

# Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) de Medellín

Amplification and sequencing of rRNA mitochondrial DNA in leaf cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) of Medellín

SANDRA URIBE SOTO<sup>1</sup>, LIDA ARIAS MARÍN<sup>2</sup>, FRANCISCO SERNA<sup>3</sup>

Revista Colombiana de Entomología 26(1-2): 71-76 (2000)

**Resumen.** Las hormigas arrieras o cortadoras de hojas constituyen una plaga agrícola de gran importancia en Colombia y otros países causando graves pérdidas económicas; aunque se han realizado numerosos intentos para el control de estas hormigas, existe aún desconocimiento en aspectos básicos sobre su biología como la relación con el hongo mutualista del cual se alimentan y las relaciones taxonómicas y filogenéticas entre ellas. El ADN mitocondrial aparece como una herramienta importante en estudios de entomología molecular que permite no solo la identificación de especies, si no también el establecimiento de relaciones evolutivas entre insectos y los organismos con los cuales se asocian. En el presente estudio se amplificó y secuenció un fragmento de 405 pares de bases de la unidad larga ribosomal mitocondrial de hormigas cortadoras del género *Atta*, como paso preliminar hacia el conocimiento de secuencias con uso potencial en el estudio de estos insectos. La identidad de las secuencias se verificó mediante comparación con secuencias de esta región previamente publicadas para otros insectos. En las secuencias de *Atta cephalotes* se observaron altos contenidos de adenina y timina (80%) una característica común en ADN mitocondrial de insectos y una similitud de 48.5% y 50.3% en relación con *Anopheles gambiae* y *Lutzomyia longipalpis*, respectivamente.

**Palabras clave:** Hormiga arriera. *Atta cephalotes*. ADN. rRNA. Mitocondria.

**Summary.** The leaf cutting ants are important agricultural pests in Colombia and other countries. Although several have been used for the control of these insects, it remains unknown of some basic aspects regarding to their relationship with the mutualist fungus and the taxonomic and phylogenetic relationships between them. The mitochondrial DNA appears as an important tool in studies of molecular entomology for the taxonomy and also for the establishment of evolutive relations in both insects and mutualist fungus. In the present study we amplified and sequenced a fragment of 405 bp from the mitochondrial ribosomal large subunit in leaf cutting ants from Medellín. The identity of the sequences was verified comparing them with sequences for this region previously published for insects belonging to the order Diptera. There were determined high contents of adenine and thymine (80%) a common characteristic in mitochondrial DNA of insects and a similarity of 48.5% and 50.3% was found in sequences from ants when compared with *Anopheles gambiae* and *Lutzomyia longipalpis* respectively.

**Key words:** Leaf cutting ants. *Atta cephalotes*. DNA. rRNA. Mitochondrion.

## Introducción

Las hormigas arrieras constituyen una de las plagas agrícolas de mayor importancia en Colombia y otros países causando pérdidas en gran número de cultivos; su daño consiste en cortar las hojas de las plantas reduciendo sustancialmente el área foliar, disminuyendo la capacidad fotosintética y afectando la producción en especies de importancia económica (Cherrett 1989; Serna 1992). Estos insectos tienen un gran número de hospederos y llevan con frecuencia los cultivos a productividades muy bajas, calculándose que las pérdidas exceden la cifra de los mil millones de dólares (Evans 1993; Rehner *et al.* 1994; Serna y Correa 1995).

La mayoría de los estudios realizados en relación con estas hormigas se han orientado hacia el control químico y/o biológico y en menor proporción se han incluido aspectos

como la simbiosis mutualista con el hongo, taxonomía y estimación de los daños económicos (Serna 1992; Serna y Correa 1995; Bolton 1997; Yepes y Madrigal 1998).

