

# Efecto de extractos etanólicos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Leucoagaricus gongylophorus*

David Jiménez-Londoño,<sup>1\*</sup> Diana P. Farfán-Villanueva<sup>1,2</sup>, Nicolás Pinel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia*

<sup>2</sup>*Grupo de Investigación en Biodiversidad, Evolución y Conservación (BEC), Universidad EAFIT, Medellín, Colombia*

## Resumen

**Palabras clave:** Hormigas cortadoras de hojas, *Atta cephalotes*, *Leucoagaricus gongylophorus*, extractos vegetales

### 1. Introducción:

En la subfamilia Myrmicinae (Hymenoptera: Formicidae) se encuentra la tribu Attini compuesta por 19 géneros y 245 especies distribuidas en la región Neotropical, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Bich et al., 2017; Fernández et al., 2015; Mera-Rodríguez et al., 2020). Las hormigas de esta tribu se conocen como “hormigas cultivadoras de hongo” (*fungus-farming ants*) debido a su simbiosis con hongos, la mayoría de ellos pertenecientes a la tribu Leucoprineae (Agaricales: Agaricaceae). El cultivo de hongos sirve de alimento para la hormiga reina y las larvas (Bich et al., 2017), y en retorno la colonia le ofrece al hongo alimento, protección contra patógenos y competidores, y garantiza su dispersión (Mehdiabadi & Schultz, 2009). Desde el surgimiento de esta simbiosis, aproximadamente entre 60 a 50 Ma (Masiulionis et al., 2014), se han desarrollado cinco sistemas de cultivo: 1) Agricultura baja (*Lower agriculture*), 2) Agricultura hongo-coral (*Coral-fungus agriculture*); 3) Agricultura de levadura (*Yeast agriculture*); 4) Agricultura alta generalizada (*Generalized higher agriculture*); 5) Agricultura de cortadoras de hojas (*Leafcutting ants*) que agrupa los géneros *Atta* & *Acromyrmex* (Mehdiabadi & Schultz, 2009), caracterizadas por usar material vegetal vivo para alimentar su hongo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Cazal et al., 2009; Franzel & Farji-Brener, 2000). Se ha estimado que las hormigas cortadoras de hojas (HCH) tienen la capacidad de remover entre el 15% y 17% de la producción de hojas en los bosques húmedos tropicales, traduciéndose en cientos de kilogramos de material vegetal por hectárea al año, por lo que son considerados como los herbívoros dominantes en los trópicos (Fernández et al., 2015; Franzel & Farji-Brener, 2000). Debido a su capacidad defoliadora, las hormigas cortadoras de hojas pueden dañar hasta en un 100% las producciones agrícolas, de manera que son clasificadas como una de las plagas de mayor importancia en Latinoamérica (Bich et al., 2017; Muñoz, 2017). En Colombia, se han caracterizado cerca de 11 especies de HCH repartidas en bosques y regiones agrícolas del país como Santander, Antioquia, Cundinamarca, Magdalena y el Valle del Cauca que afectan cultivos de maíz, frijol, yuca; frutales como cítricos, mangos, aguacates, cacao, guanábanos; hortalizas, gramíneas, café, plátano y aquellos usados en programas de reforestación (Fernández et al., 2015).

A raíz de los daños que causan las hormigas cada año, los cultivos son protegidos por medio del uso de pesticidas. Según Kaur et al., (2019) los pesticidas se definen como sustancias químicas tóxicas o una mezcla de sustancias o agentes biológicos que son liberados de forma intencional en el ambiente con el objetivo de evitar, impedir, controlar y/o matar y destruir poblaciones de insectos, hierbas, roedores, hongos u otras plagas dañinas, las cuales se definen de forma general como plantas o animales que ponen en peligro la comida, salud o confort de los seres humanos. Sin embargo, el uso de pesticidas puede conllevar a daños al medio ambiente y seres vivos, como: contaminar aguas subterráneas, eutrofizar ríos, causar un gasto excesivo de agua (Boulogne et al., 2012), afectar otros organismos beneficiosos para los cultivos, como los polinizadores (Raine, 2018), y la salud del ser humano (Kaur et al., 2019), entre otros. Lo anterior se evidencia principalmente en los países en desarrollo, mientras que, en los países desarrollados, los pesticidas producidos generan menos daños a los ecosistemas y no presentan tantos riesgos para sus usuarios (Kaur et al., 2019).

La simbiosis como característica principal de las HCH, permite erradicar las colonias de *Atta* o *Acromyrmex* si el hongo es un objetivo de control. Al depender netamente de *L. gongylophorus* para la subsistencia de la reina y el crecimiento de nuevas generaciones de hormigas obreras, la muerte del jardín fúngico conllevaría a la muerte del nido (Morais et al., 2015a). Para evitar esto, las hormigas son altamente selectivas entre los sustratos vegetales disponibles (Saverschek et al., 2010) basándose en sus características físicas y químicas como: dureza, aporte nutricional y efecto de los metabolitos secundarios sobre el jardín fúngico (Nelson et al., 2019). De esta forma, las hormigas pueden seleccionar entre plantas y evitar aquellas perjudiciales para el hongo.

En algunos estudios se han identificado plantas con potencial inhibitorio de algunas, como: *Spiranthera odoratissima* (Terezan et al., 2010), *Sesamum indicum* (Ribeiro et al., 2006), *Ricinus communis* (Bigi et al., 2004b), *Piper holtonii* (Salazar et al., 2020a), *Capsicum baccatum*, & *Capsicum frutescens* (Lobo-Echeverri et al., 2018), *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* & *Mentha piperita* (Morais et al., 2015b), *Pennisetum purpureum*, *Hyparrhenia rufa*, *Brachiara brizantha*, *Saccharum officinarum* (variedad SP80-1842) & *Paspalum* spp. (Castellani et al., 2009), y *Helietta puberola* (Almeida et al., 2009) contra *Leucoagaricus gongylophorus*. No obstante, a raíz de la amplia distribución geográfica, capacidad selectiva y defoliadora de las hormigas cortadoras de hojas, es necesario continuar reportando especies vegetales que puedan inhibir el crecimiento fúngico. Es por esto que el objetivo del presente estudio es determinar cómo influyen las características químicas de un conjunto de plantas en el desarrollo *in vitro* del hongo simbiote de las hormigas cortadoras de hojas, *Leucoagaricus gongylophorus*, abordándolo desde la relación tripartita entre hormiga-hongo-planta. Adicionalmente, se realizó una revisión sistemática para conocer las plantas que han sido evaluadas anteriormente como potenciales inhibidores del crecimiento del hongo simbiote.

## **2. Materiales y métodos.**

### **2.1. Revisión sistemática**

La búsqueda se llevó a cabo en cuatro bases de datos: PubMed, ScienceDirect, SpringerLink y Scopus usando las palabras claves: “Leucoagaricus gongylophorus” OR “Leaf cutting ants” AND “plant extracts”; “Leucoagaricus gongylophorus” AND “plant” AND “antifungal activity”; “Leucoagaricus gongylophorus” AND “Acromyrmex” OR “atta” AND “antifungal activity”; “Leucoagaricus gongylophorus” AND “plant extracts”; “Leucoagaricus gongylophorus” OR “leaf cutting ants” AND “plant extracts” OR “fungi inhibition” OR “secondary metabolites” OR “leaf extracts”. Los artículos seleccionados debían contener en su título una o más palabras clave de la búsqueda. Adicionalmente, se realizó un análisis de las referencias bibliográficas de cada artículo y se extrajeron aquellos que cumplían con los requisitos y se encontraron en la misma base de datos que el artículo fuente. Luego de recopilar todos los artículos, varios filtros fueron aplicados. Primero, se eliminaron los artículos repetidos; segundo, los títulos y resúmenes fueron analizados con mayor detalle y se descartaron aquellos que no tuvieran una aproximación al estudio del hongo simbionte, no tuvieran ensayos inhibitorios usando extractos de plantas o estuvieran enfocados en otras especies de hongos; tercero, los artículos restantes fueron leídos en su totalidad.

### **2.2. Selección de nidos activos de hormigas cortadoras de hojas**

El estudio se llevó a cabo en el Cerro Nutibara, uno de los siete cerros tutelares de la ciudad de Medellín junto con el cerro el Volador, Pan de azúcar, el Picacho, la Asomadera, las Tres Cruces y Santo Domingo. El cerro está ubicado en Belén (comuna 16) en el suroccidente de la ciudad a una altura de 1.562 msnm y una extensión de 33 hectáreas (Aprendeonline.edu.co, párr. 2). Como criterios de elección del lugar, se tuvo en cuenta la presencia de nidos de HCH, tamaño del cerro, ubicación, acceso a transporte y seguridad.

