

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Katedra Parazitologie



Bakalářská práce

Molekulární fylogenetika primárních endosymbiontů hmyzu

Benjamín Skála

Vedoucí práce: prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

České Budějovice 2009

Skála, B., 2009: Molekulární fylogenetika primárních endosymbiontů hmyzu [Molecular Phylogenetics of Primary Endosymbionts of Insects]. Bachelor thesis, in Czech. 20 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Molecular phylogeny and evolution of the bacterial Primary symbionts in insects pose several complex questions in respect to the methodology and theory of molecular phylogenetics. This thesis provides an introduction to the biology of the Primary symbionts and the main aspects of their phylogeny.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30. dubna 2009

.....

Benjamín Skála

Poděkování:

Rád bych poděkoval mému školiteli Václavu Hypšovi.

Obsah

1. Úvod 1
2. Primární endosymbionti 1
 - 2.1. *Buchnera* 2
 - 2.2. *Wigglesworthia* 5
 - 2.3. *Blochmannia* 6
 - 2.4. Další primární endosymbionti hmyzu 6
3. Fylogenetické vztahy mezi P-endosymbionty hmyzu ze skupiny Enterobacteriaceae 10
4. Primární endosymbionti a molekulární fylogenetika 11
5. Závěr 13
6. Literatura 15

Úvod

V tělech hmyzu a jiných členovců, přímo v tělních buňkách, žijí různé druhy bakteriálních endosymbiontů. Odhaduje se, že endosymbionty hostí kolem 10 až 15 % hmyzích druhů (Wernegreen, 2004). Lze je dělit do dvou ekologicky vymezených skupin: na primární (P) a sekundární (S) endosymbionty (obligátní a fakultativní – Dale et Moran, 2006). Toto rozdělení ale nijak neodráží jejich příbuzenské vztahy, ty jsou podstatně složitější a endosymbióza vzniká mnohonásobně ve fylogenetické blízkosti volně žijících bakterií. Zvláštním případem primární endosymbiózy jsou ko- primární endosymbionti (Takiya et al., 2006), tj. dva druhy P-endosymbiontů žijící v jednom hostiteli.

Primární endosymbióza je v poslední době intenzivně zkoumána. Praktický dopad přítomnosti endosymbiontů je zřejmě obrovský, Moran a Telang (1998) uvažují i o jejich vlivu na bohatství fauny hmyzu: k velkému úspěchu hmyzu podle nich přispívá mj. jejich snadné soužití s bakteriemi. Endosymbionti mohou díky svému charakteristickému způsobu života sloužit také jako biologické modely, pro které je typická kupř. zrychlená evoluce, častý bottleneck efekt (při každém množení hostitele) a podobně (Moran, 1996).

Primární endosymbionti

Primární endosymbionti se vyskytují obvykle u hmyzu potravně specializovaného na nutričně nevyvážené zdroje a poskytují mu některé nedostatkové látky, vztah s hostitelem je tedy mutualistický. Žijí ve specializovaných buňkách zvaných bakteriocyty (mycetocyty). Ty jsou buď rozptýleny po těle, nebo se shlukují a vytvářejí orgán bakteriom (mycetom). Šíří se vertikálně, do další generace hostitele se dostávají různými způsoby, většinou přes vajíčko (Wernegreen, 2002).

Primární endosymbionti jsou charakterističtí redukcí svého genomu, ztratili řadu genů potřebných k nezávislému způsobu života. Zatímco genom bakterie *Escherichia coli* obsahuje až přes 5000 protein kódujících genů, nejredukovanější genom endosymbionta *Carsonella ruddii* (stejně jako *E. coli* zástupce skupiny γ -Proteobacteria) jich má pouhých 182 (Nakabachi et al., 2006). Spolu s redukcí genomu se také snižuje GC obsah. Ve velkém množství se exprimují geny tepelného šoku, jako je např. chaperonin groEL. Symbiont *Enterobacter aerogenes* (Enterobacteriaceae) dokonce změnil tento chaperonin na toxin, který využívá hostitel mravkolev *Myrmeleon bore* (Yoshida et al., 2001). Typická pro

endosymbionty je koevoluce s hostitelem, starobylost jejich linií a zrychlené tempo substitucí (Moran et Baumann, 2000).

Laboratorní odstranění endosymbiontů z těla hostitele zvýšením teploty, antibiotiky či baktericidním enzymem lysozymem vede ke sterilitě a snížení váhy těla a délky života hostitele (Chen et al., 1996).

Primární endosymbionty je velice obtížné pěstovat v laboratorních kulturách, leccos o nich (kupř. o jejich biochemii) se však můžeme dozvědět z již publikovaných kompletních genomů těchto bakterií (Wernegreen, 2002).

Užití klasických molekulárně-fylogenetických metod pro zkoumání míry příbuznosti mezi P-endosymbionty i mezi P-endosymbionty a ostatními bakteriemi se nevyhne určitým problémům, které jsou dány některými z jejich výše naznačených charakteristických znaků.

