas colonias dentro del laboratorio, estas se mantuvieron en cajas plásticas, donde fueron alimentadas por cinco días a la semana, con hojuelas de avena, trozos de manzana, piña o harina de maíz. Alrededor del jardín fúngico se colocó papel toalla absorbente remojado con agua, esto ayudaba al mantenimiento de la humedad, además se retiraba constantemente los desechos producidos por estas para evitar posibles contaminaciones.

#### D. Aislamiento de *Escovopsis*

Para el aislamiento de *Escovopsis*, en cámaras húmedas se pesaron porciones de 0.5 g de jardín fúngico, se retiraron las hormigas y se colocaron de manera individual en platos Petri 90x15mm que contenían papel kimwipes con agua y estos se sellaron con Parafilm. Se incubaron por 7 días hasta que se identificó *Escovopsis*. Una vez que se identificó mediante observación microscópica, en una cabina de seguridad, empleando pinzas estériles se sembraron pequeños fragmentos de micelio cultivar en el centro de platos Petri en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) sin antibióticos. Los platos fueron sellados con papel parafilm y se incubaron a una temperatura de 20° C durante 20 días. Todos los platos se monitorearon constantemente para detectar el crecimiento de *Escovopsis* y tener cultivos puros sin contaminación.

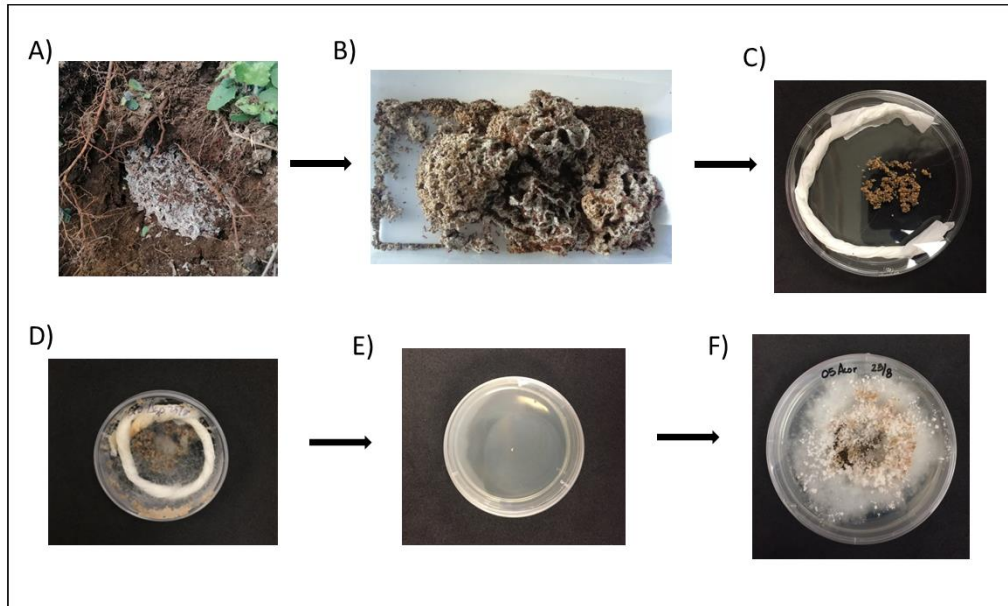


Figura 1: A) Cámara de jardín fúngico de hormigas *Acromyrmex coronatus* B) Cámara de jardín fúngico extraído y colocado en cajas plásticas C) Cámara húmeda para el crecimiento de *Escovopsis* (Inicial) D) Cámara húmeda con crecimiento de *Escovopsis* luego de 7 días E) Luego se realiza pases en PDA, tomando un trozo del micelio y se incuba por 20 días F) Pasados estos días se ve el crecimiento micelial de *Escovopsis* (*A. coronatus*)

## E. IDENTIFICACION MOLECULAR DE *ESCOVOPSIS*

### 1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, seguimos un protocolo de extracción a base de CTAB modificado de Moller et. al 1992, se tomaron porciones del micelio con ayuda de un bisturí estériles y se colocaron en tubos de 1.5 mL (Eppendorf). Luego añadimos 500  $\mu$ L de CTAB (TEKNOVA), posteriormente se mezcló vigorosamente con un pistilo estéril y se llevó a incubar en seco (Labnet International, Inc) a 65° C durante 30 minutos. Se agregó 400  $\mu$ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamil, invirtiendo varias veces (15 veces) para mezclar, para luego llevar a la microcentrífuga (Thermo |EC) a 14000 rpm durante 5 minutos. En tubos de 1.5 mL (Eppendorf) nuevos transferimos 250  $\mu$ L de sobrenadante y se añadieron 250  $\mu$ L de isopropanol (MARCA), la suspensión se mezcló y se incubo en congelador (MARCA) a -20°C durante 30 min, luego se centrifugo a 14 000 por 7 min. se descartó el isopropanol

y el pellet se lavó con 800 µL de etanol frío al 70%(MARCA), seguido de una centrifugación a 14 000 por 1 minuto. Después de descartar el etanol, se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet de ADN se resuspendió en 30 µL de agua ultrapura (MARCA) y se procedió a cuantificar el ADN extraído utilizando el NanoDrop (MARCA). Finalmente, los tubos con el ADN extraído se almacenaron a -20°C para posterior uso en análisis moleculares.

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de *Escovopsis*  
Se amplificó la región ITS1 – 5,8S-ITS2 del ADN ribosomal, los primers utilizados para la detección de *Escovopsis* por PCR fueron los siguientes: ITS 4 (5´TCCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) ITS 5 (5´GGAAGTAAAGTCGTAA CAAGG 3´) ITS 4 (5´TCCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) ITS 1

Para la amplificación de ADN, cada reacción de PCR (volumen final de 25 µL) estuvo compuesta de la siguiente manera: 12.25 µL de H<sub>2</sub>O, 0.5 µL de cada primer para *Escovopsis*, 2.5 µL de Buffer 10x, 0.5 µL de dNTPs 10mM, 3.0 µL de MgCl<sub>2</sub>, 5.0 µL de Qsln, 0.25 µL Taq DNA polimerasa y 0.5 µL de ADN de la muestra.

Para generar los amplicones, las condiciones de PCR fueron programadas en el termociclador (MARCA): Para ITS 5- ITS 4 95°C por 5 min, 30 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 50°C y 1.3 min a 72°C. Además de una extensión final a 72°C durante 10 min (Mejia, L.). Para ITS 1- ITS 4 95°C por 5 min, 30 ciclos de 30 s a 95° C, 30 s a 60°C y 1.3 min a 72°C, además de una extensión final a 72°C durante 10 min (Agustin, J. 2013). Los controles negativos (procedentes de la extracción de ADN) fueron incluidos en todas la PCR realizadas.