Se realizó una búsqueda de nidos activos que se encontraran cerca a los senderos peatonales del cerro y fueran de fácil acceso. De cada nido se colectó un individuo de forma manual usando pinzas metálicas y se preservaron en etanol al 70% en tarros plásticos. En el laboratorio se llevó a cabo la identificación taxonómica con ayuda de un estereoscopio electrónico Carl Zeiss Stereo Discovery V.12 (Kaika. Bogotá, Colombia ) y usando las claves presentes en el libro *Hormigas Cortadoras de Hojas de Colombia: Acromyrmex & Atta* (Fernández et al., 2015).

### **2.3. Experimentación de consumo de plantas por nidos de hormigas cortadoras de hojas**

Se seleccionaron 10 especies de plantas encontradas en el mismo recorrido realizado para la búsqueda de los nidos de hormigas cortadoras de hojas y que no tuvieran signos de forrajeo. Las plantas fueron identificadas usando los catálogos: *Flora de los bosques montanos de Medellín* (Alzate et al., 2013) y *Árboles Nativos y Ciudad: Aportes a la silvicultura Urbana de Medellín* (Alcaldía de Medellín, 2011).

Se cortaron y pesaron 50 gramos de hojas de cada especie usando tijeras podadoras de 7.5 pulgadas y pesola *light* de 100 gramos (Avinet Research Supplies). El material vegetal cortado fue puesto en platos desechables pandos de 26 cm de diámetro en los caminos de forrajeo de tres nidos diferentes durante dos horas con dos aberturas perpendiculares para permitir a las hormigas detectar y acceder más fácilmente al material vegetal. Este proceso se realizó por triplicado.

#### **2.4. Preparación de medio de cultivo para el crecimiento del hongo**

Se usó PDA al 50% preparado con 18g/L de PDA y 15g/L de agar bacteriológico. El medio fue esterilizado a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos. Posteriormente, fue acidificado usando ácido láctico a 1.5 ml/L a temperatura óptima entre 30 °C a 40 °C (D. Jimenez-Zapata, comunicación personal, 2 de enero de 2021).

#### **2.5. Colecta y preparación del hongo simbiote**

El hongo fue colectado de un nido silvestre activo correspondiente a *Atta cephalotes* (identificada en el sitio por medio de una de las hormigas soldado) (lat. 6.2362091, long. -75.5814386194). El hongo fue extraído por excavación y depositado en un recipiente de plástico previamente esterilizado con hipoclorito y transportado hasta el laboratorio donde se almacenó dentro de una nevera de poliestireno extendido rodeado de agua (mas no sumergido) para controlar la salida de las hormigas. Se tomaron fragmentos del hongo y se inocularon en cajas de Petri. Los inóculos permanecieron a temperatura ambiente cerrados con *4arafilm* para reducir las posibilidades de contaminación y minimizar la desecación. Los inóculos fueron repicados entre dos y tres veces por semana hasta obtener cultivos puros. La identidad del individuo se confirmó a través de la observación de gongilidias al microscopio (Bich et al., 2017; Castellani et al., 2009) por medio de tinción con azul de lactofenol (Morales Restrepo y Cardona-Castro, 2018).

#### **2.6. Preparación de extractos de plantas**

Se colectaron 500 gramos de material vegetal de las 10 especies de plantas. En el laboratorio se trocearon y almacenaron con 2.5 L de etanol al 96% (relación 1:5 m/v) en recipientes ámbar durante siete días (Bigi et al., 2004<sup>a</sup>) y se recuperó el extracto usando un tamiz de 25 µm. Los extractos filtrados fueron concentrados usando un rotaevaporador Laborota 4000 Heidolph Instruments (CTL Company. Medellín, Colombia) y rotaevaporador Büchi R-114 (CTL Company. Medellín, Colombia), junto con bombas de vacío Boeco R-300 (CTL Company, Colombia) y ME 2C NT (CTL Company. Medellín, Colombia) respectivamente, a una temperatura de 70 °C con rotación de 30 rpm durante dos horas o hasta observar rastros de la sustancia adheridos al balón de destilación de 1000 ml. Posteriormente, se vertieron en *beakers* y fueron colocados en estufa Dynamica Air Expert (Kaika. Bogotá, Colombia) durante 7 días a 45 °C hasta evaporar las trazas de etanol. Finalmente, se obtuvieron los pesos de cada extracto y fueron suspendidos en 150 ml de etanol al 96%. Los extractos se almacenaron en frascos de vidrio ámbar con tapa de rosca en nevera a 4 °C hasta su posterior uso.

## **2.7. Prueba de efecto de extractos de plantas en el crecimiento de *L. gongylophorus*.**

El experimento se llevó a cabo en cajas de Petri (60X15 mm, Marienfield Aleman). En cámara de bioseguridad *Biological Biobase Safety Cabinet* BSC-13011<sup>a</sup>2-X (CTL Company. Medellín, Colombia) se agregaron 200 µL de extracto a cada caja; seguidamente, se agregaron 10 ml de PDA al 50% previamente esterilizado y acidificado, obteniendo una concentración de los extractos de 2% v/v. El medio se mantuvo a 70 °C en plancha de calentamiento con agitador magnético dentro de la cámara para evitar su solidificación; cada caja fue agitada suavemente de forma circular para esparcir el extracto en el medio de cultivo. Se utilizó un control positivo, un control negativo y un control de solvente. Para el control positivo, los inóculos fueron sembrados en medio PDA al 50% acidificado. Para el control negativo, los inóculos fueron tratados en hipoclorito al 15% durante 30 s para inactivarlos y luego fueron sembrados en medio PDA al 50% acidificado. Para el control del solvente, se sustituyeron los extractos de las plantas por 200 µL de etanol al 96% para conocer si el solvente tuvo algún efecto significativo en el crecimiento del hongo. Este proceso se repitió siete veces para cada tratamiento y control. Todas las cajas se mantuvieron dentro de la cámara durante una hora con ventilación para evitar la condensación de agua.

Los inóculos de hongo fueron sembrados 24 h después de preparar los medios. Fragmentos de micelio fueron tomados de cultivos de entre 7 a 30 días crecidos en medio PDA al 50% usando pinzas entomológicas de punta delgada flameadas para esterilizarlas y colocándolos en el centro de la caja. Este proceso se hizo en cámara de flujo laminar *Flow 120H C4* (Scientific Products. Cali, Colombia). El registro del crecimiento de los inóculos se realizó una vez por semana durante cuatro semanas usando el estereoscopio electrónico y el área de crecimiento de los inóculos fue medida usando el programa Zen Lite Blue Edition 3.3.

## **2.8. Ensayos fitoquímicos de extractos de plantas**

Se llevaron a cabo ensayos fitoquímicos para detectar taninos, alcaloides, flavonoides y terpenoides, debido a que muchas sustancias químicas con efecto antifúngico se encuentran dentro de dichos grupos de compuestos orgánicos (Boulogne et al, 2012; Infante-Rodríguez et al., 2020; Lobo-Echeverri et al., 2018). Todos los ensayos se llevaron a cabo con diluciones 1:100 de los extractos obtenidos.

**Detección de taninos:** Se tomaron 2 ml de extracto y se mezclaron con 2 ml de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 5 gotas de cloruro férrico al 40%. El cambio a una coloración verde azulosa indicó presencia de taninos (Lobo-Echeverri et al., 2018; Shaikh & Patil, 2020).

**Detección de alcaloides:** A 3 ml de extracto se agregaron 5 gotas de solución de yoduro. La formación de un color azul se tomó como resultado positivo (Shaikh & Patil, 2020).

**Detección de flavonoides:** A 2 ml de extracto se agregaron 5 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%. Aquellos extractos que se tornaron color naranja revelaron la existencia de flavonoides (Shaikh & Patil, 2020).

Detección de terpenoides: 2 ml de extracto se evaporaron al baño maría usando un mechero bunsen y se resuspendieron en 2 ml de cloroformo. Luego, se agregaron 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% por las paredes del tubo y se calentó de nuevo al baño maría. La aparición de una solución de color gris indicó presencia de terpenoides (Shaikh & Patil, 2020).

## 2.9. Análisis estadístico

El consumo de las plantas fue analizado por medio de la prueba Tukey usando la función HSD.test de la librería agricolae (versión 1.3-3). Adicionalmente, se realizó un gráfico de caja usando la función boxplot del paquete gplots (versión 3.1.1). Para los ensayos *in vitro* se calculó la diferencia relativa (DR) del área de las réplicas de cada tratamiento usando la Ecuación 1, en donde  $A_f$  es el área final y  $A_i$  es el área inicial de cada réplica. Con los datos se realizó un análisis de varianza ANOVA contrastando cada tratamiento con los controles negativo y positivo. El *p-value* fue comparado con un nivel de significancia de 0.05, usando la función aov de la librería stats (versión 4.0.5)

$$\text{Ecuación 1 : } DR = \frac{A_f - A_i}{A_i} \times 100\%$$

Todos los análisis se realizaron en R Studio (versión 1.4.1106) (R Core Team, 2021).

