

# Identificación de hongos entomopatogénicos de *Atta sexdens* en un sistema silvopastoril

Identification of entomo-pathogenic fungi of *Atta sexdens* in a silvopastoral system

Gloria Arminda Resquín-Romero<sup>1</sup>\*, Humberto Sarubbi-Orue<sup>1</sup>, Fanni Petrona Ruiz-Samudio<sup>1</sup>, Sergio Manuel Chamorro-Díaz<sup>1</sup>, Mirtha Vera de Ortiz<sup>2</sup>, Katarzyna Golan<sup>3</sup>, Inmaculada Garrido-Jurado<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agrarias. Docente Investigador del Área Protección Vegetal. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agrarias. Carrera de Ingeniería Forestal. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>3</sup>Universidad de Life Sciences en Lublin. Departamento de Protección Vegetal, Leszczyńskiego. Lublin, Polonia

<sup>4</sup>Universidad de Córdoba Departamento de Agronomía, ETSIAM. Campus de Rabanales. Córdoba, España.



10.57201/ieuna2323340

Sección: Artículo Original

\*Autor correspondiente:  
gloresqx@agr.una.py

Editor de área:  
Andrea Arrúa, Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). San Lorenzo, Paraguay

Editor invitado:  
Guillermo Enciso, Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT). Hohenau, Paraguay.

Recibido:  
25 de abril de 2023

Aceptado:  
06 de julio de 2023

Recibido en versión modificada:  
6 de julio de 2023

Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons "CC BY 4.0".



Declaración de conflicto: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

e-ISSN 2709 - 0817

Como citar: Resquín-Romero, G. A., Sarubbi-Orue, H. J., Ruiz-Samudio, F. P., Chamorro-Díaz, S. M., Vera de Ortiz, M., Golan, K. y Garrido-Jurado, I. (2023). Identificación de hongos entomopatogénicos de *Atta sexdens* en un sistema silvopastoril. *Revista investigaciones y estudios - UNA*, 14(2), 15-25.

**Resumen.** Las hormigas cortadoras Ysaú (*Atta sexdens*) son insectos sociales compuestas por una reina, soldados, obreras, jardineras y zánganos, formando un nido bien organizado y de difícil manejo y/o control. En Paraguay, en la última década, se ha convertido en una plaga invasora importante tanto para los cultivos forestales como agrícolas. El objetivo de la presente investigación fue la de identificar los hongos entomopatógenos (HE) en la zona de influencia de nidos, localizados en parcelas silvopastoril comercial de *Urochloa brizantha* MG-5 y *Eucalyptus* sp. La metodología para aislar HE fue el uso insectos trampas o cebos a base de hormigas reinas, colectadas e instalada en época de vuelo nupcial de los nidos de hormigas. Se utilizaron muestras de suelo de las parcelas silvopastoril y raíces de gramíneas (*U. brizantha*). También se aislaron de insectos muertos colectados. Los datos generados sobre la incidencia de insectos micosados se sometieron a análisis de varianza y las medias se sometieron a la prueba de Tukey. La comparación de las poblaciones de hormigas cortadoras de hojas se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes, cuyos resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre nidos para la variable hormigas micosados por hongos ( $H=2,463$ ;  $p>0,05$ ) y para la variable, muertos por otras causas ( $H=3,806$ ;  $p>0,05$ ). Los hongos entomopatógenos identificados fueron *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* sp. aisladas de hormigas cortadoras de micorrizas obtenidas del área de influencia de nidos en un sistema silvopastoril.