### 3. Electroforesis en gel de agarosa

Para la separación de fragmentos amplificados, se prepararon gel de agarosa al 2.0% (LONZA), se pesaron 0.9 g de agarosa por cada 60 mL de buffer TAE 1x (Thermo scientific). Los pocillos fueron llenados con 5  $\mu$ L de PCR más 2  $\mu$ L de tampón de carga (Gel pilot Loading Dye, 5x). Uno de los pocillos fue llenado con 4  $\mu$ L de marcador de peso molecular más 2  $\mu$ L de tampón de carga (Gel pilot Loading Dye, 5x), para comparar las bandas resultantes y estimar su peso. Luego de cargar las muestras en el gel, se programó para que corriera por 30 minutos a 94V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador, donde se registraron fotográficamente las muestras positivas y negativas.

### 4. Purificación de ADN (QIAGEN)

Se midió el volumen total de cada muestra de PCR amplificado, una vez obtenido este volumen se multiplico por 5, el resultado de esta multiplicación es el volumen por agregar de Buffer PB. Luego se transfirió a una columna spm en un tubo de 2mL y se centrifugo por 1 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante, devolviendo la columna nuevamente al tubo. Se agregó 750 uL de buffer PE y se centrifugo por 1 min a 13,000 rpm, se descarta el precipitado y nuevamente se centrifuga por 1 min. Transferimos la columna a tubos de 1.5mL, agregamos 20 uL de agua de tipo molecular y se dejó reposar 30 min, una vez pasado este tiempo, se cuantifico el ADN.

### 5. Secuenciación

Una vez purificada las muestras, se midió el volumen total de cada una y esta se dividió en dos. Ya dividido el volumen de ADN se marcó con la inicial F (foward) y R (reversed), y se le agrego 5uL del primer correspondiente.

La secuenciación de los ADN se realizó por el servicio de secuenciación automática de MACROGEN, Corea. Se utilizó el programa para la construcción de una secuencia y se realizó un análisis de identidad y similitud mediante la herramienta Blast contra la base datos de nucleótidos del NCBI.

F. Fotografías macroscópicas y microscópicas

Para la identificación morfológica de *Escovopsis* se realizaron placas de los aislamientos obtenidos con ayuda de una cinta adhesiva esta se colocó sobre el micelio para su adhesión y luego se colocó sobre el portaobjeto, en el cual previamente se había colocado una gota de azul Lactoglicerol para teñir sus estructuras.

## VII. RESULTADOS

### A. Colecta de colonias

Se colectaron 10 colonias de cada especie de hormigas *A. echinator*, *A. octospinosus*, *A. coronatus*, *Acromyrmex* sp. estas se mantuvieron en el laboratorio durante 1 mes aproximadamente con los cuidados requeridos para preservar el hongo simbiote por un tiempo más prolongado.

	Nidos colectados	Nidos aislados	ADN extraído	ADN amplificado (PCR)	ADN purificado	ADN secuenciado
<i>Acromyrmex echinator</i>	11	10	10	9	9	9
<i>Acromyrmex octospinosus</i>	7	7	7	5	4	4
<i>Acromyrmex coronatus</i>	13	11	11	10	10	10
<i>Acromyrmex</i> sp.	12	9	9	9	9	9

Cuadro 1: Nidos colectados y aislamientos para análisis moleculares.

### B. Aislamiento de *Escovopsis*

De cada colonia se prepararon 10 platos Petri de cámaras húmedas las cuales se monitorearon durante 7 días hasta observar el crecimiento de *Escovopsis*, en los cuales se obtuvo crecimiento micelial del micoparásito en cada uno. Para los aislamientos en medios de cultivos (PDA) se sembraron aproximadamente 10 platos de cada colonia y se monitorearon constantemente durante 20 días, periodo en el que se obtuvieron cultivos puros de *Escovopsis*.

Los cultivos puros de *Escovopsis* obtenidos de algunas colonias de *Acromyrmex* sp. y *Acromyrmex coronatus* mantuvieron un color amarillo – mostaza durante

aproximadamente dos semanas, sin embargo, pasado este tiempo se tornaban chocolates, su color característico;(E.V. Gibbs, observaciones personales).

