

Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniosis

.....

Amplification and sequencing of mitochondrial rRNA from *Lutzomyia* spp. vectors of leishmaniosis

.....

Sandra Uribe¹
Charles Porter²
Iván Darío Vélez¹

Resumen

Recientes investigaciones han señalado el ADN mitocondrial como herramienta importante en estudios de entomología molecular que incluyen no sólo la identificación de especies sino también el establecimiento de relaciones filogenéticas y evolutivas en insectos. En el presente estudio se amplificó y secuenció exitosamente un fragmento de 380 pb de la subunidad larga ribosomal mitocondrial en *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia gomezi* vectores de leishmaniosis, como paso preliminar hacia el conocimiento y obtención de secuencias con uso potencial en estudios taxonómicos y filogenéticos en estos insectos. Los oligonucleótidos usados para la amplificación por técnicas de reacción de polimerasa en cadena PCR, fueron diseñados con base en las regiones conservadas de insectos cuyas secuencias para esta región de ADN mitocondrial han sido previamente publicadas. Las secuencias obtenidas fueron ricas en adenina y timina (81%) una característica común en ADN mitocondrial de insectos y los alineamientos múltiples no presentaron ambigüedades características de ADN nuclear. Comparaciones preliminares entre las secuencias obtenidas sugieren la utilidad de esta región como caracter taxonómico para *Lutzomyia* a nivel de especie.

Palabras claves: *Lutzomyia* spp., PCR, ADN mitocondrial, Secuencias.

Summary

Recent investigations have been suggested mitochondrial DNA as important tool in molecular entomology studies that include not only species identification, but also establishment of phylogenetic and evolutive relationships among insects.

In this work we amplified and sequenced a fragment of 380 pb from the mitochondrial ribosomal large subunit; this preliminary work was done in order to obtain sequences with potential use as taxonomic character in sand flies. Primers used for PCR amplification and DNA sequencing were designed based on the consensus sequence of insects previously reported for this region. A bias toward adenine and thymine (81%) is consistent with the base composition of mtDNA sequences of other insects. Multiple alignment among sequences did not show ambiguities characteristic of nuclear DNA and preliminary comparisons suggest their utility as taxonomic character at the species level.

Key words: Sandfly, PCR, Mitochondrial DNA, Sequences.

Introducción

Los flebotomíneos, (Diptera:Psychodidae) de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* son los insectos transmisores de leishmaniosis en el viejo y nuevo mundo respectivamente (Ashford *et al.* 1992). Esta enfermedad, potencialmente fatal causada por el parásito protozoo del género *Leishmania*, ha recibido recientemente especial atención por el creciente número de casos diagnosticados y el aumento en la población de riesgo (Ashford *et al.* 1992; Mutebi *et al.* 1998).

Los estudios epidemiológicos y de control de la enfermedad requieren la identificación de la o las especies vectoras; sin embargo, este trabajo, basado generalmente en caracteres morfológicos, se dificulta por el pequeño ta-

maño de estos insectos y los procedimientos necesarios para la observación de estructuras internas importantes como las espermatecas de las hembras, que requieren aclaración y montaje de los especímenes. Adicionalmente, muchos de los caracteres morfológicos diagnósticos de especie se encuentran presentes en un solo sexo (Young y Duncan 1994).

La existencia de especies isomórficas y complejos de especies en flebotomíneos ha sido sugerida mediante estudios isoenzimáticos y por algunas técnicas de entomología molecular como amplificación al azar de fragmentos de ADN usando PCR (Lanzaro y Warburg 1995); tales estudios han señalado la necesidad de implementar nuevas estrategias que permitan identificar las especies que conforman los complejos y que podrían diferir en aspectos como la capacidad vectorial, lo cual traería importantes implicaciones en la transmisión de la enfermedad (Lanzaro y Warburg 1995).

Así mismo y de acuerdo con los principales estudiosos de la taxonomía de estos pequeños dípteros de la familia Psychodidae, los esquemas de clasificación y la interpretación de los mismos deben ser constantemente reexaminados y la inclusión de nuevos caracteres taxonómicos -además de los morfológicos- es necesaria para la determinación de las relaciones taxonómicas y filogenéticas, un aspecto poco estudiado y entendido hasta ahora (Young y Duncan 1994).

El ADN mitocondrial, por su herencia materna y su relativa tasa de cambio rápida, se constituye en una herramienta importante de la entomología molecular que permite su utilización en estudios taxonómicos aumentando el número de caracteres disponibles para tales estudios y solucionando dificultades de la taxonomía clásica (Beard *et al.* 1993). La subunidad larga ribosomal, del ADN mitocondrial ha sido ampliamente estudiada en insectos de los órdenes Diptera, Orthoptera e Hymenoptera y su utilidad ha sido probada a diferentes niveles (Flook y Rowell 1997).

En el presente estudio se amplificó y secuenció exitosamente un fragmento de 380 pb obtenido a partir de *Lutzomyia longipalpis* vector de leishmaniosis visceral y *Lutzomyia gomezi* vector de leishmaniosis cutánea en Latinoamérica, usando unos oligonucleótidos diseñados con base en las secuencias publicadas de insectos como *Anopheles quadrimaculatus*, *Apis mellifera* y *Drosophila melanogaster*; dado que éste es un estudio preliminar, cuyo objetivo principal constituyó la búsqueda de oligonucleótidos adecuados para la amplificación exitosa por técnicas de PCR e identificación de secuencias de uso potencial en estudios de taxonomía y filogenética de *Lutzomyia* spp. no se incluyen análisis detallados de sistemática molecular.

