

INSTITUT CAVANILLES DE BIODIVERSITAT I BIOLOGÍA EVOLUTIVA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALÈNCIA



Estudio molecular del consorcio bacteriano
Buchnera aphidicola/Serratia symbiotica en
Cinara tujafilina, el pulgón de *Platycladus*
orientalis

Tesis de Máster

Vanesa Martínez Díaz
Septiembre 2011

Directoras:

Dr. Amparo Latorre
Catedrática de Genética

Dr. Rosario Gil
Profesora Titular de Genética

Tutor: Ricardo Flores

.....*en memoria de Manuel Díaz Rodenas*

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	6
1. La planta parasitada: <i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco.....	6
2. El Pulgón: <i>Cinara tujafilina</i>	7
2.1. Características generales de los pulgones.....	7
2.2. Ciclo reproductivo de los pulgones.....	8
2.3. Clasificación de los pulgones.....	9
2.4. <i>Cinara tujafilina</i>	10
3. La simbiosis.....	12
4. El endosimbionte primario: <i>Buchnera aphidicola</i>	13
4.1. Características generales.....	13
4.2. Características genómicas.....	14
5. El endosimbionte secundario: “ <i>Candidatus Serratia symbiotica</i> ”.....	16
5.1. Características generales de los endosimbiontes secundarios o facultativos.....	16
5.2. Simbiontes secundarios en la subfamilia Lachninae.....	18
5.3. Características genómicas.....	20
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Obtención y cultivo de <i>C. tujafilina</i>	22
2. Métodos microscópicos.....	22
2.1. Disección de <i>C. tujafilina</i>	22
3. Métodos de Biología Molecular.....	23
3.1. Extracción de DNA total.....	23
3.2. Cuantificación de DNA.....	24
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
3.4. Clonación del DNA.....	26
3.5. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias.....	27
3.6. PCR cuantitativa (qPCR).....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
1. Selección de una población de <i>C. tujafilina</i> para su estudio.....	28
2. Elección del método de extracción de DNA.....	29
3. Puesta a punto de la técnica de qPCR aplicada a muestras de pulgón.....	30
3.1. Optimización de la reacción de qPCR para los genes <i>COI</i> , <i>EF1α</i> , <i>groEL</i> y <i>atpD</i>	30

3.2. Obtención de las Curvas Patrón Externas.....	31
4. Medida del efecto de la temperatura y la cautividad en la proporción de <i>B. aphidicola</i> BCt y <i>S. symbiotica</i> SCt.....	33
5. Cuantificación de endosimbiontes en tejidos del pulgón.....	35
5.1. Disección de bacteriocitos de <i>Cinara tujafilina</i>	35
5.2. Análisis de la presencia de endosimbiontes en los tejidos diseccionados.....	36
5.3. qPCR de los genes <i>COI</i> , <i>EF1α</i> , <i>groEL</i> y <i>atpD</i> en muestras diseccionadas de cabezas y bacteriocitos de <i>C. tujafilina</i>	37
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

INTRODUCCIÓN

1. LA PLANTA PARASITADA: *Platycladus orientalis* (L.) Franco

Platycladus orientalis (L.) Franco, antiguamente denominada *Thuja orientalis* (L.) Franco, es una especie arbórea de la familia de las Cupresáceas llamado comúnmente, árbol de la vida chino, biota o tuya. Su clasificación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación de *P.orientalis* (L.) Franco

Reino	Plantae
División	Pinophyta
Clase	Pinopsida
Orden	Pinales
Familia	Cupressaceae
Subfamilia	Cupressoideae
Género	Platycladus
Especie	<i>P. orientalis</i>

Esta especie es nativa del noroeste de China y está ampliamente distribuida en el este de Asia, Corea, Japón, de sur a norte de la India y de oeste a norte de Irán. En Europa su cultivo no se extendió hasta el siglo XIX, a pesar de que fue introducida en 1690. En la actualidad se comercializa en toda Europa.



Figura 1. Fotografías de (A) hoja, (B) planta completa y (C) estróbilos de *P.orientalis*.

[Fuente: (A) http://www.baumkunde.de/Platycladus_orientalis/Bild2/;

(B) <http://www.iglaki24.pl/p4076,platycladus-orientalis-zywotnik-wschodni-grunt-50-70cm-z.html>;

(C) http://www.ruhr-uni-bochum.de/boga/html/Platycladus_orientalis_Foto.html].

Son arbustos monoicos, de forma columnar o cónica e incluso oval⁵ (Figura 1). Su corteza es delgada y finamente agrietada, de un color marrón rojizo. Las ramillas son comprimidas y erectas, disponiéndose en planos verticales y sus hojas son escuamiformes, opuestas, decusadas e imbricadas en las plantas adultas. Posee estróbilos de maduración anual, ovoideos, con 6 u 8 escamas más o

menos planas, a modo de valvas. Tiene de 1 a 3 semillas por escama, ovoideas y ápteras (Fuente: http://www.floraiberica.es/v.2.0/PHP/familias_lista_.php?familia=Cupressaceae).

2. EL PULGÓN: *Cinara tujafilina*

2.1. Características generales de los pulgones

Los pulgones son insectos chupadores que pertenecen al orden Hemiptera, superfamilia Aphidoidea. Son un grupo de insectos de gran diversidad respecto a sus características morfológicas, biológicas y comportamiento. En la actualidad se conocen unas 4.000 especies en todo el mundo aunque sólo 100 han explotado el entorno agrícola como plagas, hasta el grado de provocar pérdidas económicas significativas^{7,74}. De estas 4.000 especies, la mayoría viven en regiones templadas, donde llegan a colonizar el 25% de las especies de plantas existentes²⁵.

Todos los pulgones son fitófagos y se alimentan del floema de las plantas gracias a poseer un aparato bucal picador-chupador en posición ventral y dirigido hacia atrás. Se consideran plaga cuando causan daños en el material vegetal del que se están alimentando, lo que repercute en el beneficio económico del agricultor. Los daños y síntomas que pueden producir se enumeran a continuación:

1. Debilitamiento de la planta como consecuencia de la succión del contenido celular o del floema, que lleva a una pérdida de nutrientes. Necrosado en hojas.
2. Vectores de enfermedades de numerosos virus vegetales. Casi el 50% de los insectos vectores de virus (275 de 600) son pulgones^{44,68}.
3. Pueden ser fitotóxicos, ya que mientras se alimentan inyectan saliva²².
4. Pueden provocar deformación del tejido celular. Algunos inducen al vegetal a producir agallas.
5. Como consecuencia de que expulsan sustancias azucaradas (melaza) donde frecuentemente crece la fumagina (negrilla), pueden dificultar la capacidad fotosintética de la planta hospedadora²².
6. Finalmente, como segregan por medio de los cornículos sustancias cerosas no azucaradas, el valor económico del cultivo o planta se puede ver depreciado.

Uno de los rasgos más característicos de los pulgones es el polimorfismo. Una misma especie presenta formas distintas según las épocas del año (emigrantes, virginóparas, sexúparas, sexuales) y a su vez coexisten individuos ápteros y alados. En general, los pulgones son de forma globosa u ovoide, de cuerpo blando débilmente esclerotizado en el abdomen (sobre todo en individuos ápteros). Su pigmentación y talla son muy variables, midiendo entre 0.5 y 7 mm. La morfología de los pulgones alados es mucho menos variable, que la de los ápteros. Su cuerpo se divide en tres zonas, cabeza, tórax y abdomen, más o menos diferenciadas, dependiendo de la especie en cuestión (Figura 2A). Sus piezas bucales, adaptadas para taladrar las plantas y sorber la savia, están formadas por cuatro estiletos. Presentan dos ojos compuestos y un tubérculo ocular por encima de cada ojo, formado por tres lentes, llamado triomatidia. Sus patas no están adaptadas al movimiento rápido. Pueden poseer cornículos (o sifones) en el abdomen por los que expulsan sustancias cerosas procedentes de la

hemolinfa, generalmente con función defensiva. Los sifones aparecen en la gran mayoría de pulgones que habitan en cultivos agrícolas. También poseen una prolongación en la parte final del abdomen denominada cauda, que utilizan para expulsar la melaza. Las gotas de melaza son muy pegajosas y, si al ser expulsadas les caen encima, pueden quedar inmovilizados, por lo que la cauda ejerce función de pala para expulsar las gotas de melaza ya formadas. Estas últimas dos estructuras, los sifones y la cauda, son utilizados por los taxónomos para llevar a cabo la identificación de especies.

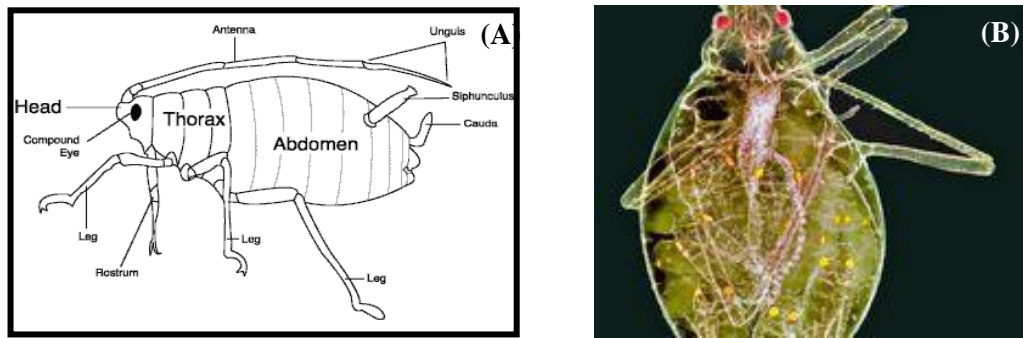


Figura 2. (A) Esquema de las principales partes de un pulgón. [Fuente: <http://insected.arizona.edu/gg/resource/external.html>]. (B) Fotografía de Tomas Cabello, investigador de la UAL, "El pulgón negro de las habas" galardonada en la Nikon small World Competition 2010.

Los enemigos naturales de los pulgones son: escarabajos (Coleoptera: *Coccinellidae*), larvas de sírfidos (díptera: *Syrphidae*), avispas parasitarias, larvas de la mosquita del pulgón, arañas cangrejo, crisopas (neuróptera: *Chrysopidae*) y hongos entomopatógenos como *Lecanicillium lecanii*. Por el contrario, muchas especies establecen relaciones beneficiosas con hormigas, que se alimentan de la melaza producida por los pulgones, quienes se benefician por su parte de la protección que éstas les ofrecen frente a ciertos depredadores.

2.2. Ciclo reproductivo de los pulgones

El ciclo reproductivo de los pulgones es uno de los aspectos más destacable de su biología⁵⁶. Su estudio es relevante por dos motivos: por una parte, el estudio en los pulgones que sean plaga de cultivos agrícolas puede ser esencial para ejercer unas efectivas medidas de control⁴⁰. Por otra parte, los pulgones son un buen modelo de estudio para abordar problemas excepcionales en biología evolutiva.

Los pulgones son insectos adaptados a multiplicarse rápidamente para aprovechar recursos efímeros. Por ello, durante la mayor parte del año se reproducen con rapidez por partenogénesis y viviparidad. En su ciclo, suelen tener una época sexual y otra asexual. A su vez, estas épocas pueden desarrollarse en plantas hospedadoras distintas, de forma que en la fase sexual suelen ser monófagos mientras en la asexual muestran una gran polifagia. Las especies que muestran esta alternancia de ciclos se denominan holocíclicas, y las que no, anholocíclicas. En las especies holocíclicas, tal y como muestra la Figura 3, tras la puesta en invierno de huevos de resistencia procedentes de la reproducción

sexual, se produce su eclosión en primavera, dando lugar a hembras vivíparas que se reproducirán partenogénicamente durante la primavera y el verano. Sólo en caso de una sobrepoblación o un deterioro de la planta se producirán individuos alados, capaces de colonizar nuevas plantas. Con la bajada de las temperaturas, en otoño, aparecen las formas sexuadas que darán lugar de nuevo a los huevos de resistencia.

Adicionalmente, si los individuos holocíclicos no alternan la especie de planta hospedadora, las especies se denominan monoicas, y si la alternan, dioicas. Las especies dioicas tienen un hospedador primario (sobre el que se desarrollan las hembras sexuadas) que suele ser una planta leñosa, y un hospedador secundario (sobre el que se desarrollan las sucesivas generaciones de hembras vivíparas y partenogénicas), que suele ser una o varias plantas herbáceas. Algunas especies tienen una gran cantidad de hospedadores secundarios.

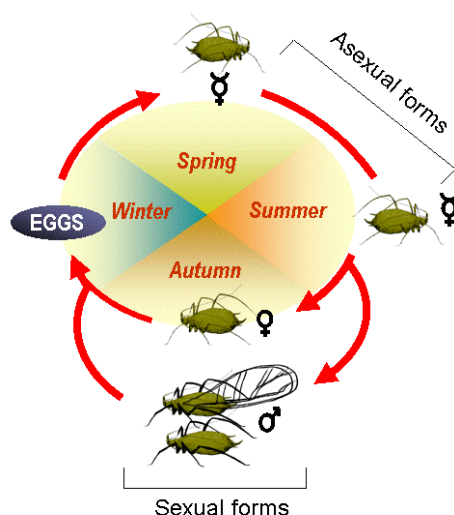


Figura 3. Esquema del ciclo reproductivo de los pulgones.
[Fuente: http://www.aphidbase.com/aphidbase/community_links/the_pea_aphi].

En las especies anholocíclicas, la reproducción ocurre exclusivamente mediante partenogénesis, con madres que contienen embriones (Figura 2B) que a su vez contienen embriones. Este fenómeno se conoce como generaciones condensadas o telescópicas.

La mayoría de especies de pulgones son monoicas holocíclicas. Sin embargo, las que causan daños a los cultivos suelen ser dioicas y, en muchos casos, anholocíclicas.

2.3. Clasificación de los pulgones

Se han propuesto diferentes clasificaciones para la familia Aphididae, basándose en caracteres morfológicos^{41,98} y en datos moleculares^{52,72,93} que ofrecen variaciones en algunas de las relaciones propuestas. La clasificación propuesta por⁷⁴ es la que seguimos en el grupo de Genética Evolutiva y se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de la familia Aphididae⁷⁴.

