

César Basso · Gabriela Grille
Editores

Relaciones entre organismos en los sistemas hospederos-parasitoides simbiontes

Colección Biblioteca Plural



Basso, César, ed.

Relaciones entre organismos en los sistemas hospederos-parasitoides-simbiontes / ed. César Basso y Gabriela Grille. Montevideo : Facultad de Agronomía, 2009. 226p.

1. INSECTA

2. CONTROL BIOLÓGICO

3. RELACIONES HUESPED PARASITO

I. Grille, Gabriela, coed.

II. Título

CDU 595.7

Reservados todos los derechos de la presente edición para todos los países. Este libro no se puede reproducir total o parcialmente por ningún medio gráfico, electrónico, digital, mecánico o cualquier otro, incluyendo los sistemas de fotocopias o fotoduplicación, registro magnético o de almacenamiento de datos sin expreso consentimiento de la Facultad de Agronomía de Uruguay.

© UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

AV. GARZÓN 780. 12900 MONTEVIDEO-URUGUAY

Colección "Biblioteca Plural"

Comité de Referato de la Facultad de Agronomía: Profs. Artigas Durán, Jorge Monza, Jorge Urioste, Cristina Mazzella, Pedro De Hegedüs, Alfredo Gravina, Zohra Bennadji.

La publicación de este libro fue realizada con el apoyo de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República y de la Embajada de Francia en Uruguay.

Diseño de cubierta: Andrés Basso

Imagen de cubierta: *Cotesia melitaeorum* (Hymenoptera, Braconidae) parasitando a *Melitaea didyma* (Lepidoptera, Nymphalidae).

Foto: Roger Vila - Departament de Genètica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

ISBN 978-9974-0-0536-5

Impresión y Diseño: Rusconi

Olegario Andrade 4710/12 - Tel.: 359 0706*

Depósito legal 346837

Impreso en Enero de 2009

Infecciones múltiples, regulación y evolución de poblaciones simbióticas

FABRICE VAVRE, EMILIE VAUTRIN, GWENAELLE GUEGUEN,
LAURENCE MOUTON & FRÉDÉRIC FLEURY

*Université de Lyon, F-69000 Lyon. Université Lyon 1;
CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie
Evolutive. 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622
Villeurbanne, France.*

1. Introducción

Todos los organismos eucariotas albergan microorganismos y aquellos que son patógenos no representan más que una fracción de la comunidad simbiótica total. Una gran parte de esos microorganismos están asociados en forma permanente, especialmente gracias a su localización intracelular y su transmisión vertical vía el citoplasma de los huevos. Estos simbioses cubren al conjunto del espectro de interacciones posibles, desde el parasitismo hasta el mutualismo. Los insectos son muy tolerantes a estos simbioses, los cuales no son extraños al éxito evolutivo de los insectos (Ishikawa, 2003). Ciertos de ellos, los simbioses primarios, permiten a muchos insectos explotar recursos pobres o desequilibrados complementando su régimen alimentario y, de ese modo, conquistar nuevos nichos ecológicos. Así,

entre el 10 y el 15% de las especies de insectos podrían ser tributarios de la presencia de simbioses primarios, como lo son la gran mayoría de los succionadores de savia (Baumann, 2005). La interacción entre los asociados es muy íntima: es obligatoria (interdependencia de los dos organismos), duradera (decenas o centenas de millones de años de co-especiación) y totalmente integradas (por ejemplo, los bacteriocitos son células hospedadoras, reagrupados en un órgano llamado la bacterioma, que están específicamente dedicadas a albergar simbioses).

Por fuera de esos simbioses primarios obligatorios, los insectos también están infectados a menudo por otros simbioses llamados secundarios, que presentan también una localización intracelular y una transmisión materna. Ellos difieren de los primarios por su carácter facultativo: aunque estén asociados al hospedero, éste puede, por lo contrario, prescindir de su presencia. Según el fenotipo que éstos induzcan, se pueden definir dos grandes categorías de simbioses secundarios. Como los simbioses primarios, ciertos de ellos van a aportar una ventaja al hospedero, especialmente la resistencia a condiciones de estrés tales como las altas temperaturas (Montllor *et al.*, 2002), los patógenos (Scarborough *et al.*, 2005), los parasitoides (Oliver *et al.*, 2003) o la especialización a la planta hospedadora (Tsuchida *et al.*, 2004)... Otros van a manipular la reproducción de los hospederos para su propio beneficio, según variadas estrategias que incluyen la feminización de machos genéticos, la inducción de la partenogénesis telitoca, el 'male-killing' o la inducción del aislamiento reproductivo post-zigótico, llamado incompatibilidad citoplasmática (revisado en Werren, 1997). En todos los casos, la lógica evolutiva es la misma: siendo las hembras las solas a transmitir los simbioses, toda estrategia que aumente la frecuencia relativa de las hembras infectadas, tanto en detrimento de los machos como del compartimento no infectado, podrá invadir. El ejemplo más estudiado de esos manipuladores de la reproducción es la bacteria del género *Wolbachia* que alcanzaría a infectar más del 20% de las especies de insectos, aunque ciertas estimaciones llegan al 75% (Werren *et al.*, 1995a; Jeyaprakash & Hoy, 2000; Werren & Windsor, 2000). Cuatro bacterias manipuladoras de la reproducción han sido identificadas (*Cardinium*, *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, *Rickettsia*), así como microsporidios (Dunn *et al.*, 1995; Zchori-Fein *et al.*, 2001; Zchori-Fein & Perlman, 2004; Perlman *et al.*, 2006). Aún si la incidencia de cada uno de esos microorganismos no es

conocida de manera precisa, una cosa es segura: los parásitos de la reproducción, y más generalmente los simbioses secundarios, son frecuentes.

En razón de la gran diversidad, incidencia y prevalencia de las bacterias simbióticas, numerosas especies de insectos están infectadas simultáneamente por varios simbioses. El interés por las infecciones múltiples en esas simbiosis de transmisión vertical es reciente, aunque ellas han sido identificadas desde hace mucho tiempo (Buchner, 1965), y constituyen un parámetro clave de la evolución de la virulencia de los simbioses de transmisión horizontal y, en consecuencia, de los efectos ecológicos y evolutivos de esas infecciones sobre las poblaciones hospederas (Frank, 1996a,b; Chao *et al.*, 2000). En realidad, generalmente la transmisión vertical se ha opuesto a la diversidad de los simbioses. Al momento de la colonización del ovocito solamente una pequeña parte de la población bacteriana es transmitida a cada descendiente. Ese cuello de botella repetido en cada generación se traduce en una muy fuerte deriva genética a nivel citoplasmático, que debería conducir a una rápida homogeneización del compartimiento simbiótico (Mira & Moran, 2002; Wernegreen, 2004). Incluso, Frank (1996a) ha propuesto que la transmisión vertical constituiría un medio por el cual los hospederos limitan la diversidad simbiótica y, por ello, de atenuar la virulencia de los simbioses. En efecto, en caso de infección múltiple, el simbiote que se multiplique más rápidamente (a priori el más virulento) debería ganar la competición intra-hospedero, y ésta debería, en consecuencia, favorecer niveles de virulencia superiores. La limitación de la mezcla de los simbioses mediante la transmisión vertical permitiría evitar este fenómeno conocido bajo el nombre de "tragedia de los comunes" (Hardin, 1968).

Por lo tanto, en una decena de años los estudios concernientes a las infecciones múltiples por simbioses de transmisión vertical se multiplicaron bajo la influencia especialmente del gran número de casos reportados. *Wolbachia* ha jugado un papel central en ese entusiasmo: los casos de infección de varias cepas de *Wolbachia* en el seno de un mismo hospedero son muy frecuentes (Mercot *et al.*, 1995; Rousset & Solignac, 1995; Sinkins *et al.*, 1995; Vavre *et al.*, 1999; Jeyaprakash & Hoy, 2000; Malloch *et al.*, 2000; Jamnongluk *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2002; Mitsuhashi *et al.*, 2002; Riegler & Stauffer, 2002; Reuter & Keller, 2003; Van Borm *et al.*, 2003; Dedeine *et al.*, 2005). Más en general, la existencia y las consecuencias de las infecciones

múltiples son también problemáticas en pleno auge en otros sistemas, en particular en ciertos insectos que albergan simbioses primarios como los pulgones o la mosca tsé-tsé que están frecuentemente sobreinfectadas por simbioses secundarios (Simon *et al.*, 2003; Aksoy & Rio, 2005; Rio *et al.*, 2006).