Además de su utilidad en los estudios evolutivos, la entomología molecular aparece como una herramienta importante en la identificación de especies, ya que las secuencias de ADN incorporan numerosos caracteres taxonómicos facilitando el estudio de diversos grupos de insectos (Simon *et al.* 1994; Flook y Rowell 1997). Igualmente, el ADN mitocondrial por su relativa rápida tasa de cambio y su herencia materna se ha utilizado con éxito para entender relaciones taxonómicas y filogenéticas entre insectos y los organismos con los cuales estos se asocian (De Salle *et al.* 1992; Nigro y Graputo 1993; Simon *et al.* 1994; Kambhampati 1995; Kambhampati *et al.* 1996). La unidad larga ribosomal se ha utilizado exitosamente

para estudiar insectos de los órdenes Diptera y Orthoptera, además secuencias parciales de la pequeña subunidad ribosomal y otros genes mitocondriales se han incluido en el estudio de las hormigas cortadoras y el hongo mutualista del cual se alimentan (Hinkle *et al.* 1994). Con esta investigación preliminar se pretende implementar la utilización de secuencias de ADN mitocondrial en el estudio de hormigas cortadoras de diferentes regiones de Colombia en aspectos básicos que faciliten a mediano y largo plazo actividades de control. Para ello se amplificó y secuenció un fragmento de 405 pares de bases de la unidad larga ribosomal mitocondrial en soldados de *Atta cephalotes* provenientes del campo, usando oligonucleótidos diseñados con base en las secuencias de esta región publicadas para insectos como *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* y *Anopheles gambiae*.

1, 2 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET Universidad de Antioquia. I.A. MSc; Ph.D, PECET U de A-CDC (Atlanta G.A.); Bacterióloga Auxiliar de Investigación en Entomología, respectivamente. A.A. 1226 Medellín, Colombia.

3 Universidad Nacional de Colombia. I.A. MSc. Profesor Posgrado de Entomología. A.A. 3840. Medellín, Colombia.

## Materiales y Métodos

### Especímenes

Las secuencias fueron obtenidas a partir de 6 especímenes de *A. cephalotes* capturados en Medellín; la identificación taxonómica de los especímenes fue realizada mediante criterios morfológicos.

### Aislamiento y Amplificación de ADN por técnicas de PCR

Los especímenes se colectaron y preservaron en isopropanol al 100%. Para la extracción de ADN sólo se utilizó el tórax de cada espécimen donde se encuentra la mayor proporción de mitocondrias (Futuyma 1998) y el ADN se aisló por el método de Collins y Porter (1990). Brevemente, los tórax se maceraron en buffer de lisis y se incubaron a 35°C durante 30 minutos. El ADN mitocondrial se purificó utilizando el kit Wizard™ Maxipreps (Promega), con esta metodología se obtuvieron entre 50-200 µg de ADN por individuo.

El fragmento de la unidad larga ribosomal mitocondrial se amplificó utilizando los oligonucleótidos LRJ12966 (AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA A) y LRN13393 (C (G/A)C CTG TTT AAC AAA AAC AT) construidos de acuerdo con las secuencias presentadas en el trabajo publicado por Monteiro *et al.* (1999) para estudiar insectos del orden Hemiptera.

Después de una fase de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 minutos, los parámetros de amplificación para los siguientes 35 ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se desnaturalizaron por 1 minuto a 93°C, se alinearon por 1 minuto a 50°C y se extendieron por 1 minuto a 72°C. Para verificar la amplificación, parte de la muestra fue sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se comparó con el marcador de peso molecular 1 kb (Promega). El ADN amplificado se purificó usando Wizard PCR preps (Promega).

Antes de secuenciar los fragmentos de ADN se purificaron usando columnas (Microspin s-300 HR Columns, Pharmacia Biotech, Inc.). Los productos resultantes se secuenciaron utilizando el kit Big dye con Amplitaq DNA polimerasa FS (Perkin Elmer) durante 24 ciclos bajo las siguientes condiciones: 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C. El ADN se precipitó utilizando etanol al 70% y se resuspendió en formamida-dextran antes de correrse en un gel de acrilamida al 4.8% (Page Plus and Amresco) durante 7 horas en un secuenciador ABI prism 377 utilizando el respectivo módulo de corrido.