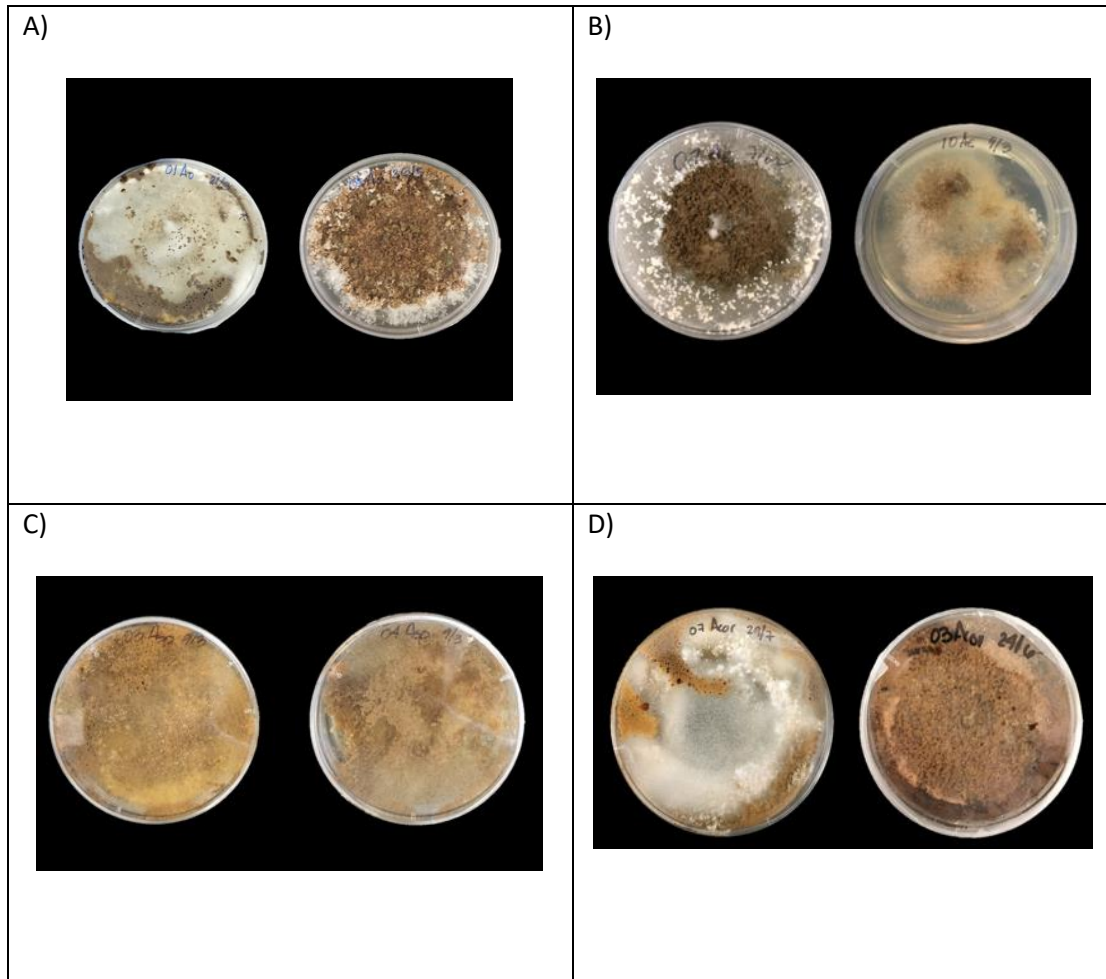


Figura 2: Aislamiento de *Escovopsis* por especie de hormigas: A) cepas fúngicas obtenidas de nidos de hormigas de *Acromyrmex octospinosus* B) cepas fúngicas obtenidas de nidos de hormigas de *Acromyrmex echinator* C) cepas fúngicas obtenidas de nidos de hormigas de *Acromyrmex* sp. D) cepas fúngicas obtenidas de nidos de hormigas de *Acromyrmex coronatus*

Se tomaron fotografías macroscópicas de cada una de las colonias de *Escovopsis* aisladas, estas fotos se tomaron antes del proceso de extracción de ADN, para una observación más clara de las características que presentaba el micelio.

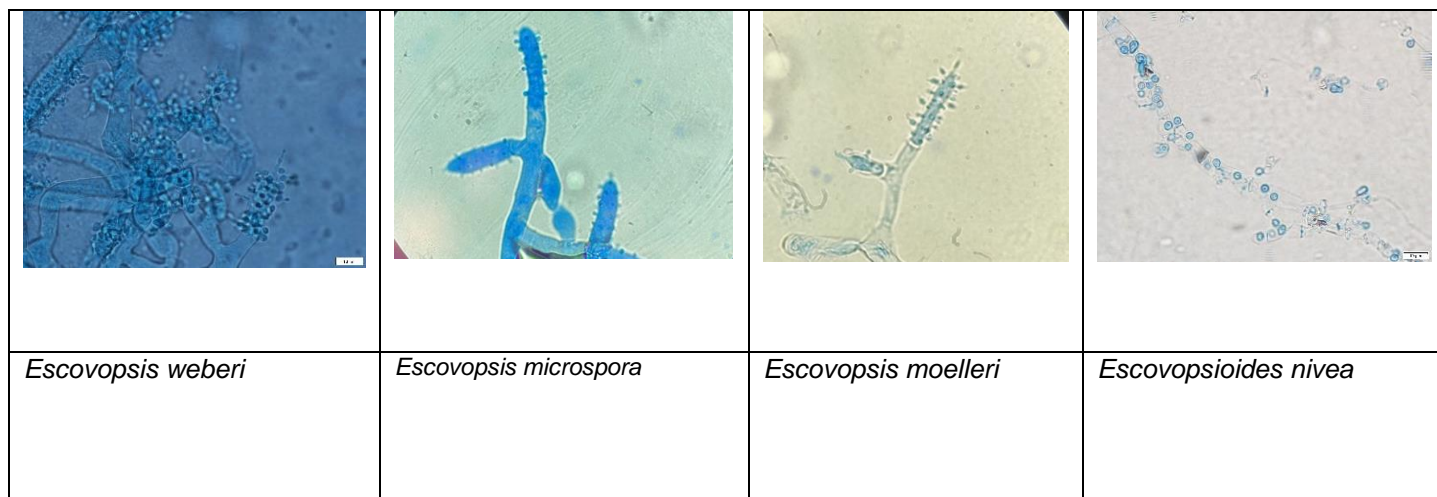


Figura 3: A) microscopia de conidióforo de *Escovopsis weberi* a 10um B) microscopia de *Escovopsis microspora* a 10um C) microscopia de conidióforo de *Escovopsis moelleri* a 10um D) microscopia de parte hialina de *Escovopsioides*

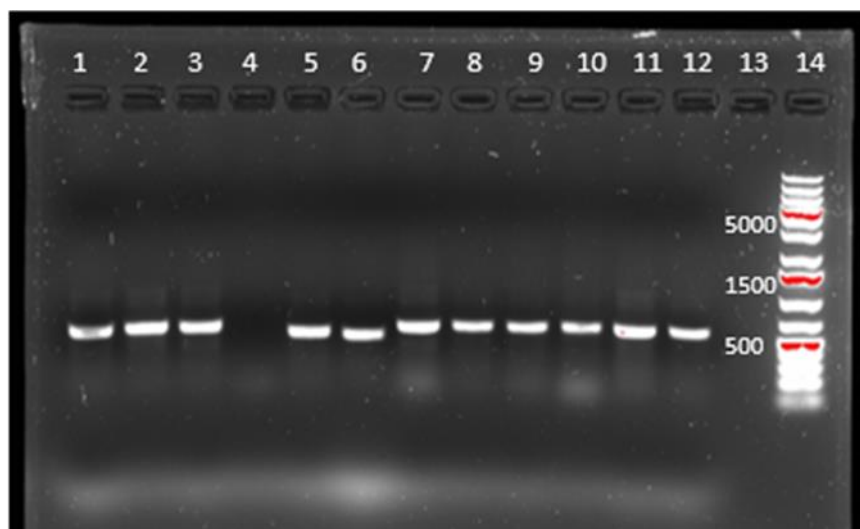
Se realizaron placas frescas durante el experimento para la observación de estructuras del hongo *Escovopsis*, mediante tinción de azul de lactoglicerol, este nos ayuda a observar las estructuras más claras, se utilizó un microscopio de luz con cámara DP73 OLYMPUS BX53.

