

TESIS DE DIPLOMA

**Hallazgo de mirmecofilia en *Acacia spp* (Fabaceae), en la
Región Central de Cuba. Agentes asociados.**



Autora: Rosario Hernández Armengol.



Hallazgo de mirmecofilia en *Acacia spp* (*Fabaceae*), en la Región Central de Cuba. Agentes asociados.

Autora: Rosario Hernández Armengol

Tutor: Dr. Horacio Grillo Ravelo

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

2013

Pensamiento

Para ser grande, solo basta con intentar lo grande.

José Martí

Dedicatoria

A mi mamá, a mi papá, a mis abuelos, a mi tía y a los que no llegaron a ver este día.

A las personas que siempre han estado apoyándome y a los que recuerdo en cada logro de mi vida.

Agradecimientos

A mi madre Beatriz, mi padre, mis abuelos, mis hermanos, y mi tía Kiri, por apoyarme y dedicar todos estos años a mi.

A todo a mi familia que de una forma u otra me ayudaron llegar aquí.

A Vivian, Rodolfo, Melissa y Lino por los servicios técnicos y por ser mi nueva.

A Grillo por ser el mejor tutor y guía, a Michel Leiva por adoptarme y por sus consejos, a Mayrita por ser la mejor técnico y brindar su sabiduría.

A mis graduadas Odlenis y Dayana, por ser solo mis amigas, por compartir un millón de noches (de estudio), y por apolillar para las pruebas.

A Kenia por ser mi mejor orgullo.

A Daime y Lisandra por ser de Cienfuegos y por que si las pongo separadas no estoy completa.

A Ana Laura, Daily, Clairra, Ibis, Zulema, Sheyla y Lili por ser mis hijitas malcriadas y mis fans.

A Denyer y Daylon por ser mis socios, mis compañeros, los hermanos varones celosos y más que nada por quererme.

A mis compañeros de aula que condimentaron mis días y me soportaron con la mayor paciencia.

A Arturo por ser mi mejor maestro, porque sin el no me gradúo y porque siempre esperó de mi lo mejor.

A mis mayores amigos, mis inaguantables compañeros, a mi familia más grande en la universidad, porque son lo más grande que he conocido, porque como escuchamos una vez: "No importa lo que hiciste en la universidad, lo que estudiaste, lo que aprendiste, las pruebas que ponchaste, a la fiesta que fuiste, lo que importa son los amigos que conociste, porque cuando todo acaba solo ellos es lo que importa". Por todo eso agradezco al Conjunto Danzario "5 de diciembre". A todos los que fueron sus integrantes y a los de ahora.

A Gerardo, Iván y Diuvel Ernesto, por enseñarme a superarme cada día y por bailar con los pies sobre el viento y el corazón en la danza.

Por ser mami y papi, mi confidente, la sonrisa más contagiosa, por llenarnos de su alegría y por ser solo tú, Youry.

A los amigos que no mencioné pero que llevo conmigo porque sin ellos no sería yo.

A los que no llegaron a ver este día que los llevo en la memoria siempre.

A los profesores que de verdad me enseñaron y no impusieron un criterio, a los que ya no están aquí y tengo que agradecerles.

Por ser el último y no me nos importante, por tener una gran paciencia, por apoyarme en todo y por tener el don de escuchar, le agradezco a mi novio.

Resumen

Resumen

Las plantas mirmecófilas y sus organismos asociados presentan un ejemplo de cómo especies de diferentes reinos y niveles tróficos pueden establecer relaciones de beneficio mutuo. En el caso planta-hormiga el mutualismo provee defensa anti-herbívoros para las plantas a cambio de alojamiento y/o comida para la colonia de hormigas. Los procesos que favorecieron este mutualismo en el curso de la evolución de estos grupos de organismos constituyen un reto para el entendimiento de la selección natural en acción. En la presente investigación se estudiaron los caracteres asociados a la mirmecofilia en plantas de género *Acacia* y las asociaciones de las hormigas de género *Pseudomyrmex* con éstas. Estas acacias presentan nectarios extraflorales en el pecíolo de las hojas, cuerpos de Belt o Beltarios en el ápice de los folíolos y están siempre verdes; también un crecimiento desmedido de algunas de sus espinas, en cuyo interior establecen su colonia las hormigas. Se estudiaron las especies *Acacia cornigera* (L) Willd., *A. auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth., *A. catechu* Willd., *A. nilotica* (arabiga) Wild. ex Delile, *A. campilacantha* Hochst. ex A. Rich, *A. scorpioides* W. F. Wight, *A. jutsonii* Maiden., *A. suma* Kurz. ex Brandis y *A. torta* Craib. procedentes del Jardín Botánico de Cienfuegos. La especie *A. cornigera* del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas, *A. collinsi* Saff. de Playa Honda, Costa Rica y *A. daemon* Urb. et. Ekman procedente del área protegida Cubanacán, Santa Clara, Villa Clara. Sólo *A. cornigera* y *A. collinsi*, mostraron los caracteres típicos de la relación Acacia-hormiga, denominada mirmecofilia. Se encontraron colonias activas de *Pseudomyrmex elongatus cubensis* Fabr. y *P. spinicola* (Emery), respectivamente, en el interior de las espinas estipulares engrosadas. *A. daemon* presentó algunos caracteres de mirmecofilia, sus espinas estipulares engrosadas son menos abundantes que las normales y están distribuidas en el tronco principal, se reportó la presencia de *Tapinoma* sp., informado por primera vez a la ciencia. Se determinó la presencia de micobiota asociada a las espinas gigantes de *A. cornigera* a través de experimentos con muestras de material vivo y de los hongos presentes en el parénquima interno de espinas juveniles y adultas, sin huecos, encontrándose la presencia de *Pestalotiopsis acaciae* (Thuem). Se midió la secreción de auxinas por parte del hongo *P. acaciae*, obteniéndose altos niveles de AIA en las espinas de *A. cornigera*.

Palabras claves: Acacia, auxinas, hormigas inquilinas, hongos asociados, mirmecofilia, *Pestalotiopsis acaciae*.

Abstract

Abstract

The mirmecofit plants and their associate organisms present an example of how species of different Kingdom and trofics levels can establish relationships of mutual benefit. In the case plant-ant the mutualism provides defense anti-herbivores for the plants in exchange for lodging and/or food for the colony of ants. The processes that favored this mutualism in the course of the evolution of these groups of organisms constitute a challenge for the understanding of the natural selection in action. We carried out investigations in which the character associated to the present mirmecofilia was studied in plants of the genus *Acacia* and the associations of the ants of the genus *Pseudomyrmex* with these. These *Acacias* present extrafloral nectarious in the petiole of the leaf, bodies of Belt or Beltarios in the apex; also a limitless growth of some of their thorns into which establish their colony the ants. The species *Acacia cornigera* (L) Willd., was studied, *A. auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth., *A. catechu* Willd., *A. nilotica* (arabic) Wild. ex Delile, *A. campilacantha* Hochst. ex A. Rich, *A. scorpioides* W. F. Wight, *A. jutsonii* Maiden., *A. suma* Kurz. ex Brandis and *A. torta* Craib., coming from the Jardín Botánico de Cienfuegos. The species *A. cornigera* of the Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central Martha Abreu de Las Villas, *A. collinsii* Saff. of Playa Honda, Costa Rica and *A. daemon* Urb. et. Ekman coming from the protected area Cubanacán, Santa Clara, Villa Clara. Only *A. cornigera* and *A. collinsii*, showed the typical characters of the relationship *Acacia*-ant, denominated myrmecofily. Active colonies of *Pseudomyrmex elongatus cubensis* Fabr. and Costa Rican *P. spinicola* (Emery) respectively inside the swollen stipulated thorns. *A. daemon* shows some mirmecofilia characters, their swollen stipulated thorns are not more abundant than the normal ones and they are distributed in the main trunk, the presence of *Tapinoma* sp. was reported, informed for the first time to the science. The micobiotic presence associated to the giant thorns of *A. cornigera* was determined through experiments with material samples I live and of the present mushrooms in the internal parénquima of juvenile and mature thorns, without holes, being the presence of *Pestalotiopsis acaciae* (Thuem). The auxins secretion was measured on the part of the mushroom *P. acaciae*, being obtained high levels of AIA in the thorns of *A. cornigera*.

Keywords: *Acacia*, auxins, ants tenants, associate mushrooms, mirmecofilia, *Pestalotiopsis acaciae*.

Índice

Índice:

1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	5
2.1 Mirmecofilia en especies vegetales	5
2.1.1 Interacciones Mutualistas entre Plantas y Animales	5
2.1.2 Mirmecofilia y defensa de las plantas	6
2.1.3 Distribución de la Mirmecofilia	8
2.1.4 ¿Qué tipos ecológicos de plantas son mirmecófitas?	11
2.1.5 ¿En qué ambientes viven?	12
2.2 Mirmecofilia en especies de Acacia	15
2.2.1 Mutualismo entre planta-hormiga	18
2.3 Mirmecofilia en <i>Acacia cornigera</i>	22
2.4 Clasificación taxonómica, ubicación geográfica y características generales de <i>Acacia cornigera</i>	23
2.4.1 Clasificación científica	23
2.4.2 Distribución	24
2.4.3 Descripción	24
2.4.4 Mirmecofilia	24
2.4.5 Uso medicinal	25
2.4.6 Sinonimia	25
3. Materiales y métodos	26
3.1 Evaluar las modificaciones morfológicas de plantas de la especie <i>Acacia daemon</i>, en asociación con sus especies de hormigas inquilinas	26
3.2 Evaluar caracteres asociados a la mirmecofilia en ejemplares de <i>Acacia spp.</i>, procedentes de diferentes localidades	27
3.2.1 Jardín Botánico de Cienfuegos (JBC)	27
3.2.2 Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas (CEJBVC)	27

3.2.3 Localidad El Playazo, Área protegida Cubanacán (Cub.), Santa Clara, Villa Clara.....	27
3.2.4 Playa Honda, Costa Rica. (CR) (Material recibido por correo especial para material científico conservado).....	27
 3.3 Determinación de la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de <i>Acacia cornigera</i>	28
3.3.1 Montaje y esterilización de Cámaras Húmedas.....	29
3.3.2 Preparación de las muestras para las Cámaras Húmedas.....	29
3.3.3 Montaje de las placas para el aislamiento de los hongos filamentosos.....	30
3.3.4 Aislamiento de hongos filamentosos en placas de cultivo.....	30
3.3.5 Identificación de las muestras de colonias.....	32
 3.4 Determinación de la micobiota en tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas sin huecos de la planta de <i>Acacia cornigera</i> , presente en el Jardín Botánico de la UCLV.....	33
3.4.1 Montaje y esterilización de Cámaras Húmedas.....	33
3.4.2 Preparación de las muestras para las Cámaras Húmedas.....	34
3.4.3 Montaje de las placas con medio de cultivo para el aislamiento de los hongos filamentosos.....	35
3.4.4 Aislamiento de hongos filamentosos en placas de cultivo.....	35
3.4.5 Cultivo de hongos filamentosos en Tubos de ensayo con medio PDA.....	36
 3.5 Determinación de las concentraciones de auxinas (AIA) en las colonias de hongos filamentosos obtenidos en el tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de <i>A. cornigera</i> , presente en el Jardín Botánico de la UCLV.....	37
3.5.1 Cultivo en Caldo-Triptona-Soya, a pH= 5,8, de las muestras de hongos en tubos de ensayo.....	37
3.5.2 Determinación de las concentraciones de AIA.....	39

4. Resultados.	40
4.1 Evaluar las modificaciones morfológicas de plantas de la especie <i>Acacia daemon</i> , en asociación con sus especies de hormigas inquilinas.....	40
4.2 Evaluar caracteres asociados a la mirmecofilia en ejemplares de <i>Acacia spp.</i> , procedentes de diferentes localidades.....	42
4.2.1 Ejemplares procedentes del Jardín Botánico de Cienfuegos (JBC)	
4.2.2 Ejemplar de <i>A. cornigera</i> del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas (CEJBVC).....	44
4.2.3 Ejemplares de <i>A. collinsii</i> (= <i>A. costarricensis</i>), recibidas por correo desde Costa Rica.....	46
4.3 Determinación de la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de <i>A. cornigera</i>	46
4.4 Determinación de la micobiota en tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de <i>A. cornigera</i> , presente en el Jardín Botánico de la UCLV.....	52
4.5 Determinación de las concentraciones de auxinas (AIA) en las colonias de hongos filamentosos obtenidos en del tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de <i>Acacia cornigera</i> , presente en el Jardín Botánico de la UCLV.....	54
5. Discusión.	57
5.1 Evaluar las modificaciones morfológicas y fenológicamente de plantas de género <i>Acacia daemon</i> , en asociación con sus especies de hormigas inquilinas.....	57
5.2 Evaluar caracteres asociados a la mirmecofilia en ejemplares de <i>Acacia spp.</i> , procedentes de diferentes localidades.....	59

5.2.1 Ejemplares procedentes del Jardín Botánico de Cienfuegos (JBC).....	59
5.2.2 Ejemplar de <i>A. cornigera</i> del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas (CEJBVC).....	60
5.2.3 Ejemplares de <i>A. collinsii</i> (= <i>A. costarricensis</i>), recibidas por correo desde Costa Rica.....	61
 5.3 Determinación de la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de <i>A.</i> <i>cornigera</i>	61
 5.4 Determinación de la micobiota en tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de <i>Acacia cornigera</i> , presente en el Jardín Botánico de la UCLV.....	63
 5.5 Determinación de las concentraciones de auxinas (AIA) en las colonias de hongos filamentosos obtenidos en del tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de <i>Acacia cornigera</i> , presente en el Jardín Botánico de la UCLV.....	65
 6. Conclusiones.....	66
Recomendaciones.....	67
Referencias Bibliográficas.....	68
Anexos.....	70

Introducción

1. Introducción

Acacia es un género de arbustos y de árboles pertenecientes a la familia *Fabaceae* y subfamilia *Mimosoideae*, aunque también se conocen vulgarmente con el nombre de «acacia» a muchos árboles leguminosos de otros géneros. Existen unas 1,300 especies en el mundo (unas 950 especies proceden de Australia). Necesitan un lugar fresco para invernar, con temperatura comprendida entre 5 °C y 10 °C. Las acacias son muy importantes ya que son plantas fijadoras de nitrógeno. De esta forma, contribuyen a la nitrificación del suelo y a que éste sea ideal para plantas, como las ornamentales, que necesitan de suelos básicos. También facilitan acceso a este elemento por otras plantas. Son de rápida germinación y de fácil cuidado. (Janzen, 1967; Del Val, 2011)

Algunas especies de acacias poseen un sistema de defensa que algunos biólogos consideran como único en el Reino Vegetal. En los conglomerados donde cada individuo se encuentra en contacto cercano con otro, si éste es abordado por un depredador de su follaje, la planta reacciona químicamente liberando sustancias que son de transferencia aérea y llegan a las otras plantas "dando la alarma"; de inmediato el resto de los ejemplares del conglomerado comienzan a segregar en sus hojas una sustancia tóxica -éstas cambian de color oscureciéndose- que es dañina al contacto e ingestión y hasta mortal para el depredador animal (que puede ser por ejemplo un gran mamífero como una jirafa, aunque se han dado casos en que se produjeron intoxicaciones de mascotas). (Botanicals 1986, N° 133)

Por otra parte, algunas especies presentan una asociación con las hormigas (mirmecofilia) u otros insectos, los cuales ejercen función protectora de la planta en caso de algún otro insecto depredador; las hormigas ayudan a mantener el follaje siempre verde, evitando que otros animales se alimenten de la planta, ayudan en la defensa y a su vez establecen sus colonias en las espinas o

acículas de la planta; las cuales en algunos casos presentan un gigantismo que le permite vivir en ellas.

Generalmente asociamos a las hormigas con algún daño producido a las plantas cultivadas. Si bien es cierto que estos insectos son importantes fitófagos, sería conveniente que conociéramos otros tipos de asociaciones entre hormigas y plantas, que resultan beneficiosos para ambas. La mirmecofilia, es la estrecha relación que se ha establecido entre ciertas especies de hormigas y de plantas para lograr un beneficio recíproco entre ambas.

Por ejemplo, el caso más conocido e interesante de mirmecofilia, se da entre las hormigas de género *Pseudomyrmex* y algunas especies de género *Acacia* que tienen grandes espinas, las cuáles pueden ser ahuecadas por las hormigas, para que puedan vivir y establecer sus colonias en su interior; sino que además las hojas de estas plantas poseen nectarios extraflorales en el pecíolo, y en el ápice de los folíolos presentan los llamados cuerpos de Belt que contienen grandes cantidades de proteína de las que las hormigas se alimentan. En retribución a tanta hospitalidad, las hormigas defienden a "su árbol" atacando ferozmente a cualquier persona, animal o planta que se aproxime.

En Nicaragua se ha estudiado la asociación entre *Acacia cornigera* y algunas hormigas que establecen sus crías en este tipo de espinas. Se ha encontrado que las acacias tienen estructuras anatómicas especiales en que se alimentan las hormigas, éstas, a su vez, protegen a las plantas de los herbívoros. Se ha visto también que en un área circular alrededor del tronco de estos árboles, las hierbas crecen sin ser consumidas por otros herbívoros. El ejemplo mas conocido es el del **Torito** o **Cornezuelo** (*A. cornigera*) especie que tiene algunas espinas divergentes, fuertemente globosas hacia la base en las que anida una especie de *Crematogaster* sp. (Sosa, 2009)

Para Cuba no se ha reportado este tipo de asociación entre hormigas y estas plantas, ya que todas han sido introducidas y solamente se conoce una endémica, *A. daemon* Ekm y Urb., y como naturalizada, *A. cornigera* (sinónimo de *A. cubensis*)

En Costa Rica, otros ejemplos muy claros de mirmecofilia se presentan en los árboles de **guarumo** (*Cecropia*), **hormigo** (*Triplaris melanodendron*) y **laurel** (*Cordia alliodora*). Analizaremos algunos aspectos de la asociación entre las hormigas y estos árboles del género *Acacia*. (Sosa, 2009)

La micología es una rama de la biología que estudia a los hongos. Los hongos pueden producir enfermedad tanto en humanos, animales, como en plantas.