Los estudios que se interesan actualmente en las infecciones múltiples tratan sobre su ocurrencia, aparición, invasión y mantenimiento, así como sus consecuencias sobre el fenotipo de la asociación, la estructuración de las poblaciones de hospederos o aún su regulación e influencia sobre la evolución de las asociaciones simbióticas. Una cosa es cierta, no se puede reflexionar sobre las interacciones bacterias-insectos sin tener en cuenta la multiplicidad de asociados bacterianos. Las interacciones en el seno de la comunidad bacteriana van a jugar, tanto como la infección en si misma, un papel primordial en el impacto de la simbiosis sobre la población de insectos. Por lo tanto, hay que desarrollar una verdadera ecología microbiana del insecto.

Finalmente, esos simbioses transmitidos por una vía vertical pueden además interactuar con simbioses de transmisión horizontal, e influenciar la virulencia o difusión de esos últimos de una manera totalmente inesperada. Los fitopatosistemas considerados en este libro están integrados por una comunidad en interacción, donde el compartimiento simbiótico es mucho más complejo de lo que se había entendido por un largo tiempo.

2. El origen de las infecciones múltiples: las transferencias horizontales

Las infecciones múltiples *sensu stricto* corresponden a la co-existencia de varios simbioses en el interior de un mismo individuo. Esta definición es la más restrictiva referida a las infecciones múltiples, y será la retenida en este capítulo. No obstante, como se verá seguidamente, otras escalas son a tener en cuenta referidas a la competencia entre simbioses (Fig. 12.1). A escala poblacional, individuos mono y multi-infectados pueden coexistir y, tener en cuenta las interacciones entre individuos que contienen diferentes cortejos simbióticos va a ser primordial para comprender la dinámica

epidemiológica de las infecciones múltiples y las diferentes líneas maternas que componen la población. Asimismo, esas interacciones entre individuos van a poder ocurrir cuando varios simbioses se encuentren en el seno de las mismas poblaciones, pero sin que ellos coexistan necesariamente a escala del individuo (competición entre diferentes líneas mono-infectadas por simbioses diferentes por ejemplo). Finalmente, varios simbioses pueden infectar una misma especie, sin que ellos sean encontrados en el seno de las mismas poblaciones. En esas situaciones, la diversidad de la infección puede ser un factor mayor de diferenciación, de aislamiento de las poblaciones, incluso estar en el origen de la radicación de un complejo de especies.

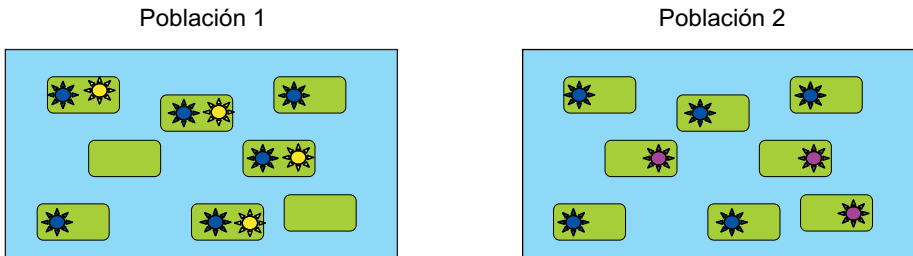


Figura 12.1. Los rectángulos azules corresponden a poblaciones donde se encuentran individuos verdes. En esta especie, tres simbioses están presentes. En la población 1, los simbioses azules y amarillos coexisten en el seno del mismo individuo: hay una infección múltiple. Ellos interactúan a nivel intra-individual. En la población 2, el simbiote azul y el rosado coexisten en el seno de la población sin afectar a los mismos individuos. Su interacción es únicamente a través de la competencia entre individuos. Por último, los simbioses amarillos y rosados no coexisten en los mismos individuos, ni en las mismas poblaciones. Sin embargo, su presencia puede ser un importante factor de aislamiento entre las poblaciones 1 y 2. En cada población existe polimorfismo de infección, que permite que la selección a nivel individual actúe sobre la composición simbiótica de la población.

Antes de comprender la dinámica epidemiológica de la infección, es necesario volver sobre los procesos del origen de la emergencia de la infección múltiple generada ante todo por las transferencias horizontales. En la mayoría de los casos, las asociaciones entre los simbioses primarios y sus hospederos tienen una larga historia co-evolutiva, que se traduce en particular por co-especiaciones entre los dos asociados con una antigüedad de decenas o centenas de millones de años (Baumann, 2005). Por el contrario, las asociaciones entre hospederos y simbioses secundarios son mucho más lábiles,

especialmente por el hecho de que los simbioses secundarios pueden muy regularmente capturar nuevas especies hospedadoras vía transferencia horizontal. Los argumentos que testimonian esas transferencias son numerosos, e incluyen la incongruencia de las filogenias entre hospedadores y simbioses (Werren *et al.*, 1995b; Thao & Baumann, 2004), la posibilidad de transferencias artificiales de simbioses entre individuos o especies (Boyle *et al.*, 1993; Grenier *et al.*, 1998; Koga *et al.*, 2003) y la puesta en evidencia de transferencias naturales (Rigaud & Juchault, 1995; Heath *et al.*, 1999; Huigens *et al.*, 2000, 2004).

Esas transferencias regulares tienen, por supuesto, el potencial de generar infecciones múltiples. Si la transferencia de un simbiote A tiene lugar en una especie poseyendo un simbiote primario o un simbiote secundario fijo, la transferencia genera obligatoriamente una infección múltiple a escala individual. Si, por el contrario, un simbiote residente B es secundario y la población hospedadora presenta un polimorfismo de infección, la transferencia de A genera una infección múltiple (A, B) o una nueva mono-infección A. En ese último caso, la población incluirá igualmente individuos mono-infectados B e individuos no infectados. La dinámica epidemiológica que resulta de ello será radicalmente diferente, como se verá seguidamente.

El análisis de la diversidad de los *Wolbachia* en el caso de las drosófilas y sus parasitoides es particularmente representativo de esos fenómenos (Vavre *et al.*, 1999; Haine *et al.*, 2005). En el seno de esa comunidad, numerosas especies están infectadas, encontrándose frecuentemente las mismas cepas de *Wolbachia* en los hospedadores y/o los parasitoides. El modo de vida parasitario, por la proximidad que implica entre los dos asociados, favorece esos intercambios de simbioses. Sin embargo, los parasitoides parecen ser más sensibles a la infección en función de la asimetría de la relación hospedador-parasitoide y la virulencia total de los parasitoides sobre sus hospedadores. Así, en *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera, Eucoilidae) y *Asobara tabida* (Hymenoptera, Braconidae) han sido detectadas tres cepas de *Wolbachia* a nivel individual y dos en el caso de *Trichopria* nr. *drosophilae*. En el caso de *Leptopilina guineaensis* se encontraron dos cepas, pero que no compartían los mismo individuos hospedadores ni las mismas poblaciones (Vavre *et al.*, no publicado). La primera se encontró en África del Oeste y la segunda en África del Este.

Esas dos cepas son similares a las de *Wolbachia* encontradas localmente en las drosófilas. Las transferencias horizontales pueden así generar frecuentemente multi-infecciones, pero la pregunta es saber cómo ellas van a invadir y mantenerse en el seno de las poblaciones hospederas.

