

REVISIÓN DE TEMA

SIMBIOSIS BACTERIANA EN INSECTOS

Orlando Grijalva

Universidad del Valle. Departamento de Biología. A.A. 25360. Cali, Colombia; correo electrónico: orlando.grijalva@gmail.com

Gloria Isabel Giraldo

Universidad del Valle. Departamento de Biología. A.A. 25360. Cali, Colombia; correo electrónico: gloriaisabelgiraldo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Uno de los orígenes de la diversidad biológica, es la producida por la interacción de dos especies. Esta, se general de diferentes maneras, tales como las relaciones depredador-presa, el parasitismo y la simbiosis (Ishikawa 2003). El término simbiosis fue usado, por primera vez en 1879 por Antón de Bary, para referirse a dos o más especies que viven permanentemente en estrecha asociación, durante al menos una parte de su ciclo de vida, ya sea con la coexistencia de un individuo sobre el otro o uno dentro del otro (Gil et al. 2004). En el siglo XIX, T. H. Huxley denominó erróneamente “protoplasma celular” a las bacterias endosimbióticas en la cavidad corporal de los áfidos; éstas, sólo fueron reconocidas como bacterias en 1910, mediante los trabajos independientes de K. Sulc y U. Pierantoni (Douglas 2003). La detección de bacterias asociadas a insectos se dio a lo largo de todo el siglo XX, no obstante, el papel de los simbioses primarios, así como su identidad específica, debió aguardar hasta comienzos de la década de los 90s, debido a la imposibilidad de ser mantenidos en medios de cultivo (Munson et al. 1991). De acuerdo con Ishikawa (2003), actualmente se reconoce que la simbiosis, por la magnitud de su alcance, es el mecanismo con las mayores consecuencias para el proceso evolutivo.

Los insectos representan un modelo especial, apto para el estudio de las relaciones simbióticas, debido a su gran diversidad, la mayor de todos los invertebrados, y a su gran tolerancia a organismos foráneos, que les permite coexistir con muchos microorganismos diferentes y en gran variedad de maneras. Según Gil et al. (2004), la mayor parte de los hexápodos están involucrados en algún tipo de simbiosis, especialmente con bacterias. En muchos casos, estas asociaciones, llegan a ser obligatorias y han sido tradicionalmente clasificadas como mutualistas (con beneficio recíproco), parasíticas (con un costo fisiológico impuesto al hospedero sin que éste reciba beneficio a cambio) y comensalistas (cuando, aparentemente, el hospedero no se beneficia pero tampoco se afecta, por la presencia de su simbiote asociado).

La eliminación de los simbioses en los insectos, por medio de antibióticos, permite determinar y (en casos como el de *Buchnera*), cuantificar el aporte de los simbioses a su hospedero. En la actualidad, los beneficios que recibe el hospedero de la relación simbiótica, son casi siempre definidos, pues la eliminación en condiciones de laboratorio de los microorganismos, así como su cultivo en medios artificiales, permite estudiar en forma detallada las consecuencias para el hospedero. No obstante, los beneficios para los microorganismos simbioses no lo son tanto, razón por la cual, incluso, han llegado a considerarse como esclavos del hospedero en vez de mutualistas (Maynard Smith & Szathmary 1995, citados por Werren & O'Neill 1997). En consecuencia, no siempre es fácil enmarcar una relación en alguna de las categorías antes mencionadas (Werren & O'Neill 1997).

El efecto que la simbiosis con bacterias puede ejercer sobre los insectos es variado y abarca principalmente: alteraciones del desarrollo (Braendle et al. 2003); mecanismos nutricionales que posibilitan suplementar una dieta pobre con algún componente o la digestión de recursos alimenticios como la celulosa (Bauman 2005); alteraciones de la reproducción que pueden traducirse en eventos de especiación (Hurst & Werren 2001, Stouthamer et al. 1999); defensa contra el ataque de enemigos naturales (Scarborough et al. 2005), inmunidad (Macdonald & Monteleone 2005) y compensación por la pérdida del simbiote primario (Koga et al. 2003).

Los simbioses pueden pasar de una generación a otra mediante dos estrategias generales: la transmisión horizontal (típico proceso infeccioso donde el simbionte se adquiere desde el ambiente externo) y la transmisión vertical, mediada por la herencia, casi siempre vía materna, a través del citoplasma de los huevos. No obstante, existen otras formas de transmisión (Buchner 1965, citado por Werren & O'Neill 1997). Los simbioses estrictamente heredables poseen una asociación estrecha con sus hospederos, producto de una evolución íntimamente ligada. En estos microorganismos, la supervivencia y la reproducción están directamente vinculadas a las de su hospedero, por lo cual, se puede afirmar, que una vez que un microorganismo se transmite estricta o casi estrictamente por una vía vertical, su asociación habrá evolucionado hacia una relación mutualista (Lipsitch et al. 1995). Generalmente, esto significa que el simbionte no afectará negativamente la supervivencia de su hospedero y, que su mecanismo de transmisión estará vinculado a la reproducción de éste, como por ejemplo, en el caso de *Wolbachia pipientis* (α Proteobacteria) la cual genera en sus hospederos alteraciones reproductivas que favorecen la emergencia de hembras (Stouthamer et al. 1999).

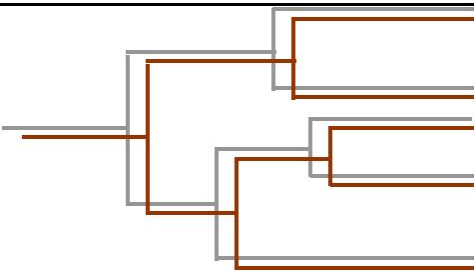
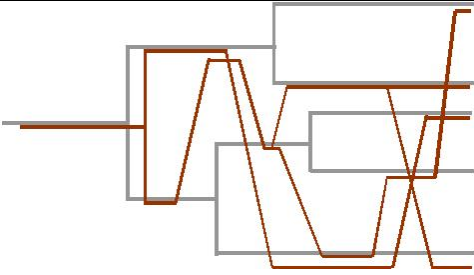
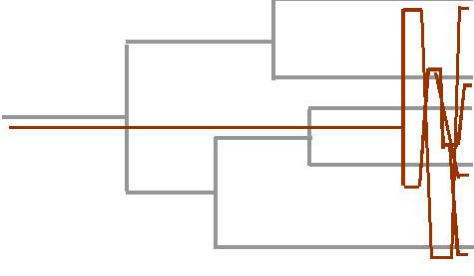
Tipos de simbioses


Los simbioses se han clasificado de acuerdo a la edad evolutiva estimada para la relación con su hospedero y el grado de dependencia entre estos, como simbioses primarios u obligados y secundarios o facultativos. Los primeros, son aquellos requeridos esencialmente por el hospedero y que son exclusivos de estructuras llamadas bacteriocitos o micetocitos, propias del hospedero, altamente especializadas, características de tres grupos de insectos: Blattaria, Homoptera y la familia Curculionidae (Ishikawa 2003). Los micetocitos o bacteriocitos pueden, en ocasiones, estar agrupados en un órgano, el micetoma o bacterioma (Buchner 1965, citado por Ishikawa 2003). Los simbioses primarios presentan evidencia molecular de un origen monofilético, con un ancestro común que colonizó al hospedero, el cual puede haber divergido en más de una especie, cada una de las cuales porta un linaje del simbionte ancestral (Thao & Baumann 2004) (Tabla 1). El otro tipo de simbioses, los secundarios o facultativos, por el contrario, no están restringidos a órganos especializados ni son indispensables para la supervivencia de su hospedero. En esta última categoría se encuentran los patógenos, que poseen su propia maquinaria biológica para invadir células hospederas y tejidos (Dale & Moran 2006).

Simbioses primarios u obligados

En este tipo de simbioses se pueden encontrar evidencias de una asociación antigua y especializada, tales como un árbol filogenético con claras congruencias con el de su hospedero durante largos períodos de tiempo evolutivo (Tabla 1) (Thao & Baumann 2004, Moran et al. 2005, Baumann 2005, Lo et al. 2003, Moran et al. 2003, Wu et al. 2006). La edad estimada de estas asociaciones oscila entre 30 y 270 millones de años, lo cual significa que muchas de las relaciones simbióticas de los insectos son anteriores a la aparición de los mamíferos y las angiospermas, entre otros grupos modernos que hoy son dominantes (Dale & Moran 2006). Durante un período de asociación tan largo, el genoma y la estructura poblacional de los simbioses primarios han experimentado marcadas alteraciones, como consecuencia de su evolución dependiente de la del hospedero. Estas incluyen: reducción en el tamaño del genoma (van Ham et al. 2003); casi total ausencia de recombinación, producto de una reproducción clonal, por estar los diferentes linajes confinados estrictamente en diferentes hospederos (Nilsson et al. 2005); pequeños tamaños de población, que es un rasgo completamente opuesto al de las bacterias de vida libre o simbioses facultativos en general, donde se encuentran poblaciones del orden de 10^7 individuos; genes codificantes que muestran una acelerada evolución, en comparación con los microorganismos de vida libre y una inusual tasa baja de sustituciones sinónimas; acumulación de aminoácidos con familias de codones atípicamente ricos en A+T y de mutaciones deletéreas debidas a deriva genética al azar (Moran 1996, Moya et al. 2002).