SUBFAMILIA	TRIBU	GÉNERO	
Theanaxinae	---	<i>Theanax</i>	
Eriosomatinae	Pemphigini	<i>Pemphigus</i>	
	Eriosomatini	<i>Erisoma</i>	
		<i>Tetraneura</i>	
		<i>Baizongia</i>	
	Fordini	<i>Geoica</i> <i>Forda</i>	
Myzocallidinae	Myzocallidini	<i>Panaphis</i> <i>Cromaphis</i> <i>Tinocallis</i>	
		Chaitophorini	<i>Chaitophorus</i> <i>Peryphyllus</i>
			Lachninae
Eulachnini	<i>Cinara</i>		
Tramini	<i>Eulachnus</i>		
Pterocommatinae	---	<i>Pterocomma</i>	
Aphidinae	Aphidini	<i>Aphis</i> <i>Hyalopterus</i> <i>Rhopalosiphum</i> <i>Acythosiphon</i> <i>Brachycaudus</i> <i>Corylobium</i> <i>Diuraphis</i> <i>Macrosiphoniella</i> <i>Macrosiphum</i> <i>Megoura</i> <i>Myzus</i> <i>Roepkea</i> <i>Sitobion</i> <i>Uroleucon</i>	
		Macrosiphini	

2.4. *Cinara tujafilina*

C. tujafilina, el pulgón de la tuya, vive sobre especies de varios géneros de cupresáceas, preferentemente *Platycladus*, *Callitris*, *Chamaecyparis*, *Libocedrus* y *Widdringtonia*. Su distribución geográfica es cosmopolita, por acción antrópica⁶. Tradicionalmente se ha considerado como una especie anholocíclica, ya que en las zonas templadas no suelen encontrarse individuos sexuales,

aunque no se descarta que exista una fase sexuada (J. M. Michelena, comunicación personal). Entre mayo y octubre presenta individuos alados. En primavera coloniza los brotes, las arcéstidas y la parte posterior de las ramas cercanas al tronco, en tejidos donde existan heridas, y a mitad del verano las ramas más viejas y los troncos, llegando a descender a las raíces^{8,18}. En condiciones favorables, las colonias pueden ser muy numerosas provocando el desarrollo de mucha fumagina sobre la melaza, lo que ocasiona una disminución del crecimiento y marchitamiento de las plantas atacadas¹³.

Tabla 3. Especies de la Subfamilia Lachninae Herrich-Schaeffer, 1854; Tribu Eulachnini Baker, 1920 y Gen. *Cinara* Curtis, 1835.

Subgen. <i>Cinara</i> Curtis, 1835	<i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>acutirostris</i> Hille Ris Lambers, 1956 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>balachowskyi</i> Remaudière, 1974 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>brauni</i> Börner, 1940 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>cedri</i> Mimeur, 1936 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>confinis</i> (Koch, 1856) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>costata</i> (Zetterstedt, 1828) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>guadarramae</i> Mimeur, 1936 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>gudaris</i> Binazzi y Sanchís, 1994 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>hyperophila</i> (Koch, 1855) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>laricis</i> (Hartig, 1839) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>maghrebica</i> Mimeur, 1934 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>maritimae</i> (Dufour, 1833) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>montanicola</i> Börner, 1939 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>neubergi</i> (Arnhart, 1930) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>nuda</i> Mordvilko, 1895 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>palaestinensis</i> Hille Ris Lambers, 1948 <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pectinatae</i> (Nördlinger, 1880) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>piceae</i> (Panzer, 1801) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>piceicola</i> (Cholodkovsky, 1896) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pilicornis</i> (Hartig, 1841) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pilosa</i> (Zetterstedt, 1840) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pineae</i> (Mordvilko, 1895) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pini</i> (Linnaeus, 1758) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pinihabitans</i> (Mordvilko, 1896) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>pruinosa</i> (Hartig, 1841) <i>Cinara</i> (<i>Cinara</i>) <i>schimitscheki</i> Börner, 1940
Subgen. <i>Cedrobium</i> Remaudière, 1954	<i>Cinara</i> (<i>Cedrobium</i>) <i>laportei</i> (Remaudière, 1954)
Subgen. <i>Cupressobium</i> Börner, 1940	<i>Cinara</i> (<i>Cupressobium</i>) <i>cupressi</i> (Buckton, 1881) <i>Cinara</i> (<i>Cupressobium</i>) <i>fresai</i> E.E. Blanchard, 1939 <i>Cinara</i> (<i>Cupressobium</i>) <i>juniperi</i> (DeGeer, 1773) <i>Cinara</i> (<i>Cupressobium</i>) <i>oxycedri</i> Binazzi, 1996 <i>Cinara</i> (<i>Cupressobium</i>) <i>tujafilina</i> (del Guercio, 1909)

C. tujafilina pertenece a la familia Aphididae y, dentro de esta, a la subfamilia Lachninae. Esta subfamilia, a su vez, está dividida en tres tribus: Eulachnini, Lachnini y Tramini. Dentro de la tribu Eulachnini² encontramos el género *Cinara*, con tres subgéneros: *Cinara*, *Cedrobium* y *Cupressobium*, tal y como muestra la Tabla 3. Las especies pertenecientes a estos tres subgéneros se alimentan de coníferas.

La identificación de *C. tujafilina* se basa principalmente en el análisis del filamento terminal, el cual debe medir entre 0.004 y 0.048 mm, junto con el número de setas en el antenómero IV que debe ser 5 ó 6. Las hembras vivíparas ápteras miden de 1,7 a 3,5 mm, presentando un color castaño, algo anaranjado, con una tenue cerosidad blanquecino-grisácea, destacando en el dorso dos líneas oscuras divergentes hacia atrás llegando casi a los cornículos (Figura 4). Las patas son claras, con la mitad distal de los fémures ligeramente más oscuros que el resto de artejo, y el ápice de las tibias y los tarsos negruzcos. Las hembras vivíparas aladas son semejantes a las ápteras, con pigmentación más intensa en anteras, patas y setas de las tibias posteriores más largas (hasta 0.250 mm).



Figura 4. Fotografía de ninfas y hembras adultas de *Cinara tujafilina*. [Fuente: <http://www.aphidweb.com/Aphids%20of%20Karnataka/Cinaratujafilina.htm>]

3. LA SIMBIOSIS

El término simbiosis del griego: σύν (sym) "con"; y βίωσις (bioun) "vivir", hace referencia a la relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies. En la relación de simbiosis podemos distinguir dos organismos: el hospedador (generalmente de mayor tamaño), y el huésped, el cual recibe el nombre de simbiote.

Las relaciones simbióticas se pueden clasificar dependiendo de su localización (endo y ectosimbiontes), en base al grado de dependencia que tengan con su hospedador (obligada o facultativa) y en función a las ventajas o desventajas que se deriven de esta asociación (mutualismo, comensalismo y parasitismo). A continuación se definen todos estos tipos de simbiosis:

- **Endosimbiosis:** el simbiote vive todo o parte de su ciclo de vida dentro de los tejidos o células de su hospedador.

- **Ectosimbiosis:** el simbiote reside sobre el organismo hospedador.
- **Simbiosis obligada:** la relación simbiótica es esencial para la supervivencia de los miembros de la asociación
- **Simbiosis facultativa:** los participantes son capaces de vivir en asociación o como seres independientes.
- **Mutualismo:** la relación de simbiosis beneficia a ambos participantes.
- **Comensalismo:** sólo uno de los miembros obtendrá un beneficio de la relación, mientras que el otro no se verá afectado.
- **Parasitismo:** en este caso existe un perjuicio para uno de los participantes.

En esta Tesis de Máster se estudiará la relación simbiótica existente entre tres organismos. El hospedador, el pulgón *C. tujafilina*, y sus dos bacterias simbiotes: un endosimbionte obligado, *Buchnera aphidicola* y un simbiote facultativo, “*Candidatus Serratia simbiótica*”.

4. EL ENDOSIMBIONTE PRIMARIO: *Buchnera aphidicola*

4.1. Características generales

B. aphidicola fue descrita por primera vez por el biólogo alemán Paul Buchner en 1965, en cuyo honor recibió su nombre⁶⁵. Su clasificación se presenta a continuación:

Tabla 4: Clasificación, basada en la secuencia del rDNA 16S⁶⁴.

Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria (grupo $\gamma 3$)
Orden	Thiotrichales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Buchnera</i>
Especie	<i>Buchnera aphidicola</i>

B. aphidicola es el endosimbionte primario de los pulgones, a excepción de algunas especies de la tribu *Cerataphidini* que carecen de ésta, y que en su lugar contienen levaduras simbiotes extracelulares^{3,9,34}. La relación simbiótica entre *B. aphidicola* y los pulgones es de carácter nutricional. Los pulgones se alimentan del floema de la planta parasitada, rica en hidratos de carbono pero deficitaria en compuestos nitrogenados, como aminoácidos esenciales^{26,79} y vitaminas⁶⁷, que son suministrados por el endosimbionte. Se trata de una simbiosis mutualista obligada, es decir, la bacteria es incapaz de sobrevivir fuera de su hospedador, hasta el punto de no poder ser cultivada en el laboratorio. Por su parte, los pulgones necesitan a la bacteria para poder crecer y reproducirse^{51,81}.

La bacteria se encuentra confinada en los bacteriocitos, células poliploides especializadas del pulgón, englobadas en vesículas denominadas simbiosomas. Los bacteriocitos se agrupan

constituyendo un órgano denominado bacterioma, localizado en el hemocele del insecto, debajo del tracto digestivo. El número de bacteriocitos por bacterioma varía, siendo en el caso de *Acythosiphon pisum* del orden de 60 a 90²⁷, y menor cuando el pulgón alcanza el estadio adulto²⁸.

Se transmiten de madres a huevos o embriones en desarrollo. Millones de años de transmisión estrictamente vertical, sin fenómenos de transferencia horizontal y, por lo tanto, sin intercambio de material genético con otras bacterias, ha posibilitado la coevolución de hospedador y endosimbionte. Gracias a estudios moleculares, se ha establecido que dicha asociación se inició hace de 80-150 millones de años⁹³.

Las células de *B. aphidicola* poseen una forma esférica (véase Figura 7 en la página 18), con un tamaño medio de 2.9 μm ⁵⁴. Al microscopio, se observan tres membranas: la doble membrana característica de las bacterias gran negativas^{39,42,53} y la perteneciente a la vesícula de la célula eucariota que la alberga⁴³. Las células son poliploides, con un número promedio de copias genómicas por bacteria de 120 en el caso de *A. pisum*⁴⁶.

4.2. Características genómicas

Los endosimbiontes primarios presentan varios rasgos genómicos que los distinguen de sus pariente de vida libre, siendo los más relevantes la drástica reducción en el tamaño de su genoma y el aumento en el contenido de A+T⁶³. Otra consecuencia de estos efectos en el genoma de simbiontes primarios es el sesgo en el uso de codones, a diferencia de las bacteria de vida libre^{62,75}.

El grado de reducción en el tamaño del genoma y el aumento en el porcentaje de A+T es variable entre endosimbiontes, y presenta una correlación con la edad de la asociación simbiote-insecto (Tabla 5). Asociaciones antiguas presentan genomas más pequeños y un mayor contenido en A+T, que puede superar el 70%^{4,19,61,63,94}.

El proceso de cambio de una bacteria de vida libre a un ambiente intracelular implica que muchos de sus genes pueden ser innecesarios o incluso redundantes, de forma que sus funciones pueden ser suplidas por el hospedador. De esta forma, se observa una pérdida de genes estructurales, elementos reguladores y mecanismos de reparación del DNA^{57,96}, lo que implica una menor flexibilidad transcripcional y menor capacidad de respuesta a situaciones de estrés^{59,82,85}. La pérdida de este material genético puede darse sin efecto perjudicial para la simbiosis, acumulándose mutaciones debido a una relajación de la selección natural y al efecto de la deriva genética. Además, su aislamiento dificulta o imposibilita la transferencia horizontal de material genético, por lo que las pérdidas son irreversibles. En cuanto al aumento en el contenido de A+T, probablemente se debe a la pérdida de genes para la reparación del DNA, conduciendo a una mutación de GC por AT⁹⁵. Como consecuencia de estos cambios en zonas codificantes, se modificará la estructura y función de determinadas proteínas. De hecho, se ha propuesto que la chaperonina GroEL, la cual se sobreexpresa constitutivamente en *B. aphidicola*, ayuda al plegamiento postransduccional de aquellas proteínas cuya estructura está alterada³⁰.

Tabla 5: Datos genómicos de simbioses mutualistas en animales⁶³.

Organism	Host	Metabolic mode	Genome size (kb)	GC content (%)	CDS	rRNAs	tRNAs	Pseudogenes	Accession number
<i>Buchnera aphidicola</i> BAp*	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (aphid) [†]	Heterotroph	652	26.24	574	3	32	12	BA000003, AP001070, AP001070
<i>Buchnera aphidicola</i> BSg*	<i>Schizaphis graminum</i> (aphid)	Heterotroph	653	26.3	556	3	32	33	AE013218, AF041836, Z21938
<i>Buchnera aphidicola</i> BBp*	<i>Batzongia pistaciae</i> (aphid)	Heterotroph	618	25.3	507	3	32	9	AE016826, AF492591
<i>Buchnera aphidicola</i> BCc*	<i>Cinara cedri</i> (aphid)	Heterotroph	422	20.2	362	3	31	3	CP000263, AY438025
<i>Blochmannia floridanus</i> ^{‡§}	<i>Camponotus floridanus</i> (carpenter ant)	Heterotroph	706	27.4	583	3	37	4	BX248583
<i>Blochmannia pennsylvanicus</i> ^{‡§}	<i>Camponotus pennsylvanicus</i> (carpenter ant)	Heterotroph	792	29.6	610	3	39	4	CP000016
<i>Wigglesworthia glosinidita</i> *	<i>Glossina brevipalpis</i> (tsetse fly)	Heterotroph	698	22.5	617	6	34	14	BA000021, AB063523
<i>Sodalis glosiniditus</i> *	<i>Glossina morsitans</i> (tsetse fly) [†]	Heterotroph (Secondary)	4,171	54.7	2,516	7	69	972	AP008232, AP008233, AP008234, AP008235
<i>Baumannia cicadellincola</i> ^{‡§}	<i>Homalodisca coagulata</i> (sharpshooter)	Heterotroph	686	33.2	595	6	39	9	CP000238
<i>Sulcia muelleri</i> [¶]	<i>Homalodisca coagulata</i> (sharpshooter)	Heterotroph	245	22.4	227	3	31	–	CP000770
<i>Carsonella ruddii</i> ^{‡§}	<i>Pachypsylla venusta</i> (psyllid)	Heterotroph	160	16.6	182	3	28	–	AP009180
<i>Wolbachia wBm</i> [¶]	<i>Brugia malayi</i> (nematode) [¶]	Heterotroph	1,080	34	805	3	34	98	AE017321
<i>Ruthia magnifica</i> ^{‡§}	<i>Calypogena magnifica</i> (Deep-sea clam)	Autotroph	1,200	34.0	976	3	36	–	CP000488
<i>Vesticomysoctus okutanii</i> ^{‡§}	<i>Calypogena okutanii</i> (Deep-sea clam)	Autotroph	1,000	31.6	937	3	35	–	AP009247
<i>Nitratiruptor</i> sp ^{**}	Deep-sea-vent animals	Autotroph	1,878	39.7	~1,118	9	45	~739 ^{††}	AP009178
<i>Sulfurovum</i> sp ^{**}	Deep-sea-vent animals	Autotroph	2,563	43.8	~1,218	9	44	~1,248 ^{††}	AP009179

The data shown are for those symbionts that have been sequenced as of January 2008. Data were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). *γ-Proteobacteria. †Genome sequence in progress. ‡These bacteria are called *Candidatus*. §Bacteroidetes. ¶α-Proteobacteria. ††Complete genome available, see RFF 7A. **ε-Proteobacteria; although it is unclear whether these two isolates are epibiotic symbionts or another variation of symbionts, many genome features

En la actualidad se ha secuenciado completamente el genomas de cinco cepas de *B. aphidicola*, dos de ellas pertenecientes a dos especies de pulgones de la familia Aphidinae, *A. pisum*⁸² y *Schizaphis graminum*⁸⁵; la tercera perteneciente a un miembro de la subfamilia Eriosomatinae, *Batzongia pistaciae*⁹² y las dos últimas procedentes de pulgones de la subfamilia Lachninae, *Cinara cedri*⁷³ y *C. tujaefilina*⁴⁸. Todas estas cepas poseen un tamaño de genoma distinto, destacando *B. aphidicola* BCc y BCt cuyos genomas tienen una longitud de 422 kb y 453 kb, respectivamente, unas 200 kb menores que el resto de cepas de *B. aphidicola* secuenciadas^{48,73}.

