



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**GENÓMICA DE LA FLAVOBACTERIA ENDOSIMBIÓNTE DE LOS INSECTOS
DE LA FAMILIA MARGARODIDAE**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
TANIA ROSAS PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS
COMITÉ TUTOR
DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. VÍCTOR GONZÁLEZ ZÚÑIGA
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

CUERNAVACA, MOR. ABRIL DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

- *A Esperanza Martínez Romero por sus enseñanzas, su paciencia y confianza otorgadas.*
- *A Mónica Rosenblueth por su apoyo y guía en mi desarrollo académico.*
- *A Lorenzo Segovia, Victor González, Otto Geiger, Isabel López y Christian Sohlenkamp por sus cuestionamientos, sugerencias y aportaciones para el enriquecimiento de mi trabajo.*
- *A mis compañeros de grupo Luigi, Mario, Martha, Tabita, Luis, Bere, Arturo, Victor, Ernesto por hacer del laboratorio un lugar agradable y divertido, por sus ideas y aportaciones en los seminarios y por su apoyo moral.*
- *A todos los integrantes del Programa de Ecología Genómica.*
- *A los miembros del jurado por la revisión de ésta tesis:*

- *A la UNAM y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por darme las herramientas para desarrollarme académicamente asistiendo a cursos, congresos y estancias de investigación.*
- *A Conacyt por la beca otorgada.*

Personales

- *A mis padres por su cariño y por apoyar todas mis decisiones y sueños incondicionalmente.*
- *A mi hermana por acompañarme y apoyarme siempre.*
- *A mis abuelos, tíos y primos por darme su ejemplo y motivación.*
- *A mis amigos Diana, Pablo, Ana, Ale, Marel, Chanto, Iris, Karen, Sergio, Ana Paulina, Neph, Lulú, Carolina por compartir aventuras y crecer juntos.*

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Simbiosis	3
1.2 Asociaciones bacteria-insecto	3
1.3 Simbiosis en insectos escama	4
2. Antecedentes	6
2.1 <i>Llaveia axin axin</i> como modelo de estudio	6
2.2 Identificación de los endosimbiontes de <i>L. axin axin</i>	7
3. Planteamiento del problema	10
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	10
6. Resultados	11
6.1 Estimación del tamaño del genoma de la flavobacteria	11
6.2 Identificación del bacterioma de <i>L. axin axin</i>	11
6.3 Publicación: Genome sequence of “ <i>Candidatus</i> Walczuchella monophlebidarum” the flavobacterial endosymbiont of <i>Llaveia axin axin</i>	13
6.4 Resultados adicionales	27
6.4.1 Genoma parcial de la enterobacteria endosimbionte	27
6.4.2 Caracterización fisiológica de los tejidos simbióticos	28
6.4.3 Transcriptómica del bacterioma y el ovario de <i>L. axin axin</i>	29
7. Discusión	35
8. Perspectivas	37
Metodología adicional	38
Bibliografía	41

Resumen

Los insectos escama (Hemíptera: Coccoidae) constituyen un grupo muy diverso de insectos chupadores de savia que tienen una gran diversidad de asociaciones simbióticas con bacterias. Aquí se presenta la secuencia genómica completa, reconstrucción metabólica y genómica comparativa de la flavobacteria endosimbionte del insecto escama gigante *Llaveia axin axin*. El repertorio genético dentro de su genoma de 309,299 pb es similar al de otras flavobacterias endosimbiontes de insectos pero no sinténico. De acuerdo con su contenido genético, sintetizar amino ácidos esenciales parece ser la principal contribución de la flavobacteria en la asociación simbiótica con su insecto hospedero. También se reporta la presencia de una γ -proteobacteria simbiote que podría estar relacionada con el reciclaje del nitrógeno de desecho y también tiene capacidades biosintéticas de amino ácidos que podrían proveer precursores metabólicos a la flavobacteria endosimbionte. Se propone “*Candidatus Walczuchella monophlebidarum*” como el nombre de la flavobacteria endosimbionte de los insectos de la familia Monophlebidae.

Abstract

Scale insects (Hemiptera: Coccoidae) constitute a very diverse group of sap feeding insects with a large diversity of symbiotic associations with bacteria. Here we present the complete genome sequence, metabolic reconstruction and comparative genomics of the flavobacterial endosymbiont of the giant scale insect *Llaveia axin axin*. The gene repertoire of its 309,299 bp genome was similar to that of other flavobacterial insect endosymbionts though not syntenic. According to its genetic content, essential amino acid biosynthesis is likely to be the flavobacterial endosymbiont's principal contribution to the symbiotic association with its insect host. We also report the presence of a γ -proteobacterial symbiont that may be involved in waste nitrogen recycling and also has amino acid biosynthetic capabilities that may provide metabolic precursors to the flavobacterial endosymbiont. We propose “*Candidatus Walczuchella monophebidarum*” as the name of the flavobacterial endosymbiont of insects from the Monophlebidae family.

1. Introducción

1.1 Simbiosis

La simbiosis es el fenómeno de interacción estable entre dos o más organismos de diferentes especies en donde se genera una relación que puede ser benéfica, perjudicial o neutra (Moya *et al*, 2008). Este tipo de relaciones tienen un papel fundamental en diversos procesos biológicos relacionados con la salud y enfermedad, la ecología y el medio ambiente.

Las interacciones simbióticas entre bacterias y eucariontes se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido una fuente importante de innovaciones evolutivas que han permitido la utilización de nuevas fuentes de alimento, la colonización de nuevos nichos ecológicos e incluso la generación de nuevas especies (Douglas, 2012, Moran, 2007).

En los casos más extremos de simbiosis se encuentran aquellos en los que uno de los organismos vive dentro de cavidades o incluso dentro de células del otro. A éste último se le denomina hospedero y al organismo que habita dentro del hospedero se le conoce como endosimbionte (Moya *et al*, 2008).

1.2 Asociaciones bacteria-insecto

Dentro de las asociaciones más estudiadas entre endosimbiontes y animales se encuentran las simbiosis entre bacterias e insectos, éstas se caracterizan por la formación de bacteriocitos, células especializadas del insecto para albergar a sus endosimbiontes, y el grupo de bacteriocitos conforman el órgano simbiótico llamado bacterioma (Douglas, 2011). El desarrollo de un órgano tan especializado como el bacterioma implica una asociación muy íntima probablemente mutualista, donde el interés de mantener la interacción simbiótica puede estar relacionado directamente con la supervivencia tanto

del simbiote como del hospedero. La dependencia entre el endosimbionte y su hospedero se ve reflejada principalmente en dos fenómenos, en el método de transmisión del endosimbionte a la progenie del hospedero y en los cambios genómicos del endosimbionte (Douglas, 2012, Mccutcheon y Moran, 2012). Comúnmente los endosimbiontes son transferidos de manera vertical, es decir, la madre los transmite directamente a su progenie a través de diferentes mecanismos que aseguran la presencia del simbiote en todos los individuos de la nueva generación. Es importante mencionar que en algunos casos ocurren fenómenos aislados de transmisión horizontal.

El método de transmisión tiene un impacto en la población bacteriana ya que restringe su interacción con otras poblaciones, disminuyendo la variabilidad genética y produciendo una población de endosimbiontes esencialmente clonal. Las restricciones poblacionales así como el ambiente intracelular tienen un efecto importante sobre el genoma del endosimbionte, por un lado, una población clonal no permite que la selección purificadora actúe sobre mutaciones semi deletéreas, permitiendo que genes defectuosos se fijen en la población; por otro lado, la bacteria al introducirse permanentemente al nicho intracelular sufre una marcada reducción genómica en donde pierde genes con funciones redundantes u obsoletas (Douglas, 2011, Mccutcheon y Moran, 2012). Otras características importantes que adquieren los genomas de bacterias endosimbiontes son un alto contenido de A+T, una alta tasa de mutación y la conservación exclusiva de genes con funciones importantes para la interacción simbiótica con el hospedero (Mccutcheon y Moran, 2012). Ésta última característica permite que a través del análisis del genoma de las bacterias endosimbiontes se puedan hacer inferencias sobre su rol en la simbiosis.

Es importante notar que obtener una muestra de ADN genómico de los endosimbiontes para hacer éstos análisis no es trivial, ya que éste tipo de bacterias raramente son cultivables en el laboratorio y su separación a partir de los tejidos del insecto puede ser técnicamente muy complicada. Por estas razones se ha recurrido a la utilización de tecnologías de secuenciación de nueva generación sobre muestras heterogéneas de ADN

(ADN de endosimbiontes y hospedero juntos) para obtener la secuencia genómica de los endosimbiontes y mediante métodos bioinformáticos, analizar su contenido funcional e inferir el papel de la bacteria en la relación simbiótica así como las posibles interacciones metabólicas entre endosimbionte y hospedero (Mccutcheon, 2011).

Esto ha permitido entender mejor el surgimiento y la biología de las relaciones simbióticas entre bacterias e insectos, un fenómeno que se estima que ocurre en al menos el 15% de las especies de insectos en el planeta (Douglas, 2011).

1.3 Simbiosis en insectos escama

Un grupo de insectos donde se ha encontrado una gran diversidad de relaciones simbióticas con bacterias es el de la superfamilia Coccoidea, perteneciente al orden Hemiptera (Rosenblueth *et al*, 2012). Los insectos de ésta superfamilia son conocidos como insectos escama por secretar una cobertura cerosa protectora. Todas las especies de éste grupo de insectos se alimentan exclusivamente de la savia de sus plantas hospederas, la cual succionan con un estilete que forma parte de su especializado aparato bucal. La savia es el medio de transporte de nutrientes y desechos de la planta y se compone principalmente de agua, azúcares y minerales disueltos. La baja cantidad de compuestos nitrogenados en la savia la hace una dieta muy deficiente y llama la atención que sea la base nutricional de todo este grupo de insectos (Bourtzis y Miller, 2006). Muchos insectos con dietas pobres se sabe que mantienen relaciones simbióticas con microorganismos que les ayudan a suplementar su nutrición por lo que no es raro que se hayan identificado dos bacterias simbióticas, una flavobacteria y una enterobacteria, presentes en varias de las subfamilias dentro del grupo de los insectos escama (Gruwell *et al*, 2010, Matsuura *et al*, 2009, Sabree *et al*, 2012, Walczuch, 1932). La presencia de estas bacterias en una gran cantidad de especies dentro de éste grupo de insectos sugiere que tienen un papel relevante en la biología de sus insectos hospederos, sin embargo no se tiene aún mucho conocimiento sobre la base biológica de su interacción.

2. Antecedentes

2.1 *Llaveia axin axin* como modelo de estudio

Se conocen diversos tipos de relaciones endosimbióticas entre bacterias e insectos pero hay muchos grupos de insectos en los que la caracterización de estas interacciones aún no ha sido explorada, como es el caso de la familia de insectos Margarodidae. Esta es de las familias más antiguas dentro de la superfamilia Coccoidea y se calcula que se originó hace aproximadamente 145 millones de años (Gullan y Cook, 2007).

Recientemente la clasificación taxonómica de esta familia fue modificada y ahora recibe el nombre de Monophlebidae (Rosenblueth *et al*, 2012). Una especie representativa de esta familia de insectos en México es *Llaveia axin axin*, una cochinilla con gran importancia económica en las regiones de Chiapas y Michoacán. Tiene un ciclo de vida anual y presenta dimorfismo sexual. Los machos son pequeños y alados, viven un par de días y mueren tras la copula. Las hembras pasan por tres estadios de crecimiento hasta que llegan al estado adulto, pasan toda su vida ancladas a su planta hospedera y al final del ciclo se dejan caer a la tierra donde ponen sus huevecillos y luego mueren. Una hembra adulta llega a medir hasta 2 cm de largo y puede poner alrededor de 500 huevecillos. El gran tamaño de este insecto así como la facilidad de obtención de especímenes y el previo conocimiento sobre su biología lo hace un buen modelo de estudio.



Fig. 1. Huevecillos y hembras de la especie *Llaveia axin axin* en estadio de ninfa y estadio adulto.

2.2 Identificación de los endosimbiontes de *L. axin axin*

A partir del DNA total de 10 hembras adultas de la especie *Llaveia axin axin* se realizó PCR utilizando un par de oligos diseñados para amplificar el gen 16s rRNA de eubacterias. Los amplicones obtenidos se clonaron y se secuenciaron 18 insertos provenientes de los DNAs de 2 insectos. Además se verificó la identidad de 34 insertos provenientes de los DNAs de 8 insectos a través de ARDRA comparando sus patrones de restricción con los de los insertos secuenciados.

Se hizo Blast de las secuencias obtenidas contra la base de datos NT y se encontraron solamente dos tipos de secuencias, una con identidad del 88% con el gen 16s rRNA de *Uzinura diaspidicola* y otra con identidad del 98% con el gen 16s rRNA de *Sodalis glossinidius*. Tanto *U. diaspidicola* como *S. glossinidius* son bacterias endosimbiontes de insectos, la primera es una flavobacteria asociada a insectos de la familia Diaspididae y la segunda es una Gamma-proteobacteria asociada a la mosca tse- tse *Glossina morsitans morsitans*. Se obtuvieron estas mismas secuencias al amplificar por PCR el gen 16s rRNA a partir de DNA de huevecillos. Se utilizaron estas secuencias para hacer un análisis filogenético de los simbioses encontrados.

La filogenia del phylum Bacteroidetes construida a partir de secuencias del gen 16s rRNA posiciona a la flavobacteria de *L. axin axin* en un clado de bacterias simbioses de insectos, siendo sus parientes más cercanos los simbioses de otros insectos escama. El clado está conformado por simbioses de cochinillas, chicharras, escarabajos y cucarachas.

La filogenia construida con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias representantes de la clase Gammaproteobacteria posiciona al simbiote de *L. axin axin* cercanamente relacionado con las bacterias endosimbiontes del gorgojo y de la mosca Tse-tse dentro del grupo de las enterobacterias.

Las filogenias se muestran a continuación:

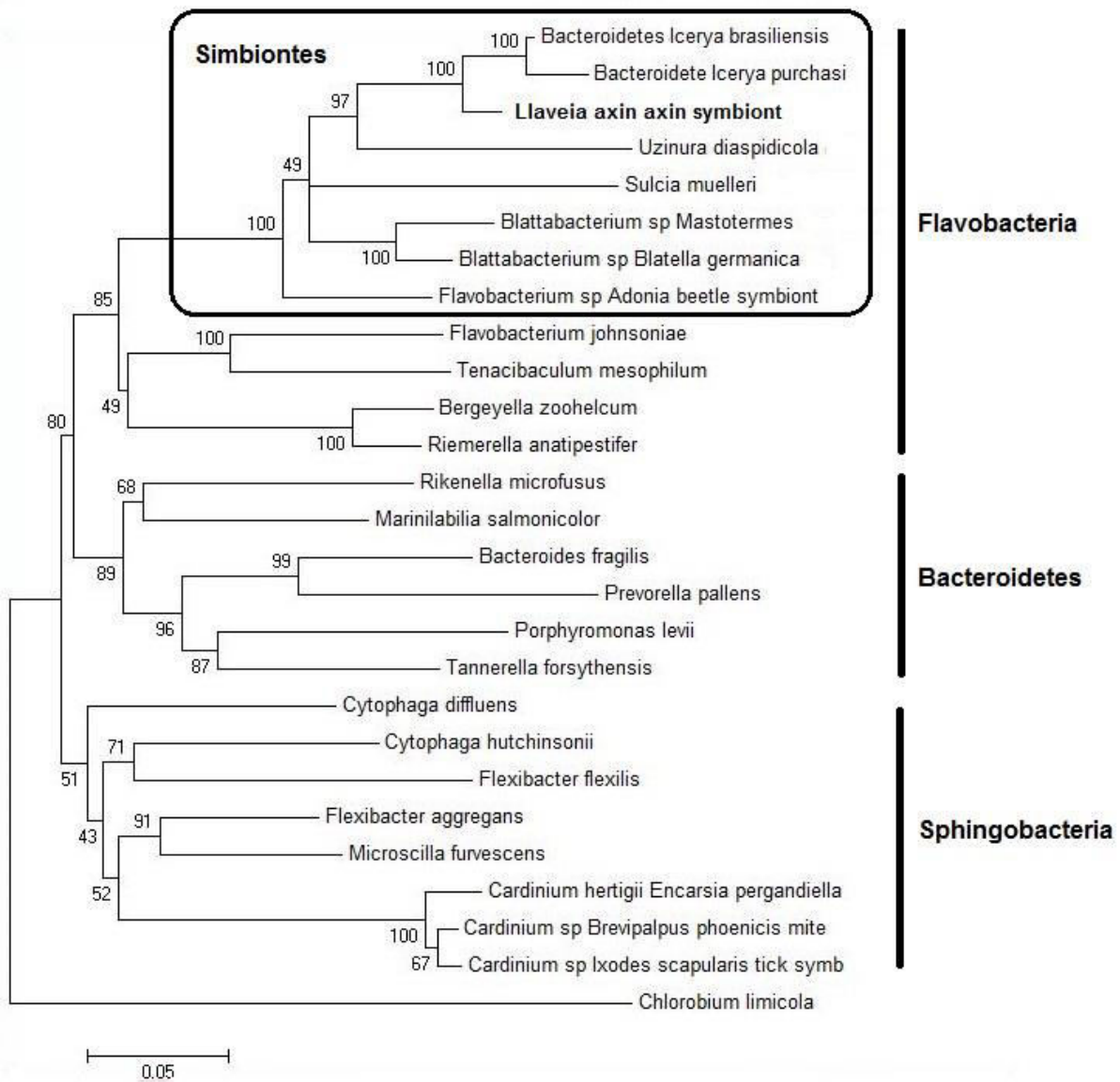


Fig. 2. Filogenia de bacterias representantes del phylum Bacteroidetes obtenida a partir de secuencias del gen 16s rRNA. ML.