3. Invasión y mantenimiento de las infecciones múltiples

3.1. Fuerzas que se oponen a la infección múltiple

Como ha sido dicho anteriormente, el cuello de botella que sobreviene al momento de la transmisión de los simbioses es una fuerza que tiende a oponerse al mantenimiento de las infecciones múltiples, y puede ocasionar continuamente una segregación de los diferentes simbioses y, por lo tanto, una homogenización del compartimiento citoplasmático a nivel individual. La eficacia de la transmisión de los diferentes simbioses y de la multi-infección va a jugar un rol primordial en el impacto de ese cuello de botella.

Por otra parte, la presencia de varios simbioses en el seno de un mismo individuo puede ocasionar un aumento del "fardo simbiótico". En efecto, la multiplicación y el mantenimiento de la población simbiótica ocasionan un costo al hospedero, y la presencia de varios simbioses puede aumentarlo. Este fenómeno ha podido ser demostrado en el caso de *A. tabida*, donde el costo de la infección aumenta con el número de cepas presentes en el insecto (Fig. 12.2, Mouton *et al.*, 2004). Si este aumento es excesivamente importante, el mismo puede limitar la co-existencia de varios simbioses. Así, la co-infección de *Hamiltonella defensa* y *Serratia symbiotica* ocasiona un aumento en la densidad de *Serratia* en el pulgón *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera, Aphididae), lo cual se traduce por un aumento espectacular del costo de la infección, limitando el mantenimiento de la co-infección en la naturaleza (Oliver *et al.*, 2006). Finalmente, cuando varios simbioses están presentes en el seno de un hospedero y en los mismos tejidos, los mismos pueden entrar en competencia por el espacio y/o el recurso. Es el caso del pulgón *A. pisum*, donde la presencia de simbioses secundarios puede repercutir directamente sobre la densidad del simbiote primario *Buchnera aphidicola* y, potencialmente, sobre su eficacia en proveer de

los nutrientes necesarios para su desarrollo al hospedero (Koga *et al.*, 2003 ; Sakurai *et al.*, 2005). Esa reducción puede constituir un costo importante al hospedero en términos de supervivencia y reproducción.

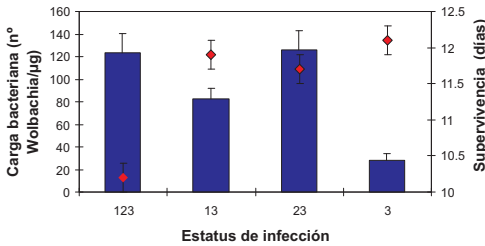
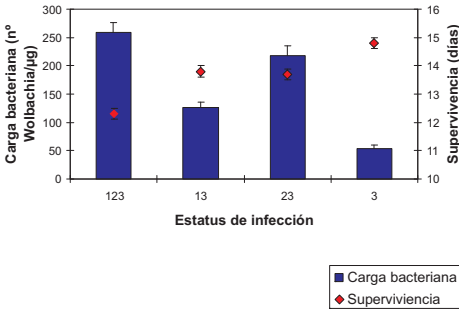


Figura 12.2. Relación entre la densidad y el costo de la infección por *Wolbachia* en *Asobara tabida*. El aumento de la densidad total en bacterias está correlacionado con una reducción de la supervivencia de los individuos de los dos sexos. Los estatus de infección están representados por el nombre de las cepas presentes denominadas 1, 2 y 3. La cepa 3 no puede ser eliminada en *A. tabida* puesto que ella es necesaria para la ovogénesis. La densidad se mide por PCR Cuantitativa en tiempo real y está relacionada con el peso del insecto (según Mouton *et al.*, 2004).

Debido a los diferentes mecanismos que pueden limitar las infecciones múltiples, su mantenimiento requiere un mecanismo que los seleccione a nivel de la población. Varios de entre ellos han sido caracterizados.

3.2. La incompatibilidad citoplasmática

La mayoría de cepas o especies bacterianas manipuladoras de la reproducción que coexisten en el seno de los mismos individuos inducen incompatibilidad citoplásmica (IC). Ellas han sido bien caracterizadas en el caso de infecciones por múltiples cepas de *Wolbachia*. La IC es un aislamiento reproductivo post-zigótico que interviene en los cruzamientos donde el macho está infectado por una cepa de *Wolbachia* que no posee la hembra (Cuadro 12.1), y se traduce por una condensación anormal de los cromosomas paternos que no pueden participar normalmente en la primera división mitótica (revisado en

Poinsot *et al.*, 2003). La acción de diferentes cepas de *Wolbachia* es específica y se manifiesta en que solo aquellas hembras que presenten toda la diversidad bacteriana podrán cruzarse con el conjunto de machos de la población. El análisis teórico de esos sistemas ha mostrado que la IC permite a las infecciones múltiples invadir y mantenerse en el seno de las poblaciones en una amplia gama de parámetros (Frank, 1998; Vautrin *et al.*, 2007). Esa capacidad de la IC de mantener infecciones múltiples ha sido puesta en evidencia en muchos modelos, entre los cuales *L. heterotoma*. En esa especie, las tres cepas de *Wolbachia* que coexisten inducen IC (Vavre *et al.*, 2001; Mouton *et al.*, 2005; Pintureau, capítulo 11), y la infección múltiple es particularmente estable: se la encuentra en todas las poblaciones muestreadas en Europa, África del Norte o América, y en todos los individuos colectados en la naturaleza (Vautrin *et al.*, no publicado). Del mismo modo, el análisis teórico ha mostrado que ciertas cepas solo pueden mantenerse si coexisten con otra cepa más eficaz, demostrando que las infecciones múltiples pueden, también, influenciar la dinámica invasiva de simbioses que inducen IC (Vautrin *et al.*, 2007).

Por el momento, han sido reportados dos casos de infección múltiple donde los dos manipuladores de la reproducción no inducen IC. Se trata de la mariposa *Eurema hecabe* (Lepidoptera, Pieridae) donde una *Wolbachia* feminizante coexiste con una *Wolbachia* que induce IC (Hiroki *et al.*, 2004) y de *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) donde una *Wolbachia* que induce IC puede coexistir con un espiroplasma que induce 'male-killing' (Montenegro *et al.*, 2005).

		Hembras			
		∅	Wa	Wb	Wab
Machos	∅	∅	Wa	Wb	Wab
	Wa	IC	Wa	IC	Wab
	Wb	IC	IC	Wb	Wab
	Wab	IC	IC	IC	Wab

Cuadro 12.1. Incompatibilidad citoplásmica inducida por *Wolbachia*. ∅ indica un individuo no infectado; Wa y Wb indican una mono-infección por el tipo bacteriano a o b; Wab corresponde a un bi-infección; IC significa que el cruzamiento es incompatible. Los casilleros grises muestran que las hembras bi-infectadas pueden tener una descendencia normal con todos los tipos de machos contrariamente a las otras hembras.

Muchos estudios teóricos han demostrado que esas multi-infecciones podrían ser estables, pero en condiciones de invasión y mantenimiento muy restrictivas (Randerson *et al.*, 2002; Engelstadter *et al.*, 2004).

3.3. Cada simbiote aporta una ventaja

La conservación de las infecciones múltiples es igualmente posible cuando el valor selectivo de los hospederos multi-infectados es superior al valor selectivo de los individuos mono-infectados, es decir cuando cada simbiote aporta una ventaja al hospedero. Dos condiciones deben presentarse para que ese sistema invada y sea estable. Por un lado, la ventaja de la infección múltiple debe superar su costo, como en el caso de los pulgones que se ha visto precedentemente (Oliver *et al.*, 2006). Por otro lado, la ventaja aportada por los dos simbioses debe ser de naturaleza diferente, o al menos igual a la simple adición del efecto de las dos infecciones aisladas. Si ese no es el caso, ninguna fuerza se opone a la segregación y la infección múltiple no será mantenida.