Los hongos son microorganismos similares a las plantas pero que carecen de la producción de clorofila. Existen más de 100,000 especies de hongos, afortunadamente no todos los hongos producen enfermedades e incluso algunos son utilizados para producir medicamentos, otros en la industria, agricultura, etcétera, sin embargo, también existe una gran variedad de hongos que producen enfermedades y pueden invadir tanto a humanos, animales, y plantas. Los hongos al no producir clorofila deben captar su alimento de otros organismos, debido a que no utilizan luz para producir sus alimentos pueden desarrollarse y vivir en espacios oscuros y/o húmedos; los hongos se alimentan de materia muerta, sin embargo en algunas ocasiones pueden comenzar a parasitar a organismos vivos.

En la actualidad se desconoce la diversidad de hongos asociados con las plantas de *A. cornigera*.

Hipótesis

Mediante el análisis de las especies de *Acacia* presentes en la Región Central, es posible que encontremos algún caso de mirmecofilia y otros agentes asociados que contribuyan a ella.

Objetivo general

Realizar una evaluación acerca de las modificaciones morfológicas típicas de la relación mirmecófila en especies de *Acacia* presentes en la Región Central.

Objetivos específicos

1. Evaluar las modificaciones que pueden sufrir, morfológicamente estas plantas del género *Acacia*, en asociación con sus especies de hormigas inquilinas.
2. Analizar los caracteres asociados a la mirmecofilia en las siguientes especies: *Acacia cornigera* (L.), *A. daemon* Urb. y Ekm., *A. torta* Craib, *A. catechu* Willd., *A. nilotica (arabiga)* Wild. ex Delile, *A. campilacantha* Hochst. ex A. Rich, *A. scorpioides* W. F. Wight, *A. hudsonii* Maiden., *A. suma* Kurz. ex Brandis., *A. collinsii* y *A. auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth.
3. Determinar la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de *Acacia cornigera*.
4. Determinar si las especies de hongos asociados al parénquima interno de las espinas gigantes de *A. cornigera* tienen acción metabólica auxínica.

Revisión bibliográfica

2. Revisión bibliográfica

2.1 Mirmecofilia en especies vegetales.

2.1.1 Interacciones Mutualistas entre Plantas y Animales

Las interacciones ecológicas entre plantas y animales constituyen un sistema de estudio que permite poner de manifiesto la complejidad del proceso evolutivo en la naturaleza (Howe y Westley, 1989). Esto se debe a que todos los seres vivos se desarrollan en una red de relaciones biológicas que pueden ser benéficas, antagónicas o neutras para los individuos que interactúan, de manera que la ecología y la evolución de un determinado grupo de organismos depende no solo del ambiente físico, sino de sus relaciones con los demás organismos interactuantes. Además, si bien típicamente se consideran las interacciones como si fuesen “uno a uno” (es decir, por ejemplo, una especie de planta que interactúa con una especie de animal), la realidad es que las interacciones bióticas involucran a muchas especies tanto del mismo, como de diferentes niveles tróficos.

Cuando una relación entre organismos es benéfica para las especies que interactúan la relación se denomina mutualismo (de beneficio mutuo). Dicho de otra manera, se trata de interacciones entre especies donde la adecuación de cada organismo interactuante se incrementa por la acción del otro (Harper, 1977)

En el caso de las interacciones entre plantas y animales, encontramos que las plantas dependen de interacciones mutualistas con animales para sobrevivir y viceversa. Uno de los tipos de mutualismo entre plantas y animales más conocido es la polinización. En esta interacción un animal, ya sea un insecto, ave o mamífero, lleva polen de una flor a otra haciendo posible la fecundación; al mismo tiempo, el polinizador obtiene alimento de recompensa en forma de polen, de aceites o de néctar de las flores. Otra relación mutualista ocurre entre animales frugívoros y plantas. En este caso, la planta produce frutos con olores y/o colores atractivos para los frugívoros. Al alimentarse de dichos frutos, estos animales dispersan las semillas de las plantas, permitiendo el establecimiento de las

semillas en lugares que pueden ocasionalmente favorecer la germinación y establecimiento de las plantas.

Además de las asociaciones mutualistas mencionadas, a principios del siglo XX se describió otro tipo de interacción mutualista entre plantas y hormigas “jardineras” (*Atta* sp.). Este tipo de hormigas transporta a su nido las semillas de algunas plantas epífitas. El nido resulta ser el lugar óptimo para la germinación de estas plantas (Krebs, 1994). La existencia de tales jardines epífitos, conspicuos en muchas selvas tropicales, ha hecho evidente el potencial de interacciones diversas entre hormigas y plantas, ha promovido el interés por las relaciones entre tales organismos, y ha generado toda una disciplina de estudio conocida como la mirmecofilia. Si bien el término implica una amplia gama de tipos de interacciones planta-hormiga, incluyendo el cultivo de jardines epífitos y la dispersión de semillas por parte de hormigas, tradicionalmente el término se asocia con interacciones defensivas de la planta por parte de la hormiga. Así, en este ensayo nos referiremos a la mirmecofilia en este sentido.

2.1.2 Mirmecofilia y defensa de las plantas

Muchas especies de plantas han evolucionado en conjunto con algunos insectos, estableciendo una asociación mutualista defensiva por parte de estos. La asociación mutualista defensiva más conocida sucede entre hormigas y plantas (Hölldobler y Wilson, 1990). La Tabla I presenta una muestra de una variedad de especies mirmecófitas y sus hormigas asociadas. En esta relación particular, las hormigas proveen defensa para la planta atacando a los herbívoros que intentan alimentarse de los tejidos de aquellas, ya sea hojas y tallo, o tejido reproductivo como flores y brácteas. En algunos casos, además, las hormigas activamente quitan aquellas plantas epífitas que se establecen sobre la mirmecófita, o que se establezcan en el vecindario inmediato del tronco de la planta mirmecófita (Janzen, 1967, 1969). A su vez, las plantas proporcionan alimento y, a veces, además, un lugar para vivir para sus hormigas protectoras.

En la interacción mirmecófila el alimento que es suministrado por las plantas para las hormigas puede ser en forma de néctar, u otro tipo de recompensas alimenticias empacadas en corpúsculos (por ejemplo corpúsculos ricos en azúcares, lípidos o proteínas, o ambas cosas) (Figuras 2a-b). Las estructuras donde viven las hormigas dentro de la planta son denominadas domacios y pueden estar en el tronco hueco de la planta o en otras estructuras vegetales modificadas provistas de cavidades que den albergue a la colonia, incluyendo espinas, ramas o dobleces en el pecíolo de las hojas (Figura 2; Janzen, 1969; Rickson, 1971, Fonseca, 1994).

En muchas de las relaciones mirmecófilas se ha encontrado que la colonia de hormigas que habita en la planta también “cultiva” (es decir cuida, mantiene) insectos homópteros (Coccidae) en la misma (Bentley, 1977; Hölldobler y Wilson, 1990). El cultivo de estos insectos sirve para complementar la dieta de azúcares y proteínas de las hormigas que es aportada por las plantas. Incluso algunos estudios apuntan que las secreciones de los homópteros constituyen el principal alimento para las hormigas (Blüthgen et al., 2000). Sin embargo, como los homópteros se alimentan del floema de las mirmecófitas, aún no es muy claro qué tan negativo es el impacto que tiene el cultivo de estos insectos para las plantas. Si bien en las relaciones mirmecófilas las plantas dependen de las hormigas y viceversa, se sabe que una sola especie de planta puede estar asociada con varias especies de hormigas. Esta baja especificidad se ve reflejada en un gradiente de calidad en la defensa para la planta, pues hay hormigas más eficientes (más agresivas, o que se reclutan más rápidamente en presencia de herbívoros) que otras (Murase et al., 2003; Bruna et al., 2004). Además, algunas investigaciones recientes revelan que a partir de las interacciones entre mirmecófitas y sus hormigas asociadas, las plantas pueden obtener nutrientes de manera antes desconocida. Basados en experimentos que involucraron insectos alimentados con compuestos radiactivos insertados en las cavidades de *Hydnophyton* (Rickson, 1979) y en los rizomas de *Lecanopteris spp.* (Gay, 1993), Sagers et al. (2000) utilizaron isótopos estables de carbono y nitrógeno para demostrar que los

individuos de *Cecropia spp.* son capaces de absorber una impresionante cantidad de nitrógeno (ca. 90%) de los desechos que las hormigas dejan en los domacios.

Recientemente Fischer et al. (2003) también llegaron a la conclusión de que dos especies mirmecófitas del género *Piper* son capaces de incorporar en su tejido hasta el 25% del nitrógeno consumido por las hormigas *Pheidole bicornis*, absorbiéndolo a través de la pared de los domacios. Estos descubrimientos sugieren que el beneficio que la planta obtiene de la interacción con las hormigas es aún mayor que la sola defensa, como antes se creía (Del Val y Dirzo, 2004).

Un componente importante del síndrome de mirmecofilia es que muchas plantas producen algún tipo de secreción nutritiva, por ejemplo néctar para atraer hormigas a su follaje. Algunos autores calculan que un tercio de las plantas tropicales tienen algún tipo de nectario extrafloral. Sin embargo, únicamente son consideradas como verdaderas mirmecófitas aquellas plantas que, además de producir algún tipo de alimento también poseen estructuras para albergar a la colonia de hormigas en su interior. Cabe mencionar que también hay plantas que, en el otro extremo del espectro, tienen estructuras para alojar a las hormigas pero no producen ningún tipo de alimento (Tabla I). En concordancia con esto, hacemos notar que la interacción mirmecófila se desplaza a lo largo de un gradiente de dependencia de los interactuantes, desde mutualismos obligatorios (en los que la hormiga no puede sobrevivir sin la planta), hasta mutualismos laxos (en los cuales la hormiga sólo utiliza a la planta como fuente de alimento ocasional). Preferimos ubicar a las diversas relaciones mirmecófilas a lo largo de este gradiente de dependencia, en vez de considerar a la mirmecofilia en una dicotomía excluyente (todo o nada)(Del Val y Dirzo, 2004).

2.1.3 Distribución de la Mirmecofilia

La revisión de la literatura refleja que la relación mirmecófila se conoce en 465 especies de plantas distribuidas en 52 familias. Sin embargo, este número se

incrementa cada año con los nuevos estudios, particularmente aquellos enfocados a las zonas tropicales (Jolivet, 1998).

La información disponible hace evidente que la distribución de mirmecófitas está concentrada cerca de la región ecuatorial, de manera que es más abundante en los trópicos con respecto a las regiones templadas (Figura 3). Una posible explicación para esta distribución sesgada tiene que ver con los cambios de temperatura a lo largo del día y entre las estaciones del año en las regiones templadas, pues en climas fríos las plantas no tendrían la capacidad de albergar y alimentar a las hormigas de manera permanente (Davidson et al., 1989), lo que implicaría que la defensa no sería consistente en el tiempo.

Dentro de la región tropical, la mirmecofilia es más común en el Nuevo Mundo. En América se han descrito 250 especies de plantas (el 53% del total de especies mirmecófitas) pertenecientes a 19 familias, y 180 especies de hormigas dentro de cinco subfamilias que presentan este tipo de mutualismo (Jolivet, 1998). Se calcula que en África existen 65 especies de mirmecófitas y 150 en Asia. Cabe resaltar que de Oceanía no se conoce ninguna mirmecófita verdadera que provea alimento para la colonia; solamente hay algunas especies que presentan estructuras donde la colonia puede vivir. Curiosamente, en géneros cosmopolitas como *Acacia*, las especies australianas no presentan asociaciones con hormigas.

Si bien el porcentaje de mirmecófitas es relativamente alto en el neotrópico, a escala local los porcentajes son bajos. Por ejemplo, en la selva de Los Tuxtlas, México, se encontró que de 289 especies de plantas analizadas sólo 9 (3,1%) son mirmecófitas, asociadas a 26 especies de hormigas (Ibarra y Dirzo, 1990). En la Reserva del Manu, en Perú, también se observó un porcentaje similar, con 8 mirmecófitas de un total de 229 especies de plantas analizadas (3,5%; Davidson et al., 1989).

Otra pregunta relacionada con la abundancia de las mirmecófitas es la distribución de la mirmecofilia en el reino vegetal, en particular, analizando los caracteres

mirmecófilos involucrados y su frecuencia de aparición en la filogenia de las plantas vasculares.

Por una parte vemos que las adaptaciones morfológicas y fisiológicas que permiten esta asociación son poco parecidas entre diferentes plantas (i.e. algunas tienen espinas huecas mientras que otras tienen cavidades en el tronco) y, en otros casos, varias familias poco relacionadas filogenéticamente presentan una misma característica mirmecófila. En algunos casos se sabe que, a nivel local, la representación del carácter mirmecófilo está relacionada con ciertos géneros o familias de plantas, los cuales contienen varias especies mirmecófitas. Por ejemplo, en la región de Panamá se ha descubierto que la mayoría de los géneros de mirmecófitas (87%) tiene al menos dos especies que se asocian con hormigas (Schupp y Feener, 1990). Esto sugiere que a pesar de que la mirmecofilia esté presente en especies de varias familias de plantas, dentro de cada familia esta característica es compartida por varias especies, por lo que probablemente la heredaron de un ancestro común. La familia Melastomataceae es un ejemplo donde la mirmecofilia puede relacionarse con la filogenia. Del total de las mirmecófitas descritas globalmente (465), 80 especies (17,2%) pertenecen a esta familia (Vasconcelos, 1991). Este porcentaje es mayor de lo que se podría esperar por azar. Por otro lado, la familia Cecropiaceae está formada por seis géneros de los cuales cuatro tienen especies mirmecófitas (*Cecropia*, *Coussapoa*, *Poikilospermum*, *Pouruma*). En otros taxa como el género *Neonaunclea* (Rubiaceae) encontramos 17 especies (28%) que son mirmecófitas y el género *Macaranga* (Euphorbiaceae), con 300 especies, tiene 26 (8,6%) que son mirmecófitas (Fonseca, 1994; Maschwitz y Fiala, 1995). Finalmente, los datos de registros fósiles sugieren que la asociación entre hormigas y plantas se originó a mediados del Cretácico, cuando las angiospermas estaban en proceso de diversificación, y evidentemente dicha asociación ocurrió varias veces en diferentes linajes de plantas. El avance actual y futuro de las técnicas moleculares promete que pronto será posible mapear la mirmecofilia en la filogenia de las plantas (Del Val y Dirzo, 2004).

2.1.4 ¿Qué tipos ecológicos de plantas son mirmecófitas?

La mayoría de las especies mirmecófitas de los trópicos (61%) son plantas demandantes de luz y de rápido crecimiento, conocidas como plantas pioneras (Schupp y Feener, 1990). El hecho que la mirmecofilia sea más frecuente en este tipo de especies que en plantas de crecimiento lento (tolerantes a la sombra) puede ser explicado por dos hipótesis, que no son mutuamente excluyentes. Por un lado, en el marco de la hipótesis de crecimiento y asignación de recursos en las plantas (Coley et al., 1985) para explicar la evolución de las defensas anti-herbívoro se postula que las plantas pioneras, que habitan en sitios de abundancia de recursos, asignan la mayoría de su presupuesto energético al crecimiento y solo invierten pocos recursos en la defensa en contra de herbívoros. Se propone que la asociación con hormigas es relativamente barata de producir y mantener, por lo que la mirmecofilia podría ser considerada como una defensa de este tipo (Fonseca, 1994). No obstante, varios estudios en diferentes mirmecófitas sugieren que la producción de cuerpos alimenticios puede tener un costo que podría ser no despreciable.

Por ejemplo, en *Macaranga triloba* (Heil et al., 2002), *Cecropia* spp. (Folgarait y Davidson, 1995) y *Piper cenocladum* (Dyer y Letourneau, 1999) la producción de recompensas se incrementa con la adición de fertilizantes, sugiriendo que tal producción está limitada por nutrientes. No obstante, hasta ahora no se cuenta con estudios que permitan definir el costo relativo de la inversión en recursos que supone la defensa mirmecófila. Este también es un campo promisorio para estudios subsecuentes.

La otra posible explicación se basa en la limitación por hormigas. Esta hipótesis propone que el origen y la manutención de la defensa por hormigas en las plantas están determinados por la comunidad de insectos (Schupp y Feener, 1990). Dado que las hormigas son organismos principalmente carnívoros, los insectos son el

alimento más importante para las colonias, y éstos son más abundantes en los lugares abiertos.

Como consecuencia, las hormigas son menos abundantes en lugares con pocos insectos y esto se ve reflejado en la menor cantidad de mirmecófitas en sitios cerrados. No obstante, esta explicación responde al origen de la mirmecofilia, más que a su manutención, puesto que las hormigas que habitan dentro de las plantas generalmente ya no dependen de los insectos forrajeadores, pues solo ocasionalmente se alimentan de ellos (Del Val y Dirzo, 2004).

Además de que la variación en la presencia de mirmecofilia tiene que ver con la identidad de las especies, localidades y linajes, también varía con la forma de vida de las plantas. En un estudio en Panamá se analizó el carácter mirmecófilo en relación con la forma de crecimiento de las plantas (Schupp y Feener, 1990) y se encontró que a nivel de especie, la mayoría de las mirmecófitas son lianas. Reforzando este hallazgo, Bentley (1976) postula que la mirmecofilia puede estar favorecida en las lianas porque esta forma de vida resulta benéfica para aumentar el área de forrajeo de la colonia de hormigas, ya que las lianas están en contacto con un gran número de ramas de diferentes árboles, donde las hormigas podrían conseguir un mayor número de presas. De nuevo, este argumento se refiere a la hipótesis del origen de las mirmecófitas, mas no explica el mantenimiento del mutualismo. En todo caso, esta inferencia podría aplicarse en mayor medida a las hormigas que mantienen una asociación con mirmecófitas, pero que no dependen exclusivamente del alimento que les proporcionan las plantas en donde viven (caso de hormigas con asociación no obligatoria), sino que además buscan comida en las inmediaciones de la planta (Del Val y Dirzo, 2004).

2.1.5 ¿En qué ambientes viven?

