

CONSECUENCIAS EVOLUTIVAS Y BIOLÓGICAS CAUSADAS POR BACTERIAS DEL GÉNERO *WOLBACHIA* EN ARTRÓPODOS

Enrique González Tortuero¹ & Francisco David Martínez Pérez²

¹Ctra. De Alcalá 9, 19174, Torrejón del Rey, Guadalajara, España – enriquegleztortuero@gmail.com

²Sociedad para el Estudio y Conservación de las Arañas, C/ Moratines 18, 1º B, 28005 Madrid, España – seca_es@yahoo.es

Resumen: Se revisa la información existente sobre *Wolbachia*, género de bacterias común y ampliamente distribuido que se encuentra en los tejidos reproductores y somáticos de un gran número de especies del clado *Ecdisozoa*. Estos endosimbiontes inducen alteraciones en la reproducción de los artrópodos (como la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis, androcidio y feminización) y patogénesis en las filarias. Este microorganismo permitiría explicar cuestiones de biología teórica como la especiación rápida de los artrópodos, la transferencia horizontal de genes y las alteraciones citogenéticas inducidas por factores citoplasmáticos. Discutimos el desarrollo de su aplicación en el control biológico de plagas y de artrópodos vectores de enfermedades.

Palabras clave: Arthropoda, androcidio, endosimbiosis, feminización, incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis, bacterias, *Wolbachia*.

Evolutionary and biological effects caused in arthropods by bacteria of the genus *Wolbachia*

Abstract: A revision is presented of the existing information on *Wolbachia*, a common and widespread genus of bacteria found in reproductive and somatic tissues in species of the clade *Ecdisozoa*. These endosymbionts induce reproductive alterations in arthropods (such as cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, male-killing and feminization) and pathogenesis in filarial nematodes. These microorganisms would help to explain such questions of theoretical biology as the high rate of speciation of arthropods, horizontal gene transfer and cytogenetic alterations linked to cytoplasmic factors. We discuss the development of their application in the biological control of pests and disease-carrying arthropods.

Key words: Arthropoda, male-killing, endosymbiosis, feminization, cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, bacteria, *Wolbachia*.

Introducción

Wolbachia es un género de bacterias de transmisión materna que se encuentran en los tejidos reproductores y somáticos (Dobson *et al.*, 1999) de un amplio rango de animales del clado de los *Ecdisozoa*. Estos organismos procariontes inducen alteraciones en los ciclos reproductores en los artrópodos, como la incompatibilidad citoplasmática (IC) inter- e intraespecífica, inducción de partenogénesis, androcidio y feminización de individuos genéticamente machos (Majerus, 1999; Werren, 1997). En el caso de los nematodos, dichas bacterias son simbioses mutualistas obligados que favorecen la patogénesis en las filarias (Taylor & Hoerauf, 1999).

Así pues, el interés de estas bacterias radica en dos aspectos:

1. Las bacterias del género *Wolbachia* están implicadas en procesos importantes desde el punto de vista evolutivo y molecular como la especiación rápida en los insectos (Bordenstein *et al.*, 2001) y la transferencia horizontal de genes (Kondo *et al.*, 2002).
2. Desde un punto de vista aplicado, este género de bacterias puede ser interesante para el control biológico como “enemigo natural” microbiano al disminuir la fecundidad de enemigos naturales (Zabalou *et al.*, 2004) o al promover la fecundidad de las avispas parasitoides (Stouthamer, 1993). También puede servir como vector de modificaciones genéticas para estudios de poblaciones de insectos (Beard *et al.*, 1998) e, incluso, en el caso de las filarias, ser un punto de diana terapéutico (Taylor *et al.*, 2000).

Actualmente, hay una creciente cantidad de información sobre la evolución, genómica y los mecanismos de acción de *Wolbachia*. Por ello, en este artículo se revisa la información

existente sobre los efectos de este procarionte en artrópodos y sus consecuencias evolutivas, sin entrar en detalles moleculares y genómicos.

Filogenia y distribución del género *Wolbachia*

Distribución de *Wolbachia* a lo largo de los *Ecdisozoa*

Hasta ahora, se han descubierto en insectos (e. g. Kittayapong *et al.*, 2003; Kyei-Poku *et al.*, 2006; Werren *et al.*, 1995a), crustáceos (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2008), ácaros (Breeuwer y Jacobs, 1996; Gotoh *et al.*, 2003), escorpiones (Baldo *et al.*, 2007), arañas (Goodacre *et al.*, 2006; Rowley *et al.*, 2004), pseudoescorpiones (Zeh *et al.*, 2005), colémbolos (Czarnetzki y Tebbe, 2004; Vanderkerckhove *et al.*, 1999) y en nematodos (Bandi *et al.*, 1998; Casiraghi *et al.*, 2004; Taylor y Hoerauf, 1999). Dentro de los insectos, se han encontrado en la mayoría de los órdenes, estimándose actualmente que un 66% de especies contienen estos simbioses (Hilgenboecker *et al.*, 2008). En el caso de los nematelmintos, solamente se han detectado en la mayoría de las especies de la familia Onchocercidae, destacando las especies más infecciosas para el ser humano: *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* y *Onchocerca volvulus* (Bandi *et al.*, 1998).

Taxonomía microbiana de *Wolbachia*

Desde un punto de vista taxonómico, el género *Wolbachia* se ubica dentro del filo α -*Proteobacteria*, y están emparentadas con bacterias del orden *Rickettsiales*, formando un grupo monofilético (fig. 1). Las rickettsias son parásitos intracelulares obligados cocoides Gram negativos que se encuentran frecuentemente en los artrópodos. Estos animales actúan

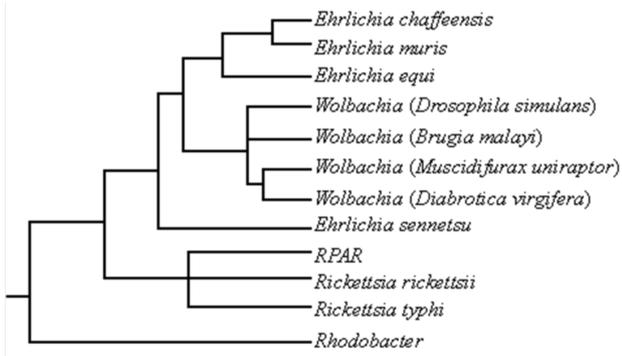


Fig. 1. Topología del cladograma de la secuencia de ADNr 16S de bacterias del género *Wolbachia* y otras rickettsias realizado según el algoritmo de Máxima Parsimonia. Basado en Anderson y Karr (2001).

como vectores, de modo que infectan a los vertebrados causando enfermedades como el tifus epidémico (*Rickettsia prowazekii*), la ehrlichiosis canina (*Ehrlichia canis*) y la anaplasmosis granulocítica humana (*Anaplasma phagocytophilum*) (Anderson y Karr, 2001; Werren, 1997). Sin embargo, *Wolbachia* no causa patologías en los vertebrados, sino que induce a alteraciones en los ciclos reproductores de sus hospedadores. Entre ellos, hay que destacar la IC inter- e intraespecífica en hexápodos y ácaros, inducción de partenogénesis en himenópteros y colémbolos, androcidio en coleópteros, lepidópteros y pseudoescorpiones, la feminización de individuos genéticamente machos en los crustáceos isópodos (Majerus, 1999; Werren, 1997), y en los nematodos con simbioses mutualistas obligados de las filarias (Taylor y Hoerauf, 1999). Al establecer las relaciones filogenéticas entre el género *Wolbachia* con *Ehrlichia* y *Rickettsia*, se ve que la manipulación de la reproducción del hospedador es un carácter derivado vinculado con la pérdida de la habilidad de infectar a hospedadores vertebrados que poseen las especies del género *Ehrlichia* y *Rickettsia* (Anderson y Karr, 2001).

Estudios cladistas de *Wolbachia*: ¿una especie con muchas cepas o muchas especies con pocas cepas?

Dentro del género *Wolbachia*, se han establecido ocho clados basándose en las secuencias de los genes ADNr 16S y *ftsZ*. Estos grupos monofiléticos (o “supergrupos”) se denominan con letras mayúsculas desde la A hasta la H (fig. 2) (Lo *et al.*, 2007). Los supergrupos A y B fueron los primeros en ser estudiados y se corresponden con las bacterias responsables de la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis y feminizantes en los artrópodos (Majerus, 1999; Werren, 1997), mientras que los supergrupos C y D se corresponden con las bacterias descubiertas en las filarias y que son responsables de su condición zooparásita (Bandi *et al.*, 1998; Taylor y Hoerauf, 1999). En algunas especies de colémbolos (Entognatha, Collembola), se encuentran bacterias del mencionado género que forman un grupo monofilético aparte (supergrupo E). Además, las bacterias del género *Wolbachia* que portan algunos artrópodos como las chinches de las camas (Hemiptera, Cimicidae) forman otro clado junto a aquellos que se ubican en las células de las filarias del género *Mansonella* distinto a los anteriormente mencionados (supergrupo F) (Casiraghi *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 2002). Actualmente, la presencia de endosimbiontes del género *Wolbachia* del supergrupo F en los escorpiones del género *Opisthophthalmus* puede indicar que

hubo más de una radiación de endosimbiontes y que tras estas radiaciones siempre hubiera transmisión horizontal y flujo genético reducido (Baldo *et al.*, 2007). Por último, los endosimbiontes que se encuentran en algunas arañas (como los géneros *Diaea* y *Dysdera*) forman un clado cuyos grupos hermanos más cercanos son los clados A y B. A este grupo monofilético se le ha denominado supergrupo G (Rowley *et al.*, 2004). Recientemente se ha visto que, en algunas termitas (Hexapoda, Isoptera), se encuentran bacterias del mencionado género que forman un grupo monofilético aparte (supergrupo H) (Lo y Evans, 2007). Todos estos supergrupos han sido corroborados realizando filogenias con otros genes como *groEL* y *gltA* (Casiraghi *et al.*, 2005), un sistema de tipado de secuencias multilocus (MLST: Baldo *et al.*, 2006b) y con genomas parciales (Baldo *et al.*, 2006a).