Tabla 1. Principales patrones evolutivos en bacterias endosimbiontes de insectos. Adaptado de Dale & Moran (2006) y Lo et al. (2003).

HISTORIA EVOLUTIVA	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
	<p>Simbiontes obligados asociados a bacteriomas Evolución concertada por largos periodos de tiempo evolutivo; sin intercambio genético entre linajes por estar confinados a un hospedero.</p>	<p><i>Buchnera aphidicola</i> <i>Wigglesworthia glossinidia</i> <i>Baumannia cicadellinicola</i></p>
	<p>Parásito reproductivo antiguo Transmisión horizontal ocasional; recombinación entre hospederos; aunque pueden ser intracelulares, no están confinados en bacteriomas.</p>	<p><i>Spiroplasma</i> spp. <i>Rickettsia</i> spp.</p>
	<p>Simbiontes facultativos Transmisión horizontal ocasional; evidencias de reciente unión o cruce de linajes; relación simbiótica reciente</p>	<p><i>Hamiltonella defensa</i> <i>Regiella insecticola</i> <i>Serratia symbiotica</i> <i>Arsenophonus</i> spp.</p>



En la actualidad, el modelo mejor estudiado para este tipo de relación es *Buchnera aphidicola* (γ Proteobacteria) como endosimbionte primario de áfidos (Hemiptera: Aphididae). Esta bacteria genera efectos positivos sobre la eficacia reproductiva (“fitness”) de su hospedero (Figura 1), particularmente, en el suministro de aminoácidos esenciales (Douglas 2003; Gil et al. 2004). Esta relación se remonta a unos 200 millones de años, a lo largo de los cuales, la bacteria, además de las modificaciones típicas del genoma de un simbiote primario, ha experimentado la amplificación de los genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Silva et al. 2001, Lai et al. 1994, Moran et al. 1993).

En áfidos portadores de *B. aphidicola*, criados con dieta artificial, su desarrollo y reproducción no son afectados cuando de su dieta se eliminan algunos aminoácidos esenciales; en contraste, en áfidos a los que, experimentalmente, se les suprime su población de endosimbiontes primarios, la exclusión de algunos o todos los aminoácidos esenciales se traduce en un menor desarrollo (Douglas 1998). Esto, al parecer, es válido para otros hemipteros (Sasaki et al. 1996, Douglas 1998). Así mismo, se ha demostrado que *B. aphidicola*, aislada, puede sintetizar aminoácidos esenciales, pero no así los áfidos aposimbióticos. El porcentaje total de

aminoácidos producidos por la bacteria, puestos a disposición del áfido *Aphis fabae*, con excepción del triptófano, oscila entre 54 y 76% (Douglas et al. 2001, Douglas 2003) (Tabla 2).

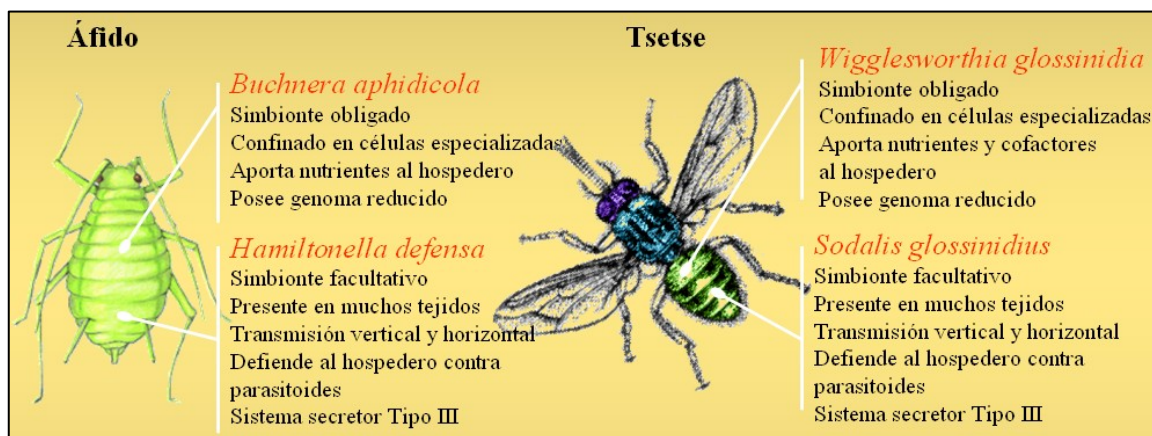


Figura 1: Características sobresalientes de la relación simbiote-hospedero según lo específico de la dependencia. Adaptado de Dale & Moran (2006).

Tabla 2. Producción de aminoácidos esenciales en *Aphis fabae* gracias a su asociación simbiótica con *Buchnera aphidicola*. Adaptado de Douglas et al. 2001 y Douglas 2003.

Aminoácido	Áfidos simbióticos (pml/μg proteína total diaria)	Áfidos aposimbióticos (pml/μg proteína total diaria)	Producción por células de <i>Buchnera</i> diariamente (fmol)	Cantidad liberada al áfido (%) ^a
Histidina	12.4	3.3	0.02	54
Isoleucina	114.7	21.9	0.19	75
Leucina	180.8	24.7	0.33	74
Lisina	157.4	32.1	0.26	74
Metionina	31.6	13.1	0.04	68
Fenilalanina ^b	84.4		0.28	76
Treonina	111.3	19.3	0.19	56
Triptófano	10.3	2.6	0.02	19
Valina	128.3	22.6	0.22	70

^a Este cálculo asume que las células de *Buchnera* proliferan a una tasa de 0.3 célula/día y que su proteína tiene la misma composición de aminoácidos que *Escherichia coli*.

^b La tasa de crecimiento de áfidos aposimbióticos no se pudo calcular en una dieta libre de fenilalanina debido a la alta mortalidad.

Se ha secuenciado el genoma de varios simbioses primarios de áfidos que, por su tamaño reducido y por estar enclaustrado en bacteriocitos es, relativamente, más sencillo de lograr. Aunque existen unas 4 mil especies de áfidos (Minks & Harrewijn 1987, citado por Munson et al. 1991) y la infección con *Buchnera* es el resultado de un único episodio ancestral (Moran et al. 1993), la secuenciación del genoma de cinco linajes (subfamilias) de áfidos, que comprenden nueve especies, reveló que varía desde 450 hasta 670 kb (Gil et al. 2002). El estudio del genoma de *Buchnera* ha permitido comprobar que éste se encuentra dotado con todos

los genes codificantes de las enzimas de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos esenciales (Shigenobu et al. 2000). Existe una complementariedad entre el genoma de uno y otro, al grado que tanto *Buchnera* como su hospedero se proveen, en mutua reciprocidad, aquellas sustancias que cada uno no puede sintetizar (Tabla 2) (Andersson 2000). La relación se torna aún más estrecha si se tiene en cuenta que los precursores de algunos aminoácidos, son otros aminoácidos no esenciales como el glutamato y el aspartato. Usualmente, los áfidos, no excretan nitrógeno como un producto de desecho sino que reciclan grupos amino, como la glutamina, los cuales *Buchnera* emplea como sustrato para la síntesis de aminoácidos esenciales (Douglas 1998, Sasaki & Ishikawa 1995, Shigenobu et al. 2000, Whitehead & Douglas 1993). También se deduce de la estructura genómica de *Buchnera* que esta respira aeróbicamente; además, los bacteriocitos contienen bastantes mitocondrias y están comunicados con las tráqueas del insecto. No obstante, aunque *Buchnera* posee el conjunto de genes responsables de la glicólisis, el ciclo de la pentosa fosfato y la respiración aeróbica, carece de los genes para el funcionamiento del ciclo del ácido tricarbóxico y para el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Shigenobu et al. 2000). Entre muchas particularidades, el genoma de *Buchnera* carece de los genes que codifican para varios sistemas regulatorios, como por ejemplo, los que generalmente controlan la expresión a cambios medioambientales. En conjunto, este genoma está tan especializado que la supervivencia de *Buchnera* sólo es viable dentro de un ambiente intracelular, lo cual, sumado a su papel de aporte de energía al hospedero, la hace similar a una organela (Shigenobu et al. 2000).

