

Detección molecular de depredación
de *Hypothenemus hampei* (coleoptera:
curculionidae) por *Wasmannia auropunctata*
(hymenoptera: formicidae)

Predation molecular detection on
Hypothenemus hampei (coleoptera:
curculionidae) by *Wasmannia auropunctata*
(hymenoptera: formicidae)

Detección molecular de depredação
de *Hypothenemus hampei* (coleoptera:
curculionidae) por *Wasmannia auropunctata*
(hymenoptera: formicidae)

ELISABETH JIMÉNEZ-CARMONA¹, INGE ARMBRECHT², RODRIGO QUINTERO³,
JAMES MONTOYA-LERMA⁴, LUIS MIGUEL CONSTANTINO⁵

Recibido para evaluación: 22 de Octubre de 2017.

Aprobado para publicación: 29 de Noviembre de 2018.

- 1 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). PhD. Cali, Colombia.
- 2 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). PhD. Cali, Colombia.
- 3 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). Biólogo. Cali, Colombia.
- 4 Universidad del Valle, Dpto. de Biología, Grupo de Ecología de agroecosistemas y hábitats naturales (GEAHNA). PhD. Cali, Colombia.
- 5 CENICAFE, dpto. de Entomología. Msc. Chinchiná Colombia.

Correspondencia: inge.armbrecht@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Se conoce poco sobre redes tróficas implicando hormigas que depredan broca del café. Con el objetivo de evaluar la interacción depredador-presa usando análisis molecular se usó dicha tecnología para identificar la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en el contenido estomacal de la hormiga *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). Colonias artificiales de *W. auropunctata* fueron alimentadas en condiciones de laboratorio con broca, mientras los controles fueron alimentadas con presas distintas. Se observó amplificación de los tres cebadores en el 96,59% de las muestras de las hormigas con consumo de broca, sin embargo la amplificación también se presentó en el 83,72% de las muestras sin consumo, detectando la unión de los cebadores evaluados a sitios inespecíficos de las hormigas control. Se encontró que los cebadores no fueron específicos para broca. Diferentes estudios argumentan que el ADN del depredador puede presentarse en exceso en comparación al ADN de la presa y, en consecuencia, las secuencias menos concentradas de la presa a menudo no amplifican y los cebadores tienden a unirse a regiones inespecíficas del ADN del depredador, generando falsos positivos. Se concluye que el análisis molecular representa una herramienta adicional para detectar depredación en este sistema pero que aún requiere mayor especificidad.

ABSTRACT

There is a small knowledge about trophic webs implying ants that predate coffee berry borer. With the objective of evaluating the predator-prey interaction using molecular analysis, this technology was used to identify the coffee berry borer (CBB) (*Hypothenemus hampei*) in the gut contents of the ant *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). Artificial colonies of *W. auropunctata* were fed under laboratory conditions with CBB, while controls were fed with a different prey. Amplification of the three primers was observed in 96,59% of the ant samples with CBB consumption, however the amplification was also present in 83,72% of the samples without consumption, which means that the primers attached to non-specific sites of control ants. We found that the primers were not specific to the CBB. Various studies argue that DNA from predator may be in excess compared to DNA from the prey and, as a consequence, less concentrated sequences of prey often do not amplify and primers tend to bind to non-specific regions of the predator DNA, generating false positives. It is concluded that the molecular analysis represents an additional tool to detect predation on this system but still requires to be more specific.

RESUMO

Pouco se sabe sobre redes tróficas que implicam formigas que depredam a broca do cafeiro. Com o objetivo de avaliar a interação predador-presa utilizando o análise molecular, a referida tecnologia foi utilizada para identificar a broca do café (*Hypothenemus hampei*) no conteúdo estomacal da formiga *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae). As colônias artificiais de *W. auropunctata* foram alimentadas em condições laboratoriais com broca, enquanto os controles foram alimentados com diferentes presas. A am-

PALABRAS CLAVE:

Enemigos naturales, Control biológico, Plaga del café.

KEY WORDS:

Natural enemies, Biological control, Coffee pest.