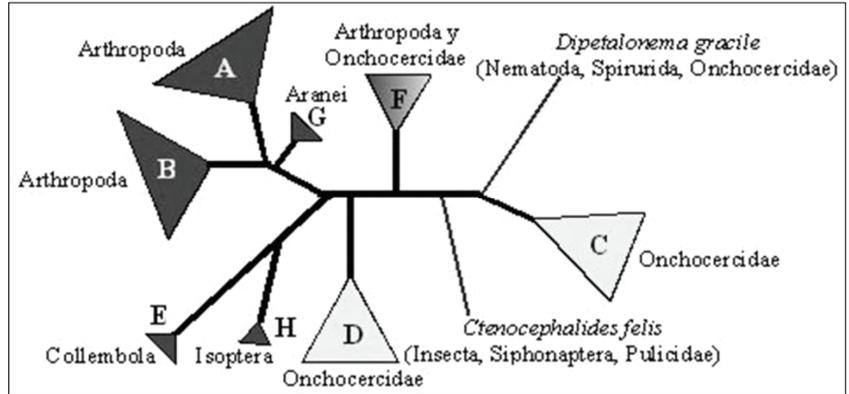
Dentro de este sistema de clasificación de supergrupos, se ha propuesto subdividirlos en otros más pequeños (“grupos”, linajes o cepas) basándose en la secuencia del gen de la proteína de superficie de *Wolbachia* (*wsp*). Estos grupos se nombrarían con una *w* minúscula y el nombre específico del hospedador, como por ejemplo *wMel* (sería la cepa de *Wolbachia* de *Drosophila melanogaster*), *wPip* (para indicar el endosimbionte hallado en *Culex pipiens*) o *wPap* (si se trata de la cepa de *Wolbachia* de *Phlebotomus papatasi*). Sin embargo, si hay más de un cepa de *Wolbachia* en un mismo hospedador, se pone el supergrupo al que pertenece (como sucede en *wAlbA*, donde se indica que es la *Wolbachia* de clado A de *Aedes albopictus*) o se indica el lugar de procedencia de la especie (viéndose esto en el caso de *wHaw*, donde se quiere indicar que es la *Wolbachia* de las poblaciones de *Drosophila simulans* de Hawaii) (Zhou *et al.*, 1998). Pese a esto, se ha visto que la proteína WSP es producto de genes quiméricos, i. e., se ha originado por la fusión de distintos genes. Por este motivo, se ha sugerido no realizar filogenias con este gen (Baldo *et al.*, 2005; Werren y Bartos, 2001).

Sin embargo, hay mucha controversia sobre si es una misma especie (*Wolbachia pipientis*) distribuida en numerosos hospedadores o si estas bacterias son específicas de cada hospedador, y por ello, habría que nombrarlas en función del hospedador. Al margen del debate sobre el concepto microbiológico de especie, hay que destacar que la divergencia de las secuencias de ADNr 16S entre los clados A y B es del 2% y su tiempo de divergencia es de 50 ma (Werren *et al.*, 1995b), al igual que el tiempo de divergencia entre los linajes de *Wolbachia* de hospedadores artrópodos y nematodos ocurrió hace 70-140 ma y la divergencia de las secuencias de ADNr 16S entre estos linajes es del 5,7% (Sironi *et al.*, 1995). Por ello, considerando el concepto de especie cladístico (Hennig, 1966), habría más de una especie de *Wolbachia*. De hecho, algunos investigadores han caracterizado a algunos de estos simbioses clasificándolos en otras especies como *W. postica* (Leu *et al.*, 1989), *W. inokumae* y *W. brouquii* (Matsumoto *et al.*, 2008). Sin embargo, en una conferencia internacional realizada en Australia en 2004, se llegó al consenso de que todas las bacterias que tengan una afinidad filogenética cercana a *Wolbachia pipientis* deberían ser incluidas en esta especie (Lo *et al.*, 2007).

Transmisión horizontal de bacterias e implicaciones evolutivas

Los estudios filogenéticos realizados con el gen *ftsZ* del endosimbionte muestran incoherencias con los cladogramas de sus

Fig. 2. Diagrama esquemático de la filogenia de *W. pipientis* basado en las secuencias de ADNr 16S, *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *dnaA* y *wsp*. Las líneas rojas indican linajes de endosimbiontes que no han sido determinados en ninguno de los supergrupos. Modificado de Lo *et al.* (2007).



hospedadores artrópodos (Werren *et al.*, 1995b), pero son coherentes con los cladogramas de sus hospedadores nematodos (Bandi *et al.*, 1998).

La incoherencia mostrada entre las bacterias del género *Wolbachia* de los clados A y B con sus hospedadores artrópodos es tan grande que se ha visto secuencias idénticas del gen *ftsZ* de estas bacterias entre especies de distintos órdenes de insectos. Esto se puede explicar a través de las interacciones negativas entre las distintas especies. De hecho, el parasitoidismo (Werren *et al.*, 1995b; Vavre *et al.*, 1999a) y la depredación (Hoy y Jeyaprakash, 2005; Johanowicz y Hoy, 1996; Cordaux *et al.*, 2001) podrían ser mecanismos de transmisión horizontal de estas bacterias, dado que se capturarían los simbiontes del hospedador o presa y pasarían a estar en las células reproductivas del parasitoide o depredador (Vavre *et al.*, 1999a). Sin embargo, la elevada transmisión de bacterias que se da en los insectos herbívoros no se puede explicar mediante interacciones negativas (Shoemaker *et al.*, 2002), sino que se sospecha que las plantas puedan ser un “almacén temporal” de bacterias, de modo que un nuevo hospedador adquiere las bacterias tras alimentarse de una planta donde ha estado anteriormente otro fitófago (Sintupachee *et al.*, 2006). Esta hipótesis está apoyada en estudios donde se ha demostrado que la bacteria es capaz de sobrevivir en el medio ambiente (Rasgon *et al.*, 2006). A pesar de estas observaciones, algunos autores postulan que la transmisión horizontal de bacterias se ha dado dentro de los mismos géneros de hospedadores, dado que influye en la expresión del fenotipo de las bacterias la fisiología del hospedador (Jiggins *et al.*, 2002). Corroborando este postulado, en las hormigas del género *Formica* ha habido muchas transmisiones horizontales de bacterias a lo largo de su evolución (Viljakainen *et al.*, 2008).

La coherencia que se da entre las filogenias de estos endosimbiontes de los clados C y D y los cladogramas de sus hospedadores indica que la asociación entre las filarias y *Wolbachia* es estable y se ha transmitido de manera vertical (Bandi *et al.*, 1998). Ahora bien, el hecho de que en el supergrupo F haya hospedadores nematodos y artrópodos indican que hubo transmisión horizontal de estos endosimbiontes hace 100 m.a. (Casiraghi *et al.*, 2005). No obstante, siempre hay que tener presente que la transferencia horizontal puede dar lugar a confusiones en los estudios filogenéticos de *Wolbachia*, por lo que se deberían reinterpretar adecuadamente los patrones evolutivos de esta bacteria (Jiggins *et al.*, 2001; Werren y Bartos, 2001).

Consecuencias evolutivas generales de los efectos que produce *Wolbachia* en sus hospedadores

Independientemente del efecto que genere *Wolbachia* en el hospedador, se sostiene que las alteraciones en la reproducción de artrópodos y la patogénesis obligada en las filarias es un producto de la interacción *Wolbachia* – ancestro del

clado Ecdisozoa, conllevando la pérdida de infecciones en algunos linajes como en *Drosophila melanogaster*; en el lepidóptero *Plutella xylostella* y en las filarias. En los dos primeros casos, las cepas de *Wolbachia* poseen distintas tasas de infección dependiendo de la biogeografía sin correlación entre *Wolbachia* y haplotipos mitocondriales en la susodicha especie (Rousset y Solignac, 1995; Delgado y Cook, 2009). En el tercer caso, se ha visto que hay una pérdida de endosimbiontes a lo largo de la evolución de la familia Onchocercidae, de modo que solamente se conservan en las subfamilias Dirofiliariinae y Onchocercinae (Casiraghi *et al.*, 2004). Sin embargo, lo más importante de esta hipótesis es que se incluye, por primera vez, la idea de que el hospedador influye de manera importante en el fenotipo de las bacterias, tal y como se ha demostrado en la transfección *in vitro* de *Wolbachia* inductora de feminización en el lepidóptero *Ostrinia scapularis* a huevos de *Ephestia cautella* que habían sido tratados previamente con tetraciclina. En estos nuevos huéspedes, *Wolbachia* no inducía a feminización, sino a androcidio prematuro (Fujii *et al.*, 2001). También permite explicar la existencia de dobles y triples infecciones en la naturaleza (Vavre *et al.*, 1999a).

Wolbachia inductora de incompatibilidad citoplasmática

La IC es una incompatibilidad reproductiva que se da entre el esperma y el huevo, de modo que resulta en la muerte del cigoto en especies diploides o en la producción de machos en especies haplodiploides. Este fenómeno es muy habitual en casi todos los órdenes de insectos (O'Neill *et al.*, 1992) y en los ácaros (Breeuwer, 1997; Van der Geest *et al.*, 2000), pero es muy raro en los crustáceos isópodos, de modo que solamente se ha reportado en *Porcellio dilatatus* y en *Cylisticus convexus* (Bouchon *et al.*, 1998). Hay dos tipos de IC, unidireccional y bidireccional.

En el primer caso, la IC se da entre el esperma de un macho infectado con *Wolbachia* y un huevo de una hembra no infectada, pero no se da si el esperma proviene de un macho sin endosimbiontes y el huevo de una hembra que alberga endosimbiontes (fig. 3). Por el contrario, la IC bidireccional sucede cuando machos y hembras de una misma especie con distintas cepas de *Wolbachia* no pueden reproducirse (Majerus, 1999).

Mecanismo de acción de *Wolbachia* IC

Basándose en los estudios realizados con *Nasonia vitripennis*, *Drosophila melanogaster* y *Culex pipiens*, la IC envuelve dos componentes del sistema: la “modificación bacteriana” del esperma y el “rescate bacteriano” en el huevo fertilizado. Así,

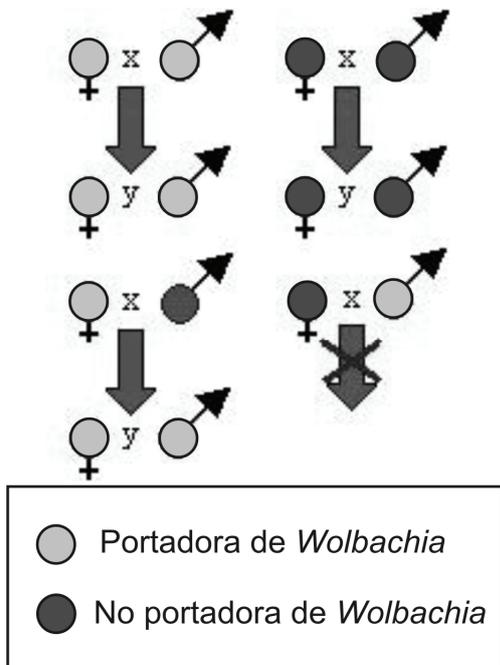


Fig. 3. Incompatibilidad citoplasmática (IC) unidireccional mediada por *Wolbachia*. Adaptado de Beard *et al.* (1998).

la presencia de una cepa de *Wolbachia* en los testículos modifica la espermatogénesis mediante proteínas asociadas a la cromatina que se libera mediante una secreción de tipo IV (Rancès *et al.*, 2008), donde estaría implicada una proteína de la membrana externa denominada proteína de superficie de *Wolbachia* (WSP; Braig *et al.*, 1998). Normalmente, las proteínas asociadas a la cromatina alteran las proteínas reguladoras del ciclo celular generando rupturas en el desarrollo del núcleo (NEB), con lo cual, impiden la fosforilación de la histona 3 (H3) (Tram y Sullivan, 2002). Esta misma cepa debe estar presente en el ovocito para eliminar (o rescatar) esa modificación. Si este “rescate” no sucede, entonces sucede la incompatibilidad ovocito-esperma debido a la incapacidad de fusionarse que tienen los espermatozoides portadores de *Wolbachia* IC con los gametos femeninos que carecen de la misma cepa de *Wolbachia* IC (McGraw *et al.*, 2001). Este modelo permite explicar la IC unidireccional (dado que el espermatozoides modificado de machos infectados no son rescatados por huevos sin infectar) y la IC bidireccional (dado que las distintas cepas usan distintos mecanismos de modificación-rescate) (Werren, 1997).