El grupo de Genética Evolutiva del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (ICBiBE) se ha dedicado, en los últimos años, al estudio en profundidad de la simbiosis entre bacterias e insectos. Pérez-Brocal y colaboradores (2006) estudiaron a *B. aphidicola* BCc, endosimbionte primario del pulgón *C. cedri*, planteando la hipótesis de que, dada su extremada reducción genómica (había perdido determinadas funciones vitales para su supervivencia y la de su hospedador) y la presencia de “*Ca. Serratia symbiotica*” en todas las poblaciones analizadas, se podría estar produciendo un reemplazamiento del primero por este segundo endosimbionte. Sin embargo, en los

últimos años, los estudios filogenéticos, morfológicos, genómicos y funcionales realizados por Lamelas y colaboradores⁴⁷⁻⁴⁹ han llevado a la conclusión de que la cepa *B. aphidicola* BCc no está siendo reemplazada por “*Ca. Serratia symbiotica*”, sino que se ha establecido una estrecha complementación metabólica entre ambas, formando un consorcio bacteriano.

Los estudios de Gil y colaboradores (2002)³⁷ sobre el tamaño de los genomas de cepas de *B. aphidicola* procedentes de diferentes familias de pulgones habían puesto de manifiesto que todos los pulgones de la subfamilia Lachninae analizados presentan cepas de *B. aphidicola* con un tamaño genómico muy reducido, por lo que cabe preguntarse si en los otros pulgones de esta subfamilia podría estar sucediendo un proceso evolutivo similar al descrito en *C. cedri*.

En esta Tesis de Máster trabajaremos con los endosimbiontes, del pulgón *C. tujaefilina*: el primario u obligado *B. aphidicola* BCt y el secundario o facultativo *S. symbiotica* SCt. El genoma de *B. aphidicola* BCt, está compuesto de un cromosoma circular de 444.930 pb⁴⁸, más un plásmido de 8.069 pb, denominado pLeu/Trp-BCt³⁷ que contiene todos los genes necesarios para la síntesis de leucina y los dos genes implicados en el primer paso de la ruta de síntesis de triptófano, ambos aminoácidos esenciales. Su contenido en C+G es del 25%. Su número total de genes es de 404, de los cuales 367 son genes codificantes de proteínas, y 9 pseudogenes.

5. EL ENDOSIMBIONTE SECUNDARIO: “*Candidatus Serratia symbiotica*”

5.1. Características generales de los endosimbiontes secundarios o facultativos

Su existencia fue descrita por primera vez en 1965 por Buchner y, posteriormente, se caracterizó molecularmente el primer simbiote secundario en *A. pisum*⁹¹.

Estas bacterias se han denominado genéricamente simbioses secundarios o facultativos debido a que su presencia no resulta esencial para la supervivencia del hospedador, ya que no aparecen en todos los individuos de una especie o de una cepa concreta, dándose un amplio abanico de posibilidades, desde su ausencia a su coexistencia con varias especies bacterianas junto con el endosimbionte primario⁶⁹. Aunque se transmiten preferentemente de forma vertical, estudios filogenéticos han mostrado casos de transferencia horizontal, al no existir cocladogénesis con el hospedador⁷⁶.

Mediante el estudio de la secuencia del 16S del rDNA se han determinado los siguientes linajes de simbioses secundarios en pulgones:

- “*Candidatus Serratia symbiotica*”⁶⁰.
- “*Candidatus Hamiltonella defensa*”⁶⁰.
- “*Candidatus Regiella insecticola*”⁶⁰.
- Tipo V⁷⁶.
- YSMS (*Yamatocallis Secondary Mycetocyte Symbiont*)³².
- Tipo Ars (abreviatura de *Arsenophonus*)⁷⁶.
- Tipo So-So (Abreviatura de *Sitophilus oryzae* y de *Sodalis glossinidius*)⁷⁶.

- *Wolbachia*³⁸.
- *Rickettsia*^{14,78}.
- *Spiroplasma*³².

El grupo más abundante y mejor descrito hasta el momento, son las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (phylum Proteobacteria, clase γ -proteobacteria), al que pertenecen todos los linajes mencionados excepto los tres últimos. De todos ellos, los más estudiados y, sin duda, los más importantes en los pulgones, son los tres primeros: “Ca Serratia symbiotica”, “Ca Hamiltonella defensa” y “Ca Regiella insecticola”⁶⁰. Recientemente se ha secuenciado el genoma de los tres en la especie *A. pisum*^{11,23,24}. A partir de este momento, y para facilitar la lectura, se prescinde del término Candidatus y se sigue la nomenclatura de género (primera letra) y especie.

S. symbiotica se ha identificado en pulgones de las tribus Macrosiphini, Aphidini, Chaitophorini, Eulachnini (Lachninae), Fordini, Lachnini (Lachninae) y Pemphigini^{16,35,76,80,90,91}. Una característica que diferencia a *H. defensa* de los otros dos simbioses es que no solo infecta a pulgones, sino también a otro tipo de insectos, como por ejemplo, psílidos (*Cacapsylla pyri*)⁷⁶, y mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii*)^{17,20,87}. En pulgones, ha sido descrita en las tribus Macrosiphini, Aphidini, Chaitophorini, Fordini y Pemphigini^{21,76,80}. Por último, *R. insecticola* se ha encontrado en pulgones de las tribus Macrosiphini, Aphidini, Chaitophorini y Pemphigini^{76,80,90}.

Los simbioses secundarios se puede localizar en bacteriocitos específicos, llamados bacteriocitos secundarios, pero también se encuentran alrededor o invadiendo bacteriocitos primarios, en células de la vaina o libres en el hemocele del insecto^{35,60} pudiendo presentar morfologías diferentes⁸⁴.

A pesar de ser facultativos y, por tanto, no ser necesarios para la supervivencia del pulgón, en los últimos años diversos estudios (sobretudo en *A. pisum*), han descritos casos de efectos positivos sobre los mismos^{14,15,45,55,71,89}. A continuación se enumeran algunos ejemplos:

- Se ha demostrado que algunos simbioses facultativos son capaces de sintetizar compuestos biológicamente activos (por ejemplo, toxinas), proporcionando al insecto protección. Este es el caso de *H. defensa*, que protege a *A. pisum* contra la avispa parasitoide *Aphidius ervi*⁷⁰ y de *S. symbiotica*⁷¹.
- Los pulgones no sólo pueden ser atacados por otros insectos, sino que también están sujetos a posibles infecciones por parte de virus, bacterias y hongos. *R. insecticola* protege del ataque del hongo *P. neoaphidis*, cuyas esporas e hifas colonizan la cutícula del pulgón produciéndole la muerte.
- En un trabajo reciente, se alimentó con dietas artificiales (azúcar y aminoácidos en concentraciones variables) a diferentes clones de *A. pisum* infectados por *H. defensa*, *R. insecticola* o *S. symbiotica*. Los resultados revelaron pequeñas variaciones en la tasa de crecimiento de los pulgones con distintos simbioses. Se observó que el número de estas bacterias aumentaba cuando disminuían los niveles de nitrógeno en la dieta, lo que permitiría al pulgón utilizar plantas con un bajo nivel de nitrógeno en su savia⁹⁷. Este trabajo reveló, por

tanto, que una de las funciones más importantes de los simbioses secundarios puede ser la aportación de nutrientes esenciales a la dieta del pulgón.

- iv. Por último, muchos pulgones son vulnerables a las altas temperaturas, disminuyendo su tamaño, fecundidad y supervivencia y aumentando el tiempo del desarrollo¹⁵. La exposición al calor disminuye el número de bacteriocitos y, como consecuencia, el número de células de *B. aphidicola*, lo que probablemente explicaría la baja eficacia biológica de estos pulgones. *S. symbiotica* SAp actúa aminorando los efectos deletéreos que produce el choque térmico al pulgón mediante la protección de las células de los bacteriocitos^{10,55,77}. Además, se ha observado que existe una correlación entre la frecuencia de *S. symbiotica* y las estaciones, siendo mayor su presencia en los meses de verano. Aun así, hay que tener en cuenta que ha sido descrita una mutación recurrente en el promotor de un gen de choque térmico en *B. aphidicola* que favorece la tolerancia al calor en *A. pisum* y que se puede confundir con los efectos de simbioses facultativos²⁹.

5.2. Simbioses secundarios en la subfamilia Lachninae.

En la subfamilia Lachninae, los pocos estudios que se han llevado a cabo han reportado la presencia de γ -proteobacterias como simbioses secundarios^{33,36,76}. Además, el estudio realizado por Lamelas y colaboradores (2008)⁴⁹ demostró la presencia de simbioses secundarios en 14 especies de la subfamilia Lachninae (todas las estudiadas excepto la especie *Stomaphis cupressi*) y en la mayoría de éstas el simbiose secundario resultó ser *S. symbiotica*. Por ello parece plausible que *S. symbiotica* pudiera estar establecida en linaje de los Lachnidos desde largo tiempo atrás y, por tanto, coevolucionar con el endosimbionte primario *B. aphidicola*. En el análisis filogenético realizado en dicho trabajo a partir de los árboles obtenidos con el gen ribosomal 16S y con el gen *atpD* (Figura 6), quedo demostrada la existencia de dos grandes clados. El clado A alberga las cepas correspondientes a los pulgones de las subfamilias: Aphidinae, Chaitophorinae, Eriosomatinae y algunos miembros de la tribu Eulachnini de la subfamilia Lachninae del subgenero *Cinara Cupressobium* el cual contiene la cepa en estudio en esta Tesis de Máster, *S. symbiotica* SCt. En cambio, el clado B comprende solo miembros de la subfamilia Lachninae; en concreto, miembros del subgénero *Cinara Cinara* de la tribu Eulachnini a la cual pertenece la cepa *S. symbiotica* SCc, endosimbionte co-primario de *C. cedri*, más las especies *Lachnus roboris* y *Tuberolachnus salignus* de la tribu Lachnini. Dado que la secuenciación de los genomas de *B. aphidicola* BCC⁷³ y *S. symbiotica* SCc⁴⁸, muestran que ambas bacterias son obligadas o co-primarias en *C. cedri*, se postuló que las cepas de *S. symbiotica* pertenecientes al clado B son simbioses obligadas mientras que las cepas del clado A, a la que pertenece *S. symbiotica* SCt, son facultativas. Esta asociación no obligada se demostró en el caso de *S. symbiotica* de *A. pisum* mediante la secuenciación de su genoma¹¹.

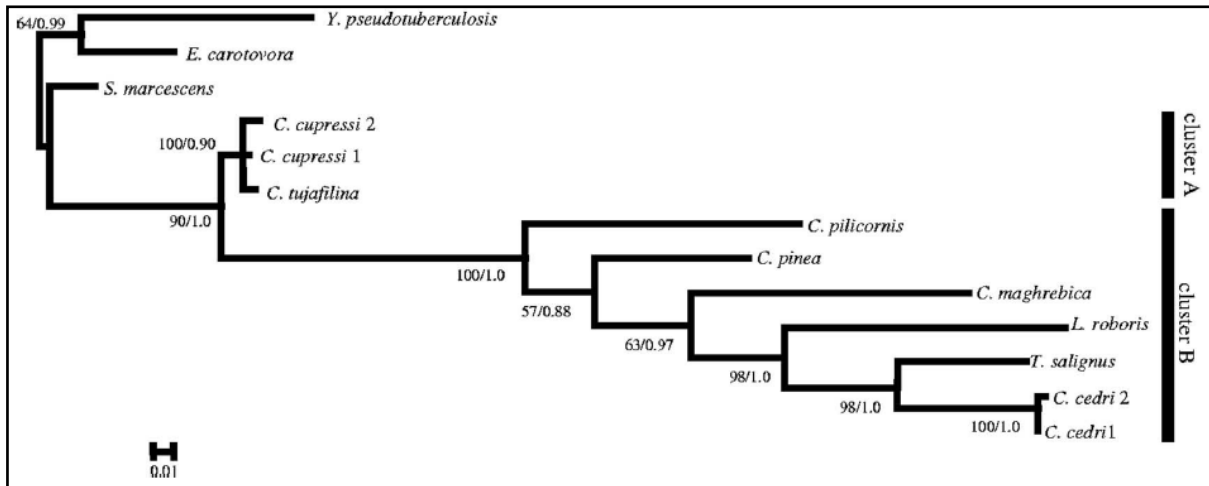


Figura 6. Árbol filogenético de *S. symbiotica* en Lachnidos a partir de gen *atpD*⁴⁹. *Serratia marcescens* es una bacteria de vida libre. *Erwinia carotova* y *Yersinia pseudotuberculosis* están fuera del grupo de los Lachnidos.

