

DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA Y FRECUENCIA DE INFECCIÓN DE *Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Rickettsia* Y *Cardinium* EN *Atta cephalotes*

Glever Alexander Vélez Martínez

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: glever.velez@correounivalle.edu.co*

Vanessa Muñoz Valencia

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: vanem28@gmail.com*

James Montoya-Lerma

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: james.montoya@correounivalle.edu.co*

RESUMEN

En el neotrópico los herbívoros generalistas con mayor impacto en los sistemas de producción e incluso en infraestructuras civiles son las hormigas cortadoras de hojas *Atta* y *Acromyrmex*. En Colombia, *Atta cephalotes* es la especie más ampliamente distribuida de su género y con mayor impacto económico. Dado que se ha comprobado que las relaciones simbióticas han influenciado la evolución y ecología de la especie, se planteó evaluar la frecuencia de infección de los endosimbiontes secundarios *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Rickettsia* y *Wolbachia* en *A. cephalotes*. Para esto, se muestrearon 615 obreras en tres localidades de la región pacífica y cuatro de la amazónica de Colombia. Se amplificaron con cebadores específicos el gen mtCOI del insecto y los genes 16S ADNr de las bacterias. Se detectó *Wolbachia* únicamente en ocho muestras del Amazonas y presentaron doble infección. *Arsenophonus* fue evaluado por PCR convencional y anidada. Con el primer método no se detectó la bacteria. Con el segundo método se obtuvieron 38 secuencias, de las cuales solo una secuencia correspondió a *Arsenophonus*, las demás eran en su mayoría bacterias del orden Rhizobiales, sugiriendo que los cebadores no son específicos. Asimismo, las reconstrucciones filogenéticas sugieren la presencia de transmisión horizontal de *Arsenophonus* en insectos y la infección de cepas del género *Mesorhizobium* aún no descritas en las muestras del pacífico. Por su parte, *Cardinium* y *Rickettsia* no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas. Dados los bajos índices de infección, es poco probable que estas bacterias hayan influenciado en el pasado en la especie.

Palabras clave: Atta cephalotes, Arsenophonus, Cardinium, Endosimbiontes, Rickettsia, Wolbachia.

ABSTRACT

In the Neotropics, the leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex* are the herbivores with the greater impact of crops production and even cities infrastructure. In Colombia, *Atta cephalotes* is the most widely distributed leaf cutter ant species and produces the highest economic impact. Given that symbiotic relationships have been shown to be influential in the evolution and ecology of this species, it was proposed to evaluate the frequency of infection of the secondary endosymbionts *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Rickettsia* and *Wolbachia* in *A. cephalotes*. A total of 615 workers were collected from three places in the Pacific and Amazonic regions of Colombia. The gen COI from the ant and the genes 16s from each bacteria was amplified with specific primers. *Wolbachia* double infection was found in only eight samples from one Amazonic place. *Arsenophonus* was tested by conventional and nested PCR. In the first method the bacteria was not detected. With the second method, 38 sequences were obtained, of which only one corresponded to *Arsenophonus*, while the others were mostly Rhizobial bacteria, suggesting no specificity of the primer. Likewise, phylogenetic reconstructions suggest the presence of horizontal transmission of *Arsenophonus* in insects and the infection of strains of the genus *Mesorhizobium* not described yet in the Pacific samples. On the other hand, *Cardinium* and *Rickettsia* were not detected in any of the samples analyzed. Given the low rates of infection, it is unlikely that these bacteria have influenced the species in the past.

Key words: Atta cephalotes, Arsenophonus, Cardinium, Endosymbionts, Rickettsia, Wolbachia.

INTRODUCCIÓN

Las hormigas cortadoras de hojas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Formicidae: Attini) son herbívoros generalistas, cortadores de material vegetal que utilizan como sustrato para cultivar los jardines del hongo mutualista que constituye su fuente de alimento (Hölldobler and Wilson, 2011; Mueller *et al.*, 2001). En los ecosistemas se reconoce que estas hormigas son bio-ingenieras al intervenir en procesos como el ciclaje de nutrientes, en la creación de claros, y en la remoción, fertilización y aireación del suelo (Montoya-Lerma *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a su alta tasa de defoliación de cultivos y plantas ornamentales, se les denomina como los mayores herbívoros en el Neotrópico (Montoya-Lerma *et al.*, 2012; Hölldobler and Wilson 2011).

En Colombia, *Atta cephalotes* es la especie más ampliamente distribuida y abundante del grupo, representando un limitante en la producción agrícola y forestal (Fernández *et al.*, 2015). Aunque propias de hábitats naturales y rurales, estas hormigas han expandido su distribución respondiendo a múltiples factores ecológicos; con impactos importantes a nivel comercial, forestal y estructural cuando nidan en cercanías a construcciones urbanas (Chacón de Ulloa, 2003; Montoya-Lerma *et al.*, 2012).

La tribu Attini agrupa 13 géneros de hormigas distribuidos exclusivamente en el continente americano, desde el sur de América del Norte hasta el norte de Argentina (Fernández *et al.*, 2015). Weber (1972) propuso la región amazónica como el centro de origen de las primeras especiaciones del grupo por medio de dispersión o aislamiento geográfico. Esto sugiere que la distribución de las hormigas a través del continente se realizó paulatinamente a medida que los insectos se adaptaban por fuera de la región amazónica. Con base en esto, el autor sugiere que la ruta de migración de las hormigas desde la Amazonía hacia el norte de América del Sur fue a través del litoral que comunica la cuenca amazónica con el litoral caribe; hacia el Sur del continente se dispersaron a través del Río Paraná; mientras que, hacia Centroamérica, y consecuentemente también hacia América del Norte, lo hicieron a través del istmo de Panamá.

A las hormigas Attini se les reconoce por establecer relaciones simbióticas de tipo múltiple (Currie *et al.*, 2003). La más antigua de las relaciones que ha mantenido *A. cephalotes* por más de 30 millones de años, es la simbiosis mutualista obligada con el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricaceae:

Leucocoprinae) (Hölldobler and Wilson, 2011). Este hongo les proporciona a las hormigas los nutrientes necesarios para el sustento y crecimiento de la colonia, a la vez que las reinas jóvenes garantizan su propagación cuando salen del nido durante el vuelo nupcial (Mueller *et al.*, 2001). Por otra parte, a otros géneros dentro de la tribu se les ha detectado la asociación de bacterias cuticulares con capacidad de secretar sustancias repelentes en contra de los hongos antagonistas reportados (Currie *et al.*, 2003; Giraldo, 2009; Marsh *et al.*, 2013). No obstante, se ha explorado poco acerca de la posibilidad de infección de bacterias de tipo endosimbionte, las cuales podrían intervenir en procesos bioquímicos, ecológicos y evolutivos de las hormigas.

Las bacterias endosimbiontes se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a la asociación con sus hospederos (Grijalba and Giraldo, 2006). Los endosimbiontes primarios (EP) son transmitidos estrictamente por vía materna y logran mantener una trayectoria evolutiva conjunta con sus hospederos (Baumann and Baumann, 2005; Rosenbluth *et al.*, 2012; Wilson and Duncan, 2015). Por su parte, los endosimbiontes secundarios (ES) pueden ser transmitidos vertical u horizontalmente, generando un vínculo no indispensable con el hospedero (Dale and Moran, 2006; Grijalba and Giraldo, 2006). Estos últimos también pueden establecer congruencia filogenética con los insectos cuando la transmisión es por vía materna.

En los últimos años, los estudios en ES han sido enfocados en *Wolbachia*, un género de α -proteobacteria que podría estar infectando el 40 % de los artrópodos terrestres (Zug and Hammersstein, 2012). Su transmisión puede ser vía materna, registrándose en esos casos una simbiosis de tipo mutualista y la congruencia entre las filogenias de la bacteria y los hospederos. Por contraste, a esta bacteria también se le atribuye la capacidad de actuar como parásito reproductivo al producir alteraciones como partenogénesis, incompatibilidad citoplasmática, feminización e inviabilidad de machos (Stouthamer *et al.*, 1999; Kageyama *et al.*, 2012; Van Borm *et al.*, 2001). Cada una de estas alteraciones son adaptaciones por parte de la bacteria para favorecer la producción de hembras infectadas y su transmisión.