1 I.A. Ms.C (Ph.D candidate), Estudiante de doctorado PECET-CDC Atlanta y MD.Tropicalista Ms.C., Ph.D. coordinador PECET respectivamente. A.A.1226 Medellín, Antioquia

2 Biólogo Ph.D. Investigador en Entomología, Center for Diseases Control CDC, Atlanta GA.30341, USA.

Materiales y Métodos

Especímenes de *Lutzomyia* spp. Las secuencias fueron obtenidas de 18 especímenes de *Lutzomyia*, de los cuales 16 correspondían a *L. longipalpis* y 2 a *L. gomezi*.

Los especímenes estudiados de *L. longipalpis* provenían de Colombia y de otros países que permitieron observar la variabilidad de las secuencias respecto a la distribución geográfica. La tabla 1 muestra la procedencia de los ejemplares de *L. longipalpis* y *L. gomezi* utilizados en el estudio.

Aislamiento y amplificación de ADN por técnicas de PCR. Los especímenes fueron criopreservados o mantenidos en isopropanol al 100%. Para la extracción de ADN solo se utilizaron machos cuyas terminalias fueron previamente removidas y aclaradas en medio Hoyer's para verificar la identidad de la especie usando las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994). El ADN fue aislado de especímenes individuales por el método de Collins y Porter (1990); tres especímenes se utilizaron por cada localidad para *L. longipalpis* con excepción de Guatemala de donde solo un ejemplar fue disponible y dos para *L. gomezi*.

El fragmento de 380 pb fue amplificado usando los oligonucleótidos LRJ12966 (AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA A) y LRN13393 (C (G/A)C CTG TTT AAC AAA AAC AT) diseñados y construidos en el Center for Diseases Control (Atlanta, Georgia) con base en la secuencia consensus de dos regiones altamente conservadas del gen de la unidad larga ribosomal mitocondrial de seis especies de invertebrados depositados en el banco de genes (Gen Bank). Las especies elegidas para diseñar los primers y los números de identificación en el banco de genes son las siguientes: *Anopheles gambiae* (L20934), *Anopheles quadrimaculatus* (LO4272), *Apis mellifera* (LO6178), *Drosophila melanogaster* (U37541) y *Locustus migratoria* (X80245).

Después de una fase inicial de desnaturalización del ADN a 94 °C, durante tres minutos, los parámetros de amplificación para los siguientes 35 ciclos de PCR fueron: desnaturalización por un minuto a 93°C, alineamiento por un minuto a 50° C y extensión 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.

El ADN amplificado fue purificado usando Wizard PCR preps (Promega) para productos de PCR. Los productos de PCR fueron secuenciados directamente en ambos sentidos de la doble cadena usando un secuenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer) y analizadas con el paquete GCG (Genetics Computer Group). Las secuencias fueron edi-

Tabla 1. Procedencia de los especímenes de *Lutzomyia* spp. utilizados para la extracción y amplificación de ADN

Especie	País	Departamento y/o Estado	Localidad -vereda	Fuente
<i>L. longipalpis</i>	Colombia	Cundinamarca Santander	El Callejón Girón-palo gordo	Cristina Ferro Victor Angulo
	Brazil	Ceará Minas Gerais	Sobral	Robert Tesh Robert Tesh
	Venezuela	Trujillo	El Batatillo	José V. Scorza
	Guatemala	El Progreso		Nidia Rizo
<i>L. gomezi</i>	Colombia	Antioquia	Montebello	Sandra Uribe

tadas usando el programa Sequencing Navigator (Perkin Elmer) comparando las secuencias en ambos sentidos de la doble cadena para cada espécimen y posteriormente alineadas por el programa pileUp de GCG. La variabilidad haplotípica, la composición en términos de nucleótidos y el porcentaje de transiciones-transversiones entre las secuencias fueron igualmente determinadas.

Resultados

Amplificación de ADN mediante PCR. La figura 1 muestra la amplificación exitosa del fragmento de 380 pb de algunos de los especímenes visualizada en un gel de agarosa al 1 %; el tamaño de la banda fue determinado por comparación con el marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega) que aparece en las líneas extremas de la fotografía del gel. La

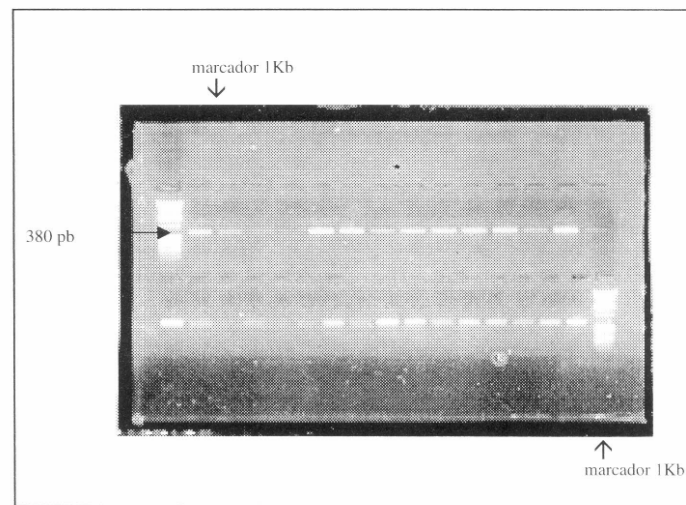


Figura 1. Verificación de la amplificación de mt lrrRNA en gel de agarosa 1%.

Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular 1Kb (promega). Los otros carriles corresponden a productos amplificados por PCR y/o purificación (línea inferior) en *L. longipalpis* de diferentes localidades y *L. gomezi*. C1: *L. longipalpis* El Callejón (Cundinamarca), C2: El Callejón espécimen 2, C3: El Callejón espécimen 3, C4: Girón (Santander), C5: Girón (Santander) espécimen 2, C6: Girón (Santander) espécimen 3, C7: Minas gerais (Brazil), C8: Minas gerais (Brazil), espécimen 2, C9: Minas gerais (Brazil), espécimen 3, C10: Sobral ceará (Brazil) C11: Sobral ceará (Brazil), espécimen 2, C12 : Sobral ceará (Brazil), espécimen 3, C13: Tulumajillo (El Progreso, Guatemala) C14: Trujillo (Venezuela), C15: Trujillo (Venezuela), espécimen 2, C16 :Trujillo (Venezuela), espécimen 3, C18: *L. gomezi* (Montebello), C20: *L. gomezi* (Montebello) espécimen 2. Los carriles C21-C230 corresponden a los productos de PCR purificados de los productos de PCR visualizados en los carriles C1-C10.

identidad del fragmento fué corroborada posteriormente al comparar las secuencias con la secuencia referencia de *Anopheles gambiae* (Beard *et al.* 1993).

Secuencias. Las secuencias obtenidas para *Lutzomyia* corresponden a las posiciones 12904 - 13284 de la secuencia referencia de *Anopheles gambiae* y la homología entre ellas fué de 80 % para *L. gomezi* y 79.8 % para *L. longipalpis*.

La composición de las bases fué similar en todas las secuencias de *Lutzomyia*, las cuales aparecen en la figura 2, las proporciones de las bases variaron entre 36.8-41% para timina, 38.6-41.5 para adenina, 5.5-8.8 para guanina y 9.4-10.8 para citosina.

Los porcentajes promedio de cada una de las bases fueron:

A: 42%, T: 39%, G: 8%, y C: 11%. Altas proporciones de adenina-timina (81%) en total son consistentes con la composición de estos nucleótidos encontrada en secuencias de ADN mitocondrial en otros insectos (Simond *et al.* 1994).

En el alineamiento múltiple de pileUp bajo GCG (Fig. 3) se observaron 14 haplotipos entre las 18 secuencias. Un haplotipo es definido en la vía usual, es decir, como una secuencia única de ADN mitocondrial que puede distinguirse de cualquier otra secuencia homóloga por lo menos por una sustitución nucleotídica. Los haplotipos comunes en dos o más individuos fueron encontrados solo en *Lutzomyia* de la misma especie (*L. gomezi*) y de la misma localidad, (*L. longipalpis* de Trujillo, Venezuela) y ningún haplotipo fue compartido por las dos especies. El alineamiento múltiple de las secuencias resultó en 380 caracteres incluyendo tres deleciones en las posiciones 43, 123 y 353 en las secuencias de *L. longipalpis* en relación con las de *L. gomezi*; igualmente, una deleción adicional fue observada en la posición 163 del alineamiento para las secuencias de *L. longipalpis*, Brazil Minas Gerais, El Progreso, y Guatemala en relación con las otras secuencias de *L. longipalpis*. De los 380 caracteres, 58 (15%) fueron variables entre las secuencias; el porcentaje de las Transversiones -cambios de purina por pirimidina y viceversa- fué mayor que las transiciones -cambios de purina por purina y/o pirimidina por pirimidina- (70% y 30% respectivamente) y la mayoría de las transversiones fueron A-T (55%), algo comúnmente observado en secuencias de ADN ribosomal mitocondrial en insectos (Nigro y Grapputo 1993).

Al comparar las secuencias entre *L. gomezi* y *L. longipalpis* se encontraron 58 sitios polimórficos incluyendo las deleciones previamente descritas, mientras que entre *L.*

longipalpis de los diferentes países sólo se observaron 16 sitios polimórficos. Entre *L. longipalpis* de una misma localidad se presentaron variaciones puntuales entre especímenes como los de Girón (Santander), donde se observaron cambios de G por T, C por T, A por T y G por A en las posiciones 16, 143, 256 y 367, respectivamente.

Variaciones puntuales como éstas son frecuentemente observadas entre insectos de la misma especie, en particular cuando los especímenes estudiados provienen del campo (Besanski *et al.* 1997).

Algunas diferencias encontradas entre *L. longipalpis* de diferentes localidades en un mismo país permitieron separar las *Lutzomyia* provenientes de estas localidades por inspección visual del alineamiento, como en el caso de Minas Gerais, Sobral Ceará en Brazil y otras; sin embargo, estas variaciones fueron pocas; uno a tres sitios polimórficos.

El hecho de que el alineamiento de las secuencias obtenidas directamente de productos de PCR no revelara ambigüedades características de heteroplasma dentro o entre las dos especies, sugiere que los segmentos secuenciados corresponden a ADN mitocondrial y no a copias nucleares (Besanski *et al.* 1997).