En los cicadélidos (Homoptera, Cicadellidae) por ejemplo, no se encuentra uno sino dos simbioses primarios, cada uno aportando al hospedero elementos necesarios para su desarrollo de manera no redundante (Wu *et al.*, 2006). En lo que concierne a los simbioses secundarios, el caso de *A. pisum* es bastante ejemplar: además de su simbiote primario *Buchnera aphidicola*, diferentes simbioses secundarios están presentes, aportándoles todos una ventaja. Esa ventaja es de naturaleza muy diferente según los simbioses (resistencia al calor, especialización sobre la planta hospedera, resistencia a los parasitoides) (Montllor *et al.*, 2002; Koga *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2003; Tsuchida *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2005). Como puede constatarse en ese ejemplo, los simbioses pueden estar implicados en una gran gama de efectos, y su combinación puede generar un conjunto de adaptaciones favorables para su hospedero.

Finalmente, la coexistencia puede igualmente hacer intervenir diferentes estrategias para los diferentes simbioses: aporte de una ventaja y manipulación de la reproducción (IC u otro). En el caso de la mosca tsé-tsé (Diptera, Glossinidae), por ejemplo, el insecto alberga un simbiote primario (*Wigglesworthia glossinidae*), un simbiote

secundario que podría ser benéfico (*Sodalis*), pero igualmente una *Wolbachia* que induciría IC (Aksoy, 2000). De la misma manera, en el caso del parasitoide *A. tabida* donde se encuentran tres cepas de *Wolbachia*, dos inducen IC, mientras que la tercera es necesaria a la ovogénesis del insecto (Dedeine *et al.*, 2004).

3.4. Coexistencia, sin infección múltiple, de varios simbioses a escala de la población o de la especie

Varios fenómenos pueden estar presentes en el origen de una mezcla en el seno de una población de individuos infectados por simbioses diferentes, pero sin que varios simbioses coexistan en los mismos individuos. Se pueden citar las transferencias horizontales en individuos no infectados mientras que la población posee una infección residente no fija, la pérdida recurrente de las infecciones múltiples por el hecho de una transmisión incompleta de uno de los simbioses, o aun la migración de individuos entre poblaciones de estatus de infección diferentes... Esas situaciones de coexistencia a escala poblacional son generalmente inestables y deberían conducir a la eliminación de uno de los linajes maternos y, en consecuencia, a la extinción local de una infección. En las islas del Pacífico, *Hypolimnas bolina* (Lepidoptera, Nymphalidae) posee dos cepas de *Wolbachia*, pero únicamente en individuos diferentes. Una induce 'male-killing' y la otra IC (Charlat *et al.*, 2006). Esas dos cepas son raramente encontradas en las mismas islas o, cuando coexisten, una de ellas presenta frecuencias muy bajas. Esta situación se explica por la imposibilidad de mantener localmente esas diferentes infecciones. La misma situación se espera cuando muchas cepas que inducen IC están presentes en una población pero sin multi-infección (Rousset *et al.*, 1991). Esa situación habría ocurrido en *D. melanogaster* donde parecen haber tenido lugar reemplazos sucesivos de cepas de *Wolbachia* (Riegler *et al.*, 2005). Por el contrario, la situación reportada en el caso del mosquito *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) donde coexisten numerosas cepas de *Wolbachia* mutuamente incompatibles, permanece a la hora actual difícil de comprender (Duron *et al.*, 2006). La coexistencia solo podrá mantenerse si las poblaciones intercambian migrantes con las poblaciones vecinas (Telschow *et al.*, 2005b).

Del mismo modo, se espera esa inestabilidad en el caso de los

simbiontes secundarios que aportan un beneficio al hospedero. En esas situaciones, los efectos y, en consecuencia, los beneficios de la presencia de los simbiontes dependen ampliamente del ambiente (climático, específico) del hospedero. Existe así una condicionalidad del efecto positivo aportado por los simbiontes (Bronstein, 1994) que puede permitir la puesta en marcha de adaptaciones locales de la comunidad simbiótica en función de las condiciones ambientales locales. Por analogía con los conceptos desarrollados por Thompson (2005) para el polimorfismo a nivel nuclear, el concepto de mosaico geográfico puede ser retomado a nivel simbiótico y permitir el mantenimiento de la diversidad simbiótica a escala de metapoblación.

Finalmente, las variaciones entre poblaciones van a poder jugar un papel en el aislamiento reproductivo de las poblaciones. Ya sea debido a la IC (aislamiento post-zigótico) o bien a la especialización (aislamiento pre-zigótico), los simbiontes van igualmente a desempeñar un papel fundamental en la diferenciación de las poblaciones de hospederos a nivel nuclear (Bordenstein *et al.*, 2001; Telschow *et al.*, 2002a,b; 2005a). En particular, el impacto de las infecciones múltiples sobre esos fenómenos será de acentuar y acelerar ese aislamiento, multiplicando el número de estatus de infección potenciales y reforzando las barreras (genéticas, comportamentales....) entre esos estatus.

4. Regulación y evolución de las poblaciones bacterianas en las infecciones múltiples

La frecuencia de las infecciones múltiples depende de su impacto sobre el hospedero, de los factores que permiten y regulan su mantenimiento a nivel individual y de la dinámica co-evolutiva que puede ponerse en marcha en esos sistemas complejos. En el centro de ese problema se encuentra la regulación de las poblaciones simbióticas. ¿Cómo puede el insecto soportar una infección por un número importante de simbiontes? ¿Existen mecanismos específicos para regular esas poblaciones? ¿Qué tipos de interacciones pueden emerger en esos sistemas?

4.1. Regulación de las poblaciones bacterianas

El estudio de la regulación de las poblaciones bacterianas es muy reciente. Ello ha sido realizado especialmente en los casos de *L. heterotoma* y *A. tabida*, dos especies naturalmente tri-infectadas por *Wolbachia*. En las dos especies, la densidad de *Wolbachia*, total y específica de cada cepa ha sido medida en cepas presentando estatus de infección diferentes (Fig. 12.3, Mouton *et al.*, 2003, 2004). En esas dos especies, la densidad total aumenta con la diversidad bacteriana. En consecuencia, la regulación de la población bacteriana no es global. Por lo contrario, cada cepa posee una densidad que le es propia, y que no varía con la composición de la población bacteriana. Ese resultado demuestra que las diferentes cepas no están en competencia en el seno de un mismo hospedero. Ese resultado ha sido encontrado también en otras especies multi-infectadas naturalmente o artificialmente por *Wolbachia* (Rousset *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2003, pero ver Kondo *et al.*, 2005 por un contra ejemplo), sugiriendo que la regulación específica es bastante general en esas situaciones. La regulación específica de la densidad de cada cepa podrían constituir una estrategia eficaz que permitiría limitar la pérdida ecológica de las cepas bacterianas durante la fase de transmisión mientras limitaba la competencia entre las cepas por el espacio y los recursos, y la evolución hacia un aumento de la virulencia (Mouton *et al.*, 2004; Engelstadter *et al.*, 2007 por un análisis teórico).

Por el contrario, esa regulación específica no parece aplicarse a la coexistencia de varias especies bacterianas (Goto *et al.*, 2006; Oliver *et al.*, 2006). En esos dos estudios, se observan dos situaciones bien distintas. En el caso de *D. melanogaster*, la densidad de *Wolbachia* disminuye fuertemente mientras que la densidad de *Spiroplasma* permanece constante (Goto *et al.*, 2006). En *A. pisum*, la densidad en *Serratia* aumenta en presencia de *Hamiltonella* mientras que la densidad de esta última no varía (Oliver *et al.*, 2006). Los mecanismos de esas variaciones restan a descubrir, y falta analizar todas las sutilezas del control de esas multi-infestaciones a escala intra-individual. Uno de los aspectos que se plantea de manera crucial es el de determinar si existen interacciones entre los socios bacterianos.