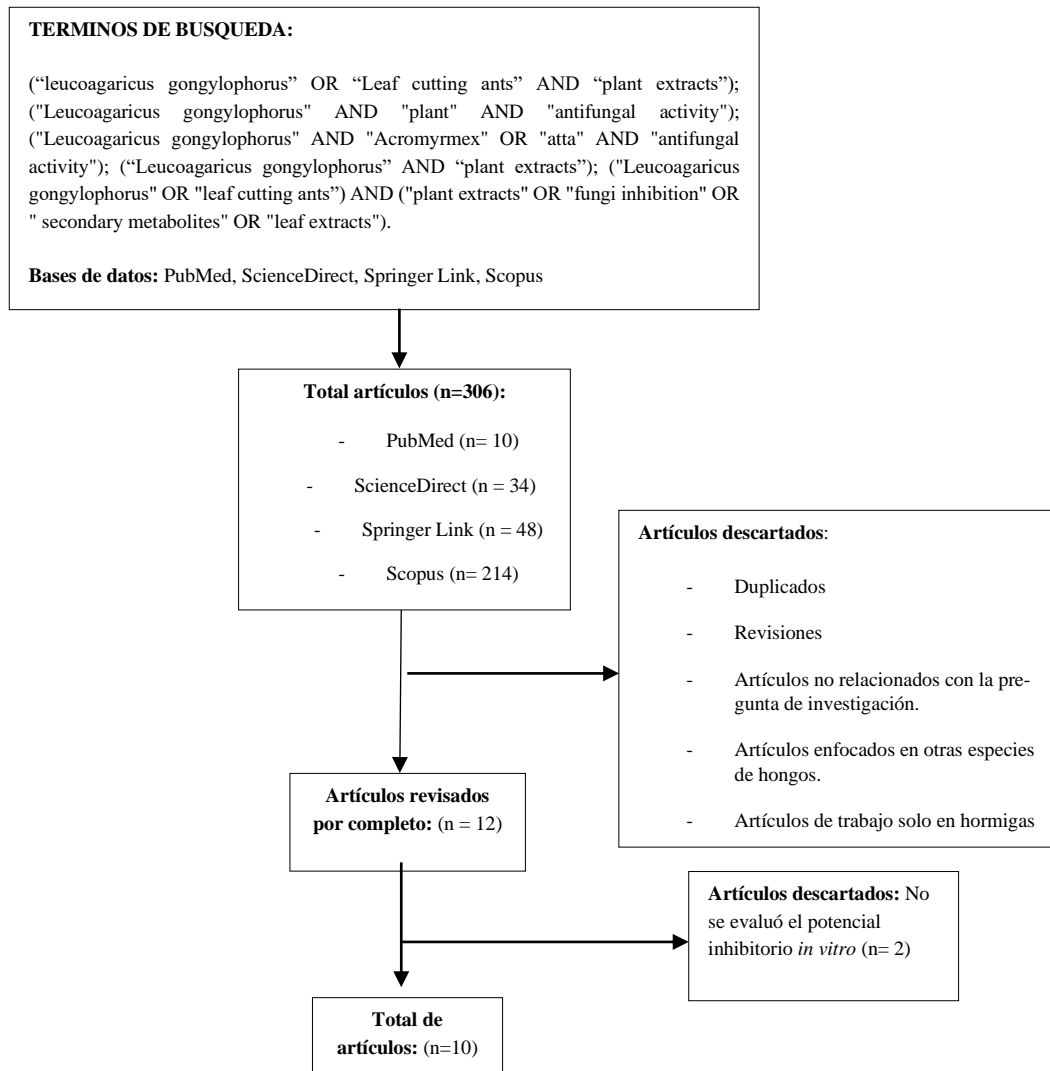
## 3. Resultados

### 3.1. Revisión sistemática

Los resultados del proceso de revisión sistemática se observan en la Figura 1.

Los 10 artículos seleccionados buscaban evaluar si las especies de plantas usadas tenían la capacidad de afectar el crecimiento de *L. gongylophorus*. Las especies de hormigas del género *Atta* fueron usadas en 8 artículos, mientras que el género *Acromyrmex* en los dos restantes. Dentro de *Atta*, *Atta sexdens rubropilosa* fue la especie más recurrente en cinco artículos, seguido de *Atta cephalotes* en dos artículos y *Atta capiguara* solo en uno. Dentro de *Acromyrmex*, *Acromyrmex balzani* y *Acromyrmex. Octospinosus* fueron usadas cada una en un solo artículo.

El hongo fue extraído de los nidos directamente, pero solo dos artículos especifica su colecta de nidos artificiales. La identificación taxonómica del hongo se basó en la presencia gongilidias. Entre las 10 investigaciones, el simbionte fue cultivado en cuatro medios diferentes: el medio diseñado por Pagnocca et al.,(1990), agar papa dextrosa (PDA – potato dextrose agar), agar extracto de malta (MEA – malt extract agar) y agar papa zanahoria (PCA – potato carrot agar), siendo usados en cuatro, tres, dos y un artículo respectivamente. Algunos de estos medios de cultivo fueron modificados para la experimentación, ya fuera para evitar la contaminación con agentes bacterianos (Boulogne et al.,2012; Salazar et al., 2020), o para complementar los nutrientes necesarios para el hongo (Bicalho et al., 2012; Boulogne et al., 2012).



**Figura 1.** Diagrama de flujo del proceso de revisión sistemática y selección de artículos sobre la inhibición de *Leucoagaricus gongylophorus* usando extractos de plantas

Para la extracción de los metabolitos secundarios se usaron diferentes partes como ramas, frutos y semillas. Las hojas fueron el órgano común para la obtención de extractos y evaluación con diferentes solventes: el agua, usada en cuatro artículos, fue el solvente más utilizado. El hexano, el metanol y el diclorometano, se usaron en tres artículos; el etil acetato, el cloroformo y el etanol fueron usados solo en un artículo cada uno. Sin embargo, están de acuerdo con que el grado de inhibición de los extractos de las plantas depende no solo del solvente, sino también de la concentración usada. En las diferentes metodologías utilizadas, secar los órganos

y pulverizarlos antes de extraer los metabolitos con ayuda del solvente fue un paso común en 6 artículos. Los demás artículos usan hidrodestilación, extracción por presión y congelación de las hojas.

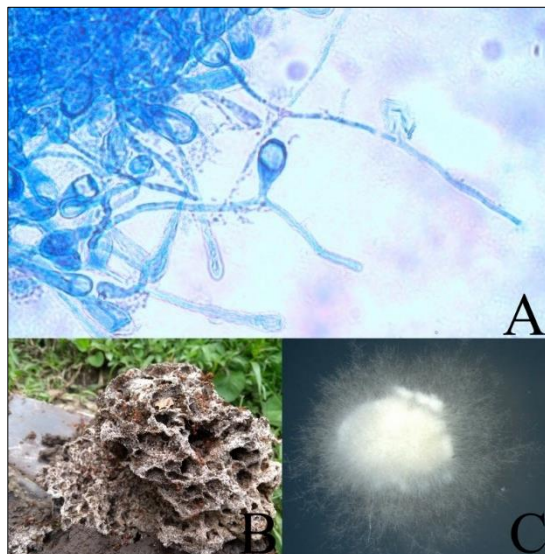
Debido a que en los artículos se evalúa el potencial de diferentes plantas (*Sesammum indicum*, *Viola sebifera*, *Aristolochia trilobata*, *Myrcia lundiana*, *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum*, *Mentha piperita*, *Pennisetum purpureum*, *Hyparrhenia rufa*, *Brachiara brizantha*, *Saccharum officinarum*, *Phaspalum spp.*, *Euphorbia cotinifolia*, *Piper holtonii*, *Allium cepa*, *allium sativum*, *Lycopersicon esculentum*, *Manihot esculenta* y *Senna alata*), se encontraron gran variedad de compuestos orgánicos con potencial antifúngico, como el dillapiole, la quercetrina, lignanos; ácidos grasos, como: ácidos tetradecanoico,

hexadecanoico, octadecanoico, icosanoico y docosanoico; alcaloides, terpenoides, entre otros. No obstante, Bigi et al.,(2004b); Melo et al.,(2020) y Ribeiro et al.,(2006) enfatizaron que el efecto sinérgico de los componentes de los extractos puede tener un mayor impacto en el control de la hormiga arriera. Por último, Boulogne, Ozier-Lafontaine, et al., (2012); Morais et al., (2015c); y Salazar et al., (2020b) consideraron que las sustancias deben ensayarse con nidos silvestres usando diferentes métodos como cebos para que las hormigas transporten los compuestos perjudiciales directamente a la colonia, o por medio de la termonebulización.

