

Reconstrucción filogenética de pulgones de la subfamilia Lachninae mediante el gen *atpD*

Máster en biología molecular, celular y genética. Especialidad genética.



Autor: David Peris Navarro

Directora: Amparo Latorre Castillo (Catedrática de Genética)

Tutora: Amparo Latorre Castillo

•Resumen y palabras clave.

Las bacterias intracelulares se caracterizan por poseer una alta reducción genómica. Ésto puede conducir, en un caso extremo, a la pérdida de genes esenciales para la simbiosis, como ocurre en *Buchnera aphidicola* del pulgón *Cinara cedri*, perteneciente a la subfamilia Lachninae, haciéndose necesario la entrada en juego de otro endosimbionte, *Serratia symbiotica*, para proporcionar al hospedador los nutrientes que *Buchnera* no puede suministrar.

Para tratar de determinar cuando se estableció *S. symbiotica* en la subfamilia Lachninae se llevó a cabo previamente a este trabajo un análisis filogenético con el gen 16S rDNA de los endosimbiontes en miembros representativos de la subfamilia. El resultado fue que la mayor parte de los llamados simbioses secundarios era del tipo *S. symbiotica*. Por ello, se construyó una filogenia con las secuencias correspondientes a las distintas *S. symbiotica* obtenidas durante el estudio y nuevas secuencias de la base de datos. Para confirmar la filogenia obtenida con las secuencias del gen ribosomal, se utilizó el gen *atpD*, objetivo del presente trabajo. Se confirma la existencia de dos clados, uno que corresponde al género *Cinara* y el otro al género *Cupressobium*. Este resultado, junto con los datos previos y estudios morfológicos de *B. aphidicola* y *S. symbiotica* en dos especies representativas de los dos clados, nos lleva a postular la existencia de dos tipos de *S. symbiotica*. que nos cuentan dos historias distintas, bien porque poseen dos orígenes diferentes, o bien porque presentan dos historias evolutivas divergentes.

Palabras clave: *B. aphidicola*, *S. symbiotica*, β -subunidad ATPasa, endosimbiosis, pulgón, hipótesis de reemplazamiento.

•Introducción

La reducción genómica en bacterias endosimbiontes es un proceso continuo debido a la acomodación a la vida intracelular. La cuestión que aparece es si el proceso de reducción tiene un límite o conduce a la extinción y reemplazamiento de la bacteria por un nuevo endosimbionte. El debate está en si esta reducción es conducida por un sesgo en la delección o por selección natural, teniendo implicaciones en la teoría de la evolución de genomas complejos (Lynch et al. 2006).

La asociación obligada entre pulgones (Hemiptera, Aphidoidea) y la bacteria *Buchnera aphidicola* (γ -proteobacteria), transmitida verticalmente, ofrece un sistema modelo para analizar la reducción genómica y sus consecuencias. El papel de *Buchnera* en la simbiosis es nutricional, suministrando los nutrientes esenciales (aminoácidos y algunas vitaminas) que el pulgón no puede tomar de la dieta, el floema de las plantas. La relación es de mutualismo obligado ya que el pulgón al que se le elimina *Buchnera* mediante tratamiento con antibióticos, deja de reproducirse. Por otro lado, el pulgón suministra a la bacteria un ambiente estable con una fuente permanente de recursos. De hecho *Buchnera* no puede cultivarse en el laboratorio. El tamaño del genoma de las cepas de *B. aphidicola* en diferentes especies de pulgón va desde los 422 kb a las 641kb, siendo *B. aphidicola* de *Cinara cedri* (BCce) el más reducido (Pérez-Brocal et al. 2006). Una característica importante de *C. cedri* es la presencia de un gran número de endosimbiontes secundarios (SS) concretamente del denominado *Serratia symbiotica* (Gómez-Valero et al. 2004).

B. aphidicola se localiza en células especializadas del pulgón, denominadas bacteriocitos primarios, que conforman un órgano bilobulado llamado bacterioma, situado en la zona abdominal del pulgón, por debajo del aparato digestivo. Los SS pueden encontrarse en sus propios bacteriocitos, llamados bacteriocitos secundarios, en células de la vaina y en regiones extracelulares (hemolinfa) (Moran et al. 2005).

La transmisión vertical presentada en *B. aphidicola* está respaldada por el hecho de que la filogenia de los hospedadores y sus endosimbiontes primarios es concordante, indicando un único suceso de infección y millones de años de coevolución (Von Dohlen et al. 2000), aproximadamente unos 84-164 m.a.

Mientras que *B. aphidicola* es el único endosimbionte primario encontrado en los pulgones, se han encontrado hasta 10 tipos distintos de SS

-Siete linajes de γ -proteobacterias:

1. *Serratia symbiotica* (Moran et al. 2005): también llamada tipo R, o PASS.
2. *Hamiltonella defensa* (Moran et al. 2005): también llamado tipo T, o PABS.
3. *Regiella insecticola* (Moran et al. 2005): también llamado tipo U, o PAUS.
4. **Tipo V** (Russell et al. 2003).
5. **YSMS** (*Yamatocallis Secondary Mycetocyte Symbiont*) (Fukatsu 2001).
6. **Tipo Ars.** (*Arsenophonus*) (Russell et al. 2003).
7. **Tipo So-So** (Russell et al. 2003): emparentado con los endosimbiontes primarios del gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) y la mosca tse-tse (*Sodalis glossinidius*).

-Dos linajes de α -proteobacterias:

1. *Wolbachia* (Jeyaparakash et al. 2000; Gómez-Valero et al. 2004).
2. *Rickettsia* (Chen et al. 1996): también llamado PAR (*Pea Aphid Rickettsia*).

-Un linaje de la clase Mollicutes:

1. *Spiroplasma* (Fukatsu et al. 2001): relacionado con *Mycoplasma*.

A diferencia de *B. aphidicola*, no se encuentran de manera universal en los pulgones y su papel sería más bien facultativo (por eso se les denomina también simbiontes facultativos) teniendo, en algunos casos, 2 posibles efectos:

-Negativos: en el crecimiento, reproducción y longevidad del hospedador (Fukatsu et al. 2002).

-Positivos: mayor resistencia a altas temperaturas (Montllor et al. 2002), resistencia al ataque de avispas parasitoides (Olivier et al. 2003) e infecciones fúngicas (Ferrari et al. 2004) y mejora en el aprovechamiento de ciertas plantas hospedadoras (Tsuchida et al. 2004).

Su modo de transmisión es vertical, aunque cuando se realiza el contraste de filogenias de los SS con el hospedador se encuentran numerosas discordancias, lo que indica sucesos relativamente frecuentes de transmisión horizontal entre poblaciones e incluso entre especies no relacionadas (Russell et al. 2003). No se conoce bien el modo en que sucede esta transmisión pero se especula que podría deberse a las avispas parasitoides o a través de la planta donde al morir el pulgón sus restos quedarían y las bacterias podrían infectar otros pulgones que pasaran por allí.