La comparación con secuencias homólogas previamente estudiadas en otros insectos y en especial con *Anopheles gambiae* confirma la identidad de las secuencias y la utilidad de los oligonucleótidos usados en este estudio para amplificar mtRNA en *Lutzomyia* spp.

Discusión

En este estudio se presentan las secuencias de un fragmento de 380 pb de la unidad larga ribosomal mitocondrial en *L. longipalpis* y *L. gomezi* vectores de leishmaniosis. Regiones homólogas han sido amplificadas y secuenciadas en otros dípteros, pero no en flebotómicos (Lanzaro y Warburg 1995; Essegir *et al.* 1997). Las únicas secuencias de ADN mitocondrial publicadas hasta la fecha en la familia Psychodidae corresponden a fragmentos de los genes Citocromo B y NADH1 obtenidos a partir de insectos pertenecientes al género *Phlebotomus* -transmisor de leishmaniosis en el viejo mundo- de las especies *papatasi*, *bergeroti*, *dubosqui* y otras del Mediterráneo (Essegir *et al.* 1997).

Numerosos estudios han mostrado que el ADN mitocondrial de insectos posee una proporción alta en adenina y timina y las *Lutzomyia* incluídas en este estudio no fueron la excepción con un promedio de de 81% entre las 18 secuencias; sin embargo, este valor aparece alto, cuando se compara con las secuencias de regiones homólogas de insectos estudiados hasta la fecha (ver tabla 2 en Simond *et al.* 1994).

Por ejemplo, la región homóloga en 32 especies de cucarachas mostró un promedio de 72% en A-T (Kambhupati 1995) y para miembros de la familia Cicadellidae, Fang *et al.* (1993) encontraron un promedio de 73 % de A-T valores más bajos que el encontrado en el presente estudio.

En el caso de *Anopheles gambiae* el contenido de A-T observado fue de 80% en casi la totalidad del gen con aproximadamente 1150 pares de bases (Beard *et al.* 1993).

Igualmente, estudios similares en fragmentos más largos de la unidad larga ribosomal mitocondrial en insectos de las familias Aphididae (Hymenoptera), y Lachnidae (Homoptera), revelaron un contenido de A-T de aproximadamente 75% (Kambhupati datos no publicados).

En cuanto a las sustituciones nucleotídicas, el promedio de la tasa de transiciones de 30% entre *Lutzomyia*, observado en este estudio, es considerablemente mayor que el encontrado en otros insectos como termitas y cucarachas de 8 y 7 % respectivamente (Kambhupati 1995); mientras que en cucarachas la tasa de transición C-T fué dos veces más frecuente que la de A-G, en *Lutzomyia* al igual que en termitas la proporción en los cuatro tipos de transiciones fué relativamente igual (Kambhupati *et al.* 1996).

La tasa de transversiones de 70% fue más alta que la encontrada en otros insectos, sin embargo, el porcentaje en las transversiones A-T fue menor respecto al de cucarachas y similar al de termitas (Kambhupati 1995; Kambhupati *et al.* 1996).

La variabilidad en las sustituciones nucleotídicas confirma la existencia de diferencias en la dinámica evolutiva del gen 16S rRNA entre grupos de insectos propuesta por Kambhupati *et al.* (1996).

La variación en el contenido de A-T en secuencias de ADN mitocondrial en insectos ha sido previamente demostrada y ha sido particularmente estudiada en Hymenoptera, donde la cantidad de A-T alcanza extremas proporciones (Crozier y Crozier 1989; Dietrich *et al.* 1997).

Investigaciones previas sugieren que las fluctuaciones en la composición de nucleótidos son consecuencia directa del tipo de evolución de DNA mitocondrial en insectos y que los efectos potencialmente adversos de esta variación en la taxonomía y reconstrucción filogenética deben ser considerados, por lo tanto, estudios basados en secuencias como las de Hymenoptera y *Lutzomyia* descritas en este trabajo con altos contenidos de A-T deben contemplar este aspecto en el análisis estadístico (Flook y Rowell 1997).