Como la mayoría de las especies mirmecófitas tropicales son plantas pioneras, los ambientes en los que se desarrollan son principalmente lugares con abundancia de recursos (luz y/o nutrientes en el suelo), es decir en claros de la selva o bosques, a

los costados de caminos, cerca de fuentes de agua y en lugares perturbados por el hombre. En América tropical, los géneros *Cecropia* y *Pouruma* (Cecropiaceae), *Acacia* (Mimosoidae), *Ochroma* (Bombacaceae) y *Cordia* (Boraginaceae) son muy abundantes tanto en los claros selváticos como a la orilla de los caminos (Jolivet, 1987) y lo mismo ocurre con *Triplaris* spp. (Polygonaceae). En Asia, las especies del género *Macaranga* (Euphorbiaceae) y *Neonauclea* (Rubiaceae) también habitan en lugares similares (Fiala et al., 1994; Maschwitz y Fiala, 1995).

En África, *Barteria* (Passifloraceae) y *Bracystephanus* (Acanthaceae) son representantes de especies pioneras que también viven en ambientes con gran disponibilidad de luz (Janzen, 1972; Champluvier, 1994)

A pesar de ser menos comunes, también existen mirmecófitas que habitan en lugares más umbrófilos de selva madura como *Maieta guianensis* y *Tococa macrosperma* (Melastomataceae), *Tachigali myrmecophila* (Caesalpinaceae), *Douroia* sp. (Rubiaceae), *Piper arianun* (Piperaceae) y *Cordia nodosa* (Boraginaceae) en Amazonia (Fonseca, 1994; Michelangeli, 2003). En África se conoce a *Leonardoxa africana* (Leguminosae: Caesalpinioideae) y a *Barteria* spp. (Passifloraceae) que habitan en el sotobosque de los bosques tropicales de Camerún y Nigeria (Janzen, 1972; McKey, 1984; Marquis, 1987), mientras que diversas especies mirmecófitas de *Inga* (Mimosoidae) habitan en un ámbito amplio de hábitats, desde los abiertos hasta los relativamente umbrófilos.

TABLA I
 EJEMPLOS DE MIRMECÓFITAS VERDADERAS (MUTUALISMOS OBLIGATORIOS)*
 Y PLANTAS CON ALGÚN TIPO DE MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL PARA ATRAER HORMIGAS, PERO QUE NO
 MANTIENEN UN MUTUALISMO OBLIGATORIO

Mirmecófitas	Familia	Forma de vida	Tipo de domacio	Recompensa	Hormigas asociadas
<i>Nepenthes bicalcarata</i> * 1	Nepenthaceae	Carnívora	Zarcillos huecos	Nectarios extraflorales	<i>Camponotus</i> spp.
<i>Cecropia</i> spp.* 2	Cecropiaceae	Árbol	Tronco hueco	Cuerpos müllerianos	<i>Azteca</i> spp.
<i>Piper</i> spp.* 3	Piperaceae	Arbusto		Cuerpos unicelulares	<i>Pheidole bicornis</i>
<i>Macaranga</i> spp.* 4	Euphorbiaceae	Árbol		Cuerpos beccarianos	<i>Crematogaster</i> spp.
<i>Acacia</i> spp.* 5	Leguminosae	Árbol	Espinas huecas	Cuerpos de Belt y nectarios extraflorales	<i>Pseudomyrmex</i> spp.
<i>Myrmecodia</i> spp. 6	Rubiaceae	Epífita	Hipocotiledón hueco	Ninguna	<i>Philidris</i> spp.
<i>Hoya</i> spp. 7	Asclepidaceae	Epífita	Hojas modificadas	Ninguna	<i>Philidris</i> spp.
<i>Solanopteris</i> spp. 8	Polypodiaceae	Epífita	Rizoma hueco	Ninguna	<i>Azteca</i> spp.
<i>Triplaris</i> spp. 9	Polygonaceae	Árbol	Tronco hueco	Ninguna	<i>Pseudomyrmex viduus</i> y <i>Azteca</i> spp.
<i>Leonardoxa africana</i> 10	Leguminosae	Árbol		Ninguna	<i>Aphomyrmex afer</i> y <i>Petalomyrmex</i> spp.
<i>Maieta</i> spp. 11	Melastomataceae	Arbusto	Base de peciolo hueco	Ninguna	<i>Pheidole</i> spp.
<i>Vochysia vismiifolia</i> 12	Vochysiaceae	Árbol	Tallos huecos	Ninguna	<i>Pseudomyrmex</i> sp.
<i>Cordia alliodora</i> 13	Boraginaceae	Árbol	Internodos huecos	Ninguna	<i>Azteca pittieri</i> , <i>Cephalotes setulifer</i> , <i>C. multispinosus</i> , <i>Crematogaster curvispinosa</i> , <i>Myrmelachista</i>
<i>Ocotea pedatifolia</i> 14	Lauraceae	Árbol	Peciolos huecos	Ninguna	<i>Pseudomyrmex concolor</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>Azteca polymorpha</i> , <i>A. schummani</i>
<i>Tachigali</i> spp. 15	Cesalpiniaceae	Árbol	Hojas modificadas	Ninguna	Moog 2002 sociobiology
<i>Zanthoxylum myriacanthum</i> 16	Rutaceae	Árbol	Tallos huecos	Ninguna	<i>Azteca</i> spp., <i>Allomerus</i> spp., <i>Dolichoderus</i> spp., <i>Pseudomyrmex</i> spp., <i>Crematogaster</i> spp., <i>Gnamptogenys</i> spp., <i>Solenopsis</i> spp. y <i>Myrmelachista</i> spp.
<i>Tococa</i> spp. 17	Melastomataceae	Arbusto, árbol		Ninguna	
<i>Ochroma pyramidale</i> 18	Bombacaceae	Árbol	Ninguno	Cuerpos ricos en lípidos	<i>Chelaner</i> spp.
<i>Croton bonplandianum</i> 19	Euphorbiaceae	Arbusto	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Meranoplus bicolor</i> , <i>Polyrhachis exercita</i> , <i>Componatus sericeus</i> , <i>Tapinoma melanocephalum</i> , <i>Crematogaster</i> sp., <i>Solenopsis geminata</i> , <i>Camponotus compussum</i> , <i>Pheidole woodrasoni</i> , <i>Monomorium indicum</i>
<i>Chamaecrista</i> sp. 20	Cesalpiniaceae	Herbácea	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Crematogaster lineolata</i> , <i>Dolichodeus plaviatus</i> , <i>Formica pallidefulva</i>

<i>Macaranga tanarius</i> ²¹	Euphorbiaceae	Árbol	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Crematogaster</i> spp.
<i>Opuntia stricta</i> ²²	Cactaceae	Arbusto	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Camponotus planatus</i> , <i>C. abdominalis</i> , <i>Paratrechina longicornis</i> , <i>Crematogaster</i> <i>brevispinosa</i> , <i>Monomorium cyanenum</i> , <i>Pseudomyrmex</i> , spp.
<i>Stryphnodendron microstachyum</i> ²³	Leguminosae	Árbol	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Wasmannia auropunctata</i> , <i>Ectatomma ruidum</i>
<i>Passiflora</i> spp. ²⁴	Passifloraceae	Herbácea- enredadera	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Ectatomma ruidum</i> , <i>E. tuberculatu</i> , <i>Crematogaster</i> , <i>Pheidole</i> , <i>Solenopsis</i> , <i>Pseudomyrmex</i> , <i>Brachymyrmex</i> , <i>Camponotus</i> , <i>Paratrechina</i> , <i>Tapinoma</i>
<i>Alchornea floribunda</i> ²⁵	Euphorbiaceae	Arbusto	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Crematogaster</i> spp.
<i>Inga densiflora</i> ²⁶	Leguminosae	Árbol	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Camponotus</i> spp. y otras
<i>Cassia fasciculata</i> ²⁷	Leguminosae	Herbacea	Ninguno	Nectarios extraflorales	<i>Iridomyrmex pruinosus</i> y otras

¹Merbach *et al.* (2001), ²Janzen (1969) y Rickson (1971), ³Marquis (1987), ⁴Fiala *et al.* (1991), ⁵Janzen (1967), ⁶Huxley (1978), ⁷Kelijn y van Donkelaar (2001), ⁸Gómez-Pignataro (1974), ⁹Oliveira *et al.* (1987), ¹⁰McKey (1984, 1991), ¹¹Vasconcelos (1991), ¹²Blüthgen y Wesenberg (2001), ¹³Tillberg (2004), ¹⁴Stout (1979), ¹⁵Fonseca (1994), ¹⁶Moog *et al.* (2002), ¹⁷Michelangeli (2003), ¹⁸Jolivet (1987), ¹⁹Veena *et al.* (1989), ²⁰Ruhren (2003), ²¹Murase *et al.* (2003), ²²Oliveira *et al.* (1999), ²³de la Fuente y Marquis (1999), ²⁴Apple y Feener (2001), ²⁵Morini *et al.* (2004), ²⁶Koptur (1994), ²⁷Kelly (1986).

2.2 Mirmecofilia en especies de Acacia

El mutualismo es una relación interespecífica muy particular en la que todos los organismos participantes se benefician. Si se establece entre hormigas y plantas se denomina, genéricamente mirmecofilia, término usado por primera vez en 1955 por Van der Pijl y empleado para agrupar a todas las relaciones mutualísticas entre ambas.

Las plantas mirmecófitas pertenecen a dos categorías: las que son defendidas, y las que son nutridas por las hormigas. Un ejemplo clásico de las primeras es el género *Acacia*, con unas 750 especies en todo el mundo, de las cuales las de América Central experimentaron un crecimiento notable de sus espinas foliares o estípulas, utilizadas por las hormigas como nidos. En esas espinas cada una de las cuáles alcanza un volumen interno de 7mm³- habitan hormigas de género *Pseudomyrmex*. Ocupan tantas espinas como se requieran para albergar a la colonia, que comprende unas 30,000 hormigas. Las obreras patrullan todos los árboles en un área de 10m², durante las veinticuatro horas, y defienden las plantas contra cualquier agresor, no sólo otros insectos y vertebrados sino, también,

plantas epifitas (que viven sobre otras plantas) y hongos, que eliminan de forma permanente. La acacia les dispensa refugio y alimento, por medio de sus nectarios extraflorales del pecíolo y los llamados cuerpos de Belt, que se hallan en el extremo de las hojas y contienen proteínas y lípidos. La estratégica ubicación de esos cuerpos asegura la vigilancia de las hormigas en las áreas más accesibles a los fitófagos.

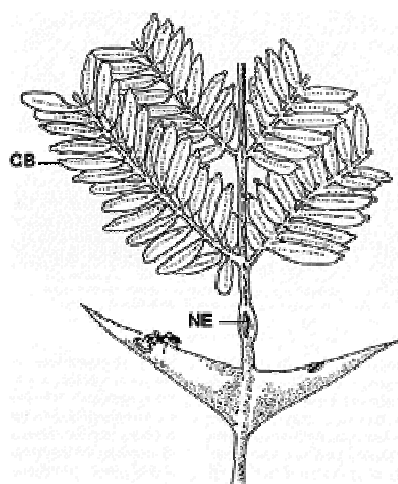


Figura 1. *Pseudomyrmex* posada sobre una espina de *Acacia sphaerocephala* (Fabacea) que sirve de refugio y cámara de cría, obsérvese además el nectario extrafloral en la base del pecíolo (NE) y los cuerpos de Belt (CB) en el extremo de los folíolos de las hojas, que sirven de recurso alimenticio para la hormiga.

Mientras la mayoría de las *Pseudomyrmex* son arborícolas, sólo las altamente específicas muestran gran agresividad. (Sosa, 2009)

Las hormigas que viven en las plantas varían en hábito, desde el uso fortuito de una cavidad en la planta hasta interacciones altamente complejas entre las hormigas y las plantas. El sistema hormiga-Acacia, representa este último extremo y la Acacia es definitivamente una mirmecófita.

Las acacias con espinas engrosadas son aquellas con:

- 1-espinas estipulares agrandadas, normalmente atendidas por las hormigas,
- 2-nectarios foliares agrandados o aumentados de tamaño,
- 3- folíolos modificados en sus ápices, (beltarios consumidos por las hormigas),

4- producción de hojas durante todo el año, aún en áreas con una estación seca bien definida.

Se ha demostrado experimentalmente que las *Acacias* con espinas engrosadas, tienen virtualmente dependencia obligada con las hormigas, en las tierras bajas de México hasta América Central. La mayor parte de las especies de género *Acacia* no tienen total dependencia obligada con las hormigas aunque pueden ocurrir interacciones menores (la asociación hormigas-nectarios).

Toda la cría y gran parte de las obreras de la colonia, se encuentran en el interior de las espinas de *Acacia* que ellas ocupan. Las hormigas cortan o hacen un agujero de entrada a través de la pared de las espinas, cerca de uno de sus extremos, mientras la espina esta aún verde pero completamente expandida.

Los nectarios extraflorales de las acacias con espinas engrosadas son mucho más grandes y tienen un flujo mayor de néctar que aquellos de las acacias no mirmecófitas; una *Acacia* de 2m de altura produce alrededor de 1mL por día de glucosa y fructuosa. Estos azúcares son virtualmente la única fuente energética en una colonia de hormigas –*Acacia*.

Solamente las *Acacias* con espinas engrosadas o aquellas que se presume que genéticamente existen relacionadas, tienen los ápices de los folíolos modificados en beltarios.” (Janzen, 1966, y 1979)

Los bosques y arbustales de regiones áridas y semiáridas cumplen una función importante en relación a la protección del suelo contra la desertificación. Las especies de *Acacia* forman arbustales de considerable desarrollo en regiones tropicales y subtropicales de América, Australia y el sudeste de Asia.

El conocimiento de los caracteres anatómicos del leño y la determinación de tasas de crecimiento de especies arbustivas son necesarios para comprender mejor la dinámica de los arbustales, revalorizar su presencia e impulsar usos alternativos.

Se reconocen las características anatómicas del leño de *A. aroma* y *A. furcatispina* para analizar la evolución del crecimiento de árboles individuales con relación a la edad y la presencia de fitopatógenos (Bravo et al., 2001).

El diámetro tangencial medio de los vasos xilemáticos y floemáticos permite asignar la categoría de “poros medianos” a *A. aroma* y “poros pequeños” a *A. furcatispina*, según las categorías establecidas por Giménez (1993). Este resultado concuerda con el mayor porcentaje de vasos en la madera de *A. furcatispina*, ya que existe una relación inversa entre el número de poros y el diámetro tangencial de sus elementos (Moglia y López 2001). El mayor porcentaje de elementos lignificados influye probablemente en el mejor estado fitosanitario observado en las muestras de leño de *A. furcatispina*. En *A. aroma*, el parénquima axial y radial brindan probablemente una mayor cantidad de sustrato respirable para patógenos como bacterias y hongos, responsables de pudriciones de corazón en muestras de leño. Este tipo de deterioro ha sido observado en el leño de otras especies de *Acacia*, citándose como hongos patógenos a especies de los géneros *Fomes* y *Ganoderma* (Lee et al. 1988)

La decoloración del leño observada en *A. furcatispina* es un defecto que disminuye la calidad de la madera y representa, al igual que la gomosis y otros procesos de secreción, una respuesta común frente a daños al tallo (Radermacher et al. 1984, Giménez et al. 1998, Bravo et al. 2001, Smith y Sutherland 2001) En *A. mangium* la decoloración del leño es inducida por la invasión de patógenos a través de una lesión (Lee et al. 1988, Schmitt et al. 1995). Bravo et al. (2001).

2.2.1 Mutualismo entre planta-hormiga

Los mutualismos, interacciones de provecho recíproco que brindan beneficios netos para ambas partes (Thompson 1982; Janzen 1985; Conner 1995), son comunes en ecosistemas y taxa. Muchos organismos emplean los beneficios o servicios que brindan otras especies para aumentar su supervivencia, crecimiento, y reproducción, a cambio de producir beneficios o servicios (por ejemplo, transportación, protección, o nutrición) disponibles para su socio mutualista (Noë y

Hammerstein 1994; Schwartz y Hoeksema 1998). La disponibilidad de estos beneficios o servicios brindan la posibilidad de que otros no mutualistas los exploten, tomando estos beneficios o servicios sin nada a cambio para ninguno de los mutualistas. A tales individuos se les llama con frecuencia explotadores de mutualismos (Bronstein 2001), parásitos de mutualismos (Janzen 1975), aprovechados (Soberon y Martínez del Río 1985), rateros (Pellmyr et al. 1996), o ladrones (Inouye 1983)

Los mutualismos planta-hormiga, especialmente, aquellos en los cuales las hormigas habitan y defienden sus plantas hospedantes y las plantas brindan recursos a las hormigas, proveen una excelente oportunidad para el acceso a los recursos de nutrición y defensa para los organismos que son capaces de explotarlos. El mutualismo de la acacia-hormiga cuerno de toro es una de tales interacciones. Muchas especies de *Vachellia* (primeramente conocidas como *Acacia* spp), acacias cuerno de toro, forman mutualismos obligados con *Pseudomyrmex* spp (comúnmente menos con hormigas *Crematogaster* spp). Estos mirmecófitos (plantas que viven en asociación con hormigas) proveen néctar a las hormigas vía nectarios extraflorales, cuerpos de Belt (estructuras ricas en proteínas y lípidos producidas sobre las hojas jóvenes y dadas como alimento a las larvas de las hormigas), y refugio en forma de domacios, en los cuales las hormigas crían su descendencia (Janzen 1983) las hormigas defienden los árboles hospedantes de los herbívoros y patógenos, remueven los detritus, y frecuentemente eliminan otra vegetación del área que rodea la base de una planta hospedante (Janzen 1966)

Las especies capaces de infiltrar el mutualismo hormiga-acacia pueden obtener beneficios tales como espacio libre de enemigos, reducción de la competencia, y acceso a fuentes de alimentos. Además, el tejido de la hoja de los árboles de las Acacias mirmecófitas tienen concentraciones más bajas de quitinasas vegetales, glucósidos cianogénicos, y alcaloides, comparados con los de la Acacias no-mirmecófitas (Heil et al 2000; Rehr et al 1973); estas hojas están relativamente sin defensa química y relativamente gustosas para los herbívoros que burlan la

defensa de las hormigas. Las hormigas patrullan los árboles de acacias y retiran la mayor parte de los herbívoros que no son capaces de resistir o burlar sus defensas y los herbívoros que pueden persistir sobre estos árboles pueden ganar un espacio libre de enemigos y una competencia reducida por las fuentes de alimentación.