### 3.2. Selección de nidos, plantas, colecta e identificación de hongo

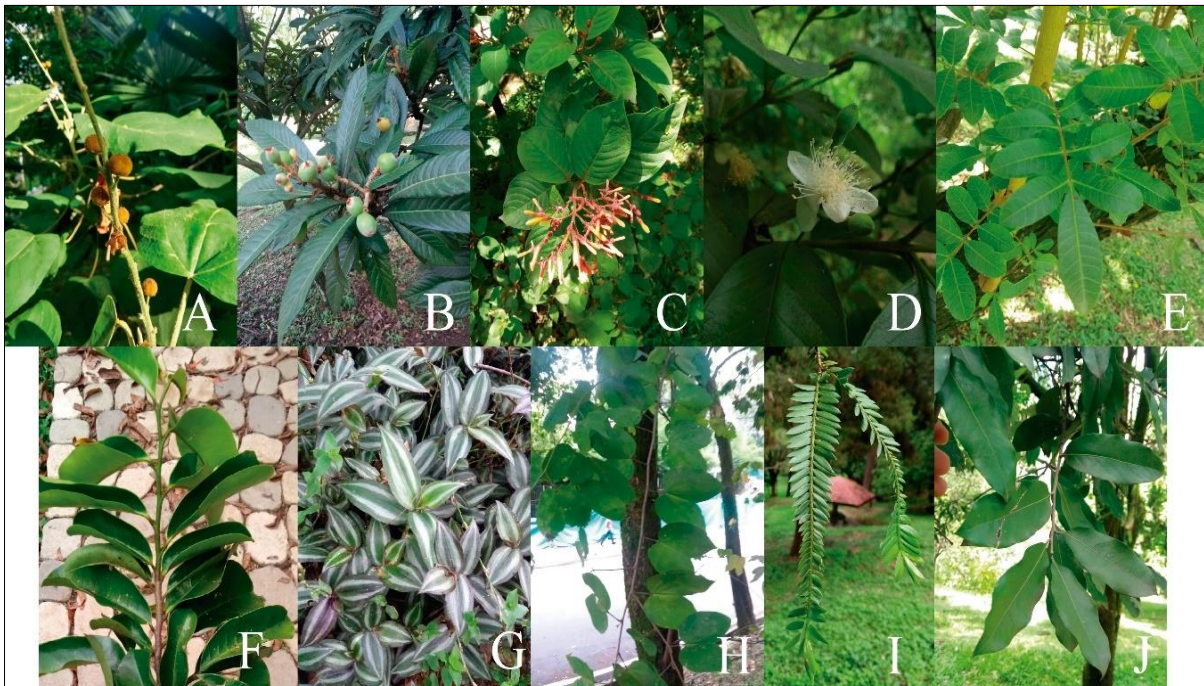
Se escogieron cinco nidos de hormigas cortadoras de hojas (Nido 1: 6.2365340, -75.578890; Nido 2: 6.2347920, -75.5789690; Nido 3 : 6.2346850, -75.5792760; Nido 4: 6.2346850, -75.5792760; Nido 5: 6.2354450, -75.5808050) y se identificaron como *Atta cephalotes*, confirmado por Fernando Fernández (comunicación personal, 11 de marzo de 2021). De los cinco nidos, los nidos 1, 3 y 4 fueron seleccionados para llevar a cabo experimentos de consumo de hojas debido al flujo constante de hormigas observado en al menos uno de sus caminos de forrajeo y la distancia de separación entre ellos.

Las plantas seleccionadas fueron *Annona muricata*, *Bauhinia sp.*, *Croton magdalenensis*, *Eriobotrya japonica*, *Hamelia patens*, *Licania sp.*, *Nageia rospigliossi*, *Psidium guajava*, *Schinus terebinthifolia* y *Tradescantia zebrina* (Figura 3). Las especies fueron confirmadas por Camila Martínez Aguillón (comunicación personal, 12 de febrero de 2021). Adicionalmente, El hongo colectado fue identificado como *Leucoagaricus gongylophorus* (Figura 2).



**Figura 2.** Morfología de *Leucoagaricus gongylophorus*. **2A.** Vista microscópica del micelio (40X). Las gongilidias son señaladas con la flecha. **2B.** Muestra del jardín fúngico extraído de una colonia de *A. cephalotes*; **2C.** Crecimiento *in vitro* en PDA al 50%.



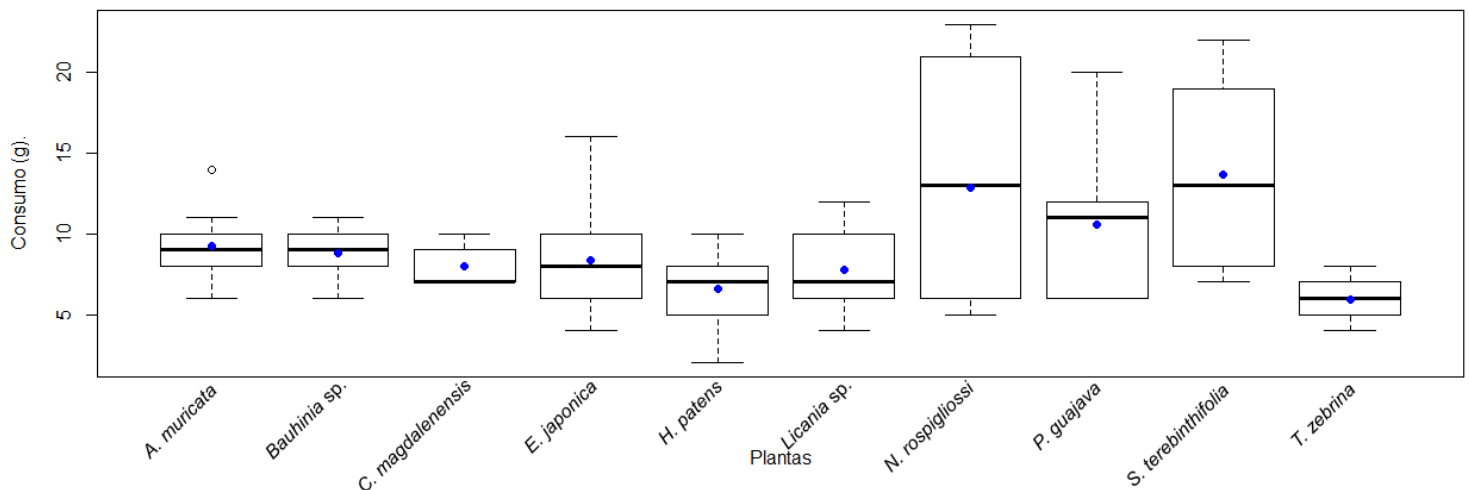


**Figura 3.** Especies de plantas escogidas para la experimentación. Las hojas o flores corresponden a: **A.** *Croton magdalenensis*; **B.** *Eriobotrya japonica*; **C.** *Hamelia patens*; **D.** *Psidium guajava*; **E.** *Schinus terebinthifolia*; **F.** *Annona muricata*; **G.** *Tradescantia zebrina*; **H.** *Bauhinia* sp; **I.** *Nageia rospigliossi*; **J.** *Licania* sp.

### 3.3. Experimentación de consumo de las plantas por nidos de hormigas cortadoras de hojas

No se encontraron diferencias significativas entre el consumo de *P. guajava*, *A. muricata*, *Bauhinia* sp., *E. japonica*, *C. magdalenensis* y *Licania* sp. Sin embargo, si hubo diferencias significativas entre el consumo de *S. terebinthifolia* y *N. rospigliossi*, y *H. patens* y *T. zebrina*, las cuales fueron las plantas que registraron mayor y menor consumo, respectivamente, como se muestra en la Tabla 4. Adicionalmente, las hormigas presentaron comportamientos variados con los sustratos presentados, debido a que los platos con hojas de *S. terebinthifolia* y *N. rospigliossi* eran forrajeadas con avidez, mientras que con las hojas de las otras plantas no mostraban un interés marcado.