#### C. Identificación molecular

##### - Amplificación de ADN

Se obtuvieron los resultados requeridos, el ADN extraído fue utilizado para la amplificación y reacción en cadena de la polimerasa. Para el hongo del género *Escovopsis*, y la región ITS1 – ITS2 del gen ribosomal 5,8S; la amplificación del ADN alcanzo un peso molecular entre 600 a 700pb. En este trabajo fue posible extraer ADN genómico a partir del micelio de cada cepa fúngica aislada, en los cuales se obtuvieron ADN genómico de buena calidad con concentraciones y absorbancia requeridas (Cuadro 2). Todas las muestras se le realizo la técnica de

electroforesis, las cuales se observaron las bandas amplificadas en un transiluminador como se observa en la figura 4.



**Figura 4:** Amplificación en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 94V. Utilizando los primers ITS5 - ITS4 y ITS1 - ITS4, con sus condiciones de PCR correspondientes, y el marcador de peso molecular (INVITROGEN).

EXTRACCIÓN DE ADN		
COLONIA	CONC.	260/280
01 <i>Acromyrmex echinatio</i>	43.9	2.23
02 <i>Acromyrmex echinatio</i>	673.6	2.10
03 <i>Acromyrmex echinatio</i>	46.3	2.12
04 <i>Acromyrmex echinatio</i>	16.4	1.89
05 <i>Acromyrmex echinatio</i>	64	2.21
06 <i>Acromyrmex echinatio</i>	44	2.20
07 <i>Acromyrmex echinatio</i>	35.6	2.06
08 <i>Acromyrmex echinatio</i>	256.7	2.09
09 <i>Acromyrmex echinatio</i>	496.3	2.07
10 <i>Acromyrmex echinatio</i>	140.9	2.16
11 <i>Acromyrmex echinatio</i>	132.6	1.45
01 <i>Acromyrmex coronatus</i>	264	2.14
02 <i>Acromyrmex coronatus</i>	119.5	1.99
03 <i>Acromyrmex coronatus</i>	55.1	2.33
04 <i>Acromyrmex coronatus</i>	56.1	2.18
05 <i>Acromyrmex coronatus</i>	92.69	2.04
06 <i>Acromyrmex coronatus</i>	23.6	2.44
07 <i>Acromyrmex coronatus</i>	18.4	2.16
08 <i>Acromyrmex coronatus</i>	257.6	2.13

09 <i>Acromyrmex coronatus</i>	29.9	1.98
10 <i>Acromyrmex coronatus</i>	57.6	2.23
11 <i>Acromyrmex coronatus</i>	95.3	1.52
12 <i>Acromyrmex coronatus</i>	189.2	2.06
13 <i>Acromyrmex coronatus</i>	157.5	2.10
01 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	63.9	1.07
02 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	101.6	1.88
03 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	100.1	1.76
04 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	35.9	2.01
05 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	374.4	1.97
06 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	4.7	1.70
07 <i>Acromyrmex octospinosus</i>	35.2	1.71
01 <i>Acromyrmex sp.</i>	25.9	1.98
02 <i>Acromyrmex sp.</i>	41.2	2.00
03 <i>Acromyrmex sp.</i>	276.3	2.14
04 <i>Acromyrmex sp.</i>	71.8	2.05
05 <i>Acromyrmex sp.</i>	205.8	2.10
07 <i>Acromyrmex sp.</i>	239.6	2.02
08 <i>Acromyrmex sp.</i>	80.4	1.89
10 <i>Acromyrmex sp.</i>	121.8	1.77
11 <i>Acromyrmex sp.</i>	50.3	1.67
12 <i>Acromyrmex sp.</i>	102.4	1.78

Cuadro 2: muestras extraídas por colonia de hormigas con su concentración de ADN genómico y absorbancia 260/280.

#### - SECUENCIACIÓN

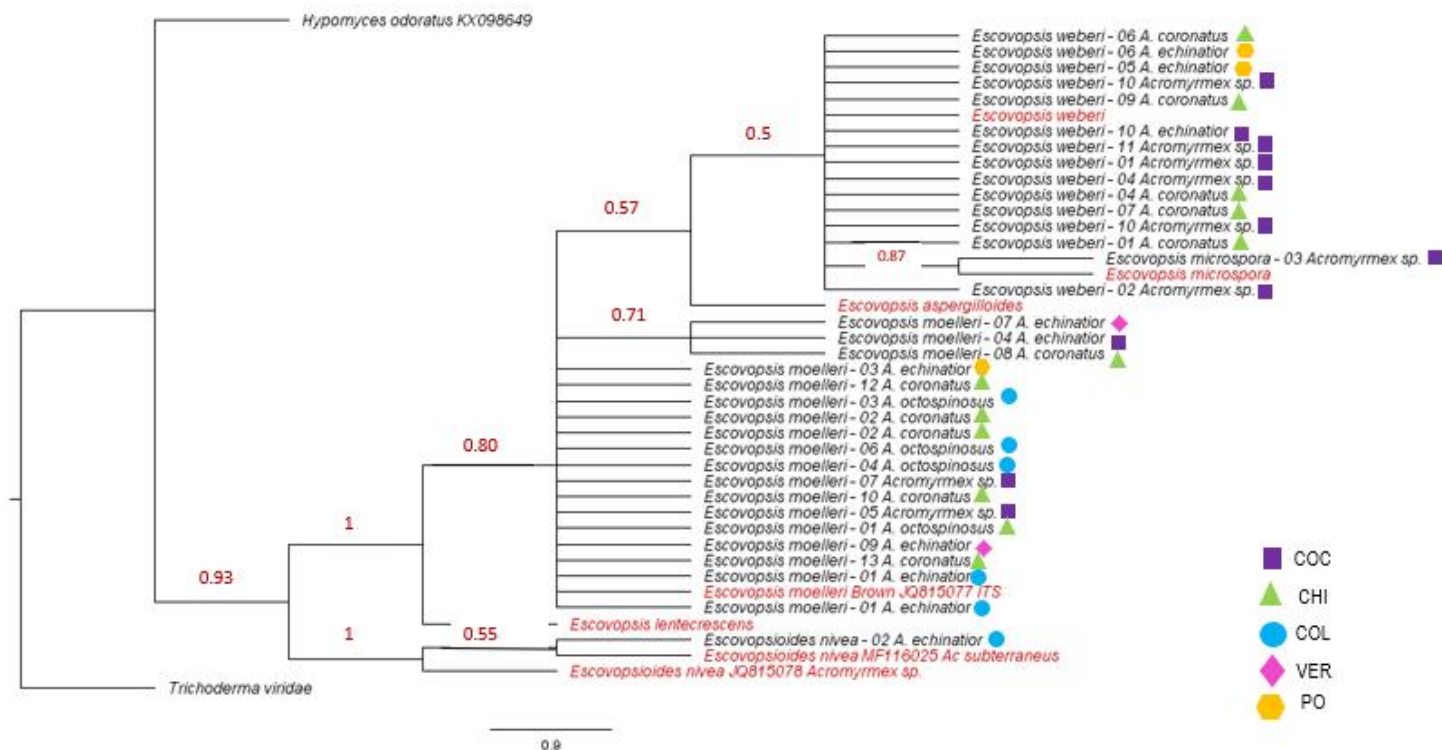
Se aislaron 37 hongos del género *Escovopsis*, aproximadamente 10 para cada especie de hormiga *Acromyrmex*, de las cuales se obtuvieron 34 secuencias limpias para la formación de los árboles filogenético a partir de análisis de Inferencia Bayesiana y RAXML. Los análisis obtenidos para estas secuencias por especie de hormiga fueron: nueve (9) muestras de *Escovopsis* para *Acromyrmex echinator*, cuatro muestras para *Acromyrmex octospinosus*, diez muestras para *Acromyrmex coronatus* y nueve muestras para *Acromyrmex sp.*