Los explotadores infiltran los mutualismos hormiga- planta a través del parecido químico o corrupción de los sistemas de comunicación del hospedante (Hölldobler y Wilson 1990; Akino et al 1999; Barbero 2009), a través del comportamiento o morfología (Styrsky y Eubanks 2007; Reiskind 1977). Los explotadores que persisten dentro del mutualismo acacia-hormiga tienen varias adaptaciones en cada una de estas categorías que les permiten escapar al comportamiento agresivo de las hormigas que viven en los árboles hospedantes, incluyendo rasgos morfológicos: exocutícula muy fuerte en los escarabajos rutelinos; rasgos de comportamiento: construcción de refugios por las larvas de *Aristotelia coralina* (Gelechiidae) que se alimentan en el ápice de los brotes; el comportamiento evasivo de *Bagheera kiplingi*, una araña que se alimenta en los cuerpos de Belt (Meehan et al 2009); y parecidos químicos; absorción de olores de la colonia por Orioles y *Kiskadees* que anidan en los arboles de acacia (Janzen 1983; Eubanks et al 1997) No obstante, se conocen otros explotadores del mutualismo acacia-hormiga o los medios por los cuales lo logran. Las sociedades de hormigas tienen complejos sistemas de comunicación (Hölldobler y Wilson 1990; Jackson y Ratnieks 2006) basados en el intercambio de semioquímicos importantes para el reconocimiento de los compañeros del nido, la iniciación de la defensa, navegación, y para determinar el resultado de interacciones intraespecíficas (Hölldobler y Wilson 1990; Hölldobler 1999). Los explotadores del mutualismo acacia-hormiga pueden usar esta seguridad en los sistemas de seguridad para burlar las defensas normales de las hormigas.

La corrupción de los sistemas de comunicación química se pueden lograr adquiriendo hidrocarburos cuticulares de sus hospedantes a través del contacto físico directo (trophofilaxis o aloacicalamiento), la biosíntesis, o a través de la dieta

(Dettner y Leipert 1994; Lenoir et al 2001; Elgar y Allan 2004). Para algunos explotadores o parásitos sociales este modo de simulación conlleva el alto costo de la especificidad en el hospedante (Elgar y Allan 2004) de modo que, el individuo o especie está confinado a vivir con una especie de hormiga o aun en una misma colonia.

En general, se conocen las estrategias que las explotadoras usan para burlar la defensa de la colonia, sin embargo, para cualquier interacción dada entre explotadores y mutualistas los mecanismos frecuentemente no se describen y son pobremente entendidos. En una floresta neotropical decidua de terrenos bajos (Parque Nacional Palo Verde, Guanacaste, Costa Rica) se encontró un hemíptero (Hemiptera; Coreidae) alimentándose sobre árboles de *Vachellia* spp que no era molestado por las hormigas residentes. Esta especie, hasta ahora determinada como *Mozena* sp, parece alimentarse solamente con los jugos de las hojas tiernas, destruyendo importantes recursos, tanto para los árboles como para las hormigas residentes. Los adultos de este coreido se alimentan en hojas tiernas de *Vachellia* sp. (Acacia cuernos de toro) con una proboscis picador-chupador, causando que las hojuelas se marchiten, lo que resulta en la pérdida de las hojas, los cuerpos de Belt, y los nectarios extraflorales. Cuando este coreido se está alimentando o caminando sobre los árboles de *Vachellia* spp no tiene lugar la alerta de las hormigas que defienden las plantas. Los mecanismos conductuales o morfológicos para evitar las defensas de las hormigas han sido enlistados por investigaciones previas (Whitehead et al., datos sin publicar) Así, el mecanismo que permite a *Mozena* sp escapar a la detección y ataque se asume que es debido a señales químicas.

Se conoce que *Mozena* sp. produce compuestos orgánicos volátiles desconocidos en las glándulas del metatórax, que son asperjados para su defensa (Aldrich et al. 1982). Estos humores químicos, quizá en adición a hidrocarburos cuticulares que corrompan los sistemas de comunicación de las hormigas, pueden ser usados para

invadir acacias mirmecófitas y permitir la explotación de las hormigas de la acacia y los árboles de *Vachellia* spp.

2.3 Mirmecofilia en *Acacia cornigera*

El primer autor que mencionó por escrito a las mirmecófitas fue el naturalista Francisco Hernández en 1651, al referirse a la planta “huitzmaxalli” (*Acacia cornigera*), afirmando que dicha planta vive en asociación con “hormigas muy feroces” (Jolivet, 1987). Otros pioneros en el estudio de la mirmecofilia fueron los biólogos de campo Fritz Mueller en el siglo XIX y William Morton Wheeler a principios del siglo XX (Figura 1). Este último, un gran naturalista, fue particularmente prolífico en su descripción de casos de interacción mirmecófila y de sus estudios pioneros.

El ejemplo clásico de una asociación mirmecófila entre la planta *Acacia cornigera* y sus hormigas mutualistas *Pseudomyrmex ferruginea* fue descrito en detalle por Janzen (1966). En este caso particular, las hormigas habitan en las espinas huecas de la planta y se alimentan de unos pequeños glóbulos ricos en glucógeno (cuerpos de Belt) que son secretados por el ápice de los foliolos (Figura 2b). Janzen (1966) demostró experimentalmente que las hormigas ejercen una acción benéfica para las acacias. El mensaje de sus experimentos es que las plantas que no tienen (o pierden) la asociación con las hormigas disminuyen su adecuación, debido a que son atacadas ferozmente por herbívoros y a veces invadidas por lianas trepadoras, lo que puede resultar en la muerte de la planta. Estos efectos positivos sobre la supervivencia y bienestar de las plantas pueden, a su vez, tener un efecto positivo sobre el éxito reproductivo de las mismas.

En algunos casos como el de *Acacia* y *Cecropia*, las mirmecófitas tienen una adaptación muy particular en su metabolismo. Dichas plantas son capaces de producir glucógeno como componente de los cuerpos alimenticios. Esta modificación en el metabolismo de las plantas es muy significativa, pues por regla general, únicamente los animales son productores de glucógeno. También se hace

notar que la producción de un elemento nutritivo de tipo animal por parte de estas plantas para alimentar hormigas, es consistente con el hecho de que las hormigas, que son un linaje evolutivo de tipo carnívoro pero adaptado a alimentarse de productos vegetales, reciben de su interacción mirmecófila un alimento que, sorprendentemente, se asemeja a un producto animal. Debido a esto, algunos autores (p.e., Bentley, 1977; Jolivet, 1998) postulan que el desarrollo de nectarios extraflorales y la producción excepcional de glucógeno provienen de la evolución de estrategias que seleccionaron a las plantas para mantener su relación con las hormigas.

2.4 Clasificación taxonómica, ubicación geográfica y características generales de *Acacia cornigera*.

2.4.1 Clasificación científica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Tribu: Acacieae

Género: *Acacia*

Especie: *A. cornigera*

Nombre binomial: *Acacia cornigera* (L.) Willd., 1806

2.4.2 Distribución

Es nativa del sur de México y Centroamérica. Se distribuye por Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Estados Unidos. Ha sido introducida en India y Pakistán (Zamora, 1991).

2.4.3 Descripción

Esta especie puede alcanzar hasta 10 m de altura. Tiene espinas grandes, ahuecadas dirigidas hacia afuera (espinas dorsales estipulares) que están en pares en la base de las hojas, se asemejan a los cuernos de un toro y son de color ligera o fuertemente cafés, algunas veces marfil o amarillas.

Las hojas bipinnadas, con raquis principal de 12 a 14 cm de longitud, con 8 a 10 pares de hojuelas de 4 a 6 cm de largo y pecíolo acanalado de 0,5 a 2 cm, cada hojuela con 22 a 32 pares de pinnas de 3 a 7 mm de largo y 7 a 17 mm entre par de pinnas. Inflorescencia en espiga con flores sésiles de corolas amarillas de 1,1 a 1,5 mm de largo, ligeramente más largas que el cáliz. Legumbre color caoba, usualmente erecta, rolliza, 5 a 9 cm de longitud por 1,3 a 1,8 cm de anchura, con ápice puntudo. Semillas color pardo oscuro (Zamora, 1991).

2.4.4 Mirmecofilia

Esta acacia es conocida por su relación simbiótica con las hormigas del género *Pseudomyrmex* (*P. ferruginea*, *P. belti*, *P. nigrosincta*). Las hormigas actúan como mecanismo de defensa para el árbol, protegiéndolo contra insectos y otros animales dañinos o contra plantas parásitas. Las hormigas habitan en las espinas huecas de la planta y se alimentan de unos pequeños glóbulos ricos en glucógeno (cuerpos de Belt) que son secretados por el ápice de los foliolos (Zamora, 1991).

2.4.5 Uso medicinal

La medicina tradicional atribuye al cocimiento de la raíz propiedades antiinflamatorias, analgésicas y anti diarreicas, siendo usado también para aliviar la tos. La corteza como la raíz son usadas para tratar mordeduras de determinadas serpientes y las vainas del fruto para tratar los "fuegos" o infecciones micóticas de la boca (Zamora, 1991).

2.4.6 Sinonimia

Acacia cornigera (L.) Willd., 1806

Acacia campecheana Schenck

Acacia cornigera (L.) Willd. var. *americana* DC.

Acacia cubensis Schenck

Acacia furcella Saff.

Acacia hernandezii Saff.

Acacia interjecta Schenck

Acacia rossiana Schenck

Acacia spadigera Schldl. y Cham.

Acacia turgida Saff.

Mimosa cornigera L.

Tauroceras cornigerum (L.) Britton y Rose

Tauroceras spadigerum (Schldl. y Cham.) Britton y Rose

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Evaluar las modificaciones morfológicas de plantas de la especie *Acacia daemon*, en asociación con sus especies de hormigas inquilinas.

Los experimentos y evaluaciones fueron realizados en el Laboratorio de Taxonomía, perteneciente al edificio del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) enclavado en el área de la Universidad Martha Abreu de Las Villas; con la presencia y asesoramiento del Dr. C. Horacio Grillo Ravelo. Desde el 8 de Octubre del 2008 hasta el 12 de Junio del 2009.

Se marcaron 4 plantas de *A. daemon* en el área de El Playazo, Sabanas de Cubanacán, Santa Clara, Villa Clara, cuidando que estuviesen en lugares protegidos de la tala o destrucción por el fuego. Se establecieron cuatro zonas de 50 cm de altura cada una sobre el tallo principal y a partir del nivel del suelo, y se contabilizó el número de espinas gigantes y de espinas normales.

Se describieron los siguientes aspectos:

- a- Relación numérica de espinas normales/gigantes en cada verticilo y zona del tallo.
- b- Caracterización de las espinas describiendo color: verde (V), castaña (C), y gris (G), forma, dimensiones: largo y ancho (en mm) y desarrollo de las mismas.
- c- Follaje, flores y frutos de la planta.

Contabilizar el número de espinas gigantes con orificios practicados por hormigas, aclarando el tipo de los mismos, caracterizar los orificios (posición en la espina, apical o basal), y elaborar una base de datos utilizando pruebas no paramétricas Mann Whitney con los valores obtenidos en el estudio de las espinas. Colectar y referenciar con el micronicho todos los insectos que se encuentren; hacer anotaciones de todo lo observado. Conformar y conservar una colección de estudio con estos materiales empleando un sistema de codificación moderno e identificar las especies involucradas.

3.2 Evaluar caracteres asociados a la mirmecofilia en ejemplares de *Acacia* spp. , procedentes de diferentes localidades.

Se estudiaron 11 especies de *Acacia* procedentes de las siguientes localidades:

3.2.1 Jardín Botánico de Cienfuegos (JBC)

1. *Acacia auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth.
2. *Acacia campilacantha* Hochst. ex A. Rich.
3. *Acacia catechu* Willd.
4. *Acacia cornigera* (L.) Willd.
5. *Acacia jutsonii* Maiden.
6. *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex Delile
7. *Acacia scorpioides* W. F. Wight
8. *Acacia suma* Kurz. ex Brandis
9. *Acacia torta* Craib.

3.2.2 Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “ Marta Abreu” de Las Villas (CEJBVC), Santa Clara, Villa Clara:

- *A. cornigera*. (L)

3.2.3 Localidad El Playazo, Área protegida Cubanacán (Cub.), Santa Clara, Villa Clara

- *Acacia daemon* Urb. y Ekm.

3.2.4 Playa Honda, Costa Rica. (CR) (Material recibido por correo especial para material científico conservado):

- *Acacia collinsii* Saff

(Material usado como muestra patrón para comparación).

Sustrato

Serpentinita.

Suelos pardos con carbonato.

Se emplearon los siguientes materiales y utensilios:

- **Tubos de ensayo:** para recoger muestras de espinas.
- **Aspiradores:** para co lectar las hormigas.
- **Cintas de colores fosforescentes:** para marcar las plantas.
- **Pomos de cristal:** para contener las hormigas co lectadas.
- **Cajas de cartón pequeñas:** para guardar y transportar las secciones de ramas con espinas co lectadas en el campo.
- **Cintra métrica:** para medir las dimensiones de la planta en las cuáles se tomaron muestras.
- **Cables de colores:** para marcar las secciones en las plantas.
- **Espátula:** para remover las espinas en los troncos.
- **Microscopio estereoscópico.** Para el estudio de los detalles de las muestras.
- **Lupa.** Para las observaciones de campo.
- **Cámara fotográfica digital.** Imágenes que acompañan al trabajo.
- **Etiquetas:** para marcar las diferentes muestras.
- **Cuadernos de anotaciones para el campo.**

3.3 Determinación de la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de *Acacia cornigera* (L).

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Microbiología Aplicada perteneciente al Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central de Las Villas, durante el período comprendido entre 26 de Junio y 12 de Julio del 2011. Se contó con la asistencia de la técnica especialista en micología agrícola: Mayra Acosta Suárez, la cual facilitó la implementación para realizar dichos experimentos. La esterilización de las placas Petri ha utilizar, fue realizada en Estufa a 180°C durante dos horas. La esterilización del medio de cultivo utilizado fue realizada en Autoclave a 121°C, 1,2 atm de presión, durante 40 minutos. El experimento fue montado en equipo de Flujo Laminar, para evitar contaminación ambiental.

3.3.1 Montaje y esterilización de Cámaras Húmedas:

En el primer día de practica investigativa se montaron y esterilizaron Cámaras Húmedas, estas se utilizaron para aislar los hongos filamentosos presentes en las espinas de *A. cornigera* y determinar su micobiota endofítica y epifítica.

Materiales:

Placas Petri de 14,50 mm de diámetro
 Portaobjetos
 Papel de filtro
 Cristal en forma de V o soporte de vidrio
 Agua desionizada estéril

Se montaron las placas Petri (D=14,50 mm) con el papel de filtro en el fondo, previamente humedecido con agua desionizada estéril; sobre este se colocaron el soporte de vidrio en forma de V y el portaobjetos. Esto se realizó de esta manera para que el portaobjetos quede separado del papel de filtro y no se altere la muestra (**Anexo 1**).

3.3.2 Preparación de las muestras para las Cámaras Húmedas:

Se utilizaron como muestras para este experimento espinas, que presentaban crecimiento anormal o gigantismo, de *Acacia cornigera* procedentes de tres lugares:

- Espinas de *Acacia cornigera* de Honduras. (H)
- Espinas de *Acacia cornigera* de Costa Rica. (CR)
- Espinas de *Acacia cornigera* de Cuba, Jardín Botánico de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas. (CEJBVC)

Materiales:

Agua corriente	Tijeras
Agua desionizada	Bisturí estéril
Erlenmeyers	Equipo de Flujo Laminar
Pinza	Incubadora

Se seleccionaron un total de tres espinas de cada uno de los lugares de procedencia. Estas muestras se lavaron durante aproximadamente 15 min. en agua corriente para evitar la presencia de microorganismos saprofitos y la contaminación de las muestras. Luego se depositaron en Erlenmeyers con agua desionizada estéril durante 10 min (**Anexo 2**). En las Cámaras Húmedas (previamente esterilizadas) se depositaron las tres muestras diferentes de espinas de *Acacia cornigera*, (**Anexo 3**) para un total de seis placas. Las Cámaras Húmedas se incubaron a 28°C y oscuridad constante durante seis días.

3.3.3 Montaje de las placas para el aislamiento de los hongos filamentosos.

Materiales:

Placas Petri de 90 mm de diámetro

Plaquero

Estufa

Equipo de Flujo Laminar

Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) a pH 5,8

Se utilizaron placas Petri de 90mm de diámetro con medio de cultivo PDA realizado a partir de sus componentes naturales:

200g de papa

20g de dextrosa

20g de Agar

3.3.4 Aislamiento de hongos filamentosos en placas de cultivo.

Materiales:

Mechero Aguja enmangada

Fósforos Estereoscopio

Alcohol Placas Petri (D=90mm) con medio de cultivo PDA

Posteriormente se aislaron en las placas con medio de cultivo PDA, cada uno de los diferentes hongos que se observaron en las espinas, los que se encontraban hacia la base de las acículas y los que se encontraron en el interior de las mismas. Las placas fueron incubadas a 28°C y oscuridad constante durante seis días (**Anexo 4**). Las placas fueron nombradas de la siguiente forma (**Tabla I**)

Tabla I. Montaje de las placas Petri con aislados de hongos presentes en espinas de *A. cornigera*

Plantas hospedantes	<i>A. cornigera</i> (H): A.c. I	<i>A. cornigera</i> (CR): A.c. II	<i>A. cornigera</i> (CEJBVC): A.c. III
P L A C A S	P-1: hongo con crecimiento filamentosos verde	P-1: hongo con crecimiento filamentosos blanco hacia la base de las acículas.	P-1: hongo con crecimiento filamentosos algodónosos blanco.
	P-2: hongo presente en agujero hecho por hormigas; con crecimiento filamentosos verde.	P-2: hongo con crecimiento filamentosos verde.	P-2: hongo con crecimiento filamentosos blanco entre los tejidos leñosos de la base de las acículas.
	P-3: hongo con crecimiento filamentosos blanco hacia la base de las acículas.	P-3: cuerpos pequeños que cubrían las paredes de las acículas en su interior.	P-3: larvas de hormigas que se encontraron en el interior de una acícula.