#### Consumo de diez especies de plantas por *Atta cephalotes*

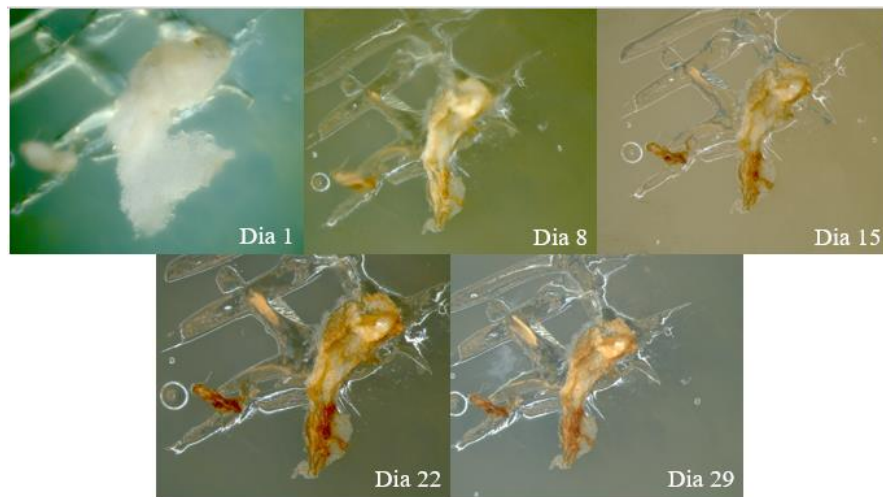


**Figura 4.** Gráfico de caja de la distribución del consumo en gramos (ubicado en el eje y) de diez especies de plantas (ubicadas en el eje x) por tres nidos de *Atta cephalotes*. Los puntos azules indican la media de los datos. Ver datos en Anexo 1.

### 3.4. Prueba de efecto de los extractos de plantas en el crecimiento de *L. gongylophorus*

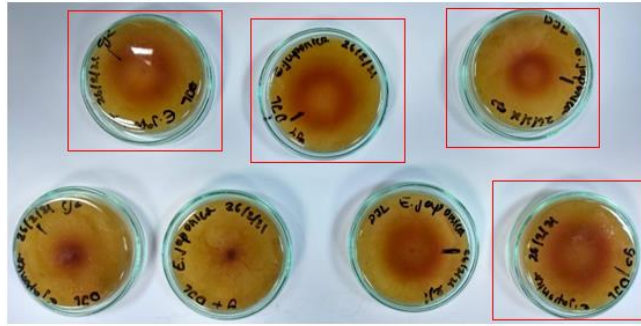
Casi todos los extractos de las plantas causaron un decrecimiento efectivo de los inóculos fúngicos en comparación con el control negativo ( $p < 0.05$ ). Los inóculos sembrados en medio con extracto de *Bauhinia* sp. mostraron el mayor decrecimiento en el período de evaluación, como se muestra en la Tabla 2, mientras que el efecto inhibitorio de *T. zebrina* fue similar al hipoclorito al 15% usado en el control negativo ( $p \geq 0.05$ ). Así mismo, fueron efectivos al inhibir el crecimiento al ser comparados con el control positivo, incluyendo a *T. zebrina* ( $p < 0.05$ ). Se encontró que el etanol tuvo un efecto significativo en el crecimiento de *L. gongylophorus* cuando se comparó con el control positivo (Anexo 2), debido a que las réplicas del control de solvente presentaron un tamaño menor en comparación con las réplicas del control positivo.

La morfología de los inóculos cambió notoriamente desde la primera semana de experimentación; perdieron su color blanco y apariencia esponjosa inicial, y se tornaron de color marrón y un aspecto duro y compacto (Figura 5). A excepción de los medios con extracto de *T. zebrina* y *Bauhinia* sp., todos los medios se tornaron de color naranja, cuya intensidad varió entre tratamientos y réplicas. De los tratamientos han de resaltarse dos: los que contenían extractos de *E. japonica* y *S. terebinthifolia*, porque los efectos fueron los que más resaltaron. Las réplicas de *E. japonica* presentaron dos patrones: uno donde la coloración se desprendía desde el inóculo y otro donde la coloración se formaba un anillo encerrando el inóculo. Por su parte, los extractos de *S. terebinthifolia* ejemplifican como se dio la coloración en los demás tratamientos, sin embargo, en una de las réplicas este extracto pudo dañar el agar de forma vertical en el sitio de inoculación. (Figura 6).

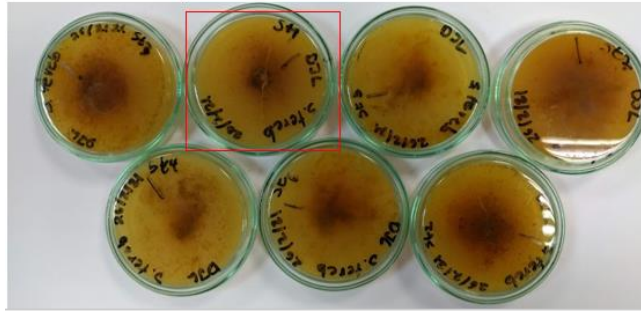


**Figura 5.** Registro fotográfico de los cambios en un inóculo de *L. gongylophorus* cultivado en medio PDA al 50% con extracto de *Bauhinia* sp durante 29 días

*Eriobotrya japonica*



*Schinus terebinthifolia*



**Figura 6.** Registro de los cambios de coloración en los medios de cultivo durante la experimentación con extractos de plantas. **6A.** Réplicas de los ensayos con extracto de *Eriobotrya japonica*. Los medios que presentaron coloración alrededor del inóculo en forma de anillo son señalados con cuadros rojos. **6B.** Réplicas del ensayo con extracto de *Schinus terebinthifolia*. Se señala con un cuadro rojo la réplica que presentó daño en el medio de cultivo.

**Tabla 1:** Consumo en gramos de las diez especies de plantas por tres nidos de *Atta cephalotes*. Las hojas fueron picadas y puestas en platos desechables en los caminos de forrajeo durante dos horas. Se muestra el consumo promedio de cada planta y la diferencia significativa entre plantas de acuerdo con la prueba de Tukey. Las plantas con **ab** indica que sus medias no son estadísticamente significativas, mientras que aquellas con la letra **a** sus medias son significativamente diferentes de aquellas con la letra **b**.

Planta	Nido 1		Nido 2		Nido 3		Consumo promedio/planta	Prueba de Tukey
	Consumo total (g)	% de consumo	Consumo total (g)	% de consumo	Consumo total (g)	% de consumo		
<i>A. muricata</i>	22	15	29	19	32	21	9.22	ab
<i>Bauhinia</i> sp.	25	17	27	18	27	18	8.77	ab
<i>C. magdalenensis</i>	24	16	24	16	24	16	8	ab
<i>E. japonica</i>	32	21	17	11	26	17	8.33	ab
<i>H. patens</i>	15	10	22	15	22	15	6.55	b
<i>Licania</i> sp.	17	11	23	15	30	20	7.77	ab
<i>N. rospigliossi</i>	57	38	25	17	34	23	12.88	a
<i>P. guajava</i>	37	25	25	17	33	22	10.55	ab
<i>S. terebinthifolia</i>	44	29	49	33	30	20	13.66	a
<i>T. zebrina</i>	20	13	15	10	18	12	5.88	b

**Tabla 2:** Promedio de la diferencia de crecimiento en el tiempo de los inóculos en medio PDA al 50% con adición de extractos de plantas. Se realizaron pruebas de varianza ANOVA de cada tratamiento con los controles. Los valores de *p-value* obtenidos fueron registrados y comparados con un nivel de significancia de 0.05.

Planta origen del extracto	Promedio de diferencia de crecimiento (%)	<i>p-value</i>	
		Control negativo	Control positivo
<i>A. muricata</i>	-38	0.00703	0.00374
<i>Bauhinia</i> sp	-49	0.00157	0.00373
<i>C. magdalenensis</i>	-27	0.0341	0.00378
<i>E. japonica</i>	-28	0.0215	0.00379
<i>H. patens</i>	-33	0.0115	0.00375
<i>Licania</i> sp.	-16	0.0357	0.00380
<i>N. rospigliossi</i>	-38	0.0013	0.00372
<i>P. guajava</i>	-27	0.0103	0.00378
<i>S. terebinthifolia</i>	-30	0.0065	0.00379
<i>T. zebrina</i>	-6	0.053	0.00379
Control etanol	2077	-----	0.0252
Control positivo	7881	-----	-----
Control negativo	-28	-----	-----

### 3.5. Análisis fitoquímico de extractos de plantas

A diferencia de *Bauhinia* sp. y *C. magdalenensis*, ocho plantas fueron positivas para flavonoides. Los alcaloides no fueron detectados en ninguno de los extractos. Con respecto a los taninos, solo *P. guajava* y *S. terebinthifolia* los presentaron, mientras que *Bauhinia* sp. fue de la única especie que se reportó presencia de terpenoides (Tabla 3).