Los productos de PCR se secuenciaron directamente en ambos sentidos de la doble cadena y se analizaron con el paquete estándar GCG (Genetics Computer Group). Las secuencias se editaron usando el programa Sequencing Navigator (Perkin Elmer) comparándolas en ambos sentidos de la doble cadena para cada espécimen de cada uno

de los cuales se secuenciaron dos productos de PCR.

La identidad de las secuencias fue verificada mediante comparación con la secuencia de *A. gambiae* (Diptera: Culicidae) cuyo genoma mitocondrial completo fue publicado por Beard *et al.* (1993) y *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por la disponibilidad de esta secuencia publicada por Uribe *et al.* (1998).

La variabilidad haplotípica, la composición en términos de nucleótidos y la similitud en relación con las secuencias referencia fueron igualmente determinadas.

## Resultados

**Amplificación de ADN ribosomal mitocondrial mediante PCR.** La figura 1 muestra la amplificación del fragmento de 405 pb de los especímenes en un gel de agarosa al 1%; el tamaño de la banda fue verificado por comparación con el marcador de Promega 1 kb que aparece en las líneas extremas de la fotografía del gel.

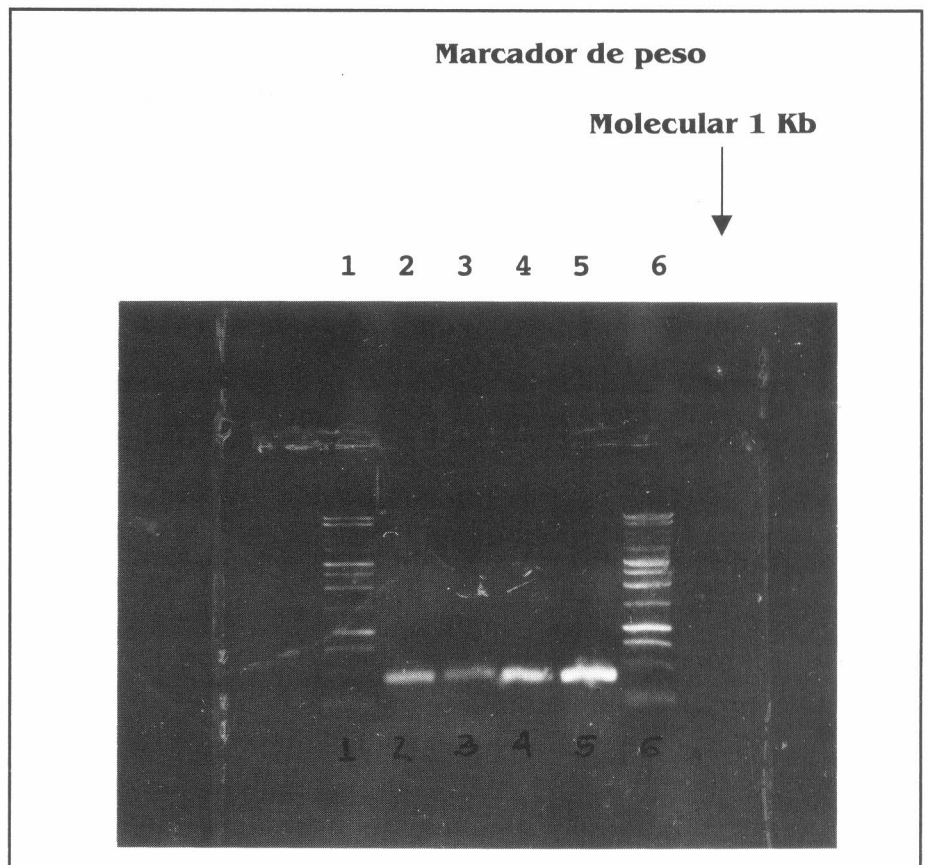
**Secuencias.** La figura 2 muestra la secuencia consenso para *A. cephalotes* obtenida mediante reversa complemento y comparación de las secuencias en ambos sentidos de la doble cadena del fragmento de la unidad ribosomal mitocondrial; no se observó

variabilidad entre las secuencias obtenidas de diferentes productos de PCR en un mismo individuo ni entre individuos, lo cual sugiere que probablemente pertenecían a un mismo grupo familiar.