PALAVRAS CHAVE:

Inimigos naturais, Controle biológico, Praga do cafeiro.

plificação dos três iniciadores foi observada em 96,59% das amostras de formigas com consumo de broca, no entanto, a amplificação também estava presente em 83,72% das amostras sem consumo, detetando a ligação dos iniciadores avaliados para locais não específicos de formigas controle. Descobrimos que os iniciadores não eram específicos da broca. Diferentes estudos argumentam que o DNA predador pode estar em excesso em comparação com o DNA da presa e, como consequência, as sequências de presas menos concentradas geralmente não amplificam e os iniciadores tendem a se ligar a regiões não específicas de o DNA do predador, gerando falsos positivos. Conclui-se que a análise molecular representa uma ferramenta adicional para detectar predação neste sistema, mas ainda requer ser mais específica.

INTRODUCCIÓN

Las hormigas han sido reportadas como enemigos naturales de una gran variedad de artrópodos. Ellas tienen el potencial de ejercer una presión significativa sobre sus presas herbívoras, ya que exhiben una amplia gama de preferencias alimentarias y, debido a su comportamiento y carácter social, pueden consumir especies de todos los tamaños [1,2]. Su ubicuidad en áreas urbanas, boscosas y agrícolas, junto con sus hábitos alimenticios diversos, sugiere que sus patrones de consumo podrían tener efectos importantes para la dinámica de la red alimentaria. Además, varias especies de hormigas son depredadoras importantes de plagas agrícolas tropicales tan diversas como la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) [7], y de otras plagas como la mosca de la fruta oriental *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

(Diptera: Tephritidae) en cítricos [3] y sobre ninfas de *Idioscopus nitidulus* (Walker) (Hemiptera: Cicadellidae) en mango [8]. Sin embargo, sus interacciones dentro de las redes alimenticias de muchos otros sistemas siguen siendo poco claras. Para caracterizar mejor el impacto de las hormigas como depredadores, es necesario mapear la estructura de sus redes alimenticias y establecer patrones generales de consumo. Los métodos utilizados para caracterizar las redes alimenticias de las hormigas han sido a menudo aproximados y vagos. Los ensayos visuales de forrajeo de hormigas presentan una extrema dificultad en su ejecución, especialmente en las especies forra-

jas nocturnas, y proporcionan estimaciones relativamente poco confiables de la depredación.

El análisis molecular del contenido estomacal, un método *post-mortem* de identificación de enlaces tróficos, es altamente sensible a la identificación de ADN específico de presa dentro del estómago de los depredadores [4] y podría ser una excelente herramienta para identificar los vínculos tróficos y estimar los patrones de depredación de las hormigas sobre especies claves de presas como *Hypotenemus hampei*.

Para la broca del café, estudios anteriores han utilizado el análisis molecular del contenido intestinal de varios insectos depredadores como *Karnyothrips flavipes* Jones (Thysanoptera: Phlaeothripidae),

Cathartus quadricollis (Guér.) (Coleoptera: Silvanidae) y *Leptophloeus* sp. (Coleoptera: Laemophloeidae) confirmando el papel depredador de estos insectos en granos de café brocados [5]. Los cebadores del gen COI específicos de especie diseñados para *H. hampei* demostraron tener un alto grado de especificidad para ADN de broca y no produjeron ningún producto de PCR a partir de ADN molde de otros insectos asociados a los agroecosistemas de café [9]. Igualmente, mediante ensayos de alimentación en laboratorio, Jaramillo y colegas [9] demostraron que un fragmento de 185 pb de ADN de COI de *H. hampei* podría permanecer intacto durante un máximo de 30 h en el tracto digestivo de *K. flavipes*. Finalmente, en muestreos de campo los autores encontraron que, en total, 3.327 *K. flavipes* emergieron de 17.792 frutos infestados con *H. hampei* recogidos entre abril y septiembre de 2008. A lo largo de la temporada, el 8,3% de *K. flavipes* dio positivo para ADN de *H. hampei*, aunque a veces esta cifra se acercó al 50%. Estos resultados revelaron que la disponibilidad de las presas se correlacionó significativamente con el consumo de éstas, lo que indica el impacto potencial sobre las poblaciones de *H. hampei*. Con los anteriores antecedentes y dado que varias especies de hormigas han sido encontradas depredando la broca, el presente estudio evaluó la especificidad de un par de cebadores del gen mtCOI para identificar broca del café haciendo un análisis molecular del contenido intestinal de hormigas alimentadas con broca empleando el método propuesto en la literatura.