**Tabla 3:** Resultados del análisis fitoquímico cualitativo realizado a las 10 especies de plantas evaluadas. La presencia de los metabolitos se indica con (+) y la ausencia se indica con (-).

Planta	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Alcaloides
<i>A. muricata</i>	-	+	-	-
<i>Bauhinia</i> sp	-	-	+	-
<i>C. magdalenensis</i>	-	-	-	-
<i>E. japonica</i>	-	+	-	-
<i>H. patens</i>	-	+	-	-
<i>Licania</i> sp	-	+	-	-

Planta	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Alcaloides
<i>N. rospigliossi</i>	-	+	-	-
<i>P. guajava</i>	+	+	-	-
<i>S. terebinthifolia</i>	+	+	-	-
<i>T. zebrina</i>	-	+	-	-

#### 4. Discusión

En el presente estudio, se reportan diez especies de plantas que inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Leucoagaricus gongylophorus*, donde inóculos de dicho hongo, crecidos en medios de cultivo que contenían extractos de los metabolitos secundarios, sufrieron cambios en su morfología y un decrecimiento de tamaño. El efecto de los extractos obtenidos, en parte, fue el esperado basado en los ensayos de consumo de plantas llevado a cabo en el cerro, puesto que las plantas que tuvieron un consumo bajo causaron inhibición de los inóculos, a excepción de *N. rospigliossi* y *S. terebinthifolia*, las cuales, de acuerdo con los resultados obtenidos y las observaciones realizadas, fueron las plantas más preferidas entre las diez especies evaluadas, pero que igualmente causaron inhibición del hongo simbionte. Los datos de consumo registrados y el comportamiento de forrajeo permiten suponer que los nidos habían tenido contacto con estas dos especies y que pudieron ser usadas como fuente de alimento anteriormente. Sin embargo, es posible que con el aumento del tamaño y la ampliación de su área de forrajeo (Urbas et al., 2007), los nidos hayan detectado plantas más palatables para ellas mismas y nutritivas para el hongo, influyendo en sus preferencias alimenticias y modificando el esfuerzo de forrajeo hacia las mejores opciones, bajando a *N. rospigliossi* y *S. terebinthifolia* en la clasificación de sustratos. Esto estaría de acuerdo con la afirmación hecha por Saverschek et al. (2010), quienes explican que los animales clasifican los recursos encontrados en su área de forrajeo y parecen concentrar sus esfuerzos en los mejores ítems. Esta explicación podría atribuírsele al resto de plantas que no fueron bien consumidas, especialmente *T. zebrina* por ser la planta con menor consumo registrado.

Conforme a las diferencias de consumo observadas durante los ensayos de consumo con las colonias y las hojas, se esperaba que los extractos de *A. muricata*, *Bauhinia* sp., *C. magdalenensis*, *E. japonica*, *H. patens*, *Licania* sp., *P. guajava* y *T. zebrina* causaran un impacto negativo en el hongo, explicando por qué las hormigas no forrajeaban sus hojas, puesto que si las hormigas encuentran un sustrato perjudicial para el simbionte, interrumpen inmediatamente su consumo (Arenas & Roces, 2017), mientras que *N. rospigliossi* y *S. terebinthifolia* ayudarían al crecimiento de los inóculos; pero los resultados de la experimentación arrojaron que incluso las plantas aceptadas pudieron dañar al hongo. Una razón que ayude a entender por qué *N. rospigliossi* y *S. terebinthifolia* fueron consumidas a pesar de sus efectos adversos se puede deber a la capacidad de *L. gongylophorus* de defenderse contra ciertos metabolitos secundarios, demostrado por los cambios físicos que se presentaron en los medios de cultivo con ocho de los extractos, incluidos los de estas especies. Es factible

que estos cambios se hayan producido por un intento de los inóculos de defenderse contra los metabolitos secundarios. Pero es probable que, por la alta concentración del extracto en el medio y el tamaño del inóculo, su capacidad de defensa fuera superada y no pudieran neutralizar los metabolitos perjudiciales. Adicionalmente, la falta de hormigas puede influir en la baja capacidad de los inóculos de contrarrestar los compuestos dañinos. Al consumir las gongilidias, las hormigas jardineras ingieren proteínas capaces de metabolizar aquellos metabolitos secundarios que puedan dañar la integridad del jardín fúngico y agregan a los sustratos vegetales a través de las heces cuando preparan la pulpa alimenticia (Infante-Rodríguez et al., 2020). Es posible que la defensa del hongo sea limitada y no pueda contrarrestar todos los metabolitos, por lo cual en los medios con extractos de *Bauhinia* sp. y *T. zebrina* no presentaron cambios. Esta característica de no ser contrarrestadas por el simbionte da luces para predecir que estas dos plantas podrían ser las mejores opciones entre las diez especies evaluadas para controlar los jardines fúngicos. Sin embargo, para afirmar asegurar la anterior suposición, debe hacerse un nuevo conjunto de experimentos, debido a que la metodología aplicada no estaba dirigida a determinar cuál de las plantas tendría la mayor eficiencia en la inhibición del crecimiento fúngico. Para esto, el objetivo y el diseño experimental deben ser guiados a clasificar las diez especies de plantas con base en el porcentaje de inhibición que causen cada uno de sus extractos a *L. gongylophorus* a partir de diferentes concentraciones por debajo a la evaluada en este experimento, siendo la mejor planta aquella cuya concentración inhibitoria mínima (MIC) sea la más baja dentro del conjunto de plantas, mientras se compara con el extracto de una planta cuya eficiencia de inhibición ya haya sido reportada a una baja concentración anteriormente, como *Senna alata* (Boulogne, Ozier-Lafontaine, et al., 2012).

Se han reportado 384 compuestos con capacidad antifúngica, donde 123 son compuestos fenólicos, 30 alcaloides y 80 terpenoides (Boulogne, Petit, et al., 2012). Al menos uno de estas familias ha sido detectados en las plantas utilizadas en esta investigación (Afzal, et al., 2017; Baghalpour et al., 2021; Biswas et al., 2013; Mogole et al., 2020; Quijano-Célis et al., 2013; Sánchez Peralta et al., 2015; Silva et al., 2012; Surana & Wagh, 2015; Uliana et al., 2016; Usunobun et al., 2015), por lo que su actividad inhibitoria se le podría adjudicar a estos compuestos; pero, de acuerdo con los ensayos fitoquímicos (Tabla 3), la presencia de taninos, alcaloides, flavonoides y terpenoides es muy variable o nula, lo que difiere con lo reportado y por tanto no podrían ser los causantes del decrecimiento fúngico. No obstante, sería necesario identificar de forma más detallada los compuestos que componen los extractos fitoquímicos usados en la experimentación. La presencia de un grupo específico de metabolitos secundarios no implica que sea el responsable de la inhibición del inóculo. Un ejemplo de esto es *S. terebinthifolia*, la cual tuvo un resultado positivo para taninos y, aun así, fue una de las plantas con mayor consumo registrado. Otra planta rica en taninos y que también fue forrajada por HCH fue reportada por Infante-Rodríguez et al.,(2020) quienes registraron a *Styrax glabrescens* como una planta que era usada por hormigas de la especie *Atta mexicana* a pesar de ser rica en flavonoides y taninos.

## 5. Conclusión

Los resultados obtenidos dan pie para continuar estudiando las diez plantas como posibles agentes reguladores de las poblaciones de hormigas cortadoras de hojas a través del control de los jardines fúngicos, especialmente

*T. zebrina* y *Bauhinia* sp. Es necesario entender de forma más detallada el comportamiento de *Leucoagaricus gongylophorus* al ser sometido a los extractos de las plantas, analizando el crecimiento del hongo al llevar a cabo evaluaciones *in vitro* con concentraciones más bajas de los extractos que permitan comparar si la respuesta de los inóculos es similar a las reportadas, el porcentaje de inhibición crece o, por el contrario, si la supervivencia del hongo aumenta.