Probablemente, la mayor parte de la reducción en el tamaño del genoma lo experimentó *Buchnera* ancestral (Gil et al. 2002) y el resto de la diversificación es producto de la especiación del hospedero, el cual, por supuesto, también pasó por un período de tiempo sin haber aún radiado en cuatro mil especies. A partir de Gil et al. (2002), el genoma de la línea de *Buchnera*, endosimbionte de los áfidos del género *Cinara* (subfamilia Lachninae), es el más pequeño del que se tenga noticia (480 kb), ya que el anterior era el de *Mycoplasma genitalium* con 580 kb (Fraser et al. 1995).

Simbiontes Secundarios o Facultativos

Estos pueden colonizar hospederos de nuevas especies mediante transmisión horizontal (Tabla 1). Son características preponderantes de este tipo de asociaciones, su carácter facultativo, considerándolo desde el punto de vista del hospedero, y la condición de benéfico o perjudicial para la eficacia reproductiva del colonizado. La vía de transmisión es, principalmente, materna y esto les permite diseminarse entre las poblaciones con el empleo de estrategias que favorecen las líneas maternas infectadas (Dale & Moran 2006). Se ha demostrado que este favorecimiento o ventaja, consiste en ciertas prerrogativas para la supervivencia del hospedero o su tasa reproductiva, tales como protección contra parásitos o presiones medioambientales (Moran et al. 2005a, Moran et al. 2005b, Oliver et al. 2003, Scarborough et al. 2005). En algunos casos, la intervención del simbiote en la reproducción del hospedero puede ser notablemente influyente. Esto ha sido documentado con *Wolbachia*, bacteria que manipula la reproducción del hospedero mediante uno de los siguientes cuatro fenómenos: inducción de partenogénesis, eliminación selectiva de los embriones machos, feminización de machos genéticos e incompatibilidad citoplasmática (reproductiva) que conduce, en todos los casos, a una ventaja reproductiva que favorece su transmisión por línea materna (Stouthamer et al. 1999, Werren 1997). Este tipo de simbiontes son calificados como egoístas, en el sentido de que manipulan al hospedero, el cual además de no recibir un beneficio claro, es profundamente modulado a nivel poblacional (Weeks et al. 2002).

El áfido *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) expresa resistencia contra el ataque de su parasitoide *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) cuando se encuentra infectado por su simbiote secundario, la bacteria *Hamiltonella defensa* (γ Proteobacteria). Las interacciones que median en la expresión del fenotipo resistente de *A. pisum* frente a los ataques de *A. ervi* son aún desconocidas, pero se sabe que en áfidos el proceso de encapsulación es poco frecuente (Oliver et al. 2005). Se ha propuesto una explicación al fenotipo susceptible; en este, el parasitoide estaría manipulando los bacteriocitos de los áfidos en beneficio propio; por el contrario, en los áfidos resistentes (los portadores de *H. defensa*), este mecanismo estaría bloqueado y el desarrollo del parasitoide no prosperaría (Falabella et al. 2000). En esta propuesta, los áfidos serían beneficiados por su relación mutualista con la bacteria, como si ella fuese una extensión de su sistema inmune, ya sea con los simbiontes ejerciendo totalmente el papel defensivo o, en combinación con el sistema inmune propio de los áfidos. Estudios en *Drosophila*, han revelado que el sistema de encapsulación es costoso (Kraaijeveld et al. 2001), no obstante, se ignora el costo de mantener a *H. defensa* (Russell & Moran 2005).

Sin embargo, se ha establecido, que la protección que brinda a su hospedero no es específica. No existe congruencia entre la presencia de simbioses secundarios y la filogenia de los áfidos, ya que, aún dentro una misma especie de áfido, estos varían con su biotipo o hábitat, sugiriendo que su adquisición por parte de los insectos ha ocurrido recientemente, varias veces en distintos linajes (Ishikawa 2003) (Tabla 1).

Expresado en términos de flujo de energía, el anterior análisis se realiza desde el punto de vista del hospedero. Sin embargo, analizado desde el otro extremo del sistema, desde la bacteria simbiote, la patogénesis o parasitismo y el mutualismo, sin importar que ambos signifiquen un impacto opuesto sobre la eficacia reproductiva del hospedero, abarcan el mismo tipo de obstáculos: la invasión de las células o tejidos del hospedero y el consecuente enfrentamiento con sus defensas químicas y celulares, con el propio gasto de energía que esto involucra (Hentschel et al. 2000, Moran 2001). La evidencia experimental, con patógenos de plantas y animales, induce a pensar que la invasión de un hospedero, muchas veces, está mediada por un conjunto de genes evolutivamente homólogos, transmitidos entre distintos linajes de bacterias (Moran 2001, Cheng & Schneewind 2000). Estos genes codifican lo que se ha denominado el sistema secretor tipo III, el cual consiste en un puente transmembranal que permite el transporte de proteínas hacia el exterior de la célula bacteriana (Hueck 1998, Cheng & Schneewind 2000). Se ha demostrado que este sistema es esencial en *Sodalis glossinidius* (γ Proteobacteria), simbiote intracelular de *Glossina* spp., la mosca tsetse (Diptera: Glossinidae), como también en la colonización de células de insectos en condiciones de laboratorio y para la infección del hospedero en condiciones naturales (Dale et al. 2001). Considerando que *S. glossinidius* es un simbiote secundario, tal como lo indica la comparación de su filogenia con la de *Glossina* spp. (Chen et al. 1999) y el hecho de que se distribuya tanto interna como extracelularmente en diferentes tejidos de su hospedero (Dale & Maudlin 1999), la evidencia de la existencia del sistema secretor tipo III apoyaría la hipótesis de que los endosimbiontes de transmisión vertical (que suelen tener una relación mutualista con su hospedero) han evolucionado a partir de parásitos transmitidos horizontalmente, como patógenos atenuados (Gil et al. 2004) en una relación que exhibiría un espectro continuo desde parasitismo hasta mutualismo (Dale et al. 2001) y un cambio en la dirección de la transmisión desde horizontal a vertical.

Esa misma asociación, mosca tsetse -*S. glossinidius*, ilustra la forma como se articulan los mecanismos de la simbiosis facultativa. En el insecto, se han identificado tres bacterias endosimbiontes (Tabla 1), dos de las cuales, por el grado de congruencia con el genoma de su hospedero, se han clasificado, respectivamente, como simbioses primario, *Wigglesworthia glossinidia* (γ Proteobacteria) y secundario, *S. glossinidius* (Beard et al. 1993, Aksoy 1995, Dale & Maudlin 1999). La tercera, *Wolbachia*, está presente sólo en algunas especies de *Glossina* y la evidencia molecular indica que ha sido adquirida en forma independiente por cada una (Cheng et al. 2000). No obstante, a diferencia de otros endosimbiontes, *Wolbachia* suele estar restringida a los tejidos de los órganos reproductivos en todas las especies que infecta.

Algunos endosimbiontes notables

Además de la simbiosis en áfidos, hay otras relaciones de este tipo estudiadas con detalle (ver Blattner et al. 1997, Gil et al. 2003, Akman et al. 2003, Shiguenobu et al. 2000, Tamas et al. 2002, van Ham et al. 2003, Fraser et al. 1995). La información que, en la actualidad, se tiene acerca del genoma de cinco diferentes endosimbiontes parece probar, en todos los casos, que estas asociaciones, además de mutualistas, tienen una base nutricional (Gil et al. 2004). Considerando que al menos 70% de los insectos albergan simbioses intracelulares (Ishikawa 2003), es muy probable que nuevas formas de simbiosis estén por ser estudiadas y que su análisis contribuya a la comprensión del espectro de fuerzas que han moldeado los ecosistemas actuales.