Nejpodrobněji zkoumaným P-endosymbiontem je *Buchnera* žijící v tělech mšic. Bakteriální symbionty mšic poprvé zaznamenal T. H. Huxley v 19. století (Douglas, 2003). Fylogenetické vztahy buchnery jsou také nejvíce zkoumané, *Buchnera* se stala prvním kompletně osekvenovaným P-endosymbiontem (Shigenobu et al., 2000); zájem o ni je také živěn tím, že má mezi blízkými příbuznými další zajímavé P-endosymbionty.

Buchnera

Buchnera aphidicola patří do skupiny Enterobacteriaceae gamma-proteobakterií. Je P-endosymbiontem mšic a žije ve vezikulech jejich mycetocytů, kterých je v jedné mšici 60-80 (Shigenobu et al., 2000) a z nichž se při množení hostitele přenáší přes hemolymfu do oplozeného vajíčka. Buňky buchnery jsou Gram-negativní, kulovitého tvaru, v průměru velké 2 – 5 μm (Janda, 2006). Změna velikosti průměru ani objemu buňky v závislosti na stáří mšice není signifikantní, velikost buchner v mšicích starých 10 dní je zhruba stejná jako v mšicích starých 50 dní (Nakabachi et Ishikawa, 2000).

Pro svého hostitele je *Buchnera* důležitá např. syntézou esenciální aminokyseliny tryptofanu nebo vitamínu riboflavinu (Nakabachi et Ishikawa, 1999). Naopak geny pro neesenciální aminokyseliny chybí, buchnery využívají produkty obsažené v cytoplazmě mycetocytů (Shigenobu et al., 2000). U mšice *Aphis fabae* bylo zkoumáno množství esenciálních aminokyselin, které *Buchnera* hostiteli poskytuje (Douglas et al., 2001; Douglas, 2003). Relativně nejvíce poskytuje fenylalanin (z vyrobeného množství $0,28 \times 10^{-15}$ molů denně jedna buňka buchnery poskytne 76 %), nejvíce syntetizuje leucin (z $0,33 \times 10^{-15}$ molů hostitel využije 74 %). U většiny esenciálních aminokyselin mšice využije nadpoloviční

většinu vyrobeného množství, výjimkou je tryptofan (z $0,02 \times 10^{-15}$ molů hostitel využije 19 %). *Buchnera* kmene APS má 54 genů kódujících bílkoviny pro syntézu všech aminokyselin esenciálních pro mšice (Shigenobu et al., 2000).

Buchnera má stejně jako ostatní P-endosymbionti značně redukovaný genom včetně ztráty genů pro reparaci DNA. *Buchnera* je ale jediný známý organismus, který ztratil i gen *recA* (*recBCD* zůstaly zachovány), gen, který je nejzásadnější součástí systému pro homologní rekombinace, opravy a údržbu DNA (Shigenobu et al., 2000). Přítomný ale nefunkční gen je ještě znám z genomu pouhých dvou bakterií ze skupiny Mollicutes. Ty mají gen *recA* zkrácený na prvních 390 nukleotidů (*Spiroplasma citri*), či jinak pozměněn (*Spiroplasma melliferum*), a tak nedostačující (Marais et al., 1996).

Na rozdíl od jiných Gram-negativních bakterií *Buchnera* neprodukuje žádné polyaminy s výjimkou spermidinu, který vyrábějí enzymy kódované geny *speD* a *speE*. Chybí i významné polyaminy ostatních prokaryot jako putrescin či kadaverin. Obsah spermidinu je nejvyšší u mladých mšic (Nakabachi et Ishikawa, 2000). *Buchnera* také postrádá lipopolysacharidy ve své vnější buněčné membráně. Chybí jí také geny *motA* a *motB*, které jsou důležité pro aktivitu bičíku. Naopak zástupci dobře prozkoumaného kmene APS si ponechali aparát pro glykolýzu. Jak je pro P-endosymbionty charakteristické, společně s redukcí genomu se snižuje GC obsah. U kmene APS činí zhruba 26 % (Shigenobu et al., 2000).

Pro *Buchneru* je charakteristické, že ve větší míře exprimuje geny pro proteiny tepelného šoku. Mezi ně patří *groEL* (57,3 kDa), *groES* (10,3 kDa), což jsou chaperony *Hsp60*, resp. *Hsp10* (zvané někdy chaperoniny), *dnaK* (*Hsp70*), *dnaJ* (*Hsp40*; pomocný protein pro chaperony *Hsp70*) nebo *rpoH*. *RpoH* je gen pro σ^{32} , σ -faktor, který spouští expresi genů tepelného šoku tím způsobem, že se při zvýšení teploty uvolní z komplexu s pomocným proteinem *dnaJ* a ten pak umožňuje vazbu RNA-polymerázy k promotorům proteinů tepelného šoku. Z nich je nejvíce produkován *groEL*, *groES* i *dnaKJ* jsou v buňce zastoupeny v podstatně nižších koncentracích (Sato et Ishikawa, 1997b; Baumann et al., 2006). *Buchnera* totiž proteiny *groEL* exprimuje i při normální teplotě. Mšice při teplotě 23°C stará 9 dní obsahuje $1,6 \times 10^5$ molekul *groEL* na μm^3 objemu buňky. To je podobné množství jako u *E. coli* při teplotě 46°C (Baumann et al., 1996). Nadprodukce *groEL* je pro *Buchneru* prospěšná z několika důvodů. Část proteinu přechází do hemolymfy mšice. Zde může obalovat virové částice rostlinných virů (luteoviru), které se sem dostávají ze zaživacího traktu mšice, která se živí šťávami napadané rostliny. Viry jsou tak zachovány v infekční formě a přes slinné žlázy mšice se mohou přesunout na jinou rostlinu (Hogehout et al., 1998). Infikované rostliny mají