MÉTODO

Establecimiento y selección de las hormigas depredadoras en laboratorio

Se realizó un análisis exploratorio para determinar cuáles géneros de hormigas eran los más abundantes en el campo y los más apropiados para criar en laboratorio y con mayor potencial depredador. Para esto se establecieron colonias artificiales usando cajas plásticas con: *Crematogaster montezumia*, *C. nigropilosa*, *C. curvispinosa*, *C. erecta*, *C. crinosa*, *Linepithema* sp., *Tapinoma* sp., *Nesomyrmex asper*, *Nylanderia* sp., *Pheidole* sp., *Wasmannia auropunctata* y *Solenopsis stricta* y *Monomorium floricola*, recolectadas en cafetales del Cauca y Chinchiná (Caldas). Posteriormente, las colonias se alimentaron con granos brocados. Se ofreció a las colonias 3 a 4 granos brocados con diferentes estados (larvas, adultos y huevos) de *H. hampei* obtenidos de granos pergamino de café infestados, proporcionados por el laboratorio Biocafé de Chinchiná (Caldas). Las colonias fueron revisadas diariamente para evaluar el consumo de broca. Las observaciones evidenciaron que las hormigas forrajeaban sobre los granos pero no penetran por los orificios, la mayoría de estas especies son más grandes que los orificios del grano de café, por los que algunas debían escavar los granos para poder entrar. Sólo *W. auropunctata* y *S. stricta* fueron observadas entrando en los granos sin mucho esfuerzo, debido a su diminuto tamaño (± 1 mm), y fueron más activas forrajeando sobre los granos. Finalmente, se seleccionó a *W. auropunctata*, dado que esta especie reportó tasas de depredación del 100% y colonias con numerosas obreras que garantizaban el número de muestras necesarias para los análisis. En total se alimentaron seis colonias de las cuales a tres se les ofreció entre tres a cuatro granos brocados partidos a la mitad con larvas, adultos y huevos de la broca expuestos, por cinco días además de agua y miel. A las colonias remanentes se les ofreció una presa alternativa criada en laboratorio (generalmente Acrididae, *Ephesthia kuehniella* o *Tenebrio molitor*), agua y miel. Antes de iniciar la alimentación con broca, las colonias fueron sometidas a un periodo de ayuno de cinco días (solo se les ofrecía agua y miel) con el objeto de estimular la depredación.

Extracción de ADN

El ADN total se extrajo de especímenes triturados utilizando el kit especializado QIAGEN DNeasy

Blood & Tissue Kit siguiendo el protocolo suplementario de purificación de ADN total de insectos del fabricante, con una excepción: en el paso 1 no se usó nitrógeno líquido ni mortero, sino que se añadieron 10 μ L de solución ATL (Tissue Lysis Buffer) amortiguadora a la muestra, se maceró con puntas de micropipeta estériles. Posteriormente, en el paso 2, se agregaron los 170 μ L restantes para completar 180 μ L de la ATL amortiguadora. El resto del proceso se realizó de la forma descrita en el protocolo.

PCR

Se llevó a cabo usando el par de cebadores CBB-COI-F (5'-TTGACAAAGGAGCAGGAACA-3') y CBB-COI-R (5'-TTCTGGCTGTATCCCAGGAG-3') específicos de *H. hampei* para amplificar un fragmento de 185 pb del gen COI, los cuales fueron probados en un trabajo anterior [9]. En dicho trabajo se realizó un análisis extenso de reactividad cruzada contra especies de insectos que se encuentran comúnmente en el interior de los frutos de café y otros 69 organismos no objetivo que representan 41 familias dentro de 11 órdenes de invertebrados. Estos cebadores no produjeron amplificación de ADN de ninguna de las otras especies examinadas.

Además, se utilizó el par de cebadores CI-13 (5'-ATA-ATTTTTTTATAGTTATACC-3') y CI-14 (5'-GTTTCT-TTTTTCTCTTTC-3') diseñados en estudios moleculares con el género *Crematogaster* (Quek et al. 2004) para amplificar un fragmento de aproximadamente 608 pb del gen COI con el fin de confirmar el éxito de la extracción del ADN de las hormigas, así como su viabilidad para su uso en PCR.