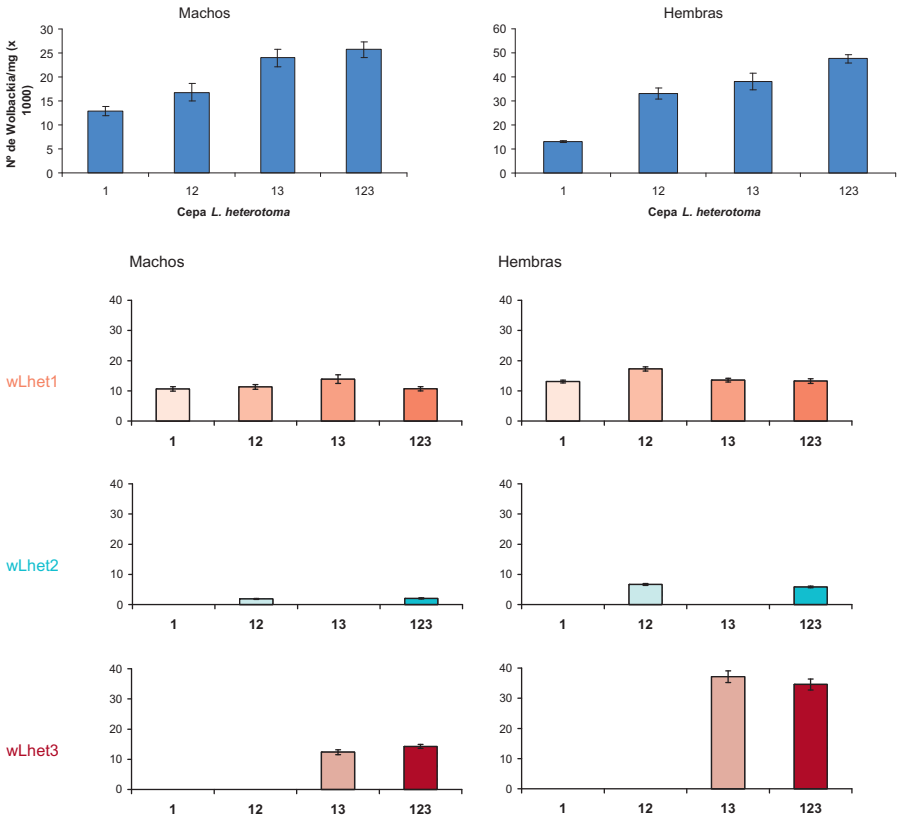


Figura 12.3. Densidad total (a la izquierda) y específica para cada cepa (a la derecha) en *Leptopilina heterotoma*. Esta especie está tri-infectada por las cepas 1, 2 y 3. El eje de las abscisas representa el estatus de infección de las líneas (1=línea mono-infectada por la cepa 1, 12 = bi-infectada por las cepas 1 y 2; 13 = bi-infectada por las cepas 1 y 3; 123 = tri-infectada por las tres cepas). La densidad total aumenta con el número de cepas, pero la densidad de cada cepa permanece constante cualquiera sea la composición del compartimiento simbiótico (según Mouton *et al.*, 2003).

4.2. Evolución de la transmisión conjunta

Una pregunta aun poco abordada atiende a comprender cómo van a evolucionar las interacciones entre simbiotes, y cuáles son los factores que determinan esta evolución cuando una infección múltiple se mantiene en una población. Uno de los puntos particularmente importantes que distingue las multi-infecciones en los sistemas de

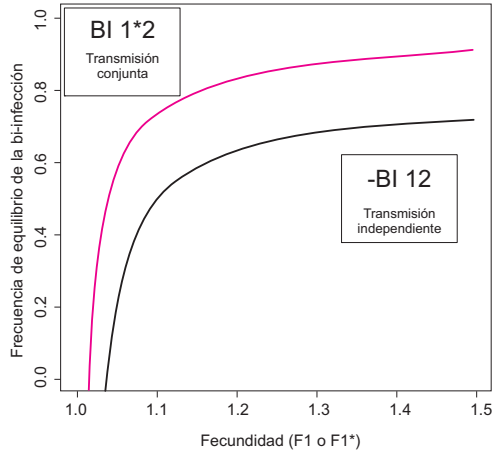
transmisión vertical de aquellos de transmisión horizontal es la co-transmisión de los simbioses. En efecto, la transmisión vertical entraña la coexistencia de los mismos genotipos bacterianos de generación en generación. Estamos, en consecuencia, en una situación donde existe una cohesión genética de la población bacteriana que es mantenida en el momento de los eventos de transmisión. Como ejemplo es necesario imaginar una bi-infección donde dos cepas de *Wolbachia* que inducen IC coexisten en el seno de un mismo hospedero. A la escala de un individuo, una *Wolbachia* que se multiplique rápidamente tendrá sin duda una mejor transmisión, pero podrá igualmente acarrear una disminución de la transmisión de su colodario. Uno de los problemas es, por supuesto, que cuando esta cepa invasiva se encuentra sola sufrirá la IC inducida por la segunda cepa! En ese sistema, la selección inter-individual inducida por la IC va a contra-seleccionar fuertemente cepas "egoístas". Estamos, posiblemente, en condiciones que pueden favorecer la cooperación entre cepas bacterianas.

Los modelos teóricos desarrollados para estudiar esas cuestiones buscan determinar las condiciones que favorecen la emergencia de la competencia o, por el contrario, la cooperación entre diferentes genotipos bacterianos (diferentes cepas de una misma bacteria o diferentes especies bacterianas). Los primeros resultados muestran que cualquiera sea el origen del mantenimiento de la infección múltiple (IC o ventaja aportada al hospedero), a partir que la infección múltiple se mantiene, la selección favorece los genotipos bacterianos que aumentan la producción de hembras multi-infectadas. Este aumento puede tomar la forma de una cooperación entre cepas bacterianas para la transmisión. Se observa en efecto que, para una amplia gama de parámetros, la selección va a favorecer la puesta en funcionamiento de interacciones cooperativas que van a maximizar la co-transmisión, aun si ello se traduce por una disminución de la transmisión individual (Vautrin *et al.*, en prensa). En todos los casos, ello se traduce por un aumento de la frecuencia de la multi-infección en las poblaciones naturales, que permanece limitada en el caso de la IC, pero que puede ser importante cuando los dos simbioses aportan una ventaja al hospedero (Fig. 12.4). En consecuencia, la evolución de la cooperación entre simbioses puede tener consecuencias importantes sobre el conjunto de los asociados. Dado que las infecciones múltiples existen en numerosas plagas, se comprende bien

que el aumento de su frecuencia puede igualmente jugar un papel importante sobre problemáticas totalmente aplicadas.

Figura 12.4.

Frecuencia de la bi-infección en función de la ventaja sobre la fecundidad aportada por la infección (medida en fecundidad relativa con relación a los individuos no infectados). En negro: ausencia de interacción cooperativa; en rosado: cooperación entre las cepas (maximización de la co-transmisión de las bacterias sin cambios sobre su transmisión individual). Por ejemplo, para una fecundidad relativa de 1,1, la frecuencia de la infección múltiple pasa de aproximadamente 0,5 sin cooperación a 0,75 con cooperación (según Vautrin *et al.* 2008).



4.3. La evolución de la dependencia entre simbioses

Situaciones especialmente complejas existen en la naturaleza. Así, en el caso de los cicadélidos, los insectos no poseen uno sino dos simbioses necesarios para su desarrollo (Wu *et al.*, 2006). En el nematodo *Olavius algarvensis* se encuentran cinco simbioses que coexisten en un organismo que no posee ni buche, ni tubo digestivo, ni ano. ¿Todo es gestionado por los intercambios gaseosos con el exterior y el metabolismo cruzado de los diferentes simbioses! (Woyke *et al.*, 2006) ¿Cómo tales sistemas pueden existir?