větší podíl živin ve šťávě (Blua et al., 1994), jejich přenos je tedy pro mšici a tudíž i pro její symbionty výhodný. Další výhoda pro buchneru z nadprodukce groEL může plynout z obecné vlastnosti chaperonů skládat právě translatované proteiny do funkční terciální struktury. Chaperony tak mohou částečně kompenzovat akumulované substituce aminokyselin, ke kterým častěji dochází právě v redukováném genomu P-endosymbiontů, kde chybí některé proteiny důležité pro reparaci DNA (Baumann et al., 2006).

Protein groEL buchcery je v pořadí aminokyselin z 85,8 % shodný s groEL u *E. coli* (Ohtaka et al., 1992). Strukturou je s groEL u *E. coli* shodný, je také složen ze 14 podjednotek, které – stejně jako u *E. coli* – vytvářejí dva kruhy o sedmi jednotkách. Dříve byl nazýván symbionin, zkráceně symL, groES pak symS (Sato et Ishikawa, 1997a). Stejně jako u *E. coli* mají proteiny groEL a groES společný operon groESL (symSL), ze kterého se transkribuje mRNA dlouhá 2,1 kb (Sato et Ishikawa, 1997a). U kmene APS buchcery není groEL (na rozdíl od např. menšího genomu kmene Cc) popsán v databázi Genbank, odpovídá mu však gen mopA, který přirozeně chybí v chromozomech s groEL.

Buchnera je polyploidní, obsahuje kolem 120 kopií genomu na buňku (Komaki et Ishikawa, 1999). Kromě chromozómů obsahuje i několik plazmidů. V nich se nacházejí např. geny pro syntézu tryptofanu či leucinu (geny leuABCD nalezené v plazmidu pLeu některých kmenů buchcery).

Buchnera byla objevena u řady druhů mšic, pravděpodobně žije u většiny druhů, některé druhy tribu Cerataphidini ji však postrádají (Baumann et al., 1995) a místo ní mají houbovité mikroorganismy, tedy Eukaryota. Genom je přečtený zatím u čtyř kmenů: APS (*Acyrtosiphon pisum*), Bp (*Baizongia pistaciae*), Cc (*Cinara cedri*), Sg (*Schizaphis graminum*). Jsou také přečteny genomy kmenů 5A a Tuc7, oba z *Acyrtosiphon pisum*. Počet protein kódujících genů je variabilní, nejvíce jich má kmen APS (564; další kmene z druhu *Acyrtosiphon pisum* se mu počtem genů velmi podobají), daleko nejméně pak Cc (357). Tento kmen již není schopen zastávat některé biosyntetické procesy důležité pro hostitele (syntéza tryptofanu či riboflavinu), jeho činnost nahrazuje S-symbiont *Serratia symbiotica*, taktéž člen skupiny Enterobacteriaceae (Pérez-Brocal et al., 2006). Počet bází v genomu kmene Cc se blíží horní hranici známé u mitochondrií suchozemských rostlin a podobnými organelami se tyto buchcery možná v budoucnu stanou, pokud ovšem nevymřou (Andersson, 2006). Porovnání genomů ostatních kmenů buchcery ale naopak ukazuje velkou stabilitu genomu – při srovnání kmenů Sg a APS nebylo nalezeno žádné získání genu či přeskupení chromozomu za posledních 50 až 70 milionů let (Tamas et al., 2002).

Soužití buchcery s mšicemi je evolučně staré. Infikace předka mšic bakterií, ze které se vyvinuly dnešní buchcery, se odehrálo před 160-280 milióny lety (Douglas, 1997), nebo v této době alespoň vznikl horizontální přenos těchto bakterií. *Buchnera* má shodnou fylogenezi s mšicemi i na velmi nízké úrovni (Funk et al., 2000). Od *E. coli* *Buchnera* divergovala před zhruba 420 miliony lety (Unterman et al., 1989).