Al igual que *Wolbachia*, las bacterias *Arsenophonus*, *Rickettsia* y *Cardinium* son ES conocidos por las alteraciones reproductivas que causan en sus hospederos. La γ -proteobacteria *Arsenophonus*, que infecta aproximadamente el 5 % de los artrópo-

dos, puede actuar como parásito reproductivo al inducir partenogénesis y generar feminización de machos (Darby *et al.*, 2010; Duron *et al.*, 2008). En escarabajos, la α -proteobacteria *Rickettsia* puede inducir partenogénesis (Hagimori *et al.*, 2006) y muerte de machos (Lawson *et al.* 2001; Von der Schulenburg *et al.*, 2001; Werren *et al.*, 1994). Por su parte, se ha observado que la bacteria *Cardinium*, la cual se encuentra distribuida entre el 6 y 8 % de los artrópodos (Weeks *et al.*, 2003; Zchori-Fein and Perlman, 2009), puede inducir incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis y feminización de machos (Hunter *et al.*, 2003; Gotoh *et al.*, 2007; Zchori-Fein *et al.*, 2001; Weeks *et al.*, 2001).

Aunque se desconoce el posible efecto de la infección de ES sobre la eficiencia biológica o *fitness* en las hormigas Attini, si se ha reportado su influencia en otros insectos. En mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae), *Rickettsia* induce incrementos en la fecundidad, tasa de supervivencia y desarrollo, proporción de hembras y tolerancia a la temperatura (Brumin *et al.*, 2011; Himler *et al.*, 2011; Oliver *et al.*, 2005). De manera similar, *Wolbachia* puede disminuir la mortalidad larval y pupal e incrementar la longevidad y el tamaño del adulto en *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae) (Brelsfoard and Dobson, 2011), así como aumentar la fecundidad en *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Fry *et al.*, 2004). No obstante, también se ha reportado que *Rickettsia* puede aumentar la susceptibilidad de algunos insecticidas en *Bemisia tabaci* (Kontsedalov *et al.*, 2008; Ghanim and Kontsedalov, 2009); mientras que, la infección por *Wolbachia* aumenta la mortalidad de los estados inmaduros de la avispa *Trichogramma* (Tagami *et al.*, 2001).

Además de los efectos antes descritos en el *fitness* y en la biología del hospedero, también se ha reportado que los ES tienen el potencial de influenciar la estructura genética poblacional de sus insectos al disminuir la variabilidad genética mitocondrial por medio de barrido selectivo (Baudry *et al.*, 2013; Charlat *et al.*, 2009; Jiggins, 2003). Ese efecto se ha observado en himenópteros (Raychoudhury *et al.* 2003; Xiao *et al.*, 2012), escarabajos (Jäckel *et al.*, 2013) y en mosquitos (Armbruster *et al.*, 2003), en relación a la infección por *Wolbachia*.

Debido a la importancia potencial que exhiben los ES en la biología de los insectos sociales, se examinó la presencia de algunos ES con potencial de influenciar la estructura genética poblacional de su hospedero *A. cephalotes* en relación a los haplotipos mitocondriales. Para esto se plantea-

ron los siguientes interrogantes. Primero, ¿existen múltiples ES en *A. cephalotes*? ¿Están estos ES relacionados con los haplotipos mitocondriales presentes en *A. cephalotes*? ¿Existe una relación de co-evolución o congruencia filogenética entre las poblaciones de hormigas arriera y alguno de ES evaluados en este estudio? El resolver estos interrogantes contribuirá a entender cómo las relaciones endosimbióticas entre el hospedero y su huésped pueden estar afectando la dinámica poblacional tanto de la hormiga como de los ES, y contribuir a futuro con estrategias de manejo y control de esta plaga.

MÉTODOS

Recolecta de especímenes

Se recolectaron obreras de *A. cephalotes* en nidos de diferentes localidades de las regiones pacífica y amazónica de Colombia. Se escogieron tres localidades en la región pacífica y cuatro en la amazónica (tabla 1). Dentro de cada localidad se seleccionaron entre tres y cinco nidos, separados por una distancia aproximada de 1 km para asegurar su independencia. De cada nido se colectaron como máximo 20 obreras medias, para un total de 615 muestras. Las hormigas fueron almacenadas en alcohol al 96 % y a -20°C. Con ayuda de colaboradores se obtuvieron muestras de la especie de Guatemala, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Perú, Trinidad y Tobago y dos localidades en el Brasil: Manaos y Rio Claro.

Extracción de ADN

Las obreras fueron inicialmente maceradas, de manera individual, con nitrógeno líquido en un mortero y luego depositadas en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregó 100 μ L de buffer TNEs y se continuó macerando con un motortool. A continuación, se agregaron 450 μ L del buffer TNEs para completar un volumen final de 550 μ L. Posterior a esto, se adicionaron 10 μ L de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml y se incubaron a 55 °C en baño maría durante la noche. Al día siguiente, las muestras fueron puestas en frío para inhibir la acción de la enzima y luego se les adicionaron 5 μ L de RNasa a una concentración de 10 mg/ml e incubadas nuevamente a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se inhibió la enzima con frío y se prosiguió con la precipitación de proteínas adicionando 200 μ L de NaCl a 5M. El sobrenadante fue transvasado a un nuevo tubo eppendorf y luego se agregaron 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 24:1. La fase acuosa que contenía el ADN fue transferida a un nuevo tubo eppendorf, al cual se le adicionaron 600 μ L

Tabla 1. Coordenadas de las muestras de *A. cephalotes* colectadas en las regiones pacífica y amazónica

Región	Departamento	Localidad	Nidos	Número de obreras	Coordenadas	
					Longitud	Latitud
Pacífica	Chocó	Quibdó	N1	20	N 05°40' 23,9"	O 076°37' 09,8"
			N2	20	N 05°40' 15,2"	O 076°37' 13,0"
			N7	20	N 05°40' 25,6"	O 076°35' 40,9"
			N11	20	N 05°37' 13,9"	O 076°38' 29,5"
			N17	20	N 05°36' 46,4"	O 076°38' 19,2"
	Valle del cauca	Dagua	N1	20	N 03°34' 40,2"	O 076°39' 24,1"
			N2	20	N 03°32' 06,1"	O 076°38' 46,6"
			N4	20	N 03°34' 07,2"	O 076°38' 47,4"
			N5	20	N 03°30' 44,1"	O 076°39' 22,1"
			N10	20	N 03°33' 22,4"	O 076°39' 07,5"
	Cauca	Guapi	N1	20	N 02°32' 17,4"	O 077°52' 10,0"
			N2	20	N 02°32' 33,1"	O 077°52' 01,0"
			N4	20	N 02°32' 40,6"	O 077°52' 44,9"
			N5	20	N 02°32' 33,7"	O 077°52' 17,5"
			N10	20	N 02°33' 11,7"	O 077°51' 42,8"
Amazónica	Vaupés	Apaporis	N1	10	S 01°00' 59,4"	O 070°08' 12,2"
			N2	20	S 00°49' 53,9"	O 070°15' 21,2"
			N4	20	S 00°58' 46,3"	O 070°12' 13,9"
		Ozcimi	N1	20	N 01°14' 31,4"	O 070°14' 19,6"
			N2	20	N 01°13' 55,1"	O 070°13' 57,8"
			N4	20	N 01°13' 30,6"	O 070°13' 42,1"
			N5	20	N 01°13' 43,8"	O 070°13' 45,5"
			N13	20	N 01°13' 43,8"	O 070°14' 42,4"
		Taraira	N1	11	S 00°29' 00,7"	O 069°39' 22,0"
			N2	20	S 00°32' 16,0"	O 069°36' 41,2"
			N4	20	S 00°38' 47,6"	O 069°38' 47,6"
			N6	12	S 00°32' 20,2"	O 069°36' 42,1"
			N7	20	S 00°33' 08,8"	O 069°38' 08,8"
		Arrendajo	N1	20	N 01°06' 15,3"	O 070°17' 32,6"
			N2	20	N 01°06' 23,3"	O 070°17' 52,8"
			N4	10	N 01°06' 03,3"	O 070°18' 03,1"
			N5	12	N 01°06' 05,1"	O 070°18' 13,4"
			N6	20	N 01°06' 27,9"	O 070°16' 49,0"

de isopropanol a -20 °C, se incubó por 2 h para precipitar el ADN. Finalizada la incubación se descartó el sobrenadante y se hizo un segundo lavado con etanol frío al 70 %. El sobrenadante fue descartado nuevamente y los botones de ADN fueron secados en un horno a 50 °C por 20 minutos. El ADN fue resuspendido en 100 μ L agua ultrapura y almacenado a -20 °C.

Amplificación de genes

La amplificación del gen citocromo oxidasa I (COI) de *A. cephalotes* se llevó a cabo con los cebadores específicos diseñados en este estudio. Para los ES se usaron cebadores específicos reportados en la literatura (tabla 2). Las PCR's se realizaron en un volumen final de 12 μ L, que contenía: 1 μ L de ADN molde para amplificar COI y 2 μ L para la detección de ES (10 ng/ μ L), 10 μ M de cada cebador, 6 μ L de GoTaq Green Master Mix y el resto de volumen en agua. El protocolo de amplificación para COI

fue: 95 °C por 5 min, seguido 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 56 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Se realizó la amplificación de COI en la totalidad de las muestras evaluadas con el objetivo de garantizar la calidad de extracción.