El desarrollo de esos sistemas complejos puede ser interpretado a la luz del análisis de las presiones selectivas que actúan sobre las multi-infecciones (Vautrin *et al.*, en prensa). La selección solo opera para maximizar la producción de individuos multi-infectados, siendo neutros todos los caracteres que se imprimen únicamente en situación de mono-infección. En esas condiciones, si una bacteria se vuelve dependiente de otra por consecuencia de la pérdida de una función, si esa función le es provista por una de sus asociadas, esa cepa no va a ser contra-seleccionada. Es la hipótesis del gen doble-empelo,

clásicamente utilizado por los parásitos que se vuelven dependientes de sus hospederos, pero que se aplica aquí a muchos simbioses. Desde ese momento, esa bacteria puede volverse dependiente de otro asociado simbiótico, lo que va a reforzar la cohesión del sistema multi-infectado. Así, en el caso de *Cinara cedri* (Homoptera, Aphididae) se encuentra *Buchnera* que tiene el genoma más pequeño de todas las *Buchnera* (Gil *et al.*, 2002; Perez-Brocal *et al.*, 2006), realmente pequeño, que no codifica ciertas funciones necesarias al hospedero, como la síntesis del triptofano. Entonces, ¿cómo *Buchnera* y su hospedero pueden sobrevivir? En realidad, en esa especie el simbionte secundario *Serratia* está en proceso de volverse obligatorio y poseer especialmente la capacidad de sintetizar el triptofano. Un escenario posible es que la pérdida de esos genes en *Buchnera* solo ha sido posible porque *Serratia* estaba presente, y le permitía compensar esa carencia. En consecuencia, la infección múltiple habría "autorizado" la pérdida de esa función y la evolución de la interdependencia entre los tres organismos asociados.

5. Una situación que resume todo, las infecciones múltiples en *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci (Homoptera, Aleyrodidae) es una de las plagas más importantes de los cultivos (Dalton, 2006). Extremadamente polífago, vector de virus fitopatógenos particularmente virulentos, este insecto causa daños directos e indirectos tanto sobre plantas alimenticias como ornamentales. Es una especie invasiva de origen africano, con una distribución actualmente cosmopolita, que continua progresando hacia las regiones septentrionales probablemente en relación con el calentamiento climático y los intercambios comerciales. La aparición de resistencia a los insecticidas limita considerablemente los medios de lucha contra este insecto. Se debe además agregar que *B. tabaci* es un complejo de especies, habiéndose descrito varios biotipos más o menos interfecundos, y más o menos especializados en diferentes plantas hospederas (De Barro *et al.*, 2000).

Bemisia tabaci alberga, como la mayoría de insectos picosuctores, un simbionte primario, *Portiera aleyrodidarum*, probablemente implicado en el complemento del régimen alimentario

de su hospedero (Baumann, 2005). Además de ese simbiote, seis simbioses secundarios han sido descritos. Varios de entre ellos son conocidos por manipular la reproducción de los insectos (*Wolbachia*, *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Rickettsia*), mientras que *Hamiltonella* está asociado a diferentes características de la aptitud (fitness) de *A. pisum* (resistencia al calor o a los parasitoides) (Zchori-Fein & Brown, 2002; Nirgianaki *et al.*, 2003; Gottlieb *et al.*, 2006). Por último, *Fritschea* no tiene actualmente ningún efecto conocido en los insectos.

El análisis de la ocurrencia y de la co-ocurrencia de esos simbioses a gran escala geográfica ha permitido demostrar que más del 95% de estos insectos albergan, al menos, un simbiote secundario además del simbiote primario, y que más del 65% presentan multi-infecciones provocados por más de un simbiote secundario (Gueguen *et al.*, no publicado). Así, la multi-infección es la regla en *B. tabaci*. El análisis de la repartición de diferentes combinaciones de simbioses muestra que ciertas asociaciones son privilegiadas, mientras que otras son, por el contrario, muy raras o jamás observadas. Esto sugiere que interacciones entre simbioses pueden limitar o por el contrario favorece la existencia y el mantenimiento de ciertas combinaciones simbióticas (¿conflicto y cooperación entre simbioses?). En este insecto, todas las bacterias son albergadas en el bacteriocito que es transmitido directamente al ovocito. Esta co-localización durable en el seno de las mismas células que asegura la transmisión y la co-transmisión de las bacterias deja presagiar que tales interacciones son posibles (Gottlieb *et al.*, no publicado).

Del mismo modo, la multiplicidad del estatus de infección sugiere una rápida dinámica de las comunidades simbióticas. Así, diferentes "grupos" de individuos pueden estar separados en función de su estatus de infección. Esos grupos corresponden a la clasificación obtenida sobre la base de marcadores mitocondriales. Nada sorprendente, porque la invasión por parte de una bacteria transmitida maternalmente se traduce igualmente por la invasión del variante mitocondrial que le está asociado (Hurst & Jiggins, 2005). La situación se vuelve más interesante cuando se agrega que esa clasificación es utilizada para determinar los biotipos de *B. tabaci*. Si los simbioses tienen una influencia importante sobre la biología del insecto, es entonces necesario tomarlos en cuenta, y la utilización de marcadores mitocondriales está justificada. Si no es así, los criterios de definición de esos biotipos son a revisar de urgencia... Sabremos más cuando los

efectos de esos simbioses hayan sido determinados, y los fenómenos de competencia y de cooperación entre simbioses hayan sido aclarados en este modelo.

Bemisia tabaci es también una especie modelo para ilustrar la importancia del compartimiento simbiótico "permanente" sobre las capacidades vectoriales de los insectos. Esta especie es un vector de numerosos virus fitopatógenos, entre los cuales el Tomato Yellow Leaf Curled Virus (TYLCV). Al momento de su translocación en el insecto, este virus se combina a una proteína, GroEL, cuyo origen es bacteriano y proviene de uno de los simbioses presentes en *B. tabaci*, pero cuya identidad aun resta determinar (Morin *et al.*, 1999). Esta proteína es una acompañante que va a facilitar el repliegue correcto de las proteínas y así facilitar la translocación del virus en el insecto. Cuando esta proteína se combina, la eficacia de la transmisión viral por parte del insecto se reduce fuertemente, y ensayos están en marcha actualmente para utilizarla como trampa al interior de plantas transgénicas (Akad *et al.*, 2007). Por otra parte, también es posible considerar la manipulación del compartimiento simbiótico, en particular si existen exclusiones entre simbioses, para limitar la presencia del simbiote responsable de la facilitación, y controlar de este modo el nivel de vección viral. El mismo tipo de interacción entre virus y simbiote ha también sido descubierto en los pulgones. La generalidad de estas interacciones falta ser analizada (Vandenhuevel *et al.*, 1994).

Como puede verse en este ejemplo, las infecciones múltiples pueden jugar un papel importante en modelos de interés agronómico, y estar directamente relacionadas a los daños inflingidos directa o indirectamente a los cultivos por vección de patógenos. La posibilidad de utilizar el compartimiento simbiótico, y todas las interacciones que ahí pueden existir, como medio de lucha contra las plagas es una pista urgente de explorar.

6. Las infecciones múltiples, una temática a desarrollar

El conjunto de resultados presentados en este capítulo muestra a que punto las infecciones múltiples son frecuentes y diversas en las

simbiosis vía transmisión vertical. Además, ellas dejan en evidencia qué sistemas específicos de regulación, competencia, cooperación y dependencia pueden emerger en esos sistemas, planteando directamente la pregunta sobre el papel de los diferentes asociados en la evolución de esas interacciones, en particular, en el marco de las interacciones entre bacterias en el seno del insecto.

Numerosas preguntas quedan en suspenso. Ellas conciernen los factores que limitan o, por el contrario, favorecen el mantenimiento de la diversidad simbiótica a escala individual y poblacional, con todas sus consecuencias sobre la adaptación de los insectos a su ambiente. Sin lugar a dudas, estos sistemas son una herramienta formidable para estudiar las interacciones entre bacterias, ya sea entre individuos de una misma cepa o entre especies, reuniendo en esta temática una problemática mayor de la ecología microbiana. La especificidad de esos sistemas reside en dos características principales. El hospedero constituye un ambiente cerrado que favorece las interacciones directas entre los asociados y la comunicación eficaz entre ellos. En efecto, los efectores moleculares bacterianos, por una difusión limitada, van a poder alcanzar sus objetivos a bajo costo. Después, la transmisión vertical asegura interacciones continuas y sostenidas entre los mismos genotipos de los diferentes asociados, que van a facilitar la emergencia de interacciones.