Cuando se estudió el proceso de reducción del genoma de *B. aphidicola* estudiado en *C. cedri* se observó que éste había perdido genes de varias categorías (Pérez-Brocal et al. 2006):

1. Biosíntesis de nucleótidos.

2. Biosíntesis de cofactores.
3. Membrana celular.
4. Transporte.

La composición génica demuestra que *B. aphidicola* de *C. cedri* (BCce) es incapaz de suministrar al pulgón riboflavina y triptófano (Pérez-Brocal et al. 2006). Sin embargo, aunque el genoma de *B. aphidicola* de *C. tujafilina* (BCtu) no se ha secuenciado, se ha demostrado que sí es capaz de sintetizar triptófano (Latorre et al. 2005; Gil et al. 2006). BCtu es pariente próximo de BCce y los pulgones que los hospedan son muy parecidos morfológicamente (Remaudière et al. 1997). Además, las plantas de las que se alimentan son muy similares, por tanto si BCce no es capaz de suministrar triptófano y el pulgón, de manera similar a *C. tujafilina* no lo puede tomar de la dieta, debería existir algún otro microorganismo que aporte los nutrientes que *B. aphidicola* no puede sintetizar.

Los simbioses secundarios son considerados facultativos en otros pulgones pero *S. symbiotica* está presente en todos los clones de *C. cedri* analizados hasta el momento (Lamelas, 2006) y en pulgones emparentados dentro de la tribu Eulachnini. Además, estudios de tamaño de bacteriocitos primarios y secundarios muestran que son similares en *C. cedri* (Gómez-Valero et al. 2004). Esto, junto a ejemplos donde la eliminación de *B. aphidicola* y la presencia de *S. symbiotica* mejora la supervivencia del pulgón, o donde la eliminación de *B. aphidicola* va seguida de la invasión en paralelo de *S. symbiotica* (Koga et al. 2003), nos lleva a plantearnos si *S. symbiotica* está reemplazando a *B. aphidicola* (Pérez-Brocal et al. 2006), o simplemente existe una complementación entre ambos endosimbioses.

La comparación de filogenias generadas a partir de secuencias del 16S rDNA entre *B. aphidicola* y *S. symbiotica* en pulgones de la subfamilia Lachninae, reveló la existencia de congruencia (fig 1), lo que podría estar indicando un largo periodo de coexistencia entre ambos endosimbioses (Lamelas, 2006). Debido a la amplia representación de *S. symbiotica* en los pulgones bajo estudio se generó un árbol de 16S rDNA en aquellas especies de pulgones donde se ha encontrado (datos tomados de las bases de datos) (fig 2). Aparecieron dos clados bien diferenciados del género *Cinara*: *Cinara (Cupressobium) tujafilina* y *Cinara (Cinara) cedri*, que pueden indicar la existencia de dos tipos de *S. Symbiotica*. Para confirmarlo, se hace necesaria la secuenciación de algún gen codificante de proteínas, así como la caracterización morfológica de ambas *Serratia*.

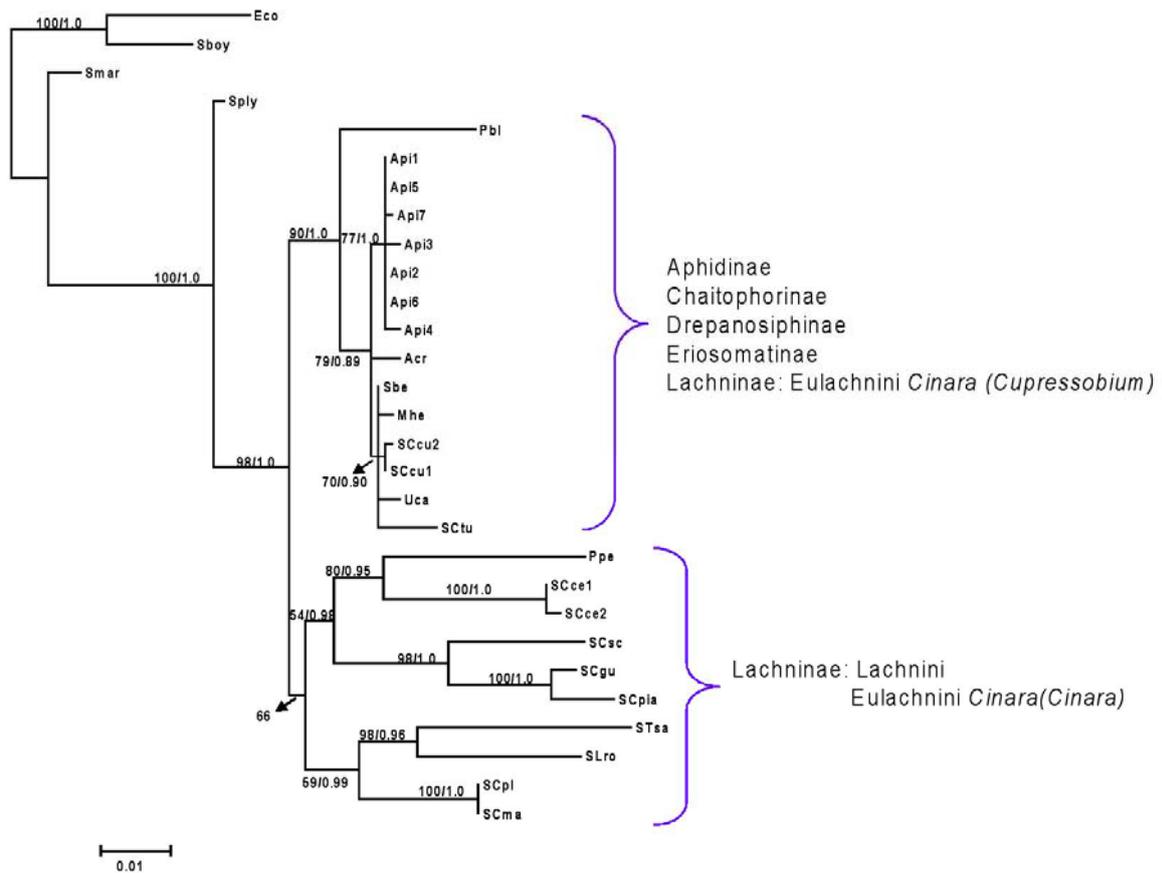


Fig 2. Árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud (ML) para *S. Symbiotica*. Los valores en los nodos indican el soporte por *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas y probabilidades Bayesianas a posteriori. Ramas con valores menores al 55% fueron colapsadas. *E. coli* (AB045731) y *S. boydii* (AY696681) son los *outgroups*.

•Objetivos

El trabajo actual se centra en:

1. La caracterización de simbioses secundarios de pulgones de la subfamilia Lachninae (clasificados según Nieto-Nafría et al. 2003) (fig. 3) mediante la secuencia del gen *atpD*, que codifica para la subunidad beta del complejo F-ATP, con el objetivo de:

-Incrementar la señal filogenética del árbol 16S rDNA.