El análisis de endosimbiontes se realizó a través de *pools* de ADN de 10 individuos. En los casos en los que se obtuvo amplificación positiva, los *pools* fueron individualizados y reamplificados usando el respectivo cebador. El perfil térmico utilizado para la amplificación de *Arsenophonus*, *Rickettsia* y *Cardinium* inició con 95 °C por 2 min, luego 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, Tm por 45 seg (tabla 2) y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 5 min. Mientras que, para *Wolbachia* fue: 94 °C por 2 minutos, seguido de 37 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 45 segundos, 72 °C por un minuto y medio y una extensión final por

Tabla 2. Lista de los cebadores específicos usados para la detección de ES en *A. cephalotes*.

Especie	Gen	Cebadores	Secuencias (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño fragmento (pb)	Referencia
<i>Atta cephalotes</i>	mtCOI	COI2-F COI2-R	CATTTGATCAGGCTTACTCGGC TGATATTCCAGCAATGTGGAGAGA	56	330	Este estudio
Universales de las bacterias	16S rRNA	27-F 1513-R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG ACGGYTACCTTGTACGACTT	52	1500	Sirviö and Pamilo 2010.
<i>Wolbachia</i>	<i>wsp</i>	wsp-F1 wsp-R1	GTCCAATARSTGATGARGAAAC CYGCACCAAYAGYRCTRATAA	59	600	Zhou <i>et al.</i> 1998
<i>Arsenophonus</i>	16S rRNA	ARS-F ARD-R2	GGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGT GTAGCCCTRCTCGTAAGGGCC	60	600	Duron <i>et al.</i> 2008
<i>Rickettsia</i>	16S rRNA	RICK-F RICK-R	GCTCAGAACGAACGCTAT GAAGGAAAGCATCTCTGC	58	900	Gottlieb <i>et al.</i> 2006
<i>Cardinium</i>	16S rRNA	CLO-F CLO-R1	GCGGTGTAAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT	58	450	Sirviö and Pamilo 2010

10 minutos a 72 °C. Asimismo, para la detección de *Arsenophonus* se utilizó PCR anidada modificado a partir de lo reportado por Clay *et al.* 2008. Como controles positivos se utilizaron muestras de *Acromyrmex* para las reacciones de *Wolbachia* y de mosca blanca para *Arsenophonus*, *Cardinium* y *Rickettsia*. Cada reacción de PCR también contó con un control negativo. Las PCRs fueron corridas en un termociclador Veriti® (ThermoFisher, EEUU). Los resultados de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1 %. Las muestras positivas tanto para COI como para los ES fueron enviadas a Macrogen Corporation, Estados Unidos para su secuenciación.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas de los ES y el gen COI se editaron en el programa *Sequencher* 4.1.4 y se evaluaron las identidades en la herramienta BLAST del NCBI. Luego, se realizó un alineamiento con *Clustal W* en el programa *Bioedit*. Se determinó el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba a los datos usando la herramienta *Find best DNA/protein model* de MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Para las reconstrucciones filogenéticas se utilizó el método de máxima verosimilitud (MV) en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) con 1.000 repeticiones y se incluyeron secuencias disponibles en el *GenBank* para cada caso. Las redes de haplotipos se realizaron en el programa *Network* v5 (Bandelt *et al.*, 1999) En el programa *DnaSP* versión v6 (Rozas *et al.*, 2017) se calcularon parámetros polimórficos como la cantidad de sitios segregados (S), el número de haplotipos (h), la diversidad nucleotídica (π) y la diversidad haplotípica (Hb) y la prueba de neutralidad Tajima's D.

RESULTADOS

Análisis de COI de *A. cephalotes*

En la figura 1 se puede observar que las muestras de *A. cephalotes* se separaron de acuerdo a

la región de la cual provenían. Las de la región amazónica se agruparon en dos clados, en los cuales también se incluyen muestras provenientes de Perú, Brasil (Manaos) y Venezuela (Clado A y B). Mientras que, todas de la región pacífica conformaron un mismo clado, junto con las hormigas de Panamá (clado D). Es de notar que entre los clados de las regiones pacífica y amazónica se encuentra un pequeño grupo que incluye dos secuencias de la localidad de Arrendajo (Vaupés), dos secuencias de Guapi (Cauca) y dos de Dagua (Valle) (clado C). Por último, las secuencias de Costa Rica Trinidad y Tobago, Brasil (Río Claro) y Guatemala forman dos clados aparte de los mencionados.

La red haplotípica permite observar que los haplotipos de *A. cephalotes* dentro de las dos regiones estudiadas son únicos para cada una (no se comparten) (Figura 2). A nivel intrarregional, los haplotipos son compartidos en las localidades muestreadas, encontrándose que el haplotipo V fue el más frecuente dentro de la región pacífica, presentándose en 10 de las 29 secuencias analizadas, mientras que el haplotipo I fue el más frecuente dentro de la región amazónica, al registrarse en 18 de las 37 secuencias (Figura 2). Con respecto a los haplotipos de las hormigas diferentes países de Centro y Sur América, se observa que las muestras del Perú se agrupan dentro del haplotipo más frecuente del Vaupés y que las de Venezuela lo hacen con un haplotipo registrado para la localidad de Taraira. Las demás secuencias de las hormigas de Brasil, Panamá, Guatemala, Costa Rica y Trinidad y Tobago presentaron haplotipos exclusivos. La distancia media entre los principales 13 haplotipos de COI fue 0,029 (tabla 3).

Frecuencia de infección de ES

De las 615 muestras analizadas, *Wolbachia* amplificó únicamente en ocho muestras de la región amazónica, correspondientes a la localidad de

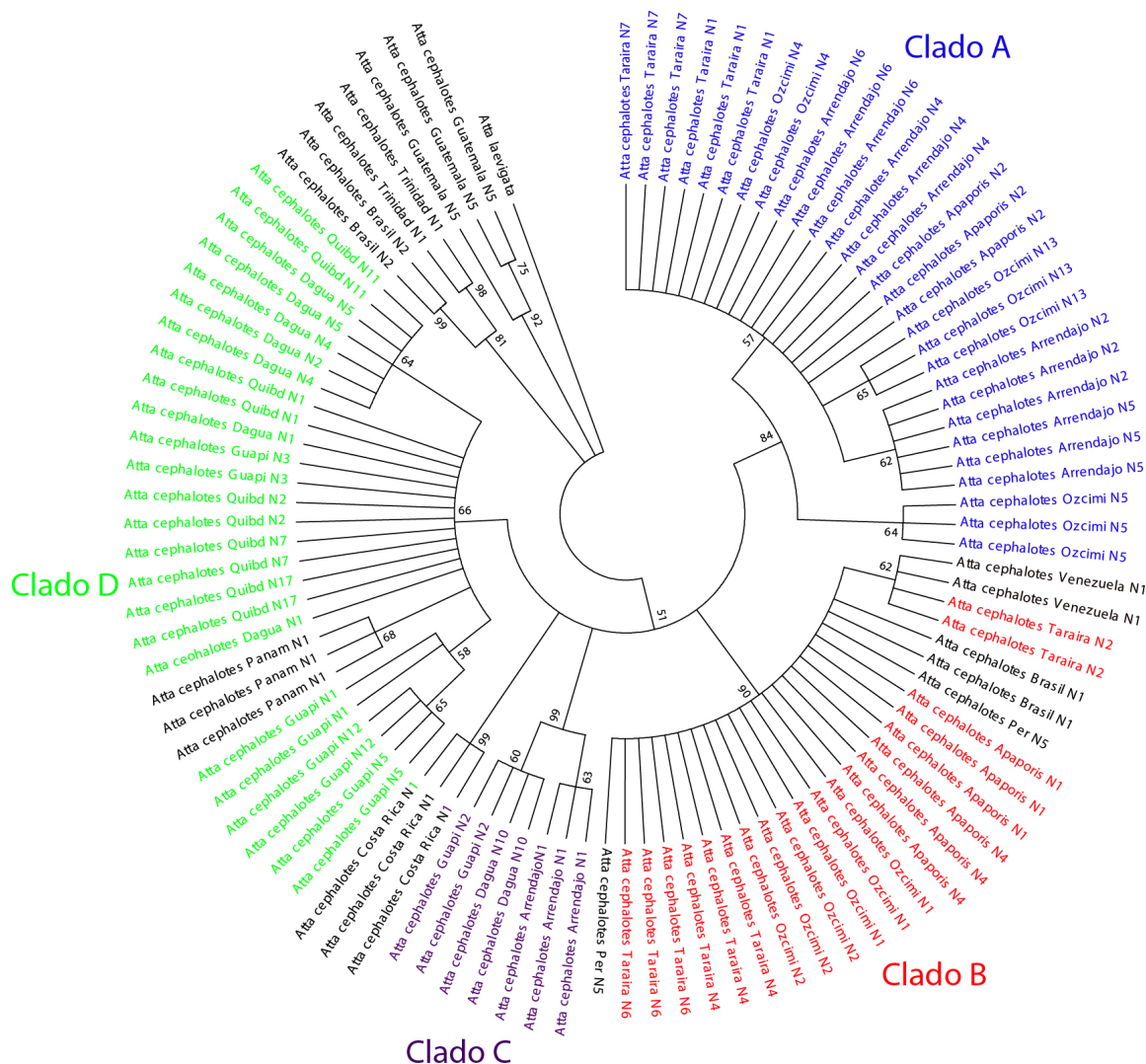


Figura 1. Reconstrucción filogenética intraespecífica de *Atta cephalotes* evaluados en este estudio, usando el método de máxima verosimilitud y el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI).