**Palabras clave:** *Beauveria*, biocontrol, insectos trampa, *Metarhizium*, Ysaú.

**Abstract.** Ysaú leaf cutter ants (*Atta sexdens*) are social insects made up of a queen, soldiers, workers, gardeners and drones, forming a well-organized nest that is difficult to manage and/or control. In Paraguay, in the last decade, it has become an important invasive pest for both forestry and agricultural crops. The objective of this research was to identify entomopathogenic fungi (HE) in the area of influence of nests, located in commercial silvopastoral plots of *Urochloa brizantha* MG-5 and *Eucalyptus* sp. The methodology to isolate HE was the use of insect traps or baits based on queen ants, collected and installed during the nuptial flight season of the ant nests. Soil samples from the silvopastoral plots and grass roots (*U. brizantha*) were used. They were also isolated from collected dead insects. The data generated on the incidence of fungal insects were subjected to analysis of variance and the means were subjected to Tukey's test. The comparison of the populations of leaf-cutter ants was carried out using the non-parametric Kruskal-Wallis test for independent samples, whose results showed that there were no significant differences between nests for the fungal ants variable ( $H=2.463$ ;  $p>0.05$ ) and for the variable, deceased from other causes ( $H=3.806$ ;  $p>0.05$ ). The entomopathogenic fungi identified were *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* sp. isolated from mycorrhizal cutter ants obtained from the area of influence of nests in a silvopastoral system.

**Keywords:** *Beauveria*, biocontrol, insect traps, *Metarhizium*, Ysaú.

## Introducción

Los hongos entomopatógenos (HE) se consideran componentes importantes de un manejo integrado de plagas, en particular para un sistema silvopastoril, sea esto como biopesticidas o como microorganismos naturales conservados en el medio ambiente (Quesada-Moraga et al., 2007). Sin embargo, hay poca información como potencial supresor natural de insectos y sus posibles efectos sobre los insectos bajo un manejo de la silvicultura. Los cambios en los paisajes naturales, debido a la intensificación agrícola, han causado una pérdida considerable de la biodiversidad y, por consiguiente, diezmar los servicios de un ecosistema. Sin embargo, la adopción de prácticas más amigables como el sistema silvopastoril puede fomentar condiciones abióticas y bióticas que conserven la biodiversidad y, en consecuencia, pueden restablecer la provisión de servicios naturales a los ecosistemas.

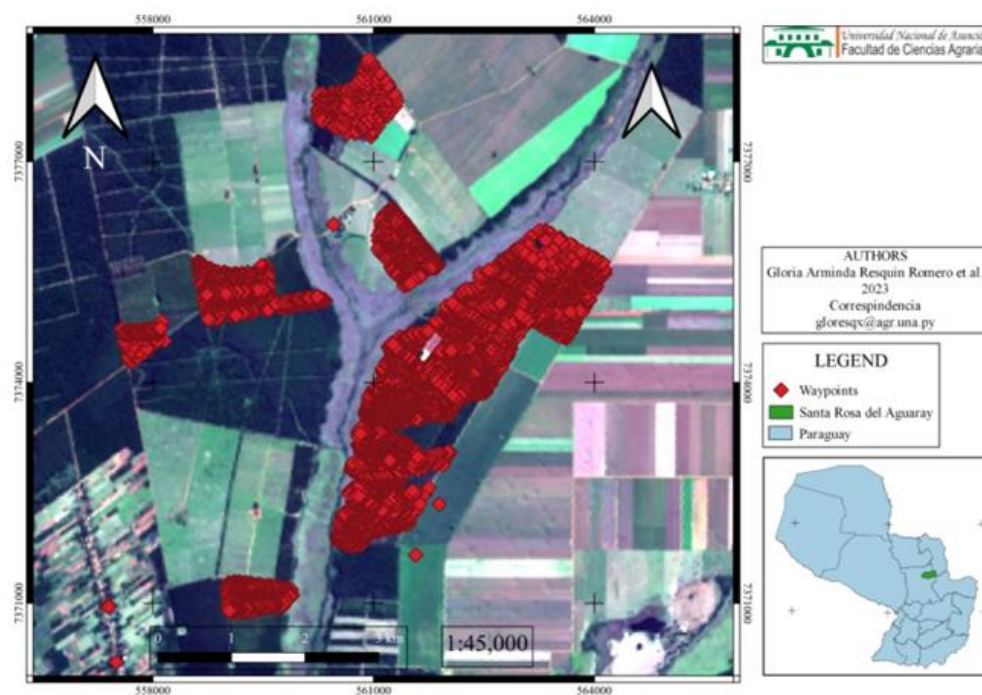
Existen más de 700 especies de entomopatógenas derivadas de la división de Ascomycota y Entomophthoromycota (Hibbett et al., 2007; Humber, 2012; Gryganskyi et al., 2013) tienen el potencial de controlar un rango de insectos plaga con su acción de contacto única; constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista sistemático y también presentan diferencias en cuanto a su biología, actúan por la vía tegumentaria y su virulencia frente a insectos, les convierte en un importante factor de regulación natural de sus poblaciones (Quesada-Moraga et al., 2007).