Además de este modelo general, la IC está correlacionada con defectos en las primeras mitosis del cigoto. Los cromosomas paternos forman una masa de cromatina difusa en la primera mitosis, con lo que falla la segregación y pierden la información genética en sucesivas divisiones (Reed y Werren, 1995). Esta pérdida de parte del genoma paterno genera una descendencia haploide que es masculina en organismos haplodiploides como la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis* (Breeuwer y Werren, 1990) o la muerte del embrión en especies diploides como en *Drosophila simulans* (Lassy y Karr, 1996). Recientemente, se ha visto mediante técnicas moleculares que, en el coleóptero *Callosobruchus chinensis*, la cepa *wBruAus* contiene en su genoma solamente las secuencias *dnaX* y *wsp*, mientras que el resto de su información genética pasa al cromosoma X de la misma manera

que un retrotransposón. Este evento, además de demostrar que *Wolbachia* induce a la alteración en el reparto de la información genética mediante el mal apareamiento cromosómico inducido por adición, se puede tratar como el primer caso de transferencia horizontal de genes (HGT) entre procariotas y eucariotas (fig. 4) (Kondo *et al.*, 2002). La inserción de material genético de procariotas en organismos eucariotes mediante HGT puede tener implicaciones evolutivas considerables, dado que es una fuente de información nueva (similar a las mutaciones). Ahora bien, en estos casos, es muy probable que hayan sido inutilizados por mutaciones neutras, puesto que no se suelen expresar en los hospedadores. Sin embargo, es viable también que en algún hospedador, estos genes se puedan expresar de modo que adquirirían esta información genética por “nuclearización”, que es un proceso análogo al mecanismo parasexual de transformación (fig. 5) (Blaxter, 2007).

No obstante, habría que tener en cuenta que hay otros factores implicados en la expresión de la IC además de los modelos bioquímicos y citogenéticos. Estos factores están interrelacionados entre sí y con otras variables aún no estudiadas, y son las cepas bacterianas que porta el hospedador, las infecciones múltiples, la densidad bacteriana en las células del hospedador, el hospedador como ambiente y las interacciones con otros endosimbiontes.

Las cepas bacterianas de *Wolbachia* que porta el hospedador juegan un importante rol, de modo que hay cepas inductoras de IC y no inductoras de IC (Charlat *et al.*, 2003). En los estudios de IC bidireccional realizados entre las tres cepas IC naturales de *D. simulans* (ubicadas en el supergrupo A), se ve que las poblaciones de esta especie están delimitadas por estas cepas, de modo que no se pueden reproducir individuos con distintas cepas. Con esto, se puede apreciar que los nuevos tipos de compatibilidad pueden evolucionar rápidamente de un grupo bacteriano (Clancy y Hoffmann, 1996; Werren *et al.*, 1995b). También se ha demostrado IC bidireccional entre avispas del género *Nasonia* portadoras de *Wolbachia* de los supergrupos A y B (Perrot-Minot *et al.*, 1996).

La existencia de infecciones múltiples influye en el tipo de compatibilidad. En algunas especies, hay individuos que portan más de una cepa de *Wolbachia*, de modo que hay casos en los que hay dobles y triples infecciones (como en las avispas parasitoide *Asobara tabida* y *Leptopilina heterotoma*) con cepas de los supergrupos A y B (Vavre *et al.*, 1999a). Estas dobles y triples infecciones permiten crear nuevos tipos de compatibilidades, de modo que, en infecciones naturales de *Aedes albopictus*, *Drosophila simulans* y *Nasonia vitripennis*, los machos doblemente infectados eran incompatibles con hembras infectadas por solamente una cepa, aunque esa cepa estuviera presente en el macho. Por este motivo, las dobles infecciones estables que se expresan en individuos de una población funcionan exactamente igual que si hubiera solamente una cepa bacteriana considerando el modelo general de 'modificación-rescate' (Turelli, 1994). Esto se ha comprobado estudiando el patrón biogeográfico del crisomélido *Chelymorpha alternans*, donde la cepa *wCalt1* genera IC débil y *wCalt2* genera IC fuerte. Cuando se presentan las dos cepas en una misma población, se genera una IC intermedia, aunque también intervienen otros factores ambientales (Keller *et al.*, 2004).

La densidad de la bacteria en la célula está relacionada con la expresión y la transmisión de *Wolbachia* inductora de

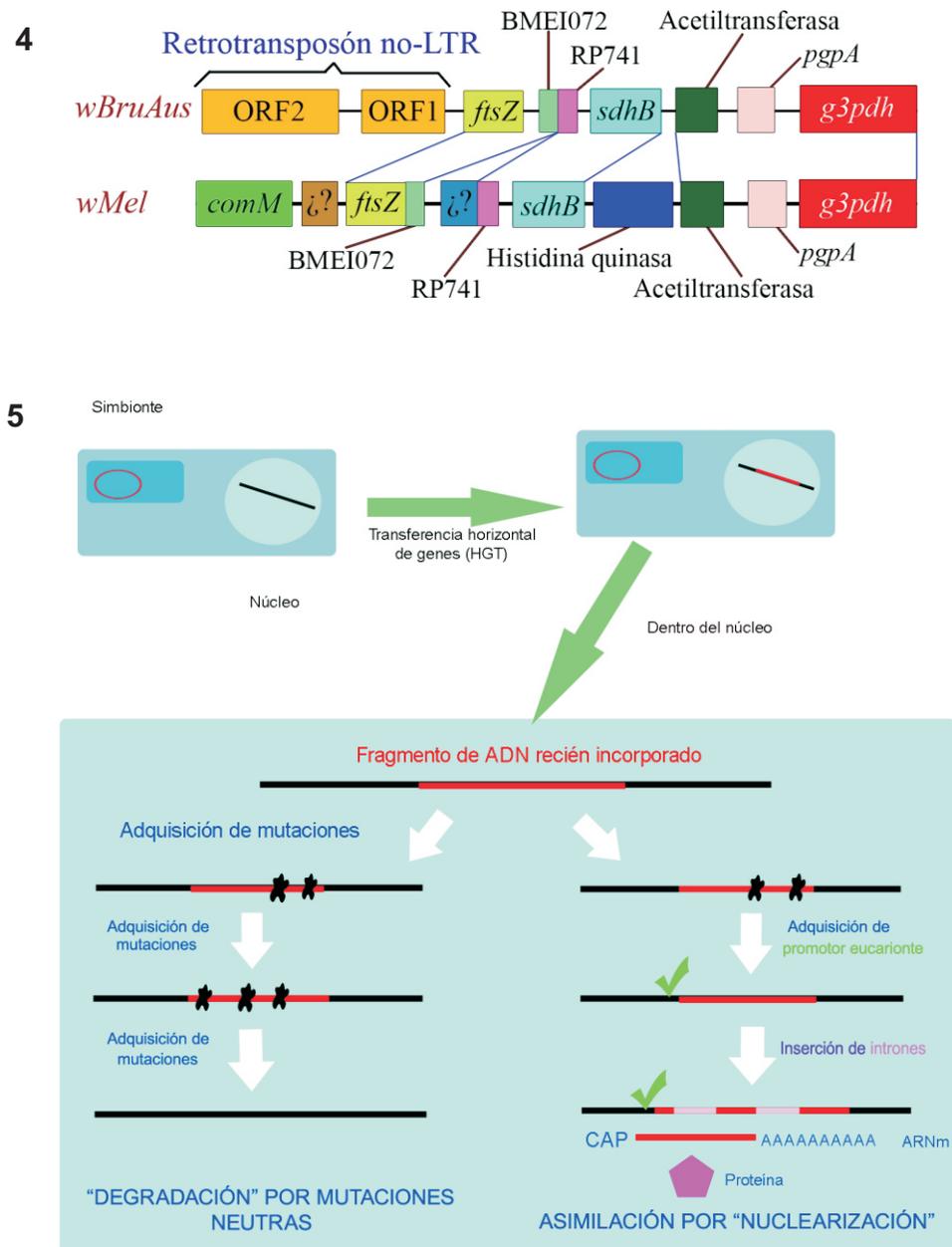


Fig. 4. Estructura de los fragmentos genómicos de la cepa *wBruAus* de *Callosobruchus chinensis* hallados en el cromosoma X comparados con una porción del genoma de la cepa *wMel* (*Wolbachia* presente en *Drosophila melanogaster*). Adaptado de Kondo *et al.* (2002). **Fig. 5.** Destino de los genes procariontes que se transfieren horizontalmente a sus hospedadores. Modificado y adaptado de Blaxter (2007).

IC. La expresión de la IC y las tasas de transmisión de *Wolbachia* son típicamente bajas a lo largo de sucesivas generaciones, a no ser que la densidad bacteriana incremente (Boyle *et al.*, 1993). Los tratamientos con antibióticos que reducen las densidades bacterianas pueden acabar dando compatibilidades, de tal modo que a altas densidades de *Wolbachia*, altas son las probabilidades de que haya IC (Majerus, 1999). También se ha visto que la densidad de la bacteria en las células del hospedador (y con ello la expresión de la IC) disminuye con la edad en algunas especies como el hemíptero *Sogatella furcifera* (Noda *et al.*, 2001). Un caso excepcional es el que se da en el braconídeo *Asobara tabida*, donde los tratamientos con fármacos inhiben la oogénesis en las hembras, de modo que, bajas

densidades bacterianas impiden que la hembra se pueda reproducir. Esto conlleva a pensar que la interacción *Wolbachia*–*A. tabida* es obligatoria para la supervivencia de la especie (Dedeine *et al.*, 2001). Sin embargo, la densidad de la bacteria por sí misma es insuficiente para explicar la IC bidireccional o la existencia de cepas no inductoras de IC (Giordano *et al.*, 1995).

En todas las interacciones microorganismo–animal, el hospedador induce a la reducción del genoma del simbiote, de modo que este genomio se especializa en función de las necesidades vitales del hospedador independientemente de que la interacción sea positiva o negativa para el huésped (Moya *et al.*, 2008; Rio *et al.*, 2003). En el caso de *Wolbachia*, la demostración de esta variable se ha hecho mediante

estudios *in vitro* donde se ha inyectado *Wolbachia* IC de *Drosophila melanogaster* en *D. simulans* y viceversa. En este caso, se ve que la cepa *wRi* de *D. simulans* apenas se manifiesta en *D. melanogaster*, mientras que la cepa de *D. melanogaster* hace que la IC en *D. simulans* sea muy patente (Boyle *et al.*, 1993). Esto se debe a que las modificaciones que induce *Wolbachia* en el esperma son distintas en función de la especie aunque sea la misma cepa (McGraw *et al.*, 2001). Otra prueba que corrobora el papel del hospedador como ambiente es que, en el Tenebriónido *Tribolium confusum*, *Wolbachia* induce IC, mientras que en *Tribolium madens* genera androcidio. El análisis de las secuencias de ADN de *Wolbachia* de los dos huéspedes indican que es la misma cepa (Fialho y Stevens, 2000).