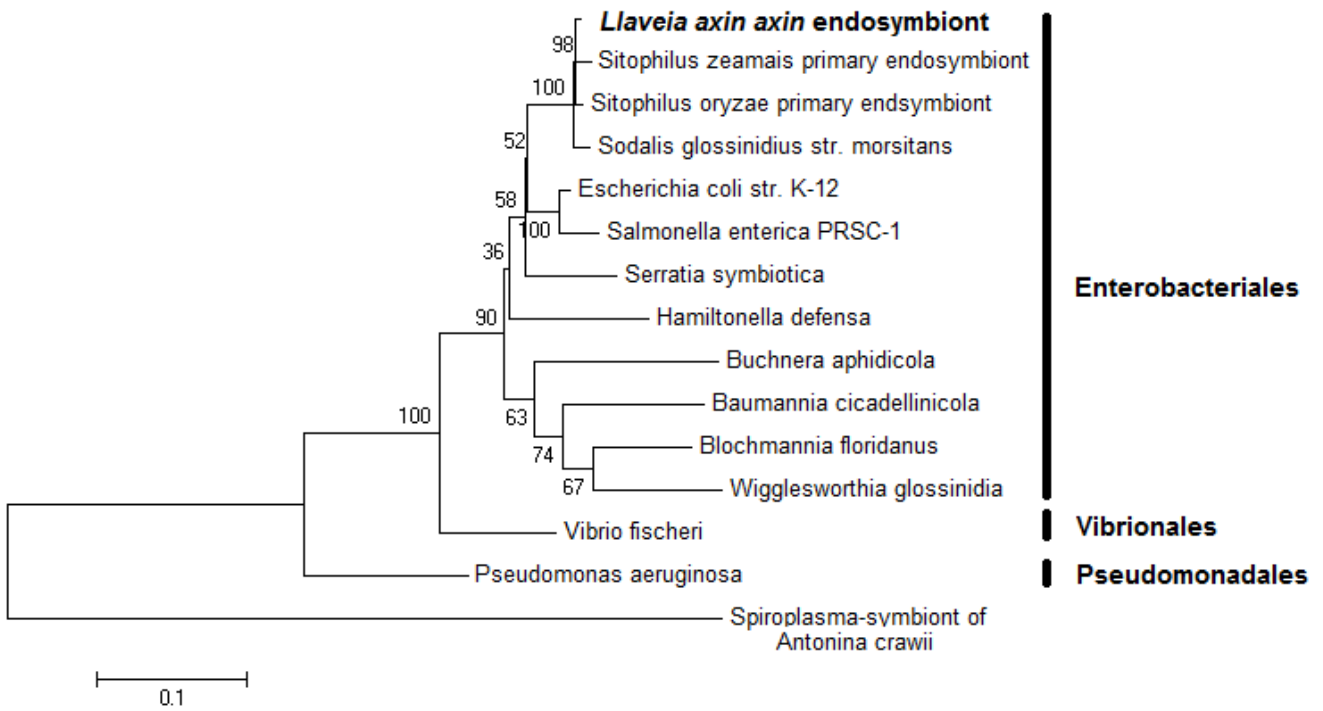


Fig. 3. Filogenia de bacterias representantes del phylum Gammaproteobacteria generada a partir de secuencias del gen 16s rRNA. ML

3. Planteamiento del problema

Se sabe que los animales tienen en general muchas limitaciones metabólicas, entre ellas, la inhabilidad de sintetizar varios aminoácidos y vitaminas. Al ser incapaces de sintetizar muchos nutrientes esenciales dependen de su dieta para obtenerlos.

Los insectos de la familia Monophlebidae (antes Margarodidae) se alimentan exclusivamente de la savia de las plantas, sustancia rica en carbohidratos pero pobre en compuestos nitrogenados. Una dieta tan pobre no es capaz de satisfacer las necesidades nutricionales del insecto por lo que suponemos que bacterias simbiotas pudieran complementar su nutrición.

4. Hipótesis

La flavobacteria es un endosimbionte de los insectos de la familia Monophlebidae y tiene un genoma reducido que ha perdido genes importantes para subsistir en vida libre pero conserva genes para la producción de nutrientes ausentes en la dieta del hospedero como aminoácidos y vitaminas.

5. Objetivos

1. Secuenciar y anotar el genoma de la flavobacteria.
2. Comparar las características genómicas de la flavobacteria con las de otras bacterias endosimbiontes y de vida libre.
3. Determinar si los genes relacionados con el papel nutricional de la flavobacteria en la simbiosis se expresan dentro del insecto.

6. Resultados

6.1 Estimación del tamaño del genoma de la flavobacteria

La señal de hibridación de la sonda específica para detectar el DNA de la flavobacteria en un gel de campos pulsados reveló una banda de aproximadamente 250 kb.

El experimento no fue reproducible utilizando la sonda específica para detectar el DNA de la enterobacteria.

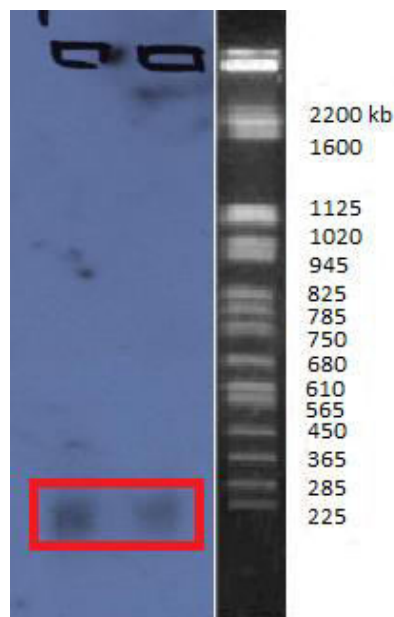


Fig. 4. Localización del DNA de la flavobacteria en un gel de electroforesis de campos pulsados.

6.2 Identificación del bacterioma

Los resultados de RT-PCR de los órganos disectados del insecto revelaron un enriquecimiento importante de DNA de endosimbiontes en dos estructuras rosadas localizadas en la parte alta del abdomen, una del lado derecho y otra del lado izquierdo del aparato digestivo, sugiriendo la presencia de un bacterioma dividido en 2 estructuras gemelas a cada lado del abdomen.

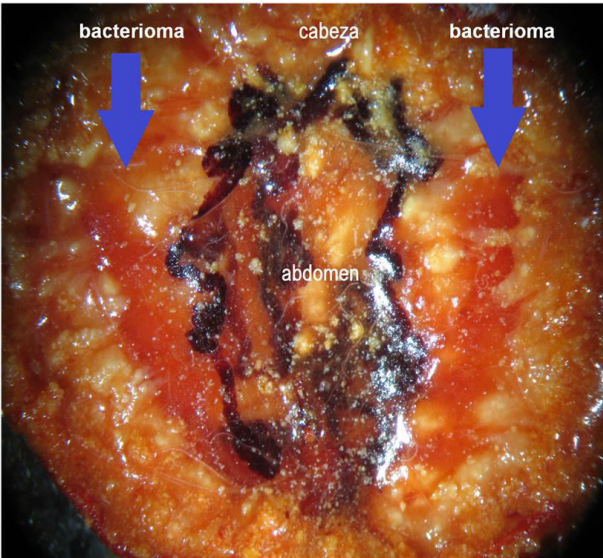


Fig. 5. Disección de una hembra adulta de la especie *L. axin axin* mostrando el bacterioma.

Cuantificación relativa de DNA de endosimbiontes

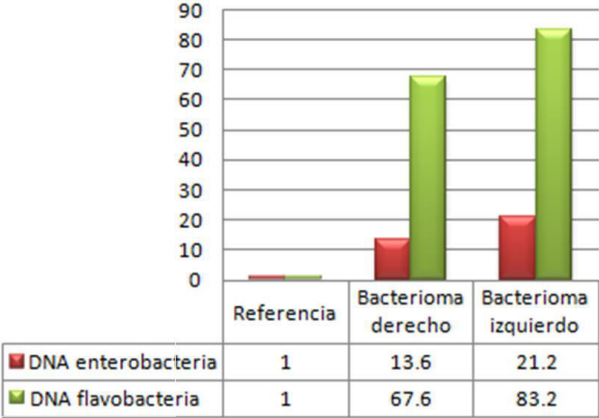


Fig. 6. Cuantificación relativa de DNA de los endosimbiontes de *L. axin axin* en el bacterioma con referencia al cuerpo completo.

6.3 Rosas-Pérez, T., Rosenblueth, M., Rincón-Rosales, R., Mora, J. and Martínez-Romero, E. (2014). Genome Sequence of “*Candidatus Walczuchella monophlebidarum*” the Flavobacterial Endosymbiont of *Llaveia axin axin* (Hemiptera: Coccoidea: Monophlebidae). Genome. Biol. Evol. 6:714-726

En éste trabajo se describió el genoma de la flavobacteria endosimbionte de *L. axin axin*, se hizo la reconstrucción de su metabolismo y se propuso que su función principal en la relación simbiótica es sintetizar amino ácidos. Se propuso nombrarla “*Candidatus Walczuchella monophlebidarum*”. También se observó la estructura del bacterioma y la colonización de la flavobacteria en las células del insecto a través de FISH.

Se hizo un análisis de genómica comparativa entre las flavobacterias endosimbiontes de insectos donde se observó que existe muy poca sintenia entre ellos pero una alta conservación funcional a pesar de sus diferencias ecológicas.

También se describieron algunos mecanismos del metabolismo del nitrógeno de la enterobacteria endosimbionte que podrían ser importantes en la relación simbiótica.

Genome Sequence of “*Candidatus Walzuchella monophlebidarum*” the Flavobacterial Endosymbiont of *Llaveia axin axin* (Hemiptera: Coccoidea: Monophlebidae)

Tania Rosas-Pérez^{1,*}, Mónica Rosenblueth¹, Reiner Rincón-Rosales², Jaime Mora¹, and Esperanza Martínez-Romero¹

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico

*Corresponding author: E-mail: trosas@icg.unam.mx.

Accepted: February 26, 2014

Data deposition: This project has been deposited at GenBank/DDJB/EMBL under the accession CP006873.

Abstract

Scale insects (Hemiptera: Coccoidea) constitute a very diverse group of sap-feeding insects with a large diversity of symbiotic associations with bacteria. Here, we present the complete genome sequence, metabolic reconstruction, and comparative genomics of the flavobacterial endosymbiont of the giant scale insect *Llaveia axin axin*. The gene repertoire of its 309,299 bp genome was similar to that of other flavobacterial insect endosymbionts though not syntenic. According to its genetic content, essential amino acid biosynthesis is likely to be the flavobacterial endosymbiont's principal contribution to the symbiotic association with its insect host. We also report the presence of a γ -proteobacterial symbiont that may be involved in waste nitrogen recycling and also has amino acid biosynthetic capabilities that may provide metabolic precursors to the flavobacterial endosymbiont. We propose “*Candidatus Walzuchella monophlebidarum*” as the name of the flavobacterial endosymbiont of insects from the Monophlebidae family.

Key words: scale insect, γ -Proteobacteria, symbiosis, comparative genomics.

Introduction

Insects have specialized symbioses with certain bacteria that provide diverse advantages to hosts. Generally, endosymbionts reside inside insect cells, sometimes in unique abdominal structures called bacteriomes (Wernegreen and Wheeler 2009). Endosymbionts have reduced genomes and maintain functions that allow their hosts to live on nutrient-deficient diets such as plant sap or blood (Moya et al. 2008). Endosymbionts from different bacterial phyla have been studied from various sap-sucking insects, mainly aphids and insects in the suborder Auchenorrhyncha (Moran 2007).

Flavobacteria have been found as endosymbionts of several scale insects (Hemiptera: Coccoidea). Until now they have been reported within the families Diaspididae, Lecanodiaspididae, Coccidae, Eriococcidae, Pseudococcidae, Ortheziidae, Coelostomidiidae, and Monophlebidae (Zchori-Fein et al. 2005; Gruwell et al. 2007; Matsuura et al. 2009; Gruwell et al. 2010; Dhimi et al. 2012; Rosenblueth et al. 2012). Flavobacteria have been considered to be the primary

endosymbionts of scale insects (Gruwell et al. 2007; Rosenblueth et al. 2012). The genome of *Uzinura diaspidicola* (endosymbiont of Diaspididae) was recently sequenced (Sabree et al. 2012). Flavobacteria from scale insects seem to have a single origin, except for *Brownia rhizoecola* (from Pseudococcidae: Phenacoccinae) tribe Rhizoecini (Rosenblueth et al. 2012). Some endosymbiotic Flavobacteria form a clade on the basis of 16S rRNA sequences and have been proposed to cospeciate with their Monophlebidae hosts (Rosenblueth et al. 2012). Besides scale insects, two other Flavobacteria have been reported as insect endosymbionts, *Sulcia muelleri* from Auchenorrhyncha and *Blattabacterium* spp. from basal termites and cockroaches, and their genomes have been fully sequenced (Wu et al. 2006; McCutcheon and Moran 2007; López-Sánchez et al. 2009; McCutcheon et al. 2009; Sabree et al. 2009; McCutcheon and Moran 2010; Woyke et al. 2010; Neef et al. 2011; Huang et al. 2012; Sabree et al. 2012; Patiño-Navarrete et al. 2013; Tokuda et al. 2013). In scale insects,

Enterobacteriaceae endosymbionts have been frequently found to coexist with Flavobacteria, including insects from Diaspididae (Rosenblueth et al. 2012); although the genome of *U. diaspidicola* has been sequenced from an insect that only has a single endosymbiont species (Sabree et al. 2012). *Llaveia axin axin* (Monophlebidae) harbors both endosymbionts previously found in scale insects: a flavobacterium and an enterobacterium (Rosenblueth et al. 2012).

Llaveia axin axin (Llave) (called “nijj” by native people) is a giant scale mainly restricted to tropical lowland regions of the states of Michoacán, Guerrero, and Chiapas in Mexico, and in Guatemala, although there are reports previous to 1995 of its presence in the Mexican states of Guanajuato, Veracruz, and Yucatán (Ben-Dov 2005). It is characterized by its use in the manufacture of native traditional crafts that provide an economic benefit to the local people. A yellow fat that is obtained from the female insect is used to prepare a lacquer to coat traditional art crafts making them resistant to heat, water, and decay. The lacquer can be mixed with other natural products to obtain different colors. It has been used on eating utensils without toxic effects and also as a medicine unguent for external wounds or pain (Williams and MacVean 1995; Martínez 2006).