El objetivo general del presente trabajo fue identificar HE presentes en la zona de influencia de *Atta sexdens* (L., 1758) en un sistema silvopastoril (*Urochloa brizantha* MG-5 y *Eucalyptus* spp.); y cuyos objetivos específicos fueron: a) Colectar del área de estudio muestras de artrópodos muertos con crecimiento fúngico o por otras causas; b) Inspeccionar fuentes de los servicios naturales de un ecosistema, en suelos y área de la rizosfera de la planta, con el uso de la técnica de insecto trampa c) Identificar con el análisis molecular los controladores biológicos representativos obtenidos durante la inspección de campo. (2023)

## Materiales y Métodos

Se colectaron muestras de suelos, también se colectaron suelos adheridos a raíces de las plantas así también insectos muertos colonizados y no colonizados, de una parcela con sistema silvopastoril (*Urochloa brizantha* MG-5 y *Eucalyptus* sp.), de la localidad de Santa Rosa del Aguary (S23°43'39" W56°27'17"), Departamento de San Pedro, Paraguay, en dos oportunidades, noviembre y diciembre de 2019, utilizando el área de influencia de 20 nidos de hormigas cortadoras de hojas (*Atta sexdens*, Hymenoptera: Formicidae), de los cuales 10 nidos ubicados en áreas tratadas frecuentemente con productos químicos (Fipronil) y 10 nidos donde se dejó de utilizar tratamientos químicos por un año. Estos estaban localizados en un área de aproximadamente 5.000 m<sup>2</sup> de manejo silvopastoril combinando *U. brizantha* MG-5 con *Eucalyptus* sp. (distante 2m x 5m entre planta e hilera). En total, se utilizaron 100 puntos de muestreo. Cada punto de muestreo comprende un área de 0,25 m<sup>2</sup> con un

intervalo de 2 m y, cada nido con un área de 8 a 10 m ancho y 15 a 20 m de largo. La distancia promedio de muestreo entre nidos fue de 40 a 50 m, localizada al azar (Figura 1).



**Figura 1.** Geolocalización de nidos de hormigas cortadoras de hojas (*Atta sexdens*) e incidencia real en áreas rurales, parcelas silvopastoriles comerciales (*Urochloa brizantha* cv. MG-5 y *Eucaliptus* sp.)

La recolección de suelo se realizó en plena estación húmeda, a una profundidad de 0 a 10 cm, utilizando una barrena de metal para extraer suelos. También se extrajo raíces de plantas predominantes encontradas en cada punto de muestreo, se usó el suelo que se desprendió de las raíces para aislar los hongos (Figura 2 y 3).



**Figura 2.** A-B-C. Formación de nidos de hormigas cortadoras registradas bajo un sistema silvopastoril (*Urochloa brizantha* MG-5 y *Eucaliptus* sp.). Colecta de muestras: D. Suelos, E. Raíces de poáceas, E. Insectos. Localidad: Santa Rosa del Aguaray, Dpto. San Pedro, Paraguay., año 2019.

Cada muestra de suelo fue dividida en tres partes y distribuidas en bolsas de plásticos transparente de 200 ml. Una parte del suelo (200 g) fueron utilizadas para la detección de HE y otra se guardaron como material de reposición, en caso de pérdida de material. Todas estas muestras fueron conservadas a temperatura 4°C. No se utilizó control alguno en cuanto a sustrato suelo y raíces del área de la rizosfera se refiere.