-Determinar si *S. symbiotica* está bien establecida en la subfamilia, y por tanto, coevoluciona con *B. aphidicola*, o si *C. cedri* es un caso especial dentro de los pulgones.

-Poder discriminar entre las hipótesis de reemplazamiento o complementación de simbioses.

2. Caracterización morfológica de *S. symbiotica* de los dos clados mediante microscopía óptica, con el objetivo de determinar la existencia de dos tipos de *S. symbiotica*.

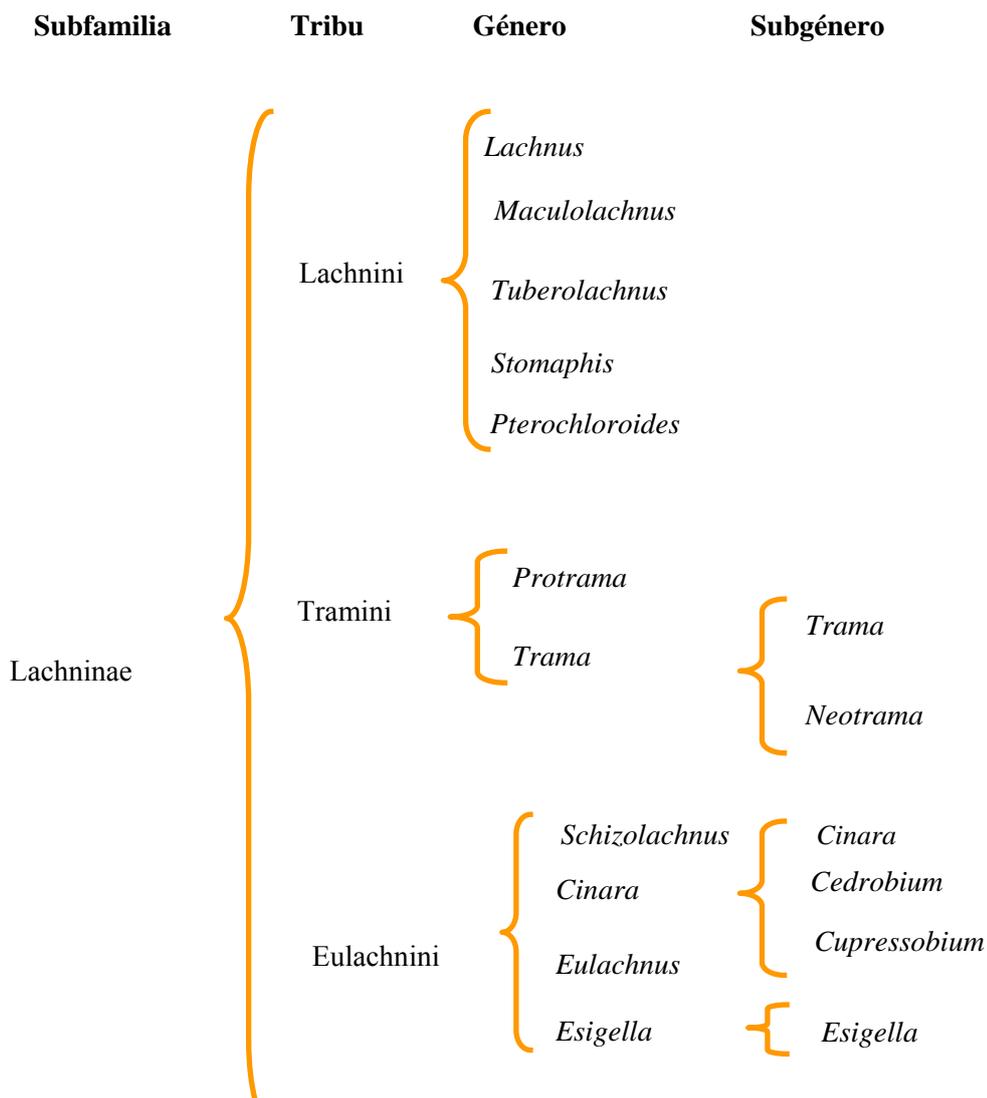


Fig. 3. Clasificación de la subfamilia Lachninae según Nieto -Nafria y colaboradores (2003).

La subfamilia Lachninae tiene una posición filogenética controvertida dentro de la familia Aphididae ya que varía según se realice con caracteres morfológicos (Heie 1987, Wojciechowski 1992) o con DNA mitocondrial (von Dohlen y Moran 2000) que lo sitúan como grupo monofilético junto con la subfamilia Aphidinae, mientras que filogenias más recientes, mediante secuencias de genes del pulgón y de *B. aphidicola* la sitúan en una posición basal (Martínez-Torres et al. 2001, Ortiz-Rivas et al. 2004).

•Material y métodos.

1. Recolección y clasificación de pulgones.

Debido a la imposibilidad de poder cultivar los pulgones de la subfamilia Lachninae en nuestro laboratorio se hizo necesaria su captura e inmediata conservación en acetona para su posterior manipulación. Los pulgones han sido recolectados en distintas localidades de la Comunidad Valenciana y la provincia de Teruel, a lo largo de 2003-2005, siendo determinados siguiendo la clasificación de Nieto-Nafría et al. (2003) con la ayuda de los Doctores Michelena y González-Funes del grupo de entomología y control de plagas del Instituto Cavanilles. Las especies capturadas se muestran en la tabla 1.

Todas las especies de pulgones se nombran con un código de tres letras, derivadas del género y especie respectivamente; en caso de individuos de distintas poblaciones se les añade un número identificativo. Cuando se trata de *B. aphidicola*, se antepone una B y cuando se trata de *S. symbiotica* una S.

Tabla 1. Estado taxonómico, código, planta hospedadora y localización de las especies de pulgón en el estudio actual.

Subfamilia	Tribu	Especies	Código	Planta hospedadora	Recolección Localidad		
Lachninae	Eulachnini	<i>Cinara (Cinara) cedri</i>	Cce1	<i>Cedrus sp.</i>	Liria (Valencia)		
		<i>Cinara (Cinara) cedri</i>	CceS	<i>Cedrus sp.</i>	Salamanca		
		<i>Cinara (Cinara) maghrebica</i>	Cma	<i>Pinus halepensis</i>	Morella (Castellón)		
		<i>Cinara (Cinara) pinea</i>	Cpia	<i>Pinus sylvestris</i>	Valdelinares (Teruel)		
		<i>Cinara (Cinara) pilicornis</i>	Cpl	<i>Picealies</i>	Arcos de las Salinas (Teruel)		
		<i>Cinara (Cupressobium) cupressi</i>	Ccu1	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Ahillas (Valencia)		
		<i>Cinara (Cupressobium) cupressi</i>	Ccu2	<i>Cupressus arizonica</i>	La Yesa (Valencia)		
		<i>Cinara (Cupressobium) tujafilina</i>	Ctu	<i>Thuja sp.</i>	Burjassot (Valencia)		
		Lachnini		<i>Lachnus roboris</i>	Lro	<i>Quercus</i>	Ahillas (Valencia)
				<i>Tuberolachnus salignus</i>	Tsa	<i>Salix sp.</i>	Bugarra (Valencia)

2. Purificación del DNA de los endosimbiontes de distintos pulgones.

Para la extracción y purificación del DNA genómico de los simbiontes, se empleó el método de Latorre y colaboradores (1986). Se colocó un pulgón de cada especie en un tubo de centrífuga, en hielo para evitar la degradación del DNA. Se añadió 160µl de solución I (Tris 10mM, NaCl 60mM, 5% de sacarosa, EDTA 10mM, pH 7,8). Sirve para homegeneizar.