Kromě buchcery se v tělech mšic vyskytují různí S-endosymbionti, často také ze skupiny Enterobacteriaceae (Baumann et al., 2006). Např. u kalifornských mšic druhu *Acyrtosiphon pisum* byl pomocí PCR nalezen S-endosymbiont (nazvaný PASS – pea aphid secondary symbiont) u téměř 88 % jedinců (Chen et Purcell, 1997). U téhož druhu mšice byl nalezen i exkluzivní kmen rickettsie (PAR – pea aphid rickettsia) podle sekvencí 16S rDNA příbuzný druhu *Rickettsia bellii* (Chen et al., 1996). S-endosymbiontů mšic je celá řada. Fukatsu (2001) objevil S-endosymbionta mšic rodu *Yamatocallis* (YSMS). Teprve v posledních letech se přistupuje k popisování S-endosymbiontů klasickými rodovými a druhovými jmény. U mšic podčeledi Lachninae (kam patří také *Cinara cedri*, hostitel buchcery Cc) byla popsána bakterie *Serratia symbiotica* (Lamelas et al., 2008), která patří do stejného rodu ke známým patogenům; rod *Serratia* patří také do čeledi Enterobacteriaceae. Dalšími S-endosymbionty z této skupiny proteobakterií jsou např. *Hamiltonella defensa* a *Regiella insecticola* (Moran et al., 2005). O regielle bylo zjištěno, že podporuje rezistenci hostitele vůči patogenům a tak zvyšuje fitness mšic (Scarborough et al., 2005). S-endosymbionti mšic jsou na rozdíl od buchcery tyčinkovité bakterie. Žijí ve zvláštních buňkách částečně obklopujících bakteriom s buchnerami.

Wigglesworthia

Wigglesworthia glossinidia patří také do skupiny Enterobacteriaceae. Žije v cytoplazmě bakteriocytů ve tvaru písmene U, které jsou umístěny v přední části střeva (Janda, 2006) much tse-tse (*Glossina*, Diptera: Glossinidae), tedy v krevsajícím hmyzu (Aksoy, 1995). Do nové generace hostitele se šíří přes přídatné pohlavní žlázy (tzv. „mléčné žlázy“), které vyživují larvy v uteru. Soužití bakterie s předkem mochy tse-tse je staré nejméně 50 miliónů let (Aksoy et al., 1997). Hostiteli *Wigglesworthia* poskytuje vitamíny skupiny B. V genomu této bakterie se zachovalo 62 genů pro biosyntézu látek, které využívá moucha tse-tse.

V redukovaném genomu se nezachoval např. gen *dnaA* důležitý pro replikaci DNA. Oproti buchneře však zůstaly zachovány geny pro glukoneogenezi, biosyntetický řetězec CoA produkující acetyl-CoA z kyseliny pantothenové či aparát bičíku (Akman et al., 2002).

Wigglesworthia byla popsána z mouchy *Glossina morsitans morsitans* (Aksoy, 1995), ale žije i v dalších druzích (*Glossina tachinoides*, *Glossina palpalis* apod.). Kompletní genom je zveřejněn zatím pouze jeden, a to z kmene žijícího v druhu *Glossina brevipalpis*. Obsahuje 611 protein kódujících genů.

Kromě wigglesworthie žijí v mouchách tse-tse další dvě symbiotické bakterie. S-endosymbiont *Sodalis glossinidius* ze skupiny γ -Proteobacteria a *Wolbachia* (α -Proteobacteria). *Sodalis* žije ve střední části střeva, v hemolymfě i jinde (Cheng et Aksoy, 1999; Baumann et al., 2006). Je blízkým příbuzným P-endosymbionta nosatce *Sitophilus oryzae* pojmenovaného SOPE („*Sitophilus oryzae* primary endosymbiont“), není ale jasné, zda jde přímo o nardonellu, P-endosymbionta nosatců (Rio et al., 2004).

Blochmannia

Blochmannia je dalším P-endosymbiontem ze skupiny Enterobacteriaceae. Žije v cytoplazmě bakteriocytů mravenců rodů *Formica* a *Camponotus*, které jsou umístěny v epiteliálních buňkách ve střední části střeva královny i dělnic. Tito mravenci se živí převážně rostlinnými šťávami (floemem) a medovicí. Čím blochmannie mravencům pomáhají, není známo zcela přesně (Baumann et al., 2006), ale leccos lze odvodit ze složení jejich genomu: syntetizují esenciální aminokyseliny, rozkládají močovinu, redukují sulfáty (Gil et al., 2003). Stáří tohoto soužití je odhadováno na více než 100 milionů let (Schröder et al., 1996). Toto číslo ale vychází ze srovnání s buchnerou, jejíž soužití s mšicemi je podle novějších prací ještě starší (Douglas, 1997). Formálně je rozlišováno mnoho druhů rodu *Blochmannia*, které se zpravidla jmenují podle hostitele (Sauer et al., 2000). Jsou osekvenovány dva kompletní genomy ze druhů *Blochmannia floridanus* a *Blochmannia pennsylvanicus* (583, resp. 610 protein kódujících genů).