Otra característica interesante es la variedad morfológica que presentan los endosimbiontes de cada clado (Figura 7). El estudio mediante microscopía electrónica de dos endosimbiontes en representación de cada clado mostró que las cepas SCc (clado B) presentan células de gran tamaño y forma esférica, muy similares a las de los endosimbiontes primarios^{38,73}, y se localizan en bacteriocitos secundarios. En cambio, las células de la cepa SCt (clado A) son bacilares y se localizan en las células de la vaina del insecto, bacteriocitos secundarios y extracelularmente, como previamente había sido demostrado en el caso de *S. symbiotica* SAp^{35,60}.

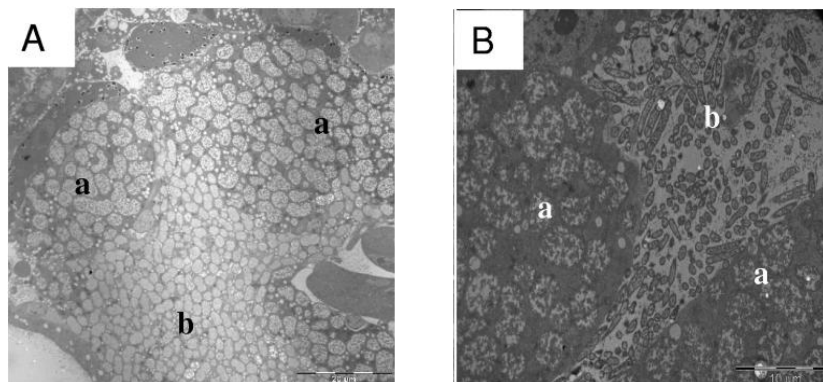


Figura 7. Microscopía electrónica de bacteriocitos de *C. cedri* (A) y *C. tujafilina* (B). (a) *B. aphidicola*. (b) *S. symbiotica*⁴⁹.

La diversidad encontrada en las cepas de *S. symbiotica* en cuanto a aspectos morfológicos, distribución y función debe ser un reflejo de la evolución de diferentes caracteres dentro de linajes de un mismo clado¹².

5.3. Características genómicas

Hasta el momento, las únicas cepas secuenciadas de *S. symbiotica* corresponden a *S. symbiotica* SCc, perteneciente al clado B⁴⁷ y “*Serratia symbiotica* str. Tucson” a la que hemos denominado en la presente tesis *S. symbiotica* SAp, perteneciente al clado A¹¹.

El genoma de *S. symbiotica* SCc nos muestra un endosimbionte en fase reductiva intermedia entre endosimbiontes secundarios y primarios. Se compone de un cromosoma circular de 1.762.765 pb y al menos dos plásmidos, de 21.946 pb y de 10.855 pb, denominados respectivamente pSCce_1 y pSCce_2. El genoma contiene un total de 711 genes y 58 pseudogenes, y su contenido en C+G es del 29,22%.

S. symbiotica SAp tiene un genoma de más de 2.573.085 pb (el genoma no ha sido completado, actualmente la secuencia conocida se ha ensamblado en 600 contigs). Dicha cepa contiene descritos por el momento 2.720 genes (de los cuales 2.157 codifican proteínas) y 550 pseudogenes. Su contenido total de C+G del 52%.

Si comparamos estas dos cepas con *S. proteomaculans* (NC_009832), una bacteria del género *Serratia* de vida libre, podemos observar que en ambos casos se ha producido a lo largo de su evolución una reducción en el tamaño del genoma, como resultado de la pérdida de genes superfluos o beneficiosos pero no esenciales¹¹. Sin embargo, en relación con el contenido en G+C de su genoma, *S. symbiotica* SCc es más similar a endosimbiontes primarios, mientras que la cepa SAp se asemeja a bacterias de vida libre.

En esta Tesis de Máster nos vamos a centrar en la cepa *S. symbiotica* SCt, la cual está siendo secuenciada en este momento por nuestro grupo de investigadores en el ICBiBE.

OBJETIVOS

Las simbiosis mutualistas entre bacterias intracelulares e insectos están muy extendidas en la naturaleza y parecen ser clave en el éxito evolutivo de este grupo de organismos. El trabajo que aquí se presenta, pretende abordar una parte del estudio de tales asociaciones que lleva a cabo desde hace varios años el grupo de Genética Evolutiva de la Universidad de Valencia. Nuestro objetivo global es contrastar el modelo de historia evolutiva de las asociaciones mutualistas entre bacterias y sus hospedadores en varias etapas, mediante estudios de genómica comparada, transcriptómica y proteómica.

Los objetivos concretos que se pretenden conseguir con esta Tesis de Máster son:

1. Diseño de un método eficiente de extracción de DNA total del conjunto formado por el pulgón *C. tujafilina* y sus endosimbiontes, *B. aphidicola* BCt y *S. symbiotica* SCt.
2. Puesta a punto de un sistema de cuantificación del DNA de ambas bacterias, mediante técnicas de PCR cuantitativa (qPCR).
3. Análisis de la proporción de *B. aphidicola* BCt y *S. symbiotica* SCt, y su correlación con las variaciones climáticas (especialmente variaciones de temperatura) y el mantenimiento en cautividad de *C. tujafilina*.
4. Puesta a punto de un método de disección de *C. tujafilina*, con el fin de realizar una extracción de sus bacteriocitos y obtener así muestras de DNA enriquecidas en endosimbiontes.

MATERIALES Y METODOS

1. Obtención y cultivo de *C. tujafilina*

Para llevar a cabo esta Tesis de Máster era necesario disponer de nuestras propias plantas de *P. orientalis* infestadas de *C. tujafilina*. Los pulgones fueron recolectados a partir de poblaciones naturales de las localidades de Paiporta y Bétera en septiembre y noviembre de 2010, y se utilizaron para infestar dos plántones de *P. orientalis* trasplantados en macetas de 5 litros. Para evitar que ambas poblaciones pudiesen mezclarse, las plantas infestadas con cada población se colocaron en zonas distintas dentro del edificio del ICBiBE.

2. Métodos Microscópicos

2.1. Disección de *C. tujafilina*.

Para realizar las disecciones de los pulgones se utilizó el macroequipo Leica Z16 APO equipado con cámara digital Leica DFC 500 con software LAS 3.8.

El protocolo de disección se ha puesto a punto específicamente para este estudio. Se inmoviliza un pulgón sobre una placa petri con agarosa al 1%, extirpando sus patas con la ayuda de micro-pinzas y, seguidamente, se depositan en un tubo que se sumerge inmediatamente en un baño de nitrógeno líquido. Seguidamente se le corta la cabeza, y al igual que en el caso anterior, la muestra se congela inmediatamente en un baño de nitrógeno líquido. A continuación, se añaden al insecto unas gotas de tampón A (Tris-HCl 35mM, Sacarosa 250mM, EDTA 100mM, KCl 25mM, pH 7.5) y se abre el abdomen. Se localizan los bacteriocitos junto a la cadena embrionaria, y se dispersan mediante agitación. Por último, los bacteriocitos se recogen mediante aspiración con la ayuda de una pipeta Pasteur capilarizada manualmente y unida a un tubo de látex, tal y como se muestra en la Figura 8. Como en los casos anterior, los bacteriocitos recolectados se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido.

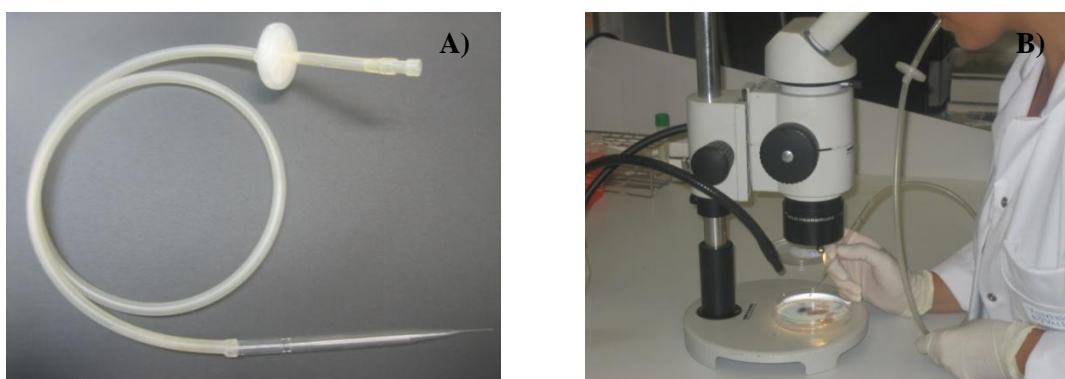


Figura 8: Fotografías de la herramienta utilizada para la absorción de los bacteriocitos (A). En la fotografía (B) se puede observar cómo se utiliza la herramienta.

3. Métodos de Biología Molecular

3.1. Extracción de DNA total

➤ Método de Latorre y colaboradores⁵⁰, modificado

Se parte de tres pulgones, a los que se añade la solución I a 4°C (Tris 10mM, NaCl 60mM, sacarosa al 5%, EDTA 10mM, pH 7.8) y se homogeniza con la ayuda de una varilla de vidrio o un *potter*. Seguidamente, se añade la solución II (Tris 300mM, SDS 1.25%, sacarosa al 5%, EDTA 10mM, pH 8) con el fin de romper las membranas celulares de nuestra muestra y precipitar las proteínas, e incubamos a 65°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añade acetato potásico 3M (pH 5) para neutralizar la preparación, se mezcla e incuba a -20°C durante 20 min. Las proteínas precipitadas y los restos de insecto se recogen en el fondo del tubo mediante centrifugación en una centrífuga de sobremesa modelo 5415R (Eppendorf) durante 10 min a máxima velocidad. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo, se precipita el DNA con un volumen de isopropanol y se incuba a -20°C durante 1 hora. El *pellet* obtenido se lava con etanol al 70% y, por último, se resuspende en LTE (Tris HCL 10mM, EDTA 0.11mM, pH 8) más RNasa, para eliminar el RNA de la muestra.

➤ Método de CTAB/Na^{1,66}, modificado

Se parte de tres pulgones adultos previamente homogeneizados en tampón TE (Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5) a los que se añade SDS al 10% (dodecilsulfato sódico) y proteinasa K (20mg/ml) y se incuba durante 1 hora a 37°C. A continuación, se agrega la solución CTAB/Na (CTAB al 10% en NaCl 0.7M) precalentada más NaCl 5M y se incuba 10 min a 65°C. El CTAB (del inglés, *cetyltrimethylammonium bromide*) es un detergente catiónico que solubiliza las membranas y forma un complejo con el DNA, en condiciones de baja concentración de sales. Las proteínas contaminantes se extraen posteriormente de la fase acuosa con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). El complejo CTAB-DNA se trata con isopropanol, lo que permite la precipitación de los ácidos nucleídos. Finalmente, se lava el *pellet* obtenido con etanol al 70% y se resuspende en LTE o agua. El RNA es eliminado gracias a la adición de RNasa al tampón de resuspensión.

➤ Sistema comercial “GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit” (Fermentas)

Este sistema comercial utiliza diversos filtrados a través de membranas de sílice. Se parte de una muestra de tres pulgones adultos previamente homogeneizada en tampón A (Tris-HCl 35mM, Sacarosa 250mM, EDTA 100mM, KCl 25mM, pH 7.5) se le añade tampón de digestión y proteinasa K (20 mg/ml) para romper los tejidos celulares y se incuba la mezcla a 56°C durante 30 min. A continuación, se añade RNasa, se incuba 10 min a temperatura ambiente, y se añade la solución de lisado (para romper los núcleos y liberar el DNA) y etanol al 50%. Toda esta mezcla se pasa por una columna de purificación del DNA, y se centrifuga 1 min a 6.000g. La columna se transfiere a un tubo

limpio y el DNA se lava con solución de lavado I, y posteriormente con solución de lavado II. Por último, se vuelve a transferir la columna a un tubo limpio a la que se le añade tampón de elución. Se incuba durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifuga 1 min a 8.000g para recoger el DNA ya purificado y resuspendido.

➤ Sistema comercial “JETFLEX Genomic DNA Purification Kit” (Genomed)

En este sistema comercial se parte de aproximadamente 10 mg de pulgones que se homogeneizan con el tampón CLB (de las siglas en inglés *Cell Lysis Buffer*). Se añade proteinasa K (20 mg/ml) y se incuba 1 hora a 58°C, hasta que todos los tejidos celulares de la muestra queden disgregados. A continuación, se le añade RNasa y se incuba 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se precipitan las proteínas, añadiendo el tampón PPT (de las siglas en inglés *Protein Precipitation Buffer*) y centrifugando 3 min a 16.000g. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo, se le añade isopropanol, y se centrifugar 3 min a 16.000g. Finalmente, se recoge el *pellet*, se lava con etanol al 70% y se resuspende en tampón TE.

3.2. Cuantificación de DNA

La cantidad de DNA de cada muestra fue determinada utilizando dos métodos alternativos: “ND-1000 Spectrophotometer” basado en espectrofotometría y “Qubit 2.0 Fluorometer” basado en fluorometría, realizándose dos medidas por muestra con cada aparato. Se utilizó el “Qubit 2.0 Fluorometer” con el fin de seleccionar el método de extracción de DNA más efectivo. El “ND-1000 Spectrophotometer” se utilizó para medir la concentración de DNA total para la optimización de la reacción de qPCR y para medir la concentración de DNA plasmídico, para construir las curvas patrón externas (apartado 3 de Resultados).

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de muestras de DNA total, se identificó la presencia de DNA del insecto y de cada uno de los endosimbiontes mediante amplificación por PCR utilizando cebadores específicos. En las amplificaciones con muestras de DNA plasmídico se utilizaron cebadores específicos que reconocían el inserto o cebadores universales que reconocían el sitio de clonación múltiple del vector, dependiendo de las circunstancias. El listado de cebadores utilizados en este trabajo se presenta en la Tabla 6.

➤ Diseño de cebadores específicos

Cebadores específicos para la amplificación de DNA del insecto y de cada una de las bacterias endosimbiontes fueron diseñados con la ayuda de los programas Mega 4.0.2 y Gene Runner; y la página web con dirección: “<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>”. Los

cebadores utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 6. En el caso, de cebadores diseñados para este trabajo, cada cebador lleva el nombre del gen situado en la región amplificada y una terminación que indica si se trata del cebador directo (F, *forward*) o reverso (R, *reverse*). En algunos casos, se incluye un número indicativo de la posición del primer nucleótido del cebador en el gen correspondiente.