En cucarachas y termitas

Se asume que las cucarachas y termitas están filogenéticamente relacionadas. En el caso de las cucarachas, todas las especies hospedan simbioses bacterianas, heredados verticalmente y que parecen esenciales para su reproducción (Douglas 1989). El hecho de que *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Mastotermitidae), sea la única especie que posee, al igual que las cucarachas, un simbiote primario, ha conducido a la hipótesis de que la adquisición de dicho simbiote se llevó a cabo por parte de un ancestro común de ambos, cucarachas y termitas (Gras & Noirot 1959, citados por Bandi et al. 1995) y que, en la mayor parte de los linajes de termitas, así como en los mántidos, esta relación se ha perdido (Bandi et al. 1995). Algunos investigadores refutan esta hipótesis, argumentando que la adquisición de dos linajes de flavobacterias, el tipo de endosimbiote que albergan estos dos insectos, estrechamente emparentados, ha sido independiente por parte

de cucarachas y termites (Thorne 1990, Thorne 1991). No obstante, algunas evidencias tornan poco probable esta hipótesis alterna, a saber: de los cientos de bacterias intracelulares descritas hasta la fecha, los únicos casos de asociación intracelular de una flavobacteria, son los de las identificadas en los micetocitos de cucarachas y termites, por lo que es altamente improbable que tengan un origen independiente; el tiempo evolutivo transcurrido desde la divergencia de estos dos linajes de flavobacterias es, aproximadamente, el mismo que ha pasado desde la divergencia entre cucarachas y termites; y, por último, las flavobacterias ocupan el mismo sitio y se transmiten de la misma manera, en ambos hospederos. Adicionalmente, solamente *M. darwiniensis* entre los termites y *Cryptocercus* spp., entre las cucarachas, presentan una doble simbiosis, exhibiendo, además de los endosimbiontes de sus micetocitos, protozoarios flagelados que digieren la madera ingerida por estos insectos (Bandi et al 1995).

Al parecer, el papel de los simbiosiontes primarios en las cucarachas está asociado con el reciclaje de nitrógeno, ya que estos insectos, en general, almacenan grandes cantidades de ácido úrico en células especializadas, los urocitos, ubicadas en una posición adyacente a los bacteriocitos (Ishikawa 2003). Se sabe, por ejemplo, que *Periplaneta americana* nunca excreta ácido úrico, y que la proporción de esta sustancia con relación a la masa del insecto, varía de acuerdo al nitrógeno ingerido en la dieta. Igualmente, los insectos aposimbóticos (sin simbiosiontes) acumulan más ácido úrico que los simbióticos, presentando una relación inversa entre la cantidad de simbiosiontes en los cuerpos grasos y la cantidad de ácido úrico. Aunque originarios de bosques tropicales, donde casi todos los seres vivientes, directa o indirectamente, compiten y soportan estrés por la carencia de nitrógeno, actualmente, *P. americana*, no depende de una asociación simbiótica primaria para complementar su dieta, ya que sus hábitos sinantrópicos le proveen abundante nitrógeno.

En hematófagos

Con frecuencia, los insectos con una dieta altamente especializada, se enfrentan a la escasez de algún o algunos componentes esenciales para su desarrollo. La asociación con microorganismos simbiosiontes permite a estos insectos obtener los nutrientes faltantes en su dieta (Douglas 1989) y colonizar nuevos hospederos (Rio et al. 2006). En la mosca tsetse, hematófaga estricta de vertebrados y en la cual, como se anotó previamente, coexisten tres simbiosiontes, *W. glossinidia* se aloja en células epiteliales especializadas, bacteriocitos, empacadas en un bacterioma, en la región anterior del intestino medio (Aksoy 2003). Aunque se sabe que al igual que *S. glossinidius*, *W. glossinidia* pasa de la madre a la larva durante su vida intrauterina (que va de huevo a larva de tercer estadio), se desconoce si lo que se hereda son los bacteriocitos o la bacteria en un estado de vida libre (Aksoy 2003).

Los intentos de eliminación de los simbiosiontes de la mosca tsetse por medio de antibióticos, lisozima y anticuerpos específicos, han producido retardo en el crecimiento del insecto y una disminución en la producción de huevos, impidiendo la reproducción de los individuos aposimbóticos (Nogge 1976, Nogge & Gerresheim 1981, Wilkinson 1998). Su capacidad reproductiva se ha restaurado, parcialmente, mediante una dieta de sangre suplementada con vitaminas del complejo-B, lo cual ha conducido a la sospecha de que los endosimbiontes estarían desempeñando un papel en el metabolismo de estos compuestos (Nogge 1981).

El genoma de *Wigglesworthia* posee un subconjunto de genes típicos de las bacterias de vida libre, el cual es semejante a los que están presentes en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, con las cuales, al parecer, comparte un ancestro común (Aksoy 2003). El género *Wigglesworthia* presenta una filogenia congruente con la de tsetse y la antigüedad de esta simbiosis abarcaría, al menos, 50-80 millones de años (Chen et al. 1999, Akman & Aksoy 2001). La secuencia del genoma de *Wigglesworthia* ha revelado que, no obstante su marcada reducción, 770 Kb respecto al genoma de *E. coli* con 4.6 Mb, posee la maquinaria genómica para producir las vitaminas y aminoácidos esenciales que su hospedero requiere para su propia nutrición y fecundidad (Akman et al. 2002). Esta característica, sumada a los experimentos en los que moscas aposimbóticas demostraron los efectos de una marcada deficiencia de vitamina B, estarían perfilando el papel que *Wigglesworthia* desempeña en su relación simbiótica con *Glossina* spp. (Nogge 1976, Aksoy 2003, Akman & Aksoy 2001).

Llama la atención que el genoma de *Wigglesworthia* conserve los genes necesarios para la síntesis de un aparato flagelar completo, aunque ni el flagelo ni evidencia de movilidad han sido reportados, y se ha propuesto que este podría desempeñar un papel en su transmisión a la progenie de su hospedero (Akman et al. 2002). Se ha sugerido, además, que este flagelo podría ser un mecanismo alterno al sistema secretor tipo III,

del cual no se ha detectado evidencia, ya que un mecanismo semejante se ha observado en *Yersinia enterocolitica* (Young et al. 1999). Pero, quizá el rasgo más sorprendente del genoma de *Wigglesworthia*, sea que carece de un gen que codifique para la proteína iniciadora de la replicación de ADN (*AdnA*), una observación sin precedentes entre las eubacterias, ya que tal gen está presente, aún en las condiciones fisiológicas más extremas. Esta particularidad, como ninguna otra, es una fuerte evidencia de la dependencia de esta bacteria frente a su hospedero, debido a que podría significar un mecanismo mediante el cual dicho hospedero controla su número de simbioses (Akman et al. 2002).

Simbioses inductores de patologías

Como se anotó previamente, se ha observado que, una vez que un simbiote se transmite estricta o casi estrictamente por una vía vertical, inevitablemente evolucionará hacia una relación mutualista con su hospedero. Pero, por el contrario, no todos los simbioses heredables son mutualistas, o al menos no parecen serlo a la luz del conocimiento actual de las relaciones simbiote-hospedero (Ishikawa 2003). En términos generales, se puede distinguir una gran variación entre este tipo de simbioses de artrópodos. Por un lado, están los que manipulan la reproducción de su hospedero, ya sea en sus proporciones sexuales o por incompatibilidades, conduciendo a un incremento de su propia frecuencia en los ecosistemas (Breeuwer & Werren 1990). No obstante su papel egoísta, este tipo de simbioses, afectan selectivamente a las poblaciones de su hospedero y su detección se logra más por criterios fenotípicos que microscópicos. El caso mejor estudiado, como se anotó previamente, es el de *W. pipiens*, que fue reportada por primera vez en 1924 (Hertig & Wolbach), descrita formalmente a partir de los ovarios de *Culex pipiens* (Hertig 1936) y determinada como la causante de incompatibilidad citoplasmática en esta especie (Yen & Barr 1971, Yen & Barr 1973) y cuyo estudio, en la actualidad, vincula a científicos del mundo entero (National Science Foundation 2006). No obstante, acerca de este tipo de bacterias no hay consenso sobre su carácter infeccioso, pues la definición corrientemente aceptada de simbiosis (ver Introducción) tiene un carácter estructural, sin precisar lo funcional (O'Neill 1995).

El fenotipo más común inducido por los microbios implicados en alteraciones sexuales es el favorecimiento del sexo femenino, ya sea por la eliminación de los machos, la inducción de partenogénesis o la feminización (Ishikawa 2003). Entre los primeros, se cuentan los que eliminan los machos en una fase temprana de su desarrollo, ya sea durante el estado embrionario o el primer instar larval. El primer caso conocido, aunque insuficientemente estudiado, fue el de *Spiroplasma* spp. (Mycoplasmatales), de la cual se han identificado más de treinta especies (Williamson et al. 1998). Se sospecha que el mecanismo por el cual esta micoplasma elimina a los machos, podría comprometer alguno de los virus que alberga en su citoplasma (Cohen et al. 1987, citado por Ishikawa 2003). Los microsporidia, un grupo de microorganismos carentes de mitocondrias, causan la muerte de los mosquitos macho durante su último estado larval y, como una característica intrigante, la primera generación infectada se relaciona asintóticamente con este simbiote, expresándose el fenotipo que induce la muerte de los machos, a partir de la segunda generación, cuando el microorganismo se transmite por medio de los huevos (Bechnel & Sweeney 1990).