En el análisis de identidad de las secuencias nucleotídicas obtenidas de buena calidad se verificó un porcentaje de identidad mayor a 96%, en su mayoría

reportadas para *Escovopsis* sp., haciendo una comparación con muestras previamente secuenciadas de otros hongos del género *Escovopsis*, los cuales pertenecen a diferentes especies de hormigas Attines superiores, para corroborar la identificación molecular obtenida, se realizó el alineamiento de secuencias, se procedió a realizar un alineamiento filogenético mediante los métodos RAXML e inferencia Bayesiano.



- Filogenia



**Figura 7:** Árbol filogenético obtenido a partir del análisis por inferencia Bayesiano realizado con las secuencias ITS 1-5.8S-ITS2 del ADNr de 34 aislamientos en estudio y de las secuencias seleccionadas de la base de datos del género *Escovopsis*.

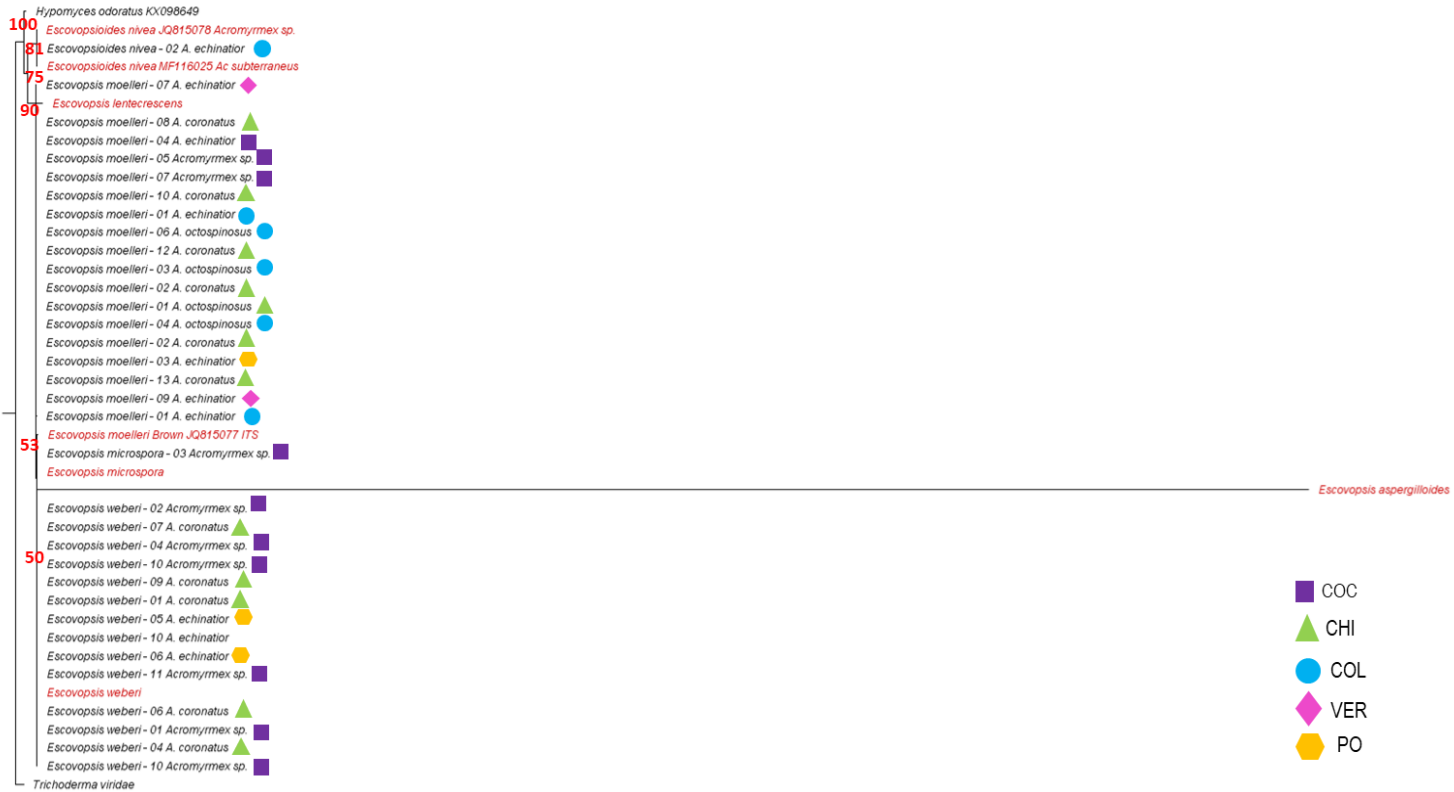


Figura 8: árbol filogenético obtenido a partir del análisis RAXML realizado con las secuencias ITS 1-5.8S-ITS2 del ADNr de los aislamientos en estudio y de las secuencias seleccionadas de la base de datos del género *Escovopsis*.

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró colectar un total de 40 colonias aproximadamente; 10 por cada especie de hormiga *Acromyrmex*, en las cuales fue posible aislar 37 cepas o cultivos puros del hongo *Escovopsis*, además se obtuvo cuatro especies de género *Escovopsis* a partir de 34 secuencias de colonias de hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* evaluadas. A continuación, discutiremos la diversidad y abundancia de las cepas de *Escovopsis* aisladas de hormigas *Acromyrmex* en Panamá.