Para el estudio del DNA del insecto se seleccionaron como marcadores un gen nuclear (*EF1 α* , codificante del factor de elongación alfa) y otro mitocondrial (*COI*, codifica un regulador del enzima citocromo-c oxidasa). Se utilizaron cebadores de amplio espectro diseñados en estudios previos^{31,58,72} comprendiendo las regiones de interés de ambos genes, para amplificarlos por PCR usando como molde DNA total de *C. tujafilina* y *C. cedri* (ver apartado siguiente). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados (apartado 3.5) y se utilizaron para el diseño de cebadores específicos para estas especies de pulgón.

El gen *groEL*, codificante de una chaperona esencial muy preservada en *B. aphidicola*, se utilizó como marcador para la identificación y estudio de *B. aphidicola* de las cepas BCt y BCc. El gen *atpD*, que codifica para una de las subunidades de la ATPasa (ausente en ambas cepas de *B. aphidicola*) fue seleccionado como marcador de *S. symbiotica* SCt. Los cebadores específicos para la amplificación de estos genes se diseñaron en base a las secuencias de *C. tujafilina* y *C. cedri* disponibles en las bases de datos.

Tabla 6. Cebadores utilizados en este trabajo Y: Base pirimidínica (C o T).

Cebador	Secuencia de nucleótidos con dirección 5'-3'	Tamaño amplificación	Utilidad
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAAGATATTGG	Alrededor de 710 pb dependiendo de la especie.	Amplifica marcador mitocondrial <i>COI</i> de invertebrados ³¹
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
EFS175	GGAAATGGGAAAAGGCTCCTTCAAGTAYGICYTGGG	Alrededor de 1100 pb, dependiendo de la especie.	Amplifica marcador nuclear <i>EF1-α</i> de pulgones ^{58,72}
EFR1	GTGTGGCAATSCAANACNGGAGT		
COXF	ATTGTTCAYCCTGTTCTGT	160pb	Amplifica marcador mitocondrial <i>COI</i> de <i>C. tujafilina</i> y <i>C. cedri</i> (este trabajo)
COXR	ATTGGAGGATTGGAAAYTGA		
EFF	AAAATTGGTTACAACCCAGC	169pb	Amplifica marcador nuclear <i>EF1α</i> de <i>C. tujafilina</i> y <i>C. cedri</i> (este trabajo)
EFR	GGATAGCATCCAAAGCTTCAA		
GroELF	TACGTGCTATGGAAGCTCC	202pb	Amplifica marcador DNA genómico de <i>B. aphidicola</i> BCt y BCc (este trabajo)
GroELR	GCAACAGAAGCAGCATATTGT		
atpD267F	GAAGTATCGTAACATCG	155pb	Amplifica marcador DNA genómico de <i>S. symbiotica</i> SCt (este trabajo)
atpD402R	GCTCATTATCTGACCGTAA		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	141pb	Cebadores universales
SP6	ATTTAGGT-ACACTATAG		

➤ Condiciones de PCR

Las condiciones concretas empleadas en los diferentes experimentos se resumen a continuación.

Mezcla de la reacción	Condiciones de reacción	
Tampón de reacción (10x): 2µl	Desnaturalización inicial: n=1 95°C 2 min	
dNTPs (10µM): 0.4µl	Amplificación: n=30	
Taq polimerasa (5U/µl): 0.08µl		95°C 30 s
Primer forward (10µM): 0.8µl		60°C 30 s
Primer reverse (10µM): 0.8µl	72°C 1 min	
DNA	Elongación final: n=1 72°C 2 min	
Vfinal: 20µl	Enfriamiento: n=1 4°C continuo	
	n: ciclos de amplificación	

El resultado de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4%. Los productos de PCR que iban a ser clonados fueron purificados mediante el sistema comercial “*HighTM Pure PCR Product Purification Kit*” (Roche).

3.4. Clonación del DNA

Los DNAs resultantes de la amplificación de los genes *COI*, *EF1α*, *GroEL* y *atpD* a partir de DNA total de *C. tujaefilina* se clonaron en el vector “*pGEM®-T Easy Vector*” (Promega) (Figura 9), y se transformaron en la cepa *XLBlue* de *E. coli*, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial (www.promega.com).

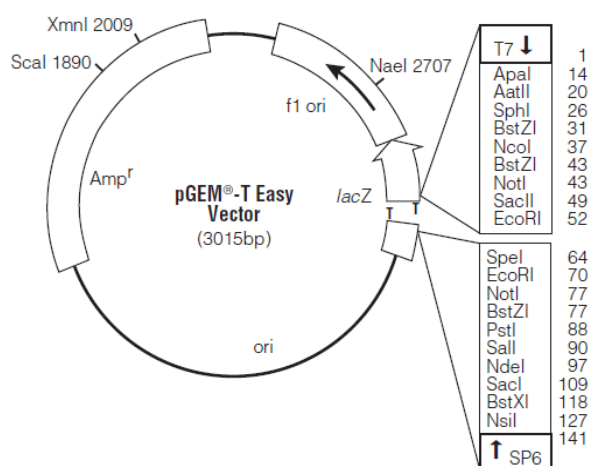


Figura 9: Esquema del vector *pGEM-T Easy* (Promega), con resistencia a ampicilina.

A continuación, se ligaron el producto de PCR purificado y el vector linearizado con DNA ligasa T4 de Promega. La mezcla de ligación se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y se utilizó para transformar células competentes de la cepa citada. Para seleccionar las bacterias que contienen el plásmido recombinante, se usó el medio selectivo LB (Luria Bertani) con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-

indolil- β -D-galactopiranosido), ampicilina e IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), como propone el protocolo de la casa comercial, seleccionándose las colonias de color blanco.

Los clones seleccionados se sembraron en 1 ml de medio líquido selectivo (LB con ampicilina) y se incubaron en agitación toda la noche a 37°C. Para purificar los plásmidos se utilizó el sistema comercial “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” (Roche). Finalmente, mediante PCR se comprobó que el tamaño de cada inserto era el esperado (ver apartado 2.3), usando cebadores universales y específicos (Tabla 6).

3.5. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias

La secuenciación se realizó por el método automático con dideoxinucleóticos en un secuenciador ABI 3730 del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universitat de València. La preparación de las muestras a secuenciar se realizó en nuestro laboratorio siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas se ensamblaron mediante el programa bioinformático Gap4 del paquete de programas Staden Package⁸³. Para la comparación de secuencias, se realizó su alineamiento con ClustalW (implementado en el paquete de programas MEGA 4.1⁸⁶). En primer lugar, se obtuvo la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de cada gen para cada una de las especies a comparar. Se utilizó este primer alineamiento como molde para alinear los nucleótidos, evitando así ambigüedades.

3.6. PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa. Se utiliza con el fin de amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del DNA. A diferencia de la PCR convencional, utiliza un fluorocromo (en este trabajo el SYBR Green I, un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del DNA) que tras ser excitado a una longitud de onda determinada, nos permitirá medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

Para todas las qPCR hemos utilizado el sistema comercial “LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I” (Roche), en las condiciones indicadas a continuación.

Mezcla de la reacción	Condiciones de reacción	
Mix comercial: 2 μ l	Desnaturalización inicial: n=1 95°C 10 min	
Agua: 3 μ l	Amplificación: n=30	95°C 5 s
Primer forward (10 μ M): 0.5 μ l		60°C 6 s
Primer reverse (10 μ M): 0.5 μ l		72°C 10 min
DNA	Curva de fusión:	
Vfinal: 10 μ l	hibridación 70°C 20s rampa 0,1°C/s modo continuo	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta Tesis de Máster se ha estudiado la relación simbiótica entre el pulgón *C. tujafilina* y sus dos bacterias simbioses, *B. aphidicola* (endosimbionte primario u obligado) y *S. symbiotica*, considerado simbiote secundario o facultativo en la mayoría de pulgones donde se ha detectado. El interés de este sistema es doble. Por un lado, *C. tujafilina* está filogenéticamente emparentado con *C. cedri*, donde *S. symbiotica* es endosimbionte co-primario con *B. aphidicola*, con quién ha establecido un consorcio bacteriano basado en la complementación metabólica. Sin embargo, estudios filogenéticos indican que mientras ambas cepas de *Buchnera* (BCt y BCc) están también muy emparentadas, *S. symbiotica* SCt está más relacionada con *S. symbiotica* de *A. pisum* (donde se trata de un simbiote facultativo) que con *S. symbiotica* SCc. Para comprender el tipo de relación existente entre los dos simbioses de *C. tujafilina* es imprescindible realizar análisis morfológicos, poblacionales y moleculares de este sistema. El primer paso para poder llevar a cabo estos estudios es poner a punto una batería diversa de técnicas adaptadas a las condiciones particulares de esta especie de pulgón.

1. SELECCIÓN DE UNA POBLACIÓN DE *C. tujafilina* PARA SU ESTUDIO

Uno de los principales problemas metodológicos del estudio de las simbiosis bacterianas en pulgones se deriva del hecho de que las bacterias no pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio. Por otro lado, los pulgones que se alimentan de coníferas, como es el caso de *C. tujafilina*, deben ser criados sobre su planta hospedadora, tuyas en este caso, en condiciones lo más parecidas a las naturales posibles, para evitar alteraciones en las condiciones de vida del pulgón que pudieran afectar a sus endosimbioses. Para ello, poblaciones de pulgones capturadas en ambientes naturales se llevan al laboratorio donde se utilizan para infestar tuyas de vivero originalmente libres de pulgones.

Nuestro grupo localizó dos poblaciones de *C. tujafilina* en tuyas de las localidades de Paiporta y Bétera. Con el fin de analizar si ambas poblaciones presentaban diferencias significativas, se realizó la extracción de DNA total, que fue utilizado para amplificar el gen *atpD* del endosimbionte *S. symbiotica* mediante PCR. Los productos fueron secuenciados y las secuencias fueron alineadas para su estudio comparativo. El resultado obtenido indica que ambas secuencias son homologas al 100% a nivel nucleotídico, demostrando que dichas poblaciones, aun estando alejadas entre sí aproximadamente 25 Km, no muestran (al menos para el gen *atpD*) un patrón evolutivo distinto.

De aquí en adelante, y sabiendo que si hiciera falta se podría utilizar la población de Bétera, todos los experimentos realizados en esta Tesis de Máster se han llevado a cabo sobre la población de *C. tujafilina* de Paiporta, aunque se mantienen ambas poblaciones en el laboratorio.

2. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA

Las técnicas para la realización de estudios moleculares sobre sistemas biológicos complejos requieren de la utilización de DNA con un adecuado grado de pureza y abundancia, por lo que en el caso de la utilización de poblaciones naturales es necesario un paso previo de puesta a punto de los protocolos de extracción de DNA, adaptándolos al organismo objeto de estudio. En el caso de los consorcios bacterianos endosimbiontes de insectos, es importante conseguir la mayor cantidad de DNA genómico de los endosimbiontes implicados, disminuyendo en la medida de lo posible el DNA procedente de los genomas nuclear y mitocondrial del insecto. Con la finalidad de seleccionar el método que mejor se adaptaba a nuestros experimentos, se extrajo el DNA total de siete muestras de *C. tujafilina* mediante el uso de 4 protocolos de extracción distintos (descritos en Materiales y Métodos).

Para cada método de extracción se realizaron dos replicas biológicas (excepto para el Sistema GeneJET, en el no se hizo réplica, por tratarse de una muestra ofertada por la casa comercial para su evaluación). La concentración de DNA en cada una de las muestras fue determinada mediante fluorimetría, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 9. Adicionalmente, todas las preparaciones se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, con dos marcadores: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) y Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3 (Fermentas) (Figura 8). El primer marcador nos sirve para determinar visualmente la concentración aproximada de las muestras, mientras que el segundo marcador permite identificar de forma correcta las bandas del primero.

Tabla 9. Concentración de DNA total en muestras obtenidas con los métodos de extracción evaluados en este trabajo. Los valores corresponden al promedio de dos medidas. SE: error estándar.

Protocolo	Muestras	Pulgones	Peso (mg)	Concentración (ng/ul)	SE	ng DNA/ mg pulgón
Latorre	1	3	5,20	40,00	0,00	7,69
	2	3	4,50	28,80	0,80	6,40
CTAB	3	3	5,80	21,95	0,25	3,78
	4	3	4,70	28,15	0,25	5,99
GeneJET	5	3	4,90	7,90	0,05	1,61
JETFLEX	6	9	10,30	196,50	0,50	19,08
	7	10	9,50	148,00	0,00	15,58

Los resultados reflejan que el método de mayor rendimiento es el Sistema comercial JETFLEX. Éste fue el método elegido para hacer las extracciones de DNA total en la mayoría de los experimentos posteriores ya que, además, nos permite extraer el DNA en menor tiempo de trabajo, al ser menos laborioso que los otros métodos ensayados.