## Referencias

- Afzal, J., Ullah, N., Hussain, Z., Rukh, S., RAYaz, M., Akbar, A., & Zaman, A. (2017). Phytochemical Analysis and Antibacterial Potential of Leaf Extract of *Bauhinia* Linn.: an Ethnomedicinal Plant. *Matrix Science Pharma (MSP)*, 1(2), 17–19. <https://doi.org/10.26480/msp.02.2017.17.19>
- Alcaldía de Medellín. (2011). Árboles nativos y ciudad, aportes a la silvicultura urbana de Medellín. In *Fondo Editorial Jardín Botánico de Medellín*.
- Almeida, R., Peñaflores, M., Simote, S., Bueno, O., Hebling, M., Pagnocca, F., Fernandes, J., Vieira, P., & Da Silva, M. (2009). Toxicity of Substances Isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *BioAssay*, 2(0). <https://doi.org/10.14295/ba.v2.0.53>
- Alzate, F., Idárraga, Á., Días, O., & Rodríguez, W. (2013). Flora de los bosques montanos de Medellín. In *Programa Expedición Antioquia-2013 Series Biodiversidad y Recursos Naturales* (Vol. 84). <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>
- Arenas, A., & Roces, F. (2017). Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants : Learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS One*, 12(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171388>
- Baghalpour, N., Abdulmajid Ayatollahi, S., Naderi, N., Hosseinabadi, T., Taheri, Y., Mahroo-Bakhtiyari, J., Shinwari, Z. K., Khalil, A. T., & Sharifi-Rad, J. (2021). Antinociceptive and anti-inflammatory studies on *Tradescantia zebrina*. *Pakistan Journal of Botany*, 53(1), 9. [https://doi.org/10.30848/pjb2021-1\(31\)](https://doi.org/10.30848/pjb2021-1(31))
- Bicalho, K. U., Terezan, A. P., Martins, D. C., Freitas, T. G., Fernandes, J. B., Da Silva, M. F. D. G. F., Vieira, P. C., Pagnocca, F. C., & Bueno, O. C. (2012). Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. *Psyche (London)*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/785424>
- Bich, G. A., Castrillo, M. L., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2017). Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4), 851–856. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.010>
- Bigi, M. F. M. A., Torkomian, V. L. V., De Groote, S. T. C. S., Hebling, M. J. A., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., & Da Silva, M. F. G. F. (2004a). Activity of *Ricinus communis* (euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (hymenoptera: formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Management Science*, 60(9), 933–938. <https://doi.org/10.1002/ps.892>
- Bigi, M. F. M. A., Torkomian, V. L. V., De Groote, S. T. C. S., Hebling, M. J. A., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., & Da Silva, M. F. G. F. (2004b). Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (hymenoptera: formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Management Science*, 60(9), 933–938. <https://doi.org/10.1002/ps.892>
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., & Yadav, A. (2013). Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International*

- Boulogne, I., Ozier-Lafontaine, H., Germešn-Robineau, L., Desfontaines, L., & Loranger-Merciris, G. (2012). *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) management: Effects of TRAMILs fungicidal plant extracts. *Journal of Economic Entomology*, 105(4), 1224–1233. <https://doi.org/10.1603/EC11313>
- Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., & Loranger-Merciris, G. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 10(4), 325–347. <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0359-1>
- Castellani, M. A., Forti, L. C., Fenille, R. C., Raetano, C. G., Moreira, A. A., Andrade, A. P. P., Camargo, R. S., Lemos, R. N. S., Aguiar, A. G., & Nagamoto, N. S. (2009). Growth of the symbiotic fungus of the grass-cutting ant *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae): Effect of grass extracts. *Sociobiology*, 54(1), 283–298.
- Cazal, C. de M., Domingues, V. de C., Batalhão, J. R., Bueno, O. C., Filho, E. R., da Silva, M. F. G. F., Vieira, P. C., & Fernandes, J. B. (2009). Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(19), 4307–4312. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.066>
- Fernández, F., Castro-Huertas, V., & Serna, F. (2015). Hormigas Cortadoras de hojas en colombia: *Acromyrmex* & *Atta*. In *Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: Acromyrmex & Atta (Hymenoptera: Formicidae)* (Issue 5).
- Franzel, C., & Farji-Brener, A. G. (2000). Opportunistic or selective? Plasticity in the diet of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* in NW Patagonia | ¿Oportunistas o selectivas? Plasticidad en la dieta de la hormiga cortadora de hojas *Acromyrmex lobicornis* en el noroeste de . *Ecologia Austral*, 10(2), 159–168.
- Infante-Rodríguez, D. A., Monribot-Villanueva, J. L., Mehlreter, K., Carrión, G. L., Lachaud, J. P., Velázquez-Narváez, A. C., Vásquez-Reyes, V. M., Valenzuela-González, J. E., & Guerrero-Analco, J. A. (2020). Phytochemical characteristics of leaves determine foraging rate of the leaf-cutting ant *Atta mexicana* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology*, 30(4), 147–159. <https://doi.org/10.1007/s00049-020-00306-4>
- Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S., & Khan, I. (2019). Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(03), 1889–1897. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.224>
- Lewis, T., Pollard, G. V., & Dibley, G. C. (1974). Rhythmic foraging in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L) (Formicidae: Attini). *Journal of Animal Ecology*, 43(1), 129–141. <https://doi.org/10.2307/3163>
- Lobo-Echeverri, T., Salazar, L. C., Hernández, A., & Ortiz-Reyes, A. (2018). Effects of *Capsicum baccatum* and *C. frutescens* against *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(2), 137–145. <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i2.6684>
- Masiulionis, V. E., Rabeling, C., De Fine Licht, H. H., Schultz, T., Bacci, M., Santos Bezerra, C. M., & Pagnocca, F. C. (2014). A Brazilian population of the asexual fungus-growing ant *Mycocepurus smithii* (Formicidae, Myrmicinae, Attini) cultivates fungal symbionts with gongyldia-like structures. *PLoS ONE*, 9(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103800>
- Mehdiabadi, N. J., & Schultz, T. R. (2009). Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, 13(April), 37–55.
- Melo, C. R., Oliveira, B. M. S., Santos, A. C. C., Silva, J. E., Ribeiro, G. T., Blank, A. F., Araújo, A. P. A., & Bacci, L. (2020). Synergistic effect of aromatic plant essential oils on the ant *Acromyrmex balzani*



- (Hymenoptera: Formicidae) and antifungal activity on its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(14), 17303–17313. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08170-z>
- Mera-Rodríguez, D., Serna, F., Sosa-Calvo, J., Lattke, J., & Rabeling, C. (2020). A checklist of the non-leaf-cutting fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae) from Colombia, with new biogeographic records. *Check List*, 16(5), 1205–1227. <https://doi.org/10.15560/16.5.1205>
- Mogole, L., Omwoyo, W., & Mtunzi, F. (2020). Phytochemical screening, anti-oxidant activity and  $\alpha$ -amylase inhibition study using different extracts of loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves. *Heliyon*, 6(8), e04736. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04736>
- Morais, W. C. C., Lima, M. A. P., Zanuncio, J. C., Oliveira, M. A., Bragança, M. A. L., Serrão, J. E., & Lucia, T. M. C. D. (2015a). Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Industrial Crops and Products*, 65, 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.054>
- Morais, W. C. C., Lima, M. A. P., Zanuncio, J. C., Oliveira, M. A., Bragança, M. A. L., Serrão, J. E., & Lucia, T. M. C. D. (2015b). Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Industrial Crops and Products*, 65, 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.054>
- Morais, W. C. C., Lima, M. A. P., Zanuncio, J. C., Oliveira, M. A., Bragança, M. A. L., Serrão, J. E., & Lucia, T. M. C. D. (2015c). Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Industrial Crops and Products*, 65, 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.054>
- Morales Restrepo, N., & Cardona-Castro, N. (2018). Métodos de diagnóstico en micología. *Revista Ces Medicina*, 32(1), 41–52. <https://doi.org/10.21615/cesmedicina.32.1.5>
- Muñoz, N. A. (2017). Hormigas cortadoras de hojas en el departamento del Vaupés, Colombia: Una propuesta de manejo integrado. *Revista Vaupés Innova*, 1, 18–41.
- Nelson, A. S., Acosta, N. C., & Mooney, K. A. (2019). Plant chemical mediation of ant behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 32, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.12.003>
- Pagnocca, F. C., Da Silva, O. A., Hebling-Beraldo, M. J., Bueno, O. C., Fernandes, J. B., & Vieira, P. C. (1990). Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Bulletin of Entomological Research*, 80(3), 349–352. <https://doi.org/10.1017/S0007485300050550>
- Quijano-Célis, C., Gaviria, M., Vanegas-López, C., Ontiveros, I., Echeverri, L., Pino, J. A., & Morales, G. (2013). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Retrophyllum rospigliosii* (Pilger) C. N. Page Leaves from Colombia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 16(5), 595–599. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.854501>
- Raine, N. E. (2018). A systemic problem with pesticides. *Nature*, 561(7721), 40–41. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05917-0>
- Ribeiro, S. B., Pagnocca, F. C., Victor, S. R., Bueno, O. C., Hebling, M. J., Bacci Jr, M., Silva, O. A., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., & Silva, M. F. G. F. (2006). Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 27(3), 421–426. <https://doi.org/10.1590/s0301-80591998000300010>
- Salazar, L. C., Ortiz-Reyes, A., Rosero, D. M., & Lobo-Echeverri, T. (2020a). Dillapiole in *Piper holtonii* as an Inhibitor of the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* of Leaf-Cutting Ants. *Journal of Chemical Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01170-w>
- Salazar, L. C., Ortiz-Reyes, A., Rosero, D. M., & Lobo-Echeverri, T. (2020b). Dillapiole in *Piper holtonii* as

an Inhibitor of the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* of Leaf-Cutting Ants. *Journal of Chemical Ecology*, 46(8), 668–674. <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01170-w>