### a. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Ochenta y nueve por ciento (89%) de los hongos secuenciados fueron limpiados y ordenados adecuadamente para poderlos analizar filogenéticamente. Solo el 11 % de las muestras restantes no se analizaron ya que estas no presentaban la calidad genética requerida para realizar el análisis. No obstante, dentro del análisis generado por NCBI Blast un 1.1% pertenecen a microorganismos adicionales, secuencias reportadas del género *Fusarium* e *Ilyonectria*; Masiulionis y Pagnocca (2017) reportaron la presencia de microorganismos adicionales en los cultivos de hongos de los nidos de hormigas de la tribu Attini. Bich (2020) por su parte supone que hay una variedad de microorganismos que se encuentran asociados biológicamente con *Escovopsis* en el microambiente de los cultivos fúngicos de las hormigas de la tribu Attini, por lo que nuestros resultados son congruentes con esta suposición, las colonias de hormigas Attini pueden estar presentando una diversidad de microorganismos asociados los cuales no se ha estudiado ni determinado su relevancia dentro de los nidos de hormigas. Las secuencias

reportadas de dichos géneros no fueron incluidas en la filogenia presentada en este trabajo.

Las muestras no secuenciadas pudieron haber sido afectadas por múltiples factores, teniendo en cuenta que las muestras debían tener concentraciones de 50ng/uL de ADN genómico para considerarse de buena calidad y una absorbancia 260/280 nm superior a 1.8, para obtener una secuencia limpia. La divergencia de estas muestras con baja calidad impide su edición ya que al presentar múltiples picos de secuencia o ruidos no pueden ser editadas y, por lo tanto, no se incluyen en el análisis. Los picos de secuencia o ruidos pueden deberse a múltiples factores como: muestras con cantidad insuficientes de ADN o existencia de un sitio secundario de unión con el cebador, esto da lugar a picos extras; falta de especificidad de la PCR y existencia de amplicones contaminantes en la muestra; presencia de fragmentos de PCR mal purificados o un cebador mal purificado y degradado.

En esta investigación mediante la caracterización molecular de las cepas fúngicas se observó que la secuencia del aislamiento para la especie *Acromyrmex echinatio* presentó un índice de identidad de 81% y formó un clado monofilético con la secuencia de referencia de la especie *Escovopsioides nivea*.

Este estudio presentó una alta diversidad a pesar de utilización de un solo juego de cebadores, se utilizó cebadores de tipo ITS para amplificar la región ITS 1 5-8S ITS 2, no obstante, en otros estudios se han utilizado cebadores como los de subunidad larga (LSU), factor de elongación (*tef1*), subunidad *rpb1*, *rpb2* (Montoya et al. 2021; Agustín et al. 2013; Christopher et al. 2021; Meirelles et al. 2015) en los cuales

hacen una comparación sistemática para la diferenciación de clados y evaluar el nivel de relación entre las diferentes especies de *Escovopsis*; por lo que para ampliar y obtener otros sitios de unión con los cebadores, la utilización de distintos cebadores podría variar la relación genética de este micoparásito.

b. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Escovopsis* Y *Escovopsioides*

Los análisis filogenéticos del árbol de RAXML y Bayesiano, revelaron la diversidad genética del género *Escovopsis* encontrada en 34 colonias de hormigas del género *Acromyrmex* (Fig. y Fig.) utilizando las secuencias ITS obtenidas de cultivos puros, y data generada en el GenBank (cuadro x).

Nuestro análisis filogenético indica que las especies de *Acromyrmex* en Panamá están siendo parasitadas e infectadas por *Escovopsis weberi*, *Escovopsis microspora*, *Escovopsis moelleri* y *Escovopsioides nivea*; a pesar de que existen pocos registros de *Escovopsis* en Panamá, Currie, CR et al. (1999) reportaron por primera vez *Escovopsis* en hormigas cortadoras de hojas (*Atta* y *Acromyrmex*) en esta región, el cual nos presentó que del 33 al 75% de los nidos se encontraban infectados por *Escovopsis*, sin embargo, no fue hasta 2017 en estudios realizados por Boya & Fernández – Marín que se caracterizó al nivel de especie siendo reportada así *E. weberi* la única especie previamente nombrada desde Panamá; más tarde Christopher y otros (2021) realizaron una importante caracterización molecular, la cual nos dio un vistazo de la amplia diversidad de *Escovopsis* en colonias de hormigas de la tribu Attini.

Esta investigación nos muestra que las cepas aisladas para las especies de hormigas *A. echinator*, *A. coronatus*, *Acromyrmex* sp. están siendo parasitadas por

*E. weberi*, *E. microspora*, es decir compartiendo el mismo micoparasito, estos resultados nos dan una idea que tan especialista son los hongos del género *Escovopsis*, ya que los lugares de colecta para esta especie de hormigas mantienen condiciones ambientales muy diferentes y una distancia geográfica amplia; además, en el presente estudio no se reportó *E. aspergilloides* ni *E. lentescentes* a pesar de que estas especies han sido reportadas parasitando otras especies de *Acromyrmex* (Agustín et al. 2013). Mientras que las hormigas de la especie de *Acromyrmex octospinosus* estudiadas en este trabajo están siendo infectadas por *Escovopsis moelleri*, este resultado consiste con lo reportado por Christopher y otros (2021), sin embargo, ellos reportaron también para esta especie de hormiga cortadora infección por *Escovopsis weberi* y *Escovopsis microspora*.

En el presente trabajo mostramos por primera vez en Panamá reporte de infección por *Escovopsioides nivea* en hormigas *Acromyrmex echinatio* lo que nos indica un antagonismo del hongo mutualista de las hormigas cortadoras de hojas. La inferencia bayesiana resolvió a *Escovopsioides nivea* en un clado monofilético aparte y como grupo hermano de *Escovopsis* tal como lo reportaron Agustín et al., 2013 y Ostis & Rodrigues, 2018.

Se ha reportado *E. nivea* es un hongo de prevalencia variable en jardines de hormigas cortadoras de hojas. Agustín et al. 2013 reportaron *E. nivea* de 14 de 25 (56%) colonias recolectadas de tres especies de *Acromyrmex* (ver material suplementario de Agustín et al. 2013). Considerando el mismo género de hormigas Rodrigues et al. 2008 y Mendoca et al. (2021 reportaron una menor prevalencia, 8% y 5%, respectivamente *E. nivea* también ha sido reportado en colonias del género

*Atta* (Reis et al. 2015; Pereira et al. 2016) con prevalencia de 66% y 12%. Otros estudios (Rodrigues et al. (2005a,b) también muestrearon colonias de *Atta* con una prevalencia de 50% y 8%.