Recientemente, se han descubierto más microorganismos que inducen a modificaciones en la reproducción del hospedador. Ejemplo de ello es el género bacteriano *Cardinium* en insectos (Zchori-Fein *et al.*, 2004) y en arañas (Duron *et al.*, 2008b), el género *Spiroplasma* en los ácaros (Enigl y Schausberger, 2007) y en las arañas (Goodacre *et al.*, 2006), y el “organismo similar a *Cytophaga*” (CLO: Weeks *et al.*, 2003). Aunque estas bacterias no son tan habituales, se sabe que se heredan en compañía de *Wolbachia* (Duron *et al.*, 2008a). Por ello, sería interesante investigar no solamente los efectos de estas bacterias en sus hospedadores, sino saber como interactúan las distintas bacterias entre sí.

Consecuencias poblacionales y evolutivas de la IC inducida por *Wolbachia*

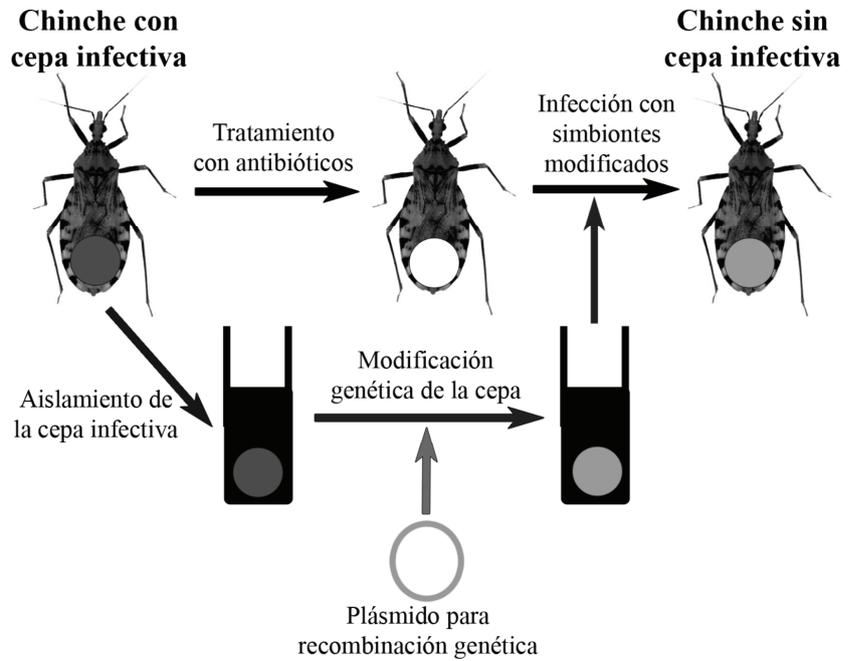
Se conoce muy poco sobre el efecto de alojar *Wolbachia* IC en la eficacia del hospedador. Mientras que en experimentos de laboratorio hay diferencias en la fecundidad entre hembras infectadas y no infectadas de *Drosophila simulans* (Hoffmann *et al.*, 1990), en los estudios realizados en el campo, las hembras infectadas de dicha especie eran tan fecundas como las no infectadas (Rasgon y Scott, 2003; Turelli y Hoffmann, 1995). Pese a esto, es posible que el efecto de alojar *Wolbachia* esté relacionado con la competencia espermática, ya que en el coleóptero *Tribolium confusum*, el esperma de machos infectados tenía menor capacidad competitiva que el de los machos no infectados (Wade y Chang, 1995). De este modo, la dinámica de dispersión de *Wolbachia* IC en una población se puede alterar con un aumento de la dispersión en las especies más promiscuas (Majerus, 1999). Ahora bien, hay modelos teóricos que defienden que la evolución de la interacción *Wolbachia*–hospedador podría reforzar la fecundidad de sus hospedadores si se disminuye la tasa de IC (Turelli, 1994; Turelli y Hoffmann, 1995), de modo que un organismo parásito “podría volverse” mutualista. Esto se ha podido comprobar en avispa de la especie *Trichogramma bourarachae*, donde el efecto de la IC es menor e induce, en su lugar, a un aumento de la fecundidad (Vavre *et al.*, 1999b). Esto mismo sucede con poblaciones naturales californianas de *Drosophila simulans* infectadas con la cepa *wRi* (Weeks *et al.*, 2007). Por último, se ha visto que, en algunos insectos como *Asobara tabida* y *Phlebotomus papatasi*, los tratamientos con antibióticos para eliminar la IC han mostrado que dan como resultado el bloqueo de la oogénesis de las hembras. Este hecho puede ser una muestra de transición entre una simbiosis facultativa a una simbiosis obligatoria (Dedeine *et al.*, 2001; Kassem *et al.*, 2003).

Además de los efectos de *Wolbachia* IC a nivel poblacional, esta bacteria puede promover una rápida especiación causando incompatibilidad reproductiva entre poblaciones, especialmente si la IC es bidireccional. De hecho, la IC parcial y completa se han encontrado entre distintos linajes de *Drosophila simulans*, *Culex pipiens* y dentro del género de avispa *Nasonia* (Werren, 1997).

El género *Nasonia* engloba tres especies: *N. vitripennis*, *N. giraulti*, y *N. longicornis*. La primera es cosmopolita y las otras dos ocupan de manera alopatrica América del Norte y son simpátricas respecto a *N. vitripennis*. Las tres especies muestran una IC reproductiva completa entre las distintas especies, debido fundamentalmente a la presencia de *Wolbachia*, ya que cada especie del género *Nasonia* alberga dobles infecciones con cepas distinguibles de los supergrupos A y B (Werren *et al.*, 1995a). Los híbridos no aparecen normalmente en los cruces entre las especies salvo que se hayan tratado con antibióticos frente a rickettsias (Breeuwer y Werren, 1990). La IC bidireccional interespecífica no se debe a las interacciones con el genotipo del hospedador, sino a las diferencias entre cepas bacterianas (Breeuwer y Werren, 1993), al igual que los estudios de hibridación entre *N. vitripennis* y *N. giraulti* revelan la existencia de genes recesivos de inviabilidad de híbridos, lo que indica una divergencia significativa entre estas especies (Breeuwer y Werren, 1995). En estudios de cruces entre *N. giraulti* y *N. longicornis*, se ha visto que la IC bidireccional inducida por *Wolbachia* precede a otros mecanismos de aislamiento reproductivo (MAR) como la esterilidad o inviabilidad de los híbridos (Bordenstein *et al.*, 2001). Por ello, los estudios realizados en el género *Nasonia* sugieren que *Wolbachia* está implicada en la especiación rápida. Ahora bien, ¿la IC bidireccional precede a la especiación (de tal modo que lo primero potencia lo segundo) en todos los casos o si la divergencia entre especies fue lo primero y luego sucedió la IC bidireccional? La respuesta a esta pregunta depende del género a analizar. Por ejemplo, se han encontrado numerosos tipos de IC bidireccional en *Drosophila simulans*, *D. sechellia* y *Allonemobius* sp., pero la incompatibilidad es débil e insignificante como para prevenir el flujo génico nuclear entre diferentes tipos de compatibilidad (Charlat *et al.*, 2002; Clancy y Hoffmann, 1996; Marshall, 2004). Ahora bien, entre poblaciones geográficas de la avispa parasitoide *Trichopria drosophilae* hay aislamiento reproductivo bidireccional y está asociada a distintas cepas de *Wolbachia* (Werren, 1997). Por último, *Wolbachia* está implicada en la especiación rápida del género *Acromyrmex*, dado que el parásito social *A. insinuator* ha evolucionado de *A. echinator* (su hospedador) gracias a la IC unidireccional que le ha conducido a la especiación rápida (Van Borm *et al.*, 2001).

Sin embargo, la IC inducida por *Wolbachia* no ha de ser un mecanismo aislado entre especies para que la bacteria pueda ser importante como mecanismo de especiación. Por ejemplo, la IC unidireccional combinada con otros MAR como la esterilidad de híbridos o la muerte prematura del cigoto puede resultar en un aislamiento reproductivo bidireccional. Esto sucede entre las especies norteamericanas del género *Gryllus* (Giordano *et al.*, 1997) y en las avispas de la familia Agaonidae (Shoemaker *et al.*, 2002). Por todo esto, las bacterias *Wolbachia* inductoras de IC bidireccional es un mecanismo posible para la rápida especiación en artrópodos.

Fig. 6. Esquema del experimento de modificación genética realizado en ejemplares de *Rhodnius prolixus* para disminuir su capacidad infectiva. Basado en Beard *et al.* (1998).



Implicaciones y usos de *Wolbachia* IC en el control biológico

Hay un interés considerable en aplicar los conocimientos que se tienen sobre *Wolbachia* IC para su aplicación en el control biológico de plagas y vectores de enfermedades (Beard *et al.*, 1998; Rasgon y Scott, 2003; Zabalou *et al.*, 2004).

Lo que se busca es establecer cepas IC que reduzcan el potencial reproductivo de estos insectos. Para esto, las cepas se han de fijar en la población, y desde un punto de vista teórico, las cepas IC con tasas de transmisión muy baja son las que tienen más probabilidad de fijarse en la población, y por ello, de ser las más útiles para este cometido (Turelli, 1994). A esto se le suma el potencial de “acumular” tipos de IC adicionales a lo largo de una población, generando dobles y triples infecciones en poblaciones en las que hay endosimbiontes (Beard *et al.*, 1998). Ahora bien, se conoce muy poco de las interacciones entre las distintas cepas bacterianas y con otros endosimbiontes, por lo que puede ser menos eficiente a la larga estas dobles infecciones con *Wolbachia* IC (Werren, 1997). Este hecho teórico se ha demostrado en el coleóptero *Chelymorpha alternans*, donde la cepa *wCalt2* genera IC fuerte y solamente se mantiene en poblaciones con doble infección con *wCalt1*, donde la IC en esta especie es moderada (Keller *et al.*, 2004). También se ha demostrado infectando con bacterias de las cepas *wCer1* y *wCer2* de *Rhagoletis cerasi* en *Drosophila simulans* que la IC se puede manifestar dependiendo de la especie, de tal modo que en el hospedador original la IC es siempre más fuerte que en el nuevo hospedador (Riegler *et al.*, 2004).

Otra aplicación más interesante de *Wolbachia* está relacionada con la ingeniería genética, de modo que se puede intentar convertirlo en un vector de genes modificados que infectan a los artrópodos para combatir agentes causantes de enfermedades, tal y como se hace con *Agrobacterium tumefaciens* para las modificaciones genéticas de las plantas (Beard *et al.*, 1998; Rasgon y Scott, 2003). Esta transformación de simbioses mutualistas en vectores de genes alterados por ingeniería genética se ha hecho con otras bacterias como *Wigglesworthia sp.* (simbionte de la mosca tse-tsé (*Glossina mortisans*)) y el simbionte de la chinche besucona (*Rhodnius prolixus*) usando en ambos casos plásmidos artificiales. Si se consigue la expresión de genes antivirales o antiparasíticos en

el hospedador, se busca reemplazar las poblaciones naturales por genotipos no virulentos (fig. 6) (Beard *et al.*, 1998; Curtis y Adak, 1974). La habilidad de las cepas IC para permanecer a lo largo de una población, junto a otros factores hereditarios por vía materna (como estos endosimbiontes modificados genéticamente) pueden ser un mecanismo eficaz para el reemplazamiento genético. A todo ello, se suma la capacidad de recombinación genética que tiene *Wolbachia*, que incrementa las probabilidades de que se puedan introducir genes foráneos en estos endosimbiontes (Werren y Bartos, 2001). Ahora bien, hay que entender la dinámica de poblaciones de este proceso antes de realizar todos estos proyectos (Werren, 1997).