Tararira. Las secuencias que se obtuvieron a partir de las muestras positivas para el gen *wsp* presentaron picos dobles en la mayoría de las posiciones, impidiendo una resolución clara de cada base nitrogenada y la construcción de un árbol filogenético. Con la secuenciación del control positivo (*Acromyrmex*) se pudo determinar que los cebadores efectivamente amplifican el segmento de la proteína de envoltura de *Wolbachia*.

En el caso de los ES *Arsenophonus*, *Cardinium* y *Rickettsia* no fueron detectados en las muestras analizadas por PCR convencional. La obtención de las secuencias de los controles positivos permitió corroborar que los cebadores funcionan correctamente y amplifican segmentos del gen 16S de estas bacterias, respectivamente.

Análisis de secuencias obtenidas por medio PCR anidada

La PCR anidada usando los cebadores para el ES *Arsenophonus*, permitió confirmar baja especificidad, al llevar a la amplificación de otras bacterias. De las 38 secuencias obtenidas con estos cebadores, 28 secuencias presentan porcentajes de identidad de entre 98 % y 99 % en la herramienta BLAST con bacterias pertenecientes al orden Rhizobiales, 20 de ellas con 99 % de identidad con la secuencia llamada "uncultured Rhizobiales bacterium clone AWA7E (KF248465)", dos secuencias concordaron con bacterias *Arsenophonus* y *Citrobacter* pertenecientes al orden Enterobacteriales y las ocho restantes reportaron identidad con bacterias no cultivables cuyos géneros no se especificaban. Las

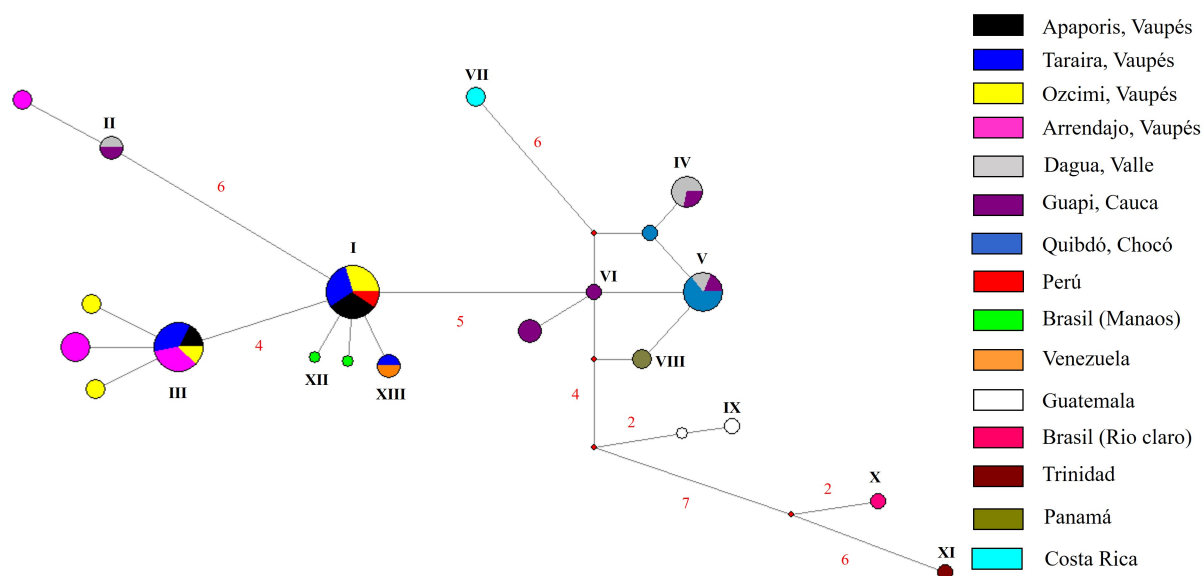


Figura 2. Red de haplotipos del gen COI de *A. cephalotes*. Los números rojos entre los haplotipos son el número de cambios. Las ramas que no tienen número indica que los haplotipos difieren en una única posición.

ocho secuencias de Rhizobiales restantes fueron: *Aliihoeflea aestuarii*, *Mesorhizobium* (en dos individuos), *Rhizobium*, *Rosenbergiella*, *Ochrobactrum*, *Rheinheimera texasensis* y *Sinorhizobium*.

Al realizar la reconstrucción filogenética de las secuencias del orden Rhizobiales con las secuencias aquí obtenidas y algunas reportadas en el NCBI se observa un clado de bacterias que infectan únicamente a hormigas (Figura 3). En ese clado se agrupan las secuencias de Rhizobiales incultivables en *A. cephalotes*, junto con bacterias reportadas en *A. laevigata*, *Trachymyrmex urichii*, *Pheidole* sp., *Dolichoderus* sp., entre otras. En ese mismo clado también están dos géneros del orden Rhizobiales: *Mesorhizobium* sp. reportada en *A. laevigata* y *Bartonella* sp. en *Tetraponera*. En el árbol de haplotipos de las bacterias Rhizobiales incultivables (Figura 4) se observa que el haplotipo III es el más frecuente, presentándose en la totalidad de las muestras obtenidas de Guapi y que la localidad de Quibdó presentó el mayor número de haplotipos. En esa misma figura también se puede observar que el haplotipo I, con secuencias de *Mesorhizobium* sp. y Rhizobiales incultivables reportadas en *A. laevigata*, fue el que menos difirió con respecto a los haplotipos en *A. cephalotes*.

La reconstrucción filogenética de la figura 2 tam-

bién permite observar que las dos secuencias de *Mesorhizobium* sp. en *A. cephalotes* se agrupan con secuencias del mismo género reportadas en plantas. De manera similar, se forma un único clado que agrupa las secuencias de *Rhizobium* encontradas en la hormiga y en plantas. Siguiendo esa misma línea, el género *Ochrobactrum* también forma un clado único con las secuencias reportadas en *A. cephalotes*, en una sanguijuela y en ambientes abióticos.

Por último, la única secuencia obtenida de *Arse-nophonus* por este método presentó entre 99 % y 98 % de identidad con bacterias halladas principalmente en Hemiptera y, en menor proporción, en Diptera.

Parámetros polimórficos y prueba de neutralidad

En la tabla 4 se observa que la diversidad nucleotídica (π) calculada fue inferior a 0,01 en todas las localidades del Amazonía y Quibdó y superior en Dagua y Guapi, mientras que la diversidad haplotípica (H_b) fue superior a 0,5 en todas las localidades. Por otra parte, en la prueba de neutralidad de Tajima's D se registraron valores positivos en todas las localidades, con los valores más altos en Quibdó, Apaporis, Ozcimi y Taraira.

Tabla 3. Distancias nucleotídica entre los principales haplotipos de COI.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
I													
II	0,019												
III	0,012	0,032											
IV	0,019	0,039	0,025										
V	0,019	0,039	0,032	0,006									
VI	0,015	0,035	0,028	0,009	0,003								
VII	0,025	0,046	0,025	0,025	0,025	0,022							
VIII	0,022	0,042	0,035	0,009	0,003	0,006	0,028						
IX	0,029	0,043	0,035	0,035	0,028	0,025	0,032	0,025					
X	0,038	0,045	0,045	0,042	0,041	0,042	0,045	0,041	0,038				
XI	0,038	0,045	0,052	0,056	0,049	0,049	0,060	0,049	0,045	0,025			
XII	0,003	0,022	0,015	0,022	0,022	0,019	0,028	0,025	0,032	0,042	0,042		
XIII	0,003	0,022	0,015	0,022	0,022	0,019	0,028	0,025	0,032	0,042	0,042	0,006	

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó la estructura genética en poblaciones de *A. cephalotes* en las regiones pacífica y amazónica de Colombia, usando el gen mitocondrial COI. Se encontró que los haplotipos de las regiones no se comparten entre sí, lo cual sugiere que el flujo genético entre las regiones está restringido probablemente debido a la distancia geográfica que las separa. Dado que la divergencia entre los haplotipos es inferior a 0,1 y teniendo en cuenta que Hebert *et al.* (2003) adoptaron como estándar para la tasa de evolución molecular del gen COI el valor del 3 % por cada millón de años, se presume que la separación entre las poblaciones de ambas regiones es relativamente reciente. Lo anterior contrasta con el estudio de Lovato *et al.* (2005), quienes al analizar 500 pb del gen COI en *A. cephalotes* encontraron un porcentaje de divergencia de 6,5 % entre hormigas del Noreste de Brasil y la amazonia de ese país. Estos autores sugieren hacer estudios con más genes mitocondriales y nucleares para confirmar la presencia de los patrones establecidos con COI.