La composición de las bases nitrogenadas fue: A: 36.3%, G: 4.7%, T: 43.7%, C: 15.3%. Una mayor proporción de A-T (80%) en total es consistente con la composición de estas bases encontrada en secuencias de ADN mitocondrial de otros insectos (Simon *et al.* 1994).

Las secuencias obtenidas para *A. cephalotes* corresponden a las posiciones 12905-13310 de la secuencia referencia de *A. gambiae* y la similitud fue de 48.5% entre ellas; al comparar las secuencias de *A. cephalotes* y *A. gambiae* (Fig.3) se encontraron 211 sitios polimórficos; la mayoría de los cambios observados fueron transversiones (cambio de purina por pirimidina y viceversa) del tipo AxT (46%), en menor proporción se observaron otras transversiones como AxC (11.8%), TxG (2.37%), GxC (0.95%) y transiciones (cambio de purina por purina y/o pirimidina por pirimidina) como TxC (19%) y GxA (8.1%).

La figura 4 muestra la comparación entre las secuencias de la región estudiada en *A. gambiae*, *L. longipalpis* (orden Diptera) y *A. cephalotes* (orden Hymenoptera). El alineamiento



**Figura 1.** Gel de agarosa al 1% verificando la amplificación del fragmento de la pequeña unidad ribosomal en *Atta cephalotes*. Los carriles 2-5 corresponden a productos de PCR, las líneas de los extremos (1 y 6) corresponden al marcador de peso molecular 1kb (Promega).

1	TTATCCCTAA	AGTAATTATT	TCTCTCCTAA	TTTCCAGTAA	ATCCATCAAA	TTTTAATTTT	H
61	TACTATTCAT	TTATATTTTT	TTCCAATTAA	AGTTTATTAA	ATTTAACAAT	CCTCCCAACT	H
121	AAATATATAA	TTTCATCATA	TACAACCTTTT	AAATTTATAA	TTTTTATAAA	ATTATATATA	H
181	AAATTCTATA	GGGTCTTCTC	GTCCATAAT	TCCATTTAAA	TATTTTTATT	TAATTACTAA	H
241	ATTCAAATTT	TTAACTTAAG	ACAGTTTAAG	TTTCATTCCT	ACATTCATTC	CAGTTTACAA	H
301	TTAATAAACA	ATCTATTATG	CTACCTTTGT	ACAGTCAATA	TACTGCAGCT	ATTTAATTTT	H
361	TAATCATTGA	GCAGTAAAAA	TATTTTTTAT	TATAATCAAA	AAACT		H

**Figura 2.** Secuencia consenso del fragmento de la unidad larga ribosomal (405 pb) entre los diferentes especímenes y productos de PCR en *Atta cephalotes* después de comparar las secuencias en ambos sentidos de la doble cadena. H: hormiga (*Atta cephalotes*).