Las reacciones de PCR (10 μ L de volumen final) se realizaron utilizando Go Taq Master Mix (Promega), con 0,2 μ M de cada cebador y 1 μ L de ADN molde cuantificado previamente por Nanodrop (0,4 - 40 ng). Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador Benchmark TC 9639. El ciclo térmico de la PCR para CBB-COI-F de 185 pb consistió en 95°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, con una extensión final de 72°C por 7 min. Para los otros dos cebadores (186 y 164 pb) el ciclo térmico de la PCR consistió en 95°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, con una extensión final de 72°C por 7 min. Finalmente, se realizaron geles de poliacrilamida y los productos

de PCR se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata (10 mg/mL).

Análisis genético en hormigas alimentadas con broca del café

Las muestras para los análisis de PCR fueron obtenidas a partir de individuos (adultos), en número variable y por separado (uno, tres y cinco, debido al pequeño tamaño de la hormiga), provenientes de tres colonias de *W. auropunctata* alimentadas con broca. A estos cebadores no se les cambió las condiciones. Las muestras se tomaron después de 24 h de comprobarse la ingesta de broca por parte de la hormiga. Como controles se emplearon ejemplares de esta especie, de tres colonias diferentes alimentadas sobre larvas de *Ephesthia kuehniella*, *Tenebrio molitor* y especímenes de Acrididae, control de extracción (sin ADN) y control de PCR. Se realizaron tres réplicas de cada nivel de tratamiento. Se efectuó la PCR con un par de cebadores específicos para *H. hampei*, teniendo como control positivo muestras con ADN extraído de individuos de broca. En cada reacción de PCR se hicieron dos repeticiones usando el ADN de individuos o grupos de individuos que fueron alimentados con broca, así como de los controles (alimentados con otras presas).

RESULTADOS

Los cebadores específicos de *H. hampei* produjeron amplificación del fragmento de 185 pb en muestras de ADN extraído de adultos y larvas de broca como también en muestras de ADN extraído de obreras de *W. auropunctata* que habían consumido broca. Sin embargo, se detectó amplificación de una pequeña banda muy próxima a la banda de broca en hormigas que no habían consumido broca (controles). Esta banda no específica de broca, se especula que puede tratarse de un falso positivo atribuible posiblemente a la presencia de material genético bacteriano en el contenido intestinal de la hormiga. Para eliminar la banda de las muestras de hormigas sin consumo de broca, obtenidas con el par de cebadores CBB-COI-F y CBB-COI-R se modificaron las condiciones de temperatura de la PCR desde 55, 57 y 59°C, y también se ensayaron diferentes cantidades de ADN (2 y 4 µL), con el objeto de disminuir la posibilidad de alineamiento de los cebadores a zonas no específicas. Sin embargo, la banda apareció en el 83,72% de las

muestras de hormigas sin consumo. Los resultados obtenidos para el otro par de cebadores (186 y 164 pb), fueron similares (cuadro 1).

Los resultados del presente estudio no permiten confirmar la potencialidad de los cebadores ensayados para evaluar la conectividad trófica entre la hormiga *W. auropunctata* y la broca en los ecosistemas cafeteros. Una posible explicación recae en las reacciones cruzadas que aparecen como falsos positivos en el sistema de detección por PCR debido a reacciones de baja eficiencia.

Esto puede estar relacionado con la forma en que las hormigas ingieren su alimento, el cual no se consume por completo. Ellas poseen un saco, llamado buche o estómago social, donde pre-digieren su alimento y parte de su contenido es regurgitado para alimentar a otras obreras y larvas [10]. Por lo tanto, es posible que una cantidad mínima de ADN de broca sea conservada en su estómago. Un estudio [11] ha demostrado que si el ADN dentro de la muestra contiene un pequeño número de secuencias en concentraciones relativamente altas, entonces las secuencias menos concentradas a menudo no amplifican porque la PCR favorece los tipos de ADN dominantes; o por "necesidad" del cebador es posible que se amplifique tanto el ADN de la presa como el del depredador [11]. Este es un problema particular en estudios de dieta molecular, donde el ADN del depredador está a menudo presente en mayor exceso que el ADN derivado del alimento [11].

Cuadro 1. Número total y porcentaje de detección de los cebadores diseñados para broca, en BB: broca; HCC: hormigas con consumo de broca y HSC: hormigas sin consumo de broca.