En cuanto al análisis intra-regional, se encontró que los haplotipos son compartidos por las diferentes localidades muestreadas. De acuerdo a las cuatro categorías de patrones filogeográficos mitocondriales intraespecíficos propuestos por Avise *et al.* (1987), los resultados del gen COI concuerdan con el modelo denominado ‘continuidad filogenética y falta de separación espacial’ (categoría IV). En éste se establece que los haplotipos mitocondriales no se distribuyen en las poblaciones de acuerdo a las localidades geográficas, lo que sugiere que se presenta, de manera extensa y reciente, interconexiones de flujo genético. Por tanto, la no diferenciación genética de las localidades dentro de las regiones sugiere que la capacidad de vuelo y

distribución de los alados de *A. cephalotes* permite la conexión entre las poblaciones. Se desconoce específicamente la capacidad de dispersión de los alados de la especie bajo estudio, pero, en *Atta texana* Moser (1967) calculó la distancia máxima de dispersión en 50 km.

Lo anterior contrasta con la reportado por Martins (2006), quien al analizar secuencias de COI, COII, IGS y Leu-tRNA de *A. cephalotes* del Brasil encontró que sus resultados concuerdan con las categorías I y II propuestas por Avise *et al.* (1987). En ese estudio, hormigas de localidades cercanas presentaron poblaciones genéticamente divergentes (4,5 % de divergencia nucleotídica), sugiriendo la presencia de una barrera al flujo génico no evidente (categoría I). Por otra parte, hormigas de localidades relativamente lejanas, presentaron baja divergencia genética (0,6 % de divergencia nucleotídica) (categoría II). Es decir que dependiendo de las localidades y las circunstancias específicas del área se pueden obtener diferentes resultados en cuanto a los análisis poblacionales mitocondriales.

Por otra parte, en cuanto al análisis de los ES se encontró que los porcentajes de infección de las cuatro bacterias analizadas (*Arsenophonus*, *Cardinium*, *Rickettsia* y *Wolbachia*) en la hormiga cortadora *A. cephalotes* fueron muy bajos tanto en la región pacífica como en la amazónica. La infección por parte de *Wolbachia* sólo alcanzó una frecuencia de infección del 1,3 %. No obstante, este resultado aunque es concordante con lo reportado por Frost *et al.* (2010) quienes encontraron una infección al 4 %; contrasta con el estudio de Van Borm *et al.* (2001) quienes reportan frecuencias de infección por *Wolbachia* en *A. cephalotes* superiores a 45 %. Asimismo, se ha observado que en *Acromyrmex*, un género hermano de *Atta*, los por-

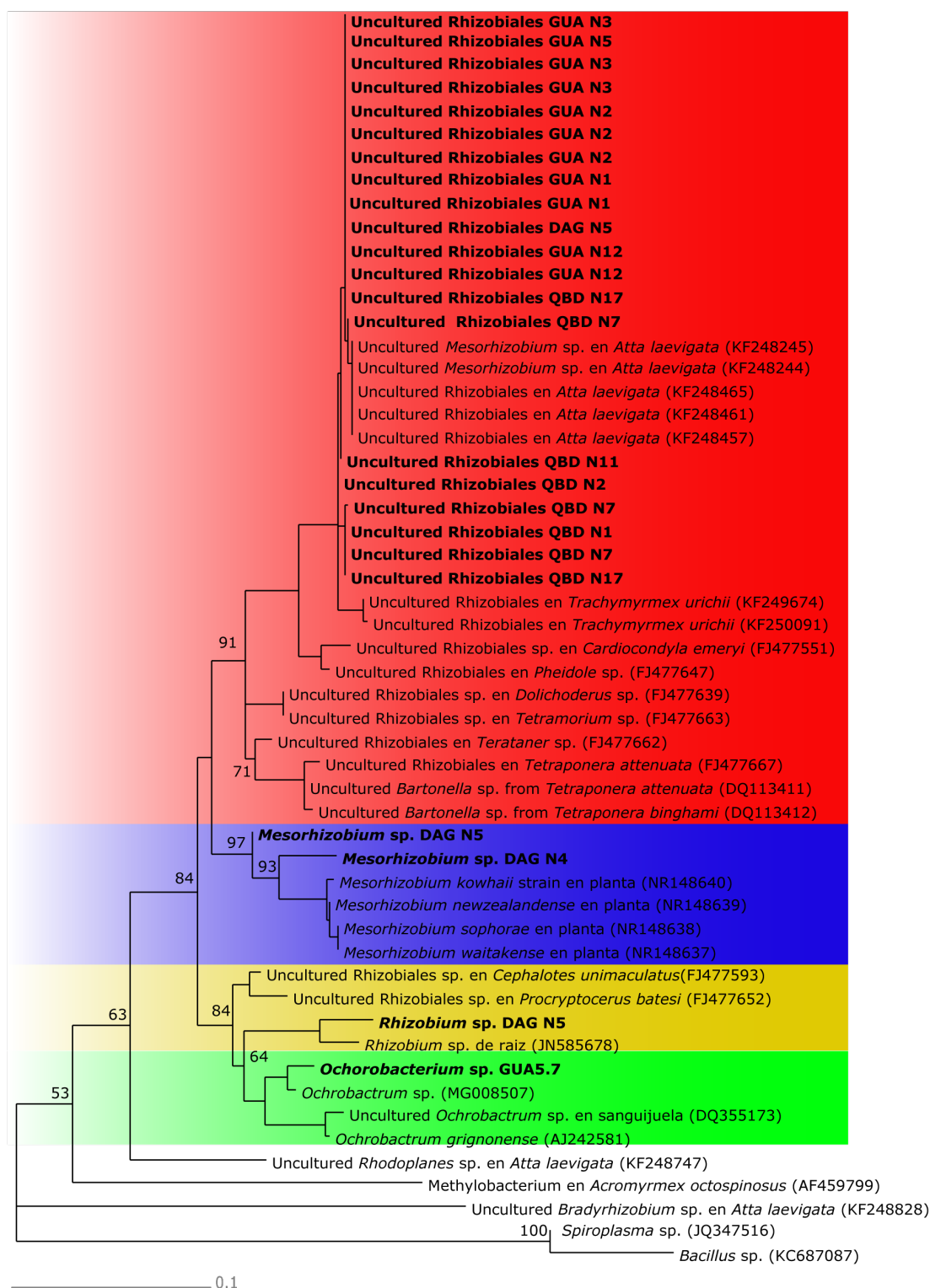


Figura 3. Árbol filogenético del gen 16S del orden Rhizobiales mediante el método de máxima verosimilitud. Los taxones en negrilla corresponden a los hallados en este estudio. Las palabras GUA, DAG y QBD indican que las muestras fueron recolectadas en Guapi, Dagua y Quibdó respectivamente. Los números junto a N indican a que nidos pertenecen las muestras. Las secuencias obtenidas del GenBank tienen sus correspondientes números de acceso en paréntesis.

Tabla 4. Parámetros polimórficos y prueba de neutralidad Tajima's D de *A. cephalotes*.

Región	Localidad	S	h	π	Hd	Tajima's D
Pacífica	Dagua	13	3	0,015	0,667	0,4379
	Guapi	13	4	0,144	0,800	0,2026
	Quibdó	2	3	0,0026	0,622	0,8302
Amazónica	Apaporis	4	2	0,0064	0,533	1,1806
	Arrendajo	11	3	0,0012	0,711	0,2309
	Ozcimi	6	4	0,0085	0,800	1,4113
	Taraira	5	3	0,0074	0,711	1,6368

centajes de infección por esta bacteria pueden llegar a 100 % (Frost *et al.*, 2010). Es interesante notar que las diferencias de infección entre especies de géneros hermanos oscilan entre aquellas propensas a la infección (como *Acromyrmex*), pasando por aquellas hasta casi refractarias (Frost *et al.*, 2010; este estudio).