**Figura 3.** A-B-C-D-E-F. Macromorfología de *A. sexdens* micosados colectados del área de influencia de nidos de hormigas cortadoras. G-H-I. Utilización de la técnica de insectos trampa (reinas aladas) como cebos para captura de hongos entomopatógenos. J-L. Obrera micosada por *Beauveria bassiana* en condiciones de cámara húmeda. K-M. Reinas aladas micosadas por *Metarhizium* sp. obtenida con uso de la técnica de insectos trampa en suelo y del área de la rizosfera de poáceas.

También se colectó insectos muertos colonizados y no colonizados *in situ*, particularmente poblaciones de hormigas; también otras poblaciones de insectos como cercopídeos (*Mahanarva fimbriolata*) (Figura 4). Todas estas muestras fueron etiquetadas de acuerdo con el origen y transportados en una conservadora al laboratorio del Área de Protección Vegetal (FCA-UNA).



**Figura 4.** Macromorfología de otros insectos colectados del área de influencia de nidos de hormigas cortadoras. A. Adultos de *Mahanarva fimbriolata*. B-C-D. *M. fimbriolata* micosados por *Metarhizium* sp. E-F. Nifas de *M. fimbriolata* micosados por *B. bassiana*. G. Estado ninfal.

Para el aislamiento de HE de suelos y del área de la rizosfera de pasturas se utilizó la técnica de insectos trampa (Zimmerman, 1986), a base de hormigas reinas de *Atta sexdens*. Estas hormigas reinas fueron capturadas y colectadas al momento cuando se disponían a abandonar el nido materno para copular con los zánganos, en el mes de diciembre de 2019. Para aislar el HE de insectos colonizadas y no colonizadas de muestras de suelo y rizosfera obtenidas del campo, se han adoptado dos métodos de acuerdo con la condición del insecto muerto (Garrido-Jurado et al., 2020), uno por transferencia conidial en placas de Petri con contenido de medio de cultivo selectivo y el otro método, los insectos sin crecimiento fúngico externo visible, se desinfestaron superficialmente y fueron incubados en condiciones de cámara húmeda. Después de 7 a 10 días de incubación a 25°C, se aislaron los hongos desarrollados. El ensayo se realizó por triplicado. Se eligieron colonias que mostraron características compatibles a los conocidos géneros de HE y algunos ocasionales hongos.

#### **Identificación y análisis moleculares**

La identificación de los hongos a nivel de género se realizó observando las estructuras microscópicas de cada aislado, bajo microscopio óptico (Microscopio Leica DM500 Alemania). Para la identificación de las estructuras fúngicas se utilizó la llave de identificación propuesto por Barnett y Hunter (1998).

El aislamiento, purificación e identificación morfológica se realizó en el laboratorio del Área de Protección Vegetal de la FCA, UNA y la amplificación del gen e identificación molecular de los aislados se realizó en el laboratorio del Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba, España.

El ADN total de los aislados se extrajo a partir de micelio liofilizado siguiendo el método de Raeder y Broda (1985). Se amplificó el gen del factor de elongación 1  $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), se secuenció y se analizó en cada uno de los aislados. La amplificación se realizó con los cebadores tef1fw (50-GTGAGCGTGGTATCACCA-30) (O'Donnell et al., 1998) y 1750-R (50-GACGCATGTACGGACGGC-30) (Garrido-Jurado et al., 2011) con las siguientes modificaciones: en un volumen total de reacción de 50  $\mu$ l que contenía 1,5  $\mu$ l de ADN genómico, 1X DreamTaq™ buffer con MgCl<sub>2</sub> (ThermoScientific, Waltham, MA, USA), 20 nM de cada cebador, 40 nM de mezcla de dNTPs y 0,25 U de DreamTaq™ DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Garrido-Jurado et al. (2011). Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1%, se purificaron utilizando GeneClean II kit system (QBiogene, Inc., Carlsbad, CA) y se secuenciaron por la empresa Stab Vida (Caparica, Portugal). Se analizaron las secuencias EF1- $\alpha$  de los aislados y el alineamiento entre estas y secuencias de la misma región de especies cercanas se realizó usando el programa MegAlign [DNASTAR package, London, UK]. El análisis filogenético se llevó a cabo mediante el programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Se realizó el árbol de máxima verosimilitud usando el criterio TBR (tree-bisection-reconnection), el soporte de las ramas se hizo mediante un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. Se utilizó una distribución discreta Gamma para calcular el modelo de la tasa de cambio entre sitios (5 categorías (+G, parámetro = 0,1893)]. Hubo un total de 853 posiciones en el dataset final. Para calcular la autocorrelación de tasas evolucionarias se ha utilizado el método Corrttest (Tao et al., 2019).