<p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Callejón, Cundinamarca, Colombia. Especimen 1</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 AATTAAACT TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Callejón, Cundinamarca, Colombia. Especimen 2.</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 AATTAAACT TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Callejón, Cundinamarca, Colombia. Especimen 3.</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 AATTAAACT TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Giron, Santander, Colombia. Especimen 1</p> <p>1 COCTAAGATA ACTTAACCTT ATAACTAATA TTAATGGATC AAAATTTCAA 51 TTAATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG 101 CCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Giron, Santander, Colombia. Especimen 2</p> <p>1 AACTTAAGTC TATAATCAAT ATTAATGGAT CAAAATTTCA ATTATAATG 51 TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG CAATATAATA 101 CCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Giron, Santander, Colombia. Especimen 3</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Sobral, Ceara, Brazil. Especimen 1</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Sobral, Ceara, Brazil. Especimen 2</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Sobral, Ceara, Brazil. Especimen 3</p> <p>1 CTAAGTATC TTAACCTTAT AATCAATATA AATGATGCAA AATTCCAAT 51 AATATATATG ACATAAATA AAAATTTAATA AATTTTATAT ATTACCCCAA 101 TATAATATAA AATATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTATTAC 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p>	<p><i>L. longipalpis</i> mt rRNA Minas Gerais, Brazil. Especimen 1</p> <p>1 TTAATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG 101 AATATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG 151 ATATATTTTA TATAAAGATC TAGAGGGTCT TCTCGTCTT TTTTTTAT 201 TTAATCATT TTTATAAATA AAAAATTTA TTTAATAAAA TTAAGACAGC 251 TAAATATTC GTCCATCATC TCATTCATG TTTCAATTA AAAACTAATG 301 AATATGCTAC TTTGTCAGAC TTAATATAC TGCGCCCTTT AATTAATCAG 351 TGGGAGATP AAOCTTAAA TAAACTCAA AAAGACA</p> <p><i>L. longipalpis</i> mt rRNA Minas Gerais, Brazil. Especimen 2</p> <p>1 COCTAAGATA ACTTAACCTT ATAACTAATA TTAATGGATC AAAATTTCAA 51 TTAATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG 101 AATATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTATTAC 151 ATATATTTTA TATAAAGATC TAGAGGGTCT TCTCGTCTT TTTTTTAT 201 TTAATCATT TTTATAAATA AAAAATTTA TTTAATAAAA TTAAGACAGC 251 TAAATATTC GTCCATCATC TCATTCATG TTTCAATTA AAAACTAATG 301 AATATGCTAC TTTGTCAGAC TTAATATAC TGCGCCCTTT AATTAATCAG 351 TGGGAGATP AAOCTTAAA TAAACTCAA AAAGACA</p> <p><i>L. longipalpis</i> mt rRNA Minas Gerais, Brazil. Especimen 3</p> <p>1 COCTAAGATA ACTTAACCTT ATAACTAATA TTAATGGATC AAAATTTCAA 51 TTAATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG 101 AATATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTATTAC 151 ATATATTTTA TATAAAGATC TAGAGGGTCT TCTCGTCTT TTTTTTAT 201 TTAATCATT TTTATAAATA AAAAATTTA TTTAATAAAA TTAAGACAGC 251 TAAATATTC GTCCATCATC TCATTCATG TTTCAATTA AAAACTAATG 301 AATATGCTAC TTTGTCAGAC TTAATATAC TGCGCCCTTT AATTAATCAG 351 TGGGAGATP AAOCTTAAA TAAACTCAA AAAGACA</p> <p><i>L. longipalpis</i> mt rRNA. Sobral, Ceara, Brazil. Especimen 1</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Sobral, Ceara, Brazil. Especimen 2</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Sobral, Ceara, Brazil. Especimen 3</p> <p>1 TATCCCTAAA GTAACCTAAC