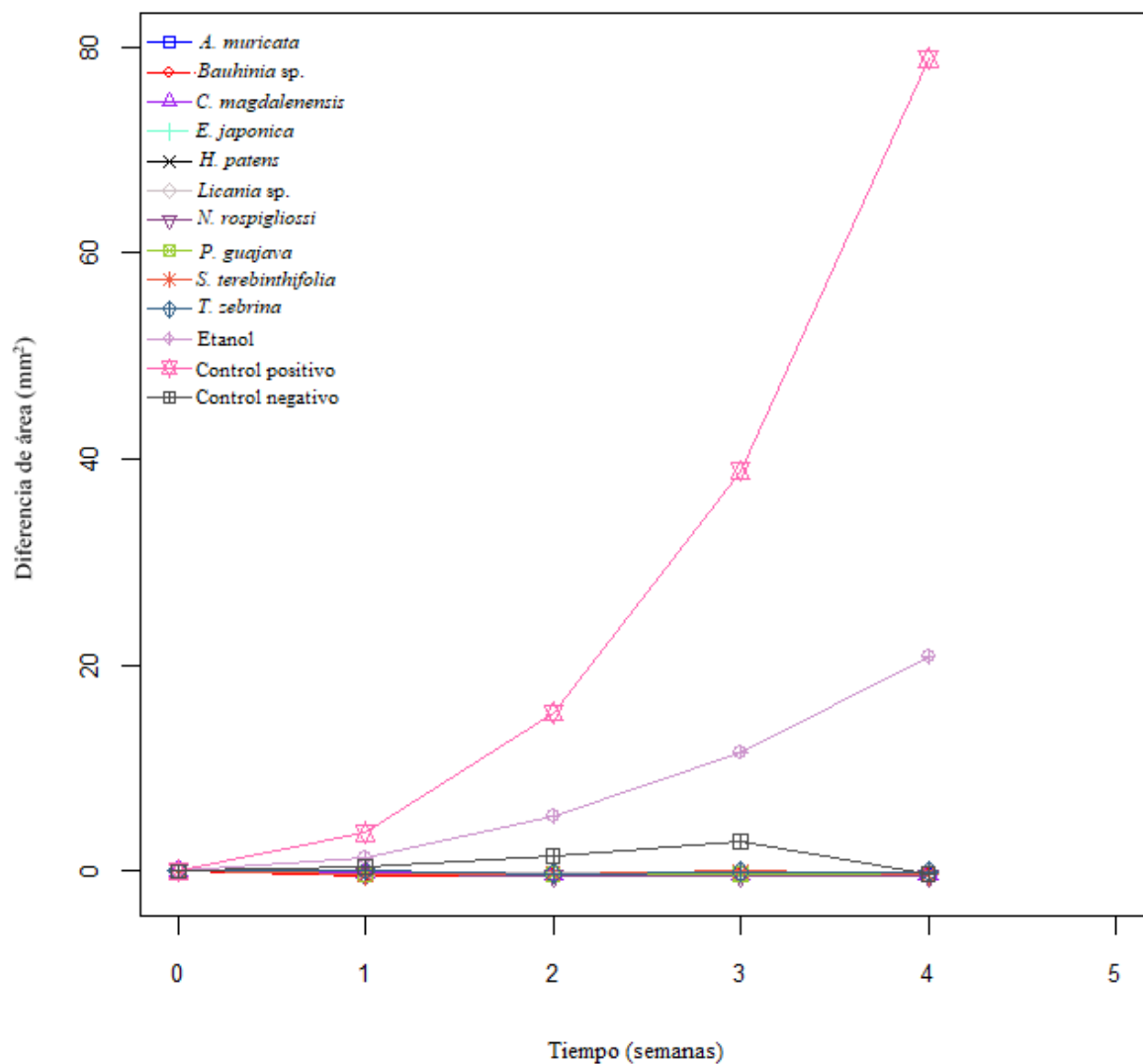
- Sánchez Peralta, W. F., Ospina Giraldo, L. F., Pérez Jaramillo, C. C., Murillo Arango, W., & Méndez Arteaga, J. J. (2015). Phytochemical screening, free radical scavenging, and anti-inflammatory activity of *Croton leptostachyus* kunth leaf extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(5), 197–201.
- Saverschek, N., Herz, H., Wagner, M., & Roces, F. (2010). Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour*, 79(3), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.12.021>
- Shaikh, J. R., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Silva, J. B. N. F., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Rodrigues, F. F. G., Costa, J. G. M., & Felipe, C. F. B. (2012). Antibacterial and antioxidant activities of *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Crhysobalanaceae). *Archives of Biological Sciences*, 64(2), 459–464. <https://doi.org/10.2298/ABS1202459S>
- Surana, A., & Wagh, R. (2015). Pharmacological review of *Hamelia patens*. *International Journal of Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*, 4(2), 290–295.
- Terezan, A. P., Rossi, R. A., Almeida, R. N. A., Freitas, T. G., Fernandes, J. B., Da Silva, M. F. D. G. F., Vieira, P. C., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., & Pirani, J. R. (2010). Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5), 882–886. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000500016>
- Uliana, M. P., Fronza, M., da Silva, A. G., Vargas, T. S., de Andrade, T. U., & Scherer, R. (2016). Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Industrial Crops and Products*, 83, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.077>
- Urbas, P., Araújo, M. V., Leal, I. R., & Wirth, R. (2007). Cutting more from cut forests: Edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in Brazil. *Biotropica*, 39(4), 489–495. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00285.x>
- Usunobun, U., Okolie, P. N., Anyanwu, G. ., Adegbeji, A. J., & E.M, E. (2015). Phytochemical Screening and Proximate Composition of *Annona muricata* Leaves. *European Journal of Botany Plant Science and Phytology*, 2(1), 18–28. [www.eajournals.org](http://www.eajournals.org)

## ANEXOS

**Anexo 1:** Datos de consumo recogidos durante la experimentación con nidos de *Atta cephalotes* durante 9 días. Se presenta la fecha de experimentación, las plantas ofrecidas a las hormigas cortadoras de hojas y la cantidad consumida por cada nido en gramos.

Fecha de experimentación	Planta	Consumo (g)		
		Nido 1	Nido 2	Nido 3
27/07/2020	<i>C. magdalenensis</i>	7	7	10
	<i>T. zebrina</i>	8	4	5
	<i>H. patens</i>	5	2	7
	<i>N. rospigliossi</i>	13	5	6
28/07/2020	<i>C. magdalenensis</i>	9	7	7
	<i>T. zebrina</i>	4	5	6
	<i>H. patens</i>	4	10	8
	<i>N. rospigliossi</i>	23	14	22
29/07/2020	<i>C. magdalenensis</i>	8	10	7
	<i>T. zebrina</i>	8	6	7
	<i>H. patens</i>	6	10	7
	<i>N. rospigliossi</i>	21	6	6
30/07/2020	<i>P. guajava</i>	6	6	12
	<i>S. terebinthifolia</i>	7	19	8
	<i>E. japonica</i>	16	4	6
	<i>Licania sp.</i>	4	6	8
3/08/2020	<i>P. guajava</i>	20	7	15
	<i>S. terebinthifolia</i>	16	8	9
	<i>E. japonica</i>	8	6	10
	<i>Licania sp.</i>	7	6	10
4/08/2020	<i>P. guajava</i>	11	12	6
	<i>S. terebinthifolia</i>	21	22	13
	<i>E. japonica</i>	8	7	10
	<i>Licania sp.</i>	6	11	12
5/08/2020	<i>Bauhinia sp.</i>	9	8	11
	<i>A. muricata</i>	6	8	10
6/08/2020	<i>Bauhinia sp.</i>	8	10	10
	<i>A. muricata</i>	9	11	14
10/08/2020	<i>Bauhinia sp.</i>	8	9	6
	<i>A. muricata</i>	7	10	8

### Crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus* durante cuatro semanas



**Anexo 2.** Líneas de tiempo del crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus* crecido en medio PDA al 50% con extractos de las 10 especies evaluadas durante cuatro semanas. Se reportan también el control positivo, negativo y con etanol.