Další primární endosymbionti hmyzu

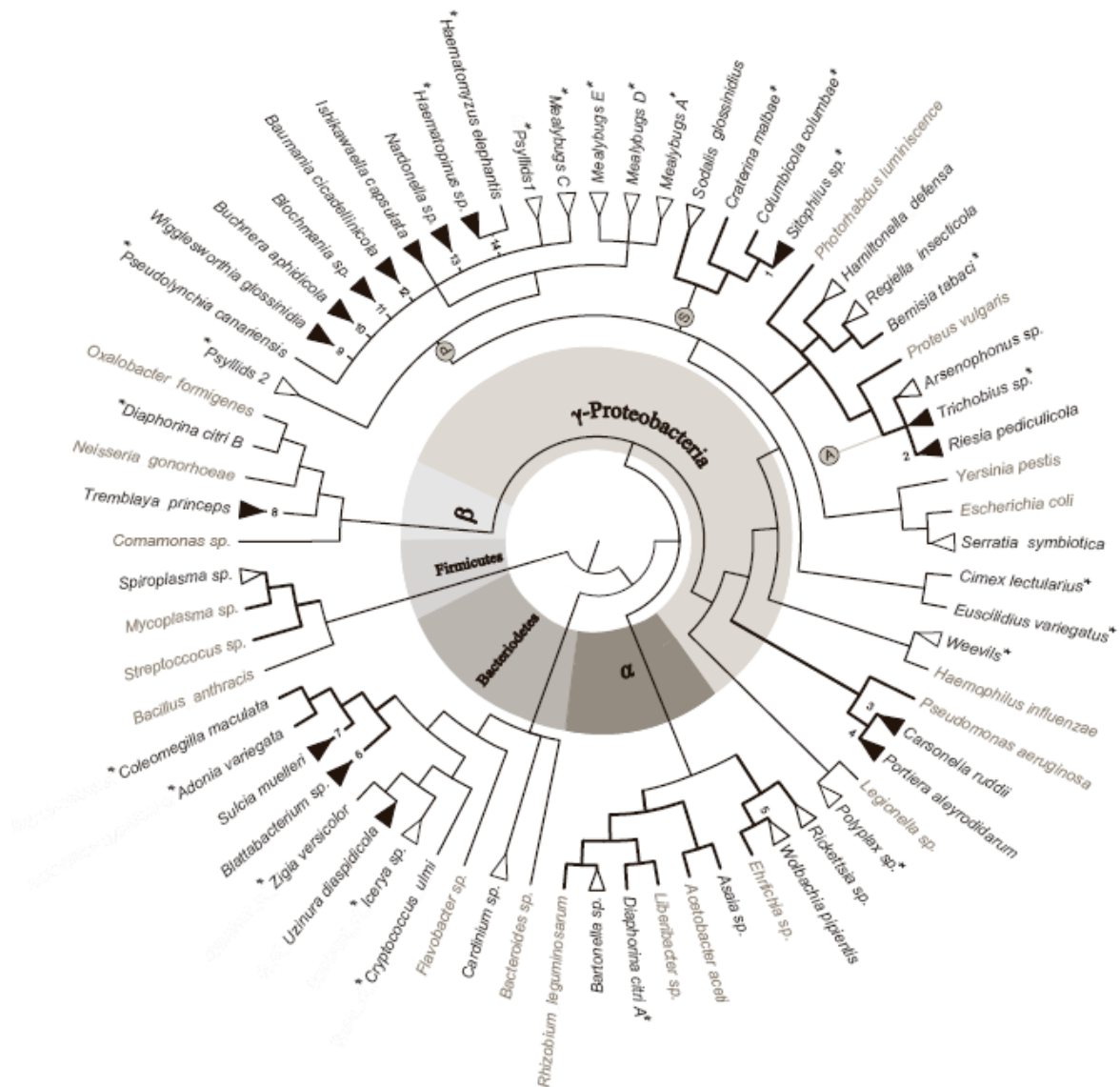
Carsonella ruddii žije v merách čeledi Psyllidae (Hemiptera). Genom jedinců z kmene Pv (hostitel *Pachypsylla venusta*) má 182 protein kódujících genů a obsah GC 16,5 %. Je redukovaný do té míry, že postrádá i Shine-Dalgarnovu sekvenci na 3' konci 16S rRNA

(Clark et al., 2001). Svému hostiteli, který se živí nutričně chudými rostlinnými šťávami, dodává *Carsonella* esenciální aminokyseliny. Tento systém je velmi podobný systému *Buchnera*-mšice a je zajímavou ukázkou konvergence (Nakabachi et al., 2006). *Carsonella* má zcela zřetelnou koevoluci se svým hostitelem, dokázanou nezávislými fylogenetickými analýzami podle různých genů (Thao et al., 2001). Ve většině mer žije kromě carsonely i S-endosymbiont ze skupiny γ -Proteobacteria (Thao et al., 2000), výjimkou je druh *Pachypsylla venusta*, kde S-endosymbionta neodhalily metody molekulární biologie ani elektronová mikroskopie (Spaulding et von Dohlen, 1998). U řady psylidů žijí S-endosymbionti v syncytiu (Fukatsu et Nikoh, 1998).