En la avispa parasitoide *Encarsia*, se ha detectado una bacteria que induce partenogénesis, pero que pertenece a un grupo distinto (Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodes) al de otras bacterias inductoras de este fenotipo y, en general, al de la mayoría de las bacterias endosimbioses (Proteobacterias), como *Wolbachia*, por lo cual se concluye que este fenómeno ha evolucionado independientemente en distintos clados (Zchori-Fein et al. 2001). Un estudio realizado en 223 especies de 20 órdenes de artrópodos detectó esta bacteria en el 7.2% de los hospederos (16 especies) y, en 7 especies, se presentó en el mismo individuo junto con *Wolbachia*, la cual se presentó en 49 especies, de 10 órdenes (Weeks et al. 2003).

En la actualidad, se sabe que la partenogénesis inducida por agentes simbióticos es un fenómeno bastante común en la naturaleza (Koivisto & Braig 2003), aunque es tan sólo una de las manifestaciones fenotípicas inducidas por simbioses bacterianas intracelulares. A pesar que es muy probable la existencia de muchas otras bacterias que estén modulando profundamente el fenotipo de sus hospederos, en la actualidad, la mejor estudiada es *Wolbachia*. Una revisión completa de los alcances de las relaciones simbióticas bacterianas sobre sus hospederos escapa al alcance de esta contribución pero el lector interesado puede consultar a Bourtzis & Miller (2003) y O'Neill et al. (1997).

En el otro extremo se encuentran los simbiosntes que claramente “enferman” (expresarlo simplemente como infecci3n, no hace una distinci3n clara) y destruyen a su hospedero, raz3n por la cual, son empleados en el control biol3gico de plagas de cultivos agr3colas (Fuxa 1987). Entre los m3s estudiados est3 *Bacillus thuringiensis* que se emplea pr3cticamente en todas las latitudes y continentes, siendo producida por muchas casas comerciales (Schnepf et al. 1998). Su acci3n entomopat3gena es causada por algunas prote3nas cristalinas que lesionan los intestinos de su hospedero, con lo cual se produce un desbalance i3nico que suele ser mortal (Gill et al. 1992, Whalon & Wingerd 2003).

La garrapata *Ixodes ricinus* puede infectarse con una bacteria que invade y devora sus mitocondrias, la cual se conoce como IricES1 y est3 relacionada con otras bacterias pertenecientes a *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Sacchi et al. 2004). Probablemente, las bacterias que habitan vacuolas en el citoplasma de c3lulas de la garrapata *Dermacentor andersoni* (Ixodidae), reportadas anteriormente (Sutakova & Rehacek 1981), correspondan a mitocondrias parasitadas en la etapa final (Sachi et al. 2004). A la luz de la teor3a endosimb3tica, esto equivaldr3a a una relaci3n simbi3tica intracelular entre dos procariotes, algo con tan s3lo un precedente reportado (Von Dohlen et al. 2001). Entre las bacterias actuales existen muy pocos modelos de relaciones paras3ticas o de depredaci3n. Hasta el momento, se conocen tres ejemplos de procariotes que desempeñen este papel ecol3gico: *Vampirococcus* sp., que ataca epibi3ticamente diferentes especies de bacterias p3rpuras sulfurosas pertenecientes al g3nero *Chromatium* y que no ha sido posible cultivar en medios ax3nicos. *Bdellovibrio* sp., habitante de aguas marinas, dulces y del suelo, est3 dotada de movilidad y ataca peripl3smicamente a varias bacterias Gram negativas. La tercera bacteria es *Daptobacter* sp., de ataque endobi3ntico a algunos g3neros de la familia Chromatiaceae, la cual es una anaer3bica facultativa que ha sido cultivada en medios ax3nicos (Guerrero et al. 1986). De la mano de este fen3meno, Voronin et al. (2004), report3 la presencia de *Wolbachia* en el ret3culo endoplasm3tico de *Drosophila melanogaster*.

Empleo de simbiosntes para el control de insectos plaga

Desde el punto de vista aplicado, algunos de los simbiosntes descubiertos hasta la fecha podr3an ser empleados en el control de insectos de importancia m3dica, agr3cola y veterinaria (Aksoy et al. 2001, Beard et al. 2001, Benlarbi & Ready 2003, Kittayapong et al. 2002, Olsen et al. 2000, Rasgon & Scott 2004, Ruang-areerate & Kittayapong 2006, Sinkins & Godfray 2004, Sinkins et al. 1997, Xi et al. 2005).

El control de poblaciones vectoras es una opci3n comprobada que reduce la transmisi3n, pues el desarrollo del par3sito dentro del insecto representa un punto d3bil en el ciclo de transmisi3n (Benedict & Robinson 2003, Riehle et al. 2003). Aunque se han empleado una variedad de m3todos para eliminar las poblaciones vectoras, los plaguicidas han sido la principal herramienta, pero presentan algunas desventajas, como su alto costo; de otra parte, no siempre se cuenta con 3xito, pues los insectos pueden expresar resistencia a los insecticidas, adem3s del impacto negativo que se genera en el ambiente. Adicionalmente, el intento por diezmar los artr3podos no es tan deseable hoy en d3a ya que estos pueden ocupar un nicho importante en la red tr3fica (Durvasula et al. 1997, Crampton 1994).

Es as3, como en la b3squeda de nuevas estrategias para prevenir la transmisi3n de pat3genos por medio de vectores, se plantea el control gen3tico, el cual busca manipular la competencia vectorial del insecto para evitar que sea capaz de transmitir el pat3geno. Existen dos estrategias principales: la transg3nesis y la paratransg3nesis; esta 3ltima, empleando los simbiosntes de los insectos. El principio de ambas estrategias es la introducci3n y la expresi3n de genes no propios del insecto, que posean efecto anti-par3sito, es decir, que produzcan mol3culas que maten o intervengan con el desarrollo del par3sito dentro del vector (Riehle et al. 2003; James 2000).

Existen dos modelos experimentales que sirven, al presente, como ejemplos o aproximaciones del control gen3tico de vectores. En forma respectiva, sus objetivos finales son la alteraci3n de la competencia vectorial del triatomino *Rhodnius prolixus* vector de *Tripanosoma cruzi* agente etiol3gico de la enfermedad de Chagas y de la mosca tsetse *Glossina* spp, vectora de *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, causantes de la enfermedad del Sueño (Handler & James 2000). En el primer caso, se conoce que *R. prolixus* posee una bacteria simbiote, *Rhodococcus rhodnii* (Actinomiceto, nocardiforme), la cual es adquirida a trav3s de las heces de los padres y necesaria para el desarrollo desde sus estados ninfales hasta adulto y, que es adquirida a

través de las heces de los padres. El simbiote se desarrolla, al igual que *T. cruzi*, en el intestino medio, esta característica hace que este simbiote sea considerado un buen candidato de paratransgénesis. En laboratorio, se ha modificado el simbiote insertándole genes que al expresarse causan la muerte del parásito mediante lisis celular y se explora la posibilidad de insertar genes de fragmentos de anticuerpos que tengan como blanco determinantes de superficie de *T. cruzi* (Durvasula et al. 1999). Con el objetivo de diseminar estos simbioses, se está desarrollando una pasta sintética denominada CRUZIGARD, con los simbioses modificados e imita en apariencia las heces de los triatominos (Beard et al. 2002).

En el segundo caso, se ha trabajado con dos de los tres simbioses identificados en *Glossina* spp. La ubicación de *Sodalis* en mesenteron, hemolinfa y glándulas salivales, lugares donde los *Trypanosoma* transitan, se diferencian, multiplican y alojan, favorece la expresión y secreción de los productos de genes anti-*Trypanosoma* en los simbioses modificados. En este simbiote se han insertado genes marcadores y posteriormente se han inyectado en la hemolinfa de hembras, heredándose los simbioses modificados de forma satisfactoria en la descendencia. Una vez se transformen los simbioses, con genes codificantes de productos anti-*Trypanosoma*, y estos sean insertados en las hembras, se espera diseminar estos insectos mediante el fenómeno de incompatibilidad citoplasmática generado por una cepa de *W. pipientis*, diferente a la de las poblaciones silvestres de *Glossina* (Aksoy et al. 2001). La incompatibilidad citoplasmática, el fenómeno más estudiado y quizá el fenotipo más común que induce *W. pipientis*, produce cruces compatibles sólo entre hembras portadoras de *Wolbachia* y machos portadores del mismo linaje o no portadores, generándose una ventaja reproductiva para las hembras que pueden transmitir *Wolbachia*, facilitando la rápida distribución de este simbiote a través de las poblaciones, mientras en cruces incompatibles, en los que intervienen una hembra no portadora y un macho portador, la mayoría de los huevos no eclosionan o se producen pocos huevos (O'Neill et al. 1997; Stouthamer et al. 1999).