En la práctica, se ha conseguido en el laboratorio protocolos de extracción y purificación de bacterias, mantenimiento de cepas en cultivos celulares (O'Neill *et al.*, 1997), verificar que son capaces de sobrevivir en el medio ambiente (Rasgon *et al.*, 2006) y transfectar cepas de *Wolbachia* IC de *Drosophila simulans* a *Ceratitis capitata* y de *Rhagoletis cerasi* a *Drosophila simulans* con éxito (Zabalou *et al.*, 2004; Riegler *et al.*, 2004).

Inducción de la partenogénesis en himenópteros y colémbolos

La partenogénesis es un mecanismo especial de reproducción en el que los nuevos individuos se originan a partir de huevos no fecundados. Este fenómeno es muy habitual en los organismos haplodiploides y se clasifica según el sexo de la descendencia en arrenotoca (si los huevos no fecundados dan lugar únicamente a machos), telitoca (si solamente se produce descendencia femenina) y deuterotoca (donde los machos y las hembras pueden surgir por partenogénesis). En el caso de partenogénesis inducida por las bacterias del género *Wolbachia*, lo que se ha visto es telitoquia, tal y como se ha visto en hembras tratadas con antibióticos como la tetraciclina (Stout-hamer *et al.*, 1990).

Wolbachia inductora de partenogénesis (IP) está presente en un amplio rango de género de avispas parasitoides (como los géneros *Trichogramma*, *Aphytis*, *Encarsia*, *Leptopilina* y *Muscidifurax*), en el coleóptero *Leucomigus tessellatus*

(Werren *et al.*, 1995b) y en el tisanóptero *Franklinothrips vespiformis* (Arakaki *et al.*, 2001). También se ha descubierto este fenotipo bacteriano en los colémbolos (Czarnetzki y Tebbe, 2004) y en el género de ácaros *Bryobia* (Van der Geest *et al.*, 2000; Weeks *et al.*, 2001).

Los endosimbiontes IP pertenecen a los supergrupos A, B y E, y los estudios filogenéticos sugieren que la IP evolucionó muchas veces de manera independiente en las distintas cepas bacterianas (Werren *et al.*, 1995b). Esto, *a priori*, podría indicar que la IP es un simple mecanismo bioquímico, pero hay estudios preliminares que muestran eventos de recombinación entre las distintas cepas de *Wolbachia* IP. No obstante, siempre se ha de tener en cuenta que la misma cepa de *Wolbachia* puede causar efectos distintos en distintos hospedadores (Fujii *et al.*, 2001), por lo que es plausible pensar que en los organismos haplodiploides *Wolbachia* sea IP y en diploides sea IC o andrécida (Majerus, 1999).

Mecanismos de acción de *Wolbachia* IP

Los mecanismos citogenéticos de *Wolbachia* IP han sido estudiados principalmente en las especies del género *Trichogramma*. En todos los casos sucede lo que se conoce como duplicación gamética. Este proceso consiste en que en la primera división meiótica, los cromosomas se condensan en la profase I y fallan al segregarse en la metafase I, lo que da lugar a un núcleo diploide. Como resultado de este fenómeno, el individuo tiene todos los *loci* homocigóticos. Ahora bien, si hay fecundación de los óvulos, la descendencia son hembras diploides. De este modo, la fertilización en estas especies inhibe la duplicación gamética, aunque la descendencia femenina albergue la bacteria y puedan dar lugar a individuos partenogenéticos por telitoquía (Stouthamer y Kazmer, 1994). Sin embargo, aunque el mecanismo molecular se desconoce, se sospecha de la disrupción del centrosoma o de alteraciones en la formación del huso mitótico y unión de éste a los cromosomas. Conforme a este último hecho, se ha visto que las *Wolbachia* IC están asociadas al huso mitótico y que pueden servir como foco para la formación del cuerpo astral (Callaini *et al.*, 1994; Tram y Sullivan, 2002).

Desde un punto de vista teórico, la duplicación gamética implica una homocigosidad completa, por lo que sería muy frecuente la presencia de mutantes deletéreos recesivos en contraste con la reproducción sexual. Sin embargo, las especies haplodiploides presentan bajas frecuencias de mutaciones deletéreas recesivas, permitiendo prescindir del sexo masculino (haploide) (Werren, 1993). Por otro lado, la duplicación gamética no trabajaría en especies haplodiploides si tuvieran determinación sexual con un solo *locus* porque resultaría en la producción de machos diploides en lugar de hembras diploides. Este segundo factor puede promover la existencia de bacterias IP en especies haplodiploides, de modo que los huevos haploides pueden empezar la embriogénesis sin fecundación sin recurrir a mecanismos especiales que induzcan la activación de los huevos (Werren, 1997).

Ahora bien, la temperatura es un factor que influye en la determinación sexual de los himenópteros partenogenéticos que poseen endosimbiontes. A temperaturas inferiores a 25° C toda la progenie es femenina, mientras que, por encima de 30° C, solo se obtiene descendencia masculina. A temperaturas intermedias, se obtienen tanto machos como hembras y ginandromorfos. Se ha sugerido que las diferencias en la proporción de tejidos masculinos y femeninos en los ginandro-

morfos es el resultado de un retraso en la duplicación gamética inducida por *Wolbachia* (Stouthamer, 1997). Esta hipótesis concuerda con la relación directa entre temperatura y cantidad de tejido masculino, pero estos individuos suelen ser predominantemente femeninos y solo poseen un pequeño grupo de células masculinas (Majerus, 1999).

Consecuencias poblacionales y evolutivas de las cepas IP

En avispa *Encarsia formosa*, las hembras partenogenéticas producen más descendencia infectada que una hembra con reproducción sexual (Zchori-Fein *et al.*, 1992). Este hecho se debe a que las cepas de *Wolbachia* IP incrementan su frecuencia, de tal modo que si la transmisión es perfecta, la infección de bacterias IP se fijan en la población dando lugar a una especie partenogenética totalmente. Sin embargo, en *Trichogramma deion* y en *Leptopilina clavipes* hay distintas frecuencias de infección a lo largo de las poblaciones (Stouthamer y Luck, 1993; Pannebakker *et al.*, 2004). Este evento se cumple cuando la transmisión de las bacterias es imperfecta o la eficacia biológica de las hembras infectadas por bacterias IP es dependiente de frecuencia (Werren, 1987).

Desde una perspectiva teórica, si una especie llega a estar fijada para una cepa de *Wolbachia* IP, se puede empezar a aislarse genéticamente de la población con reproducción sexual, de modo que se empiezan a acumular mutaciones en los genes reguladores de la sexualidad y surge, como resultado, una degeneración de la sexualidad y una partenogénesis irreversible (Werren, 1997). Este proceso es el que se empieza a ver en el caso de *E. formosa*, donde los machos no son capaces de reproducirse (Zchori-Fein *et al.*, 1992). Ahora bien, en *T. deion* y *L. clavipes*, hay todavía intercambio genético entre individuos sexuales y partenogenéticos, lo que previene la degeneración de las funciones sexuales (Pannebakker *et al.*, 2004; Stouthamer y Kazmer, 1994). En resumen, la inducción de la partenogénesis es capaz de contribuir a la especiación en los himenópteros. Algo muy similar se ha detectado en el colémbolo *Folsomia candida*, donde se ha visto una relación directa entre la gran divergencia genética de las cepas de *Wolbachia* IP, la densidad bacteriana y la ubicación geográfica de las poblaciones de hospedador. Este hecho permitiría explicar las diferencias que se han encontrado entre poblaciones enteramente partenogenéticas y poblaciones enteramente sexuales como un mecanismo de especiación rápida similar al generado por las cepas de *Wolbachia* IC (Fрати *et al.*, 2004).

Aplicación de las cepas de *Wolbachia* IP en el control biológico

Desde mediados de la década de los noventa, se ha propuesto emplear las cepas IP de *Wolbachia* en el control biológico combinándolo con el uso de avispa parasitoides de los programas de control biológico (Gonçalves *et al.*, 2006; Stouthamer, 1993). Esta combinación genera tres ventajas:

1. Los individuos partenogenéticos que posean estas bacterias aumentarán rápido en la población y serán más efectivos que aquellos que no posean bacterias, dado que *Wolbachia* actuaría como un "catalizador" de la telitoquía.
2. Estos individuos partenogenéticos son mejores colonizadores y se establecerán más fácilmente a bajas densidades poblacionales ya que el problema de encontrar pareja está solucionado.

3. Los individuos con partenogénesis son más baratos de producir masivamente porque la producción no requiere machos.

Ahora bien, estas ventajas implican una disminución del coste de fecundidad a largo plazo, con lo cual, se reduciría el número efectivo de hembras producidas (Stouthamer y Luck, 1993). Por esta razón, las poblaciones deben ser analizadas para la búsqueda de cepas bacterianas que impliquen un menor coste de fecundidad en hospedadores (Girin y Bouletreau, 1995).

Wolbachia y la feminización de los crustáceos isópodos

Hay bacterias del género *Wolbachia* del clado B que causan feminización en los crustáceos isópodos (Bouchon *et al.*, 1998), en la polilla asiática *Ostrinia furnacalis* (Kageyama *et al.*, 2002) y en el hemíptero *Zyginidia pullata* (Negri *et al.*, 2006). La feminización es la transformación de machos genéticos en hembras, y no solo es causada por las rickettsias *Wolbachia*. De hecho, en los crustáceos anfípodos, se debe a la presencia de protozoos microsporidios (Terry *et al.*, 1997) y al paramixidio *Paramarteilia orchestiae* (Majerus, 1999). En todos los casos, el mecanismo de feminización se basa en genes específicos de cada hospedador particular (Dunn y Rigaud, 1998).