Cebadores	BB (+)	BB (-)	HCC (+)	HCC (-)	HSC (+)	HSC (-)
CBB-COI-F y CBB-COI-R (185 pb)	5	0	17	1	18	4
Hh-186-F y Hh-186-R (186 pb)	4	0	5	0	8	1
Hh-164-F y Hh-164-R (164 pb)	5	0	5	0	10	2
Total	14	0	27	1	36	7
% de detección	100		96,59		83,72	

Pocos estudios han utilizado el contenido estomacal de las hormigas para análisis moleculares debido a que las hormigas han revelado dificultades para obtener ADN de presa usando extracciones de cuerpo entero. Un estudio [12] probó 24 hormigueros para evaluar la depredación de *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) utilizando PCR pero ninguno resultó positivo, a pesar de la discrepancia del 12% de los ensayos positivos usando inmuno absorción enzimática para la misma presa. Del mismo modo, un estudio [13] que investigó la depredación de *Camponotus pennsylvanicus* (Hymenoptera: Formicidae) sobre barrenadores de roble rojo (Coleoptera: Cerambycidae) reveló que muy pocos especímenes capturados en campo fueron positivos (1,7%) a pesar de altos niveles de observaciones de depredación en las masas de huevos colocadas artificialmente. Aunque estos estudios no analizaron si se inhibía la extracción y la amplificación del ADN del intestino de la hormiga, este fenómeno se ha reportado en *Tetramorium caespitum*, *Solenopsis invicta* y *Camponotus floridanus* [6]. Estos autores encontraron que tanto el gáster como el buche producían niveles significativos de inhibición de la PCR [6].

Dentro de las hormigas, se ha postulado que la inhibición de la PCR podría ser debido a la interferencia de las glándulas dentro del gáster, donde se encuentra la mayoría del tracto digestivo de la hormiga adulta [14]. La incertidumbre en la detección de ADN en el gáster de las hormigas y la falta de fiabilidad de los datos así obtenidos indican la importancia de caracterizar el efecto de los órganos de las hormigas sobre la detección del ADN y el éxito de la amplificación.

Aunque no era el objetivo de este estudio evaluar la eficiencia de depredación sobre la broca, y por tanto no se presentan estos resultados, sí se puede destacar que dos de las especies que se criaron en laboratorio *W. auropunctata* y *Solenopsis stricta* depredaron broca en dichas condiciones. Estas hormigas, de hábitos arborícolas y rastrosos, exhiben dos características eco-fisiológicas que permitirían, eventualmente, ser involucradas en un manejo integrado de la broca en Colombia. Primero, por ser muy pequeñas (de ± 1 mm), su tamaño facilita la depredación de la broca dentro del grano y, segundo, sus hábitos de anidar en ramitas y en tallos de plátano cosechado lo que permitiría la fácil provisión de sitios de anidación en los cafetales y así aumentar su impacto sobre el control de la broca. En particular,

W. auropunctata fue encontrada depredando dentro de los granos en condiciones de laboratorio y campo, lo que indica que es una especie que sube a los arbustos del café para forrajear, y puede disminuir el daño que la broca hace al producto principal. Al mismo tiempo, al anidar en ramitas sobre el suelo puede eliminar sectores de la plaga que se encuentren en los granos que caen al suelo, disminuyendo los focos de reinfección. No obstante, ambas especies, poseen un prontuario bastante negativo por su carácter invasor y agresivo [15], por lo cual interfieren, con sus picaduras, el proceso de recolección del café. Con respecto al carácter invasor de *W. auropunctata*, se aclara que esta especie se usó como modelo para estandarizar la metodología de detección de broca en el trabajo, pero esta metodología se podría implementar para otras especies de hormigas nativas con potencial depredador hacia la broca del café.

Los resultados de este estudio plantean la necesidad de seguir explorando herramientas moleculares para comprender el papel agroecológico de las hormigas depredadoras en el agroecosistema del café, pues diferentes mecanismos ecológicos y fisiológicos podrían impedir concluir con certeza las conexiones en la red trófica a partir de marcadores moleculares para la broca del café.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a dos evaluadores anónimos por sus valiosos comentarios. El laboratorio de Entomología de Cenicafe aportó los granos brocados en pergamino. Selene Escobar suministró colonias de hormigas colectadas en el campo; Janine Herrera, Omar Marín y Andrés López, mantuvieron las colonias artificiales; Fernando Díaz y Yesica López asistieron en laboratorio y con los análisis. El estudio fue financiado por el proyecto "Funciones ecológicas y hormigas en cafetales con distinta intensidad de manejo" financiado por COLCIENCIAS, Programa Nacional de Ciencias Básicas código 110656933821, contrato RC. No. 0648-2013 y por la Universidad del Valle.