TTTATATATCA ATATTATATGG ATCAAATTTT 51 CAATTATATAT TGTTTTATATA AAAATAAAAT TTATAAAATTT TTATTATTAC 101 CCCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p>	<p><i>L. longipalpis</i> mt rRNA. Tulumajillo, Depto. El Progreso, Guatemala. Especimen 1</p> <p>1 CCCTAAGATA AGTAACTT ATAACTAATA TTAATGGATC AAAATTTCAA 51 TTAATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG 101 AATATATATG TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTATTAC 151 ATATATTTTA TATAAAGATC TAGAGGGTCT TCTCGTCTT TTTTTTAT 201 TTAATCATT TTTATAAATA AAAAATTTA TTTAATAAAA TTAAGACAGC 251 TAAATATTC GTCCATCATC TCATTCATG TTTCAATTA AAAACTAATG 301 AATATGCTAC TTTGTCAGAC TTAATATAC TGCGCCCTTT AATTAATCAG 351 TGGGAGATP AAOCTTAAA TAAACTCAA AAAGACA</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Trujillo, Venezuela. Especimen 1</p> <p>1 AACTTAACCT TATAATCAAT ATTAATGGAT CAAAATTTCA ATTATAATG 51 TTTATAAATA AAAAATTTA TAAATTTTA TTATTACCCG CAATATAATA 101 CCAATATAA TATATAATA ATTAATAAAAT AATATTATAC TAATTTTTAT 151 TTAATCATT TTTATATAAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTTTTTTT 201 TTAATTAATG TTTAATATAA AAAATAAAAT TTTATTTAAA TAATATAAAG 251 ACAGTAATAA TTTGGTCCAA TCATTCATTC TAGCTTTCAA TTAATAAACT 301 AATGATTATG CTACCTTTGC ACAGTATAATA TACTGGGGCC CTTTAATTTT 351 ATCAGTGGGC AGATTAACCT TTAATAAATA TCAAAAAGAC A</p> <p><i>L. longipalpis</i>. mt rRNA. Trujillo, Venezuela. Especimen 2</p> <p>1 CTTGTTATCC TAAAGTACT TACTTTATA ATCAATATTA ATGGATCAA 51 ATTCACCTTA TACTTTATA TAAATAATA AAAATTTTA AATTTTATA AATTTTATA 101 TACCCCAATA ATATATAT ATAAATTTA AAAATTTTA AATTTTATA AATTTTATA 151 TTAATTAATG ACTTTTATA TAAAGATCA TAGGGCTTC TCGTCTTTT 201 TTTTATTTA TTTTATTTA TTTAATAATA TTTAATAATA TTTAATAATA 251 AAGACAGTA ATATTTGG CCAATCATC ATTCACCTT TCAATTTAAA 301 AATATATG TACTTACT TGCACAGT AATTAATG TGCCCTTTA 351 TTTATGCT GGCATTTA AACTTATAA AACTTAAA AAAGACA</p> <p><i>L. longipalpis</i> mt rRNA. Trujillo, Venezuela. Especimen 3</p> <p>1 GTTACCTTA AAGTACTTA ACTTTTATA CAATATTAAT GGATCAAAT 51 TCAATATA ATGTTTATA AAAAATAAA AATTTTATA AATTTTATA AATTTTATA 101 ACCCAATA TATATATA TAAATAATA ATAAATTA ACTAATTTT 151 ATTAATCACT TTTTATATA AAGATATA GGGCTCTTC GCTTTTTTT 201 TTTATTTA CTTTATAT AAAAATAA AATTTTATA AATTTTATA AATTTTATA 251 AAGACAGTA TTTTGGCC AATCATTA AATTTTATA AATTTTATA AATTTTATA 301 ATATGATA TGCTACTT CACAGTTA AATTTTATA AATTTTATA AATTTTATA 351 TATGCTGG CAGTAAAT CCAATATAA AACTTAAA AAAGACA</p> <p><i>L. gomezi</i> mt rRNA. Montebello Antioquia. Colombia. Especimen 1</p> <p>1 GTGTAAGTC CTAATCAAGT ATTAATGGAT CATTGTAAC AATTATAAT 51 GAATATAAA AATAAATTT TATAAATTT TATTATACC CCAATATAAT 101 ATATCACTA ATTAATAAT AATATAATC TATTTTTAT TATTTATG 151 TGTATATAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTATCT CATTTAAC 201 TTTAATATA AATTAATTT TTTATTTAA TAAATAAAG ACAGTAATA 251 TTTATCCAA TCATTTAAT TTTATTTAA TTAATAAAG AATGATTATG 301 CTACCTTGC ACAGTATAA TACTGGGCC CTTTAATAA TTAGTGGGC 351 AGATTAGCT TTAATTTAA TCTTAAAGA CA</p> <p><i>L. gomezi</i> mt rRNA. Montebello Antioquia. Colombia. Especimen 2</p> <p>1 GTGTAAGTC CTAATCAAGT ATTAATGGAT CATTGTAAC AATTATAAT 51 GAATATAAA AATAAATTT TATAAATTT TATTATACC CCAATATAAT 101 ATATCACTA ATTAATAAT AATATAATC TATTTTTAT TATTTATG 151 TGTATATAA GATCTATAGG GCTCTCTCGT CTTTATCT CATTTAAC 201 TTTAATATA AATTAATTT TTTATTTAA TAAATAAAG ACAGTAATA 251 TTTATCCAA TCATTTAAT TTTATTTAA TTAATAAAG AATGATTATG 301 CTACCTTGC ACAGTATAA TACTGGGCC CTTTAATAA TTAGTGGGC 351 AGATTAGCT TTAATTTAA TCTTAAAGA CA</p>
--	---	---