1	TTATCCCTAA	AGTAATTATT	TCTCTCCTAA	TTTCCAGTAA	ATCCATCAAA	TTTTAATTTT	H
	.....	G...C·TAA	AT·T·TAATC	CA·AA·AC·G	GAT·T·TT·T	·A·C·AAA	A
61	TACTATTCAT	TTATATTTTT	TTCCAATTAA	AGTTTATTAA	ATTTAACAAT	—CCTCCCA	H
	·CAATG·A·A	·A·ATAA·AA	AAGTTTA·TT	·A··TAATA	CCACCCC·G·	AAAAT·TTAT	A
121	ACTAAATATA	TAATTTCATC	ATATACAAC	TTTAAATTTA	TAATTTTTAT	AAAATTATAT	H
	TTA.....	A·T··A·AA	T·C·TT·TAA	···—	—ATA	·TTTA·A·A	A
181	ATAAAATTCT	ATAGGGTCTT	CTCGTCCCAT	AATTCATTT	AAATATTTTT	ATTTAATTAC	H
	····GA··	····	····TTT·	···AA··	T·GCT···A	·C·A·AA·T	A
241	TAAATTCAAA	TTTTTAACTT	AAGACAGTTT	AAGTTTCATT	CCTACATTCA	TTC—CAGTT	H
	A·G··T·T	A·AAATTT·A	·A·A·CAG·	·TA·A·TCA	TTC·ACCATT	CATAC··CC	A
301	TACAATTAAT	AAACAATCTA	TTATGCTACC	TTTGTACAGT	CAATATACTG	CAGCTATTTA	H
	·T····A	·G·T·TG·	····	·C·C·G·	·A··C·	·G·CC·	A
361	ATTTTAAATC	ATTGAGCAGT	AAAAATATTT	TTTATTATAA	TCAAAAAACT	H	
	·AAC—	·G·G·G	CT·G·CT·A	AA·A—A·T	A·GAC	A	

**Figura 3.** Comparación del fragmento secuenciado en *Atta cephalotes* de Medellín y la secuencia referencia de *Anopheles gambiae* (Beard et al. 1993). A: *Anopheles gambiae*, H: hormiga (*Atta cephalotes*). Las regiones conservadas entre las secuencias aparecen en puntos, las líneas señalan deleciones o inserciones de nucleótidos entre las secuencias.

1	TTATCCCTAA ..... .....	AGTAATTATT .....C·TAA G·...·C·TAA	TCTCTCCTAA CT·TATAATC AT·T·TAATC	TTTCCAGTAA AA·ATTAATG CA·AA·AC·G	ATCCATCAAA GAT··AA·TT GAT·T·TT·T	TTTTAATTTT ·CAATTA·AA ·A··C··AAA	H L A
61	TACTATTTCAT ·TG·T·AT·A ·CAATG·A·A	TTATATTTTT AA·ATAAAAA ·A·ATAA·AA	TTCCAATTAA ·TAT·AA·T AAGTTTA·TT	AGTTTATTAA TT·A·TA·T· ·A···TAATA	ATTTAACAAT CCCC··T·TA CCACCCC·G·	—CCTCCCA —ATATATT AAAAT·TTAT	H L A
121	ACTAAATATA ·A···T··A· TTA·.....	TAATTCATC A···ATT··T A·T···A·AA	ATATACAACT TA·CTA·TT· T·C·TT·TAA	TTTAAATTTA ··A—— ···——	TAATTTTAT ——··A·· ——ATA	AAAATTATAT T·TT··T·· ·TTTA··A·A	H L A
181	ATAAAATTCT .....GA· .....GA·	ATAGGCTCTT ..... .....	CTCGTCCCAT .....TTT· .....TTT·	AATTCATT TT·AAA· ···AA·	AAATATTTTT T··CT···A T·GCT···A	ATTTAATTAC ···A··AA·T ·C·A··AA·T	H L A
241	TAAATTCAAA A·...·TT·T A·G·...·T·T	TTTTTAACTT ··AAAT·AA· A·AAATTT·A	AAGACAGTTT T·A·G·CAG· ··A·A·CAG·	AAGTTTCATT ··A·A·TTCG ·TA·A·TCA	CCTACATTCA T·C·ATCATT TTC·ACCATT	TTC—CAGTT CATTCT·C· CATAC···CC	H L A
301	TACAATTAAT ·T·...·A ·T·...·A	AAACAATCTA ·...·T·ATG· ·G··T··TG·	TTATGCTACC ..... .....	TTGTACAGT ·...·C· ··C·C·G·	CAATATACTG T·...· ··A·...·C·	CAGCTATTTA ·G··CC· ·G··CC·	H L A
361	ATTTTAAATC .....— ·AAC·—	ATTGAGCAGT ·G··G··A ·G··G··G	AAAAATATTT TT··CC·A CT·G·CT·A	TTTATTATAA AA·AA·C· AA·A—A·T	TCAAAAAACT AA··—GAC A·...·GAC	H L A	