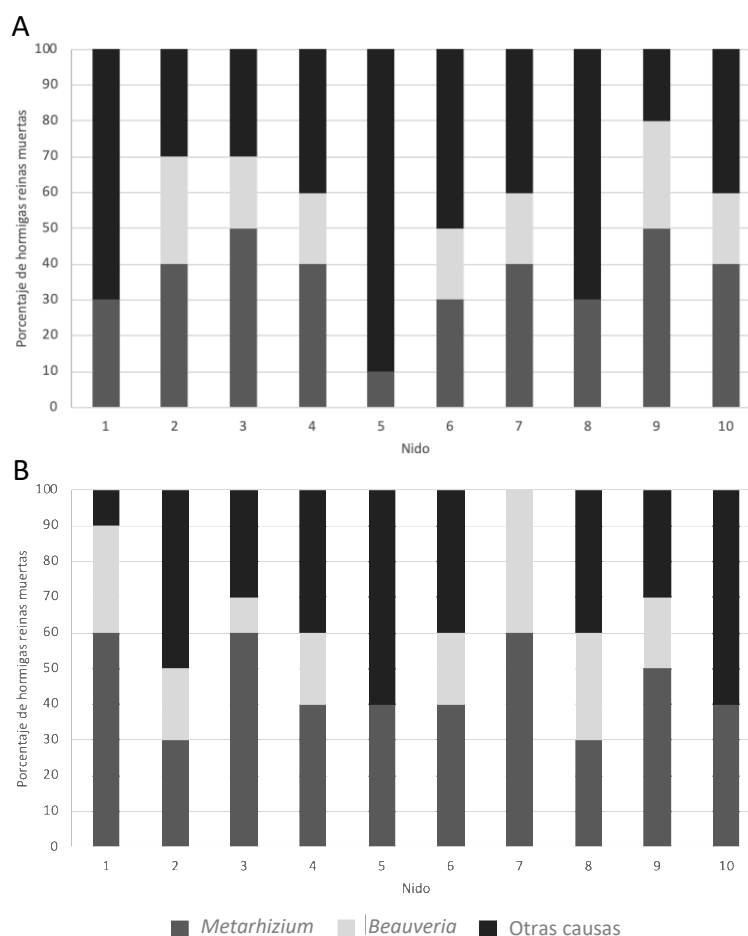
Los datos generados sobre incidencia de insectos micosados fueron sometidos a Análisis de Varianza (ANOVA) y las medias por el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) (Statistix 10, Analytical Software, 2013). La comparación de las poblaciones de hormigas cortadoras se realizó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para muestras independientes (SPSS 25).

## Resultados y Discusión

### Efectos de los hongos entomopatógenos sobre insectos trampa

Las esporas asexuales o conidios de los hongos entomopatógenos (HE) *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp., son los responsables de la infección de insectos y que se encuentran dispersos por el medio donde se encuentran sus hospedantes, en este caso sobre las hormigas cortadoras de hojas. En los 20 nidos muestreados, 10 nidos ubicados en áreas tratadas aplicación continua del producto químico (Fipronil), tanto en la zona de la rizosfera como en el resto del suelo, se han observado poblaciones de reinas aladas muertas por la infección de *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. (Tabla 1). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre nidos o entre las muestras de suelo y la rizosfera (a partir de ahora sitio) tanto para las reinas que mostraron crecimiento de *Metarhizium* sp. ( $F_{9,19}=1,95$ ,  $p > 0.05$  entre nidos;  $F_{1,19}=4,31$ ,  $p > 0,05$  entre sitios), de *Beauveria* sp. ( $F_{9,19}=0,94$ ,  $p > 0,05$  entre nidos;  $F_{1,19}=0,29$ ,  $p > 0,05$