Por otro lado, en los flebótomos, insectos vectores de *Leishmania*, parásito causante de la leishmaniasis, la estrategia con simbioses es un poco diferente pues, hasta la fecha, solo en cuatro especies de estos insectos, *Lutzomyia whitmani*, *L. shannoni*, *Phlebotomus papatasi* y *P. perniciosus*, se ha encontrado la presencia de *W. pipientis* (Zhou et al. 1998, Cui et al. 1999, Ono et al. 2001). En estos insectos, la estrategia experimental sería introducir genes anti-*Leishmania* directamente en los flebótomos y en *Wolbachia* o en los dos y, diseminar los insectos modificados en la población mediante otra cepa de *Wolbachia*, tal como en el caso de las moscas tsetse (Kassem et al. 2003, Benlarbi & Ready 2003, Parvizi et al. 2003). En casos como el de *L. longipalpis* (quien junto con *P. papatasi* son los vectores más importantes de *Leishmania* a nivel mundial), donde no se ha encontrado la presencia de *Wolbachia* en diferentes países incluido Colombia (Giraldo-Calderón et al. 2005), además de insertar el o los genes anti-*Leishmania*, se intentará insertar también un linaje de *Wolbachia* que genere un fenotipo de incompatibilidad citoplasmática.

Observaciones y conclusiones

Como nunca antes en la historia de la biología, en la actualidad se está ahondando en los mecanismos de las relaciones simbióticas, especialmente en las de insectos y bacterias, que, por su antigüedad, pueden aportar valiosa información acerca de las particularidades de los ecosistemas actuales en sus inicios. Las herramientas moleculares han posibilitado una dinámica con alcances sin precedentes. Una muestra, lo constituye la secuenciación de los genomas bacterianos hasta ahora conocidos. La tecnificación de este proceso permite una velocidad creciente, en la medida que ordenadores más potentes están disponibles, las bases de datos genómicos se robustecen y se difunden herramientas tecnológicas de punta como la bioinformática. Es así como en 1995 trabajaron 29 científicos en la secuencia del genoma de *M. genitalium*; en el año 1997, lo hicieron 17 en la de *E. coli*; mientras que en el 2002, tan sólo lo hicieron siete en la de *W. glossinidia*.

La comprensión de los fenómenos evolutivos ha proyectado sus alcances de la mano del conocimiento de las relaciones simbióticas y los modelos biológicos en los que los mecanismos metabólicos que se asocian en rutas sorprendentes, permiten vislumbrar los alcances que la bioquímica puede tener en los procesos de colonización de nuevos ambientes, llegando, incluso, a ser una forma de predecir posibles mecanismos de poblamiento y colonización de mundos extraterrestres.

Aunque las relaciones entre bacterias e insectos son un fenómeno notablemente común en los ecosistemas, la simbiosis que posee las características de mutualista y, más aún, de simbiosis primaria, parece responder a

una serie de procesos moleculares, altamente complejos, que la convierten en un fenómeno raro en la naturaleza. El tránsito desde un parásito estable, inductor de una patología lo suficientemente leve como para no afectar en forma negativa el éxito reproductivo de su hospedero, hasta una relación mutualista y obligada, que confiere un fenotipo ventajoso al hospedero, conlleva, para la bacteria, el singular proceso de la pérdida de aquellos rasgos genómicos que son inútiles en un ambiente intracelular, pero, que simultáneamente, implican la imposibilidad de retornar a un modo de vida libre. Por otra parte, su estadía permanente en el ambiente seguro y estable del medio intracelular del hospedero, según lo que se conoce hasta ahora, sólo ocurre cuando da algo a cambio. Pero, las complejas redes bioquímicas que enlazan bidireccionalmente a simbioses y hospederos no surgen desde el inicio de la relación. Considerando a los simbioses secundarios y a los parásitos, propiamente dichos, como estados tempranos de lo que podría llegar a ser una relación simbiótica, tal como se ha demostrado parcialmente con el descubrimiento del sistema secretor tipo III, en *S. glossinidius*, en la actualidad existiría un vacío en el estudio de la simbiosis como fenómeno bioquímico; este vacío correspondería a relaciones en las cuales, aunque la bacteria resida en bacteriomas, no presente una relación tan marcada y dependiente a nivel genómico, con la reducción de su genoma en aquellos genes necesarios para la vida libre, por un lado y, con la sobreexpresión por el otro, aquellos que codifican la producción de sustancias claves para su hospedero, por el otro.

Para el hospedero, la incorporación de un nuevo genoma a su sistema, implica el rearrreglo de sus mecanismos fisiológicos, especialmente los que son responsables de su sistema inmune, de lo contrario, la relación con su bacteria simbiote no podría superar la fase patogénica debido, principalmente, a una de dos causas: 1) la destrucción de la bacteria como un ente infeccioso o 2) su propio aniquilamiento por la patología inducida por su simbiote, ya sea por la enfermedad *per se*, o por el fenotipo desventajoso que le confiere. Cuando los mecanismos inmunes del insecto no entran en conflicto con la bacteria, las rutas, a la luz de lo que se conoce en la actualidad, discurren por dos senderos principales: 1) la bacteria, como en el caso de *H. defensa*, confiere algún fenotipo ventajoso al insecto, de tal forma que su población crece y, con ella, la de la bacteria o 2) esta, manipula a su hospedero para favorecer su propia diseminación en las poblaciones, aún a costa de algunos miembros de la población hospedera, como en el caso de *W. pipientis*.

Ambos, simbioses primarios y secundarios, han estado y están en la mira de los investigadores en control de plagas. En el caso de los primeros, la idea fundamental es explotar la extrema dependencia que el insecto tiene del aporte de nutrientes de su simbiote; si tal simbiote es eliminado, existe una alta probabilidad de que la población del insecto se deprima drásticamente. Como un factor en contra de este mecanismo, está el hecho de que los simbioses primarios, como se anotó previamente, son un fenómeno extremadamente raro en la naturaleza. Para los segundos, se tienen mejores perspectivas y estas se centran en aquellos simbioses que tienen la habilidad de manipular a su hospedero, ya que esta manipulación se deriva de una profunda alteración de los sistemas reproductivos, lo cual permite hipotetizar el reemplazo de poblaciones o, al menos, la introducción de nuevos rasgos en ellas que modifiquen su potencial como vectoras potenciales de agentes patógenos.

AGRADECIMIENTOS

Aunque la internet provee una vasta cantidad de información acerca de prácticamente cualquier tema, existen una gran cantidad de documentos que por ser muy nuevos o, por el contrario, anteriores al período de las publicaciones en línea, no son fáciles de conseguir. Este fue, justamente, el aporte de mi amigo Felix Alberto Guzmán, quien, generosamente, robó tiempo a su agenda de estudiante doctoral en la Universidad de Utah y, en forma oportuna, nos proveyó de la bibliografía que le solicitamos. El Profesor James Montoya Lerma, es el germen de este documento y, pacientemente y con gran gentileza, nos orientó acerca de la arquitectura adecuada para su confección. El profesor Collin Dale, de la Universidad de Utah, nos asistió a tiempo y con una rapidez sorprendente, cuando se le formularon inquietudes, algunas de las cuales ampliaron nuestra perspectiva del fenómeno de la simbiosis, notablemente.