Figura 2. Secuencias del fragmento de la unidad larga ribosomal obtenidas a partir de especímenes de *L. longipalpis* y *L. gomezi* nótese la composición nucleotídica con altas proporciones de A. T.

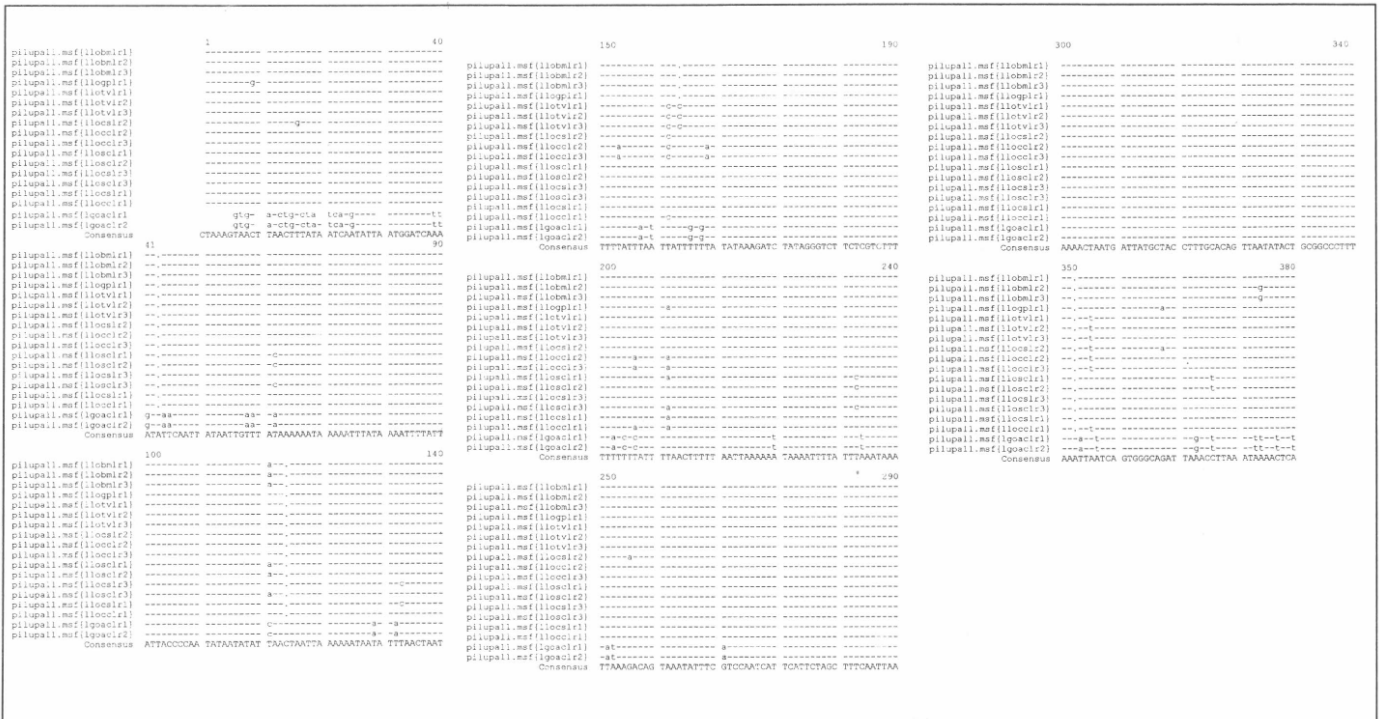


Figura 3. Alineamiento múltiple de las secuencias de mt rRNA bajo PileUp programa GCG (Genetic Computer Group) para *L. longipalpis* y *L. gomezi*. Ilo BM: *L. longipalpis* Brazil Minas Gerais; Ilogp: Guatemala; Ilotv: Venezuela, Trujillo; Ilocc: Colombia, Santander; Ilosc: Colombia, Cundinamarca; Ilosc: Brazil, Sobral Ceará; Igo: *L. gomezi* Antioquia; r1: espécimen 1; r2: espécimen 2; r3 espécimen 3.

La gran cantidad de A-T presente en ADN mitocondrial de insectos ha sido explicada asumiendo que por razones desconocidas existe un fenómeno evolutivo que hace que las enzimas involucradas en la transcripción y replicación de ADN rico en A-T han evolucionado para hacer este proceso más efectivo que en el caso de G-C; (Wolstenholme y Clary 1985; Crozier *et al.* 1989). Adicionalmente, se ha propuesto la conversión de pares de GC hacia AT mediante alquilación (Watson *et al.* 1987), ya que, al parecer, en insectos existen cantidades grandes de agentes alquilantes endógenos producidos en la mitocondria la cual es además ineficiente en importar la maquinaria de reparación para combatir las mutaciones resultantes de metilación (Beard *et al.* 1993).

El número de diferencias en términos de nucleótidos a nivel de especie entre *L. gomezi* y *L. longipalpis* encontradas en las secuencias de la unidad larga ribosomal es considerablemente mayor que el encontrado entre *L. longipalpis* de los diferentes países (58 y 16 respectivamente), lo cual sugiere la utilidad potencial de este fragmento para diferenciar especies en *Lutzomyia*; sin embargo, por el número pequeño de especies e individuos incluidos en este trabajo este aspecto deberá ser verificado cuidadosamente en estudios posteriores, ya que este gen ha sido utilizado para estudiar relaciones filogenéticas en insectos a diferentes niveles de divergencia desde subespecies y poblaciones (De Salle *et al.* 1992; Fang *et al.* 1993; Nigro y Grapputo 1993; Vogler y De Salle 1993; Xion y Kocher 1991) hasta niveles más profundos como especies, familias y órdenes (Derr *et al.* 1992; Carmean *et al.* 1992; Funk *et al.* 1995; Kambhupati 1995; Flook y Rowell 1997).

Finalmente, es importante considerar que a pesar del desarrollo reciente de la metodología molecular para el estudio de insectos, la identificación y el aislamiento de secuencias útiles a determinados niveles de divergencia, continúa siendo problemático (Doolittle *et al.* 1996); en el análisis de secuencias de ADN nucleares por ejemplo, aspectos como la determinación de la homología de las secuencias y los alineamientos múltiples son complicados y ya que las secuencias de ADN mitocondrial presentan menos problemas en este sentido se consideran en la actualidad como excelentes candidatos. Con base en la homología, el fácil alineamiento e interpretación de las secuencias y los polimorfismos encontrados, en el presente estudio se propone el fragmento secuenciado de la unidad larga ribosomal como de uso potencial en estudios taxonómicos y moleculares de *Lutzomyia spp.*; no obstante, su utilidad a diferentes niveles debe aún ser precisada.

Conclusiones

- Los oligonucleótidos LRJ 2966 y LRN 13393, diseñados con base en las secuencias de insectos como *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Anopheles quadrimaculatus* y *Locusta migratoria* y las condiciones de PCR descritas en la metodología, permiten amplificar exitosamente un fragmento de 380 pb de la unidad larga ribosomal mitocondrial gen 16SrRNA en *L. gomezi* y *L. longipalpis*.
- Las secuencias de la unidad larga ribosomal obtenidas de *Lutzomyia* poseen una alta proporción de A-T (81%) y un porcentaje de transiciones-transversiones similares a los descritos para regiones homólogas en otros insectos.
- La amplificación y obtención de las secuencias de la unidad larga ribosomal mitocondrial a partir de *Lutzomyia spp* permite disponer de caracteres moleculares como herramienta para resolver los problemas de complejos de especies y especies morfológicamente indistinguibles.
- El polimorfismo de las secuencias en términos de nucleótidos a nivel intra e inter específico, observado en los alineamientos múltiples, sugiere la utilidad de este fragmento como criterio taxonómico a nivel de especie para especies del género *Lutzomyia*; sin embargo, el nivel de utilidad de estas secuencias deberá ser examinado en estudios posteriores que incluyan mayor número de especies y especímenes.
- La estandarización de técnicas de PCR y la obtención de secuencias de ADN a partir de insectos de importancia agrícola o médica como *Lutzomyia spp* en este caso, constituyen un avance en el desarrollo de áreas tan importantes como la sistemática molecular de insectos en Colombia