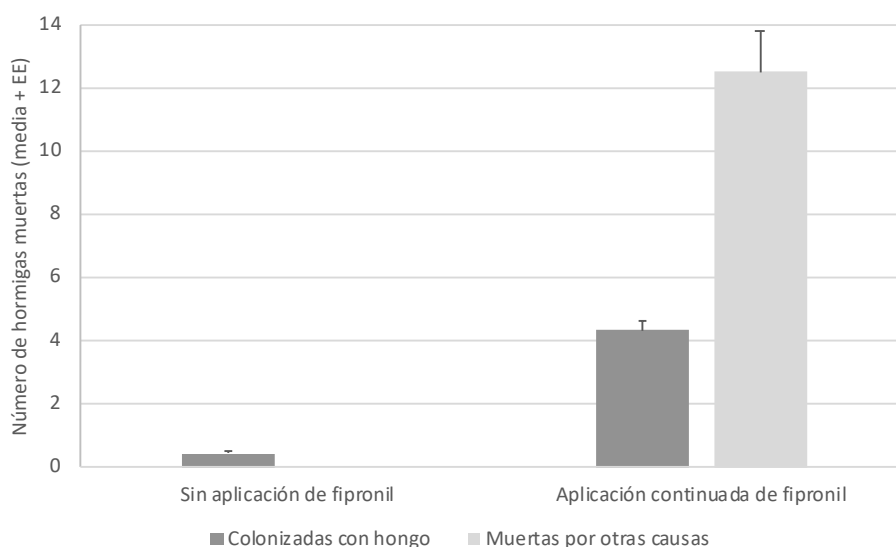
entre sitios) o muertas por otras causas ( $F_{9,19}=1,38$ ,  $p>0,05$  entre nidos;  $F_{1,19}=1,98$ ,  $p>0,05$  entre sitios) (Figura 5). Sin embargo, mostró diferencias significativas entre las dos situaciones de las parcelas de muestreo tanto para variable hormigas colonizadas por el hongo ( $H=114,249$ ;  $p=0,0001$ ) como hormigas muertas por otras causas ( $H=155,021$ ;  $p=0,0001$ ) (Figura 6).



**Figura 5.** Porcentaje de hormigas reinas encontradas muertas por infección fúngica con *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. o por otras causas para los 10 nidos ubicados en áreas de aplicación continua de Fipronil. A) Aislando del resto del suelo; B) Aislando del suelo adheridas a las raíces de las plantas.

En el caso de aquellas reinas que mostraron crecimiento de *Metarhizium* sp., aunque las diferencias entre sitios no fueron significativas, sí que se observó un mayor porcentaje de ellas en la zona de la rizosfera (Figura 6). Esto concuerda con los trabajos de Hu y Leger (2002) y Barelli et al. (2018) en los que indica que el género *Metarhizium* se encuentra preferentemente en la zona de la rizosfera.

El análisis de Kruskal-Wallis evidenció la ausencia de diferencias significativas entre los nidos para la variable hormigas colonizadas por el hongo ( $H=2,463$ ;  $p>0,05$ ) y para la variable muertas por otras causas ( $H=3,806$ ;  $p>0,05$ ), respectivamente (Figura 6).



**Figura 6.** Número de hormigas cortadoras encontradas muertas por infección fúngica o por otras causas en una zona sin aplicación de Fipronil y en otra de aplicación continuada del mismo.

Se colectaron los individuos de 30 puntos presentes en la zona de muestreo sin aplicación de Fipronil. Se encontraron un total de 368 ninfas estando el 38 % (n=144) infectadas por hongos entomopatógenos, así como 31 adultos colonizados también por hongos entomopatógenos.