Plantas hospedantes	<i>A. cornigera</i> (H): A.c. I	<i>A. cornigera</i> (CR): A.c. II	<i>A. cornigera</i> (CEJBVC): A.c. III
P L A C A S	P- 4: No crecimiento.	P-4: hongo con crecimiento filamentoso verde en el interior de la acícula.	P-4: hongo con crecimiento filamentoso blanco en la base de las acículas.
	P- 5: No crecimiento	P-5: hongo con crecimiento filamentoso verde en el interior y base de la acícula.	P-5: hongo con crecimiento filamentoso en el interior de la acícula.

3.3.5 Identificación de las muestras de colonias:

Para la identificación de hongos filamentosos aislados se describieron las características culturales en medio de cultivo PDA y se tomó un fragmento de micelio de las colonias crecidas y se hicieron preparaciones directas al microscopio óptico (OLYMPUS) con aumento de 400X. Se observaron las características morfológicas y se utilizó el manual de clasificación de Watanabe (2002)

Materiales:

Mechero

Aguja enmangada

Portaobjetos

Cubreobjetos

Tinción con Lactofenol blanco

Microscopio óptico (OLYMPUS)

3.4 Determinación de la micobiota en tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas sin huecos de la planta de *A. cornigera*, presente en el Jardín Botánico de la UCLV.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Microbiología Aplicada perteneciente al Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central de Las Villas, durante el período comprendido entre 27 de Junio y 12 de Julio del 2012. Se contó con la asistencia de la técnica especialista en micología agrícola: Mayra Acosta Suárez, la cual facilitó la implementación para realizar dichos experimentos y con la presencia como consultante del Dr. C. Michel Leiva Mora para la elaboración teórica de dichos experimentos.

La esterilización de las placas Petri utilizadas fue realizada en Estufa a 180°C durante dos horas. La esterilización del medio de cultivo utilizado fue realizada en Autoclave a 121°C, 1,2 atm de presión, durante 40 minutos. El experimento fue montado en equipo de Flujo Laminar, para evitar contaminación ambiental. (Se hace referencia al mismo proceder del experimento anterior)

3.4.1 Montaje y esterilización de Cámaras Húmedas:

El día 28 de junio se montaron y esterilizaron Cámaras Húmedas, estas se utilizaron para aislar los hongos filamentosos presentes en el tejido interno de las espinas verdes o juveniles y espinas adultas, sin huecos, de *A. cornigera* para determinar su micobiota.

Materiales:

Placas Petri de 14,50 mm de diámetro

Portaobjetos

Papel de filtro

Cristal en forma de V o soporte de vidrio

Agua desionizada estéril

Se montaron las placas Petri (D=14,50 mm) con el papel de filtro en el fondo, previamente humedecido con agua desionizada estéril; sobre este se colocaron el soporte de vidrio en forma de V y el portaobjetos. Esto se realizó de esta manera para que el portaobjetos quede separado del papel de filtro y no se altere la muestra.

3.4.2 Preparación de las muestras para las Cámaras Húmedas:

Se utilizaron como muestras para este experimento espinas verdes o juveniles y espinas adultas, sin huecos, que presentaban crecimiento anormal o gigantismo, de *A. cornigera* procedentes del Jardín Botánico enclavado dentro del área de la Universidad Central de Las Villas.

Se realizó un correcto lavado para la descontaminación superficial de las espinas para su posterior montaje en Cámaras Húmedas (CH) previamente preparadas. Se utilizaron los siguientes materiales:

Materiales:

Agua corriente	Tijeras
Agua desionizada	Bisturí estéril
Erlenmeyers	Equipo de Flujo Laminar
Pinza	Incubadora

Se seleccionaron un total de tres espinas de cada uno de los tipos de espinas colectadas. Estas muestras se lavaron durante aproximadamente 15 min. en agua corriente para evitar la presencia de microorganismos saprofitos y la contaminación de la muestras.

Luego se depositaron en Erlenmeyers con agua desionizada estéril por un tiempo de 10 min. Posteriormente, en las CH se depositaron las tres muestras diferentes de espinas de *A. cornigera*, para un total de cuatro placas; quedando la siguiente distribución:

CH-1: Espinas juveniles

CH-3: Espinas adultas

CH-2: Espinas juveniles

CH-4: Espinas adultas

Las Cámaras Húmedas se incubaron a 28°C y oscuridad constante en incubadora durante cinco días.

3.4.3 Montaje de las placas con medio de cultivo para el aislamiento de los hongos filamentosos:

Se utilizaron placas Petri de 90mm de diámetro con medio de cultivo PDA realizado a partir de sus componentes naturales:

200g de papa

20g de Dextrosa

20g de Agar

Materiales:

Placas Petri de D=90 mm

Equipo de Flujo Laminar

Plaquero

Medio de cultivo (PDA) a pH 5,8

Estufa

3.4.4 Aislamiento de hongos filamentosos en placas de cultivo.

Materiales:

Mechero

Aguja enmangada

Fósforos

Estereoscopio

Alcohol

Placas Petri (D=90mm) con medio de cultivo PDA

El día 3 de Julio se procedió a tomar muestras del tejido interno de las diferentes espinas para su aislamiento en las placas con medio de cultivo PDA. Se montaron ocho placas de cultivo para doble réplica por cada Cámara Húmeda.

Una placa de cultivo para muestras del tejido del ápice de la espina y una para muestras de la base de la misma. Se cortaron cuatro muestras de tejido interno de

cada parte de la espina y se colocaron en cuatro puntos independientes de la placa. Las placas quedaron distribuidas de la siguiente manera:

M-1: Espinas juveniles. Base	M-1: Espinas juveniles. Ápice
M-2: Espinas juveniles. Base	M-2: Espinas juveniles. Ápice
M-3: Espinas adultas. Base	M-3: Espinas adultas. Ápice
M-4: Espinas adultas. Base	M-4: Espinas adultas. Ápice

Las placas fueron incubadas a 28°C y oscuridad constante durante siete días.

3.4.5 Cultivo de hongos filamentosos en Tubos de ensayo con medio PDA.

Materiales:

Mechero	Aguja enmangada
Fósforos	Estereoscopio
Alcohol	Tubos de ensayo con medio de cultivo PDA

El día 11 de Julio se procedió a pasar a Tubos de ensayo con medio de cultivo PDA, las diferentes colonias de hongos presentes en las placas de cultivo; para su futura identificación y conservación para posteriores análisis. La distribución de los hongos en los Tubos de ensayo (nombrados con la letra P) quedó de la siguiente forma:

P-1 y P-2: Aislado # 4 (9/7/2012) de M-2. Espinas juveniles. Base.(3/7/2012)

P-3: Aislado # 3 (9/7/2012) de M-2. Espinas juveniles. Base.(3/7/2012)

P-4, P-5 y P-6: M-2. Espinas juveniles. Base.(3/7/2012)

P-7 y P-8: M-4. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

P-9, P-10 y P-11: Resiembra de M-2B. Espinas juveniles. Ápice. (6/7/2012)

P-12 y P-13: Resiembra de M-2B. Espinas juveniles. Ápice. (6/7/2012)

P-14, 15, 16 y 17: M-1. Espinas juveniles. Ápice. (3/7/2012)

3.5 Determinación de las concentraciones de auxinas (AIA) en las colonias de hongos filamentosos obtenidos en el tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de *A. cornigera*, presente en el Jardín Botánico de la UCLV.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Microbiología Aplicada perteneciente al Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central de Las Villas, durante el período comprendido entre 12 de Octubre y 22 de Octubre del 2012. Se contó con la asistencia de la técnica especialista en micología agrícola: Mayra Acosta Suárez, la cual facilitó la implementación para realizar dichos experimentos y con la presencia como consultante del Dr. C. Michel Leiva Mora para la elaboración teórica de dichos experimentos.

3.5.1 Cultivo en Caldo-Triptona-Soya, a pH= 5,8, de las muestras de hongos en tubos de ensayo.

El día 12 de Octubre se procedió a cultivar en Caldo-Triptona-Soya (CTS), a pH= 5,8, las muestras de hongos conservadas anteriormente en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA. Para la producción de AIA con el fin de determinar si los hongos secretan al medio auxinas u hormonas y en qué cantidad. (Anexo 6)

Material es:

Tubitos Eppendorf de 2ml

Aguja enmangada

Mechero

Alcohol

Cámara de Flujo Laminar

Pipeta de 100mg/L

Caldo:

Triptona-Soya 3g

Tryptophano 0.01g

Agua 100ml

(a pH= 5.8)

Luego de prepararse el caldo, se dejó esterilizar durante cinco horas, pasado este tiempo se inocularon los hongos en los tubitos Eppendorf de 2ml (nombrados con la letra T) con medio de cultivo CTS y se hizo una réplica para cada Tubo (denominada con las letras T#r). Se incubaron de 28°C a 30°C en la oscuridad durante siete días; quedando la distribución de la siguiente manera:

Tubos y Réplicas:

T1 y T1r: P-9 (11/7/2012)
T2 y T2r: P-17 (11/7/2012)
T3 y T3r: P-13 (11/7/2012)
T4 y T4r: P-10 (11/7/2012)
T5 y T5r: P-2 (11/7/2012)
T6 y T6r: P-14 (11/7/2012)
T7 y T7r: P-12 (11/7/2012)
T8 y T8r: P-15 (11/7/2012)
T9 y T9r: P-5 (11/7/2012)
T10 y T10r: P-3 (11/7/2012)
T11 y T11r: P-8 (11/7/2012)
T12 y T12r: P-11 (11/7/2012)
T13 y T13r: P-4 (11/7/2012)
T14 y T14r: P-1 (11/7/2012)
T15 y T15r: P-16 (11/7/2012)
T16 y T16r: P-6 (11/7/2012)

***P-7 (11/7/2012):** Contaminado con Bacterias.

3.5.2 Determinación de las concentraciones de AIA:

El día 19 de Octubre, para la realización de este experimento se utilizó el equipo Centrifuge 5415D Eppendorf y se siguió el Protocolo de determinación de concentraciones de AIA según Spaeper (2008), el cual consta de los siguientes pasos:

1. Inocular hongos o bacterias en medio de cultivo CTS a un pH aproximado de 5,6 a 7,2, suplementado con 100mg/L de Triptophano. Incubar de 28°C a 30°C en la oscuridad durante siete días.
2. Se centrifuga por 5 min. a 6000 rpm (en nuestro caso al ser hongos se centrifuga por 40min a 13000 rpm)
3. Se extrae el sobrenadante (75ml) y se le agrega 750ml de reactivo de Salkowsky.
4. Incubar en oscuridad durante 30min.
5. Medir absorbancia a OD=530nm. Realizar curva estándar de AIA a la misma concentración más 750ml de la diferencia, con los datos obtenidos.

Resultados

4. Resultados

4.1 Evaluar las modificaciones morfológicas de plantas de la especie *Acacia daemon*, en asociación con sus especies de hormigas inquilinas.

En los cuabales de Cubanacán, cercanos a la ciudad de Santa Clara, existe la especie *A. daemon*, la cuál tiene algunas espinas de mayor tamaño que el resto de las espinas normales y en las cuáles existen orificios y evidencias internas de haber sido habitadas por hormigas.

Del análisis de las 4 plantas marcadas y estudiadas en el campo, se encontraron en ellas espinas gigantes, las cuáles son más abundantes en el tallo principal hacia los dos primeros estratos inferiores. Se halló un 20% de orificios en las espinas gigantes. La longitud de las espinas gigantes fluctúa entre los 30 y 90 mm, el grosor, por su parte más ancha, varía entre 0,8 y 3,2 mm; y el color predominante es el gris, aunque existen castañas y verdes **(Anexos 7, 8, 9 y 10)**

Estas espinas gigantes aparecen formando un verticilo en que casi todas tienen esta condición; están distribuidas a todo lo largo del tronco principal del árbol, especialmente en la mitad inferior. **(Anexos 11, 12 y 13)**

Algunas espinas tienen dos tipos de orificios:

a -de forma ovalado-alargada, toscamente labrados desde el exterior; con los bordes irregulares. Son los más abundantes. **(Anexo 14)**

b- de forma circular, con los bordes nítidamente cortados, labrados desde adentro. Pertenecientes a parasitoides (presencia de una larva), posiblemente Himenóptera. Hay dos tipos de estos orificios, que se diferencian por sus diámetros. **(Anexo 15)**

Encontramos en varias espinas gigantes con orificios, colonias con numerosos individuos adultos de hormiga y demás estados de desarrollo. Las espinas gigantes más viejas están deshabitadas y en su superficie exterior hay estructuras fungosas de contorno circular **(Anexo 16)**, algo elevadas, de color negro (acérvulos). Las espinas finas son las más abundantes y no tienen estas estructuras fungosas. **(Anexo 17)**

Las hojas presentaron nectarios extraflorales en la zona del ápice del pecíolo, no tienen Beltarios en el ápice de los folíolos y se puede apreciar que esta especie presenta varios caracteres relacionados con la mirmecofilia, aunque carece de algunos que son esenciales. **(Anexos 18 y 19)**. Se encontraron pequeñas colonias de *Tapinoma* sp. en el interior de las espinas gigantes de *A. daemon*, esta especie es cercana a *T. litoralis* y *T. melanocephalum* las dos especies informadas para Cuba, pero difiere en varios aspectos morfológicos lo que señala que se trata de otra especie. Por todas estas condiciones, consideramos que *A. daemon* está en camino evolutivo de convertirse en una especie mirmecófita. **(Tabla II)**.

Los datos generales recogidos en el campo fueron:

- Santa Clara, Cubanacán, el Playazo.8, VII /09
- Especie: *Acacia daemon*

Tabla II. Distribución de las espinas en el tallo principal.

NO. PLANTA	ESTRATOS	Espinass	
		GIGANTES	NORMALES
1	A	24	11
	B	21	4
	C	27	4
	D	15	7
2	A	13	7
	B	19	6
	C	16	7
	D	29	8
3	A	23	5
	B	6	10
	C	14	9
	D	28	7
4	A	9	11
	B	9	18
	C	1	30
	D	2	20

4.2 Evaluar caracteres asociados a la mirmecofilia en ejemplares de *Acacia* spp. , procedentes de diferentes localidades.

4.2.1 Ejemplares procedentes del Jardín Botánico de Cienfuegos (JBC)

*Especies Jardín Botánico de Cienfuegos** (9)

Edad de los ejemplares (6- 74 años)

Total de ejemplares: 35

1-*Acacia auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth.

2 ejemplares de 42 años

2- *Acacia campilacantha* Hochst. ex A. Rich.

1 ejemplar de 37 años

2 ejemplares de 8 años

3.- *Acacia catechu* Willd.

2 ejemplares de 69 años

2 ejemplares de 26 años

1 ejemplar de 20 años

4.- *Acacia cornigera* (L.) Willd.N

2 ejemplares de 17 años

1 ejemplar de 21 años

5.- *Acacia jutsonii* Maiden.

4 ejemplares de 6 años

6.- *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex Delile

1 ejemplar de 71 años

2 ejemplares de 67 años

2 ejemplares de 43 años

7. - *Acacia scorpioides* W. F. Wight

1 ejemplar de 74 años

3 ejemplares de 33 años

4 ejemplares de 14 años

8.- *Acacia suma* Kurz. ex Brandis

2 ejemplares de 46 años

2 ejemplares de 7 años

9.- *Acacia torta* Craib.

1 ejemplar de 6 años

Al establecer la comparación de los caracteres relacionados con la mirmecofilia de las especies colectadas (Tabla III) se ha constatado que no todas las especies tuvieron espinas gigantes y hormigas asociadas a ellas. Solamente *A. cornigera* ha presentado hormigas asociadas. No presentaban tampoco otros caracteres mirmecófitos evaluados, para la mayoría de las especies.

Tabla III. *Acacia* spp. colectadas en el JBC. Caracteres relacionados con la mirmecofilia. S (Si), N (No)

	Caracteres				
Especies	Espinas Gigantes	Beltarios	Nectario extrafloral	Siempre Verdes	Hormigas asociadas
<i>A. cornigera</i>	S	S	S	S	S
<i>A. torta</i>	N, Estípulas Normales	N	1, base 1er par pinnas	S	N
<i>A. catechu</i>	N (pequeñas)	N	1, base 1er par pinnas	N	N
<i>A. nilotica (arabiga)</i>	N, Estípulas	N	N	S	N

	Caracteres				
Especies	Espinas Gigantes	Beltarios	Nectario extrafloral	Siempre Verdes	Hormigas asociadas
<i>A. campilacantha</i>	N	N	1, 1er par pinnas (Muy grande)	S	N
<i>A. scorpioides</i>	N	N	N	S	N
<i>A. jutsonii</i>	N (pequeñas)	N	N	S	N
<i>A. suma</i>	N (pequeñas)	N	1, ½ antes base, 1er par pinnas	S	N
<i>A. auriculaeformis</i>	Filodios	N	N	S	N

4.2.2 Ejemplar de *A. cornigera* del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas (CEJBVC)

Se conoce que varias especies de *Pseudomyrmex* sp. (Hymenoptera; Formicidae) hacen sus nidos en el interior de algunas espinas muy engrosadas y alargadas de especies de *Acacia*, según Janzen (1967)

En el vivero del CEJBVC existe una pequeña planta (2-3 m) de la especie *A. conigera*., la cuál fue traída a este lugar por Cristóbal Ríos y Fernando Franco hace unos 6-7 años. La planta procedía del Jardín Botánico de Cienfuegos y se trajo en forma de planta pequeña, obtenida por semilla, en maceta (Franco, X/08, Com. Pers.)

Se han encontrado varios ejemplares de *Pseudomyrmex elongatus cubaensis* Fabr., caminando activamente sobre las ramas terminales de la planta de *A. cornigera*. También algunos ejemplares de *Solenopsis geminata* (Fabr.), y de *Wasmannia auropunctata* (Roger) los cuáles estaban en la zona en que algunas lianas de *Ipomoea sp.* cubrían la planta. En el laboratorio se estudiaron dos secciones de ramas terminales de unos 80 cm de longitud y encontramos dos espinas con perforaciones de hormigas en la base de las mismas (**Anexos 20 y 21**). En una de ellas se encontraron cuatro ejemplares muertos de *P. elongatus cubaensis*.