Por último, es imposible terminar este capítulo sin mencionar la influencia que podrían tener esas infecciones múltiples sobre las transferencias horizontales de genes entre bacterias en el seno del espacio intracelular (Bordenstein & Reznikoff, 2005), pero también hacia el compartimiento nuclear (Hotopp *et al.*, 2007). Los recientes avances demuestran la plasticidad de los genomas bacterianos endosimbióticos (Wu *et al.*, 2004; Foster *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2005) y la capacidad de ciertos de esos simbiosiontes a recombinarse (Werren & Bartos, 2001; Jiggins, 2002; Baldo *et al.*, 2006) permiten suponer que es posible el intercambio de material genético en el seno de la célula. ¿Cuál es la amplitud de este fenómeno y cuáles son sus consecuencias? Puede causar asombro que bacterias extremadamente diversas induzcan efectos similares, como *Wolbachia* y *Cardinium* por ejemplo. Ciertamente, los próximos años permitirán obtener el metagenoma de ciertos insectos y avanzar sobre esta interrogante.

7. Referencias bibliográficas

- Akad F., Eybishtz A., Edelbaum D., Gorovits R., Dar-Issa O., Iraki N. & Czosnek H. 2007. Making a friend from a foe: Expressing a groel gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Archives of Virology* 152, 1323-1339.
- Aksoy S. 2000. Tsetse - a haven for microorganisms. *Parasitology Today* 16, 114-118.
- Aksoy S. & Rio R.V.M. 2005. Interactions among multiple genomes: Tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 691-698.
- Baldo L., Bordenstein S., Wernegreen J.J. & Werren J.H. 2006. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular Biology and Evolution* 23, 437-449.
- Baumann P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* 59, 155-189.
- Bordenstein S.R., O'Hara F.P. & Werren J.H. 2001. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in nasonia. *Nature* 409, 707-710.
- Bordenstein S.R. & Reznikoff W.S. 2005. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3, 688-699.
- Boyle L., Oneill S.L., Robertson H.M. & Karr T.L. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260, 1796-1799.
- Bronstein J.L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 9, 214-217.
- Buchner P. 1965. *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience Publishers. New York.
- Chao L., Hanley K.A., Burch C.L., Dahlberg C. & Turner P.E. 2000. Kin selection and parasite evolution: Higher and lower virulence with hard and soft selection. *Quarterly Review of Biology* 75, 261-275.
- Charlat S., Engelstadter J., Dyson E.A., Hornett E.A., Duploux A., Tortosa P., Davies N., Roderick G.K., Wedell N. & Hurst G.D. 2006.

- Competing selfish genetic elements in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Current Biology* 16, 2453-2458.
- Dalton R. 2006. The christmas invasion. *Nature* 443, 898-900.
- De Barro P.J., Driver F., Trueman J.W.H. & Curran J. 2000. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal Its1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16, 29-36.
- Dedeine F., Ahrens M., Calcaterra L. & Shoemaker D.D. 2005. Social parasitism in fire ants (solenopsis spp.): A potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia*. *Molecular Ecology* 14, 1543-1548.
- Dedeine F., Vavre F., Shoemaker D.D. & Bouletreau M. 2004. Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. *Evolution* 58, 2167-2174.
- Dunn A.M., Hatcher M.J., Terry R.S. & Tofts C. 1995. Evolutionary ecology of vertically transmitted parasites: Transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni*. *Parasitology* 111, S91-S109.
- Duron O., Fort P. & Weill M. 2006. Hypervariable prophage *Wo* sequences describe an unexpected high number of *Wolbachia* variants in the mosquito *Culex pipiens*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 495-502.
- Engelstadter J., Hammerstein P. & Hurst G.D.D. 2007. The evolution of endosymbiont density in doubly infected host species. *Journal of Evolutionary Biology* 20, 685-695.
- Engelstadter J., Telschow A. & Hammerstein P. 2004. Infection dynamics of different *Wolbachia*-types within one host population. *Journal of Theoretical Biology* 231, 345-355.
- Foster J., Ganatra M., Kamal I., Ware J., Makarova K., Ivanova N., Bhattacharyya A., Kapatral V., Kumar S., Posfai J., Vincze T., Ingram J., Moran L., Lapidus A., Omelchenko M., Kyrpides N., Ghedin E., Wang S., Goltsman E., Joukov V., Ostrovskaya O., Tsukerman K., Mazur M., Comb D., Koonin E. & Slatko B. 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *Plos Biology* 3, 599-614.

- Frank S.A. 1996a. Host control of symbiont transmission: The separation of symbionts into germ and soma. *American Naturalist* 148, 1113-1124.
- Frank S.A. 1996b. Host-symbiont conflict over the mixing of symbiotic lineages. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263, 339-344.
- Frank S.A. 1998. Dynamics of cytoplasmic incompatibility with multiple *Wolbachia* infections. *Journal of Theoretical Biology* 192, 213-218.
- Gil R., Sabater-Munoz B., Latorre A., Silva F.J. & Moya A. 2002. Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4454-4458.
- Goto S., Anbutsu H. & Fukatsu T. 2006. Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4805-4810.
- Gottlieb Y., Ghanim M., Chiel E., Gerling D., Portnoy V., Steinberg S., Tzuri G., Horowitz A.R., Belausov E., Mozes-Daube N., Kontsedalov S., Gershon M., Gal S., Katzir N. & Zchori-Fein E. 2006. Identification and localization of a Rickettsia sp in Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae). *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3646-3652.
- Grenier S., Pintureau B., Heddi A., Lassabliere F., Jager C., Louis C. & Khatchadourian C. 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265, 1441-1445.
- Haine E.R., Pickup N.J. & Cook J.M. 2005. Horizontal transmission of *Wolbachia* in a *Drosophila* community. *Ecological Entomology* 30, 464-472.
- Hardin G. 1968. The tragedy of the commons. *Science* 162, 1243-1248.
- Heath B.D., Butcher R.D.J., Whitfield W.G.F. & Hubbard S.F. 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* 9, 313-316.

- Hiroki M., Tagami Y., Miura K. & Kato Y. 2004. Multiple infection with *Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, 1751-1755.
- Hotopp J.C.D., Clark M.E., Oliveira D., Foster J.M., Fischer P., Torres M.C., Giebel J.D., Kumar N., Ishmael N., Wang S., Ingram J., Nene R.V., Shepard J., Tomkins J., Richards S., Spiro D.J., Ghedin E., Slatko B.E., Tettelin H. & Werren J.H. 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317, 1753-1756.
- Huigens M.E., de Almeida R.P., Boons P.A.H., Luck R.F. & Stouthamer R. 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, 509-515.
- Huigens M.E., Luck R.F., Klaassen R.H.G., Maas M., Timmermans M. & Stouthamer R. 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* 405, 178-179.
- Hurst G.D.D. & Jiggins F.M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272, 1525-1534.
- Ikeda T., Ishikawa H. & Sasaki T. 2003. Regulation of *Wolbachia* density in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, and the almond moth, *Cadra cautella*. *Zoological Science* 20, 153-157.
- Ishikawa H. 2003. Insect symbiosis: An introduction. In: Bourtzis K. & Miller T.A. (eds) *Insect symbiosis*. CRC Press. Boca Raton. pp 1-22.
- Jamnongluk W., Kittayapong P., Baimai V. & O'Neill S.L. 2002. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: Molecular evidence for five distinct strains in a single host species. *Current Microbiology* 45, 255-260.
- Jeyaprakash A. & Hoy M.A. 2000. Long pcr improves *Wolbachia* DNA amplification: Wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9, 393-405.
- Jiggins F.M. 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. *Molecular Biology and Evolution* 19, 1640-1643.