**Figura 4.** Comparación entre las secuencias de *Anopheles gambiae* y *Lutzomyia longipalpis* (ambos del orden Diptera) con *Atta cephalotes* (orden Hymenoptera) H: hormiga (*Atta cephalotes*); A: *Anopheles gambiae*; L: *Lutzomyia longipalpis*. Los puntos representan regiones conservadas y las líneas deleciones o inserciones entre las secuencias.

miento múltiple que resultó en 410 posiciones señala una mayor similitud entre las secuencias de los dípteros (*Anopheles-Lutzomyia*) 69%, en comparación con la similitud entre *Atta-Lutzomyia* 50.3% y *Atta-Anopheles* 48.5% (Hymenoptera-Diptera).

Así mismo, se observaron diferencias en cuanto a las inserciones y deleciones en las secuencias; entre *Anopheles* y *Atta* se encontraron 5 deleciones en las posiciones

111, 112, 113, 294 y 295 del alineamiento y 20 inserciones en las posiciones 154-167, 366-369 y 396-397 mientras que entre los dípteros *Anopheles* y *Lutzomyia* el número de deleciones e inserciones fue menor 3 y 7 respectivamente en las posiciones 111, 112, 113 y 165, 166, 167, 368, 369, 396, 397.

La comparación con secuencias homólogas y en especial con *A. gambiae* confirma la identidad de la secuencia y la utilidad de los

oligonucleótidos usados en este estudio para amplificar esta región de mtRNA.

### Discusión

En este estudio se presenta la secuencia de un fragmento de 405 pb de la unidad larga ribosomal mitocondrial en *A. cephalotes* con utilidad potencial para estudios taxonómicos y filogenéticos entre hormigas, así como la relación hormiga-hongo



con interesantes implicaciones en las actividades de control.

Regiones homólogas se han amplificado y secuenciado en otros insectos principalmente dípteros de importancia médica, pero no en hormigas cortadoras de hojas. Otras regiones mitocondriales han empezado recientemente a utilizarse en el estudio de hormigas de los géneros *Atta* y *Camponotus* como el Citocromo oxidasa I (COI), Citocromo oxidasa II (COII) y regiones de ARN de transferencia tARN (Evans 1993; Rehner *et al.* 1994; Reporte del Gen Bank U75350).

La mayoría de estudios en insectos han revelado altas proporciones en A-T y las secuencias provenientes de las hormigas incluidas en este estudio corresponden a estos valores, con un promedio de 80% en total, similar al observado en otros insectos como *L. longipalpis* (Uribe *et al.* 1998) y *A. gambiae* (Beard *et al.* 1993) 70% y 81%, respectivamente. Así mismo, la región homóloga en 32 especies de cucarachas mostró un promedio de 72% en A-T (Kambhampati 1995) y en miembros de la familia Cicadellidae, Fang *et al.* (1993) observaron un promedio de 73% en A-T.

La variabilidad en el contenido de A-T en secuencias de mtADN en insectos ha sido previamente demostrada y estudiada en Hymenoptera (*Apis mellifera*) donde al parecer la cantidad de A-T alcanza extremas proporciones (Crozier *et al.* 1989).