La otra espina contenía una colonia activa de *P. elongatus cubaensis*, con una reina y la siguiente composición de castas y/o estados de desarrollo (Tabla IV)

Tabla IV. Composición de las castas en la colonia de *P. elongatus cubaensis*.

Castas	Cantidad	%
Reina	1	0.3
Obreras	43	12.9
Pupas	27	8.1
Larvas	44	13.2
Huevos	218	65.4
Total	333	-----

El pecíolo de las hojas compuestas tiene nectarios extraflorales en la base del mismo y en la base de cada pinna, son de dos tipos: funcionales, o cerrados (**Anexos 22 y 23**).

En ápice de cada folíolo joven exhibe un pequeño cuerpo ovalado, de color naranja-rojizo y uno mayor en el ápice del ráquis. Estos cuerpos reciben el nombre de Órganos de Belt o Beltarios (bromacios de otros autores), tienen alto contenido de proteínas y grasas y sirven como alimento a las hormigas (adultos y larvas) que colonizan la planta. (**Anexos 24 y 25**)

Las espinas no habitadas por hormigas son casi huecas internamente, con solo algunos tabiques transversales muy delgados. Estos tabiques son eliminados por las hormigas al formar el nido, de modo que la base común de ambas espinas y todo su interior quedan completamente limpios, constituyendo un solo aposento para la colonia. **(Anexo 26 y 27)**

4.2.3 Ejemplares de *A. collinsii* (= *A. costarricensis*), recibidas por correo desde Costa Rica.

Esta especie fue colectada en: Costa Rica, Playa Conchal, 28/II/2009 (H. Hoffman) y enviada por correo postal ordinario, en un sobre sellado conteniendo cuatro espinas, dos secciones de ramas terminales de 50 cm y un pequeño vial de PBC con alcohol y siete ejemplares de *Pseudomyrmex* sp. Todo el material envuelto en dos sobres de plástico para amortiguar golpes.

De las muestras examinadas de *A. collinsii*, se ha encontrado que también esta especie tiene los caracteres fundamentales para ser una Acacia-hormiga. Las espinas gigantes **(Anexo 28)** estaban habitadas por *P. spinicola* (Emery) **(Anexo 29)**, sus folíolos presentaban Beltarios en los extremos y nectarios hacia la base de estos; coincidentemente con lo señalado por Janzen (1966, 1979).

4.3 Determinación de la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de *A. cornigera*.

Se obtuvo una gran diversidad de hongos filamentosos por acícula. En las acículas de *A. cornigera* procedente de (H) se observaron dos tipos de hongos, según sus características culturales: uno con colonias de color verde y bordes blancos, reverso blanco perteneciente al género *Penicillium* (Figura 1) y otro de color verde, de reverso verde perteneciente al género *Aspergillus* (Figura 2). En otra placa se observaron colonias de crecimiento lento de color blanco y con presencia de bacterias.

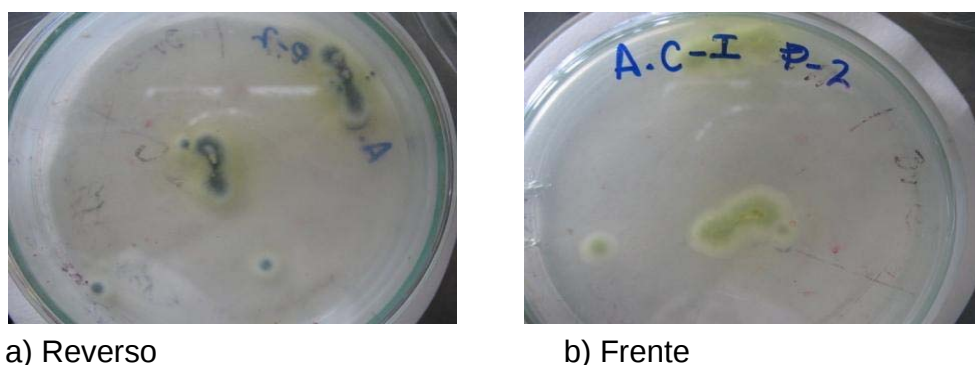


Figura 1. Colonias de hongos filamentosos pertenecientes al género *Penicillium*.



Figura 2. Colonias de hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus*.

En las colonias de hongos filamentosos, correspondientes a los aislados en medio de cultivo PDA de las acículas de *A. cornigera* (CR), se observaron diversas características culturales como: colonias de crecimiento lento de color blanco y con presencia de bacterias (Figura 3); otra placa presentó colonias con crecimiento lento de verde-olivo oscuro, de reverso verde-olivo oscuro a negro con presencia de bacterias (Figura 4). Tres placas presentaron las mismas características culturales para colonias con crecimiento rápido, de color verde con bordes blancos, de reverso verde, pigmentación del medio de cultivo de color verde y presencia de bacterias (Figura 5).



Figura 3. Colonias de crecimiento lento de color blanco con presencia de bacterias.



Figura 4. Colonias con crecimiento de color verde-olivo.



Figura 5. Colonias de color verde, con bordes blancos

Para el caso de las colonias de hongos filamentosos, correspondientes a los aislados en medio de cultivo PDA de las acículas de *A. cornigera* (CEJBVC), se repitieron los patrones de colonias de crecimiento lento de color blanco con presencia de bacterias para el caso de una placa. Otras dos mostraron diferentes características culturales como: colonias de color anaranjado, de reverso naranja,

sin pigmentación del medio de cultivo (Figura 6), de las cuales dos presentaron contaminantes diferentes: una con colonias amarillo-mostaza hacia el borde de la placa (Figura 7), otra con colonia de crecimiento de color verde oscuro de reverso verde oscuro a negro (Contaminante) hacia el borde de la placa (Figura 8); y una placa con colonias de hongos filamentosos con crecimiento lento de color verde oscuro, de reverso verde oscuro a negro y presencia de bacterias (Figura 9).

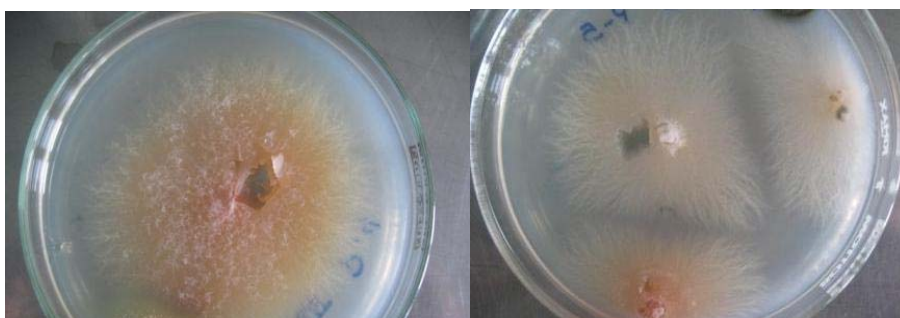


Figura 6. Colonias fúngicas de color anaranjado.



Figura 7. Colonias fúngicas: *Fusarium sp.* Contaminante: *Aspergillus sp.*



Figura 8. Colonias fúngicas: *Fusarium sp.* Contaminante: *Cladosporium sp.*



Figura 9. Colonias de crecimiento fúngico, color verde oscuro. *Cladosporium sp.*

En la siguiente tabla (Tabla V) se describen las características culturales, por placa, de las colonias de hongos mencionadas.

Tabla V. Características culturales de colonias fúngicas aisladas en medio de cultivo PDA.

Evaluación del crecimiento	Plantas hospedantes		
	<i>A. cornigera</i> (H): A.c.I	<i>A. cornigera</i> (CR): A.c. II	<i>A. cornigera</i> (CEJBVC): A.c. III
	P-1: colonias con crecimiento rápido, de color verde, de reverso verde, no pigmentación del medio de cultivo.	P-1: colonias con crecimiento lento de verde olivo oscuro, de reverso verde olivo oscuro a negro. Presencia de bacterias.	P-1: colonias con crecimiento lento de color blanco. Presencia de bacterias.
	P-2: colonias con crecimiento rápido, de color verde con bordes blancos, de reverso verde, pigmentación del medio de cultivo de color verde.	P-2: colonias con crecimiento lento de color blanco. Presencia de bacterias.	P-2: colonias con crecimiento rápido de color verde oscuro, de reverso verde oscuro a negro, hacia el borde de la placa en forma globosa.

Evaluación del crecimiento	Plantas hospedantes		
	<i>A. cornigera</i> (H): A.c.I	<i>A. cornigera</i> (CR): A.c. II	<i>A. cornigera</i> (CEJBVC): A.c. III
	P-3: colonias con crecimiento lento de color blanco. Presencia de bacterias.	P-3: colonias con crecimiento rápido, de color verde con bordes blancos, de reverso verde, pigmentación del medio de cultivo de color verde. Presencia de bacterias.	P-3: no presentó crecimiento fúngico las larvas de hormiga que se aislaron.
		P-4: colonias con crecimiento rápido, de color verde con bordes blancos, de reverso verde, pigmentación del medio de cultivo de color verde.	P-4: colonias de color anaranjado, reverso naranja, sin pigmentación del medio de cultivo. Colonias de color amarillo mostaza, de reverso amarillos mostaza. (Contaminante)
		P-5: colonias con crecimiento rápido, de color verde con bordes blancos, de reverso verde, pigmentación del medio de cultivo de color verde	P-5: colonias de color anaranjado, de reverso naranja, sin pigmentación del medio de cultivo. Colonias con crecimiento lento de verde oscuro, de reverso verde oscuro a negro. (Contaminante)

4.4 Determinación de la micobiota en tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de *A. cornigera*, presente en el Jardín Botánico de la UCLV.

El día 5 de Julio del 2012 se realizaron las primeras observaciones del crecimiento de las colonias de hongos en las placas de cultivo, para los siguientes resultados:

M-1. Espinas juveniles. Base: No crecimiento visible.

M-1. Espinas juveniles. Ápice: Crecimiento filamentosos blanco de igual extensión para las cuatro muestras de tejido interno de *A. cornigera*.

M-2. Espinas juveniles. Base: Crecimiento filamentosos blanco moderado para las cuatro muestras de tejido interno de *A. cornigera*.

M-2. Espinas juveniles. Ápice: Presencia de un contaminante, resiembra a dos placas nuevas quedando denominadas: M-2B. Espinas juveniles. Ápice (6/7/12)

M-3. Espinas adultas. Base: No crecimiento visible

M-3. Espinas adultas. Ápice: No crecimiento visible

M-4. Espinas adultas. Base: Crecimiento lento para dos muestras de tejido interno, debe incubarse por más días.

M-4. Espinas adultas. Ápice: No crecimiento visible

Se aislaron, el día 9 de Julio, a placas independientes con medio de cultivo PDA; las muestras de tejido interno contenidas en las placas:

M-1. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

M-2. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

En el primer caso, para intentar obtener algún tipo de crecimiento de estructuras fúngicas y en el segundo para evitar solapamiento de colonias de hongos presentes, se colocaron dos muestras de tejido por cada aislado.

Quedando distribuidos de la siguiente forma:

Aislado 1. (9/7/12): M-1. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

Aislado 2. (9/7/12): M-1. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

Aislado 3. (9/7/12): M-2. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

Aislado 4. (9/7/12): M-2. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)

El día 11 de Julio, se realizaron las últimas observaciones de las placas para posteriormente cultivarlas a Tubos de ensayo, para su conservación y utilización en otros análisis. Los aislados arrojaron los siguientes resultados:

Aislado 1: presentó crecimiento de colonias de hongos filamentosos en solo una de las muestras de tejido interno. (Anexo 30)

Aislado 2: no hubo muestras de crecimiento ninguno.

Aislado 3: presentó crecimiento de hongos filamentosos en una sola muestra de tejido interno. (Anexo 31)

Aislado 4: presentó crecimiento de hongos filamentosos para las dos muestras de tejido interno contenidas. (Anexo 32)

Según las características culturales observadas en los hongos aislados del parénquima interno de las espinas gigantes de *A. cornigera*, que llegaron a esporular; mediante claves dicotómicas para la taxonomía de hongos el resultado fue el género *Pestalotiopsis* y según Guba (1961) nos encontrábamos en presencia de la especie *Pestalotiopsis acaciae* (Thuem). K.Yokoy. & S.Kaneko 1980. (Figura 10)



Figura 10. Hongo *P. acaciae*, presentes en *A. cornigera*

4.5 Determinación de las concentraciones de auxinas (AIA) en las colonias de hongos filamentosos obtenidos en el tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de *A. cornigera*, presente en el Jardín Botánico de la UCLV.

El día 22 de Octubre para determinar la producción de AIA se empleó el método colorimétrico propuesto por Spaeper (2008). Para ello las cepas fueron crecidas en medio de cultivo Caldo Triptona Soya (BioCen) durante siete días, a 28 °C y en la oscuridad. Se eliminaron las células por centrifugación (40min a 13000 rpm) y a 75 ml del sobrenadante se le adicionaron 750 µl del Reactivo de Salkowsky. La mezcla se dejó incubar (30 °C y oscuridad) durante 30 min y se midió la absorbancia a 530 nm (espectrofotómetro UV-visible, Genesys 6, Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se informaron en µg.ml⁻¹ calculados a partir de una curva patrón elaborada con AIA (Duchefa) (7,5; 11,4; 12,9; 18,4; 20 µg.ml⁻¹). Al medirse la absorbancia, se obtuvieron los siguientes datos registrados en la Tabla VI; de las concentraciones de AIA secretadas por los hongos, para las 16 muestras y sus réplicas.

Tabla VI. Secreción de las concentraciones de AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$ presentes en *P. acaciae*.

Niveles de concentraciones de secreción de AIA		
No. Tubo	Muestras	Réplica 1
1	0.064	0.080
2	0.097	0.111
3	0.094	0.093
4	0.164	0.158
5	0.095	0.098
6	0.090	0.065
7	0.091	0.081
8	0.090	0.101
9	0.098	0.093
10	0.096	0.078
11	0.095	0.087
12	0.070	0.098
13	0.125	0.179
14	0.133	0.099
15	0.086	0.083
16	0.129	0.124

En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos al hallarse el promedio de AIA real mediante la fórmula $f_x = x \cdot 121,72 - 1,1776$ y el promedio de AIA general; para la elaboración de la curva patrón de AIA.

Tabla VII. Promedios específicos de las concentraciones ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) de AIA para cada muestra analizada y su réplica.

	Muestras	% de Muestras		Réplica 1	% de Réplica 1	
Cepas	OD=530	AIA real		OD=530	AIA real	AIA promedio
1	0,064	6,61248	1	0,08	8,56	7,58624
2	0,097	10,62924	2	0,111	12,33332	11,48128
3	0,094	10,26408	3	0,093	10,14236	10,20322
4	0,164	18,78448	4	0,158	18,05416	18,41932
5	0,095	10,3858	5	0,098	10,75096	10,56838
6	0,09	9,7772	6	0,065	6,7342	8,2557
7	0,091	9,89892	7	0,081	8,68172	9,29032
8	0,09	9,7772	8	0,101	11,11612	10,44666
9	0,098	10,75096	9	0,093	10,14236	10,44666
10	0,096	10,50752	10	0,078	8,31656	9,41204
11	0,095	10,3858	11	0,087	9,41204	9,89892
12	0,07	7,3428	12	0,098	10,75096	9,04688
13	0,125	14,0374	13	0,179	20,61028	17,32384
14	0,133	15,01116	14	0,099	10,87268	12,94192
15	0,086	9,29032	15	0,083	8,92516	9,10774
16	0,129	14,52428	16	0,124	13,91568	14,21998

Discusión

5. Discusión

5.1 Evaluación de las modificaciones morfológicas de plantas de la especie *Acacia daemon*, en asociación con sus especies de hormigas inquilinas.

Al analizar las espinas gigantes y las espinas normales (tabla VIII) se observó que el promedio de espinas gigantes fue superior al de espinas normales aunque en espinas normales el valor máximo fue de 30 y el valor mínimo 4. Lo cual significa que hay mayor distribución de espinas gigantes en el tronco que hacia las ramas laterales, donde abundan las espinas normales, lo que hace significativo su valor.

Tabla VIII. Resumen estadístico descriptivo para la variable número de espinas.

Parámetro	Espinas Gigantes	Espinas Normales
Media	16.0	10.25
Mediana	15.5	7.5
Moda	9	7
Máximo	29	30
Mínimo	1	4
Varianza	80.93	47.93
Error Standard	2.249	1.731

En la evaluación del número de espinas gigantes por plantas se pudo apreciar que no existieron diferencias significativas entre los diferentes estratos evaluados (Estratos: A, B, C, D). Entre los estratos A y B, para una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, el ancho resultó No Significativo (NS); mientras que para el largo Altamente Significativo (AS) con $p=0,002$. Para el estrato A y C no se presentaron diferencias; mientras que para el A y D son distintas en el ancho pero iguales en el largo, AS para un $p=0,01$. En el estrato C y B las espinas son distintas en el largo, AS con $p=0,02$; mientras el ancho resultó NS; en el estrato C y D el largo fue NS, al contrario del ancho AS, con $p=0,037$. (Tabla IX). No obstante, entre las diferentes plantas evaluadas si existieron diferencias significativas.

Tabla IX. Comparación de las diferentes variables entre estratos. (A y C); (A y D); (A y B); (C y D); (C y B)

Mann-Whitney U Test By variable Estrato Marked tests are significant at $p < 0,5000$						
Parámetros	Estratos (A y C)		Estratos (A y D)		Estratos (A y B)	
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Rank Sum-est. A	9588,000	9278,000	9084,000	8470,500	11462,00	10774,00
Rank Sum- est.C	8748,000	9058,000	8871,000	9484,500	12409,00	13097,00
U	4470,000	4328,000	4134,000	3520,500	4408,000	5096,000
Z	0,220043	-0,592021	-0,85463	-2,48802	3,017719	1,521905
p-level	0,825838	0,553837	0,392755	0,012846	0,002547	0,128034
Z- adjusted	0,220164	-0,594837	-0,85500	-2,49596	3,019753	1,529169
p-level	0,825743	0,551953	0,392554	0,012562	0,002530	0,126224
Valid N - A	99	99	99	99	92	92
Valid N - C	92	92	90	90	126	126
	Estratos (C y D)		Estratos (C y B)			
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)		
Rank Sum-est. A	8029,000	7680,500	11462,00	10774,00		
Rank Sum- est.C	8624,000	8972,500	12409,00	13097,00		
U	3751,000	3402,500	4408,000	5096,000		
Z	-1,09471	-2,07545	3,017719	1,521905		
p-level	0,273644	0,037946	0,002547	0,128034		
Z- adjusted	-1,09531	-2,08192	3,019753	1,529169		
p-level	0,273381	0,037351	0,002530	0,126224		
Valid N - A	92	92	92	92		
Valid N - C	90	90	126	126		

La tabla X y XI muestra el análisis estadístico, en cuanto a las mediciones efectuadas por estrato. En esta tabla se observó como el estrato A tiene espinas gigantes más largas que los demás estratos mientras que el estrato B es el que presenta las espinas más anchas.