During its early stages of development, the nijj establishes on the young leaves and stems of its host plants, specially *Acacia cochliacantha*, *A. angustissima* (reclassified as *Acaciella angustissima*), *Spondias* sp., and *Jatropha curcas* (Rincón-Rosales and Gutiérrez-Miceli 2008; Suazo-Ortuño et al. 2013) where it sucks the plant sap. As the insect grows, it keeps moving on the plant until it becomes an adult and reaches the principal trunk. Three-year-old plants can have around 300–400 insects but only during a short time in the year (from July to October). Locals collect the females at the end of the rainy season, rendering most of them to obtain the lacquer, but preserving a few to obtain eggs (around 500 eggs per female). Locals place these eggs at the crown of the plants when the rainy season begins and the eggs hatch a few hours later (MacVean 1999). The populations of *L. axin axin* have declined due to its overexploitation, as well as overgrazing, forest fires, and deforestation of the host plants. As they are considered pests of some commercial crops, such as *Spondias purpurea*, they have been eliminated (Rincón-Rosales and Gutiérrez-Miceli 2008; Suazo-Ortuño et al. 2013). Host plant species of *L. axin axin* have in common the production of tannins (Rincón-Rosales and Gutiérrez-Miceli 2008; Islam et al. 2011; de Sousa Araújo et al. 2012) which could be toxic compounds for insects. Endosymbiotic bacteria could have a role in the insect detoxification as in the case of pesticide detoxification in stinkbugs by their *Burkholderia* symbiont (Werren 2012). More importantly, monophlebid feed on plant sap, which is a poor source of essential nitrogen compounds (Sandström and Moran 1999).

We present here the complete genome sequence of the *L. axin axin* flavobacterial endosymbiont, a comparative genomic

analysis with other flavobacterial endosymbionts, as well as an analysis of its metabolic complementarity with the enterobacterial endosymbiont.

Materials and Methods

Nomenclature

In this article we did not use the word “*Candidatus*” as part of the name for symbiotic bacteria, and we italicized the genus and species (e.g., *S. muelleri* instead of *Candidatus* Sulcia muelleri).

DNA Extraction, PCR, and Cloning

Seven *L. axin axin* female adults were collected from each of the following host plants: *Acaciella angustissima* (Ejido Flores Magón, Mpo. Venustiano Carranza), *Jatropha curcas*, and *Spondias purpurea* (Chiapa de Corzo City) from the state of Chiapas, Mexico. Total DNA from the freshly collected insects was extracted as reported earlier (Rosenblueth et al. 2012). PCR was performed with bacterial universal 16S rRNA primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGA GGTGATCCAGCC-3'), which amplify products of about 1,500 bases (Weisburg et al. 1991). The PCR products were cloned and 60 individual plasmid clones were sequenced by MacroGen Inc. (Korea). Sequences were compared with the nt database of NCBI using the BlastN algorithm.

Fluorescent In Situ Hybridization of the Bacteriome

Fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed as described by Koga et al. (2009) with some modifications. Twenty-day-old freshly collected *L. axin axin* first instar nymphs (fig. 1a) were dehydrated with a 30–100% ethanol series, fixed overnight in Carnoy's solution, washed with ethanol, and treated for a few days in 6% hydrogen peroxide in 80% ethanol. The samples were washed several times with absolute ethanol, then with xylene, and embedded in paraffin. They were cut into 10- μ m sections with a rotary microtome and mounted on silane-coated glass slides. Sections were dewaxed through several washes with xylene and ethanol. Hybridization buffer with 100 nM of the probe was added to the samples and was incubated at 28°C overnight in a humidified chamber. The oligonucleotide probe used was Cy5_DcFlv1450 (5'-Cy5-ATACCTCCGACTTCCAGGA-3'), which targets 16S of Flavobacteria of *Drosicha* sp. (Matsuura et al. 2009) and *L. axin axin*. After washing with PBS, the samples were stained with 2 μ g/ml of DAPI and they were mounted with citifluor antifade solution. In order to confirm the specificity of the probe, control experiments were performed with no probe, RNase digestion, and competitive suppression with excess unlabelled probes. The slides were observed under a Zeiss LSM510 META confocal microscope.

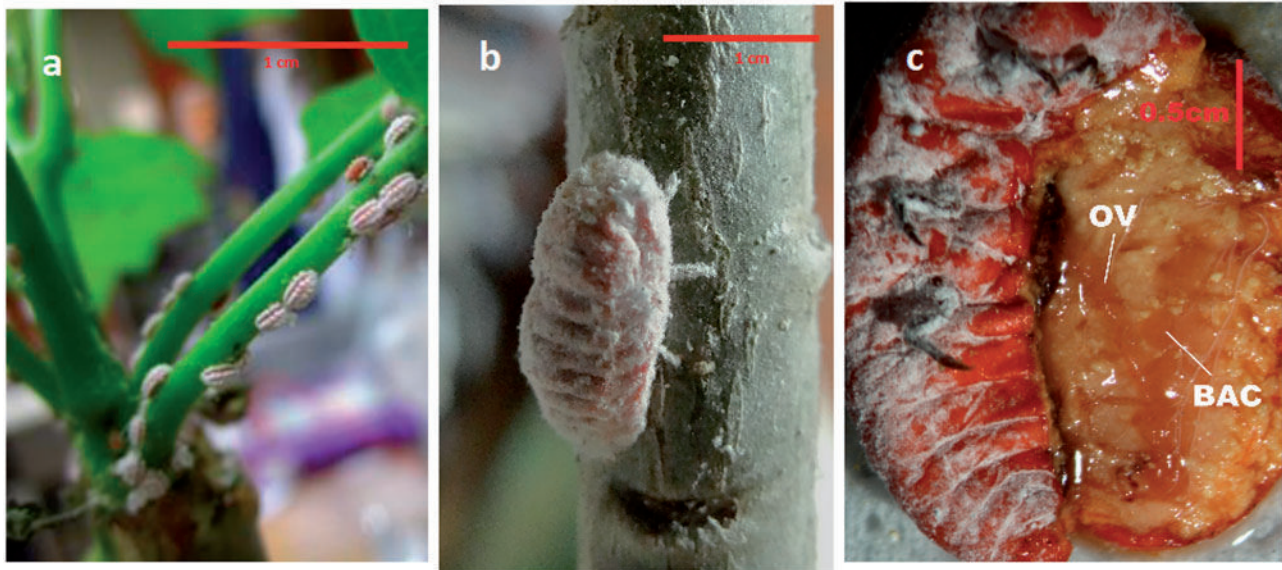


Fig. 1.—*Llaveia axin axin* insects. (a) Twenty-day-old nymphs on *Jatropha curcas* plants, (b) adult females on *Jatropha curcas*, (c) dissection of left side of abdomen of adult female in a dorsal plane showing the lobed bacteriome (BAC) and ovaries (OV), gut, and malpighian tubules were removed.

DNA Preparation and Sequencing

Bacteriomes were dissected in PBS from two frozen (-80°C) adult females collected in the summer of 2010 in Ejido Flores Magon, Mpo. Venustiano Carranza, Chiapas, Mexico (fig. 1*b* and *c*). DNA from the bacteriomes was purified using the Qiagen Dneasy Blood and Tissue Kit. Six micrograms of the purified DNA was used for Illumina HiSeq 2000 sequencing by the Next Generation Sequencing Division, Macrogen Inc.

For 454 sequencing, 5 μg of DNA were prepared from homogenized and filtered (20 and 11 μm pore size filters) abdomens of ten fresh adult females collected from the same site, using the Qiagen Dneasy Blood and Tissue Kit. Pyrosequencing was carried out in a Roche GS-FLX machine at the Virginia Bioinformatics Institute at Virginia Tech, USA.

Genome Assembly and Annotation

The Illumina Genome Analyzer System generated 61,593,058 paired-end reads of 100 nt with an insert size of 455 nt. The 454 run generated 78,087 single-end reads with an average length of 190 nt.

Velvet (Zerbino and Birney 2008) was used to make a hybrid assembly with the Illumina and 454 reads generating 118 contigs with an N50 of 231,364. All contigs were compared with the nt database of NCBI using the BlastN algorithm and only two contigs had high-scoring alignments with sequences from Flavobacteria.

A second assembly was run using Phrap (Gordon et al. 1998) taking the velvet contigs as input, generating a single circular contig of 309,299 bp which corresponded to the chromosome sequence of the flavobacterial endosymbiont.

Average coverage per nucleotide was 1571.4 \times . Protein-coding genes were predicted using Glimmer3, GeneMark.hmm, and Blast; tRNAs and a tmRNA were identified with tRNAscan-SE; and rRNAs were identified using the web version of WU-BLAST against the Rfam 11.0 sequence library.

Gene function annotation of the predicted protein-coding genes was based on results of BlastP searches against the RefSeq database and of hidden Markov model searches of the Pfam and TIGRFAM databases. The GenePRIMP pipeline (Pati et al. 2010) was used to search for gene call anomalies and the resulting report was used to perform manual curation of the genome.

Metabolic Reconstruction

The flavobacterial endosymbiont metabolic pathways were constructed by hand using the Ecocyc and Metacyc databases and the KEGG Automatic Annotation Server assignments as guides.

Comparative Genomics

Average nucleotide identity between the genomes of *S. muelleri* CARI (from *Clastoptera arizonana*), *Uzinura diaspidicola* ASNER (from *Aspidiotus nerii*), *Blattabacterium* sp. BPLAN (from *Periplaneta americana*), and the flavobacterial endosymbiont of *L. axin axin* was calculated with custom Perl scripts using Mummer alignments output.

Orthologous genes and the core genome of flavobacterial endosymbionts were determined based on BlastP matches between all genes of the four genomes with a high score

>75 using the CoreGenes server (Zafar et al. 2002). To show the syntenous blocks of genes between flavobacterial endosymbionts, the genome of the flavobacterial endosymbiont of *L. axin axin* was aligned versus the *S. muelleri*, *U. diaspidicola*, *Blattabacterium* sp., and the free-living pathogen *Flavobacterium psychrophilum* genomes using PROmer (Kurtz et al. 2004) and plotted in figure 5.

Phylogenetic Analysis

Flavobacteria 16S rRNA sequences from endosymbionts were aligned with ClustalW (Thompson et al. 1994) and manually edited. TIM2+G model was chosen by FindModel (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>; last accessed March 17, 2014. Posada and Crandall 2001) using Akaike Information Criterion (Akaike 1974). Gaps were not considered and 443 positions were analyzed. Maximum likelihood analysis was performed using PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) with 1,000 bootstrap replicates.

Enterobacteria phylogeny was built by aligning the amino acid sequences of housekeeping genes (*rpoA*, *rpoB*, *rpoD*, *rpoH*, *nusA*, *nusB*, *gyrA*, *pykA*, *dnaE*, and DNA primase) conserved in 20 γ -proteobacteria species including the enterobacterial endosymbiont of *L. axin axin* and other insect endosymbionts with reduced genomes. The alignments were concatenated and all positions containing gaps and missing data were eliminated, leaving a total of 5,565 positions in the final data set. The best model search and phylogenetic analysis were conducted in MEGA5 (Tamura et al. 2011). The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Whelan and Goldman + Freq. model with 1,000 bootstrap replicates.

GenBank accession numbers from reported sequences used to construct the phylogenies are shown in [supplementary table S1, Supplementary Material](#) online.

Results

L. axin axin Has Two Bacterial Endosymbionts in Bacteriomes

Only two phylotypes were detected in all the insect female adults sampled, Enterobacteriaceae and Flavobacteria. Figure 1c shows one of the two symbiotic organs (bacteriomes) located in the abdominal area of the insect. Figure 2 shows that Flavobacteria are localized in the bacteriomes and that each bacteriome consists of around six lobes. The same type of bacteriome has been found in *Drosicha* spp., which also belongs to Monophlebidae family (Matsuura et al. 2009). Illumina sequences obtained from bacteriome DNA confirmed that the enterobacterial symbiont is also present in the bacteriome. It has also been located in ovary and eggs by PCR.

The maternally inherited endosymbionts of Monophlebidae as well as the two large lobed bacteriomes where they are

located had been described earlier by Walczuch (1932) and Tremblay (1989). Monophlebidae has been considered a family of the superfamily Coccoidea in several recent studies (Hodgson and Foldi 2006; Gullan and Cook 2007). Tremblay's (1989) study of the endosymbionts also led him to treat Monophlebidae as a distinct family.

Proposed Name for Monophlebidae Scale Insects Flavobacterial Endosymbionts

We propose the name “*Candidatus* Walczuchella monophebidarum” for the flavobacterial endosymbiont living inside bacteriocytes of insects from the family Monophlebidae. The name Walczuchella has been chosen to honor Walczuch (1932) who described the morphology of the bacteriomes in Monophlebidae. *Walczuchella*: Wal.czuch'el.la. N.L. fem. dim. n. *Walczuchella*, named after Walczuch. Previous phylogenetic studies have shown that all the Flavobacteria from Monophlebidae belong to the same clade and suggest that they have cospeciated with their insect hosts in this family (Rosenblueth et al. 2012). That is why we propose the species name to be *monophebidarum*: mo.no.phle.bi.da'rum N.L. fem. pl. n. Monophlebidae, a zoological family name; N.L. gen. pl. n. *monophebidarum*, of Monophlebidae. Further analyses should be done to determine whether other Flavobacteria that have been previously obtained from insects of the family Coccidae and Lecanodiaspididae whose 16S rRNA sequences are phylogenetically related to *Walczuchella monophebidarum* (Rosenblueth et al. 2012) could belong to the same species (fig. 3a).

General Genomic Features

The genome of *W. monophebidarum* of *L. axin axin* consists of a circular chromosome of 309,299 bp with an average G + C content of 32.6% and a coding density of 86.2%. It encodes 33 tRNAs corresponding to 20 aminoacids, a single rRNA operon and one tmRNA. There were identified 271 protein-coding sequences (CDSs), 8 of which were classified as hypothetical proteins and the rest had assigned putative biological functions. Twenty-seven CDSs were classified as pseudogenes because of the presence of frameshifts, early stop codons, or because the encoded protein had less than 50% of the length of its closest ortholog in the databases. It is important to note that some of the pseudogenes with frameshifts in homopolymeric tracts may still conserve functionality (Tamas et al. 2008; Wernegreen et al. 2010).

Metabolic Reconstruction of the Flavobacterial Endosymbiont Genome

In figure 4, a reconstruction of *W. monophebidarum* metabolism is shown. Most genes are involved in protein and amino acids synthesis and RNA processing. *W. monophebidarum* has a minimal set of genes for genome replication,

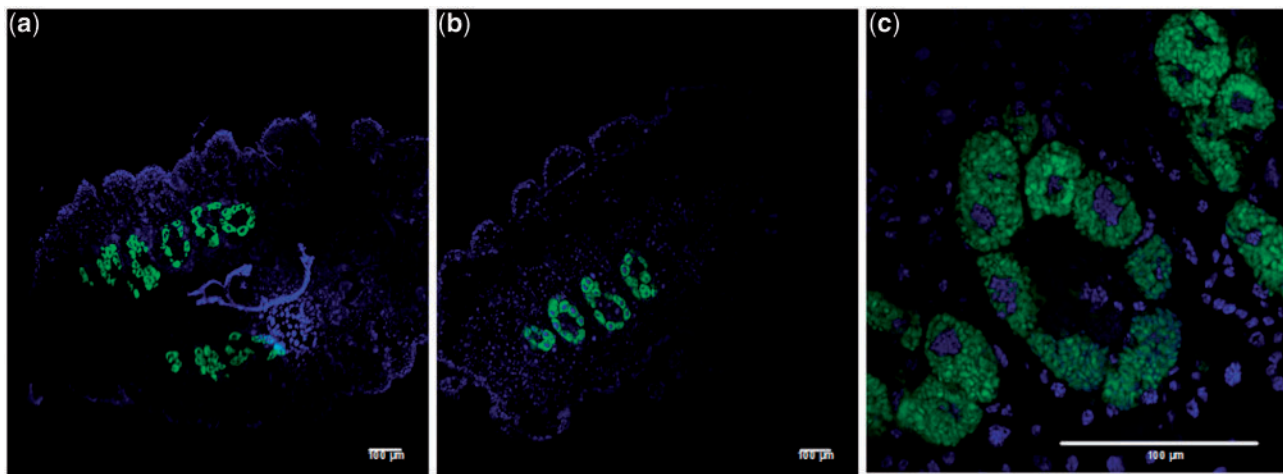


FIG. 2.—Localization of *Walczuchella monophebidae* (green) by fluorescent in situ hybridization in 20-day-old nymphs of *Llaveia axin axin*. (a) Dorsal tissue sections of the whole body showing the pair of large lobed bacteriomes where flavobacteria reside, (b) sagittal tissue section of the whole body showing one lobed bacteriome, (c) enlarged image of a bacteriome lobe.

transcription, and translation. The replication related genes code for DNA polymerase III subunits (α/ϵ , β , γ/τ , δ , and δ') and DNA gyrase. For transcription, the RNA polymerase core subunits (α , β , and β') are present along with their associated $\sigma 70$ and $\sigma 54$ factors. For translation, the complete set of ribosomal proteins is retained along with the three ribosomal RNAs and translation initiation factors (I, II, and III), elongation factors (G, P, Tu, and Ts), and peptide chain release factors (1 and 2).