Las comparaciones de las secuencias en el alineamiento de *A. cephalotes* con *A. gambiae* y *L. longipalpis* representando los órdenes Díptera e Hymenoptera, mostraron una mayor similitud entre las secuencias de los dípteros en comparación con las hormigas, observándose variaciones importantes en sustituciones nucleótidas y/o deleciones-inserciones; así, el promedio de las transversiones entre *Anopheles* y *Atta* -diferentes órdenes- fue mayor (31.5%) que el observado entre *Lutzomyia* y *Anopheles* (17.75%) -ambos del orden Díptera.

Adicionalmente, tanto el número de deleciones como inserciones fué menor entre los dípteros que entre éstos y la hormiga. Esta variabilidad en las sustituciones nucleótidas confirma la existencia de diferencias en la dinámica evolutiva de la unidad larga ribosomal (Gen 16S rARN) entre insectos propuesta por Kambhampati *et al.* (1996) y sugiere la necesidad de estudios detallados en grupos particulares y niveles de divergencia.

La mayoría de los estudios con base en datos moleculares en hormigas incluyen el uso de secuencias mitocondriales y microsátélites para entender la relación hongo-hormiga y caracterizar la estructura sociogenética de las colonias con miras a estructurar programas de control (Evans 1993; Rehner *et al.* 1994). Igualmente, se han secuenciado las unidades ribosomales pequeña y larga en gran número de simbioses del género *Atta* que correspon-

den a hongos del orden Agaricales y se han obtenido secuencias de ADN que revelan particularidades de las asociaciones hongo-hormiga gracias a las cuales las hormigas logran sobrepasar las defensas de las plantas (Holldobler y Wilson 1990; Evans 1993; Rehner *et al.* 1994; Gertsch *et al.* 1997).

En el presente estudio se comprobó que los oligonucleótidos LRJ12966 y LRN 13393 diseñados con base en las secuencias de otros insectos y las condiciones de PCR y obtención de secuencias previamente descritas, permiten amplificar un fragmento de 405 pb de uso potencial en estudios taxonómicos y moleculares en hormigas, y en especial como una herramienta para entender la relaciones con el hongo del cual se alimentan, cuya unidad larga ribosomal es objeto de amplificación y obtención de secuencias en la actualidad (Uribe sin publicar).

### Agradecimientos

Al Doctor Charles Porter del CDC de Atlanta por su asesoría en el trabajo molecular.

A Eduar Bejarano y Judy Natalia Jiménez por su ayuda en la edición de las secuencias.

El trabajo molecular en el Center for Diseases Control CDC Atlanta Georgia se realizó gracias al soporte (Beca-escolar) del Instituto Colombiano para el desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas COLCIENCIAS para Sandra Uribe durante su doctorado.

### Bibliografía

- BAUR, A.; CHALWATZIS, N.; BUSCHINGER, A.; ZIMMERMAN, D. 1995. Mitochondrial DNA sequences reveal relationships between social parasitic ants and their hosts. *Curr. Genet.* 28: 242-247.
- BEARD, B.; MILLS, H.; COLLINS, F. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect. Mol. Biol.* 2: 103-124.
- BOLTON, B. 1997. Identification guide to the ant genera of the world. Harvard University Press. London England. pp 220.
- CARDONA, M. R. 1998. Manejo de la hormiga arriera en zonas cafeteras de Colombia. Curso de extensión hormigas cortadoras. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Posgrado de Entomología. pp 205-215.
- CHERRETT, J. M. 1989. The mutualism between Leaf-cutting ants and their fungus. *Insect-Fungus interactions.* 14 Symp. Royal Entomol. Soc. 4: 93-120.
- COLLINS, F. H.; PORTER, C. H. 1990. Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42: 417-423.
- CROZIER, R. H.; CROZIER, Y.C.; MOCKINLEY, A. G. 1989. The COI and COII region on honeybee mitochondrial DNA: evidence for

variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.* 6: 399-411.