- Koga R., Tsuchida T. & Fukatsu T. 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: A facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 2543-2550.
- Kondo N., Ijichi N., Shimada M. & Fukatsu T. 2002. Prevailing triple infection with *Wolbachia* in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Molecular Ecology* 11, 167-180.
- Kondo N., Shimada M. & Fukatsu T. 2005. Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biology Letters* 1, 488-491.
- Malloch G., Fenton B. & Butcher R.D.J. 2000. Molecular evidence for multiple infections of a new subgroup of *Wolbachia* in the european raspberry beetle *Byturus tomentosus*. *Molecular Ecology* 9, 77-90.
- Mercot H., Llorente B., Jacques M., Atlan A. & Montchampmoreau C. 1995. Variability within the seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics* 141, 1015-1023.
- Mira A. & Moran N.A. 2002. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology* 44, 137-143.
- Mitsunashi W., Saiki T., Wei W., Kawakita H. & Sato M. 2002. Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Molecular Biology* 11, 577-584.
- Montenegro H., Solferini V.N., Klaczko L.B. & Hurst G.D.D. 2005. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 14, 281-287.
- Montllor C.B., Maxmen A. & Purcell A.H. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* 27, 189-195.
- Morin S., Ghanim M., Zeidan M., Czosnek H., Verbeek M. & van den Heuvel J. 1999. A groel homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256, 75-84.
- Mouton L., Dedeine F., Henri H., Bouletreau M., Profizi N. & Vavre F. 2004. Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic

population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics* 168, 181-189.

Mouton L., Henri H., Bouletreau M. & Vavre F. 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology* 12, 3459-3465.

Mouton L., Henri H., Bouletreau M. & Vavre F. 2005. Multiple infections and diversity of cytoplasmic incompatibility in a haplodiploid species. *Heredity* 94, 187-192.

Nirgianaki A., Banks G.K., Frohlich D.R., Veneti Z., Braig H.R., Miller T.A., Bedford I.D., Markham P.G., Savakis C. & Bourtzis K. 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology* 47, 93-101.

Ogata H., Renesto P., Audic S., Robert C., Blanc G., Fournier P.E., Parinello H., Claverie J.M. & Raoult D. 2005. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *Plos Biology* 3, 1391-1402.

Oliver K.M., Moran N.A. & 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* 102, 12795-12800.

Oliver K.M., Moran N.A. & Hunter M.S. 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 1273-1280.

Oliver K.M., Russell J.A., Moran N.A. & Hunter M.S. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1803-1807.

Perez-Brocal V., Gil R., Ramos S., Lamelas A., Postigo M., Michelena J.M., Silva F.J., Moya A. & Latorre A. 2006. A small microbial genome: The end of a long symbiotic relationship? *Science* 314, 312-313.

Perlman S.J., Hunter M.S. & Zchori-Fein E. 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 2097-2106.

- Poinsot D., Charlat S. & Mercot H. 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts. *Bioessays* 25, 259-265.
- Randerson J., Moreau J., Rigaud T. & Hurst L.D. 2002. Understanding the distribution and effects of *Wolbachia*: The co-existence of cytoplasmic incompatibility and feminization. *Selection* 1-2, 237-248.
- Reuter M. & Keller L. 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Molecular Biology and Evolution* 20, 748-753.
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J. & O'Neill S.L. 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* 15, 1428-1433.
- Riegler M. & Stauffer C. 2002. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the european cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, tephritidae). *Molecular Ecology* 11, 2425-2434.
- Rigaud T. & Juchault P. 1995. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *Journal of Evolutionary Biology* 8, 249-255.
- Rio R.V.M., Wu Y.N., Filardo G. & Aksoy S. 2006. Dynamics of multiple symbiont density regulation during host development: Tsetse fly and its microbial flora. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 805-814.
- Rousset F., Braig H.R. & O'Neill S.L. 1999. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. *Heredity* 82, 620-627.
- Rousset F., Raymond M. & Kjellberg F. 1991. Cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens* - how to explain a cytotype polymorphism. *Journal of Evolutionary Biology* 4, 69-81.
- Rousset F. & Solignac M. 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6389-6393.
- Sakurai M., Koga R., Tsuchida T., Meng X.Y. & Fukatsu T. 2005. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Novel cellular

tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4069-4075.

Scarborough C.L., Ferrari J. & Godfray H.C.J. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310, 1781-1781.

Simon J.C., Carre S., Boutin M., Prunier-Leterme N., Sabater-Munoz B., Latorre A. & Bournoville R. 2003. Host-based divergence in populations of the pea aphid: Insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 1703-1712.

Sinkins S.P., Braig H.R. & Oneill S.L. 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261, 325-330.

Telschow A., Hammerstein P. & Werren J.H. 2002a. Effects of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: Mainland-island model. *Integrative and Comparative Biology* 42, 340-351.

Telschow A., Hammerstein P. & Werren J.H. 2002b. The effect of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: Models with two-way migration. *American Naturalist* 160, S54-S66.

Telschow A., Hammerstein P. & Werren J.H. 2005a. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* 59, 1607-1619.

Telschow A., Yamamura N. & Werren J.H. 2005b. Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. *Journal of Theoretical Biology* 235, 265-274.

Thao M.L.L. & Baumann P. 2004. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Current Microbiology* 48, 140-144.

Thompson J.N. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press. Chicago.

Tsuchida T., Koga R. & Fukatsu T. 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303, 1989-1989.

Van Borm S., Wenseleers T., Billen J. & 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* 26, 102-109.
- Vandenheuvel J., Verbeek M. & Vanderwilk F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology* 75, 2559-2565.
- Vautrin E., Charles S., Genieys S. & Vavre F. 2007. Evolution and invasion dynamics of multiple infections with *Wolbachia* investigated using matrix based models. *Journal of Theoretical Biology* 245, 197-209.
- Vautrin E., Genieys S., Charles S. & Vavre F. 2008. Do vertically-transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *Journal of Evolutionary Biology* (en prensa).
- Vavre F., Dedeine F., Quillon M., Fouillet P., Fleury F. & Bouletreau M. 2001. Within-species diversity of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. *Evolution* 55, 1710-1714.
- Vavre F., Fleury F., Lepetit D., Fouillet P. & Bouletreau M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1711-1723.
- Wernegreen J.J. 2004. Endosymbiosis: Lessons in conflict resolution. *Plos Biology* 2, 307-311.
- Werren J.H. 1997. *Biology of Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42, 587-609.
- Werren J.H. & Bartos J.D. 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Current Biology* 11, 431-435.
- Werren J.H., Windsor D. & Guo L.R. 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 262, 197-204.
- Werren J.H. & Windsor D.M. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267, 1277-1285.
- Werren J.H., Zhang W. & Guo L.R. 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* - reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261, 55-63.

- Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N., Huntemann M., Richter M., Gloeckner F.O., Boffelli D., Anderson I.J., Barry K.W., Shapiro H.J., Szeto E., Kyrpides N.C., Mussmann M., Amann R., Bergin C., Ruehland C., Rubin E.M. & Dutilier N. 2006. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 443, 950-955.
- Wu D., Daugherty S.C., Van Aken S.E., Pai G.H., Watkins K.L., Khouri H., Tallon L.J., Zaborsky J.M., Dunbar H.E., Tran P.L., Moran N.A. & Eisen J.A. 2006. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *Plos Biology* 4, 1079-1092.
- Wu M., Sun L.V., Vamathevan J., Riegler M., Deboy R., Brownlie J.C., McGraw E.A., Martin W., Esser C., Ahmadinejad N., Wiegand C., Madupu R., Beanan M.J., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Durkin A.S., Kolonay J.F., Nelson W.C., Mohamoud Y., Lee P., Berry K., Young M.B., Utterback T., Weidman J., Nierman W.C., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., O'Neill S.L. & Eisen J.A. 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wmel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *Plos Biology* 2, 327-341.
- Zchori-Fein E. & Brown J.K. 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95, 711-718.
- Zchori-Fein E., Gottlieb Y., Kelly S.E., Brown J.K., Wilson J.M., Karr T.L. & 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* 98, 12555-12560.
- Zchori-Fein E. & Perlman S.J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* 13, 2009-2016.