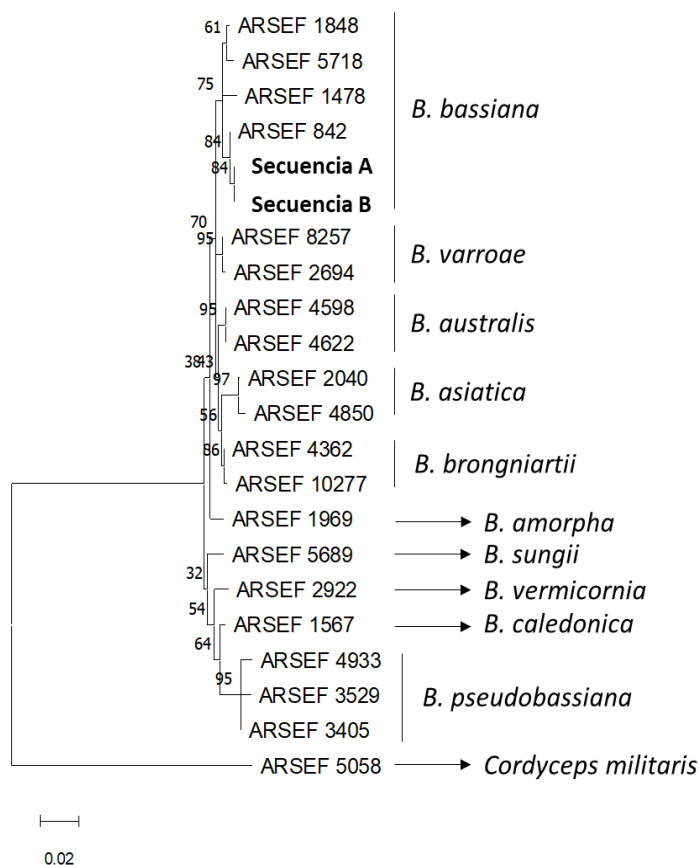
**Tabla 1.** Identificación de los aislados de hongos entomopatógenos colectados del área de influencia de nidos de hormigas cortadoras.

Identificación/ aislados	Muestras s/ insectos trampas /Hospedantes		
	Suelo	Suelo adherida a las raíces	Insectos colonizados colectados del campo
<i>Beauveria bassiana</i>	x	x	x
<i>Metarhizium</i> sp.	x	x	x

Para la identificación molecular de los hongos aislados, se obtuvieron dos aislados de los cadáveres de insectos pertenecientes a la especie *Beauveria bassiana* (Figura 7) y un aislado del género *Metarhizium*. Las secuencias obtenidas, secuencias de *B. bassiana* A y *B. bassiana* B, han sido depositadas en GenBank con los números de acceso OR176989 y OR176990, respectivamente. Ambas secuencias se alinearon y compararon con 20 secuencias obtenidas de la base de datos pertenecientes a las especies *B. bassiana*, *B. varroae*, *B. asiatica*, *B. australis*, *B. brongniartii*, *B. pseudobassiana*, *B. caledonica*, *B. vermicornia*, *B. sungii*, *B. amorpha* y *Cordyceps militaris*. El árbol filogenético muestra como ambas secuencias se encuentran recogidas en el cluster de *B. bassiana* soportado por un bootstrap de 84 %, lo que haría necesario incluir más regiones definitorias del género *Beauveria* como BLOC (Rehner et al., 2011). No se rechazó la hipótesis nula de la tasa de independencia de las tasas evolutivas entre linajes en la filogenia de la figura 7 ( $p > 0,05$ ). El análisis Corrttest (Tao et al., 2019) arrojó una puntuación de  $2,61 \times 10^{-6}$  y el logaritmo de verosimilitud del árbol evaluado es (-2146,49). En el Paraguay, existen trabajos realizados sobre eficacia de productos formulados no nativos utilizados



contra *Acromyrmex landolti fracticornis* (Amarilla Salinas y Arias Ruiz Día, 2011). En este trabajo, reportamos la identificación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* sp., dos especies obtenidas *in situ* de las hormigas cortadoras de hojas (*Atta sexdens*). Ambas especies con origen monofilético a las familias Cordycipitaceae y Clavicipitaceae perteneciente a la Clase Ascomycetes y Orden Hypocreales, respectivamente (Bischoff et al., 2009; Rehner et al., 2011).