Almost all of the genes necessary to synthesize the ten essential amino acids are present; however, some of them are annotated as pseudogenes and seven are absent. Biosynthetic pathways for methionine, threonine, tryptophan, and arginine are complete; however, some genes encoding intermediate enzymes in the pathways are annotated as pseudogenes and might not be functional. Pathways for biosynthesis of phenylalanine, histidine, lysine, and branch-chained amino acids are incomplete.

The tRNA synthetases for methionine, asparagine, alanine, and aspartate are missing.

A complete gene set encoding the twin-arginine translocation system (*tatABC*) is present. Genes for an additional protein translocation system were also found. These correspond to the Sec system, which is formed by the *secYEG* operon that encodes a protein conducting channel embedded in the membrane and *secA* that encodes an ATPase that drives translocation. All genes are present except *secG* and spread over the genome not in operons. The gene encoding the auxiliary protein YidC for the biogenesis of both translocation systems is present.

Four subunits of the FOF1 ATP synthase are encoded in the genome. Nonetheless *atpABG* are annotated as pseudogenes and only *atpF* seems to be conserved. However, the

flavobacterial genome encodes electron transport proteins: a NADH dehydrogenase, a *cbb3*-type cytochrome c oxidase complex, and two cytochrome c family proteins, which the flavobacterium can use to produce ATP.

The only genes related to vitamin and cofactor biosynthesis in the genome are *ispB*, *menA*, and *menB* from the menaquinone biosynthetic pathway.

Most of the glycolytic pathway and the TCA cycle are lost except for the pathway converting 2-oxoglutarate to succinate.

As in other insect endosymbionts with reduced genomes, *W. monophebidae* lacks genes related to cell envelope biogenesis (fatty acids, phospholipids, and peptidoglycan), DNA recombination, cell motility, defense response, and transporters (McCutcheon and Moran 2012).

The reduced genetic repertoire of the *W. monophebidae* genome suggests that it depends on its host or on the secondary symbiont to complement its metabolic and cellular processes.

Comparative Genomics between Flavobacterial Endosymbionts

Walczuchella monophebidae from *L. axin axin* shares 85.6% average genomic nucleotide identity with *U. diaspidicola*, 86.8% with *Blattabacterium* sp. BPLAN, and 87.9% with *S. muelleri* CARI, which are the closest bacterial relatives with a sequenced genome. Some characteristics of other highly reduced genomes from different insect endosymbionts are shown in table 1.

At the genetic level *W. monophebidae* shares 209 homologous genes with *U. diaspidicola*, 215 genes with *S. muelleri* and 250 with *Blattabacterium* sp. There is functional conservation between these flavobacterial symbionts but no

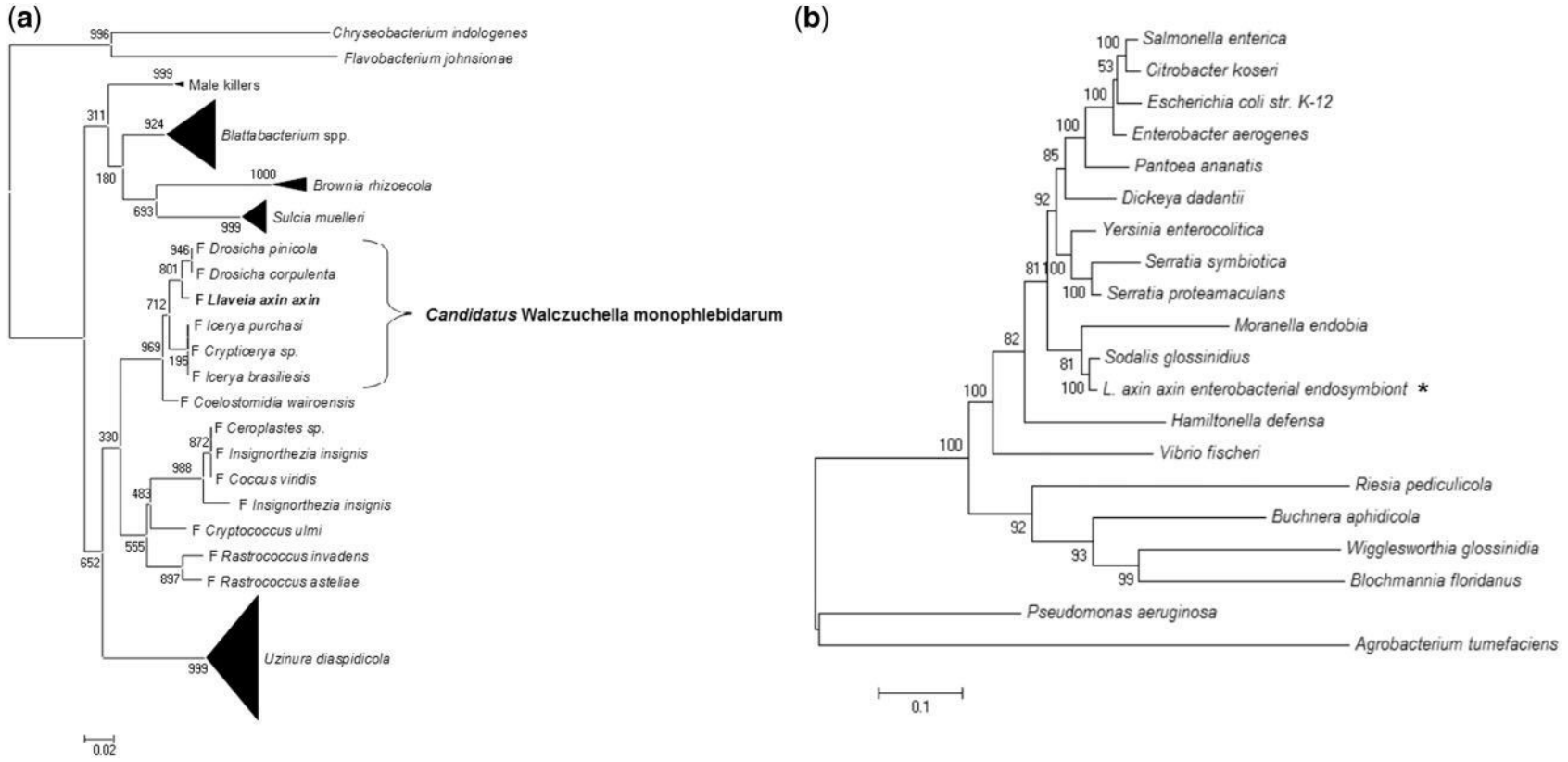


Fig. 3.—Evolutionary relationships of the flavobacterial and enterobacterial symbionts of *Llaveia axin axin*. (a) Phylogeny from flavobacterial endosymbionts inferred from sequences of the 16S rRNA gene. F indicates the flavobacterial endosymbiont of the respective insect. Sequences from free-living bacteria were used as outgroups. Bootstrap values for 1,000 replicates are shown adjacent to each node, (b) phylogeny from endosymbiotic and free-living enterobacteria inferred from the concatenated amino acid alignment of ten genes using the Maximum Likelihood method based on the Whelan And Goldman + Freq. model. Bootstrap values for 1,000 replicates are shown adjacent to each node. Asterisk indicates the location of the *Llaveia axin axin* enterobacterial symbiont in the tree.

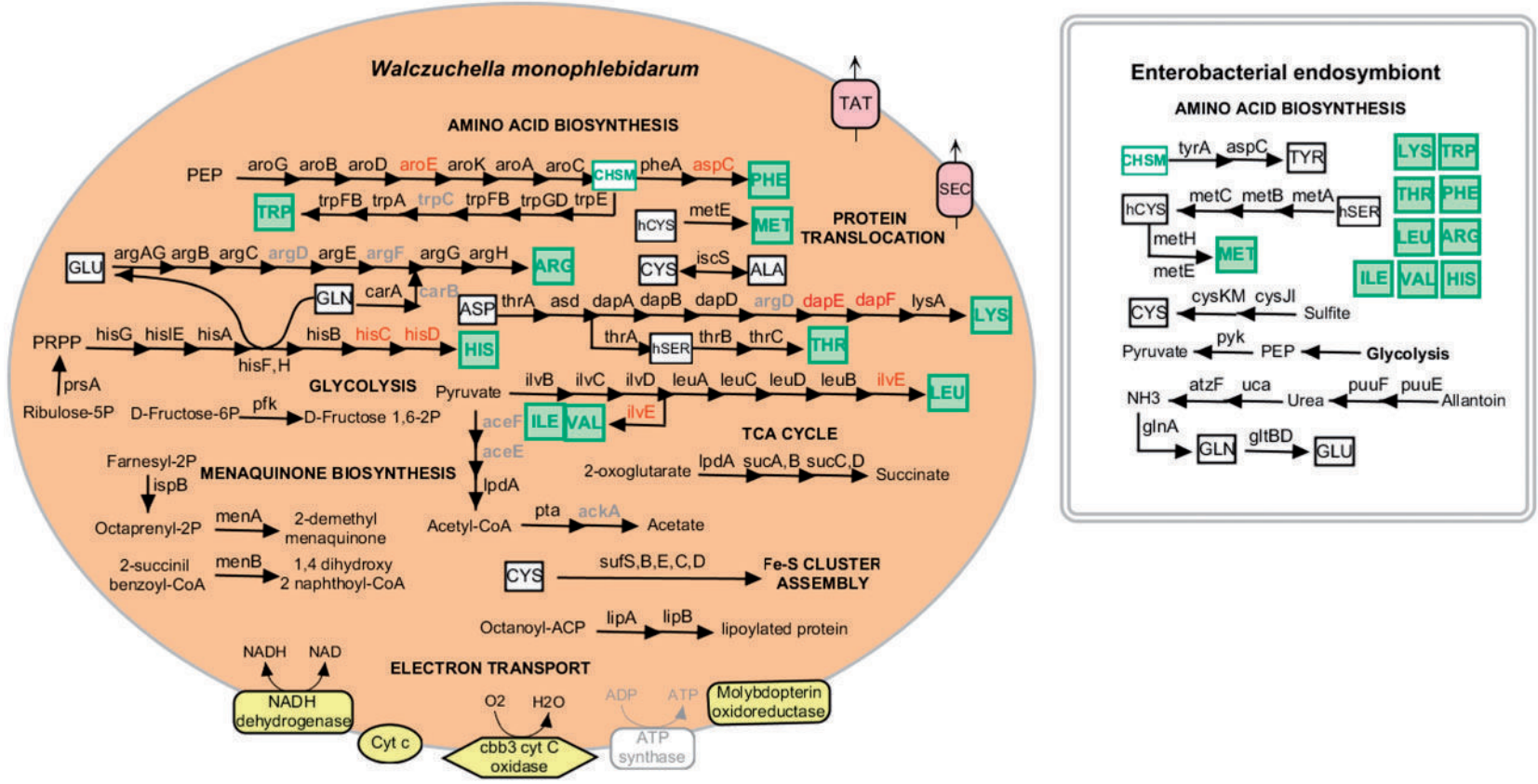


Fig. 4.—Left: A metabolic reconstruction of *Walczuchella monophlebidarum* of *Llaveia axin axin* based on its genetic content. Right: A representation of the enterobacterial symbiont capabilities for amino acid biosynthesis. Absent genes are shown in red. Pseudogenes are shown in light gray. Green boxes represent essential amino acids. White boxes represent nonessential amino acids.

Table 1

Characteristics of Highly Reduced Genomes from Different Insect Endosymbionts

Endosymbiont	Class	Host	Host Diet	Genome Size (bp) ^a	G + C%	CDSs	rRNAs	tRNAs	Pseudo-genes	Coding %
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Flavobacteria	Free living	—	2,861,988	33	2432	18	49	20	85.6
<i>Walczuchella monophebidarum</i>	Flavobacteria	Scale insects	Phloem sap	309,299	32.6	271	3	33	27	86.2
<i>Uzinura diaspidicola</i>	Flavobacteria	Scale insects	Parenchyma	263,431	30.2	227	3	30	7	89.3
<i>Blattabacterium</i> sp. MADAR	Flavobacteria	Termites	Wood	590,336	28	550	3	34	9	94.9
<i>Blattabacterium</i> sp. BPLAN	Flavobacteria	Cockroaches	Omnivorous	640,442	28	580	3	33	0	94.6
<i>Sulcia muelleri</i> CARI	Flavobacteria	Spittlebugs	Sap	276,511	21	246	3	29	0	93.2
<i>Buchnera aphidicola</i> APS	Gammaproteobacteria	Aphids	Sap	655,725	26	575	3	32	1	87.5
<i>Buchnera aphidicola</i> Cc	Gammaproteobacteria	Aphids	Sap	422,434	20.2	362	3	31	3	86.9
<i>Carsonella ruddii</i> PV	Gammaproteobacteria	Psyllids	Phloem sap	159,662	17	182	3	28	0	97.3
<i>Moranella endobia</i>	Gammaproteobacteria	Mealybugs	Sap	538,294	43.5	406	5	41	28	79
<i>Tremblaya princeps</i> PCIT	Betaproteobacteria	Mealybugs	Sap	138,927	59	121	6	12	2	72.5
<i>Zinderia insecticola</i> CARI	Betaproteobacteria	Spittlebugs	Sap	208,564	14	202	3	25	0	92.4
<i>Hodgkinia cicadicola</i> Dsem	Alphaproteobacteria	Cicadas	Sap	143,795	58	169	3	15	0	94

^aGenome size includes chromosome and plasmids if present.

significant genomic synteny. Nevertheless, it can be observed that there is more synteny disruption between *S. muelleri* or *Blattabacterium* sp. and *W. monophebidarum* than between *U. diaspidicola* and *W. monophebidarum* (fig. 5). The closer evolutionary relationship between these last two bacteria can be appreciated in the 16S rRNA gene phylogeny of different endosymbiotic Flavobacteria (fig. 3a) and has been observed in previously reported phylogenies (Gruwell et al. 2007; Gruwell et al. 2010; Rosenblueth et al. 2012). The core genome of the four endosymbionts corresponds to 157 genes. There are seven genes present in *U. diaspidicola*, *S. muelleri*, and *Blattabacterium* sp. but absent in *W. monophebidarum*. These genes encode for DNA mismatch repair protein MutL, replicative DNA helicase DnaB, methionyl-tRNA synthetase, two enzymes in the phenylalanine biosynthetic pathway AroE and AspC, malic enzymes MaeA/B, which catalyze the decarboxylation of malate to form pyruvate, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapA) required in glycolysis.

Some genes have been lost or pseudogenized in *W. monophebidarum* but conserved in *S. muelleri* and *U. diaspidicola*, even though these latter two species have more reduced genomes (table 2).