Tabla X. Resumen estadístico descriptivos de la variable largo de las espinas gigantes por estrato.

Estrato	Largo(mm) Media	Largo(mm) Std. Desv.	Largo(mm) Máx.	Largo(mm) Min.	Valid - N
A	57,46465	1,911147	53,70758	61,22171	99
B	49,42063	1,694051	46,09035	52,75092	126
C	54,11957	1,982521	50,22219	58,01694	92
D	56,43333	2,004428	52,49289	60,37377	90

Tabla XI. Resumen estadístico descriptivo de la variable del ancho de las espinas gigantes por estrato.

Estrato	Ancho(mm) Media	Ancho(mm) Std. Desv.	Ancho(mm) Máx.	Ancho(mm) Min.	Valid - N
A	1,703768	0,070491	1,565192	1,842344	99
B	1,662548	0,062484	1,539713	1,785382	126
C	1,804337	0,073124	1,660586	1,948088	92
D	2,071367	0,073932	1,926027	2,216706	90

5.2 Evaluar caracteres asociados a la mirmecofilia en ejemplares de *Acacia* spp. , procedentes de diferentes localidades.

5.2.1 Ejemplares procedentes del Jardín Botánico de Cienfuegos (JBC)

La mayoría de estas especies de *Acacia* tienen espinas y nectarios extraflorales, pero sólo las asociadas con hormigas exhiben espinas grandes huecas y cuerpos de Belt; según lo expresado por Janzen (1979) en los caracteres mirmecófilos.

Sosa (2009) demostró que “un interesante aspecto de la asociación planta-hormiga es la aparente pérdida de defensas químicas por parte de la planta: se ha visto que las especies de *Acacia* sin hormigas inquilinas se caracterizan por altas concentraciones de compuestos metabólicos secundarios, los que empeoran su sabor y, por ende, repelen a los fitófagos. A diferencia de las acacias de espinas gigantes de América Central que están protegidos por la relación simbiótica con las hormigas, estas especies producen alcaloides para disuadir a los herbívoros con hambre, por lo tanto, no dependen de las picaduras de hormigas para defenderse. Porque producen alcaloides también crecen más lentamente que las hormiga-acacias protegidas, y deben crecer en hábitats más secos, donde por la competencia de recursos crece la vegetación también más lentamente.”

Según lo anteriormente descrito, las especies estudiadas procedentes del JBC no cumplen con todos los caracteres para ser una planta mirmecófita. No presentan asociación con hormigas, lo cual indica que utilizan defensas químicas propias contra los herbívoros. Sus espinas son pequeñas o normales ya que muchas de las hojas pinnadas de las acacias pueden producir espinas afiladas. Las espinas suelen aparecer en parejas y en realidad son modificaciones hacia la base de la hoja en apéndices llamados estípulas. Estas "espinas" son estípulas modificadas de la hoja, por lo que se denominan espinas estipulares. Técnicamente las espinas son tallos modificados, pero la mayoría de los botánicos utilizan esta denominación. No poseen nectarios extraflorales desarrollados, ni cuerpos de Belt, lo cual evidencia que no son plantas mirmecófitas.

5.2.2 Ejemplar de *A. cornigera* del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas (CEJBVC).

En el caso de la asociación de *P. elongatus cubensis* y *A. cornigera*, las colonias de hormigas habitan en las espinas huecas de la planta y se alimentan de unos pequeños glóbulos ricos en glucógeno (cuerpos de Belt) que son secretados por el ápice de los foliolos. Además de alimentarse también de las sustancias secretadas por los nectarios extraflorales, las hormigas mantienen a la planta en estado óptimo y patrullan toda la planta evitando el ataque de otros herbívoros o plantas

trepadoras. Janzen demostró que las hormigas ejercen una acción benéfica para las plantas de Acacia, las que no tienen o que pierden la asociación con las hormigas disminuyen su adecuación, debido a que son atacadas ferozmente por herbívoros y pueden ser invadidas por lianas trepadoras. *A. cornigera* es incapaz de sintetizar alcaloides amargos que normalmente espantan a herbívoros que pueden causar estragos a la planta; por lo cual es de mutuo interés el beneficio de ser defendido por sus hormigas habitantes. Las hormigas son más dinámicas en plantas con nectarios peciolares activos (igual que otros tipos de nectarios, tienen períodos de actividad), lo que resulta en un incremento del crecimiento de la planta. Donde habitaban hormigas, la defensa era mejor, así que la selección pudo haber favorecido el desarrollo de espinas grandes como refugio y, por último, de los cuerpos de Belt. Con cada cambio en la planta, la eficacia defensiva de la hormiga se habría acrecentado. Convergentemente, las hormigas que mejor defendieron a la Acacia recibieron buen alimento y refugio. Este tipo de asociación mutualista entre la *A. cornigera* estudiada, procedente del CEJBVC, y sus hormigas inquilinas *Pseudomyrmex elongatus cubensis*, no había sido reportada para Cuba.

5.2.3 Ejemplares de *A. collinsii* (= *A. costarricensis*), recibidas por correo desde Costa Rica.

En la *A. collinsii* estudiada que está habitada por *Pseudomyrmex spinicola* (Emery), se evidenció la presencia de todos los carecteres evaluados por lo cual es una verdadera mirmecófito. Según Janzen (1983) estas hormigas actúan ante la liberación de feromonas de alarma por la planta y salen de su espina en gran número. Además de la protección de hormigas cortadoras de hojas y otros herbívoros no deseados, las hormigas inquilinas eliminan las semillas de plantas alrededor de la base del árbol que podría detener el crecimiento y bloquear la luz solar.

5.3 Determinación de la micobiota de espinas gigantes de plantas adultas de *A. cornigera*.

Se identificaron un total de cuatro géneros de hongos los cuales fueron *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium*. El género *Fusarium* sp., estuvo presente solamente en las muestras de acículas correspondientes a la *A. cornigera* del CEJBVC (Figura 11). Las muestras procedentes de Costa Rica y Honduras solo presentaron los hongos *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium*. Todos estos hongos son declarados como saprófitos y endófitos. Además, se aislaron otros hongos filamentosos aún no esporulados (Figura 12) que no pudieron ser identificados (Tabla XII).

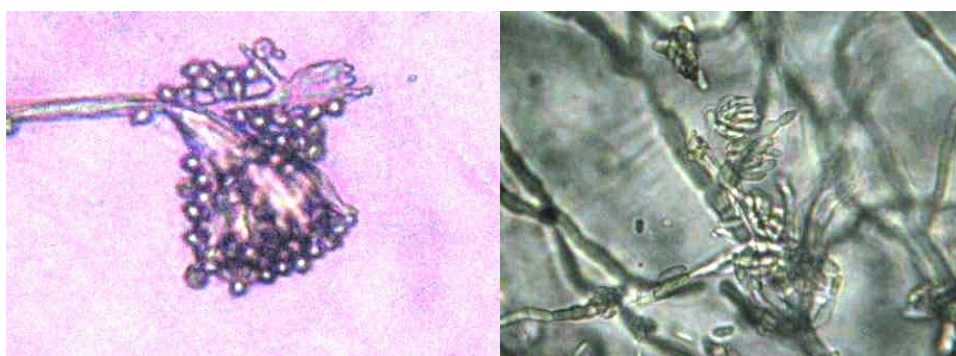


Figura 11. Esporas del género *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp., respectivamente, identificadas en microscopio óptico.



Figura 12. Placas de colonias de hongos filamentosos no esporulados.

Tabla XII. Identificación de los hongos filamentosos encontrados en acículas de *A. cornigera*.

Identificación de los géneros de hongos filamentosos.	Plantas hospedantes		
	<i>A. cornigera</i> (H): A.c.I	<i>A. cornigera</i> (CR): A.c. II	<i>A. cornigera</i> (CEJBVC): A.c. III
	P-1: <i>Aspergillus</i> sp.	P-1: no esporulado	P-1: no esporulado y presencia de bacterias.
	P-2: <i>Penicillium</i> sp.	P-2: no esporulado	P-2: <i>Cladosporium</i> sp.
	P-3: no esporulado	P-3: <i>Penicillium</i> sp.	P-3: no presentó crecimiento fúngico (larvas de hormigas).
		P-4: <i>Penicillium</i> sp	P-4: <i>Fusarium</i> sp. y <i>Aspergillus terreus</i>
		P-5: <i>Penicillium</i> sp.	P-5: <i>Fusarium</i> sp. y <i>Cladosporium</i> sp.

5.4 Determinación de la micobiota en tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de *A. cornigera*, presente en el Jardín Botánico de la UCLV.

“El género *Pestalotiopsis* se estableció por Steyaert, siguiendo una enmendadura taxonómica al género *Pestalotia* (Steyaert, 1949, 1953a, b, 1961). Steyaert (1949) restringió *Pestalotia* a una sola especie y reasignaron algunas de las especies que se dispusieron anteriormente en *Pestalotia* al nuevo género anamórfico, *Pestalotiopsis* y *Truncatella*. Guba (1961) prefirió adoptar un concepto genérico más ancho y redujo *Pestalotiopsis* y *Truncatella* a la sinonimia con *Pestalotia* y aceptado 220 especies en *Pestalotia*. Los estudios moleculares han mostrado que

Pestalotiopsis es un género mono-filético (Jeewon et al., 2002). El carácter eminente de este género es que los conidios relativamente fusiformes se formaron dentro de acérvulos compactos y los conidios normalmente son de 5 células, con las 3 células centrales coloreadas y las células de los extremos no, y con dos a más apéndices que se extienden de la célula apical.” (Wei y Xu , 2004) (Figura 13)

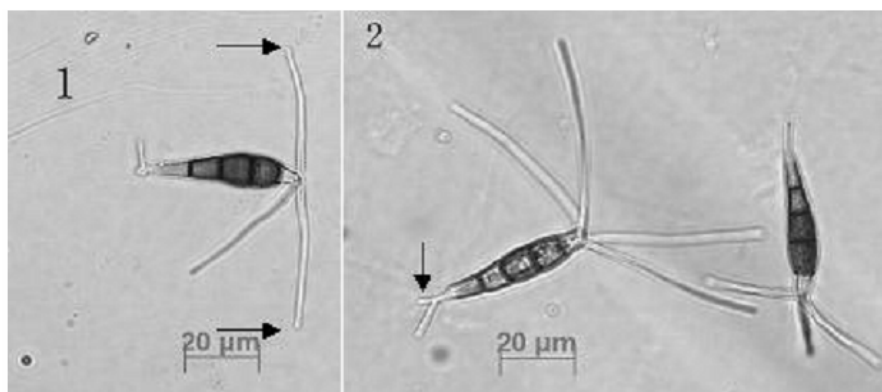


Figura 13. Conidios y apéndices apicales de *Pestalotiopsis* sp.

Las muestras de *P. acaciae* obtenidas fueron, en su mayoría, del parénquima interno de espinas juveniles hacia su base, esto nos indica que durante el crecimiento de la misma el hongo se desplaza por los tejidos hacia el ápice y desaparece gradualmente como hospedante cuando la espina llega al estado de adultez, ya que las muestras de tejido de espinas adultas no arrojaron crecimiento de colonias de este hongo. Podemos asumir que este hongo se encuentra circulando por los vasos xilemáticos y floemáticos de la planta hacia sus ramas laterales y es conocido que este género de hongo es capaz de secretar metabolitos secundarios a las plantas donde son endofíticos.

5.5 Determinación de las concentraciones de auxinas (AIA) en las colonias de hongos filamentosos obtenidos en del tejido interno de espinas gigantes juveniles y adultas, sin huecos, de la planta de *A. cornigera*, presente en el Jardín Botánico de la UCLV.

Los resultados obtenidos en la gráfica patrón de la secreción de auxinas del hongo *P. acaciae*, nos indica que para todas las muestras y sus réplicas hubo secreción

del metabolito; con índices de concentraciones superiores a 7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e inferiores a los 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Lo cual representa que este hongo es capaz de secretar AIA al medio en el cual vive o sea a la espina de la planta de Acacia, por lo que el crecimiento agrandado de sus espinas pudiese estar vinculado con la ocurrencia de este fenómeno de la presencia de auxinas (Figura 14).

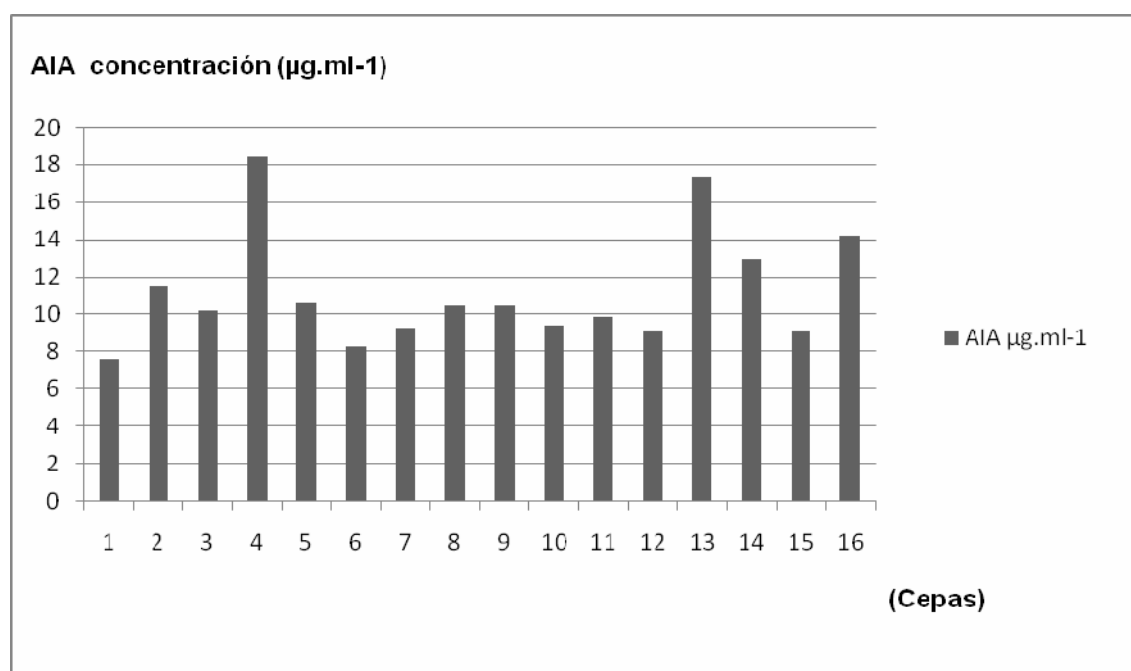


Figura 14. Gráfica patrón promedio general de concentración de AIA. (OD= 530)

Conclusiones

6. Conclusiones

1. De las 11 especies de *Acacia* evaluadas solo dos: *A. cornigera* y *A. collinsi*, presentaron todos los caracteres relacionados con la mirmecofilia. *A. daemon* exhibió solo algunos de los caracteres de las mirmecofilia y la consideramos una especie en transición hacia ese estado.
2. Se informa por vez primera la mirmecofilia en *Acacia* spp en Cuba, así como las especies *P. elongatus cubaensis*, y *Tapinoma* sp. como hormigas inquilinas las cuales son un nuevo informe para la ciencia en esta asociación.
3. Se encontraron crías de *P. elongatus cubaensis* en *A. cornigera*, y *P. spinicola* en *A. collinsii* proveniente de Costa Rica.
4. La micobiota epifítica y endofítica de *Acacia cornigera* estuvo integrada por diversos géneros de hongos filamentosos descritos como saprofíticos o fitopatógenos.
5. En el parénquima interno de las espinas gigantes de *A. cornigera* estaba presente el hongo *Pestalotiopsis acaciae*, el cual secretó altos niveles de compuestos auxínicos al medio de cultivo.

Recomendaciones

Recomendaciones:

1. Continuar los estudios de relaciones planta \ hormiga con la especie *A. daemon*.
2. Identificar las especies de los cuatro géneros de hongos filamentosos (*Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*) asociados con espinas de plantas adultas de *Acacia cornígera*.
3. Identificar los géneros de hongos no esporulados que fueron aislados.
4. Conservar a largo plazo los aislados de hongos filamentosos (*Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*) asociados con espinas de plantas adultas de *Acacia cornigera*.
5. Realizar inoculación artificial a las espinas de *Acacia cornigera* con los géneros de hongos aislados y determinar su influencia sobre el crecimiento de las mismas.
6. Determinar la producción *in vitro* y *ex vitro* de fitohormonas (ácido giberélico, auxinas, citoquininas) por los géneros de hongos filamentosos aislados.

Referencias Bibliográficas

Referencias bibliográficas:

Aldrich, J.R, J.P. Kochansky, W.R. Lusby, y S.R. Dutky. (1982): Volatile male-specific natural products of a coreid bug (Hemiptera: Heteroptera). *Journal of Chemical Ecology* 8(11): 1369- 76.

Akino, T., J.J. Knapp, J.A. Thomas, y G.W. Elmes. (1999): Chemical mimicry y host specificity in the butterfly *Maculinea rebeli* , a social parasite of *Myrmica* ant colonies. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 266: 1419-1426.

Barbero, F., J.A. Thomas, S. Bonelli, E. Balletto, y K. Schönrogge (2009): Queen ants make distinctive sounds that are mimicked by a butterfly social parasite. *Science* 323: 782-785.

Bentley, B.L. (1976): Plants bearing extrafloral nectaries and the associated ant community: Interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. *Ecology* 57: 815-820pp.