Tras sacar los tubos del hielo se añadió 200µl de la solución II (Tris 300mM, SDS 1,25% para desnaturalizar proteínas, Sacarosa 5%, EDTA 10mM, pH 8) y se mezcló por inversión.

Se incubó a 65°C durante 30 min, tras lo cual se añadió 60µl de AcK 3M pH 5, y se agitó por inversión varias veces. Después de incubarlo a -20°C durante 20 min se centrifugó

durante 10 min a máxima velocidad (14000 rpm) para provocar la precipitación de las proteínas y los restos celulares.

A continuación, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le añadió un volumen de isopropanol. Se agitó por inversión y se realizó una nueva incubación de 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar 10 min, se desechó el sobrenadante. De esta manera conseguimos precipitar el DNA. Una vez lavado el precipitado con 500µl de etanol 70% se centrifugó durante 3 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y se secó al vacío. Por último resuspendimos el precipitado celular en 20 µl de LTE.

3. Diseño de cebadores para el gen *atpD*.

Después de alinear los grupos de referencia externos y algunas secuencias de *S. symbiotica* obtenida por otros cebadores, pudimos diseñar un par de cebadores generales para todas las cepas de *S. symbiotica*: (1) *atpD_3F* (5'-GGTAARGTNGGTCTDTTYGGYGGTGC-3') y (2) *atpD_2R* (5'-YTTTCAGAYAAAYTCRTCCATACC-3').

4. PCR y purificación.

Utilizamos el gen *atpD* porque en *C. cedri* se sabía que este gen no se encontraba en *B. aphidicola*, de hecho se ha perdido todo el operon ATPasa (Pérez-Brocal et al. 2006). Intentamos amplificar este gen en el resto de cepas de *Buchnera* de los otros pulgones y no hubo amplificación, lo que indica que la pérdida del operón fue anterior a la diversificación del linaje Lachninae. Por tanto, utilizando los cebadores del punto 3 amplificaríamos únicamente el gen *atpD* de *S. symbiotica*.

A partir del DNA extraído de los pulgones procedimos a la amplificación por PCR del gen *atpD*. Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron: primer 1 y 2 1.5µl, *Buffer* 10x 5µl, dNTPs 5 µM 2µl, Taq polimerasa 1.5µl, H₂Omq 37,5µl y DNA 1µl (V final= 50µl). Las condiciones de reacción: 94°C 2 min, 30 ciclos de 94°C 30s, 45°C 30s, 72°C 1 min 30s y un último paso de 72°C 4 min. En algunos casos se realizó una RPCR (segunda PCR) con las mismas condiciones para incrementar la cantidad de DNA.

Mediante un gel de agarosa al 0,8%, y con unas cantidades de DNA de 5µl, Tampón de carga 1µl y H₂O 4µl y corriendo a 100 V detectábamos la banda de tamaño esperado (unas 700 pb).

Los productos de PCR se purificaron mediante el "kit" de purificación de PCR (Roche Cat. No. 11732668001) siguiendo su propio protocolo y cuyo producto de purificación se eluye en 20µl de tampón de elución, proporcionado en el propio "kit".

5. Secuenciación del gen *atpD* y tratamiento de las secuencias.

El DNA obtenido tras la purificación fue utilizado para la secuenciación con el "kit" BigDye3 (Applied Biosystems). Los cebadores usados, al tratarse de secuenciaciones directas sin pasar por clonación, son los mismos que para la PCR. Las concentraciones en la mezcla fueron: cebador *atpD_3F* y *atpD_2R* 1µl, BigDye 0.67µl, tampón de secuenciación 1.35µl, H₂Omq 3.5µl y DNA 1.5µl. Las condiciones de reacción fueron: 95°C 1s, 99 ciclos de 95°C 10s, 50°C 5s, 60°C 2min y mantenerlo a 4°C.

La secuenciación se llevó a cabo en el SCSIE de la Universitat de València. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el paquete de programas Staden Package (Staden et al. 2000). En todos los casos se secuenciaron las dos cadenas de DNA.

Las secuencias resultantes fueron enviadas contra la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mediante BLASTx. De esta manera se confirmó que las secuencias obtenidas correspondían a *S. symbiotica*.

6. Reconstrucción filogenética.

En primer lugar se realizó el alineamiento de las secuencias mediante el programa ClustalX (Thompson et al. 1997). Debido a que las secuencias no eran todas del mismo tamaño se recortaron mediante el programa GenDoc (Nicholas et al 1997).

La reconstrucción filogenética mediante Maxima Verosimilitud se realizó mediante el programa PHYML versión 2.4.4 (Guindon S y Gascuelo 2003) bajo un modelo evolutivo GTR con corrección gamma (G) de heterogeneidad de tasa de sustitución y un parámetro que tiene en cuenta la relación del número de sitios invariantes propuesto por Modeltest 3.7 (Posada, 1998), aplicando el criterio de información de Akaike. Para todos los árboles se aplicó un *bootstrap* usando 1000 pseudoréplicas.

También se realizó una reconstrucción filogenética mediante un análisis Bayesiano bajo el mismo modelo evolutivo anterior. La inferencia filogenética fué llevada a cabo mediante el programa MrBayes 3.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Los árboles se generaron tras correr el programa dos veces con 1000000 de generaciones y un muestreo cada 100 generaciones, cuyas 20000 primeras generaciones fueron descartadas como "burnin".

Las secuencias utilizadas para la reconstrucción fueron:

-*S. symbiotica*.

-Grupo de referencia externo: *Erwinia carotovora* (YP_052595), *Yersinia pseudotuberculosis* (YP_072442), *Serratia marcescens* (ABI21950).

7. Microscopia óptica.

Se cortó la cabeza de 4 pulgones adultos vivos de *C. tujaefilina* y de *C. cedri* en NaCl 0,9%. Se llevó a cabo la fijación con 2% paraformaldehído-2,5% glutaraldehído en tampón fosfato (PB) 0,2M pH 7,4 al vacío durante 24h, tras lo cual se hicieron varios lavados con PB 0,1M. Para su posfijación se utilizó tetraóxido de osmio al 2% en PB 0,1 durante 90 min en oscuridad, se deshidrató en etanol y se incluyó en araldita (Durcupan, Fluka).