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a COLCIENCIAS y la Universidad de Antioquia CODI por la beca y cofinanciación que permitieron el desplazamiento de Sandra Uribe al Center for Diseases Control en Atlanta Georgia y la realización exitosa de este trabajo.

Bibliografía

- ASFORD, R. W.; DESJEUX, D.; DE RAADT, P. 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitology today* 8: 104-105
- BEARD, B. C.; MILLS, H. D.; COLLINS, F. M. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparison with

- mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology* 2: 103-124.
- BESANSKY, N. J.; LEHMANN, T.; FAHEY, T.; FONTENILLE, D.; BRAACK, L.; HAWLEY, W.; COLLINS, H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African Malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* suggest extensive gene flow. *Genetics* 147: 1817-1828.
- CARMEAN, D.; KISMEY, K. S.; BERBEI, M. L. 1992. 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Mol. Phylogenetic Evol* 1: 270-278.
- COLINS, F. H.; PORTER, C. 1990. Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles herms*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42: 417-423.
- CROZIER, R. H.; CROZIER, Y. C.; MOCKINLEY, A. G. 1989. The COI and COII region on honey bee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol. Biology, Evol* 6: 399-341.
- DERR, J. N.; DAVIS, S. K.; WOOLEY, J. B.; CUHARTON, R. A. 1992. Reassessment of the 16S rRNA nucleotide sequences from members of the parasitic Hymenoptera. *Mol. Phylogenetic, Evol* 1: 338-341.
- DE SALLE, R.; GATE, S. Y.; WHEELER, W.; GRIMALDI, D. 1992. DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257: 1933-1936.
- DIETRICH, C. H.; WHIT, COMB, R. F.; BLACK IV, W. C. 1997. Phylogeny of the grassland leafhopper genus *flexamia* (Homoptera: Cicadellidae), based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenetics, Evol* 8 (2): 139-149.
- DOOLITTLE, R. F.; FENG, D. F.; TSANG, S.; CHO, G.; LITTLE, E. 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organism with a protein clock. *Science* 271: 470-472.
- ESSEGHIR, S.; READY, P. D.; KILLICK-KENDRICK, R.; ISMAIL, B. R. 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of phlebotomus vectors of *Leishmania major* Insect Molecular Biology 6: (3): 211-225.
- FANG, Q.; BLACK IV, W. C.; BLOCKER, H. D.; AND WHITCOMB, R. L. 1993. A phylogeny of new world *Deltoccephalus*-like leaf hopper genera based on mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Med. Phylogenetic, 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. Phylogenetics, Evol* 8 (2): 177-192.
- FUNK, D.; FUTUMA, D. O.; MEYER, A. 1995. Mitochondrial DNA sequences and multiple data

- set: A phylogenetic study of phytofagus beetles (Chrysomelidae : Ophraella). *Mol. Biol. Evol.* 12: 627-680.
- KAMBHAMPATI, S. 1995. A Phylogeny of coccinellids and related insects based on DNA sequences of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2017-2020.
- KAMBHAMPATI S, KJER KM, THORNE BL. 1996. Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Insect. Mol. Biol.* 5(4):229-238.
- LANZARO, G. C.; WARBURG, A. 1995. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implication for leishmaniasis epidemiology. *Parasitology Today* 11: 151-154.
- MUTEBI, J. P.; ROWTON, E.; HERRERO, M.; PONCE, C.; BELL, A.; VALLE, S.; LANZARO, G. 1998. Genetic variability among populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Central America. *Journal of medical Entomology* 35: 170-174.
- 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 primers. *Ann. Entomol. Soc. AM* 87: 651-701.
- NIGRO, L.; GRAPUTO, A. 1993. Evolution of the mitochondrial rRNA in the oriental species subgroup of *Drosophila*. *Biochem. Syst. Evol.* 21: 79-83.
- VOGLER, A. P.; DE SALLE, R. 1993. Phylogeographic patterns in North American tiger beetles, *Cicindela dorsalis*, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 47: 1192-1202.
- WATSON, J. D.; HOPKINS, N. H.; ROBERTS, J. W.; STEITZ, J. A.; WEINER, A. M. 1987. Molecular biology of the gene. 1: 346-347.
- WOLSTENHOLME, D. R.; MACFARLANE, J. L.; OKIMOTO, R.; CLARY, D. O.; WAHLEITHNER, J. S. 1987. Bizarre tRNA inferred from DNA sequences of mitochondrial genome of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1324-1328.
- XIONG, B.; KOCHER, T. D. 1991. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* 34:306-311.
- YOUNG, G.; DUNCAN, M. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *I yll* :880.