Asimismo, a pesar de que la amplificación de *Wolbachia* fue positiva en algunos de los individuos analizados, las secuencias obtenidas tuvieron muy baja resolución, lo cual podría ser evidencia de que estas hormigas están infectadas por más de una cepa de la bacteria. Este resultado concuerda con la doble infección registrada por Van Borm *et al.* (2001) en *A. cephalotes* de Gamboa, Panamá y Van Born *et al.* (2003) en *Acromyrmex*. Hasta el momento se sugiere que la múltiple infección por bacterias en los insectos es producto de la transmisión horizontal de las cepas (Van Meer and Stouthamer, 1999; Werren *et al.*, 1995). Dado que *Wolbachia* únicamente sobrevive dentro de las células, se ha propuesto que el parasitismo cruzado estaría contribuyendo en la infección de insectos no cercanos filogenéticamente (Heath *et al.*, 1999).

Es difícil encontrar una única explicación a los contrastantes porcentajes de infección por *Wolbachia* entre *Atta* y *Acromyrmex*. A continuación, se enumeran otras posibles explicaciones. (1) *Acromyrmex* es el género más propenso a la infección debido a que las reinas en los estados iniciales de formación de los nidos salen a forrajear, lo que aumenta la probabilidad de ser parasitada y, por consiguiente, ser infectada por endosimbiontes secundarias. *Atta* por su parte presenta una estrategia de fundación de nido tipo claustral (Frost *et al.*, 2010). (2) Es probable que *Atta* presente un mecanismo de limpieza de la infección más eficiente que en *Acromyrmex*. Factores como la regresión de los ovarios en las obreras, la exposición al altas temperatura y el contacto con antibióticos naturales pueden influenciar en la pérdida de infección (Van Borm *et al.*, 2001).

De hecho, dicha pérdida de infección se espera que sea adaptativo no solo para el huésped, sino también para *Wolbachia*, ya que el simbionte no se transmite a través de trabajadoras estériles. (3) Es probable que las cepas de *Wolbachia* que infectan *Atta* tengan tasas de transmisión vertical muy bajas, como se ha demostrado en otros insectos (Kassem and Osman, 2007; Narita *et al.*, 2007).

En cuanto a la bacteria *Arsenophonus*, no se detectó infección en las muestras analizadas por PCR convencional. Este resultado coincide con la ausencia de infección reportada por Russell *et al.* (2012) en los géneros de las hormigas de la tribu Attini *Apterostigma*, *Atta*, *Trachymyrmex jamaicensis*, *Cyphomyrmex* y *Sericomyrmex*. Esos investigadores al realizar una revisión de los documentos disponibles y que evaluaban el estado de infección de *Arsenophonus* en 733 artrópodos encontraron que los principales órdenes de insectos reportados para la infección son Hemiptera, Hymenoptera y Diptera, siendo más del 50 % de las especies del primer orden reportadas con infección. Además, se presume que su transmisión sea horizontal, dado el hallazgo de infección de cepas relacionadas en insectos filogenéticamente distantes, como en este estudio.

Por otra parte, el endosimbionte secundario *Cardinium* no fue detectado en ninguno de los individuos analizados en este estudio. Este resultado concuerda con lo reportado por Wang *et al.* (2016), quienes al analizar el estado de infección por *Cardinium* en 56 especies de hormigas de las subfamilias Formicinae, Myrmicinae, Dolichoderinae y Ponerine no detectaron la bacteria en ninguno de los ejemplares. Sirviö and Pamilo (2010) fueron los primeros investigadores en reportar *Cardinium* en hormigas, con una frecuencia de infección de 3,8 % en poblaciones de *Formica cinerea*. Se presume que la transmisión de la bacteria por vía horizontal se ha llevado a cabo a través de parasitoides, hallándose cepas relacionadas filogenéticamente de *Cardinium* en hospederos así mismo filogenéticamente cercanos (Zchori-Fein and Perlman, 2009).

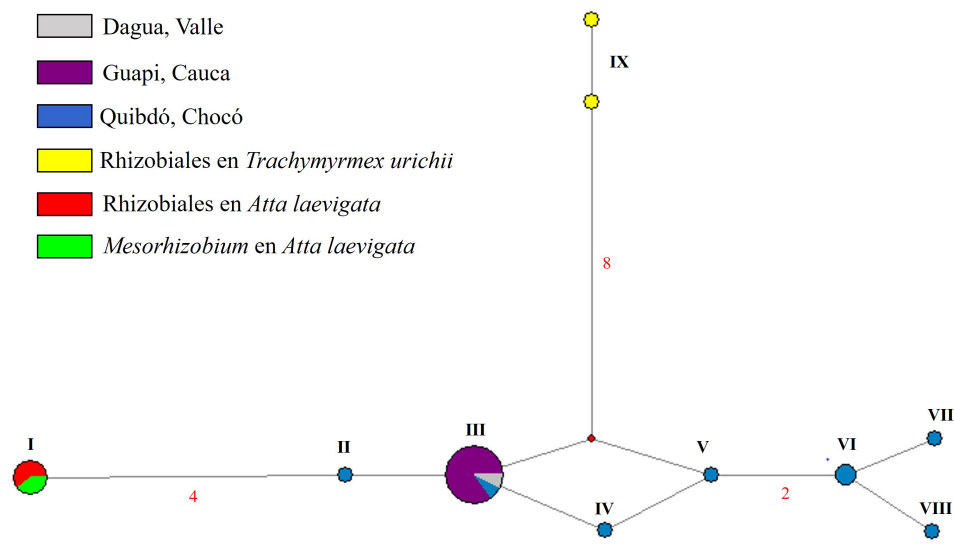


Figura 4. Árbol de haplotipo del gen 16S del orden Rhizobiales. Los números rojos entre los haplotipos son el número de cambios. Las ramas que no tienen número indican que los haplotipos difieren en una única posición.

La infección por *Rickettsia* tampoco fue positiva en la especie *A. cephalotes*. Es probable que no amplificara el gen 16S de esta bacteria dado que la transmisión horizontal en las cepas que infectan a los insectos se ha reportado por ser nula (Weinert *et al.*, 2009). Se sabe únicamente de la transmisión horizontal de cepas patógenas en vertebrados a través de artrópodos hematófagos como ácaros y garrapatas (Weinert *et al.*, 2009). El conocimiento de esta bacteria aún es incipiente, a pesar de que se han comprobado los efectos en el fitness del hospedero, se desconoce el porcentaje de infección dentro de los artrópodos y no se tienen estudios dentro de la familia Formicidae.

En cuanto a los análisis realizados por medio de la técnica de PCR anidada usando los cebadores para *Arsenophonus*, se obtuvieron secuencias pertenecientes en su mayoría, a bacterias del orden Rhizobiales. Lo anterior evidencia, como ya había sido reportado por (Jousselin *et al.* 2013; Mediannikov *et al.* 2012), que los cebadores para *Arsenophonus* no son específicos para esta bacteria.

Las bacterias del orden Rhizobiales son micror-

ganismos que se caracterizan por presentarse en simbiosis con animales, plantas o vivir en ambientes abióticos y por ser fijadores de nitrógeno atmosférico a través de los genes *NiFH* (Spaink *et al.*, 1998). Se estima que la frecuencia de infección de estas bacterias en hormigas, como lo registraron Russell *et al.* (2009), sea superior al 5 %, alcanzado en algunas especies infección hasta del 100 % de los adultos. Por tanto, se propone que estas bacterias estarían interviniendo en la nutrición metabólica de las especies dado que se ha reportado los genes *NiFH* en cepas que infectan hormigas de los géneros *Acromyrmex* (Sapountzis *et al.*, 2015), *Pheidole* sp (Russell *et al.*, 2009), *Cephalotes* (Anderson *et al.*, 2012), *Echinopla*, *Dolichoderus* y *Tetraponera* (Stoll *et al.*, 2007).

Al realizar la reconstrucción filogenética (Figura 4) se evidencia la presencia de un clado de Rhizobiales que infecta especies únicamente de hormigas. Este resultado coincide también con el clado específico de Rhizobiales en hormigas reportado por Marchiori (2013) y Russell *et al.*, (2009), en donde se incluyen, a parte de algunos hospederos aquí reportados, bacterias encontradas

en *Cataulacus*, *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Acromyrmex coronatus*, *Cyphomyrmex auritus*, *A. texana*, *A. capiguara*, *A. cephalotes* y *A. colombica*. Dada la similitud de las secuencias obtenidas con el haplotipo de *Mesorhizobium* en *A. laevigata*, se especula que las bacterias que infectan a *A. cephalotes* son microorganismos de ese género que aún no se han descrito. Es posible que esta hormiga presente cepas diferentes a las reportadas en las demás, esto teniendo en cuenta que los haplotipos aquí reportados fueron hallados únicamente en esa especie. Por tanto, es importante diseñar cebadores específicos que permitan conocer la frecuencia de infección en la especie y evaluar su posición taxonómica con respecto a las demás bacterias del orden.