Nardonella je P-endosymbiontem nosatců čeledi Dryophthoridae (Lefèvre et al., 2004; Conord et al., 2008). Kromě ní však v nosatcích žijí pravděpodobně další bakterie ze skupiny Enterobacteriaceae, které se od sebe liší jiným obsahem GC (Heddi et al., 1998). Bakteriomy se vyskytují v přední i střední části střeva, do další generace se nardonely přenáší přes vajíčko. Svému hostiteli poskytují vitamíny či aminokyseliny fenylalanin a tyrosin (Baumann et al., 2006). Stejně jako *Buchnera* a *Wigglesworthia* produkují velké množství proteinu groEL. Jejich operon groESL je shodný s obdobným operonem *E. coli* na 82 % (Charles et al., 1997).

Portiera aleyrodidarum je P-endosymbiontem molic čeledi Aleyrodidae (Thao et Baumann, 2004). Patří do skupiny Oceanospirillales gamma-proteobakterií. Bakteriocyty molic obývá kromě portieri pět S-endosymbiontů (*Hamiltonella*, *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Wolbachia* a *Rickettsia*), buňky jsou tedy unikátním ekosystémem (Gottlieb et al., 2008).

Baumannia cicadellinicola žije v tělech křísků tribu Proconiini (Hemiptera: Cicadellidae) spolu s bakterií skupiny Bacteroidetes *Sulcia muelleri*. Daniela Takiya (Takiya et al., 2006) pro oba tyto bakteriální druhy zavedla nový termín „coprimary symbiont“, kterým naznačuje dlouhodobou koevoluci hostitele s více endosymbionty. Předběžné výzkumy ukazují, že *Sulcia* je rozšířena ve více skupinách hemipter, zatímco *Baumannia* je výskytem omezená jen na čeleď Cicadellidae. U druhu *Sulcia muelleri* byl nedávno přečten genom (McCutcheon et Moran, 2007). Podle výsledků práce má *Sulcia* 227 protein kódujících genů. V produkci kupř. aminokyselin se oba P-endosymbionti doplňují: *Sulcia* produkuje leucin, isoleucin, lysin, arginin, fenylalanin, tryptofan, threonin a valin, zatímco *Baumannia* poskytuje hostiteli i dalším endosymbiontům methionin a histidin. Čistě pro sebe a pro *Sulcia* vytváří *Baumannia* např. puriny a pyrimidiny.



Obrazek 1: Phylogenetické vztahy bakterií žijících v symbióze s hmyzem. Strom byl vytvořen podle subjektivních kritérií jako souhrn publikovaných fylogenetických prací. Jména na obvodu představují buď jméno symbiotické bakterie nebo jejich hostitelský taxon (ty jsou pak označeny hvězdičkou). Volně žijící bakterie jsou vtištěny šedě. Tučné linie označují příbuzenské vztahy podle obecného konsenzu. Trojúhelníky symbolizují monofyletické diverzifikované skupiny symbiontů popsané z více než jednoho hostitelského druhu (plný trojúhelník označuje linii fylogeneticky kongruentní s hostitelem). P = domnělý původ společné symbiotické linie, která zahrnuje několik hlavních P-endosymbiontů. Převzato z Hypša et Nováková, 2009.

Vši, další krevsající hmyz, také hostí své P-endosymbionty. U vši parazitujících na člověku a dalších primátech se vyskytuje rod *Riesia* (Allen et al., 2007). U nymf a adultních samců žijí ve střevech, u adultních samic ve vejcovodech (Sasaki-Fukatsu et al., 2006). Popsány byly tři druhy, *Riesia pediculicola* z vši dětské (*Pediculus humanus capitis*), *Riesia*

pediculischaeffi ze šimpanzích vší *Pediculus schaeffi* a *Riesia pthiripubis* z dalšího lidského parazita vší muňky (*Pthirus pubis*). U vší příbuzných rodů *Haematomyzus* a *Haematopinus* byli zjištěni P-endosymbionti, kteří ale podle molekulárně-fylogenetického výzkumu nejsou zástupci jednoho druhu bakterie, jsou si však velice blízce příbuzní (Hypša et Křížek, 2007). Tato práce, postavená na genu 16S rDNA, je zajímavá mj. tím, že její dataset obsahuje více typů buchcery, blochmannie a wigglesworthie a tyto tři bakterie vycházejí jakožto zástupci jedné skupiny spolu se zmíněnými P-endosymbionty vší a několika S-endosymbionty. Rod *Riesia* i endosymbionti vší *Haematomyzus* a *Haematopinus* jsou řazeni do skupiny Enterobacteriaceae. Na druhu *Riesia pediculidola* v současnosti probíhá projekt čtení genomu v americkém J. Craig Venter Institute.

V kněžicích čeledi zaoblenkovití (Plataspidae) žijí P-endosymbionti druhu *Ishikawaella capsulata* řazení také do skupiny Enterobacteriaceae (Hosokawa et al., 2006). Osekvenovány byly zatím pouze velmi malé části genomů z šesti hositelských druhů náležejících do třech rodů.