Table 3 shows some of the specific differences found in flavobacterial endosymbionts. This comparison showed that *U. diaspidicola* lost all the genes that other flavobacterial symbionts retained related to energy production, menaquinone biosynthesis and protein transport. On the other hand, *U. diaspidicola* has two genes related to vitamin metabolism not found in other flavobacterial symbionts, *folC* for folic acid metabolism and *thiL* for thiamine biosynthesis. Only *Blattabacterium* sp. retained the folate biosynthetic pathway.

In general, the set of amino acid biosynthetic genes of *W. monophebidarum* and *U. diaspidicola* is the same, with

the exception of two genes (*aspC* and *argF*) not found in *W. monophebidarum*. Both *W. monophebidarum* and *U. diaspidicola* lost *ilvE* which encodes the enzyme for the last step in the branched-chain amino acid biosynthesis pathway while *S. muelleri* and *Blattabacterium* sp. have this gene. Similarly, *S. muelleri* and *Blattabacterium* sp. have *dapF*, a gene from the lysine biosynthetic pathway that is absent in *W. monophebidarum* and *U. diaspidicola*.

Walczuchella monophebidarum, *U. diaspidicola*, and *Blattabacterium* sp. retained two sigma factors RpoD and RpoN which is unusual in insect endosymbiont genomes.

Only *Blattabacterium* sp. possesses the ability to synthesize the cell envelope components. The glycolytic pathway as well as the TCA cycle are essentially absent in *W. monophebidarum*, *U. diaspidicola*, and *S. muelleri*.

Amino Acid Biosynthesis Related Genes in the Enterobacterial Endosymbiont

From the 454 and Illumina sequences, a draft assembly of the enterobacterial endosymbiont genome was obtained consisting of 679 scaffolds with an N50 of 7,713 and an average G + C content of 55.6%. Lengths of scaffolds sum 3.4 Mb of sequence, and taking that as the genome size, we calculate a genome coverage of 34×. We searched for all the essential amino acid biosynthesis genes in the enterobacterial endosymbiont sequences and made a reconstruction of its amino acid biosynthetic pathways. The enterobacterial symbiont has the potential to synthesize the 10 essential amino acids. Only the *aspC* and *argC* genes were not found in the enterobacterial scaffolds. Different from *W. monophebidarum*, it retains the cobalamin-dependent methionine synthase to synthesize methionine from homocysteine and vitamin B2. The enterobacterial symbiont also has the capacity to synthesize

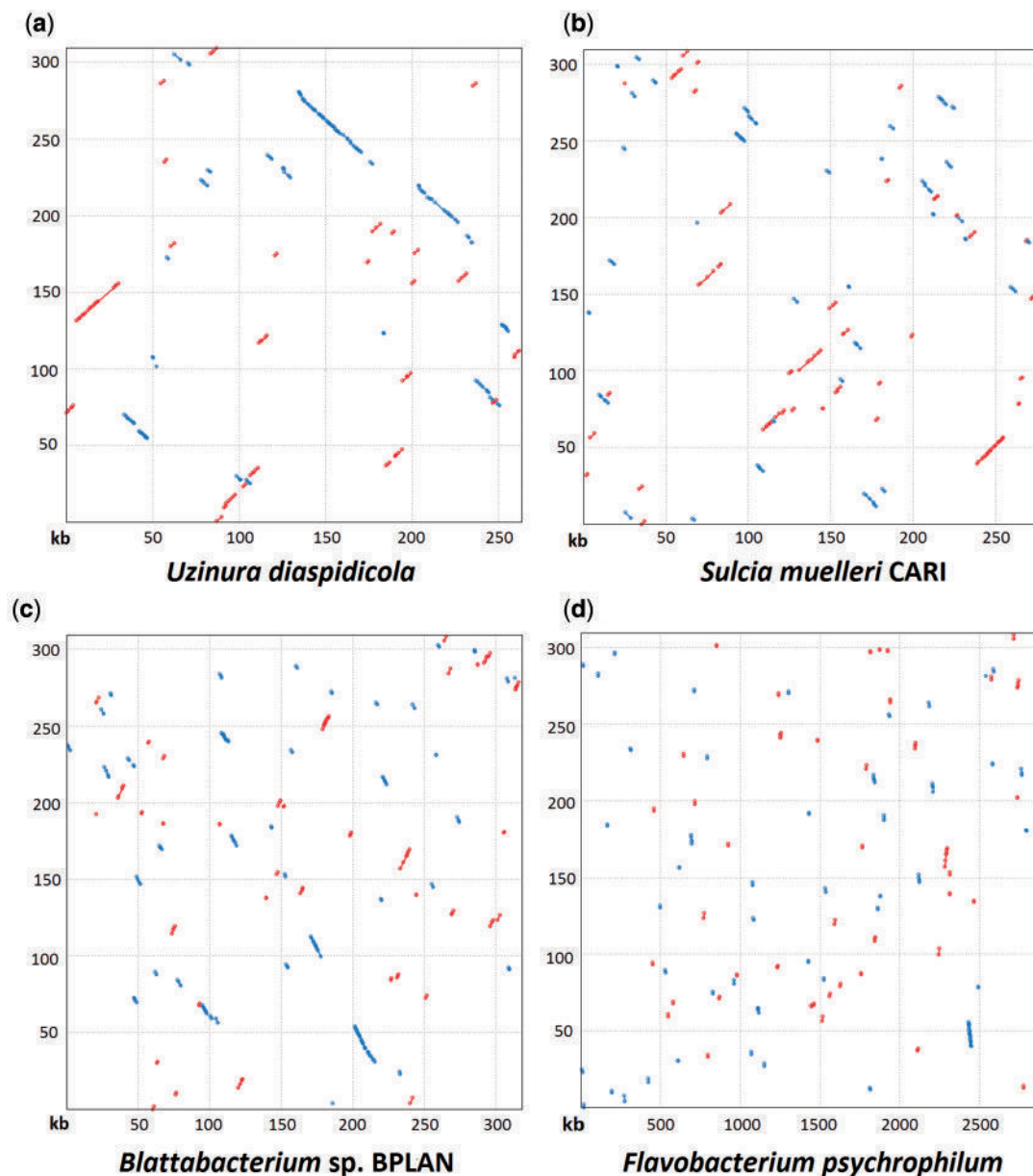


Fig. 5.—Genomic alignments of *Walczuchella monophebidae* of *Llaveia axin axin* (y axis) versus (A) *Uzinura diaspidicola* (B) *Sulcia muelleri* CARI, (C) *Blattabacterium* sp. BPLAN, and (D) *Flavobacterium psychrophilum*. Forward matches shown in red. Reverse matches shown in blue.

nonessential amino acids. It can produce tyrosine from chorismate and homocysteine from homoserine.

It is also capable of degrading allantoin to urea and then hydrolyzing it into CO₂ and ammonia, which can then be used for glutamine and glutamate production.

It is important to point out that most of the amino acid biosynthesis genes that were absent or pseudogenized in *W. monophebidae* genome were present in the enterobacterial symbiont genome.

The size of the enterobacterial symbiont genome is similar to free-living bacteria suggesting a recent change to a

symbiotic lifestyle, as in its close relative *Sodalis glossinidius* (Toh et al. 2006).

Discussion

The genetic content of *W. monophebidae* genome suggests a role in synthesizing essential amino acids for the host. According to its metabolic reconstruction, the flavobacterium needs to be provided with some precursors for the amino acid biosynthesis like PEP for phenylalanine and tryptophan production, ribulose-5P for histidine synthesis, pyruvate for

Table 2

Genes Retained in the *Sulcia muelleri* and *Uzinura diaspidicola* Genomes That Are Absent in the Genome of *Walczuchella monophlebidarum* of *Llaveia axin axin*

<i>S. muelleri</i> Genes	Related Function	<i>U. diaspidicola</i> Genes	Related Function
<i>aroE</i>	Chorismate biosynthesis	<i>aroE</i>	Chorismate biosynthesis
<i>aspC</i>	Phenylalanine biosynthesis	<i>aspC</i>	Phenylalanine biosynthesis
<i>aspS</i>	Aspartyl-tRNA biosynthesis	<i>dnaB</i>	Replication
<i>atpCDEH</i>	ATP synthase subunits	<i>eno</i>	Glycolysis
<i>dapF</i>	Lysine biosynthesis pathway	<i>folC</i>	Folic acid metabolism
<i>dnaB</i>	Replication	<i>gapA</i>	Glycolysis
<i>fabF</i>	Fatty acids biosynthesis	<i>glgA</i>	Glycogen biosynthesis
<i>fbaA</i>	Glycolysis	<i>maeB</i>	Malate metabolism
<i>gapA</i>	Glycolysis	<i>metG</i>	Methionyl-tRNA biosynthesis
<i>ilvE</i>	val, leu, ile biosynthesis	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair
<i>maeA</i>	Malate metabolism	<i>pgk</i>	Glycolysis
<i>marC</i>	Integral membrane protein	<i>queA</i>	RNA modification
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair	<i>rpe</i>	Pentose degradation
<i>putA</i>	Transcription regulator	<i>sodA</i>	Oxidative stress response
<i>ubiE</i>	Menaquinone biosynthesis	<i>thiL</i>	Thiamine biosynthesis
<i>yaeT</i>	Outer membrane assembly	<i>tktC</i>	Pentose catabolism
primase	Replication	<i>tktN</i>	Pentose catabolism
M42 family metalloprotease	Metalloprotease	<i>trxA</i>	Electron transfer
<i>tal</i>	Transaldolase	Ribokinase	Ribose catabolism
Mrp/Nbp35 ATP-binding protein	ATP-binding	CMP_dCMP deaminase	Deaminase
Signal peptidase	Signal peptidase		
Methyltransferase	Methyltransferase		

branched-chain amino acid production, and some non-essential amino acids for arginine, methionine, lysine, and threonine synthesis (fig. 4).

The enterobacterial symbiont could be supplying most of these precursors as it has the potential to make ribulose-5P from ribose-1P and also PEP and pyruvate from glycolysis. It is also capable of producing homocysteine from homoserine for methionine biosynthesis.

Interestingly, the enterobacterial symbiont could recycle the waste nitrogen from the insect in the form of allantoin to provide precursors for amino acid biosynthesis. Nitrogen recycling potential has also been reported in *Blattabacterium* sp. but through a different pathway. It is possible that *W. monophlebidarum* could assimilate distinct nitrogen products as it retains RpoN, a nitrogen-related gene regulator.

The metabolic precursor production by the enterobacterial symbiont suggests metabolic complementarities between the two endosymbionts. However, their genetic content for essential amino acid biosynthesis overlaps. This might mean that 1) both endosymbionts supply the insect host with essential amino acids or that 2) because of the loss and degradation of many essential genes for viability and amino acid biosynthesis in *W. monophlebidarum*, it has become incapable of fulfilling its role in the symbiotic relationship with the insect, and the enterobacterial symbiont now fulfills the flavobacterium's former functions.

As with *Sodalis glossinidius* and *Wigglesworthia glossinidia* (Snyder et al. 2010), the primary endosymbiont may have the capacity to produce a nutrient that the secondary symbiont needs and is not capable of producing, in this case thiamine. This could lead to the stable coexistence of both endosymbionts.

Walczuchella monophlebidarum and *U. diaspidicola* have essentially the same genetic potential for amino acid biosynthesis, the main difference being the presence of frameshifts in some genes of these pathways of *W. monophlebidarum*. *Sulcia muelleri* differs from them because it has a secondary symbiont capable of synthesizing methionine and histidine, capabilities that have been lost in *S. muelleri*.

Perhaps the more degraded state of metabolic pathways of *W. monophlebidarum* in comparison with those of *U. diaspidicola*, which has a similar host and environment, can be explained by the presence of the enterobacterial symbiont in *L. axin axin*, as this reduces the selection forces on the flavobacterium genes. On the other hand, it is interesting how *S. muelleri*, with a similar life style in an insect host with a similar diet and also accompanied by a secondary endosymbiont as in the case of the *L. axin axin* flavobacterium, has maintained amino acid biosynthetic pathway's integrity.

The high number of pseudogenes in the *W. monophlebidarum* genome compared with other reduced genomes suggests that it is still under a genomic reduction process. Despite

Table 3

Comparison of Metabolic Components Differentially Conserved between Flavobacterial Endosymbionts

	<i>Walzuchella monophlebidarum</i>	<i>Uzinura diaspidicola</i>	<i>Sulcia muelleri</i>	<i>Blattabacterium</i> sp. BPLAN
Energy production				
ATP synthase	Few subunits	Absent	Present	Present
Cytochrome C	Present	Absent	Present	Present
Cbb3-type cyt C oxydase	Present	Absent	Present	Present
NADH dehydrogenase	Present	Absent	Present	Present
Amino acid biosynthesis				
<i>ilvE</i>	Absent	Absent	Present	Present
<i>dapF</i>	Absent	Absent	Present	Present
His biosynthesis	Present	Present	Absent	Present
<i>metE</i>	Present	Present	Absent	Present
<i>aspC</i>	Absent	Present	Present	Present
<i>argF</i>	Absent	Present	Present	Present
Vitamins and cofactors				
Menaquinone biosynthesis	Incomplete	Absent	Incomplete	Incomplete
<i>folC</i>	Absent	Present	Absent	Present
<i>thiL</i>	Absent	Present	Absent	Absent
Protein transport				
Sec system	Present	Absent	Present	Present
Tat system	Present	Absent	Present	Present
Replication and transcription				
<i>dnaE</i>	Present	Present	Present	Present
<i>dnaQ</i>	Present	Absent	Present	Present
<i>dnaN</i>	Present	Absent	Present	Present
<i>dnaX</i>	Present	Absent	Absent	Present
<i>rpoD</i>	Present	Present	Present	Present
<i>rpoN</i>	Present	Present	Absent	Present
Cell envelope				
Fatty acid biosynthesis	Absent	Absent	Only <i>fabF</i>	Present
Phospholipids	Absent	Absent	Absent	Present
Peptidoglycans	Absent	Absent	Absent	Present
Carbohydrate metabolism				
Glycolysis	Incomplete	Incomplete	Incomplete	Present
TCA cycle	Incomplete	Incomplete	Incomplete	Present

the lack of genomic synteny observed in the flavobacteria of sap-feeding insects, they have a similar genome size and a significant functional convergence.

Supplementary Material

Supplementary table S1 is available at *Genome Biology and Evolution* online (<http://www.gbe.oxfordjournals.org>).

Acknowledgments

The authors thank Yu Matsuura and Shamayim T. Ramírez-Puebla for technical assistance in FISH, Rafael Díaz for

technical assistance in PFGE, and Michael Dunn for reading the manuscript. T.P.-P. was supported during the PhD Program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico). Financial support was from CONACyT (154453).

Literature Cited

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control*. 19:716–723.
- Ben-Dov Y. 2005. A systematic catalogue of the scale insect family Margarodidae (Hemiptera: Coccoidea) of the world. Wimborne (UK): Intercept Ltd.