Mecanismo de acción de las cepas feminizantes

En el caso del crustáceo isópodo *Armadillidium vulgare*, el mecanismo genético de determinación sexual son hembras heterogaméticas (ZZ para machos y ZW para hembras). Algunas hembras producen una prole cuyo *sex ratio* está fuertemente sesgado hacia las hembras (el 10% de los individuos son masculinos), y este rasgo proviene por vía materna (Majerus, 1999). Esto se debe a que la presencia de estas bacterias feminizantes se da en las hembras (tanto genética como fisiológicamente) y no en los machos, y siempre aparecen en prevalencias entre el 20,3 – 46,3 % (Bouchon *et al.*, 1998). Estos endosimbiontes inducen la pérdida del cromosoma determinante del sexo masculino (W), desestabilizando el mecanismo de determinación sexual. También se debe a la expresión de genes supresores de las hormonas masculinas de la glándula androgénica y el bloqueo de receptores para las mencionadas hormonas, favoreciendo la presencia de hembras en algunas poblaciones (Rigaud y Juchault, 1992). El motivo por el que tienen un doble mecanismo para alterar la determinación sexual en los crustáceos es una incógnita que debería ser estudiada más a fondo. Desde el punto de vista teórico, se puede explicar como una carrera armamentística entre los elementos citoplasmáticos y el genoma nuclear, ya que los genes nucleares se heredan de los dos progenitores, pero los factores citoplasmáticos se heredan por vía materna. En principio, la presión selectiva conduce a un *sex ratio* sesgado a favor de los machos, que aumentan su eficacia produciendo el sexo más raro (Fisher, 1930). Ahora bien, la selección puede favorecer la existencia de genes que contrarresten al factor feminizante. De hecho, en experimentos realizados con *A. vulgare*, se han visto genes autosómicos que permiten el aumento de la proporción de machos en la progenie (Rigaud y Juchault, 1992). Además, se ha descubierto un gen de

resistencia (gen *M*) que contrarresta el factor *f* causante de la feminización no inducida por simbiontes. Se sospecha que este factor *f* pueda tener información genética similar al que porta la bacteria *Wolbachia*. Sin embargo, aunque el gen *M* genera un producto que inhibe la actividad del factor *f*, no es capaz de bloquear el efecto de los endosimbiontes *Wolbachia* feminizantes (Rigaud y Juchault, 1993). Esto se debe a que el mecanismo de bloqueo de los receptores de la hormona androgénica es una respuesta a la acción del gen *M*, el cual, induce a que *Wolbachia* no bloquee la expresión de la glándula androgénica (Rigaud, 1997).

El androcidio en artrópodos y Wolbachia

El androcidio (*male-killing*) es el mecanismo por el cual el simbionte mata solamente a los hospedadores de sexo masculino. Debido a esta definición tan sencilla, este proceso es el más diverso desde el punto de vista taxonómico tanto de los hospedadores como de los simbiontes. Con respecto al caso de los hospedadores, se han encontrado casos de androcidio en algunos órdenes de insectos como los lepidópteros y los coleópteros (Hurst *et al.*, 1999a; Fialho y Stevens, 2000; Mitsunashi *et al.*, 2004), y en el pseudoescorpión *Pselaphocheernes scorpioides* (Zeh *et al.*, 2005). Ahora bien, los endosimbiontes capaces de causar este proceso pueden ser tanto bacterias como microsporidios.

Este proceso del androcidio se puede clasificar en función del momento del desarrollo en tardíos y precoces. En el primer caso, los endosimbiontes matan al macho muriendo ellos en el proceso, aunque al hacerlo aumentan la eficacia biológica de las hembras (compensación), con lo cual, se evita la endogamia. El androcidio tardío lo realizan los microsporidios en los culícidos. En el caso del androcidio precoz, los endosimbiontes matan al macho, pero el aumento de la eficacia biológica de las hembras se manifiesta en la redistribución de los recursos, ya que los recursos de la familia quedan disponibles para las hembras, que invierten mucha energía en la reproducción en contraste con los machos (Hurst, 1991). Este es el caso más habitual en la naturaleza y es el causado por bacterias, incluyendo *Spiroplasma* (Mollicutes), *Rickettsia*, *Wolbachia* (Rickettsiales), organismo afín a *Blattabacterium* (Flavobacteria) y *Arsenophonus nasoniae* (Enterobacteriaceae). Estas bacterias no poseen una transmisión horizontal significativa, a diferencia de lo que sucede en las otras alteraciones reproductivas de los artrópodos. Además, la distribución del androcidio no es aleatoria en los artrópodos. Se da en especies donde hay canibalismo entre las larvas, de tal modo que el androcidio induce que las larvas masculinas mueran pronto y sean consumidas por las larvas supervivientes que son de sexo femenino, disminuyendo así el canibalismo (Majerus, 1999) o en especies donde el rol sexual se ha invertido (Jiggins *et al.*, 2000).

Mecanismo de acción del androcidio inducido por bacterias

Se conoce muy poco sobre el modo en el que aparece el androcidio en el hospedador. De hecho, solo se ha estudiado en la interacción *Spiroplasma poulsonii* y *Drosophila willis-toni*. En este caso la muerte puede suceder en dos momentos: antes de la gastrulación asociado a alteraciones en el proceso de mitosis y después de la gastrulación tras la rup-

tura de las estructuras internas y la picnosis de los núcleos de los blastómeros. En el género *Drosophila*, la determinación sexual es determinado por el cociente de cromosomas X y autosomas, de modo que las hembras son 2X: 2n y los machos son X: 2n. Esto conduce a la expresión del péptido Sxl en las hembras y a su ausencia de expresión en los machos. *S. poulsonii* no reconoce la proporción de los cromosomas X y autosomas del animal, sino la presencia o ausencia de Sxl, de modo que si no hay dicho péptido, el animal muere (Hurst y Jiggins, 2000).

Sin embargo, no se puede decir que este mecanismo sea exactamente igual en otros andrócidas, puesto que depende del hospedador. De hecho, el androcidio se ha visto también en organismos donde el sexo heterogamético son los machos y los machos son homogaméticos (Hurst y Jiggins, 2000). Además, hay otros factores que influyen en la expresión del androcidio, como es la temperatura y la densidad bacteriana (Hurst *et al.*, 2000). En resumen, el androcidio tiene más de un mecanismo básico en función del hospedador, por lo que nuevamente sugerimos que se debería investigar más en este campo.

El androcidio inducido por bacterias desde el punto de vista evolutivo

La primera vez que se descubrió el androcidio fue en individuos de la especie *Adalia bipunctata* (Coleoptera, Coccinellidae), donde el sesgo sexual a favor de las hembras está correlacionado con tasas de eclosión de huevos superior al 50%. Este sesgo se puede corregir con antibióticos, lo que indica que se debe a la presencia de simbioses (Hurst *et al.*, 1992). Mediante el análisis del gen ADN_r 16S, se ha visto que hay cuatro andrócidas posibles: una cepa del género *Rickettsia* (Werren *et al.*, 1994), una cepa del género *Spiroplasma* (Hurst *et al.*, 1999b) y dos cepas del género *Wolbachia* (Hurst *et al.*, 1999a). Desde una perspectiva biogeográfica, el androcidio es muy común en esta especie, pero normalmente los androcidios son específicos de cada población, siendo frecuente la presencia de más de una especie andrócida. Sin embargo, desde el punto de vista teórico, la presencia de más de una especie andrócida en un hospedador no es viable incluso en presencia de supresores del androcidio.

En *Adalia bipunctata*, se ha visto que hay una correlación inversa entre el canibalismo de estas larvas y la densidad de áfidos, i. e., a menores densidades de pulgones, el canibalismo es más intenso. Si a esto se le asocia la relación entre el canibalismo y la presencia de andrócidas mencionada anteriormente, se puede llegar a la conclusión de que cuando hay grandes infecciones de endosimbiontes andrócidas, las probabilidades de que se produzcan canibalismo son muy bajas y eso sucede cuando hay altas densidades de áfidos. De este modo, el androcidio es una ventaja secundaria, ya que proporciona alimento cuando no hay grandes densidades de áfidos (Hurst *et al.*, 1992). Este hecho es similar a lo que sucede en las cepas andrócidas de *Wolbachia* detectadas en las hormigas del género *Acromyrmex*, donde juegan un papel importante a la hora de determinar la clase social, favoreciendo levemente el desarrollo de las hembras en detrimento de los machos (Van Borm *et al.*, 2001).

Tras descubrirse el androcidio en los coccinélidos, se empezó a estudiar en *Acraea encedon* (Lepidoptera, Nymphalidae) y se vio también que era inducido por una cepa de

Wolbachia andrócida (Hurst *et al.*, 1999a). Este hecho estaba apoyado porque el androcidio desaparecía aplicando antibióticos a las hembras infectadas (Jiggins *et al.*, 1998). Este hallazgo fue significativo porque demostró que el androcidio no está restringido solamente a los coccinélidos por motivos ecológicos. Además, era el primer caso que se daba en un grupo de animales donde el sexo heterogamético es la hembra (poseen el sistema ZW/ZZ), mientras que en *A. bipunctata* se da el sistema cromosómico XX/XY de determinación sexual. Más tarde, se empezó a estudiar en otras especies del género *Acraea* y se ha visto que la presencia de *Wolbachia* es muy común, pero no en todos los casos sucede el androcidio, dado que hay diferencias entre las cepas de *Wolbachia* que infectan a las especies de este género.

Las bacterias que inducen el androcidio producen sesgos en el *sex ratio* a favor de las hembras, de tal modo que es determinante conocer cuál es el sexo que compite por tener pareja. Normalmente, los machos son capaces de reproducirse más rápidamente que las hembras, y por este motivo, compiten entre sí por el acceso a ellas (selección intrasexual). Ahora bien, en las poblaciones donde haya un endosimbionte andrócida, se reduce la proporción de machos en la población, y con ello, la intensidad de la competencia de éstos por las hembras y las oportunidades de elección de éstas por las hembras. Así, si la proporción sexual se distorsiona drásticamente hasta tal grado que los machos son limitantes, los papeles respectivos de cada sexo se pueden invertir (Majerus, 1999). Esto se ha demostrado para el género *Acraea*, donde se ha visto una inversión de los papeles sexuales, de modo que las hembras vírgenes se exhiben en leks para competir entre ellas por los machos (Jiggins *et al.*, 2000). Los machos eligen a las hembras en función de la “no infección”, i. e., los machos tienden a elegir a hembras vírgenes no infectadas antes que a hembras infectadas por *Wolbachia*, con lo que la bacteria ha modificado además el sistema de apareamiento a nivel etológico (Jiggins *et al.*, 2000).

Este hecho favorecería el incesto, dado que para los machos sus hermanas son el grupo de hembras que tienen más probabilidades de no estar infectadas por andrócidas. Esto conduciría a un fenómeno de endogamia que conduciría a un cuello de botella y acabaría, al final, en la extinción de esa especie (Hurst y Jiggins, 2000). Sin embargo, desde un punto de vista teórico, los sesgos del *sex ratio* inducen a la selección a favor del sexo más raro (Fisher, 1930). Por ello, la selección a favor de los machos debe ser más intensa, y solamente se puede explicar mediante la existencia de mecanismos supresores del androcidio, bien matando al endosimbionte, reduciendo su transmisión vertical o impidiendo al andrócida la muerte de los machos bloqueando el reconocimiento del sexo o el propio proceso de muerte (Majerus, 1999). Este mecanismo permite hablar de una carrera de armamentos entre el hospedador y el endosimbionte, donde estaría implicada en el fenotipo bacteriano la proteína WSP (Schulenburg *et al.*, 2000). Esto se ha corroborado en el ninfárido *Hipolimnas bolimna*, en cuyas poblaciones ha habido un aumento notable de machos en 10 generaciones. De hecho, ha pasado de haber 1% de machos en la población a un 40%. Con esto, se han cumplido las perspectivas teóricas mencionadas anteriormente (Hornett *et al.*, 2006; Charlat *et al.*, 2007).