Mediante cuchilla de diamante se cortaron secciones semifinas (1,5 μ m) y se tiñeron con azul de toluidina. Posteriormente se observaron y fotografiaron bajo microscopio óptico (Leica EM UC66).

•Resultados.

1. Reconstrucción filogenética de *S. symbiotica* en la subfamilia Lachninae y comparación con la obtenida por 16SrDNA.

Llevamos a cabo la reconstrucción filogenética para *S. symbiotica*, usando *S. marcescens* y las bacterias de vida libre mencionadas anteriormente, para confirmar los resultados anteriores con datos de secuencia de 16S rDNA (fig. 4).

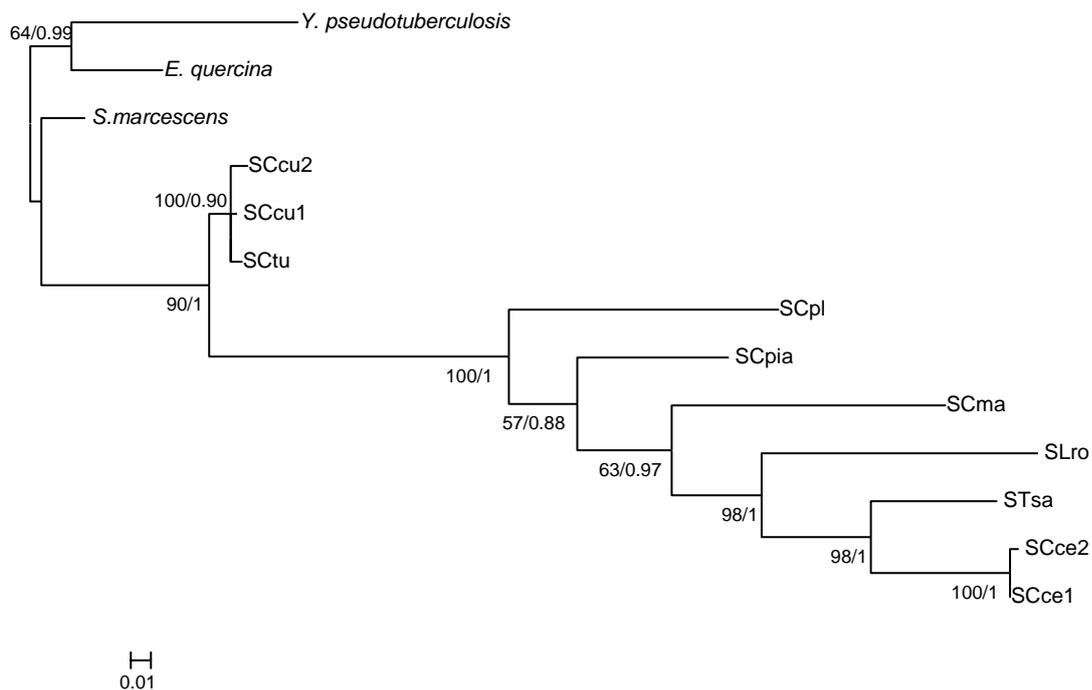


Fig 4. Árbol filogenético atpD obtenido por máxima verosimilitud (ML) para *S. Symbiotica*. Los valores en los nodos indican el soporte por *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas y probabilidades Bayesianas a posteriori. Ramas con valores menores al 55% fueron colapsadas.

Con toda la información de la que disponíamos realizamos un árbol filogenético concatenado, donde se utilizaban las secuencias concatenadas de 16SrDNA y *atpD*, esto nos permite incrementar la señal filogenética.

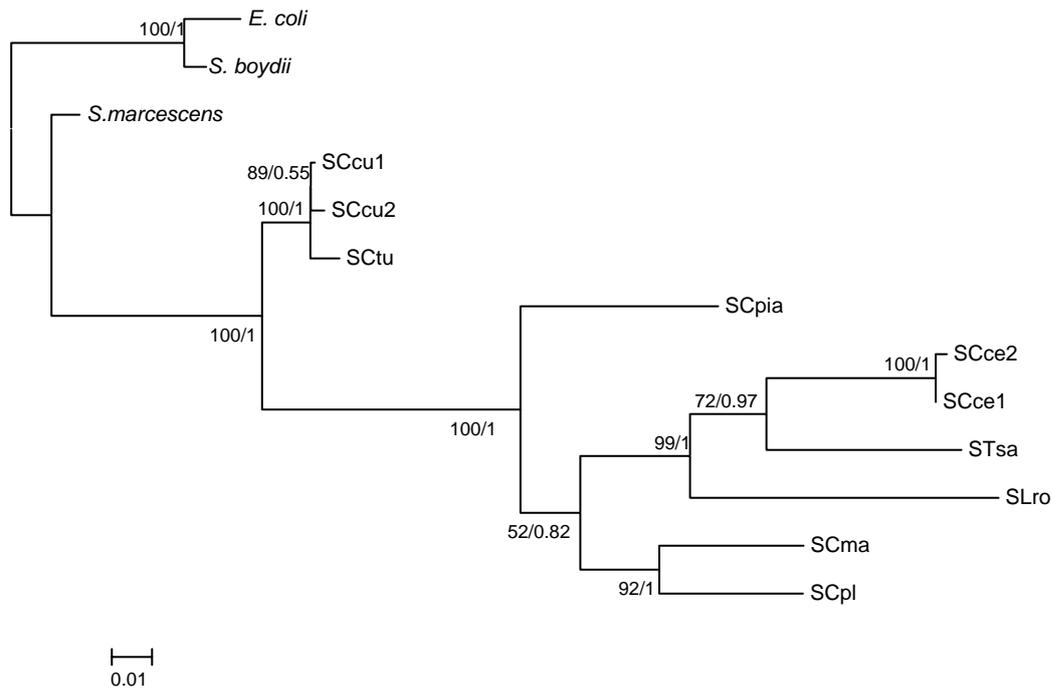


Fig 5. Árbol filogenético de los genes *atpD*-16SrDNA concatenados obtenido por máxima verosimilitud (ML) para *S. Symbiotica*. Los valores en los nodos indican el soporte por *bootstrap* con 1000 pseudoréplicas y probabilidades Bayesianas a posteriori. Ramas con valores menores al 55% fueron colapsadas.

Los dos árboles apoyan la existencia de dos grupos monofiléticos: *Cinara cinara* y *Cinara cupressobium*, al igual que lo hacia el árbol filogenético de la figura 2. Existe una diferencia en la longitud de las ramas en cada clúster, siendo el de *Cinara cinara* más largo que el clúster *Cinara cupressobium*. Existe una agrupación diferente en el clúster *Cinara cinara* del árbol filogenético concatenado donde Cma y Cpl quedan agrupados en un mismo clado respecto a lo obtenido en el árbol *atpD*.