- de Sousa Araújo TA, de Almeida e Castro VT, de Amorim EL, de Albuquerque UP. 2012. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. *Pharm Biol.* 50: 754–759.
- Dhami MK, Turner AP, Deines P, Beggs JR, Taylor MW. 2012. Ultrastructural and molecular characterization of a bacterial symbiosis in the ecologically important scale insect family Coelostomidiidae. *FEMS Microbiol Ecol.* 81:537–546.
- Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8:195–202.
- Gruwell ME, Hardy NB, Gullan PJ, Dittmar K. 2010. Evolutionary relationships among primary endosymbionts of the mealybug subfamily Phenacoccinae (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Appl Environ Microbiol.* 76:7521–7525.
- Gruwell ME, Morse GE, Normark BB. 2007. Phylogenetic congruence of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) and their primary endosymbionts from the phylum Bacteroidetes. *Mol Phylogenet Evol.* 44: 267–280.
- Guindon S, et al. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 59:307–321.
- Gullan PJ, Cook LG. 2007. Phylogeny and higher classification of the scale insects (Hemiptera: Stenorrhyncha: Coccoidea). *Zootaxa* 1668: 413–425.
- Hodgson CJ, Foldi I. 2006. A review of the Margarodidae *sensu* Morrison (Hemiptera: Coccoidea) and some related taxa based on the morphology of adult males. *Zootaxa* 1263:3–250.
- Huang CY, Sabree ZL, Moran NA. 2012. Genome sequence of *Blattabacterium* sp. strain BGIGA, endosymbiont of the *Blaberus giganteus* cockroach. *J Bacteriol.* 194:4450–4451.
- Islam AKMA, Yaakob Z, Anuar N. 2011. *Jatropha*: A multipurpose plant with considerable potential for the tropics. *Sci Res Essays.* 6: 2597–2605.
- Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T. 2009. Quenching autofluorescence of insect tissues for in situ detection of endosymbionts. *Appl Entomol Zool.* 44:281–291.
- Kurtz S, et al. 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 5:R12.
- López-Sánchez MJ, et al. 2009. Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica*. *PLoS Genet.* 5:e1000721.
- MacVean CM. 1999. Laca artesanal producto del insecto nijj. *Revista Galería Guatemala* (Guatemala, Fundación G&T)2:90–93.
- Martínez FM. 2006. La laca de los Achies. Artículo de semanario de prensa libre. [cited 2014 Mar 17]. Available from: <http://servicios.prensalibre.com/pl/domingo/archivo/revistad/2006/marzo06/190306/dfondo.shtml>; 89:18–21.
- Matsuura Y, et al. 2009. Huge symbiotic organs in giant scale insects of the genus *Drosicha* (Coccoidea: Monophlebididae) harbor flavobacterial and enterobacterial endosymbionts. *Zoolog Sci.* 26: 448–456.
- McCutcheon JP, Moran NA. 2007. Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19392–19397.
- McCutcheon JP, Moran NA. 2010. Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts spanning 200 My of evolution. *Genome Biol Evol.* 2:708–718.
- McCutcheon JP, Moran NA. 2012. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 10:13–26.
- McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NA. 2009. Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:15394–15399.
- Moran NA. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:8627–8633.
- Moya A, Peretó J, Gil R, Latorre A. 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet.* 9: 218–229.
- Neef A, et al. 2011. Genome economization in the endosymbiont of the wood roach *Cryptocercus punctulatus* due to drastic loss of amino acid synthesis capabilities. *Genome Biol Evol.* 3:1437–1448.
- Pati A, et al. 2010. GenePRIMP: a gene prediction improvement pipeline for prokaryotic genomes. *Nat Methods.* 7:455–457.
- Patiño-Navarrete R, Moya A, Latorre A, Peretó J. 2013. Comparative genomics of *Blattabacterium cuenoti*: the frozen legacy of an ancient endosymbiont genome. *Genome Biol Evol.* 5:351–361.
- Posada D, Crandall KA. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol.* 50:580–601.
- Rincón-Rosales R, Gutiérrez-Miceli FA. 2008. Biological characteristics of *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose in natural habitat and assessment of its bark potential in Chiapas, Mexico. *Agrociencia* 42: 129–137.
- Rosenblueth M, Sayavedra L, Sámano-Sánchez H, Roth A, Martínez-Romero E. 2012. Evolutionary relationships of flavobacterial and enterobacterial endosymbionts with their scale insect hosts (Hemiptera: Coccoidea). *J Evol Biol.* 25:2357–2368.
- Sabree ZL, Huang CY, Okusu A, Moran NA, Normark BB. 2012. The nutrient supplying capabilities of *Uzinura*, an endosymbiont of armored scale insects. *Environ Microbiol.* 15:1988–1999.
- Sabree ZL, Kambhampati S, Moran NA. 2009. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:19521–19526.
- Sabree ZL, et al. 2012. Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Appl Environ Microbiol.* 78:204–210.
- Sandström J, Moran N. 1999. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomol Exp Appl.* 91:203–210.
- Snyder AK, Deberry JW, Runyen-Janecky L, Rio RV. 2010. Nutrient provisioning facilitates homeostasis between tsetse fly (Diptera: Glossinidae) symbionts. *Proc Biol Sci.* 277:2389–2397.
- Suazo-Ortuño I, del Val-De Gortari E, Benítez-Malvido J. 2013. Rediscovering an extraordinary vanishing bug: *Llaveia axin axin*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:338–346.
- Tamas I, et al. 2008. Endosymbiont gene functions impaired and rescued by polymerase infidelity at poly (A) tracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:14934–14939.
- Tamura K, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731–2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Toh H, et al. 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* 16:149–156.
- Tokuda G, et al. 2013. Maintenance of essential amino acid synthesis pathways in the *Blattabacterium cuenoti* symbiont of a wood-feeding cockroach. *Biol Lett.* 9:20121153.
- Tremblay E. 1989. Coccoidea endocytobiosis. In: Schwemmler W, Gassner G, editors. *Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics, evolution*. Boca Raton (FL): CRC Press. p. 145–173.
- Walczuch A. 1932. Studien an Coccidensymbionten. *Z Morphol Ökol Tiere* 25:623–729.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173:697–703.
- Wernegreen JJ, Kauppinen SN, Degnan PH. 2010. Slip into something more functional: selection maintains ancient frameshifts in homopolymeric sequences. *Mol Biol Evol.* 27:833–839.

- Wernegreen JJ, Wheeler DE. 2009. Remaining flexible in old alliances: functional plasticity in constrained mutualisms. *DNA Cell Biol.* 28: 371–381.
- Werren JH. 2012. Symbionts provide pesticide detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:8364–8365.
- Williams M, MacVean CM. 1995. Ethnococoidology: use of the giant margarodids, *Llaveia* spp. (Homoptera: Coccoidea: Margarodidae), by indigenous peoples of Mesoamerica in their culture, medicine and arts. *Israel J Entomol.* 29:147–148.
- Woyke T, et al. 2010. One bacterial cell, one complete genome. *PLoS One* 5:e10314.
- Wu D, et al. 2006. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* 4:e188.
- Zafar N, Mazumder R, Seto D. 2002. CoreGenes: a computational tool for identifying and cataloging “core” genes in a set of small genomes. *BMC Bioinformatics* 3:12.
- Zchori-Fein E, Ben-Dov Y, Portnoy V, Katzir N. 2005. Distribution of the endosymbiont *Cardinium hertigii* in scale insects (Hemiptera: Coccoidea). In: Erkölc LB, Kaydan MB, editors. in Proceedings of the Tenth International Symposium on Scale Insect Studies; 2004 April 19–23. Adana, Turkey. Ankara (Turkey): Scientific and Technical Research Council of Turkey. p. 101–116.
- Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821–829.

Associate editor: John McCutcheon

6.4 Resultados adicionales

6.4.1 Genoma parcial de la enterobacteria endosimbionte

El ensamble de las secuencias de la enterobacteria endosimbionte resultó en 679 scaffolds con un N50 de 7713. Los scaffolds suman 3.41 Mb de secuencia y tienen un rango de tamaño de entre 223 y 27000 pb.

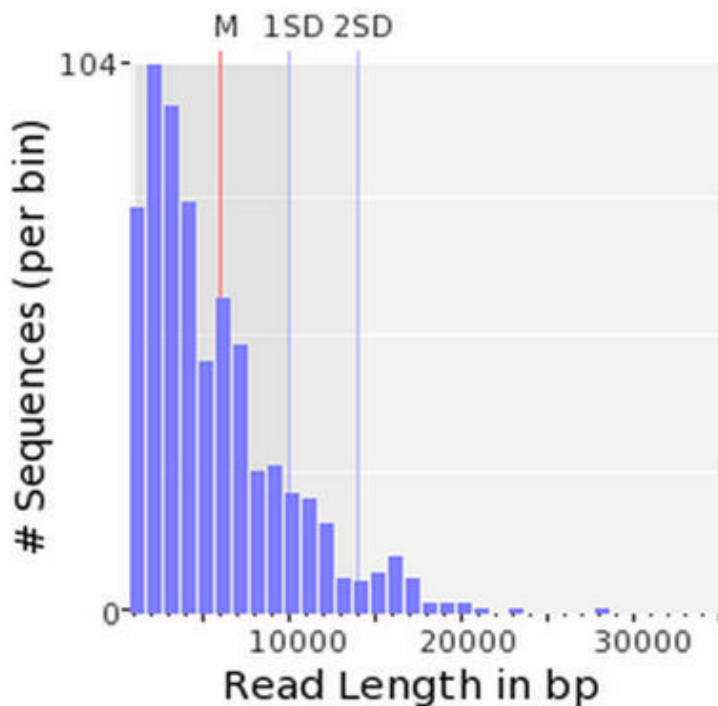


Fig. 7. Distribución del tamaño de los scaffolds del genoma de la enterobacteria.

El genoma parcial de la enterobacteria tiene un contenido de G+C promedio de 55.4%.

Se identificaron 3067 genes a los cuales se les asignó una anotación funcional.

La diversidad funcional de los genes de la enterobacteria es mucho más alta comparada con la de la flavobacteria y sus características genómicas son parecidas a las de bacterias de vida libre.

Las funciones más representadas en su genoma corresponden a procesos catabólicos, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos, transcripción, metabolismo de DNA, traducción y respuesta a estrés.

Distribución funcional de los genes de la enterobacteria

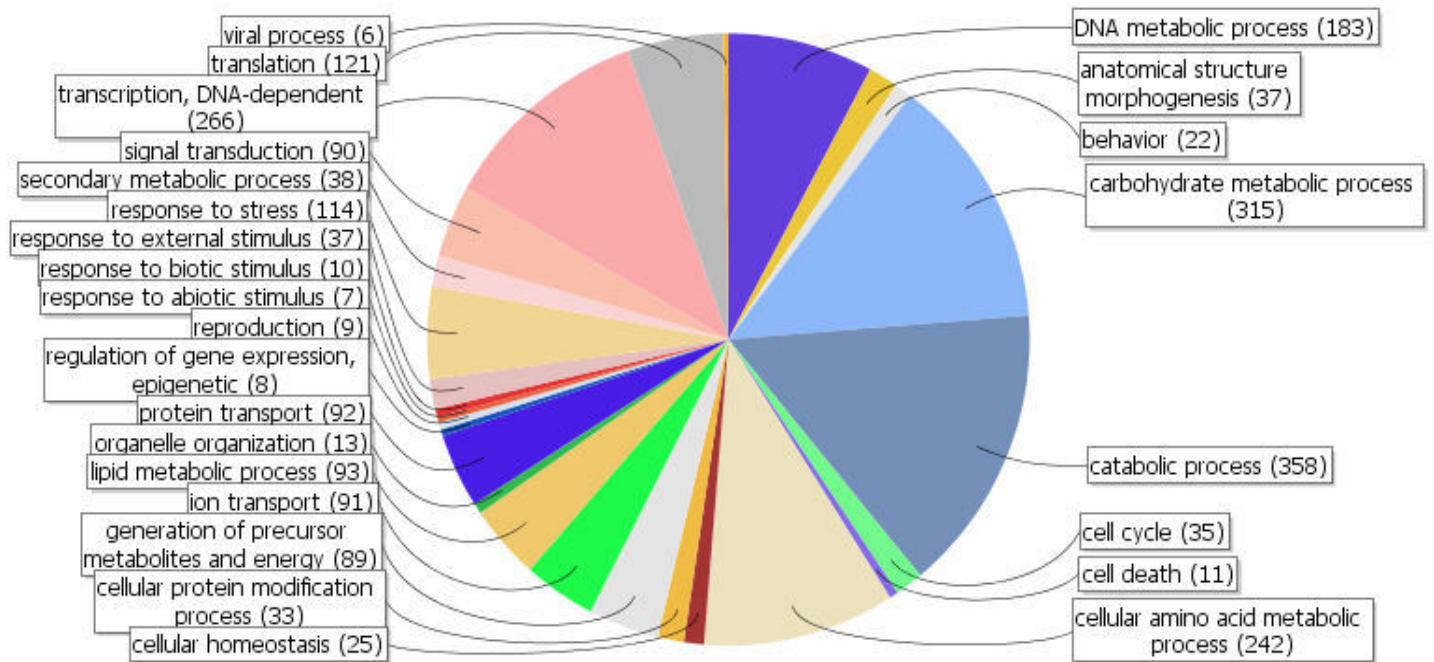


Fig. 8. Gráfica de pastel mostrando el número de genes de la enterobacteria relacionados a cada categoría funcional con base en la clasificación de GO.

6.4.2 Caracterización fisiológica de los tejidos simbióticos

La organización básica del sistema reproductor femenino de los insectos de la familia Monophlebidae consiste de dos ovarios, cada uno con un oviducto lateral pegado a un pequeño oviducto común. Este oviducto se encuentra adjunto a la vagina.

Hemos observado que en la etapa temprana de adultez, las hembras tienen un bacterioma grande y rosado que ocupa una gran proporción de la zona abdominal y ovarios delgados en la parte central del abdomen. Cuando la hembra alcanza la etapa tardía de adultez, el bacterioma comienza a desaparecer gradualmente y los ovarios crecen y comienzan a desarrollar huevecillos.

Hasta ahora conocemos la presencia de las bacterias endosimbiontes en el bacterioma y se confirmó también su presencia en los ovarios y en los huevecillos a través de PCR

con cebadores específicos. Existe la posibilidad de que las bacterias endosimbiontes sean transferidas desde el bacterioma por los ovarios hasta los huevecillos. Pensamos que debe haber moléculas importantes regulando la colonización y migración bacteriana en ambos tejidos por lo que nos interesa comparar los genes expresados en el bacterioma y los ovarios antes y después de la migración bacteriana para buscar los posibles mecanismos controlando estos procesos.

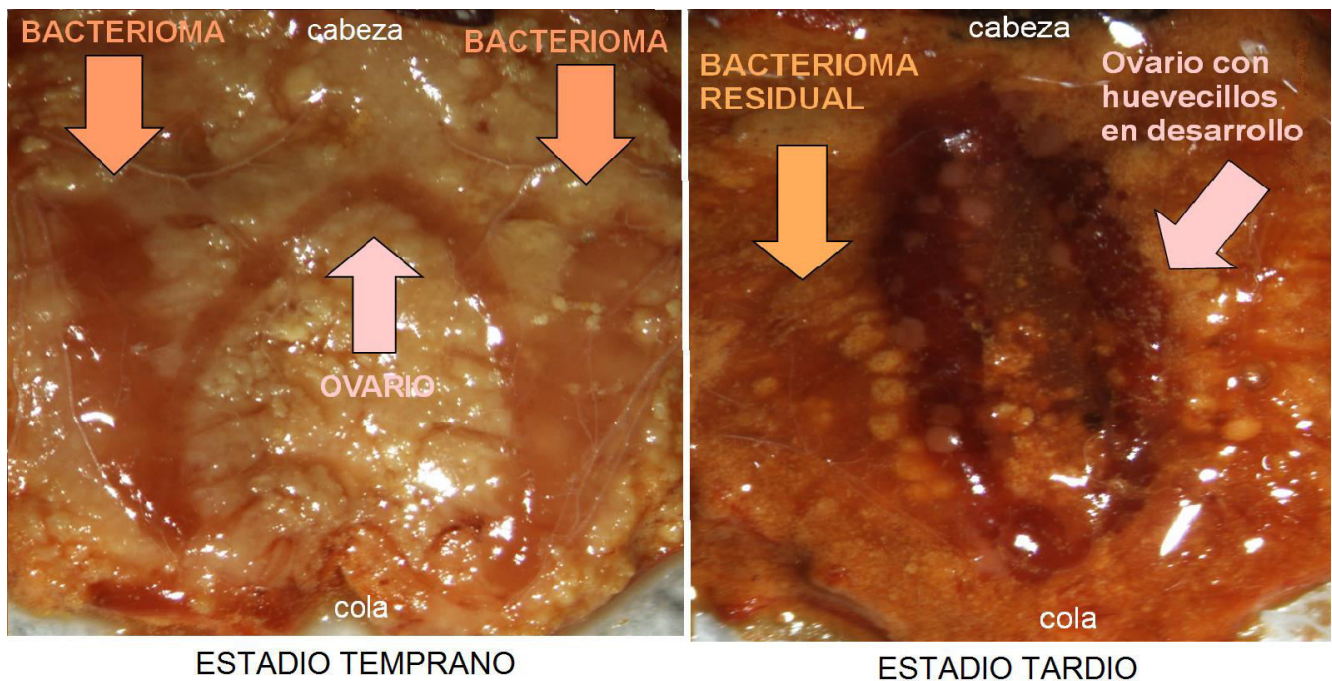


Fig. 9. Fisiología del bacterioma y los ovarios de hembras de *L. axin axin* en estadios de adulto temprano y adulto tardío.