**Figura 7.**  rbol de máxima verosimilitud basado en secuencias EF-1 . Las secuencias recién generadas para el presente estudio están en negrita. Se muestra arriba de las ramas el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon.

## Conclusión

Se reporta por primera vez, la técnica de insectos trampa con el uso de poblaciones de reinas aladas de *Atta sexdens* como medio-cebo para aislar hongos entomopatógenos.

Se identificó dos aislados de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (A y B) y un género *Metarhizium* sp. como potenciales controladores biológicos de hormigas cortadoras (*Atta sedens*) *in situ*.

## Fuente de financiamiento

Sin financiamiento externo.

## Contribución de autores

**Concepción del estudio:** G.A.R.-R. **Diseño del experimento:** G.A.R.-R. **Ejecución del experimento:** G.A.R.-R., H.S.-O., M. V. O. **Verificación del experimento:** G.A.R.-R., H.S.-O., M. V. O. **Análisis/interpretación de datos:** G.A.R.-R., F.P.R.-S., K. G., I.G.-J. **Análisis estadísticos:** G.A.R.-R., F.P.R.-S., K. G., I.G.-J. **Preparación del manuscrito:** G.A.R.-R., S. C., I.G.-J. **Edición y revisión del manuscrito:** G.A.R.-R., S. C., **Aprobación de la versión final del manuscrito:** G.A.R.-R., H.S.-O., F.P.R.-S., F.P.R.-S., M. V. O., K. G., I.G.-J.

## Referencias Bibliográficas

- Amarilla Salinas, E. y Arias Ruiz Díaz, O. R. (2011). Control de la hormiga cortadora "Akeke" *Acromyrmex landolti* con hongos entomopatógenos. *Investigación Agraria*, 13(1), 27-32.
- Barelli, L., Moreira, C. C. & Bidochka, M. J. (2018). Initial stages of endophytic colonization by *Metarhizium* involves rhizoplane colonization. *Microbiology*, 164(12), 1531-1540.
- Barnett, H. y Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. APS PRESS. The American Phytopathological Society. Minnesota, EE.UU. pp 217.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. y Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. doi: 10.3852/07-202.
- Garrido-Jurado, I., Márquez, M., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Álvarez, C., Iturriaga, E. A., Quesada-Moraga, E., Monte, E. & Hermosa, R. (2011). Genetic analyses place most Spanish isolates of *Beauveria bassiana* in a molecular group with world-wide distribution. *BMC Microbiology*, 11, 84.
- Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Yousef-Naef, M., Ríos-Moreno, A. & Quesada-Moraga, E. (2020). Soil drenching with entomopathogenic fungi for control of the soil-dwelling life stages and adults of the same generation of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Boletín de investigaciones entomológicas. *Universidad de Cambridge*, 110(2), 242-248.
- Gryganskyi, A. P., Humber, R. A., Smith, M. E., Hodge, K., Huang, B., Voigt, K. & Vilgalys, R. (2013). Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. *Persoonia*, 30, 94-105.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A.,... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.
- Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) in GBIF Secretariat (2023). Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Backbone Taxonomy. Checklist dataset. <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2023-11-20.
- Hu, G. & Leger, R. J. S. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(12), 6383-6387.
- Humber, R. A. (2012). Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*, 120, 477-492.
- O'Donnell K, Cigelnik E. & Nirenberg H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 465-493.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortes, J. A., Maranhao, E. A. A., Ortiz-Urquiza, A. & Santiago Alvarez, C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, 111, 947-966.
- Raeder, U. y Broda, P. (1985). Preparación rápida de ADN a partir de hongos filamentosos. *Applied Microbiology*, 1, 17-20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L. & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103, 1055-1073.

- Statistix 10, Analytical Software.* (2013). <https://www.statistix.com/>
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7),3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tao, Q., Tamura, K., Battistuzzi, F. & Kumar, S. (2019). A Machine Learning Method for Detecting Autocorrelation of Evolutionary Rates in Large Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *36*(4), 811-824.
- Zimmerman, G. (1986). The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, *102*, 213-215.