- DE SALLE, R.; GATE, SY. J.; WHEELER, W.; GRIMALDI, D. 1992. DNA sequences from a fossil termite in oligo-miocene amber and their phylogenetic implications. *Science.* 257: 1933-1936.
- DOOLITTLE, R. F.; FENG, D. F.; TSANG, S.; CHO, G.; LITTLE, E. 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science.* 271: 470-473.
- EVANS, J. D. 1993. *Mycetophylax comformis* symbiont 921106-04 28s ribosomal RNA, partial sequence. *Mol. Ecol.* 2: 393-397.
- FANG, Q.; BLACK, W. C. IV.; BLOCKER, H. D.; WHITCOMB, R. I. 1993. A Phylogeny of New World Deltocephalus-Like Leafhopper genera based on mitochondrial 16s ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2: 119-131.
- FLOOK, P. K.; ROWELL, C. H. F. 1997. The effectiveness of mitochondrial rRNA gene sequences for the reconstruction of the phylogeny of an insect order (Orthoptera). *Mol. Phylogenet. Evol.* 8 (2): 177-192.
- FUTUYMA, D. J. 1998. Evolutionary biology. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, pp 763.
- GERTSCH, P.; PAMILO, P.; VARVIO, S. L. 1997. Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants. *UI* 94214721. Gene Bank.
- HINKLE, G.; WETTERER, J. W.; SCHULTZ, T. R.; SOGIN, M. L. 1994. Phylogeny of the attini ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequence. *Journal of Science* 256: 1695-1697.
- HOLLOBLER, B.; WILSON, E. 1990. The ants winner of the pulitzer prize in general nonfiction. *U. S. A.* pp 733.
- KAMBHAMPATI, S. 1995. A phylogeny of cockroach and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 4: 2017-2020.
- KAMBHAMPATI, S.; KJER, K. M.; THORNE, B. L. 1996. Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16s ribosomal RNA gene. *Insect. Mol. Biol.* 5: 229-238.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRTT, J. M. 1975. Variability in the selection of substrate by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bull. Entomol. Res.* 65:33-47.
- MONTEIRO, F. A.; LYMON, F. D.; SCALANTE, A.; CORDON-ROSALES, C.; WSSON, E. M.; DUJARDIN, J. P.; BEARD, B. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatomine vector of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 377-386.
- NIGRO, L.; GRAPPUTO, A. 1993. Evolution of the mitochondrial rRNA in the oriental species subgroup of *Drosophila*. *Biochem. Syst. Evol.* 21:79-83.
- REHNER, S. A.; CHAPELA, I. H.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing

- ants and their fungi. Gene Bank número de acceso: U1189.
- SERNA, F. J. 1992. *Atta* sp., *Acromyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). Cronologías en control y tendencias en investigación. Universidad Nacional de Colombia: 6-8.
- SERNA, F. J.; CORREA, J. A. 1995. Fraccionamiento químico de hojas de *Lycopersicon esculentum* M. y evaluación de su actividad fagoinhibidora sobre *Atta cephalotes* (L). Universidad Nacional Sede Medellín. Tesis, pp 151.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. 1994. Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved. PCR primer. Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 651-701.
- WATSON, J. D.; HOPKINS, N. H.; ROBERTS, J. W.; STEITZ, J. A.; WEINER A. M. 1987. Molecular Biology of the Gene. Benjamin/Cummings, Menlo Park Calif. 1: 346-347.
- WETTERER, J. K.; SCHULTZ, TR.; MEIER, R. 1998. Phylogeny of fungus-growing ants based on mitochondrial DNA sequences and morphology. Mol. Phylogenet. Evol. 1: 42-47.
- WOLSTENHOLME, D. R.; CLARY, D. O. 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. Genetics. 109: 725-744.
- YEPES, R. F.; MADRIGAL, C. A. 1998. Recientes avances en el control de hormigas cortadoras. Curso de extensión hormigas cortadoras. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Posgrado de Entomología. pp 195-199.