LITERATURA CITADA

- Akman, L., A. Yamashita, H. Watanabe, K. Oshima, T. Shiba, M. Hattori, & S. Aksoy. 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*, 32: 402-407.
- Akman, L. & S. Aksoy. 2001. A novel application of gene arrays: *Escherichia coli* array provides insight into the biology of the obligate endosymbiont of tsetse flies. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98 (13): 7546-7551.
- Aksoy, S. 1995. *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (4): 848-851.
- Aksoy, S. 2003. Symbiosis in tsetse. Pag 53-65 *en* *Insect Symbiosis* (K. Bourtzis & T. Miller, eds). CRC Press, Boca Ratón.
- Aksoy, S., I. Maudlin, C. Dale, A. Robinson & S.L. O'Neill. 2001. Prospects for control of African Trypanosomiasis by tsetse vector manipulation. *Trends in Parasitology*, 17: 29-35.
- Andersson, J.O. 2000. Evolutionary genomics: Is *Buchnera* a bacterium or an organelle?. *Current Biology*, 10 (23): 866-868.
- Bandi, C., M. Sironi, G. Damiani, L. Magrassi, C.A. Nalepa, U. Laudani & L. Sacchi. 1995. The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proceedings of the Royal Society of London series, B* 259: 293-299.
- Baumann, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59: 155-189.
- Beard, C.B., S.L. O'Neill, P.W. Mason, L. Mandelco, C.R. Woese, R.B. Tesh, F.F. Richards & S. Aksoy. 1993. Genetic transformation and phylogeny of bacterial symbionts from tsetse. *Insect Molecular Biology*, 1: 123-131.
- Beard, C.B., E.M. Dotsona, P.M. Penningtona, S. Eichler, C. Cordon-Rosalesa & R.V. Durvasula. 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 31: 621-627.
- Beard, C.B., C. Cordon-Rosales & R.V. Durvasula. 2002. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual Review of Entomology*, 47: 123-141.
- Benedict, M.Q. & A.S. Robinson. 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: An argument for the sterile insect technique. *Trends in Parasitology*, 19(8): 349-355.
- Benlarbi, M. & P.D. Ready. 2003. Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae), and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. *Bulletin of Entomological Research* 93(5): 383-391.
- Bechnel, J.J. & A.W. Sweeney. 1990. *Amblyospora trinus* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the Australia mosquito *Culex halifaxi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Protozoology*, 37: 854-592.
- Blattner, F.R., G. Plunkett III, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau & Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277 (5331): 1453-1462.
- Bourtzis, K. & T. Miller (eds). 2003. *Insect Symbiosis* CRC Press, Boca Ratón.
- Braendle, C., T. Miura, R. Bickel, A.W. Shingleton, S. Kambhampati & D.L. Stern. 2003. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-*Buchnera* Symbiosis. *PLoS Biology, Public Library of Science Biology*, 1 (1): 70-76.
- Breeuwer, J.A..J. & J.H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346:558-60.
- Cheng, L.W. & O. Schneewind. 2000. Type III machines of Gram-negative bacteria: Delivering the goods. *Trends in Microbiology*, 8 (5): 214-220.
- Chen, X., S. Li & S. Aksoy. 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: Molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *Journal of Molecular Evolution*, 48:49-58.

- Cheng, Q., T. Ruel, W. Zhou, S. Moloo, P. Majiwa, S.L. O'Neill & S. Askoy. 2000. Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 51-55.
- Crampton, J. M. 1994. Approaches to vector control: New and trusted. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88 (2): 141-143.
- Cui, L., S-H. Chang, D. Strickman & E. Rowton. 1999. Frequency of *Wolbachia* infections in laboratory and field sandfly (Diptera: Psychodidae) populations. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(4): 571-572.
- Dale, C. & I. Maudlin. 1999. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 267-275.
- Dale C. & N.A. Moran. 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126: 453-465.
- Dale, C. S.A. Young, D. T Haydon & S.C. Welburn. 2001. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98: 1883-1888.
- Douglas, A.E. 2003. *Buchnera* bacteria and other symbionts of aphids. Pag: 23-38 *en* *Insect Symbiosis* (K. Bourtzis & T. Miller, eds). CRC Press, Boca Ratón.
- Douglas, A.E., L.B. Minto & T.L. Wilkinson. 2001. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 349-358.
- Douglas, A.E. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43:17-37.
- Douglas, A.E. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biology Reviews* 64:409-434.
- Durvasula, R.V., A. Gumbs, A. Panackal, O. Kruglov, J. Taneja, A.S. Kang, C. Cordon-Rosales, F.F. Richards, R.G. Whitham & C.B. Beard. 1999. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Medical and Veterinary Entomology*, 13: 115-119.
- Durvasula, R.V., A. Gumbs, A. Panackal, O. Kruglov, S. Aksoy, R.B. Merreiffeld, F.F. Richardas & C.B. Beard. 1997. Prevention of insect-borne diseases: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (7): 3274 - 3278.
- Ewald, P.W: 1987. Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 503 (1): 295-306.
- Falabella, P., E. Tremblay & F. Pennacchio. 2000. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: The role of teratocytes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97 (1): 1-9.
- Fraser C.M., J.D. Gocayne, O. White, M.D. Adams, R.A. Clayton, R.D. Fleischmann, C.J. Bult, A.R. Kerlavage, G. Sutton, J.M. Kelley, J.L. Fritchman, J.F. Weidman, K.V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T.R. Utterback, D.M. Saudek, C.A. Phillips, J.M. Merrick, J.F. Tomb, B.A. Dougherty, K.F. Bott, P.C. Hu, T.S. Lucier, S.N. Peterson, H.O. Smith, C.A. Hutchison III & J C. Venter. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 397-404.
- Fuxa, J.R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Annual Review of Entomology*, 32: 225-251.
- Gil, R., B. Sabater-Muñoz, A. Latorre, F.J. Silva, & A. Moya. 2002. Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 99: 4454-4458.
- Gil, R., A. Latorre & A. Moya. 2004. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology*, 6 (11): 1109-1122.

- Gil, R., F.J. Silva, E. Zientz, F. Delmotte, F. González-Candelas, A. Latorre, C. Rausell, J. Kamerbeek, J. Gadau, B. Hölldobler, R.C.H.J. van Ham, R. Gross, & A. Moya. 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 100: 9388-9393.
- Gill, S.S., E. A. Cowles & P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology, 37: 615-36.
- Giraldo-Calderón, G.I., J. Montoya, C.B. Ocampo. 2005. Determinación de la presencia del endosimbionte bacteriano *Wolbachia* (Rickettsiales) en individuos de *Lutzomyia longipalpis* y *L. evansi* (Diptera: Psychodidae) de Colombia. en: XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical. Bogotá-Colombia 2. Biomédica. Supl., No.1. 25: 169 p.
- Guerrero, R., C. Pedrós-Alfó, I. Esteve, J. Mas, D. Chase & L. Margulis. 1986. Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 83: 2138-2142.
- Handler, A.M & A.A. James. 2000. Insect Transgenesis. Methods and Applications., CRC Press EEUU. 397 p.
- Hentschel, U., M. Steinert & J. Hacker. 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. Trends in Microbiology, 8(5): 226-231.
- Hertig, M. 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipiensis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. Parasitology, 28:453-486.
- Hertig, M. & S.B. Wolbach 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. Journal of Medical Research, 44: 329-374.
- Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(2): 379-433.
- Hurst, G.G.D., & J.H. Werren 2001. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. Nature Reviews Genetics, 2: 597-606.
- Ishikawa, H. 2003. Insect symbiosis: An introduction. Pp. 1-22, en Insect Symbiosis (K. Bourtzis & T. Miller, eds). CRC Press, Boca Ratón.
- James, A.A. 2000. Control of disease transmission through genetic modification of mosquitoes. Pp. 319-333 en Insect transgenesis. Methods and applications (A.M. Handler & A.A. James eds). CR Press. Boca Ratón.
- Kassem, H.A, A.N Asan, I. Abdel-Hamid, G. Osman, E.M. El Khalab & M.A. Madkour. 2003. *Wolbachia* infection and the expression of cytoplasmic incompatibility in sandflies (Diptera: Psychodidae) from Egypt. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 97(6): 639-644.
- Kittayapong, P., V. Baimal & S.L. O'Neill. 2002. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 66(1): 108-111.
- Koga, R., T. Tsuchida., & T. Fukatsu. 2003. Changing patterns in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 270: 2543-2550.
- Koivisto, R.K.K. & H.R. Braig. 2003. Microorganisms and parthenogenesis. Biological Journal of the Linnean Society, 79: 43-58.
- Kraaijeveld, A.R., E.C Limentani & H.C.J Godfray. 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 268(1464): 259-261.
- Lai, C.Y., L. Baumann & P. Baumann. 1994. Amplification of trpEG: Adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. PNAS, Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 91: 3819-3823.
- Lipsitch, M., M.A. Nowak, D. Ebert & R.M. May. 1995. The population dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 260: 321-327.
- Lo, N., C. Bandi, H. Watanabe, C. Nalepa, & T. Beninati. 2003. Evidence for co-cladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. Molecular Biology and Evolution, 20: 907-913.
- Macdonald, T.T. & G. Monteleone. 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. Science, 307(5717): 1920-1925.