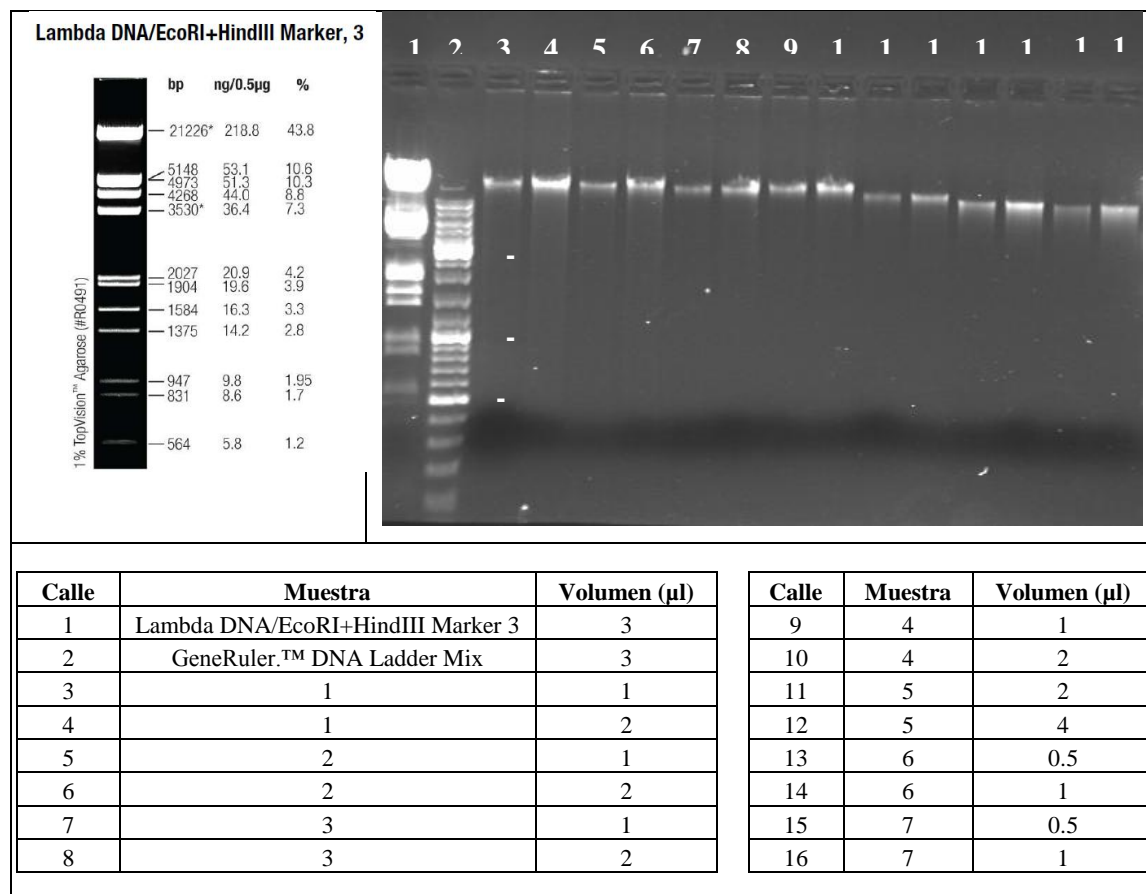


Figura 8. Electroforesis de las muestras de DNA de *C. tujaefilina* analizadas. El número de muestra se corresponde con la tabla 9.

3. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE qPCR APLICADA A MUESTRAS DE PULGÓN

Dentro del proyecto global en el que se enmarca este trabajo, se pretende realizar un estudio de la expresión génica global en el bacteriocito de *C. tujaefilina* (incluyendo el transcriptoma de la célula especializada del pulgón, así como de los dos endosimbiontes) en diferentes situaciones, para poder realizar comparaciones con *C. cedri* y *A. pisum*. Para ello, es necesario disponer de un sistema que nos permita cuantificar, al menos de forma relativa, ambos endosimbiontes simultáneamente, lo que se realiza mediante PCR cuantitativa.

3.1. Optimización de la reacción de qPCR para los genes *COI*, *EF1α*, *groEL* y *atpD*

El primer paso en la cuantificación mediante qPCR fue la determinación de las condiciones óptimas para todos los pares de cebadores diseñados para este estudio (ver “Diseño de cebadores específicos” en Materiales y Métodos). Estas condiciones son las que permita una eficiencia cercana a 2 (es decir, la duplicación de las copias de cada producto de PCR en cada ciclo). Para ello, es necesaria la construcción de una curva patrón que describe la cinética de la amplificación por PCR para cada par de cebadores utilizados. La curva patrón se representa como una recta de regresión entre el logaritmo

de la concentración de DNA (en el eje de abscisas) y el ciclo de la reacción de PCR en el que se empieza a detectar la fluorescencia, denominado como *crossing point* (en el eje de ordenadas). La eficiencia de la curva patrón se define como:

$$Eficiencia = 10^{-1/pendiente}$$

Las series de muestras a analizar fueron sometidas a amplificación con las cuatro parejas de cebadores en un mismo experimento, para garantizar que todas ellas estaban sometidas a las mismas condiciones de qPCR y reducir al máximo el posible error debido a la técnica *per se*. Para la construcción de cada una de las curvas se utilizaron tres diluciones seriadas 1/10 de DNA total de *C. tujafilina* con una concentración inicial de 167,7ng/μl, y se tomaron dos medidas para cada punto. Para determinar las condiciones óptimas de qPCR, se realizaron varias pruebas en un rango de temperaturas de la hibridación de los cebadores entre 50-60°C. Se determinó que la Tm (del inglés *melting Temperature*) más adecuada para realizar las cuatro amplificaciones en las mismas condiciones era de 60°C, ya que las eficiencias de las cuatro curvas patrón eran similares y próximas a 2, tal y como muestran los resultados presentados en la Tabla 10.

Tabla 10. Eficiencias obtenidas mediante qPCR para los genes en estudio

Gen	DNA amplificado	Eficiencia de la curva	Error de la curva
<i>COX</i>	Mitocondrial <i>C. tujafilina</i>	1,798	0,030
<i>EF1</i> □	Nuclear <i>C. tujafilina</i>	1,886	0,032
<i>groEL</i>	Genómico <i>B. aphidicola</i>	1,869	0,007
<i>atpD</i>	Genómico <i>S. symbiotica</i>	1,860	0,014

3.2. Obtención de las Curvas Patrón Externas

La técnica de cuantificación absoluta por qPCR nos permite estimar el número de copias de ácidos nucleídos (DNA o RNA) de una muestra problema, al compararla con un estándar establecido. La Curva Patrón Externa se obtuvo utilizando diluciones seriadas de concentración conocida de DNA de los plásmidos recombinantes obtenidos como se ha descrito en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. El número de copias del gen amplificado por μl de DNA se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ copias} = \frac{6 \times 10^{23} (\text{copias} / \text{mol}) \times [\text{DNA}] (\text{g} / \mu\text{l})}{\text{MW} (\text{g} / \text{mol})}$$

siendo la masa molecular (MW):

$$\text{MW} = n^{\circ} \text{ pb} \times \frac{660 \text{ Dalton}}{\text{pb}}$$

[Fuente: (http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf)]

donde el número de pares de bases (pb) corresponden a la longitud del plásmido recombinante utilizado (vector más inserto). En la tabla 11 se indica el número de copias/ μl para cada gen (*COI*, *EF1 α* , *groEL* y *atpD*) en las muestras preparadas para el calibrado.

Tabla 11: Cálculo del número de copias por μl de las muestras utilizadas.

Genes	Cebadores	g/ μl DNA ($\times 10^{-9}$)	Tamaño plásmido+amplicon	MW (g/mol)	Nº copias/ μl ($\times 10^{10}$)
<i>COI</i>	COXF-COXR	34,25	3015+160 pb	2.095.500	0,98
<i>EF1α</i>	EFF-EFR	35,2	3015+169 pb	2.101.440	1,005
<i>groEL</i>	BCGroELF- BCGroELR	43,65	3015+202pb	2.123.220	1,233
<i>atpD</i>	atpD267F- atpD402R	36,3	3015+155 pb	2.092.200	1,041

Las Curvas Patrón Externas se obtuvieron siguiendo las instrucciones del manual de la casa comercial (Roche), utilizando cinco diluciones seriadas 1/10 de DNA plasmídico cuyas concentraciones estaban en un rango entre 10^9 - 10^5 copias, realizándose tres réplicas por dilución. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

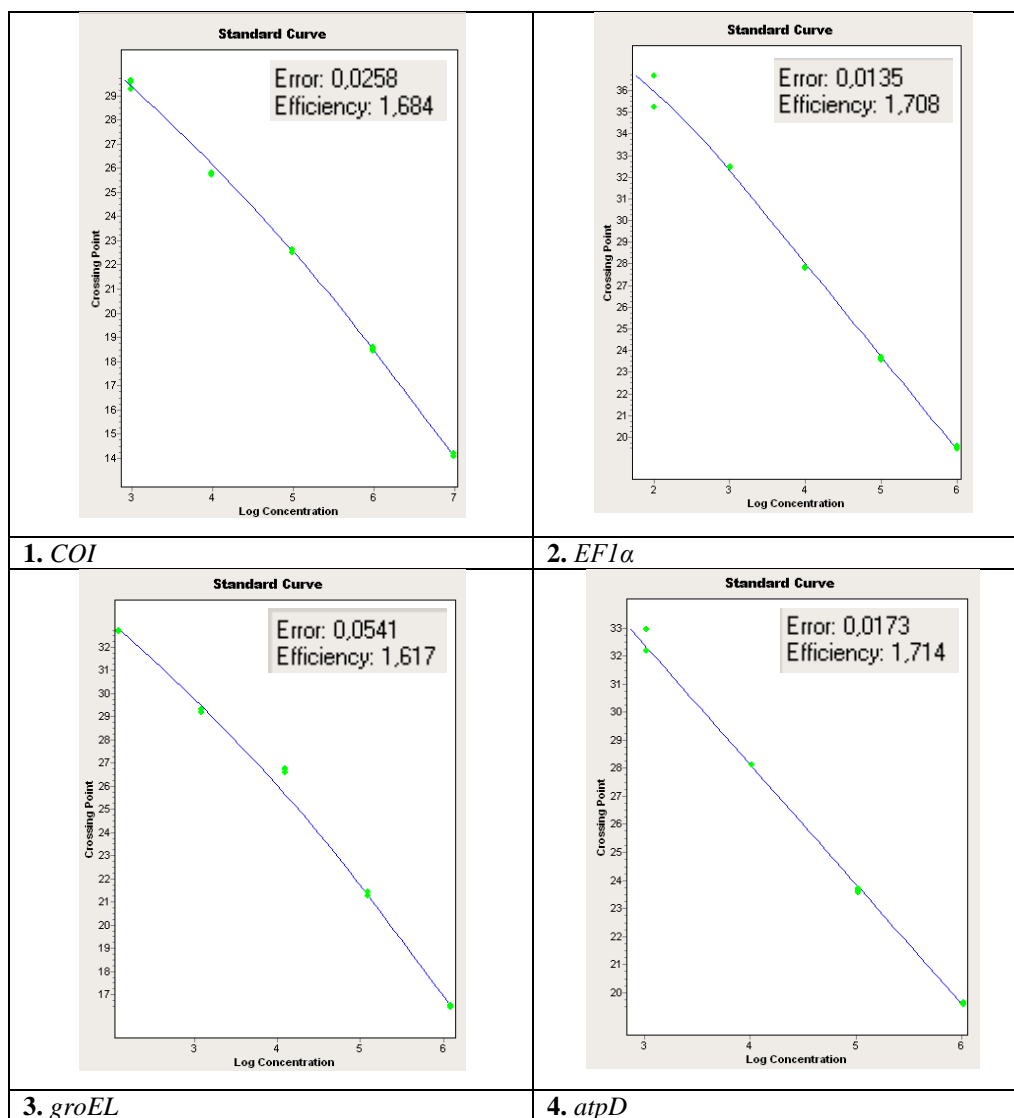


Figura 9. Curvas de calibrado para los genes en estudio.

4. MEDIDA DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA CAUTIVIDAD EN LA PROPORCIÓN DE *B. aphidicola* BCt y *S. symbiotica* SCt

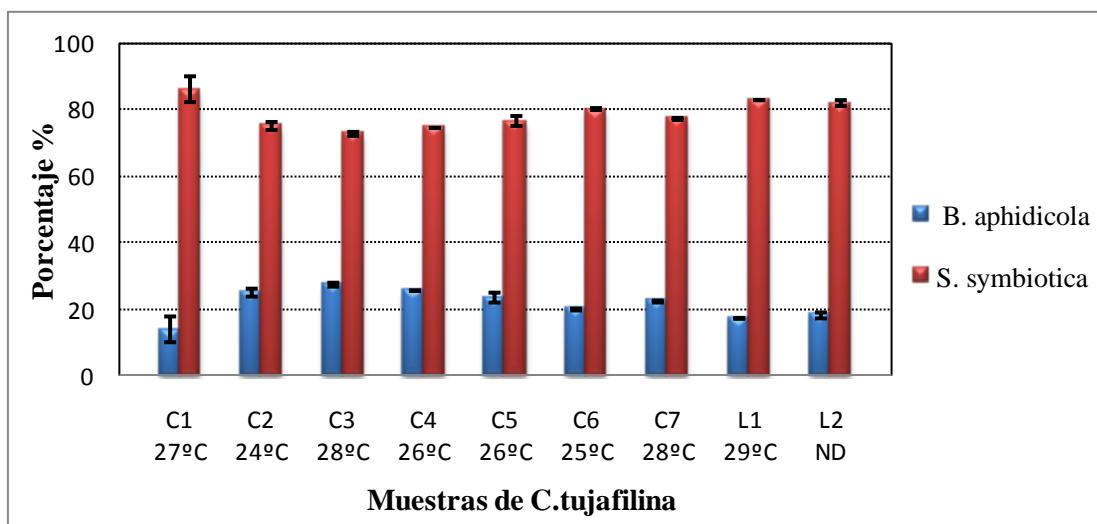
Resultados previos obtenidos en nuestro grupo al inicio de nuestro estudio del consorcio establecido por *B. aphidicola* y *S. symbiotica* en el pulgón *C. tujaefilina*, parecían mostrar que la proporción de ambas bacterias podía verse afectada por las condiciones ambientales. Además, estudios de otros investigadores sobre el posible papel de los simbiositos facultativos en pulgones, revelaron que éstos podían conferir ventajas en determinadas situaciones de estrés⁶⁹ (revisado en Oliver et al. 2010). En concreto, la presencia de *S. symbiotica* en poblaciones naturales de *A. pisum* de Arizona, ayuda a los pulgones a soportar mejor las altas temperaturas en momentos en que se produce un descenso en el número de bacteriocitos ocupados por *B. aphidicola*⁷⁷. Con el fin de comprobar la existencia de posibles variaciones en la proporción de endosimbiositos debido al mantenimiento del pulgón en cautividad o a variaciones de la temperatura, se analizaron muestras de DNA total de pulgones obtenidos a partir de poblaciones naturales y de pulgones mantenidos en el laboratorio, estimándose además las temperaturas medias de los días en que se realizaron las extracciones. Las muestras de pulgones mantenidos en cautividad se obtuvieron semanalmente, entre el 15 de junio y el 20 de julio de 2011, observándose poca variación de las temperaturas medias, entre 24°C y 28°C (muestras C1 a C6). Se obtuvieron dos réplicas biológicas por muestra. Así mismo, se recolectó en Paiporta el día 8 de agosto de 2011 (temperatura media de 29°C) una muestra de vida libre de la población original de la que proceden los pulgones mantenidos en el laboratorio usados en este estudio (muestra L1) y ese mismo día se recogieron dos muestras de pulgones en cautividad (valor medio de ambas muestras, C7). Adicionalmente, se utilizó como control la media de dos muestras de DNA total (L2) obtenidas el 29/09/2005 a partir de poblaciones naturales, cuando las temperaturas (no determinadas) debían ser más bajas en comparación con el periodo estival.