Mezi další zajímavé P-endosymbionty hmyzu patří např. *Blattabacterium cuenoti* ze skupiny Bacteroidetes, který žije ve švábech (a termitech, což jsou modifikovaní švábi, sesterská skupina švába rodu *Cryptocercus* – Lo et al., 2000) a poskytuje jim tyrosin a recykluje kyselinu močovou (což je umožněno blízkostí bakteriocytů a buněk obsahujících kyselinu močovou, bakteriocyty jsou totiž uloženy v abdomenu). Obsah GC u rodu *Blattabacterium* je 26-28 mol% (Baumann et al., 2006). *Tremblaya princeps* (Thao et al., 2002) ze skupiny β -Proteobacteria je endosymbiontem červců čeledi Pseudococcidae (Sternorrhyncha). Opět zde žije s jinými endosymbionty a jejich populační dynamika je odlišná podle toho, zda se vyvíjejí v samcích či samicích (Kono et al., 2008). Štítenky a červci z čeledi Diaspididae (opět zástupci skupiny Sternorrhyncha) jsou hostiteli P-endosymbionta ze skupiny Flavobacteria (Bacteroidetes) *Uzinura diaspidicola* (Gruwell et al., 2007).

Přehled zmíněných P-endosymbiontů (tab. 1) ukazuje, že většina z nich patří do skupiny γ -Proteobacteria (současný fylogenetický konsenzus vyjadřuje obr. 1) a téměř polovina má jako hostitele hmyz ze skupiny Hemiptera (nejčastěji Sternorrhyncha, ale i Auchenorrhyncha a Heteroptera). Primárními endosymbionty hmyzu ze skupiny Sternorrhyncha jsou někdy bakterie ze skupiny γ -Proteobacteria (*Buchnera*, *Carsonella*, *Portiera*), můžeme se však setkat i s tím, že Sternorrhyncha obsahují P-endosymbionty z jiných skupin (*Tremblaya*), či že P-endosymbionti řazení do γ -Proteobacteria žijí v jiných skupinách hmyzu (dvoukřídli, blanokřídli, brouci).

P-endosymbiont	Klasifikace	Taxonomická příslušnost hostitele
<i>Baumannia</i>	Gamma	Auchenorrhyncha
<i>Blattabacterium</i>	Bacteroidetes	Blattodea
<i>Blochmania</i>	Gamma	Hymenoptera
<i>Buchnera</i>	Gamma	Sternorrhyncha
<i>Carsonella</i>	Gamma	Sternorrhyncha
<i>Ishikawaella</i>	Gamma	Heteroptera
<i>Nardonella</i>	Gamma	Coleoptera
<i>Portiera</i>	Gamma	Sternorrhyncha
<i>Riesia</i>	Gamma	Anoplura
<i>Sulcia</i>	Bacteroidetes	Auchenorrhyncha
<i>Tremblaya</i>	Beta	Sternorrhyncha
<i>Uzinura</i>	Bacteroidetes	Sternorrhyncha
<i>Wigglesworthia</i>	Gamma	Diptera
P-endosymbiont rodu <i>Haematomyzus</i>	Gamma	Anoplura
P-endosymbiont rodu <i>Haematopinus</i>	Gamma	Anoplura
P-endosymbiont rodu <i>Sitophilus</i>	Gamma	Coleoptera
P-endosymbiont rodu <i>Trichobius</i>	Gamma	Diptera

Tabulka 1 Přehled P-endosymbiontů, jejich taxonomická příslušnost a taxonomická příslušnost hostitele. Většina P-endosymbiontů patří do skupiny γ -Proteobacteria a téměř polovina žije v symbióze s druhem hmyzu ze skupiny Hemiptera.

Fylogenetické vztahy mezi P-endosymbionty hmyzu ze skupiny Enterobacteriaceae

Jak vidíme, tři důležití P-endosymbionti hmyzu (*Buchnera*, *Wigglesworthia* a *Blochmannia*) i někteří další (*Nardonella* a *Baumannia*) patří do skupiny Enterobacteriaceae gamma-proteobakterií. Každý z těchto pěti jmenovaných ale obývá hmyz z odlišné skupiny. Kromě nich do Enterobacteriaceae patří také méně známí P-endosymbionti vši a *Ishikawaella*.

Enterobacteriaceae je skupina známá především díky bakterii *Escherichia coli* a druhům, které jsou pro člověka patogenní, např. z rodů *Salmonella*, *Shigella* či *Yersinia*. Fylogenetické vztahy mezi P-endosymbionty a volně žijícími bakteriemi uvnitř této skupiny jsou zatím nejasné.