Por otra parte, dado que las bacterias *Mesorhizobium* sp., *Rhizobium* sp. y *Ochrobactrum* sp. encontrados en la hormiga forman clados con bacterias encontradas en plantas, otros animales o en ambientes abióticos, se presume que la infección fue adquirida través de la interacción de la hormiga con el ambiente. Al igual que la infección por las bacterias *Aliihoaeflea aestuarii*, *Rosenbergiella*, *Rheinheimera texasensis* y *Sinorhizobium*, quienes no han sido reportados en infectar insectos.

Por último, los artículos que han reportado el barrido selectivo en los insectos influenciados por *Wolbachia* indican valores de diversidad nucleotídica inferiores a 0,003, diversidad haplotípica inferior a 0,5 y además valores negativos en pruebas de neutralidad (Raychoudhury *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta lo anterior, se descarta la posibilidad de barrido selectivo en el gen COI en las poblaciones aquí estudiadas dado que se encontraron valores superiores a los mencionados en los parámetros polimórficos y positivos en la prueba de neutralidad. Precisamente, un valor significativamente menor que cero en la prueba de neutralidad indica un número de variantes de baja frecuencia mayor al esperado, que puede ser causado por un barrido selectivo reciente (influenciado por endosimbiontes) o expansión de la población o

selección contra mutaciones débilmente deletéreas (Shoemaker *et al.*, 2004; Tajima, 1989), mientras que un valor significativamente mayor que cero, significa bajos niveles de polimorfismos de baja y alta frecuencia, lo que indica una disminución en el tamaño de la población o una selección estabilizadora (Simonsen *et al.*, 1995).

En síntesis, este es el primer trabajo en evaluar la frecuencia de infección de las bacterias *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Rickettsia* y *Wolbachia* en poblaciones de *A. cephalotes* en Colombia. Es probable que estas bacterias no han intervenido en la ruta evolutiva de la hormiga al no hallarse frecuencias de infección en la mayoría de los individuos y, por tanto, es poco probable que estén involucradas en parte del éxito evolutivo de la especie. Se reporta por primera vez la bacteria *Arsenophonus* dentro del grupo Attini, la doble infección de parte por *Wolbachia* en la hormiga y el estado de infección de bacterias aun no descritas del orden Rhizobiales. Se sugiere realizar más estudios que permitan discriminar las secuencias del gen *wsp* y reconstruir filogenias con el objetivo de comprobar la transmisión horizontal de las cepas. Se abre la posibilidad de evaluar la frecuencia de infección de las bacterias Rhizobiales que infectan la hormiga y analizar su posible función metabólica dentro de los organismos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad del Valle por la financiación del proyecto CI:71067 y al grupo de simbioses de insectos sociales coordinado por el profesor James Montoya por permitirme trabajar en él. Gracias al profesor Guillermo Barreto por la disposición de su laboratorio para realizar este estudio. Por la colaboración en el laboratorio agradezco a Andrea López, Diana Urcuqui, Juan Sebastián Gómez, Carolina Saavedra, Jessica Mendoza, Juan Felipe Lopez y Alexander Ramírez. Por último, no menos importante, a mi familia, por permitirme llegar a última instancia en mi formación.

LITERATURA CITADA

- Anderson, K. E., Russell, J. A., Moreau, C. S., Kautz, S., Sullam, K. E., Hu, Y., Basinger, U., Mott, B. M., Buck, N. and Wheeler, D. E. (2012), 'Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species', *Molecular Ecology*, Vol. 21(9), pp. 2282–2296.
- Armbruster, P., Damsky, W. E., Giordano, R., Birungi, J., Munstermann, L. E. and Conn, J. E. (2003), 'Infection of New- and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: implications for host mitochondrial DNA evolution', *Journal of Medical Entomology*, Vol. 40(3), pp. 356–360.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. and Saunders, N.C.

- (1987), 'Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics', *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 18, pp. 489-522.
- Bandelt H. J., Forster P. and Röhl A. (1999), 'Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies', *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 16, pp. 37-48
- Baudry E., Bartos J., Emerson K., Whitworth T. and Werren J.H. (2003), '*Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*', *Molecular Ecology*, Vol. 12(7), pp. 1843-1854.
- Brelsfoard, C. L. and Dobson S. L. (2011), '*Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae)', *Journal of Medical Entomology*, Vol. 48(5), pp.1008-1015.
- Baumann, L. and Baumann, P. (2005), 'Cospeciation between the primary endosymbionts of mealybugs and their hosts', *Current Microbiology*, Vol. 50(2), pp. 84-87.
- Brumin, M., Kontsedalov, S. and Ghanim, M. (2011), '*Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype', *Insect Science*, Vol. 18(1), pp. 57-66.
- Currie, C.R., Bot, A.N. and Boomsma, J.J. (2003), 'Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites', *Oikos*, Vol. 101, pp. 91-102.
- Chacón de Ulloa, P (2003), 'Hormigas urbanas' en Fernandez, F (Ed.) *Introducción a las hormigas de la región neotropical*, Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia, pp. 3.
- Charlat, S., Duploux, A., Hornett, E. A., Dyson, E. A., Davies, N., Roderick, G. K. and Hurst, G. D. (2009), 'The joint evolutionary histories of *Wolbachia* and mitochondria in *Hypolimnas bolina*', *BMC Evolutionary Biology*, Vol. 9(1), pp. 1.
- Dale, C. and Moran, N. A. (2006), 'Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts', *Cell*, Vol. 126(3), pp. 453-465.
- Darby, A. C., Choi, J. H., Wilkes, T., Hughes, M. A., Werren, J. H., Hurst, G. D. D., and Colbourne, J. K. (2010), 'Characteristics of the genome of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of the wasp *Nasonia*', *Insect Molecular Biology*, Vol. 19, pp. 75-89.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S. S. S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstadter, J., and Hurst, G. D. (2008), 'The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone', *BMC Biology*, Vol. 6, pp. 27.
- Fernández, F., Castro-Huertas, V., and Serna, F. (2015), *Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: Acromyrmex & Atta (Hymenoptera: Formicidae)*, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Fry, A. J., Palmer, M. R. and Rand, D. M. (2004), 'Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*', *Heredity*, Vol. 93(4), pp. 379-389.
- Frost, C. L., Fernández-Marín, H., Smith, J. E. and Hughes, W. O. H. (2010), 'Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants', *Molecular Ecology*, Vol. 19(18), pp. 4077-4085.
- Giraldo, C. (2009), *Microbiota asociada a la casta obrera de hormiga arriera Atta cephalotes (Hymenoptera: Myrmicinae)*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, Universidad del Valle, Cali.
- Grijalva, O. and Giraldo, G. I. (2006), 'Simbiosis bacteriana en insectos', *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, Vol. 7(2), pp. 24-40.
- Gottlieb, Y., Ghanim, M., Gueguen, G., Kontsedalov, S., Vavre, F., Fleury, F. and Zchori-Fein, E. (2008), 'Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies', *The FASEB Journal*, Vol. 22(7), pp. 2591-2599.
- Gotoh, T., Noda, H. and Ito, S. (2007), '*Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites', *Heredity*, Vol. 98(1), pp. 13-20.
- Hagimori, T., Abe, Y., Date, S. and Miura, K. (2006), 'The first finding of a *Rickettsia* bacterium associated with parthenogenesis induction among insects', *Current Microbiology*, Vol. 52(2), pp. 97-101.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard, J. R. (2003), 'Biological identifications through DNA barcodes', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 270(1512), pp. 313-321.