Implicaciones del androcidio en el biocontrol

Recientemente, se ha propuesto el uso de cepas andrécidas de distintas bacterias para el control biológico con el fin de reducir el tamaño poblacional del hospedador. Ahora bien, la utilidad de este tipo de cepas es discutible, dado que el tamaño de la población y su persistencia depende del número de hembras, además de que su efecto es dependiente de la

densidad y del hospedador. Por este motivo, una utilidad más realista sería usar estas cepas junto a la suelta de machos estériles. De este modo, se conseguiría disminuir su fertilidad y desplazar a los machos sin la infección a corto plazo. Sin embargo, habría que estudiar su impacto a largo plazo y la prevalencia óptima para que se puedan usar estas cepas de manera fiable (Hurst y Jiggins, 2000).

Bibliografía

- ANDERSON, C. L. & T. L. KARR 2001. *Wolbachia*: Evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. *BMC Evol. Biol.*, **1**: 10 URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/1/10>.
- ARAKAKI, N., T. MIYOSHI & H. NODA 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Frankliniopsis vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **268**: 1011-1016.
- BALDO, L., N. LO & J. H. WERREN 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *J. Bacteriol.*, **187**(15): 5406-5418.
- BALDO, L., S. BORDENSTEIN, J. J. WERNEGREEN & J. H. WERREN 2006a. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**(2): 437-449.
- BALDO, L., J. C. D. HOTOPP, K. A. JOLLEY, S. R. BORDENSTEIN, S. A. BIBER, R. R. CHOUDHURY, M. C. MAIDEN, H. TETTELIN & J. H. WERREN 2006b. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(11): 7098-7110.
- BALDO, L., L. PRENDINI, A. CORTHALS & J. H. WERREN 2007. *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. *Curr. Microbiol.*, **55**: 367-373.
- BANDI, C., T. J. C. ANDERSON, C. GENCHI & M. L. BLAXTER 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **265**: 2407-2413.
- BEARD, C. B., R. V. DURVASULA & F. F. RICHARDS 1998. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerging Infect. Dis.*, **4**(4): 581-591.
- BLAXTER, M. L. 2007. Symbiont genes in host genomes: fragments with a future? *Cell Host & Microbe*, 2007 doi: 10.1016/j.chom.2007.09.008.
- BORDENSTEIN, S. R., F. P. O'HARA & J. H. WERREN 2001. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature*, **409**: 707-710.
- BOUCHON, D., T. RIGAUD & P. JUHAULT 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **265**: 1081-1090.
- BOYLE, L., S. L. O'NEILL, H. M. ROBERTSON & T. L. KARR 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, **260**: 1796-1799.
- BRAIG, H. R., W. ZHOU, S. L. DOBSON & S. L. O'NEILL 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.*, **180**(9): 2372-2378.
- BREEUWER, J. A. J. 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity*, **79**: 41-47.
- BREEUWER, J. A. J. & G. JACOBS 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol.*, **20**: 421-434.
- BREEUWER, J. A. J. & J. H. WERREN 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, **346**: 558-560.
- BREEUWER, J. A. J. & J. H. WERREN 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, **135**: 565-574.
- BREEUWER, J. A. J. & J. H. WERREN 1995. Hybrid breakdown between two haplodiploid species: the role of nuclear and cytoplasmic genes. *Evolution*, **49**: 705-717.
- CALLAINI, G., M. G. RIPARBELLI & R. DALLAI 1994. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *J. Cell Sci.*, **107**: 673-682.
- CASIRAGHI, M., O. BAIN, R. GUERRERO, C. MARTIN, V. POCACQUA, S. L. GARDNER, A. FRANCESCHI & C. BANDI 2004. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *Int. J. Parasitol.*, **34**(2): 191-203.
- CASIRAGHI, M., S. R. BORDENSTEIN, L. BALDO, N. LO, T. BENITATI, J. J. WERNEGREEN, J. H. WERREN & C. BANDI 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, **151**: 4015-4022.
- CHARLAT, S., A. NIRGIANAKI, K. BOURTZIS & H. MERCOT 2002. Evolution of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and *D. Sechellia*. *Evolution*, **56**(9): 1735-1742.
- CHARLAT, S., L. LE CHAT & H. MERCOT 2003. Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in two continental African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity*, **90**(1): 49-55.
- CHARLAT, S., E. A. HORNETT, J. H. FULLARD, N. DAVIES, G. K. RODERICK, N. WEDELL & G. D. D. HURST, 2007. Extraordinary flux in sex ratio. *Science*, **317**: 214.
- CLANCY, D. J. & A. A. HOFFMANN 1996. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. *Trends Ecol. Syst.*, **11**: 145-146.
- CORDAUX, R., A. MICHEL-SALZAT & D. BOUCHON 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J. Evol. Biol.*, **14**: 237-243.
- CORDAUX, R., S. PICHON, A. LING, PÉREZ, C. DELAUNAY, F. VAVRE, D. BOUCHON & P. GREVE 2008. Intense transpositional activity of insertion P₁ sequences in an ancient obligate endosymbiont. *Mol. Biol. Evol.*, **25**(9): 1889-1896.
- CURTIS, C. F. & T. ADAK 1974. Population replacement in *Culex fatigans* by means of cytoplasmic incompatibility. *Bull. World Health Org.*, **51**: 249-255.
- CZARNETZKI, A. B. & C. C. TEBBE 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environ. Microbiol.*, **6**(1): 35-44.
- DEDEINE, F., F. VAVRE, F. FLEURY, B. LOPPIN, M. E. HOCHBERG & M. BOULÉTREAU 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(11): 6247-6252.
- DELGADO, A. M. & J. M. COOK 2009. Effects of a sex-ratio distorting endosymbiont on mtDNA variation in a global insect pest. *BMC Evol. Biol.*, **9**: e49 doi: 10.1186/1471-2148-9-49.
- DOBSON, S. L., K. BOURTZIS, H. R. BRAIG, B. F. JONES, W. ZHOU, F. ROUSSET & S. L. O'NEILL 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**: 153-160.

- DUNN, A. M. & T. RIGAUD 1998. Horizontal transfer of parasitic sex ratio distorters between crustaceans hosts. *Parasitology*, **117**: 15-19.
- DURON, O., D. BOUCHON, S. BOUTIN, L. BELLAMY, L. ZHOU, J. ENGELSTADTER & G. D. D. HURST 2008a. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.*, **6**: 27 doi: 10.1186/1741-7007-6-27.
- DURON, O., G. D. D. HURST, E. A. HORNETT, J. A. JOSLING & J. ENGELSTADTER 2008b. High incidence of the maternally inherited bacterium *Cardinium* in spiders. *Mol. Ecol.*, **17**: 1427-1437.
- ENIGL, M. & P. SCHAUSBERGER 2007. Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phyto-seiid mites and associated prey. *Exp. Appl. Acarol.*, **42**(2): 75-85.
- FIAHLO, R. F. & L. STEVENS 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **267**: 1469-1474.
- FISHER, R. A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press, Oxford (Reino Unido), 272 pp.
- FRATI, F., I. NEGRI, P. P. FANCIULLI, M. PELLECCIA, V. DE PAOLA, V. SCALI & R. DALLAI 2004. High levels of genetic differentiation between *Wolbachia*-infected and non-infected populations of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae). *Pedobiology*, **48**(5-6): 461-468.
- FUJII, Y., D. KAGEYAMA, S. HOSHIZAKI, H. ISHIKAWA & T. SASAKI 2001. Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapularis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestria kuehniella*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **268**: 855-859.
- GIORDANO, R., S. L. O'NEILL & H. M. ROBERTSON 1995. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics*, **140**(4): 1307-1317.
- GIORDANO, R., J. J. JACKSON & H. M. ROBERTSON 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(21): 11439-11444.
- GIRIN, C. & M. BOULETREAU 1995. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Experientia*, **51**: 398-401.
- GONÇALVES, C. I., M. E. HUIGENS, P. VERBAARSCHOT, S. DUARTE, A. MEXIA & J. TAVARES 2006. Natural occurrence of *Wolbachia*-infected and uninfected *Trichogramma* species in tomato fields in Portugal. *Biol. Control*, **37**(3): 375-381.
- GOODACRE, S. L., O. Y. MARTIN, C. F. THOMAS & G. M. HEWITT 2006. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. *Mol. Ecol.*, **15**(2): 517-527.
- GOTOH, T., H. NODA & X.-Y. HONG 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity*, **91**: 208-216.
- HENNIG, W. 1966. *Phylogenetics systematics*. University of Illinois Press, Urbana (EEUU), 280 pp.
- HILGENBOECKER, K., P. HAMMERSTEIN, P. SCHLATTMANN, A. TELSCHOW & J. H. WERREN 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.*, **281**: 215-221.
- HOFFMANN, A. A., M. TURELLI & L. G. HARSHMAN 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, **126**: 933-948.
- HORNETT, E. A., S. CHARLAT, A. M. R. DUPLOUY, N. DAVIES, G. K. RODERICK, N. WEDELL & G. D. D. HURST 2006. Evolution of male-killer suppression in a natural population. *PLoS Biol.*, **4**(9): e283 doi: 10.1371/journal.pbio.0040283.
- HOY, M. A. & A. JEYAPRAKASH 2005. Microbial diversity in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Biol. Control*, **32**(3): 427-441.
- HURST, G. D. D. & F. M. JIGGINS 2000. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications *Emerging Infect. Dis.*, **6**(4): 329-336.
- HURST, G. D. D., M. E. N. MAJERUS & L. E. WALKER 1992. Cytoplasmic male killing elements in *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae). *Heredity*, **69**: 84-91.
- HURST, G. D. D., F. M. JIGGINS, J. H. G. VON DER SCHULENBURG, D. BERTRAND, S. A. WEST, I. I. GORIACHEVA, I. A. ZAKHAROV, J. H. WERREN, R. STOUTHAMER & M. E. N. MAJERUS 1999a. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **266**: 735-740.
- HURST, G. D. D., J. H. G. VON DER SCHULENBURG, D. BERTRAND, S. A. WEST, I. I. GORIACHEVA, I. A. ZAKHAROV, J. BAUNGAARD, W. VÖLKL, R. STOUTHAMER & M. E. N. MAJERUS 1999b. Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria *Insect. Mol. Biol.*, **8**: 133-139.
- HURST, G. D. D., A. P. JOHNSON, J. H. SCHULENBURG & Y. FUYAMA 2000. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, **156**(2): 699-709.
- HURST, L. D. 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male-killers. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **244**: 91-99.
- JIGGINS, F. M., G. D. D. HURST & M. E. N. MAJERUS 1998. Sex-ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. *Heredity*, **81**: 87-91.
- JIGGINS, F. M., G. D. D. HURST & M. E. N. MAJERUS 2000. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **267**: 69-73.
- JIGGINS, F. M., J. H. G. VON DER SCHULENBURG, G. D. D. HURST & M. E. N. MAJERUS 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **268**: 1423-1427.
- JIGGINS, F. M., J. K. BENTLEY, M. E. N. MAJERUS & G. D. D. HURST 2002. Recent changes in phenotype and patterns of host specialization in *Wolbachia* bacteria. *Mol. Ecol.*, **11**: 1275-1283.
- JOHANOWICZ, D. L. & M. A. HOY 1996. *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S rDNA Analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **89**(3): 435-441.
- KAGEYAMA, D., G. NISHIMURA & Y. ISHIKAWA 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis*. *Heredity*, **88**: 444-449.
- KASSEM, H. A., A. N. HASSAN, I. ABDEL-HAMID, G. OSMAN, E. M. EL KHALAB & M. A. MADKOUR 2003. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies (Diptera: Psychodidae) from Egypt. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **47**(2): 93-101.
- KELLER, G. P., D. M. WINDSOR, J. M. SAUCEDO & J. H. WERREN, 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Mol. Ecol.*, **13**(8): 2405-2420.
- KITTAYAPONG, P., W. JAMNONGLUK, A. THIPAKSORN, J. R. MILNE & C. SINDHUSAKE 2003. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. *Mol. Ecol.*, **12**(4): 1049-1060.
- KONDO, N., N. NIKOH, N. IJCHI, M. SHIMADA & T. FUKATSU 2002. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(22): 14280-14285.
- KYEI-POKU, G. K., M. GILADI, P. COGLIN, O. MOKADY, E. ZCHORIFEIN & K. D. FLOATE 2006. *Wolbachia* in wasps parasitic on filth flies with emphasis on *Spalangia cameroni*. *Entomol. Exp. Appl.*, **121**: 123-135.
- LASSY, C. W. & T. L. KARR 1996. Cytological analysis of fertilization