CONCLUSIÓN

No se confirma la potencialidad de los cebadores ensayados para evaluar que *W. auropunctata* ha depredado la broca del café.

REFERENCIAS

- [1] MORRIS, J.R. and PERFECTO, I. Testing the potential for ant predation of immature coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) life stages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 233, 2016, p. 224-228.
- [2] MORRIS, J.R., VANDERMEER, J. and PERFECTO, I. A key stone ant species provides robust biological control of the coffee berry borer under varying pest densities. *Plos One*, 10(11), 2015, p.1-15.
- [3] DIAME, L., GRECHI, I., REY, J.Y., SANE, C.A.B., DIATTA, P., VAYSSIERES, J.F., YASMINE, A., DE BON, H. and DIARRA, K. Influence of *Oecophylla longinoda* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Formicidae) on mango infestation by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in relation to Senegalese orchard design and management practices. *African Entomologist*, 23, 2015, p. 294-305.
- [4] KING, R.A., READ, D.S., TRAUGOTT, M. and SYMONDSON, O. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular ecology*, 17(4), 2008, p. 947-963.
- [5] SIM, S.B., YONEISHI, N.M., BRILL, E., GEIB, S.M. and FOLLETT, P.A. Molecular markers detect cryptic predation on coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae) by silvanid and laemophloeid flat bark beetles (Coleoptera: Silvanidae, Laemophloeidae) in coffee beans. *Journal of Economic Entomology*, 109(1), 2016, p. 100-105.
- [6] PENN, H.J., CHAPMAN, E.G. and HARWOOD, J.D. Overcoming PCR inhibition during DNA-based gut content analysis of ants. *Environmental Entomology*, 45(5), 2016, p. 1255-1261.
- [7] ARMBRECHT, I. *Agroecología y Biodiversidad*. Cali (Colombia): Programa Editorial, Universidad del Valle, 2016.
- [8] PENG, R. K. and CHRISTIAN, K. The control efficacy of the weaver ant, *Oecophylla smaragdina* (Hymenoptera: Formicidae), on the mango leafhopper, *Idioscopus nitidulus* (Hemiptera: Cicadellidea) in mango orchards in the Northern Territory. *International Journal of Pest Management*, 51, 2005, p. 297-304.
- [9] JARAMILLO, J., CHAPMAN, E.G., VEGA, F.E. and HARWOOD, J.D. Molecular diagnosis of a previously unreported predator-prey association in coffee: *Karnyothrips flavipes* Jones (Thysanoptera: Phlaeothripidae) predation on the coffee berry borer. *Naturwissenschaften*, 97, 2010, p. 291 -298.
- [10] OLIVEIRA, P.S. and S. KOPTUR (Eds). *Ant-plant interactions. Impacts of humans on terrestrial ecosystems*. Cambridge (United Kingdom): Cambridge University Press, 2017.
- [11] VESTHEIM, H. and JARMAN, S.N. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5(12), 2008, p. 1-11.
- [12] FOURNIER, V., HAGLER, J., DAANE, K., DE LEON, J. and GROVES, R. Identifying the predator complex of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae): a comparative study of the efficacy of an ELISA and PCR gut content assay. *Oecologia*, 157, 2008, p. 629-640.
- [13] MUILENBURG, V.L., GOGGIN, F.L., HEBERT, S.L., JIA, L. and STEPHEN, S.M. Ant predation on red oak borer confirmed by field observation and molecular gut-content analysis. *Agricultural and Forest Entomology*, 10, 2008, p. 205-213.
- [14] GADAU, J. DNA isolation from ants. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009, doi:10.1101/pdb.prot5245
- [15] PASSERA, L. *Characteristics of tramp species*. Boulder (USA): Williams (Editor), Exotic Ants. Westview Press, 1994, p. 23-43.