- Moran, N.A. 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 93: 2873-2878.
- Moran N.A. 2001. Bacterial menageries inside insects. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98(4): 1338-1340.
- Moran, N.A., M.A. Munson, P. Baumann, & H. Ishikawa. 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 253: 167-171.
- Moran, N.A., G. Plague, J. Sandström, & J. Wilcox. 2003. A genomic perspective on nutrient-provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100: 14543-14548.
- Moran, N.A., P.H. Degnan, S.R. Santos, H.E. Dunbar & H. Ochman 2005a. The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 16919-16926.
- Moran, N.A., J.A. Russell, R. Koga & T. Fukatsu. 2005b. Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6): 3302-3310.
- Moya, A., A. Latorre, B. Sabater, & F.J. Silva. 2002. Comparative molecular evolution of primary (*Buchnera*) and putative secondary endosymbionts of aphids based on two protein-coding genes. *Journal of Molecular Evolution*, 54: 127-137.
- Munson, M.A., P. Baumann, M.A. Clark, L. Baumann, N.A. Moran, D.J. Voegtlin, & B.C. Campbell. 1991. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *Journal of Bacteriology*, 173(20): 6321-6324.
- National Science Foundation. 2006. *Wolbachia*. <http://www.wolbachia.sols.uq.edu.au/index.html>. (Consultada el 01/12/2006).
- Nilsson, A.I., S. Koskiniemi, S. Eriksson, E. Kugelberg, J.C.D. Hinton & D.I. Andersson. 2003. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 102(34): 12112-12116.
- Nogge, G. 1981. Significance of symbionts for the maintenance of an optional nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods. *Parasitology*, 82: 101-104.
- Nogge, G. 1976. Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Wetswood) caused by loss of symbionts. *Experientia*, 32: 995-996.
- Nogge, G. & A. Gerresheim. 1981. Experiments on elimination of symbionts from *tsetse fly*, *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae), by antibiotics and lysozyme. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 166-179.
- Oliver, K.M., N.A. Moran, & M.S. Hunter. 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 102: 12795-12800.
- Olsen, K., K.T. Reynolds & A.A. Hoffmann. 2001. A Field cage test of the effects of the endosymbiont *Wolbachia* on *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 86: 731-737.
- Oliver, K.M., J.A. Russell, N.A. Moran & M.S. Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 100: 1803-1807.
- O'Neill, S.L. 1995. *Wolbachia pipientis*: Symbiont or parasite?. *Parasitology Today*, 11(5): 168-169.
- O'Neill, S.L., A.A. Hoffmann & J.H. Werren (Eds). 1997. *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Ono, M., H.R. Braig, L.E. Munsterman, C. Ferro & S.L. O'Neill. 2001. *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(2): 237-241.
- Parvizi, P., M. Benlarbi & P.D. Ready. 2003. Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical and Veterinary Entomology*, 17:351-362.
- Rasgon, J.L. & T.W. Scott. 2004. An initial survey for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections in selected California mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(2): 255-257.

- Riehle, M.A., P. Srinivasan, C.K. Moreira & M. Jacobs-Lorena. 2003. Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. *Journal of Experimental Biology*, 206: 3809-3816.
- Rio, R.V. M., Y-n. Wu, G. Filardo & S. Aksoy. 2006. Dynamics of multiple symbiont density regulation during host development: Tsetse fly and its microbial flora. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 273(1588): 805-814
- Ruang-areerate, T., & P. Kittayapong. 2006. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: A potential gene driver of dengue vectors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 103:12534-12539.
- Russell, J.A. & N.A. Moran. 2005. Horizontal transfer of bacterial symbionts: Heritability and fitness effects in a novel aphid host. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 7987-7994.
- Sacchi, L., E. Bigliardi, S. Corona, T. Beninati, N. Lo & A. Franceschi. 2004. A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue & Cell*, 36:43-53.
- Sasaki, T., M. Kawamura & H. Ishikawa. 1996. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolisms. *Journal of Insect Physiology*, 42(2): 125-129.
- Sasaki, T. & H. Ishikawa. 1995. Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* 41: 41-46.
- Scarborough, C.L., J. Ferrari & H.C. Godfray. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755): 1781.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 775-806.
- Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, & H. Ishikawa. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407: 81-86.
- Silva, F.J., A. Latorre & A. Moya. 2001. Genome size reduction through multiple events of gene disintegration in *Buchnera* APS. *Trends in Genetics*, 17(11): 615-618.
- Sinkins, S.P., C.F. Curtis & S.L. O'Neill. 1997: The potential applications of inherited symbionts systems to pest control. Pp. 155-175, en *Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction*. (S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann & J.H. Werren, eds.). Oxford University Press, Oxford.
- Sinkins, S.P. & H.C.J. Godfray. 2004. Use of *Wolbachia* to drive nuclear transgenes through insect populations. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 271: 1421-1426.
- Stouthamer, R., J. A.J. Breeuwer, & G.D.D. Hurst. 1999. *Wolbachia pipiensis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53:71-102.
- Sutakova, G. & J. Rehacek. 1981. Endosymbionts in *Dermacentor andersoni* ticks (Ixodidae): an electron microscope study. *Experimenta and Applied Acarology*, 11: 57-72.
- Tamas, I., L. Klason, B. Canback, A.K. Naslund, A.S. Eriksson, J.J. Wernegreen, J.P. Sandström, N.A. Moran, S.G.E. Andersson. 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296: 2376-2379.
- Thao, M.L.L & P. Baumann. 2004. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3401-3406.
- Thorne, B.L. 1990. A case for ancestral transfer of symbionts between cockroaches and termites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 241:37-41.
- Thorne, B.L. 1991. Ancestral transfer of symbionts between cockroaches and termites: an alternative hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 246: 191-195.
- Van Ham, R.C., J. Kamerbeek, C. Palacios, C. Rausell, F. Abascal, U. Bastolla, J.M. Fernandez, L. Jimenez, M. Postigo & F.J. Silva. 2003. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 100: 581-586.
- Von Dohlen, C.D., Kohler, S., Alsop, S.T., Mc Manus, W.R. 2001. Mealybug β -proteobacterial endosymbionts contain γ -proteobacterial symbionts. *Nature*, 412: 433-436.
- Voronin, D.A., N.V. Dudkina, & E.V. Kiseleva. 2004. A new form of symbiotic bacteria *Wolbachia* found in the endoplasmic reticulum of early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Doklady Biological Sciences*, 396: 227-229.

- Weeks, A.R., K.T. Reynolds & A.A. Hoffmann. 2002. *Wolbachia* dynamics and host effects: What has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology and Evolution*, 17(6): 257- 262.
- Weeks, A.R., R. Velten & R. Stouthamer. 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270: 1857-1865.
- Werren, J.H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42: 587-609.
- Werren, J.H. & S.L. O'Neill. 1997. The evolution of heritable symbionts. Pp. 1-41, en: *Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction* (S.L. O'Neill, A.A. Hoffman & J.H. Werren, eds). Oxford University Press, Oxford.
- Whalon, M.E. & Byron A. Wingerd. 2003. Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54: 200-211.
- Whitehead, L.F. & A.E. Douglas. 1993. A metabolic study of *Buchnera*, the intracellular bacterial symbionts of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Genetic Microbiology* 139, 821-826.
- Williamson, D.L., R.F. Whitcomb, J.G. Tully, G.E. Gasparich, D.L. Rose, P. Carle, J.M. Bove, K.J. Hackett, J.R. Adams, R.B. Henegar, M. Konai, C. Chastel & F.E. French. 1998. Revised group classification of the genus *Spiroplasma*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:1-12.
- Wilkinson, T.L. 1988. The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 119: 871-881.
- Wu, D., S.C. Daugherty, S.E. Van Aken, G.H. Pai, K.L. Watkins, H. Khouri, L.J. Tallon, J.M. Zaborsky, H.E. Dunbar, P.L. Tran, N.A. Moran & J.A. Eisen. 2006. Metabolic complementarity and genomics of the dual symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biology*, Public Library of Science Biology, 4(6): 1079-1092.
- Xi, Z., J.L. Dean, C. Khoo & S.L. Dobson. 2005. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 903-910.
- Yen, J.H. & A.R. Barr. 1971. New hypothesis of the cause of the cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, 232: 657-658.
- Yen, J.H. & A.R. Barr. 1973. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Journal of Invertebrate pathology*, 22: 242-250.
- Youn, G.M., D.H. Schmiel & V.L. Miler. 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96: 6456-6461.
- Zchori-Fein, E., Y. Gottlieb, S.E. Kelly, J.K. Brown, J.M. Wilson, T.L. Karr & M.S. Hunter. 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98(22): 12555-12560.
- Zhou, W., F. Rousset, & S. O'Neill. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 265: 509-515.