Mediante qPCR, y tomando como referencia las Curvas Patrón Externas anteriores, calculamos el número de copias de cada uno de los genes marcadores, lo que nos permite estimar el porcentaje de DNA mitocondrial y nuclear del pulgón *C. tujaefilina*, y el DNA genómico de *B. aphidicola* BCt y *S. symbiotica* SCt. Los datos genómicos utilizados para la cuantificación son:

- Genoma de *A. pisum*: 517 Mb⁸⁸.
- Genoma mitochondrial de *A. pisum*: 16,971 kb (GenBank: FJ411411).
- Génoma de *B. aphidicola* BCt: 444,925 Kb⁴⁸.
- Génoma de *S. symbiotica* SAp: 2,573085 Mb¹¹ (GenBank: AENX00000000).

En el caso del insecto, al no estar secuenciado el genoma de *C. tujaefilina*, hemos utilizado el tamaño del genoma de los genomas nuclear y mitochondrial del pulgón *A. pisum*. Asimismo, en el caso de *S. symbiotica*, hemos utilizado el tamaño de la *S. symbiotica* de *A. pisum*, ya que análisis filogenéticos llevados a cabo previamente en nuestro grupo mostraron que ambas cepas están muy relacionadas⁴⁹.

Los resultados obtenidos, como cabía esperar dado que el método de extracción utilizado está diseñado para la extracción de DNA genómico de insectos, indican que el mayor porcentaje de DNA obtenido (en torno al 96%) corresponde al genoma nuclear del pulgón, siendo muy pequeña (alrededor del 0.02%) la cantidad de DNA mitocondrial presente en las preparaciones (datos no mostrados). Por lo que respecta al DNA bacteriano restante, el DNA de *S. symbiotica* se encuentra en proporción muy superior al de *B. aphidicola* (Figura 10).



Muestra	Temperatura (°C)	Fecha	Condición
C1	27	15/06/11	cautividad
C2	24	22/06/11	cautividad
C3	28	29/06/11	cautividad
C4	26	06/07/11	cautividad
C5	26	13/07/11	cautividad
C6	25	20/07/11	cautividad
C7	28	08/08/11	cautividad
L1	29	08/08/11	libre
L2	Indeterminada	29/09/05	libre

Figura 10. Relación porcentual entre *B. aphidicola* BCt y *S. symbiotica* SCt. ND: no determinado.

Las cantidades relativas de ambas bacterias en las muestras mantenidas en cautividad y las muestras de vida libre no presentan diferencias significativas, por lo que no parece que el estrés debido a la cautividad esté afectando al consorcio endosimbionte del pulgón *C. tujaefilina*. En relación con la temperatura, cabe destacar que, aunque no parecen encontrarse grandes diferencias, los resultados no son concluyentes. Ello es debido a que este estudio experimental se inició ya finalizada la primavera, donde los pulgones se encuentran en condiciones óptimas y que las temperaturas en el laboratorio (plantas ubicadas en los extremos del pasillo del segundo piso del ICBiBE) no han sufrido grandes oscilaciones. Además, al principio de agosto, cuando fue tomada la muestra de la población natural (8 de agosto), las temperaturas no fueron excesivamente altas. Finalmente, las muestras de DNA congelado procedente de una población natural al inicio del otoño (cuando los pulgones están próximos a hibernar) tampoco mostró diferencias. Dado que la cautividad no parece influir en la

proporción de simbioses, pretendemos someter a los pulgones a condiciones variables de temperatura de forma controlada desde el inicio de la primavera. Estos estudios, como ya se ha indicado, son necesarios para diseñar los futuros experimentos de expresión génica global.

5. CUANTIFICACIÓN DE ENDOSIMBIOTES EN TEJIDOS DEL PULGÓN

5.1. Disección de bacteriocitos de *Cinara tujafilina*

Para el estudio del consorcio *B. aphidicola* BCt y *S. symbiotica* SCt y su relación con el hospedador, pretendemos llevar a cabo estudios de metatranscriptómica mediante la extracción de RNA total de bacteriocitos y de otros órganos carentes de endosimbiontes como control. Por ello, fue necesario diseñar un sistema de disección de los pulgones que evitara al máximo la contaminación entre los distintos tejidos a analizar, que se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 11 se muestran diversas fotografías en las que se pueden distinguir los embriones que se encuentran situados formando una cadena embrionaria y junto a ellos, fragmentos del bacterioma en los que se observan los bacteriocitos con aspecto globoso y traslúcido. Para tener una mayor información acerca de la estructura tridimensional del bacteriocito, se utilizó un enfoque a contraluz.

De las estructuras observadas, se diseccionaron bacteriocitos y, para evaluar su utilidad como controles negativos, patas y cabezas de pulgones, donde no debe encontrarse *B. aphidicola*. En estos Tejidos control no podemos destacar la presencia de *S. symbiotica*, ya que simbioses facultativos se han encontrado en diferentes ubicaciones en otros pulgones^{35,60}.

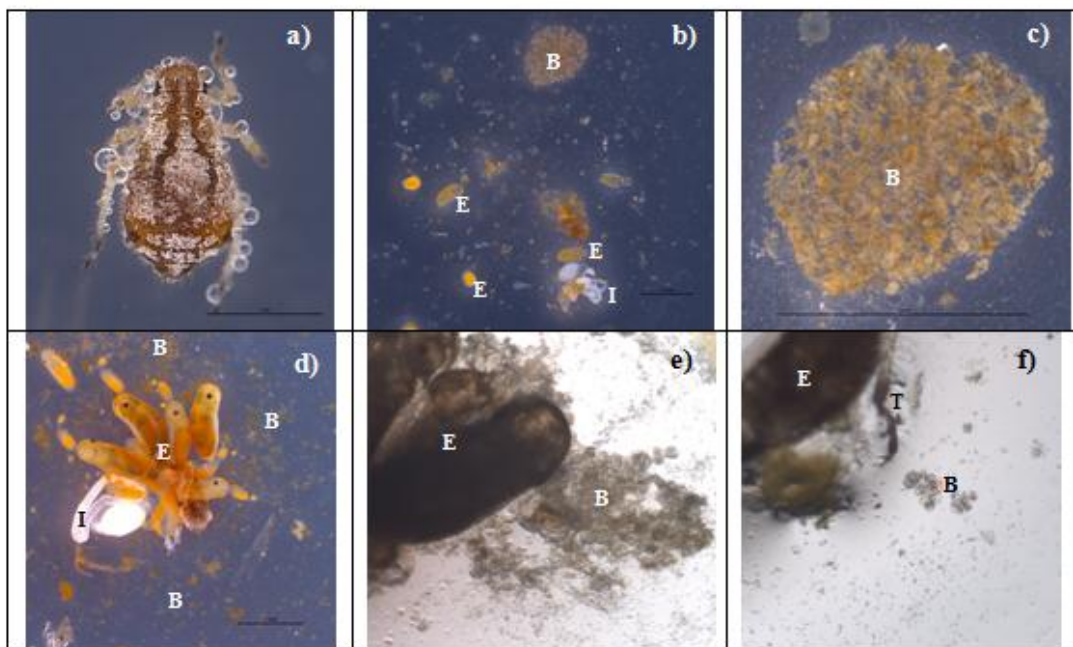


Figura 11: Fotografías al microscopio de disecciones de *C. tujafilina*. a). Fotografía de un individuo adulto. b), c) y d). Fotografías de bacteriocitos y contenido celular del insecto. e) y f). Fotografías a contraluz de bacteriocitos y embriones. E: embriones; B: bacteriocitos; I: intestino del pulgón; T: tarso del pulgón.

5.2. Análisis de la presencia de endosimbiontes en los tejidos diseccionados

A partir de disecciones de patas, cabezas y bacteriocitos de 15 pulgones de *C. tujafilina* en estadio adulto, se extrajo su DNA total, que fue usado para su análisis por PCR con los cebadores específicos para los marcadores de DNA nuclear y mitocondrial de insecto, y de cada uno de los endosimbiontes. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel al 0.8% de agarosa (Figura 12).

Los resultados muestran que en el DNA procedente de disecciones de patas se ha producido la amplificación con todos los cebadores. Ello puede ser debido a que las patas de los insectos son fácilmente contaminables, por lo que se llegó a la conclusión de que esta muestra no sería un buen control negativo de la presencia de *B. aphidicola*.

En cuanto al DNA de las muestras de cabeza, también se observa amplificación con todos los pares de cebadores, pero es muy tenue para el gen *groEL* (marcador de *B. aphidicola*), por lo que el resultado puede ser debido a una leve contaminación de alguna de las cabezas diseccionadas o a un problema al cargar el gel. Por último, el DNA extraído de los bacteriocitos diseccionados, ha amplificado con todos los cebadores excepto el gen *COI* de DNA mitocondrial del insecto, siendo más intensa la banda correspondiente al marcador de *B. aphidicola*. La ausencia de amplificación para el DNA mitocondrial puede explicarse por el método de extracción utilizado que enriquece la muestra en DNA genómico, mientras que la intensidad de la banda de *B. aphidicola* era la esperada dado que se encuentra confinada en los bacteriocitos.

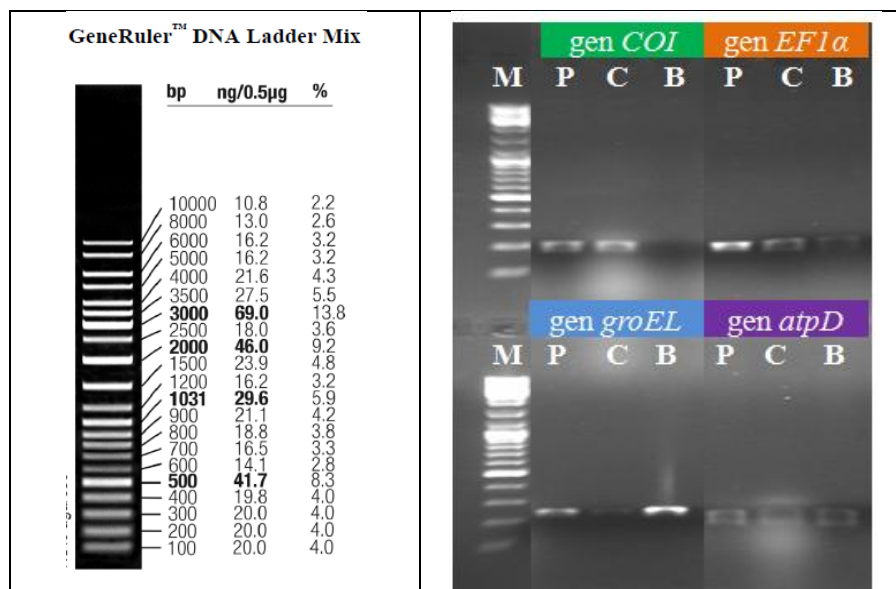


Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR a partir de DNA total de muestras de patas (P), cabezas (C) y bacteriocitos (B) de *C. tujafilina*. M: GeneRuler.™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

5.3. qPCR de los genes *COI*, *EF1 α* , *groEL* y *atpD* en muestras diseccionadas de cabezas y bacteriocitos de *C. tujafilina*.

Una vez seleccionados los tejidos a diseccionar, se obtuvieron muestras de DNA total de bacteriocitos y cabezas por disección de 26 pulgones adultos, y se cuantifico mediante qPCR el porcentaje de DNA mitocondrial y nuclear de *C. tujafilina* y el DNA genómico de *B. aphidicola* y *S. symbiotica*, utilizando las Curvas Patrón Externas descritas en el apartado 3.2 de Resultados. Se realizaron tres medidas de cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Cuantificación de los genes: *COI*, *EF1 α* , *groEL* y *atpD* en muestras diseccionadas de patas y bacteriocitos de *C. tujafilina*. Cp, *crossing point*; SE: *error estándar*.

Genes	Muestra diseccionada	Cp	SE Cp	Nº copias (x10 ⁶)	SE copias (x10 ⁵)	%
<i>COI</i>	Cabezas	17,44	0,12	1,71	1,09	0,01
	Bacteriocitos	17,47	0,12	1,69	1,09	0,02
<i>EF1α</i>	Cabezas	20,81	0,02	0,47	0,06	98,66
	Bacteriocitos	22,28	0,07	0,22	0,08	64,61
<i>groEL</i>	Cabezas	19,43	0,01	0,30	0,02	0,05
	Bacteriocitos	12,22	0,05	9,55	2,09	2,47
<i>atpD</i>	Cabezas	19,20	0,02	1,23	0,12	1,27
	Bacteriocitos	13,85	0,01	22,00	1,64	32,90

Los resultados cuantitativos confirman los obtenidos mediante PCR convencional. Prácticamente todo el DNA de las muestras de cabezas corresponden a DNA genómico del insecto, aunque se detecta un pequeño porcentaje de DNA de *Serratia* (1,27%), lo que podría indicar que esta bacteria está presente en pequeñas cantidades en diferentes tejidos del insecto. La pequeña cantidad de DNA de *Buchnera* detectada (0,05%) nos demuestra que no hemos conseguido evitar completamente las contaminaciones. En relación con los bacteriocitos, vemos que una tercera parte del DNA aislado corresponde a *S. symbiotica* y, sorprendentemente, sólo un 2,47% a *B. aphidicola*. Este resultado es coherente con los datos obtenidos sobre DNA total, pero no con el resultado de la PCR convencional en la que aparecía una banda más intensa con el gen *groEL* (marcador de la presencia de *B. aphidicola*) que con el gen *atpD* (marcador de *S. symbiotica*). Cabe la posibilidad de que la mayor parte de *S. symbiotica* se halle invadiendo, o rodeando los bacteriocitos primarios ocupados por *B. aphidicola* y que, por tanto, los resultados de la qPCR estén indicando que hemos conseguido el objetivo de coextraer ambas bacterias en la disección de bacteriocitos y, además, en la proporción real. Así, este tipo de disecciones parecen apropiadas para estudios de expresión génica del consorcio.

CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto un protocolo que nos permite cuantificar el porcentaje de cada organismo dentro del consorcio formado por *C. tujafilina*, *B. aphidicola* BCt (endosimbionte obligado) y *S. symbiotica* SCt (simbionte facultativo).
2. No existen diferencias significativas en la proporción de simbioses *B. aphidicola*/*S. symbiotica* en pulgones de la especie *C. tujafilina* procedentes de una población natural y aquellos que se han mantenido en cautividad en el laboratorio, siendo en todos los casos muy superior el porcentaje de *S. symbiotica* SCt (alrededor de 78%) que de *B. aphidicola* (en torno al 20%).
3. Tampoco se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de endosimbiontes procedentes de pulgones analizados en periodo estival (con temperaturas entre 24-28°C) y los pulgones procedentes de periodo otoñal. El estudio no es concluyente y deberá completarse con la cuantificación de nuevas muestras en un periodo más amplio de tiempo, desde la primavera al otoño, y con un control de temperaturas máximas y mínimas.
4. Se ha puesto a punto un protocolo de disección de muestras de dos tejidos de *C. tujafilina*, bacteriocitos y cabezas. Aunque pretendemos mejorarlo para evitar contaminaciones, este protocolo nos ha permitido coextraer ambos endosimbiontes (*B. aphidicola* y *S. symbiotica*) en la disección de bacteriocitos, por lo que podrá ser utilizado para la extracción de muestras de RNA en futuros estudios del metatranscriptoma.
5. Se ha detectado un porcentaje de 1,27% de DNA de *S. symbiotica* en muestras de cabeza de *C. tujafilina*. Este dato puede indicar que *S. symbiotica* SCt está presente en pequeñas cantidades en diferentes tejidos del insecto, a diferencia de *B. aphidicola* que se encuentra confinada en bacteriocitos en el hemocele.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ausubel F.M. *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. New York (1999).
2. Baker, J. L. & Hulton, H. F. The Iodimetric Estimation of Sugars. *Biochem. J.* **14**, 754-756 (1920).
3. Baumann, L. & Baumann, P. Cospeciation between the primary endosymbionts of mealybugs and their hosts. *Curr. Microbiol.* **50**, 84-87 (2005).
4. Baumann, P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 155-189 (2005).
5. Beckett K.A. *Guías de jardín Blume. Coníferas*. BLUME (ed.), pp. 18-21 Barcelona,1994).
6. Blackman R.L. & Eastop V.F. *Aphids on the world's crops*. Wiley Chichester, UK (1984).
7. Blackman R.L. & Eastop V.F. *Aphids as Crop Pests*. van Emden H.F. & Harrington R. (eds.), pp. 1-30 (CABI, London,2007).
8. Bray D.F. Life history and control of *Cinara winonkae*. *J. econ.* **46**, 103-107 (1953).
9. Buchner P. *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience Publishers, New York (1965).
10. Burke, G., Fiehn, O. & Moran, N. Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. *ISME. J.* **4**, 242-252 (2010).
11. Burke, G. R. & Moran, N. A. Massive genomic decay in *Serratia symbiotica*, a recently evolved symbiont of aphids. *Genome Biol. Evol.* **3**, 195-208 (2011).
12. Burke, G. R., Normark, B. B., Favret, C. & Moran, N. A. Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5328-5335 (2009).
13. Carter C.I. & Maslen N.R. Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr Opin Microbiol* **58**, (1982).
14. Chen, D. Q., Campbell, B. C. & Purcell, A. H. A new rickettsia from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Curr. Microbiol.* **33**, 123-128 (1996).
15. Chen, D. Q., Montllor C.B. & Purcell, A. H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomol. Exp. Appl.* **95**, 315-323 (2000).
16. Chen, D. Q. & Purcell, A. H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Curr. Microbiol.* **34**, 220-225 (1997).
17. Clark, M. A., Baumann, L. & Baumann, P. Sequence analysis of an aphid endosymbiont DNA fragment containing *rpoB* (beta-subunit of RNA polymerase) and portions of *rplL* and *rpoC*. *Curr. Microbiol.* **25**, 283-290 (1992).
18. Colombo M. & Parisini M. *Cinara tujafilina*. *Boll. Zool. agr. Bachic* **18**, 191-196 (1984).

19. Dale, C. & Maudlin, I. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 1**, 267-275 (1999).
20. Darby, A. C., Birkle, L. M., Turner, S. L. & Douglas, A. E. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 43-50 (2001).
21. Darby, A. C. & Douglas, A. E. Elucidation of the transmission patterns of an insect-borne bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4403-4407 (2003).
22. Dedryver, C. A., Le, R. A. & Fabre, F. The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biol.* **333**, 539-553 (2010).
23. Degnan, P. H. *et al.* Dynamics of genome evolution in facultative symbionts of aphids. *Environ. Microbiol.* (2009).
24. Degnan, P. H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R. A. & Moran, N. A. *Hamiltonella defensa*, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 9063-9068 (2009).
25. Dixon A.F.G., Kindlmann P. & Leps J. Why there are so few species of aphids especially in the tropics? *Am. Nat.* **4**, 580-592 (1987).
26. Douglas, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.* **43**, 17-37 (1998).
27. Douglas, A. E. & Dixon A.F.G. The mycetocyte symbiosis of aphids: variation with age and morph in virginoparae of *Megoura viciae* and *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect. Physiol.* **33**, 109-113 (1987).
28. Douglas, A. E. & Wilkinson, T. L. Host cell allometry and regulation of the symbiosis between pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, and bacteria, *Buchnera*. *J. Insect Physiol* **44**, 629-635 (1998).
29. Dunbar, H. E., Wilson, A. C., Ferguson, N. R. & Moran, N. A. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS. Biol.* **5**, e96 (2007).
30. Fares, M. A., Ruiz-Gonzalez, M. X., Moya, A., Elena, S. F. & Barrio, E. Endosymbiotic bacteria: groEL buffers against deleterious mutations. *Nature* **417**, 398 (2002).
31. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 294-299 (1994).
32. Fukatsu, T. Secondary intracellular symbiotic bacteria in aphids of the genus *Yamatocallis* (Homoptera: Aphididae: Drepanosiphinae). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5315-5320 (2001).
33. Fukatsu, T. & Ishikawa, H. Differential immunohistochemical visualization of the primary and secondary intracellular symbiotic bacteria of aphids. *Appl. Entomol. Zool.* **33**, 321-326 (1998).
34. Fukatsu, T. & Ishikawa, H. Phylogenetic position of yeast-like symbiont of *Hamiltonaphis styraci* (Homoptera, Aphididae) based on 18S rDNA sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 383-388 (1996).

35. Fukatsu, T., Nikoh, N., Kawai, R. & Koga, R. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2748-2758 (2000).
36. Fukatsu, T., Watanabe K. & Sekiguchi Y. Specific detection of intracellular symbiotic bacteria of aphids by oligonucleotide-probed in situ hybridization. *Appl. Entomol. Zool.* **33**, 461-472 (1998).
37. Gil, R., Sabater-Munoz, B., Latorre, A., Silva, F. J. & Moya, A. Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 4454-4458 (2002).
38. Gomez-Valero, L. *et al.* Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *J. Bacteriol.* **186**, 6626-6633 (2004).
39. Griffiths, G. W. & Beck, S. D. Intracellular symbiotes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Cell Tissue Res* **148**, 287-300 (1973).
40. Harrewijn P. & Minks A.K. *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Minks A.K. & Harrewijn P. (eds.), pp. 267-272 (Elsevier, Amsterdam,1989).
41. Heie O.E. *Aphids: their biology, natural enemies and control*. Minks A.K. & Harrewijn P. (eds.), pp. 367-391 (Elsevier, Amsterdam,1987).
42. Hinde, R. The fine structure of the mycetome symbiotes of the aphids *Brevicoryne brassicae*, *Myzus persicae*, and *Macrosiphum rosae*. *J. Insect Physiol* **17**, 2035-2050 (1971).
43. Houk, E. J., Griffiths, G. W., Hadjokas, N. E. & Beck, S. D. Peptidoglycan in the cell wall of the primary intracellular symbiote of the pea aphid. *Science* **198**, 401-403 (1977).
44. Katis N.I., Tsitsipis J.A., Stevens M. & Powell G. *Aphids as Crop Pests*. van Emden H.F. & Harrington R. (eds.), pp. 353-377 (CABI, London,2007).
45. Koga, R., Tsuchida, T. & Fukatsu, T. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc. Biol. Sci.* **270**, 2543-2550 (2003).
46. Komaki, K. & Ishikawa, H. Intracellular bacterial symbionts of aphids possess many genomic copies per bacterium. *J. Mol. Evol.* **48**, 717-722 (1999).
47. Lamelas, A. *et al.* *Serratia symbiotica* from the Aphid *Cinara cedri*: a Missing Link from Facultative to Obligate Insect Endosymbiont. *PLoS Genetics* . 2011. Ref Type: In Press
48. Lamelas, A., Gosalbes, M. J., Moya, A. & Latorre, A. New clues about the evolutionary history of metabolic losses in bacterial endosymbionts, provided by the genome of *Buchnera aphidicola* from the aphid *Cinara tujafilina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4446-4454 (2011).
49. Lamelas, A. *et al.* Evolution of the secondary symbiont "*Candidatus serratia symbiotica*" in aphid species of the subfamily lachninae. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4236-4240 (2008).
50. Latorre, A., Moya, A. & Ayala F.J. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **22**, -8649 (1986).

51. Liadouze J., Febvay G., Guillaud J. & Bonnot G. Effect of diet on the free amino acid pools of symbiotic and aposymbiotic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect. Physiol.* **1**, 33-40 (1995).
52. Martinez-Torres, D., Buades, C., Latorre, A. & Moya, A. Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Mol. Phylogenet. Evol.* **20**, 437-449 (2001).
53. McLean, D. L. & Houk, E. J. Phase contrast and electron microscopy of the mycetocytes and symbiotes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol* **19**, 625-633 (1973).
54. Mira, A. & Moran, N. A. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microb. Ecol.* **44**, 137-143 (2002).
55. Montllor C.B., Maxmen A & Purcell, A. H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189-195 (2002).
56. Moran, N. A. The evolution of aphids life cycles. *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 321-348 (1992).
57. Moran, N. A., Dunbar, H. E. & Wilcox, J. L. Regulation of transcription in a reduced bacterial genome: nutrient-provisioning genes of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *J. Bacteriol.* **187**, 4229-4237 (2005).
58. Moran, N. A., Kaplan M.E., Gelsey M.J., Murphy T.G. & Scholes E.A. Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomology* **24**, 85-93 (1999).
59. Moran, N. A. & Mira, A. The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0054 (2001).
60. Moran, N. A., Russell, J. A., Koga, R. & Fukatsu, T. Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3302-3310 (2005).
61. Moya, A., Gil, R. & Latorre, A. The evolutionary history of symbiotic associations among bacteria and their animal hosts: a model. *Clin. Microbiol. Infect.* **15 Suppl 1**, 11-13 (2009).
62. Moya, A., Latorre, A., Sabater-Munoz, B. & Silva, F. J. Comparative molecular evolution of primary (*Buchnera*) and secondary symbionts of aphids based on two protein-coding genes. *J. Mol. Evol.* **55**, 127-137 (2002).
63. Moya, A., Pereto, J., Gil, R. & Latorre, A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 218-229 (2008).
64. Munson, M. A. *et al.* Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol.* **173**, 6321-6324 (1991).
65. Munson, M. A., Baumann, P. & kinsey M.G. *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 566-568 (1991).
66. Murray M.G. & Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4321-4325 (1980).
67. Nakabachi, A. & Ishikawa, H. Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *J. Insect Physiol* **45**, 1-6 (1999).

68. Nault L.R. Arthropod Transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **5**, 521-541 (1997).
69. Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R. & Moran, N. A. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 247-266 (2010).
70. Oliver, K. M., Moran, N. A. & Hunter, M. S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 12795-12800 (2005).
71. Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A. & Hunter, M. S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 1803-1807 (2003).
72. Ortiz-Rivas, B. & Martinez-Torres, D. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **55**, 305-317 (2010).
73. Perez-Brocal, V. *et al.* A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science* **314**, 312-313 (2006).
74. Remaudière G. & Remaudière M. *Catalogue des Aphididae du monde*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris (1997).
75. Risse, C., Delmotte, F., van Ham, R. C. & Moya, A. Mutational and selective pressures on codon and amino acid usage in Buchnera, endosymbiotic bacteria of aphids. *Genome Res.* **14**, 44-53 (2004).
76. Russell, J. A., Latorre, A., Sabater-Munoz, B., Moya, A. & Moran, N. A. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.* **12**, 1061-1075 (2003).
77. Russell, J. A. & Moran, N. A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 603-610 (2006).
78. Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., Meng, X. Y. & Fukatsu, T. Rickettsia symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont Buchnera. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4069-4075 (2005).
79. Sandström, J. P. & Moran, N. A. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomol. Exp. Appl.* **91**, 203-210 (1999).
80. Sandström, J. P., Russell, J. A., White, J. P. & Moran, N. A. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol. Ecol.* **10**, 217-228 (2001).
81. Sasaki T., Hayasahi H. & Ishikawa, H. Growth and reproduction of symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, maintained on artificial diets. *J. Insect. Physiol.* **37**, 85-92 (1991).
82. Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. & Ishikawa, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS. *Nature* **407**, 81-86 (2000).
83. Staden, R., Beal, K. F. & Bonfield, J. K. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* **132**, 115-130 (2000).

84. Stainer R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L. & Painter P.R. *The microbial world*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs NJ (1986).
85. Tamas, I. *et al.* 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* **296**, 2376-2379 (2002).
86. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol Evol.* **24**, 1596-1599 (2007).
87. Thao, M. L. & Baumann, P. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3401-3406 (2004).
88. The International Aphid Genomics Consortium Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol* **2**, (2010).
89. Tsuchida, T., Koga, R. & Fukatsu, T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**, 1989 (2004).
90. Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T. & Fukatsu, T. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.* **11**, 2123-2135 (2002).
91. Unterman, B. M., Baumann, P. & McLean, D. L. Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. *J. Bacteriol.* **171**, 2970-2974 (1989).
92. van Ham, R. C. *et al.* Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 581-586 (2003).
93. von Dohlen C.D. & Moran, N. A. Molecular data support a rapid radiation of aphids (Aphididae) in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biol J Linn Soc* **71**, 689-717 (2000).
94. Wernegreen, J. J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 850-861 (2002).
95. Wernegreen, J. J. For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 572-583 (2005).
96. Wilcox, J. L., Dunbar, H. E., Wolfinger, R. D. & Moran, N. A. Consequences of reductive evolution for gene expression in an obligate endosymbiont. *Mol. Microbiol.* **48**, 1491-1500 (2003).
97. Wilkinson, T. L., Koga, R. & Fukatsu, T. Role of host nutrition in symbiont regulation: impact of dietary nitrogen on proliferation of obligate and facultative bacterial endosymbionts of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1362-1366 (2007).
98. Wojciechowski W. *Studies on the systematic system of aphids (Homoptera, Aphidinea)*. Uniwersytet Slaskytet Slaski, Katowice (1992).