- and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech. Dev.*, **57**: 47-58.
- LEU, S.-J. C., J. K.-K. LI & T. H. TSIAO 1989. Characterization of *Wolbachia postica*, the cause of reproductive incompatibility among alfalfa weevil strains. *J. Invertebr. Pathol.*, **54**: 248-259.
- LO, N. & T. A. EVANS 2007. Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **44**(1): 461-466.
- LO, N., M. CASIRAGHI, E. SALATI, C. BAZZOCCHI & C. BANDI 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol. Biol. Evol.*, **19**(3): 341-346.
- LO, N., C. PARASKEVOPOULOS, K. BOURTIZIS, S. L. O'NEILL, J. H. WERREN, S. R. BORDENSTEIN & C. BANDI 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**: 654-657.
- MAJERUS, M. E. N. 1999. Simbiontes hereditarios causantes de efectos deletéreos en los artrópodos. En: Melic, A. *et al.* (eds.) Evolución y filogenia de Arthropoda. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)*, **26** (vol. monográfico): 777-806.
- MARSHALL, J. L. 2004. The *Allonemobius-Wolbachia* host-endosymbiont system: evidence for rapid speciation and against reproductive isolation driven by cytoplasmic incompatibility. *Evolution*, **58**(11): 2409-2425.
- MATSUMOTO, K., A. IZRI, H. DUMON, D. RAOULT & P. PAROLA 2008. First detection of *Wolbachia spp.*, including a new genotype, in sand flies collected in Marseille, France. *J. Med. Entomol.*, **45**(3): 466-469.
- MCGRAW, E. A., D. J. MERRITT, J. N. DROLLER & S. L. O'NEILL 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **268**: 2565-2570.
- MITSUHASHI, W., H. FUKUDA, K. NICHU & R. MURAKAMI 2004. Male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Entomol. Exp. Appl.*, **112**: 57-64.
- MOYA, A., J. PERETÓ, R. GIL & A. LATORRE 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Rev. Genet.*, **9**: 218-229.
- NEGRI, I., M. PELLECCIA, P. J. MAZZOGLIO, A. PATETTA & A. ALMA 2006. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proc. R. Soc. B.*, **273**: 2409-2416.
- NODA, H., Y. KOIZUMI, Q. ZHANG & K. DENG 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**(6-7): 727-737.
- O'NEILL, S. L., R. GIORDANO, A. M. COLBERT, T. L. KARR & H. M. ROBERTSON 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**(7): 2699-2702.
- O'NEILL, S. L., M. M. PETTIGREW, S. P. SINKINS, H. R. BRAIG, T. G. ANDREADIS & R. B. TESH 1997. *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol. Biol.*, **6**(1): 33-39.
- PANNEBAKKER, B. A., D. J. ZWAAN, L. W. BEUKEBOOM & J. J. VAN ALPHEN 2004. Genetic diversity and *Wolbachia* infection of the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina clavipes* in western Europe. *Mol. Ecol.*, **13**(5): 1119-1128.
- PERROT-MINOT, M. J., L. GUO & J. H. WERREN 1996. Double and single *Wolbachia* infections in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, **143**: 961-972.
- RANCÈS, E., D. VORONIN, V. TRAN-VAN & P. MAVINGUI 2008. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *J. Bacteriol.*, **190**(14): 5020-5030.
- RASGON, J. L. & T. W. SCOTT 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics*, **165**(4): 2029-2038.
- RASGON, J. L., C. E. GAMSTON & X. REN 2006. Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(11): 6934-6937.
- REED, K. M. & J. H. WERREN 1995. Induction of paternal genome loss by the paternal sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Mol. Reprod. Dev.*, **40**: 408-418.
- RIEGLER, M., S. CHARLAT, C. STAUFFER & H. MERCOT 2004. *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(1): 273-279.
- RIGAUD, T. 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropods hosts. En O'Neill, S. L., A. A. Hoffmann & J. H. Werren (eds.) *Influential passengers* Oxford University Press, Oxford (Reino Unido): 81-101.
- RIGAUD, T. & P. JUCHAULT 1992. Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Heredity*, **68**: 47-52.
- RIGAUD, T. & P. JUCHAULT 1993. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics*, **133**: 247-252.
- RIO, R. V. M., C. LEFEVRE, HEDDIA. & S. AKSOY 2003. Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: influence of host environment on microbial genome composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(11): 6825-6832.
- ROUSSET, F. & M. SOLIGNAC 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6389-6393.
- ROWLEY, S. M., R. J. RAVEN & E. A. MCGRAW 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr. Microbiol.*, **49**: 208-214.
- SCHULENBURG, J. H., G. D. HURST, T. M. HUIGENS, M. M. VAN MEER, F. M. JIGGINS & M. E. N. MAJERUS 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Mol. Biol. Evol.*, **17**(4): 584-600.
- SHOEMAKER, D. D., C. A. MACHADO, D. MOLBO, J. H. WERREN, D. M. WINDSOR & E. A. HERRE 2002. The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **269**: 2267-2277.
- SINTUPACHEE, S., J. R. MILNE, S. POONCHAI SRI, V. BAIMAI & P. KITTAYAPONG 2006. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microb. Ecol.*, **51**(3): 294-301.
- SIRONI, M., C. BANDI, L. SACCHI, B. DI SACCO, G. DAMIANI & C. GENCHI 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **74**: 224-228.
- STOUTHAMER, R. 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*, **38**: 3-6.
- STOUTHAMER, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis En O'Neill, S. L., A. A. Hoffmann & J. H. Werren, (eds.) *Influential passengers* Oxford University Press, Oxford (Reino Unido): 102-124.
- STOUTHAMER, R. & D. J. KAZMER 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, **73**: 317-327.
- STOUTHAMER, R. & R. F. LUCK 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomol. Exp. Appl.*, **67**: 183-192.
- STOUTHAMER, R., R. F. LUCK & W. D. HAMILTON 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 2424-2427.

- TAYLOR, M. J. & A. HOERAUF 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes *Parasitol. Today*, **15**(11): 437-442.
- TAYLOR, M. J., C. BANDI, A. HOERAUF & J. LAZDINS 2000. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: a target for control? *Parasitol. Today*, **16**(5): 179-180.
- TERRY, R. S., A. M. DUNN & J. E. SMITH 1997. Cellular distribution of a feminizing microsporidian parasite: a strategy for transovarial transmission. *Parasitology*, **115**: 157-163.
- TRAM, U. & W. SULLIVAN 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science*, **296**: 1124-1126.
- TURELLI, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution*, **48**: 1500-1513.
- TURELLI, M. & A. A. HOFFMANN 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, **140**: 1319-1338.
- VAN BORM, S., T. WENSELEERS, J. BILLEN & J. J. BOOMSMA 2001. *Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. *J. Evol. Biol.*, **14**: 805-814.
- VAN DER GEEST, L. P. S., S. L. ELLIOT, J. A. J. BREEUWER & E. A. M. BEERLING 2000. Diseases of mites. *Exp. Appl. Acarol.*, **24**: 497-560.
- VANDERKERCKHOVE, T. T., S. WATTEYNE, A. WILLEMS & J. G. SWINGS 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol. Lett.*, **180**(2): 279-286.
- VAVRE, F., F. FLEURY, D. LEPETIT, P. FOUILLET & M. BOULÉTREAU 1999a. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in Host-Parasitoid Associations. *Mol. Biol. Evol.*, **16**(12): 1711-1723.
- VAVRE, F., GIRIN, C. & M. BOULÉTREAU 1999b. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Mol. Biol.*, **8**(1): 67-72.
- VILJAKAINEN, L., M. REUTER & P. PAMILO 2008. *Wolbachia* transmission dynamics in *Formica* wood ants. *BMC Evol. Biol.*, **8**: 55 doi: 10.1186/1471-2148-8-55.
- WADE, M. J. & N. W. CHANG 1995. Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite, *Wolbachia*. *Nature*, **373**: 72-74.
- WEEKS, A. R. & J. A. J. BREEUWER 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **268**: 2255-2261.
- WEEKS, A. R., R. VELTEN & R. STOUTHAMER 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **270**: 1857-1865.
- WEEKS, A. R., M. TURELLI, W. R. HARCUMBE, K. T. REYNOLDS & A. A. HOFFMANN 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol.*, **5**(5): e114 doi: 10.1371/journal.pbio.0050114.
- WERREN, J. H. 1987. The coevolution of autosomal and cytoplasmic sex ratio factors. *J. Theor. Biol.*, **124**: 317-334.
- WERREN, J. H. 1993. The evolution of inbreeding in haplodiploid organisms. En THRONHILL, N. (ed.) *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. Univ. Chicago Press (Chicago, EEUU), 42-59 pp.
- WERREN, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, **42**: 587-609.
- WERREN, J. H. & J. D. BARTOS 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Curr. Biol.*, **11**(6): 431-435.
- WERREN, J. H., G. D. D. HURST, W. ZHANG, J. A. J. BREEUWER, R. STOUTHAMER & M. E. N. MAJERUS 1994. Rickettsial relative associated with male-killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.*, **176**: 388-394.
- WERREN, J. H., D. WINDSOR & L. R. GUO 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **262**: 197-204.
- WERREN, J. H., W. ZHANG & L. R. GUO 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **261**: 55-71.
- ZABALOU, S., M. RIEGLER, M. THEODORAKOPOULOU, C. STAUFFER, C. SAVAKIS & K. BOURTZIS 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(42): 15042-15045.
- ZCHORI-FEIN, E. & S. J. PEARLMAN 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol. Ecol.*, **13**: 2009-2016.
- ZCHORI-FEIN, E., R. T. ROUSH & M. S. HUNTER 1992. Male production by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) in asexual species. *Experientia*, **48**: 173-178.
- ZEH, D. W., J. A. ZEH & M. M. BONILLA 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity*, **95**(1): 41-49.
- ZHOU, W., F. ROUSSET & S. L. O'NEILL 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **265**: 509-515.