- Himler, A. G., Adachi-Hagimori, T., Bergen, J. E., Kozuch, A., Kelly, S. E., Tabashnik, B. E., Chiel, E., Duckworth, V. E., Dennehy, T. J., Zchori-Fein, E. and Hunter, M. S. (2011), 'Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias', *Science*, Vol. 332(6026), pp. 254-256.
- Holldobler B. and Wilson E.O. (2011), *The leafcutter ants. Civilization by instinct*, WW Norton, Nueva York, Estados Unidos.
- Hunter, M. S., Perlman, S. J. and Kelly, S. E. (2003), 'A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*', *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, Vol. 270(1529), pp. 2185-2190.
- Jackel, R., Mora, D. and Dobler, S. (2013), 'Evidence for selective sweeps by *Wolbachia* infections: Phylogeny of *Altica* leaf beetles and their reproductive parasites', *Molecular Ecology*, Vol. 22(16), pp. 4241-4255.
- Jousselin, E., Cœur D'Acier, A., Vanlerberghe-Masutti, F., and Duron, O. (2013), 'Evolution and diversity of *Arsenophonus* endosymbionts in aphids', *Molecular Ecology*, Vol. 22(1), pp. 260-270.
- Jiggins, F. M. (2003), 'Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics', *Genetics*, Vol. 164(1), pp. 5-12.
- Kageyama, D., Narita, S., and Watanabe, M. (2012), 'Insect sex determination manipulated by their endosymbionts: Incidences, mechanisms and implications', *Insects*, Vol. 3(1), pp.161-199.
- Kassem H.A. and Osman G. (2007,) 'Maternal transmission of *Wolbachia* in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli)', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Vol. 101, pp. 435-440.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016), 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular biology and evolution*, Vol. 33(7), pp. 1870-1874.
- Lawson, E. T., Mousseau, T. A., Klapera, R., Hunter, M. D. and Werren, J. H. (2001), '*Rickettsia* associated with male-killing in a Buprestid Beetle', *Genetics*, Vol. 86, pp. 497-505.
- Lovato, L. (2006), *Estudos Morfológicos e análises de sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I em populações de Atta cephalotes*. Tesis de maestría, Universidade Federal do Paraná.
- Marchiori, A. C. (2013), *Diversidade e evolução na simbiose entre bactérias e formigas Attini*, Tesis de doctorado, Universidade Estadual Estatal Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'.
- Martins, J.J. (2006), *Evolução de genes e pseudogenes mitocondriais em Atta cephalotes (Linnaeus, 1758)*. Tesis de maestría, Universidad Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'.
- Marsh, S.E., Poulsen, M., Gorosito, N.B., Pinto-Tomás, A., Masiulionis, V.E. and Currie, C.R. (2013), 'Association between *Pseudonocardia* symbionts and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods', *International Microbiology*, Vol. 16, pp. 17-25.
- Mediannikov, O., Subramanian, G., Sekeyova, Z., Bell-Sakyi, L. and Raoult, D. (2012), 'Isolation of *Arsenophonus nasoniae* from *Ixodes ricinus* ticks in Slovakia', *Ticks and Tick-borne Diseases. Elsevier.*, Vol. 3(5-6), pp. 367-370.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., and Calle, Z. (2012), 'Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control', *International Journal of Pest Management*, Vol. 58, pp. 225-247.
- Moser, J. C. (1967), 'Mating activities of *Atta texana* (Hymenoptera, Formicidae)', *Insectes Sociaux*, Vol. 14 (3), pp. 293-312.
- Narita S., Nomura M. and Kageyama D. (2007), 'Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain', *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 61, pp. 235-245.
- Mueller U.G., Schultz T.R., Currie C.R., Adams R.M.M. and Malloch D. (2001), 'The origin of the attine ant fungusmutualism', *The Quarterly Review of Biology*, Vol. 76, pp.169-197.
- Oliver, K. M., Moran, N. A. and Hunter, M. S. (2005), 'Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102(36), pp. 12795-12800.
- Raychoudhury, R., Grillenberger, B. K., Gadau, J., Bijlsma, R., van de Zande, L., Werren, J. H. and Beukeboom, L. W. (2010), 'Phylogeography of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera) indicates a mitochondrial-*Wolbachia* sweep in North America', *Heredity*, Vol. 104(3), pp. 318-326.

- Rosenblueth, M., Sayavedra, L., Sámano-Sánchez, H., Roth, A. and Martínez-Romero, E. (2012), 'Evolutionary relationships of flavobacterial and enterobacterial endosymbionts with their scale insect hosts (Hemiptera: Coccoidea)', *Journal of Evolutionary Biology*, Vol. 25(11), pp. 2357-2368.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. and Sánchez-Gracia, A. (2017), 'DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism analysis of large Datasets', *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 34, pp. 3299-3302.
- Russell, J. A., Moreau, Corrie, S. Goldman-Huertas, B., Fujiwara, M., Lohman, D. J. and Pierce, N. E. (2009), 'Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 106(50), pp. 21236-21241.
- Russell, J. A., Funaro, Colin F. Giraldo, Y. M., Goldman-Huertas, B., Suh, D., Kronauer, D. J. C., Moreau, C. S. and Pierce, N. E. (2012), 'A Veritable Menagerie of Heritable Bacteria from Ants, Butterflies, and Beyond: Broad Molecular Surveys and a Systematic Review', *PLoS ONE*, Vol. 7(12).
- Sapountzis, P., Sapountzis, P., Zhukova, M., Hansen, L. H., Sorensen, S. J., Schiott, M. and Boomsma, J.J. (2015), 'Acromyrmex leaf-cutting ants have simple gut microbiota with nitrogen-fixing potential', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 81(16), pp. 5527-5537.
- Spaink, P., Kondorosi, A. and Hooykaas, J. J. P. (1998), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, Springer Science, Oegstgeest, Holanda.
- Simonsen K.L., Churchill G.A. and Aquadro C.F. (1995), 'Properties of Statistical Tests of Neutrality for DNA Polymorphism Data', *Genetics*, Vol. 141(1) pp. 413-429
- Sirviö, A. and Pamilo, P., (2010), 'Multiple endosymbionts in populations of the ant *Formica cinerea*', *BMC Evolutionary Biology*, Vol. 10, pp. 335.
- Shoemaker, D. D., Dyer, K. A., Ahrens, M., McAbee, K. and Jaenike, J. (2004), 'Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection', *Genetics*, Vol. 168(4), pp. 2049-2058.
- Stoll, S., Gadau, J., Gross, R and Feldhaar, H. (2007), 'Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*', *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 90(3), pp. 399-412,
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A., and Hurst, G.D. (1999), '*Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction', *Annual Review of Microbiology*, Vol. 53, pp. 71-102.
- Tagami, Y., Miura, K. and Stouthamer, R. (2001), 'How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*?', *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 78(4), pp. 267-271.
- Tajima F. (1989), 'The effect of change in population size on DNA polymorphism', *Genetics*, Vol. 123(3), pp. 597-601.
- Van Borm, S., Wenseleers, T., Billen, J. and Boomsma, J. J. (2001), '*Wolbachia* in leafcutter ants: A widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings', *Journal of Evolutionary Biology*, Vol. 14(5), pp. 805-814.
- Van Borm, S., Wenseleers, T., Billen, J. and Boomsma, J. J. (2003), 'Cloning and sequencing of *wsp* encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex* leafcutter ants', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 26(1), pp. 102-109.
- Van Meer, M.M. and Stouthamer, R. (1999) 'Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae)', *Heredity*, Vol. 82, pp. 163-169.
- Von der Schulenburg, J. H. G., Habig, M., Sloggett, J. J., Webberley, K. M., Bertrand, D., Hurst, G. D. D. and Majerus, M. E. N. (2001), 'Incidence of male killing *Rickettsia* spp. (alpha proteobacteria) in the ten spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera?: Coccinellidae)', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67(1), pp. 270-277.
- Wang, L., Jiang, J., Xu, Y., Zeng, L. and Lu, Y. (2016), 'Occurrence of three intracellular symbionts (*Wolbachia*, *Arsenophonus*, *Cardinium*) among ants in southern China', *Journal of Asia-Pacific Entomology. Elsevier B.V.*, Vol. 19(4), pp. 981-988.
- Weber, N.A. (1972), *Gardening Ants, the Attines*, Phyladelphia: Americal Philosophical Society.

- Weeks, A. R., Marec, F. and Breeuwer, J. A. J. (2001), 'A mite species that consists entirely of haploid females', *Science*, Vol. 292, 2479-2482.
- Weeks, A. R., Velten, R. and Stouthamer, R. (2003), 'Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* /, Vol. 270(1526), pp. 1857-1865.
- Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N. and Jiggins, F.M. (2009), 'Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria', *BMC Biology*, Vol. 7, pp. 1-15.
- Werren, J. H., Hurst, G. D. D., Zhang, W., Breeuwer, J. A. J., Stouthamer, R. and Majerus, M. E. N. (1994), 'Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*)', *Journal of Bacteriology*, Vol. 176(2), pp. 388-394.
- Werren, J.H., Zhang, W. and Guo, L.R. (1995), 'Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 261, pp. 55-63.
- Wilson, A. C. C. and Duncan, R. P. (2015), 'Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 112(33), pp. 10255-10261.
- Xiao, J. H., Wang, N. X., Murphy, R. W., Cook, J., Jia, L. Y. and Huang, D. W. (2012), 'Wolbachia infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp', *Evolution*, Vol. 66(6), pp. 1907-1916.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S. E., Brown, J. K., Wilson, J. M., Karr, T. L. and Hunter, M. S. (2001), 'A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 98(22), pp. 12555-12560.
- Zchori-Fein, E. and Perlman, S. (2009), 'Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods?', *Molecular Ecology*, Vol. 13, pp. 2009-2016.
- Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill, S. (1998) 'Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences', *Proceedings of the Royal Society of United States of America B: Biological Sciences*, Vol. 265(1395), pp. 509-515.
- Zug, R., and Hammerstein, P. (2012), 'Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected', *PLoS ONE*, Vol. 7(6), pp. 7-9.