2. Caracterización morfológica de *S. symbiotica* de *C. cedri* y *C. tujafilina*.

Se seleccionó un representante de cada clado: *Cinara (Cupressobium) tujafilina* y *Cinara (Cinara) cedri*, ambas pertenecientes al género *Cinara*.

2.1. *C. cedri*.

S. symbiotica de *C. cedri* se encuentra en bacteriocitos secundarios. Además presenta una morfología esférica. Resultado mostrado en figura 6.

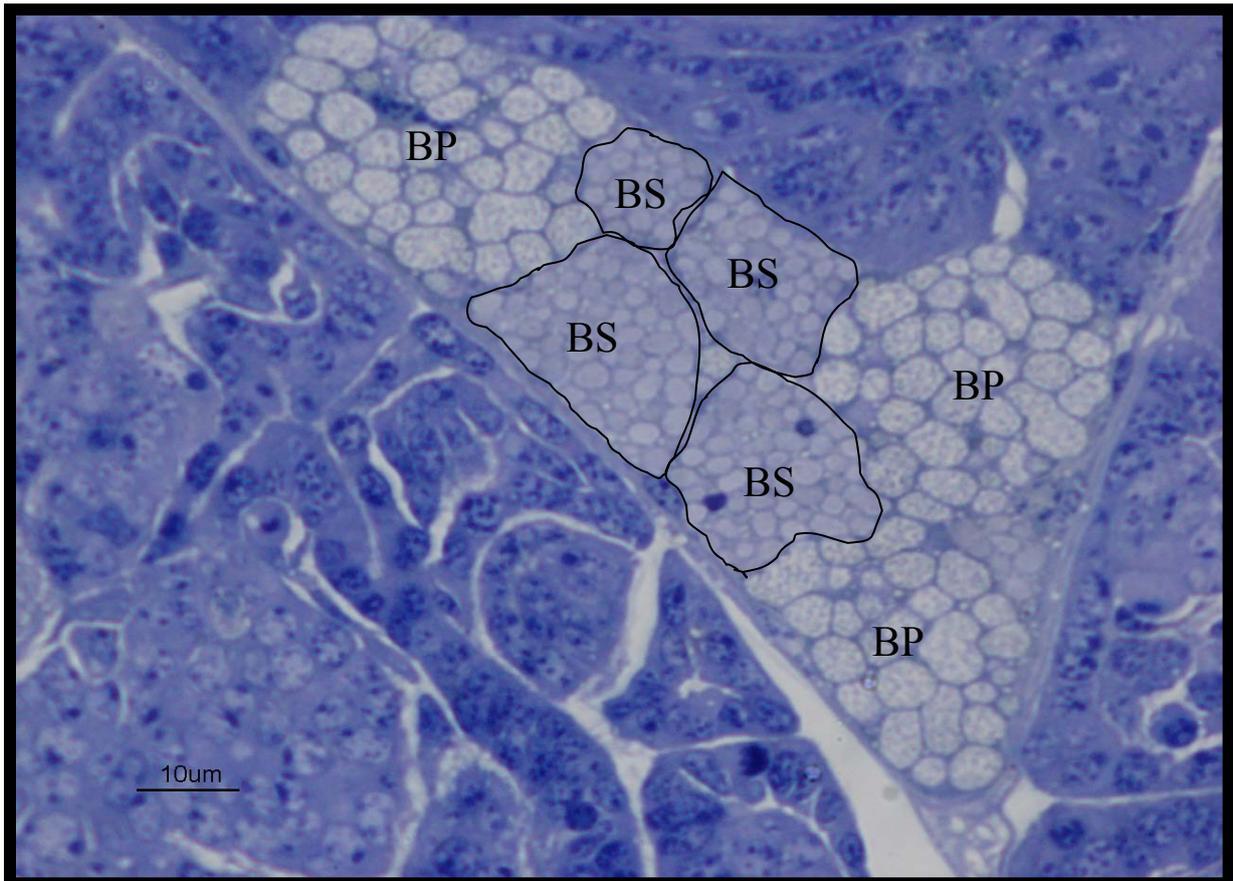


Fig 6. Bacteriocitos primarios y secundarios de *C. cedri*. BP corresponde a los bacteriocitos primarios y BS corresponde a los bacteriocitos secundarios.

2.2. *C. tujafilina*.

S. symbiotica de *C. tujafilina* se encuentra localizada en bacteriocitos secundarios, células de la vaina y en la hemolinfa. Su morfología es vacilar. Resultado mostrado en figuras 7 y 8.