*Escovopsioides* presenta un micelio hialino y carece de pigmentación, que es la principal característica que lo diferencia de *Escovopsis* (Agustín et al., 2013), además presenta un crecimiento lento por lo que el aislamiento de este puede ser una tarea difícil. Debido a los factores mencionados anteriormente, reconocer y distinguirlo de otros hongos contaminantes durante el aislamiento puede tornarse complicado. Considerando el lento crecimiento de este hongo, puede darse el caso de que otros contaminantes presentes ya sean ambientales, inhiban o abarquen su crecimiento antes de que este pueda desarrollarse completamente, por lo que trabajar de la manera más aséptica sería lo primordial para el aislamiento de *Escovopsioides*.

#### c. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

En este estudio se tomaron muestras de diferentes provincias de la República de Panamá, tales como: Panamá Oeste (Río Congo), Colón (Gamboa), Chiriquí (Fortuna y Cordillera) y Coclé (Juan hombrón y Aguadulce). Cada uno de los lugares donde se realizaron estos muestreos presenta condiciones ambientales y climáticas diferentes, además de tener una distancia geografía amplia. Los nidos de hormigas colectados en Chiriquí (*Acromyrmex coronatus*) y Coclé - Juan hombrón (*Acromyrmex sp.*) que cuentan con condiciones ambientales muy diferentes. En Chiriquí por su parte con una humedad prevalente y mayor altitud, mientras que en Coclé una zona de playa con ambiente caluroso y seco, se esperaba obtener una

alta especificidad de infección por *Escovopsis*, sin embargo, nuestro análisis filogenético agrupa en dos clados definidos soportados por Bootstrap superiores a 50%, donde se puede observar la baja especificidad del hongo *Escovopsis*, ya que estos se están compartiendo entre especies.

En el primer clado, agrupan a las cuatro especies estudiadas en este ensayo (*Acromyrmex echinator*, *Acromyrmex octospinosus*, *Acromyrmex coronatus*, *Acromyrmex sp.*), sin embargo, tres de las cuatro especies están siendo parasitadas por *Escovopsis weberi*, *Escovopsis microspora* y *Escovopsis moelleri*, y las especies *Acromyrmex octospinosus* están siendo infectadas exclusivamente por *Escovopsis moelleri*, esto nos indica que las especies de *Acromyrmex* con alta distribución geográfica están siendo infectadas por las mismas especies de *Escovopsis* que tienen baja distribución geográfica. En el clado 2, una colonia de *Acromyrmex echinator* está siendo parasitadas por *Escovopsioides nivea*, el cual había sido reportado en otras especies de hormigas cortadoras de hojas en Brasil (Agustín J, 2013; Otis J & Rodríguez A, 2018).

Estos resultados nos indica que no existe especificidad entre las especies del género *Escovopsis* y los cultivares fúngicos, la ausencia de especificidad entre los cultivares y *Escovopsis* en la simbiosis hormiga-patógeno podría indicar que las cepas de *Escovopsis* tienen alelos de virulencia que coinciden con los alelos inhibidores del cultivar (Agrawal & Lively, 2002).

En estudios realizados por Taerum et al. 2007 reportaron que los aislamientos de *Escovopsis* obtenidos de nidos de *Acromyrmex* y *Atta* eran casi idénticos, ya que no presentaban correlación con el nido de hormigas, ni con la distribución geográfica



porque había aislamientos de varias regiones (Argentina, Panamá, Ecuador) sus resultados indican similitud a pesar de ser aislamientos de muy diferentes ubicaciones geográficas, esto concuerda con nuestros resultados ya que sin importar su distribución geográfica las especies del género *Escovopsis* están correlacionadas entre sí.

Los estudios relacionados a la descripción formal de este género aún son escasos (Meirelles, Montoya et al., 2015). La presencia de las cepas en estudio al género *Escovopsis* ha sido determinada principalmente mediante caracterización molecular, sin embargo, la identificación morfológica se realizó con base en la descripción morfológica realizada por Agustín et al. (2013) y Muchovej y Della Lucia (1990).

A pesar de que se recomienda complementar la identificación morfológica con datos moleculares (Chakraborty et al., 2011), en la base de datos molecular de Genbank del NCBI, 14 de las 34 secuencias registradas de las regiones ITS de hongos del género *Escovopsis* estaban registradas a una especie determinada.

## IX. CONCLUSIÓN

Se logró determinar la diversidad de hongos patógenos del género *Escovopsis* parasitando las diferentes especies de hormigas cortadoras del género *Acromyrmex* con distinta distribución geográfica en la República de Panamá. Se aislaron 37 cepas o cultivos puros del hongo *Escovopsis*, de los cuales se obtuvieron 3 especies de *Escovopsis* a partir de 32 secuencias de colonias de hormigas cortadoras de este género; las especies del hongo *Escovopsis* que están parasitando estas especies son: *Escovopsis weberi*, *Escovopsis microspora* y *Escovopsis moelleri*.

Para las especies de hormigas *Acromyrmex echinator* y *Acromyrmex coronatus* presentan infección por *Escovopsioides*, un grupo hermano de *Escovopsis*, en el caso de *Acromyrmex echinator* mediante secuenciación formó un clado monofilético aparte y para *Acromyrmex coronatus* su caracterización fue completamente mediante observación microscópica, para esta colonia se logró aislar ambos géneros (*Escovopsis* y *Escovopsioides*) presentando así una coinfección es decir, una infección simultánea de ambos patógenos al hongo cultivar.

## X. RECOMENDACIONES

- Ampliar el número de colonias muestreadas.
- Realizar estudios para determinar la prevalencia de *Escovopsioides* en Panamá.
- Utilización de otros cebadores moleculares o primers, que nos ayuden a identificar otras especies de *Escovopsis* en estas mismas especies de hormigas u otras especies.
- Realizar estudios que incluyan otras especies de *Acromyrmex*, como *A. volcanus*, *A. insinator*
- Hacer colectas en distintas regiones de la República de Panamá.

## Abreviaturas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

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

CTAB: Bromuro de cetil - trimetil amonio.