Bentley, B.L. (1977): Extrafloral nectaries and the protection by pugnacious bodyguards. *Annu. Rev. Ecol. Systemat.* 8: 407-427.

Blüthgen N, Verhaagh M, Goitía W, Jaffé K, Morawetz W, y Bartholt W (2000): How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia* 125: 229-240.

Bruna E.M, Lapola DM, y Vasconcelos HL (2004): Interspecific variation in the defensive responses of obligate plant-ants: experimental tests and consequences for herbivory. *Oecologia* 138: 558-565.

Botanicals 1986, N° 133

Bravo Sandra, Jiménez, Ana y Moglia, Juana (2001): "Caracterización anatómica del leño y evolución del crecimiento en ejemplares de *Acacia aroma* y *Acacia furcatispina* en la Región Chaqueña, Argentina." Universidad Nacional de Santiago del Estero, Facultad de Ciencias Forestales, Cátedra de Botánica, Av. Belgrano 11912 (s), Santiago del Estero, Argentina.

Bronstein, J.L. (2001): The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters* 4: 277-287.

Champluvier, D. (1994): *Bracysteoehanus myrmecophilus* (Acanthaceae) espece nouvelle du Zaïre Oriental: Un cas intéressant de myrmécophilie. *Belgian J. Bot.* 127: 45-60.

Connor, R.C. (1995): The benefits of mutualism: a conceptual framework. *Biological Reviews*, 70:427-457.

Coley PD, Bryant JP, Chapin FS (1985): Resource availability and plant anti-herbivore defense. *Science* 230: 895-899.

Davidson, D.W., Snelling RR, y Longino JT (1989): Competition among ants for myrmecophytes and the significance of plant trichomes. *Biotropica* 21: 64-73.

Del Val, Ek y Rodolfo Dirzo (2004): Mirmecofilia: Las plantas con ejército propio. *Rev. : Interciencia*, Diciembre 2004, VOL. 29 N° 12

Del Val, E. (2011): "El ejército de las plantas". Universidad Autónoma de México (UNAM). Ph.D., Imperial College, University of London, RU. Investigadora Postdoctoral, Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad, Pontificia. Universidad Católica de Chile.

Dettner, K. y C. Liepert. (1994): Chemical mimicry and camouflage. *Annual Review of Entomology* 39: 129-154.

Dyer LA, y Letourneau DK (1999): Relative strength of top-down and bottom-up forces in a tropical forest community. *Oecologia* 119: 265-274pp.

Elgar, M.A. y R.A. Allan. (2004): Predatory spider mimics acquire colony-specific cuticular hydrocarbons from their ant model prey. *Naturwissenschaften* 91: 143-147.

Eubanks, M.D., K.A. Nesci, M.K. Peterson, L. Zhili, y H.B. Sanchez. (1997): The exploitation of an ant-defended host plant by a shelter-building herbivore. *Oecologia* 109: 454-460.

Fiala B, Maschwitz U, y Pong T Y (1991): The association between *Macaranga* trees and ants in Southeast Asia. En Huxley CR, Cutler DF (Eds.) *Ant-Plant interactions*. Oxford Science Publications. New York, EEUU. pp. 263-270

Fiala BH, Grunsky U, Maschwitz P, y Linsenmair KE (1994): Diversity of ant-plant interactions: protective efficacy in *Macaranga* species with different degrees of ant association. *Oecologia* 97: 186-192.

Fischer, R.C., Wanek W, Richter A, y Mayer V (2003): Do ants feed plants? A ¹⁵N labeling study of nitrogen fluxes from ants to plants in the mutualism of *Pheidole* and *Piper*. *J. Ecol.* 91: 126-134.

Folgarait PJ, y Davidson DW (1995): Myrmecophytic *Cecropia*: antiherbivore defenses under different nutrient treatments. *Oecologia* 104: 189-206pp.

Fonseca CR (1994): Herbivory and the long-lived leaves an Amazonian ant-tree. *J. Ecol.* 82: 833-842.

Giménez A. (1993): Rasgos estructurales característicos del leno secundario de las especies arbóreas de la región chaqueña seca. *Quebracho* 1:1-14.

Giménez A, N Ríos, J Moglia, y C. López. (1998): Leño y corteza de *Prosopis alba* Griseb. algarrobo blanco, Mimosaceae, en relación con algunas magnitudes dendrométricas. *Rev. Bosque* 19 (2):53-62.

Guba, Emil F. (1961): "Monograph of Monochaetia and Pestalotia". Harvard University Press. Cambridge. Massachusetts.USA

Heil, M., C. Staehelin, y D. McKey. (2000): Low chitinase activity in *Acacia* myrmecophytes: a potential trade-off between biotic and chemical defences? *Naturwissenschaften* 87(12): 555-558.

Heil M, Hilpert A, Fiala B, bin Hashim R, Strohm E, Zotz G, y Linsenmair KE (2002): Nutrient allocation of *Macaranga triloba* ant plants to growth, photosynthesis, and indirect defence. *Funct. Ecol.* 16: 475-483pp.

Hölldobler B, y Wilson EO (1990): *The ants*. Harvard University Press. EEUU. 712 pp.

Hölldobler, B. (1999): Multimodal signals in ant communication. *Journal of Comparative Physiology A* 184: 129-141.

Howe HF, y Westley LC (1989): *Ecological relationships of plants and animals*. Oxford University Press. RU. 273 pp.

Harper JL (1977): *Population biology of plants*. Academic Press. New York, EEUU. 892pp.

Ibarra G, y Dirzo, R (1990): Plantas mirmecófitas arbóreas de la Estación de Biología "Los Tuxtlas", Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical* 38: 79-82.

Inouye, D. (1983): The ecology of nectar robbing. Pgs 153-173 in B. Bently and T. Elias, eds. *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York.

Jackson, D.E. y F.L.W. Ratnieks (2006): Communication in ants. *Current Biology* 16(15): R570- R574.

Janzen, Daniel H. (1966): "Coevolution of mutualism between ants and *Acacia* in Central America."

Janzen, Daniel H. (1967): "Interaction of the bulls-horn acacia (*Acacia cornigera* (L.)) with an ant in-habitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in eastern México". *University of Kansas Science Bulletin*. 47:315–558.

Janzen, Daniel H. (1969): Allelopathy by mirmecophytes: The ant *Azteca* as an allelopathic agent of *Cecropia*. *Ecology* 50: 147-153.

Janzen, Daniel H (1972): Protection of *Barteria* (Passifloraceae) by *Pachysima* ants (Pseudomyrmecinae) in a Nigerian rainforest. *Ecology* 53: 885-892.

Janzen, D.H. (1975): *Pseudomyrmex nigropilosa*: a parasite of mutualism. *Science* 188:936-937.

Janzen, Daniel H. (1979): Smith. *Contributions to Botany*. No. 3 pp 1-13

Janzen, Daniel H. (1983): *Costa Rican Natural History*, Chicago: University of Chicago Press, p. 823, ISBN 9780226393346. IL:735-754

Janzen, D.H. (1985): The natural history of mutualisms. In *The Biology of Mutualism* (ed. Bouher, D.H.). Oxford University Press, New York, USA: 40-49.

Jeewon, R., Liew, E.C.Y. y Hyde, K.D. (2002): Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 378-392.

Jolivet, P. (1998): *Interrelationship between insects and plants*. CRC. EEUU. 309 pp.

K. Yokoy. y S. Kaneko, in Kaneko, (1980): *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 18: 122

Krebs CJ (1994): *Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance*. Harper Collins. EEUU. 801 pp.

Lee S, S Teng, M Lim, y R Abd, Kader. (1988): Discolouration and heart rot of *Acacia mangium* Willd. Some preliminary results. *Journal of Tropical Forest Science* 1 (2):170-177.

Lenoir, A., P. D'Ettorre, C. Errard, y A. Heftetz. (2001): Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annual Review of Entomology* 46: 573-599.

Marquis RJ (1987): Variación en la herbivoría foliar y su importancia selectiva en *Piper arieanum* (Piperaceae). *Revista de Biología Tropical* 35: 133-150.

Maschwitz U, Fiala B (1995): Investigations on ant-plant associations in the South-East-Asian genus *Neonauclea* Merr (Rubiaceae). *Acta Oecologica* 16: 3-18.

Moglia J, y C López (2001): Variabilidad radial de algunos caracteres anatómicos de *Aspidosperma quebracho blanco*. *Bosque* 22(2):3-14.

McKey D (1984): Interaction of the ant plant *Leonardoxa* African (Caesalpinaceae) with its obligate inhabitants in a rainforest in Cameroon. *Biotropica* 16: 81-99.

Michelangeli FA (2003): Ant protection against herbivory in three species of *Tococa* (Melastomataceae) occupying different environments. *Biotropica* 35: 181-188.

Murase K, Itioka T, Nomura M, y Yamane S (2003): Intraspecific variation in the status of ant symbiosis on a myrmecophyte *Macaranga bancana*, between primary and secondary forests in Borneo. *Popular. Ecol.* 45: 221- 226.

Noë, R. y Hammerstein P. (1994): Biological markets: supply and demand determine the effect of partner choince in cooperation, mutualism, and mating. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 35: 1-11.

Pellmyr, O., J. Leebens-Mack, y C.J. Huth. (1996): Non-mutualist yucca moths and their evolutionary consequences. *Nature* 380: 155-156.

Radermacher J, J Bauch, y A Shigo. (1984): Characteristics of xylem formed after wounding in *Acer*, *Betula* and *Fagus*. Development and characteristics of discoloured woods. *IAWA Bulletin* 5(2):141-151.

Rehr, S.S., P.P. Feeny, y D.H. Janzen. (1973): Chemical defense in Central American non-ant Acacias. *Journal of Animal Ecology* 42: 405-416.

Reiskind, J. (1977): Ant-mimicry in a Panamanian clubionid and salticid spiders (Araneae: Clubionidae, Salticidae). *Biotropica* 9(1): 1-8.

Rickson, F.R. (1971): Glycogen plastids in Müllerian body cells of *Cecropia peltata* – A higher green plant. *Science* 173: 344-347.

Rickson FR (1979): Absorption of animal tissue breakdown products into a plant stem - the feeding of a plant by ants. *Am. J. Bot.* 66: 87-90.

Rosenthal, Gerald A., y Janzen, Daniel H. (editors) (1979): *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, New York: Academic Press, p. 41, ISBN 0-12-597180-X

Thompson, J.N. (1982): *Interaction and Coevolution*. Wiley and Sons, New York, USA

Sagers, C.L., Ginger SM, y Evans RD (2000): Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia* 123: 582-586 pp.

Schupp EW, Feener DH (1990): Phylogeny, life form and habitat dependence of ant-defended plants in a Panamanian forest. En Huxley CR, Cutler DF (Eds.) *Ant-Plant interactions*. Oxford Science Publications. New York, EEUU. pp. 250-259.

Schwartz, M.W. y J.D. Hoeksema. (1998): Specialization and resource trade: biological market as a model of mutualisms. *Ecology* 79:1029-1038.

Smith K, y E Sutherland (2001): Terminology and biology of fire scars in selected Central Hardwoods. *Tree Ring Research* 57:141-147.

Soberon, J. y C. Martinez del Rio. (1985): Cheating and taking advantage in mutualistic associations. Pgs 192-26 in D.H. Boucher, ed. The biology of mutualism: ecology and evolution. Oxford University Press, Oxford.

Sosa, C. A. (2009): Interacciones entre hormigas y plantas. Centro de Investigaciones Entomológicas. FCEFYN, Universidad de Córdoba.

Steyaert, R.L. (1949): Contributions à l'étude monographique de Pestalotia de Not. et Monochaetia Sacc. (Truncatella gen. nov. et Pestalotiopsis gen. nov.). Bulletin Jardin Botanique État Bruxelles 19: 285-354

Steyaert, R.L. (1953a): New and old species of Pestalotiopsis. Transactions of the British Mycological Society 36: 81-89.

Steyaert, R.L. (1953b): Pestalotiopsis from Gold Coast and Togoland. Transactions of the British Mycological Society 36: 235-242.

Steyaert, R.L. (1961): Type specimens of Spegazzini's collections in the Pestalotiopsis and related genera (Fungi Imperfecti: Melanconiales). Darwiniana (Buenos Aires) 12: 157-190.

Styrsky, J.D. y M.D. Eubanks. (2007): Ecological consequences of interactions between ants and honeydew-producing insects. Proceedings of the Biological Society 274(1607): 151-164.

Vasconcelos, H. (1991): Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl., a myrmecophytic melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. *Oecologia* 87: 295-298pp.

Watanabe, T (2002): Pictorial Atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Second Edition. CrC Press. Boca Ratón. Florida.

Whitehead, S. A., Poste, y J. Sapp. (2008): *Mozena* sp. (Hemiptera: Coreidae) uses chemical cues to exploit ant-acacia mutualism. OTS Course Book: 2008-1.

Wei, J.G. y Xu, T. (2004): *Pestalotiopsis kunmingensis* sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. Department of Plant Protection, College of Agriculture y Biotechnology, Zhejiang. Fungal Diversity 15: 247-254.

Zamora, N. (1991): "Tratamiento de la familia *Mimosaceae* (Fabales) de Costa Rica". *Brenesia* 36: 63-149.

Anexos

Anexos



Anexos 1. Preparacion de Cámaras Húmedas.



Anexo 2. Erlenmeyer con agua desionizada estéril.



Anexo 3. Cámaras Húmedas con muestras de espinas de *A. cornigera*.



Anexo 4. Placas con medio de cultivo PDA en la Incubadora.



Anexo 6. Tubos de ensayo con muestras de colonias del hongo *P. acaciae*.



Anexo 7. Espinas gigantes de color castaño, colectada de uno de los estratos, de *A. daemon*.



Anexo 8. Espinas gigantes de color verde, colectada de uno de los estratos de *A. daemon*.



Anexo 9. Espinas gigantes de color gris (con agujero), colectada de uno de los estratos, de *A. daemon*



Anexo 10. Mediciones de las espinas gigantes de *A. daemon*



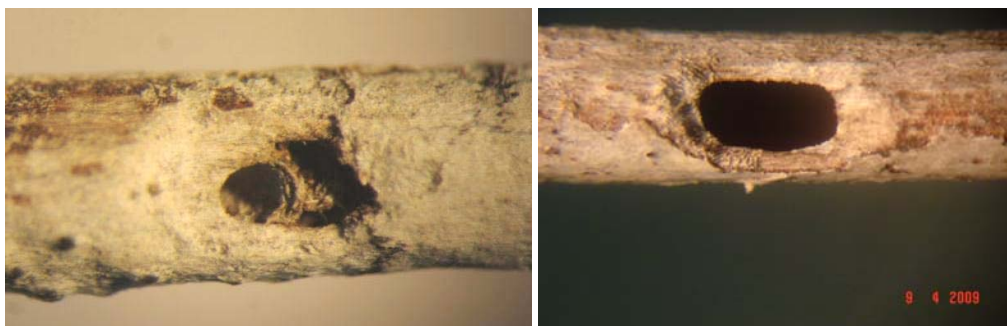
Anexo 11. Espinas gigantes de las ramas laterales del tronco, de *A. daemon*



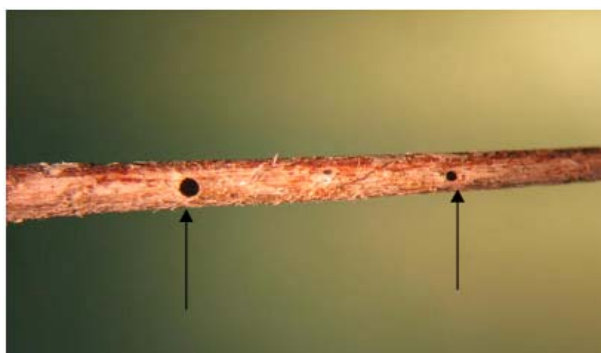
Anexo 12. Espinas gigantes de las ramas laterales del tronco, de *A. daemon*



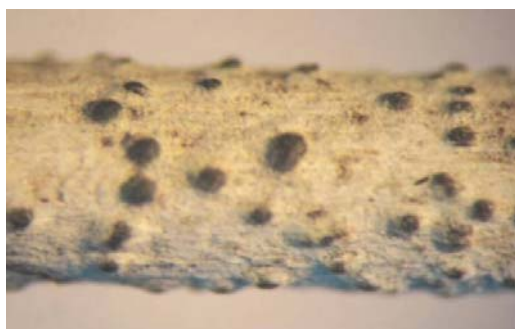
Anexo 13. Distribución de las espinas gigantes en las ramas, de *A. daemon*.



Anexo 14. Agujero labrado por hormigas, en *Acacia daemon*.



Anexo 15. Dos agujeros labrados por parasitoides, en *A. daemon*



Anexo 16. Estructuras fungosas en la superficie de las espinas viejas, *A. daemon*.



Anexo 17. Espinas lisas y más viejas, de *A. daemon*



Anexo 18. Nectario extrafloral hacia la base, en *A. daemon*



Anexo 19. Hoja de *A. daemon* con Beltarios hacia la base de los foliolos



Anexo 20. Perforaciones de las hormigas en las espinas de *A. cornigera*



Anexo 21. Perforaciones de las hormigas en las espinas de *A. cornigera*



Anexo 22. Nectario extrafloral funcional, de *A. cornigera*.



Anexo 23. Nectario extrafloral cerrado, de *A. cornigera*



Anexo 24. Cuerpos de Belt o beltarios, en el ápice de los foliolos de *A. cornigera*



Anexo 25. Beltarios en el ápice del raquis de los foliolos, de *A. cornigera*



Anexo 26. Colonia de hormigas en el interior de una espina de *A. cornigera*



Anexo 27. Colonia de *P. elongatus cubaensis* en el interior de la espina



Anexo 28. Espinas de *A. collinsii*



Anexo 29. Hormiga del género *P. spinicola* asociada a *A. collinsii*.



Anexo 30. Crecimiento del Aislado 1. (9/7/12): M-1. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012).



Anexo 31. Crecimiento del Aislado 3. (9/7/12): M-2. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)



Anexo 32. Crecimiento del Aislado 4. (9/7/12): M-2. Espinas juveniles. Base. (3/7/2012)