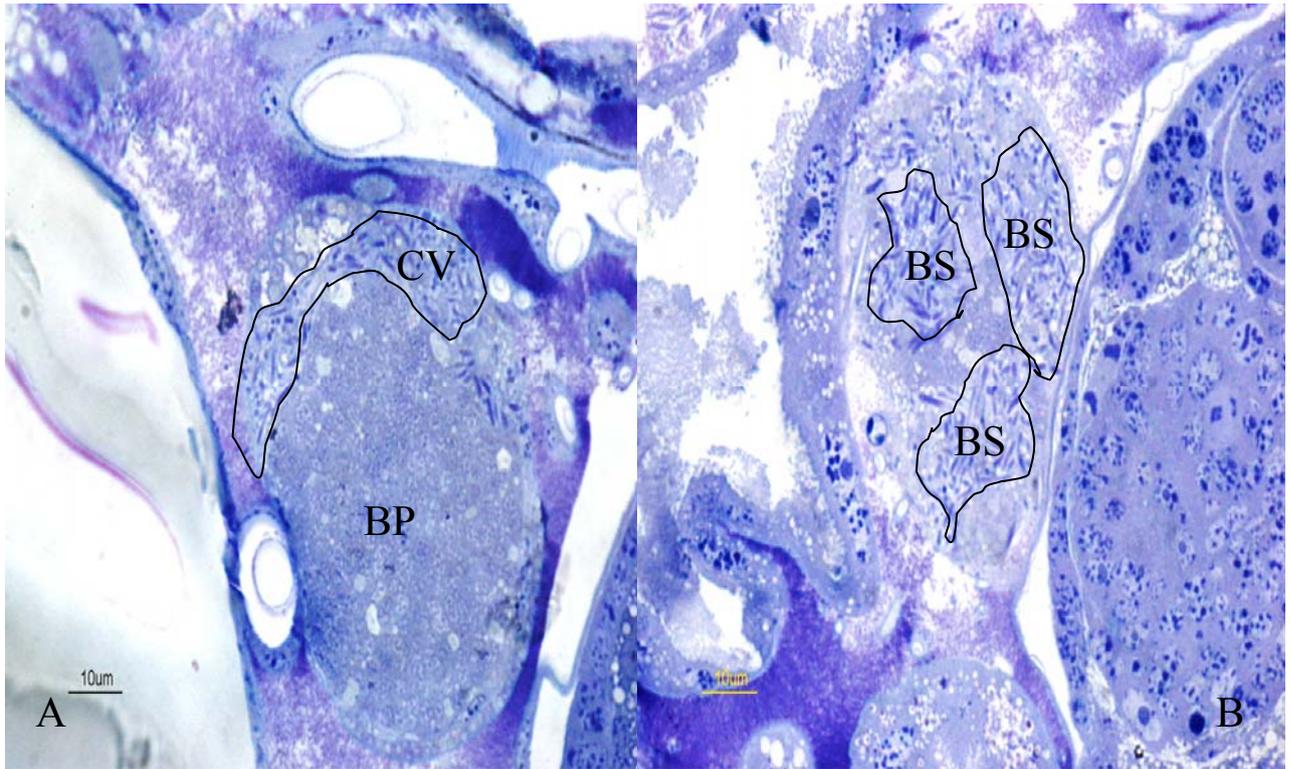


Fig 7. Bacteriocitos primarios, secundarios y células de la vaina de *C. tujafilina*. En la figura A representamos un bacteriocito primario (BP) rodeado por células de la vaina (CV). En la figura B representamos bacteriocitos secundarios (BS).

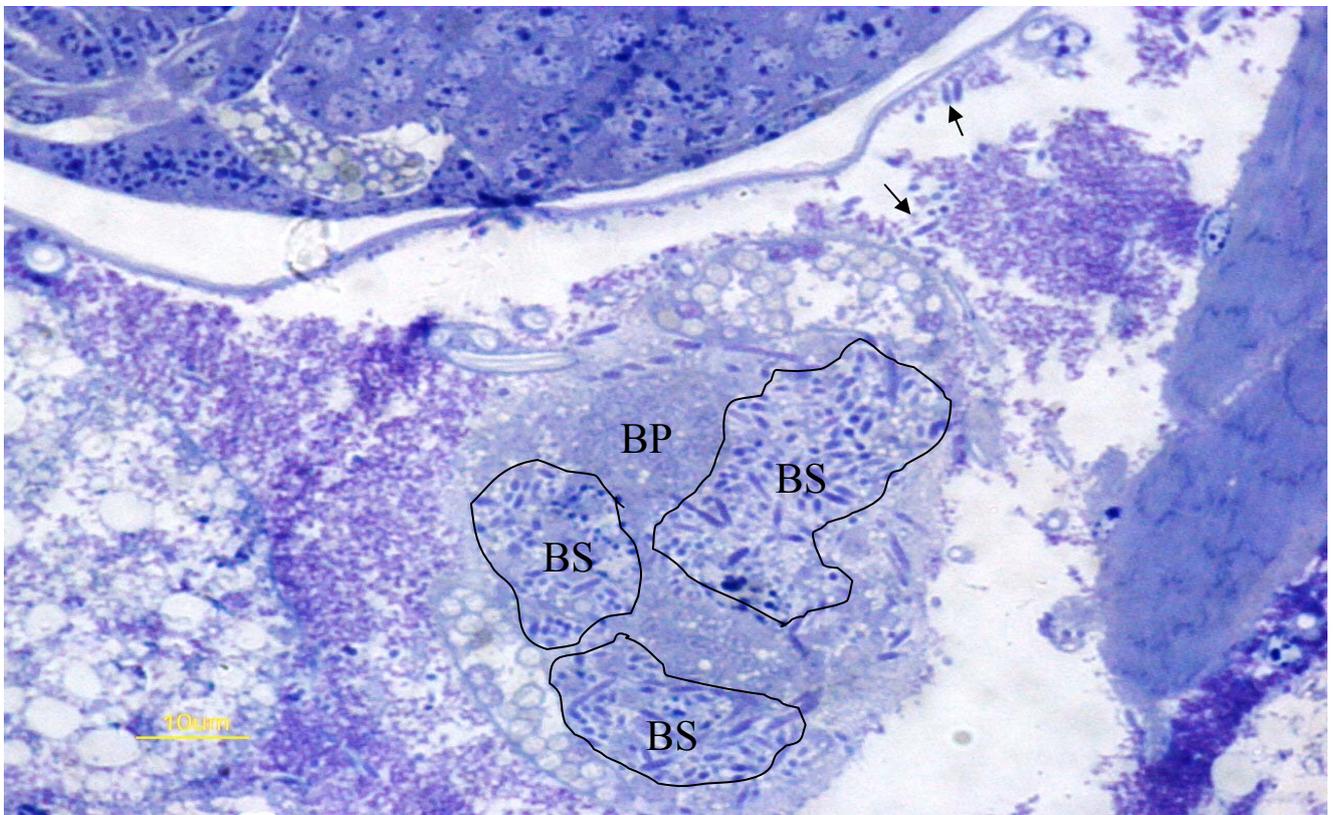


Fig 8. Bacteriocitos primarios y secundarios de *C. tujafilina*. BP corresponde a los bacteriocitos primarios, BS a los bacteriocitos secundarios y las flechas indican *S. symbiotica* en la hemolinfa.

•Discusión.

Tradicionalmente se considera que *S. symbiotica* es una bacteria facultativa porque su presencia no se requiere para la supervivencia y reproducción del insecto hospedador (Moran et al. 2007), lo cual queda en duda en nuestros estudios, al encontrarse ampliamente distribuida en nuestro pulgones.

Los análisis filogenéticos realizados apoyan la estructura filogenética (16S rDNA) propuesta, defendiendo de este modo las hipótesis que en su momento se plantearon. La primera observación es la aparición de dos clados, *Cinara Cinara* y *Cinara Cupressobium*, el primero está formado por SS de pulgones pertenecientes a la tribu Lachnini y al género *Cinara* (*Cinara*), mientras que el segundo por pulgones del género *Cinara* (*Cupressobium*) y especies pertenecientes a la subfamilia Aphidinae, Chaitophorinae y Eriosomatinae.

Estos dos clados nos sugieren la existencia de dos tipos de *S. symbiotica*. Además, la longitud de las ramas en el clado que formaban los Lachnini con los *Cinara* (*Cinara*) nos está marcando una evolución de la secuencia más acelerada, lo que podríamos relacionar con una posible pérdida del gen *recA* en este clado (datos no publicados).

Cuando analizamos morfológicamente SCTu nos encontramos con que presenta una morfología bacilar y una distribución heterogénea, localizándose en bacteriocitos secundarios, células de la vaina y hemolinfa, al igual que la distribución y morfología descrita en SS pertenecientes a la subfamilia Aphidinae (Chen et al. 2000), en cambio SCce posee una forma esférica y se localiza en bacteriocitos secundarios mimetizando a un endosimbionte primario.