PDA: Agar papa dextrosa

## XI. REFERENCIAS

- Adams RMM, Mueller UG, Holloway AK, Green AM, Narozniak J. 2001. Garden sharing and garden stealing in fungus growing ants. *Naturwissenschaften* 87: 491–93
- Armitage, S.A.O. et al., 2012. AN EVALUATION OF THE POSSIBLE ADAPTIVE FUNCTION OF FUNGAL BROOD COVERING BY ATTINE ANTS. *Evolution*, 66-6:(may 1966), pp.1966–1975.
- Augustin, J. O., Groenewald, J. Z., Nascimento, R. J., Mizubuti, E. S. G., Barreto, R. W., Elliot, S. L. et al. (2013). Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leafcutting ants. *Plos One*, 12, 1-17.
- Bot ANM, Currie CR, Hart AG, Boomsma JJ. (2001). Waste management in leaf cutting ants. *Ethol. Ecol. Evol.* In press
- Christopher Y, Wcislo WT, Martínez Luis S, Hughes WOH, Gerardo NM, Fernández-Marín H. Disease management in two sympatric *Apterostigma* fungus-growing ants for controlling the parasitic fungus *Escovopsis*. *Ecol Evol.* 2021; 00:1–12.
- Currie CR, Mueller UG, Malloch D. 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7998–8002
- Currie CR, Wong B, Stuart AE, Schultz TR, Rehner SA, Mueller UG, Sung GH, Spatafora JW, Straus NA (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science* 299:386–388.
- Currie, C. R. (2001a). A community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 55, 357-380.
- Currie, C. R. (2001b). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*, 128, 99-106.
- DENTINGER, B.T.M., JEAN LODGE, D., MUNKACSI, A.B., DESJARDIN, D.E. & MCLAUGHLIN, D.J. 2009: Phylogenetic placement of an unusual coral mushroom challenges the classic hypothesis of strict coevolution in the *Apterostigma pilosum* group ant-fungus mutualism. – *Evolution* 63: 2172-2178.
- Fernández-Marín, H. et al., 2006. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273(1594), pp.1689–95.
- 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*, 81(1), pp.39–48.

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

Goncalves, C.R. 1961: O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera, Formicidae). – *Studia Entomologica* 4: 113-180.

Holldobler B, Wilson EO. (1990). *The Ants*. Cambridge, MA: Belknap

Huber, J. 1905: Über die Koloniegründung bei *Atta sexdens*. – *Biologisches Centralblatt* 25: 606-619, 625-635.

KEMPF, W.W. 1972: Catálogo abreviado das formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae). – *Studia Entomologica* 15: 3-344.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*. 10 ed. Wallingford, UK: CABI Publishing.

Marfetán, J. A., Romero, A. I. y Folgarait, P. J. (2015). Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. *Fungal Ecology*, 17, 52-61.

Masiulionis, V. E., Cabello, M. N., Seifert, K. A., Rodrigues, A. y Pagnocca, F. C. (2015). *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107, 731-740.

Mayhé-Nunes, A.J. & BRANDÃO, C.R.F. 2007: Revisionary studies on the attine ant genus *Trachymyrmex* FOREL. Part 3: The Jamaicensis group (Hymenoptera: Formicidae). – *Zootaxa* 1444: 1-21.

Mayhé-Nunes, A.J. & Jaffé, K. 1998: On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). – *Ecotropicos* 11: 45-54.

Mehdiabadi, N.J. & Schultz, T.R., 2010. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants ( Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini ). *Myrmecological News*, (April), pp.37–55.

Meirelles, L. A., Montoya, Q. V., Solomon, S. E. y Rodrigues, A. (2015). New light on the systematics of fungi associated with Attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. *Plos One*, 10, e0112067.

Moeller A (1893) Die Pilzgaerten einiger suedamerikanischer Ameisen. En: Schimper AFW, editor. *Botanische Mittheilungen aus den Tropen*. Jena: Gustav Fischer.

Montoya QV, Martiarena MJS, Polezel DA, Kakazu S, Rodrigues A (2019) More pieces to a huge puzzle: Two new *Escovopsis* species from fungus gardens of attine ants. *MycoKeys* 46: 97–118.

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

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

Mueller, U.G. et al., 2001. Origin of the ant fungus mutualism. *The Quarterly review of biology*, 76(2), pp.169–197.

Mueller, U.G. et al., 2005. THE EVOLUTION OF AGRICULTURE IN INSECTS. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36(1), pp.563–595.

Mueller, U.G., 2002a. Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant-Cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attine Ant-Fungus Symbiosis., 160(october).

Munkacsy, B. et al., 2004. Convergent coevolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 271(1550), pp.1777–82.

Murakami, T. & Higashi, S., 1997. Social organization in two primitive attine ants, *Cyphomyrmex rimosus* and *Myrmicocrypta ednaella*, with reference to their fungus substrates and food sources. *Journal of Ethology*, 15(1), pp.17–25.

Pereira JS, Costa RR, Nagamoto NS, Forti LC, Pagnocca FC, Rodrigues A. Comparative analysis of fungal communities in colonies of two leaf-cutting ant species with different substratum preferences. *Fungal Ecol.* 2016; 21:68–75

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

Rissing, S.W. & Pollock, G.B. 1988: Pleometrosis and polygyny in ants. In: JEANNE, J.R. (Ed.): *Interindividual behavioural variability in social insects*. – Westview Press, Boulder, CO, pp. 179-222.

Rodrigues A (2004) Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas. Rio Claro Brazil: Universidade Estadual Paulista. 84 p.

Schultz, T. R. & Meier, R. A. (1995) *Syst. Entomol.* 20, 337–370.

Schultz, T.R. & Meier, R. 1995: A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. – *Systematic Entomology* 20: 337-370.

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

Schultz, T.R., Bekkevoold, D. & Boosma, J.J. 1998: *Acromyrmex insinuator* new species: an incipient social parasite of fungus-growing ants. – *Insectes Sociaux* 45: 457-471.

- Seifert KA, Samson RA, Chapela IH. 1995. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia* 87:407–13
- Taerum SJ, Cafaro MJ, Little AEF, Schultz TR, Currie CR. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. *Proc R Soc Lond B*. 2007; 274:1971–8
- Villesen, P. et al., 2004. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants. *Evolution; international journal of organic evolution*, 58(10), pp.2252–65.
- Weber NA (1982) Fungus ants. *Social Insects*, ed Hermann HR (Academic, New York), Vol 4, pp 255–363.
- Weber NA. (1972). *Gardening Ants: The Attines*. Philadelphia: Am. Philos. Soc.
- Wheeler, W.M., 1907. The fungus-growing ants of North America. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 23, pp.669–807, plates xlix–liii.
- Wilson, E. O. (1971) *The Insect Societies* (Belknap, Cambridge, MA).