6.4.3 Transcriptómica del bacterioma y ovarios de *L. axin axin*

La secuenciación de las muestras de RNA del bacterioma y ovarios resultó en 11,042,037 y 11,042,428 lecturas respectivamente.

Los resultados del mapeo de los transcritos a los genomas de referencia se muestran en la tabla siguiente:

Genoma de referencia	Lecturas mapeadas de bacterioma	Lecturas mapeadas de ovarios
<i>Drosophila melanogaster</i> (exones)	2, 019, 585	2, 008, 381
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (mRNA refseq)	3, 082, 319	2, 912, 207
Flavobacteria de <i>L. axin axin</i>	1, 052, 077	87, 502
Enterobacteria de <i>L. axin axin</i>	409, 128	483, 601

Los resultados del análisis estadístico de expresión diferencial se muestran en la tabla siguiente, presentando por cada genoma de referencia el número de genes expresados diferencialmente entre bacterioma y ovarios de acuerdo a la prueba de Kal con $p < 0.01$:

Genoma de referencia	Bacterioma	Ovarios
<i>Drosophila melanogaster</i> (exones)	494 genes	680 genes
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (mRNA refseq)	244 genes	280 genes
Flavobacteria de <i>L. axin axin</i>	2 genes	89 genes
Enterobacteria de <i>L. axin axin</i>	66 genes	50 genes

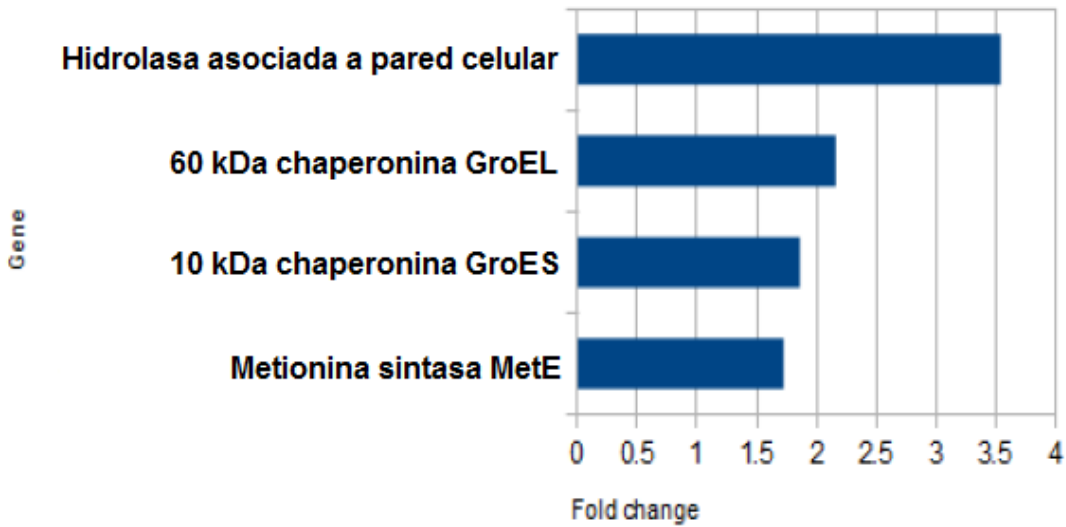
Expresión de genes de la flavobacteria

En la flavobacteria endosimbionte, para el bacterioma solo dos genes cumplen los parámetros de expresión diferencial, una hidrolasa putativa y la chaperona GroEL. Los demás genes registran un cambio en expresión menor a 2 veces comparando contra los ovarios, que va desde 1.86 a 1.09 veces. Estos genes están relacionados con síntesis de arginina, corismato, treonina, metionina y aminoácidos de cadena ramificada. La chaperonina GroES se encuentra casi en el límite de expresión diferencial (1.86 veces).

Para los ovarios se encontró expresión diferencial de genes de varias subunidades de la ATP sintasa (algunas de ellas anotadas como pseudogenes) y de la citocromo c oxidasa, también varios genes de sistemas de traslocación de proteínas y de síntesis de triptofano, histidina y corismato, un gen de estrés oxidativo y un gen que codifica un posible componente de un transportador ABC.

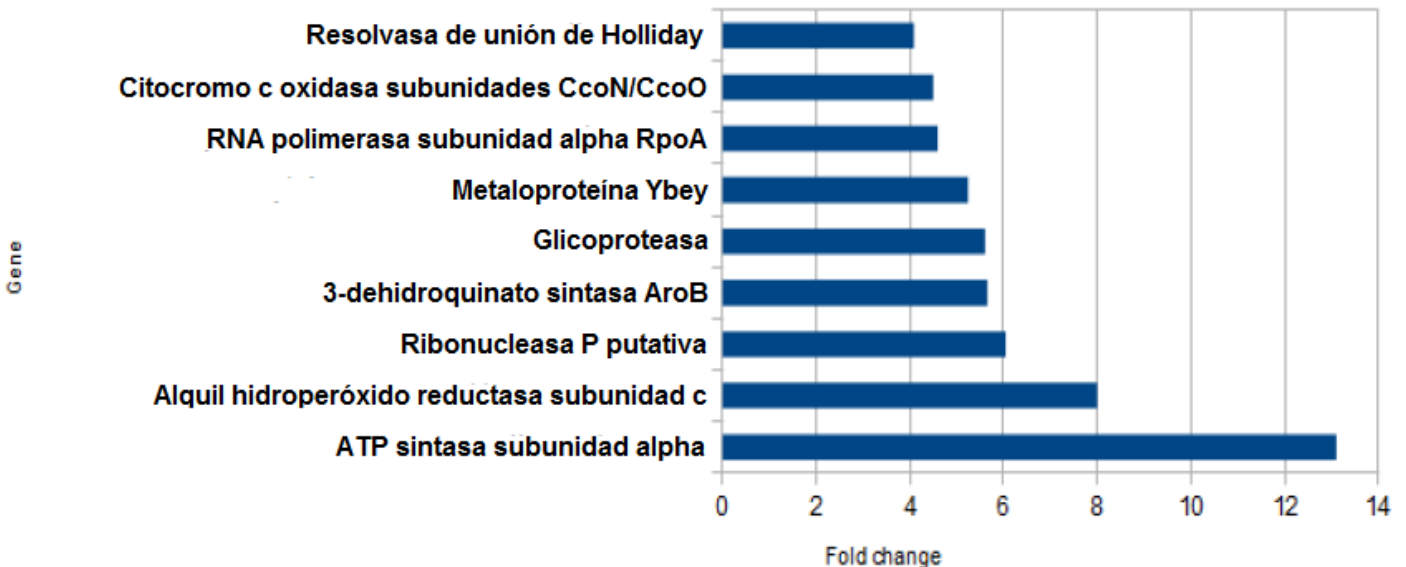
Genes con mayor expresión diferencial en bacterioma

Flavobacteria



Genes con mayor expresión diferencial en ovarios

Flavobacteria

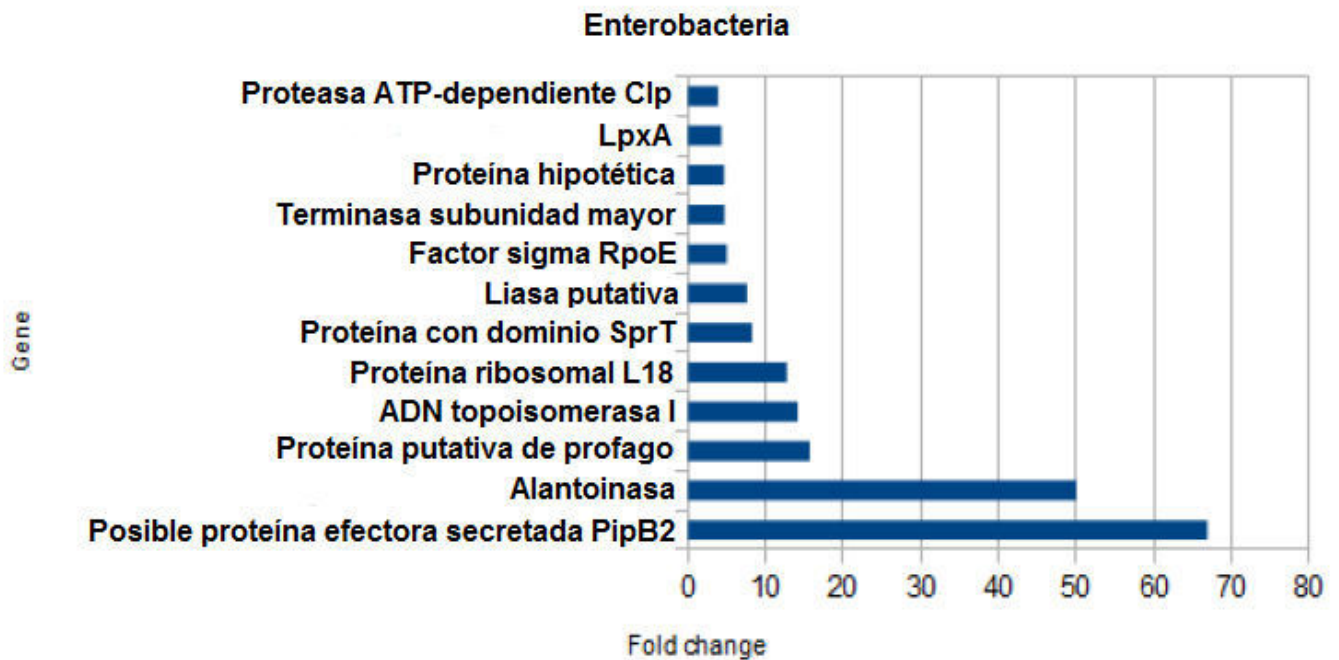


Expresión de genes de la enterobacteria

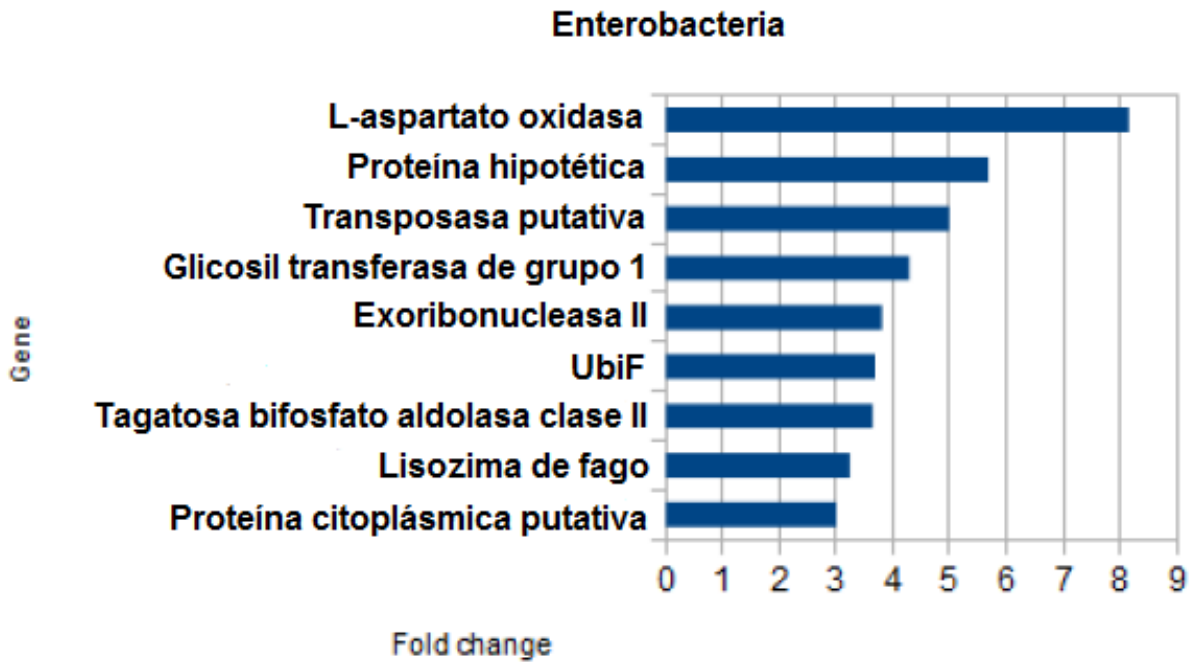
En el bacterioma, la enterobacteria presenta sobre expresión muy marcada de un gen que codifica una proteína efectora posiblemente secretada por el sistema de secreción tipo III, expresada 66.8 veces más. También se sobre expresa marcadamente el gen de una alantoinasa, proteína relacionada con la degradación de urea, con una expresión aumentada 50 veces. Otros genes sobre expresados en bacterioma son 4 transportadores ABC, una peroxidasa, la hemo sintetasa, dos genes de biosíntesis de nucleótidos, dos genes de biosíntesis de lípido A y dos genes del aparato de secreción tipo III.

En el ovario los genes sobre expresados están relacionados con síntesis de NAD, metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés, un par de transportadores y reguladores transcripcionales.

Genes con mayor expresión diferencial en bacterioma



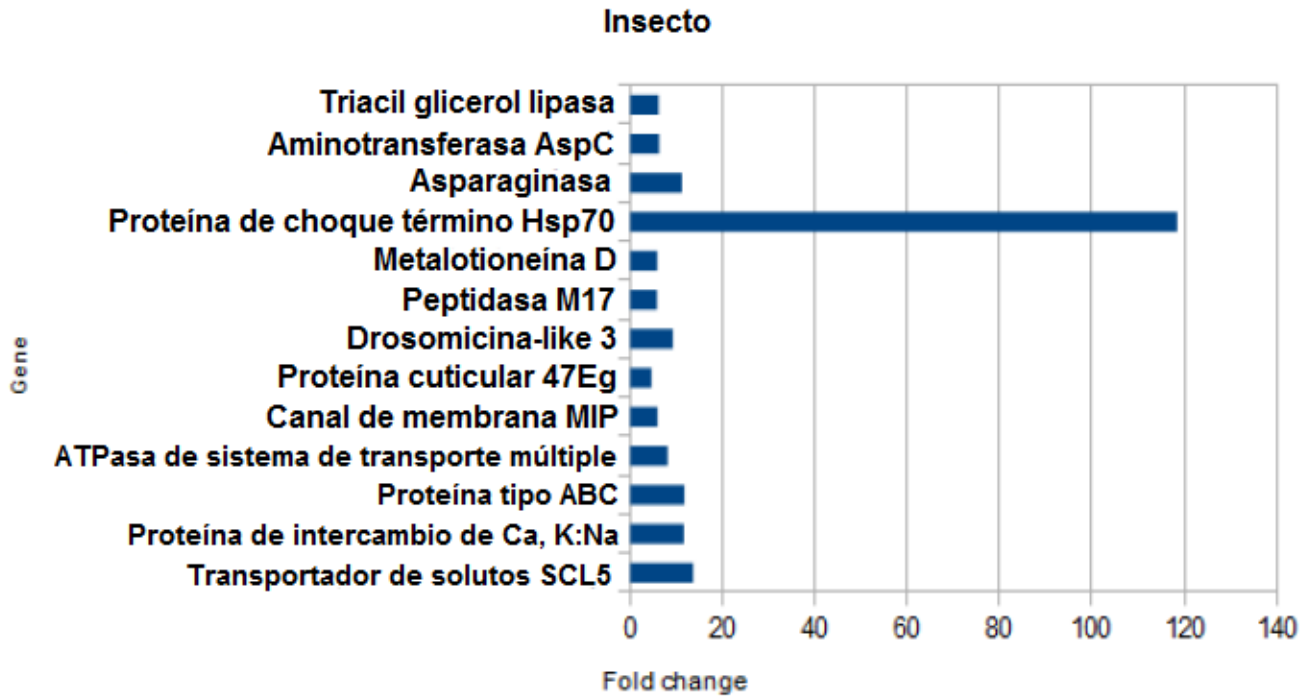
Genes con mayor expresión diferencial en ovarios