El conjunto de evidencias que hemos obtenido en este trabajo, como son la presencia de secundarios durante distintos años y en casi todos los pulgones, o el hecho de presentar características similares a las de un endosimbionte primario, se unen a otras obtenidas por Pérez-Brocal y colaboradores (2006) quienes, en el caso concreto de *C. cedri* apuntan a que el endosimbionte primario está en fase tan avanzada de degradación que estaría cerca de perder su papel original de endosimbionte primario. De hecho, funciones esenciales para el pulgón como el suministro del aminoácido triptófano o la vitamina riboflavina, se han perdido por completo en esta cepa de *B. aphidicola*, por lo que se sugiere que estos metabolitos deben de ser suministrados por otra fuente, proponiéndose a *S. symbiotica* como candidato para ejercer estas funciones. Existen funciones que por sí sola *B. aphidicola* no es capaz de realizar, por lo que se puede plantear que *S. symbiotica* se las debe de proporcionar. Todo ello nos lleva a plantear, que esté ocurriendo o un reemplazamiento o una complementación entre los dos endosimbiontes.

La posibilidad de reemplazamiento por endosimbiontes en pulgones ha sido postulada por varios autores (Clark et al. 1999, Moran et al. 1996 y Pérez-Brocal et al. 2006). Recientemente (Lefèvre et al. 2004) mostró una fuerte evidencia de reemplazamiento bacteriano en los gorgojos de la familia *Dryophthoridae*. Por otro lado, la existencia de complementación de simbiosis ha sido demostrada en el insecto *Homalodisca coagulata* (Wu et al. 2006), que se alimenta del xilema de las plantas, una sustancia deficiente en vitaminas y aminoácidos. Los autores, mediante secuenciación completa del genoma de *Sulcia* y parcial del de *Baumannia* han demostrado que la primera sintetiza vitaminas, mientras que la segunda sintetiza aminoácidos.

La secuenciación del genoma de *S. symbiotica* SCce, actualmente muy avanzada, nos permitirá confirmar si la hipótesis de reemplazamiento es correcta o se trata de un caso de complementación. La secuenciación en un futuro de *S. symbiotica* de *C. tujaefilina* nos permitirá decidir si se trata de un clado diferente al de *S. symbiotica* de SCce.

•Bibliografía.

- Chen D.Q., Moran N.A., Baumann L. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects, p. 1-67. In M. Dworkin (ed.), The prokaryotes. Springer-Verlag, New York, N.Y. (2000).
- Clark M., Moran N.A., Baumann P. Sequence evolution in bacterial endosymbionts having extreme base composition. *Mol. Biol. Evol.* **16**:1586-1598 (1999).
- Ferrari J., Darby A.C., Daniell T.J., Godfray H.C.J., Douglas A.E. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecol. Entomol.* **29**:60-65 (2004).
- Fukatsu T. Secondary intracellular symbiotic bacteria in aphids of the genus *Yamatocallis* (Homoptera: Aphididae: Drepanosiphinae). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5315-5320 (2001).
- Gil, R., Sabater-Muñoz B., Pérez-Brocal V., Silva F.J., Latorre A. Plasmids in the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* with the smallest genomes. A puzzling evolutionary story. *Gene* **370**:17-25 (2006).
- Gómez-Valero L., Soriano-Navarro M., Pérez-Brocal V., Heddi A., Moya A., García-Verdugo J.M., Latorre A. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *J. Bacteriology* **186**:6626 (2004).
- Guindon S., Gascuel O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* **52**:696-704 (2003).
- Heie O.E. Paleontology and phylogeny : En "Aphids: their biology, natural enemies and control". *World crop pests*, Vol 2A (A.K. Minks y P. Harrewijn, Eds.), Elsevier, Amsterdam Pp. 367-391 (1987).
- Jeyaprakash A., Hoy M.A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* **9**:393-405 (2000).
- 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. R. Soc. Lond.* **B 270**:2543-2550 (2003).
- Lamelas, A. Estudio filogenético y Morfológico de bacterias simbiotes en la subfamilia Lachninae. *Trabajo de investigación del postgrado Universitat de València* (2006).
- Latorre A., Moya A., Ayala F.J. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8649-8653 (1986).

- Latorre A., Gil R., Silva F.J., Moya A. Chromosomal stasis versus plasmid plasticity in aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Heredity* **95**:339-347 (2005).
- Lefèvre C., Charles H., Vallier A., Delobel B., Farrel B., Heddi A. Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils: evidence for bacterial replacement. *Mol. Biol. Evol* **21**: 965–973 (2004).
- Lynch M., Kostella B., Schaak S. Mutation Pressure and the Evolution of Organelle Genomic Architecture. *Science* **311**:1727 (2006).
- Martínez-Torres D., Buades C., Latorre A., Moya A. Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Mol. Phyl. Evol.* **20**:437-449 (2001).
- Montllor C.B., Maxmen A., Purcell A.H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* **27**:189-195 (2002).
- Moran N.A., Accelerated evolution and Muller's ratchet endosymbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2873-2878 (1996).
- 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).
- Moya A. Comparative molecular evolution of primary (*Buchnera*) and secondary symbionts of aphids based on two protein-coding genes. *J. Mol. Evol.* **55**:127-137 (2002).
- Nicholas K.B., Nicholas H.B.J., Deerfield D.W. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *Embnew. News* **4**:14 (1997).
- 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.* **10**:1803-1807 (2003).
- Ortiz-Rivas B, Moya A, Martínez-Torres D. Molecular systematics of aphids (Homoptera: Aphididae): new insights from the long-wavelength opsin gene. *Mol. Phyl. Evol.* **30**:24-37 (2004).
- Pérez-Brocal V., Gil R., Ramos S., Lamelas A., Postigo M., Michelena J.M., Silva F.J., Moya A., Latorre A. A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship. *Science* **314**:312 (2006).
- Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817-818. (1998).
- Russell J.A., Latorre A., Sabater-Muñoz B., Moya A., Moran N.A. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond Aphidoidea. *Molecular Ecology* **12**:1061-1075 (2003).

- Remaudière G., Remaudière M. Catalogue des Aphididae du Monde. Homoptera Aphidoidea. *Institut National de la Recherche Agronomique*, Paris (1997).
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574 (2003).
- Staden R., Beal K.F. y Bonfield J.K. The Staden package, 1998. *Methods Mol. Biol.* **132**:115-30 (1998).
- Thompson, J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882 (1997).
- Tsuchida T., Koga R., Fukatsu T. Host specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**:1989 (2004).
- Von Dohlen C.D., Moran N.A. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **71**:689-717 (2000).
- Wu D., Daugherty S.C., Van Aken S.E., Pai G.H., Watkins K.L., Khouri H., Tallon L.J., Zaborsky J.M., Dunbar H.E., Tran P.L., Moran N.A., Eisen J.A., Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *Plos Biol* **4**:1079-1092 (2006).
- Wojciechowski W. Studies on the systematic system of aphids (Homoptera, Aphidinea). *Uniwersytet Slaski Katowice* 1-75 (1998).