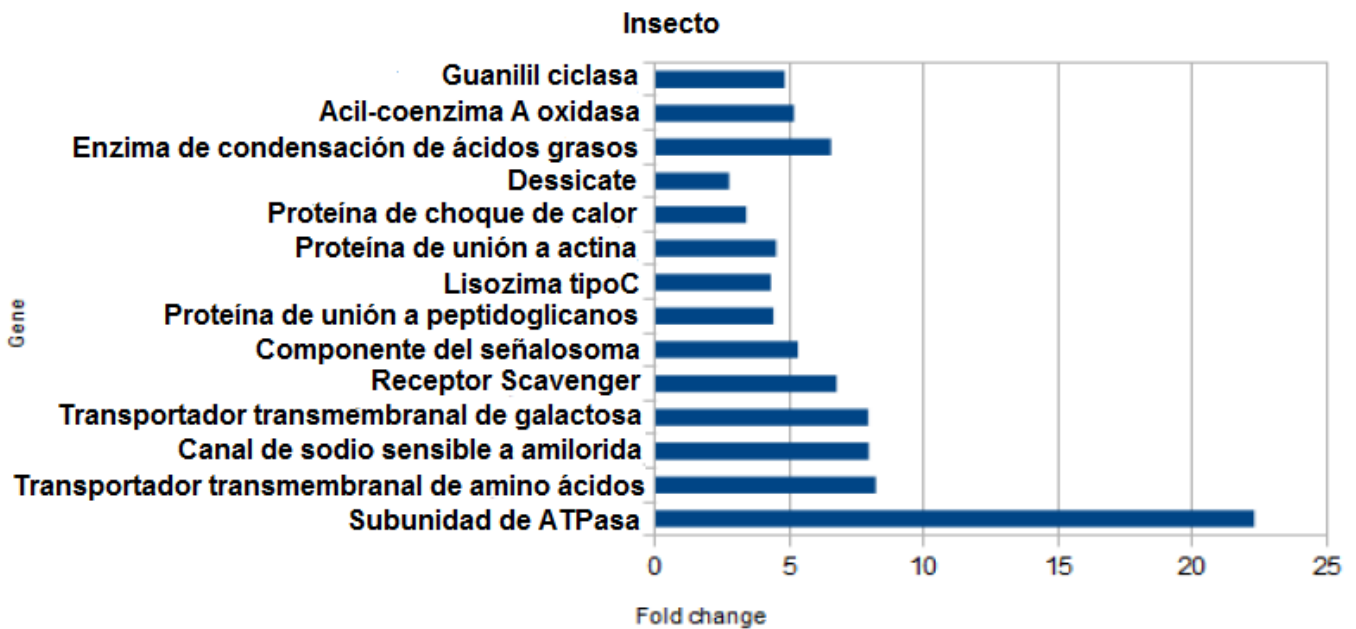
Expresión de genes del insecto

Dentro de los genes del insecto diferencialmente expresados en el bacterioma se encontraron 19 transportadores (posiblemente de amino ácidos, azúcares, vitaminas, fármacos o sin sustrato conocido), 5 genes relacionados con sistemas de defensa, entre ellos un posible péptido antiparasitario parecido a la Drosomicina 3 de *D. melanogaster*, 2 genes de respuesta a estrés de calor, un gen de respuesta a estrés oxidativo, 7 genes relacionados a metabolismo de amino ácidos y algunos genes relacionados con metabolismo de lípidos, carbohidratos y vitaminas. Por otro lado en el ovario se encontraron 15 transportadores, 17 genes de respuesta inmune, algunos genes de respuesta a estrés de calor, desecación, estrés oxidativo e hipoxia y genes relacionados a síntesis y metabolismo de lípidos, vitaminas, carbohidratos, nucleótidos, amino ácidos y quitina.

Genes interesantes con expresión diferencial en bacterioma



Genes interesantes con expresión diferencial en ovarios



7. Discusión

Concorde con la hipótesis de éste trabajo, la flavobacteria encontrada en *L. axin axin* es una bacteria endosimbionte con un genoma muy reducido, cuyo contenido funcional está casi restringido a la biosíntesis de amino ácidos. Como se había mencionado, la savia de las plantas es la base nutricional de este grupo de insectos y es muy pobre en compuestos nitrogenados. Todo esto en conjunto con las limitaciones metabólicas del insecto indica que la posible función de la flavobacteria dentro de la relación simbiótica es sintetizar amino ácidos para su hospedero.

La localización de la flavobacteria en un órgano tan especializado como el bacterioma sugiere una relación muy antigua y obligada con su insecto hospedero, sin embargo, los signos de "degradación" de las secuencias de la flavobacteria en varios de los genes de síntesis de amino ácidos así como la pérdida de genes considerados como esenciales, sugiere que la flavobacteria podría estar perdiendo la capacidad de cumplir con su función simbiótica.

Las características del genoma de la enterobacteria endosimbionte sugieren una relación muy reciente con el insecto y su adaptación al estilo de vida intracelular se ve reflejada en el alto número de elementos móviles en su genoma, característica indicativa de un proceso de reducción genómica (Mccutcheon y Moran, 2012). La presencia de la enterobacteria podría ser el resultado de la necesidad de compensar las funciones perdidas por la flavobacteria. Los análisis transcriptómicos de ambos endosimbiontes sugieren que la enterobacteria aparte de tener capacidades de biosíntesis de amino ácidos, tiene como función dentro del bacterioma reciclar el nitrógeno de desecho del insecto. El análisis también indica que la enterobacteria podría utilizar el sistema de secreción tipo III para secretar proteínas efectoras al hospedero que le ayuden a la colonización o al establecimiento de la simbiosis en el insecto.

La expresión de los genes de la flavobacteria no parece ser muy fluctuante entre bacterioma y ovario, sin embargo la sobre expresión de genes relacionados con

producción de energía y traslocación de proteínas en el ovario podría deberse a que éste endosimbionte tiene un papel importante en el proceso de ovogénesis en el hospedero.

El mapeo de transcritos a los genomas de ambos endosimbiontes sugiere que aunque ambas bacterias están presentes en los dos tejidos, la enterobacteria es igual de abundante en el bacterioma y el ovario, mientras que la flavobacteria parece ser menos abundante en el ovario.

Por otra parte, el análisis de los transcritos del insecto sugiere que éste podría utilizar un péptido antimicrobiano para controlar la densidad de endosimbiontes en el bacterioma y proteínas del sistema inmune para controlar la colonización en los huevecillos (Anselme *et al*, 2008, Login *et al*, 2011, Login y Heddi, 2013) .

8. Perspectivas

Realizar experimentos de hibridación *in situ* en secciones del cuerpo completo y órganos reproductivos del insecto en diferentes estadios del desarrollo para estudiar la ruta de transmisión de los endosimbiontes a los huevecillos, así como la distribución de las bacterias en los órganos del insecto en diferentes etapas de crecimiento.

Validar los datos del análisis del transcriptoma a través de PCR cuantitativo.

Metodología adicional

Electroforesis de campos pulsados

Para determinar el tamaño del genoma de las bacterias asociadas al Nij se realizó electroforesis de campos pulsados con el DNA obtenido a partir del macerado y la filtración de 15 hembras adultas.

Las condiciones de corrida del PFGE fueron seleccionadas para separar replicones de entre 50 y 1000 kb.

El DNA del gel se transfirió a membranas de nylon y se hibridó por separado contra las sondas dirigidas al gen 16s rRNA de la flavobacteria y la enterobacteria marcadas radiactivamente. Comparando el marcador molecular con la banda de ADN donde hibridó la sonda se estimó el tamaño del replicón.

Cuantificación relativa de DNA bacteriano por RT-PCR

Se utilizó un insecto adulto congelado a -80°C para realizar una disección de órganos y buscar la presencia de un bacterioma y analizar la localización de los endosimbiontes en el cuerpo del insecto.

Se disectaron 4 estructuras del cuerpo del insecto, el intestino y tubos de malpighi, dos estructuras rosadas presentes una en cada lado del abdomen y una porción de cuerpo graso de la parte baja del abdomen. Se extrajo el DNA de cada estructura, así como del resto del cuerpo después de la disección. Se realizó RT-PCR con los DNAs de las estructuras encontradas para examinar la riqueza de DNA tanto del insecto como de los endosimbiontes en cada tejido utilizando cebadores específicos para el gen GroEL de la flavobacteria y el gen GroEL de la gammaproteobacteria. Se utilizó el método de comparación de Ct utilizando DNA total de un insecto sin ningún tratamiento como muestra de referencia para analizar el enriquecimiento de DNA de los organismos de

interés en las muestras.

Anotación de las secuencias de la enterobacteria

Los genes presentes en los scaffolds de la enterobacteria se predijeron utilizando MetaGenemark y su anotación funcional se realizó con Blast2go, con el que se determinó la similitud de las proteínas codificadas contra la base de datos nr, los términos de ontología génica (GO), las firmas protéicas y las asignaciones de función enzimática.

Obtención de mRNA y secuenciación

Se realizó una extracción de RNA de dos tejidos del insecto, el bacterioma y el ovario, pues ambos órganos están en contacto en algún punto del ciclo de vida del insecto con las bacterias endosimbiontes. Se realizó PCR de punto final con el DNA de ambos tejidos para confirmar la presencia de los endosimbiontes utilizando oligos específicos para amplificar el gen 16S de cada uno. Las muestras de RNA se mandaron a secuenciar con la tecnología de SOLID.

El protocolo de extracción del RNA fue el siguiente:

Se maceró el tejido en nitrógeno líquido y se resuspendió en 300µl de buffer de lisis (20% SDS, 1% (NH₄)₂SO₄, pH=4.8)

Se agregaron 500µl de NaCl 5M y se centrifugó la muestra por 10 minutos a 13000 rpm.

Se repitió éste paso hasta que el sobrenadante estuviera libre de residuos.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregó 0.7 volúmenes de 2-propanol. Se centrifugó la muestra por 20 minutos a 13000 rpm.

Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ácidos nucleicos con 1ml de etanol al 70%. Se centrifugó la muestra por 2 minutos a 13000 rpm.

Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de

RNAsas.

Se digirió la muestra con DNAsa I (Fermentas, 1u/ml) a 37°C por 30 minutos y se inactivó la reacción a 60°C por 10 minutos.

Mapeo y análisis de transcritos

Los transcritos secuenciados se mapearon al genoma de la flavobacteria, a los scaffolds de la enterobacteria y a dos genomas de insecto, el de *Drosophila melanogaster* y *Acyrtosiphon pisum* (Áfido) utilizando el software CLC Genomics Workbench.

Se utilizaron dos métodos estadísticos para encontrar la expresión diferencial de genes para muestras sin réplicas en los dos tejidos, el test de proporciones de Kal y el test de distribución binomial negativa (paquete DESeq de R). Se tomaron como genes expresados diferencialmente aquellos que obtuvieran un p-value < 0.01 en el caso del test Kal y < 0.05 para el test binomial negativo, ya que éste último método es más riguroso. También se utilizó como parámetro un cambio en la expresión mayor al doble (fold > 2).

Bibliografía

- Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., Moya, A. & Heddi, A. (2008). Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biology*, 6, 43. doi:10.1186/1741-7007-6-43
- Bourtzis, K. & Miller, T. (2006). *Insect symbiosis Vol. 2*. CRC Press
- Buchner, P. (1957). Endosymbiosestudien an schildläusen. *Zeitschrift Für Morphologie Und Ökologie Der Tiere*, 308. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00406966>
- Burke, G. R., & Moran, N. A. (2011). Massive Genomic Decay in *Serratia symbiotica*, a Recently Evolved Symbiont of Aphids. *Genome Biology and Evolution*, 3, 195–208. doi:10.1093/gbe/evr002
- Dale, C., Wang, B., Moran, N., & Ochman, H. (2003). Loss of DNA recombinational repair enzymes in the initial stages of genome degeneration. *Molecular Biology and Evolution*, 20(8), 1188–94. doi:10.1093/molbev/msg138
- Douglas, A. E. (2011). Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host & Microbe*, 10(4), 359–67. doi:10.1016/j.chom.2011.09.001
- Douglas, A. E. (2012). “Can ’ t Live without You :” Essential Animal-Bacterial Relationships. *Issues*, 7(6), 273–277.
- Gruwell, M. E., Hardy, N. B., Gullan, P. J., & Dittmar, K. (2010). Evolutionary Relationships among Primary Endosymbionts of the Mealybug Subfamily Phenacoccinae (Hemiptera : Coccoidea : Pseudococcidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 76(22), 7521–7525. doi:10.1128/AEM.01354-10
- Gullan, P., & Cook, L. (2007). Phylogeny and higher classification of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Zootaxa*, 425, 413–425. Retrieved from <http://mapress.com/zootaxa/2007f/zt01668p425.pdf>
- Hansen, A. K., & Moran, N. a. (2011). Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2849–54. doi:10.1073/pnas.1013465108
- Lerat, E., & Ochman, H. (2005). Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(10), 3125–3132. doi:10.1093/nar/gki631

- Login, F. H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., Rochat, D. & Heddi, A. (2011). Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6054), 362–5. doi:10.1126/science.1209728
- Login, F. H., & Heddi, A. (2013). Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 232–9. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.06.015
- Matsuura, Y., Koga, R., Nikoh, N., Meng, X.-Y., Hanada, S., & Fukatsu, T. (2009). Huge symbiotic organs in giant scale insects of the genus *Drosicha* (Coccoidea: Monophlebidae) harbor flavobacterial and enterobacterial endosymbionts. *Zoological Science*, 26(7), 448–56. doi:10.2108/zsj.26.448
- Mccutcheon, J. P. (2011). The bacterial essence of tiny symbiont genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), 1–10. doi:10.1016/j.mib.2009.12.002.
- McCutcheon, J. P., McDonald, B. R., & Moran, N. a. (2009). Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15394–9. doi:10.1073/pnas.0906424106
- Mccutcheon, J. P., & Moran, N. A. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(1), 13–26. doi:10.1038/nrmicro2670
- Moran, N. a. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 Suppl , 8627–33. doi:10.1073/pnas.0611659104
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews. Genetics*, 9(3), 218–29. doi:10.1038/nrg2319
- Rosenblueth, M., Sayavedra, L., Sámano-Sánchez, H., Roth, a, & Martínez-Romero, E. (2012). Evolutionary relationships of flavobacterial and enterobacterial endosymbionts with their scale insect hosts (Hemiptera: Coccoidea). *Journal of Evolutionary Biology*, 25(11), 2357–68. doi:10.1111/j.1420-9101.2012.02611.x
- Sabree, Z. L., Huang, C. Y., Okusu, A., Moran, N. a, & Normark, B. B. (2012). The nutrient supplying capabilities of *Uzinura*, an endosymbiont of armoured scale insects. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.12058
- Sabree, Z. (2009). Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America. 106(46). Retrieved from
<http://www.pnas.org/content/106/46/19521.short>

- Tokuda, G., Lo, N., & Takase, A. (2008). Purification and partial genome characterization of the bacterial endosymbiont *Blattabacterium cuenoti* from the fat bodies of cockroaches. *BMC Research Notes*, 9, 1–9. doi:10.1186/1756-0500-1-118
- Walczuch, A. (1932). Studien an coccidensymbionten. *Zoomorphology*. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/YH8702802W577LV1.pdf>
- Wilson, A., & Ashton, P. (2010). Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Molecular Biology*, 19, 249–258. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00942.x
- Szklarzewicz, T., Kedra, K., & Niznik, S. (2006). and transovarial transmission of endosymbiotic microorganisms in *Palaeococcus fuscipennis* (Burmeister)(Insecta, Hemiptera, Coccinea: Monophlebidae). *Folia Biologica*, 54(1), 1–6. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/isez/fb/2006/00000054/F0020001/art00012>