Z dosavadních prací není na příklad zřejmé, zda P-endosymbionti ze skupiny Enterobacteriaceae tvoří monofyletickou skupinu. Olivier et al. (2005) publikovali výsledky, kde je trojice *Buchnera*, *Wigglesworthia* a *Blochmannia* monofyletickou, snad dokonce bazální linií skupiny Enterobacteriaceae. Výsledný strom byl ale vytvořen pouze distanční metodou Neighbor-Joining a je také nedostatečný z pohledu druhového samplingu. Nejsou v něm kupř. vůbec zastoupeni S-endosymbionti, kteří však mají ve fylogenezi této skupiny

jistě významné místo a po jejich začlenění do výpočtů mohou narušit monofylii skupiny P-endosymbiontů (Herbeck et al., 2005). Herbeck et al. (2005) publikovali osm fylogenetických stromů (fylogeneze podle genu groEL a podle genu pro 16S rRNA zpracovaná čtyřmi metodami – Bayes, Maximum Likelihood, parsimonie a Neighbor-Joining), které si navzájem odporují. Práce je založená na genech groEL a 16S rRNA pro 23, respektive 32 taxonů, mezi kterými jsou zastoupeny (u genu 16S rRNA dokonce zhruba v rovnovážném poměru) P-endosymbionti, S-endosymbionti a volně žijící bakterie ze skupiny Enterobacteriales. Z P-endosymbiontů jsou zastoupeny tři typy buchcery (APS, Bp, Sg), oba druhy blochmanie, *Wigglesworthia*, *Portiera* a *Nardonella*. Pro interpretaci výsledků je nejproblematictější postavení rodu *Buchnera*. *Wigglesworthia* a *Blochmannia* se nezdají být blízce příbuzné s buchnerou, jejich endosymbiontický způsob života by tedy vznikl pravděpodobně nezávisle na buchneře z neznámých ancestrálních S-endosymbiontů. Celá práce je výsledkem použití nehomogenního modelu sekvenční evoluce, který zohledňuje různý obsah GC mezi druhy a různou rychlost substitucí mezi oblastmi genomu.

Přesto fylogenetické práce nezřídka ukazují na monofylii skupiny, která sdružuje rody *Buchnera*, *Wigglesworthia* a *Blochmannia* (Gil et al., 2003; Hypša et Křížek, 2007; Comas et al., 2007).

Obečně jsou P-endosymbionti a zvláště ti ze skupiny Enterobacteriaceae používáni jako modelová skupina – přesto nebo právě proto, že jejich vlastní příbuzenské vztahy nejsou dosud objasněné – pro různé alternativní postupy molekulární fylogenetiky.

Primární endosymbionti a molekulární fylogenetika

Studovat příbuzenské vztahy mezi P-endosymbionty navzájem i mezi P-endosymbionty a volně žijícími bakteriemi je značně obtížné. To je dáno především tím, že některé jejich typické vlastnosti vedou při zkoumání metodami molekulární fylogenetiky k vytváření metodologických artefaktů. Mezi nejproblematictější patří vysoký obsah AT (jako řešení bývá navrženo použití nehomogenních modelů, které dokáží vliv různého zastoupení jednotlivých nukleotidů zmírnit) či potenciální horizontální přenos genů, jehož uchopení ještě komplikuje to, že jeho frekvence je zatím neznámá, apod.

Nejvíce používaným genem pro molekulárně-fylogenetické práce s P-endosymbionty je gen 16S rDNA (Aksoy, 1995; Rio et al., 2004; Olivier et al. 2005; Takiya et al., 2006; Kono et al., 2008 a mnoho dalších). Jeho analýza ale nepřináší jednoznačné výsledky, a to ani za použití nehomogenního modelu (Herbeck et al., 2005): zdá se tedy, že tento gen není

schopen vyřešit příbuzenské vztahy mezi P-endosymbionty. Moran et al. (2005) pracovali s geny *gyrB* a *recA*, nové světlo to ale do problému nepřineslo, výsledky jsou s pracemi podle genu 16S rRNA v souladu. Nejlepší metodou je využití více genů zároveň. To s sebou ale na druhou stranu nese problémy při jejich výběru, řada genů u některých druhů díky značné redukci genomů P-endosymbiontů chybí. Thao et al. (2000) a další (např. Thao et al., 2002; Thao et Baumann, 2004; Gruwell et al., 2007) zkombinovali geny 16S a 23S rDNA, ale toto malé rozšíření záběru situaci nevyřešilo. Nic nového nepřinesla ani analýza, která zkombinovala geny *atpAGD* a *rpoBC*, její výsledky jsou totiž obdobné jako práce na genech 16S a 23S rDNA (Thao et al., 2001). V další vícegenové práci Gil et al. (2003) použili 61 protein kódujících genů, v jejich analýze maximum likelihood tvoří *Buchnera*, *Wigglesworthia* a *Blochmannia* monofyletickou skupinu sesterskou ke skupině *Escherichia+Salmonella+Yersinia*.

Celé genomy P-endosymbiontů je možno srovnávat pouze v posledních deseti letech, v podstatě od chvíle, kdy Shigenobu et al. (2000) publikovali přečtení genomu buchcery kmene APS, po kterém následovali další endosymbionti. To byl výrazný průlom, před ním bylo možné pracovat pouze s malými částmi genomů, např. Hassan et al. (1996) porovnávali vysoce konzervovaný úsek sedmi genů mezi *E. coli* a buchnerou kmen Sg (geny v blízkosti *dnaA* a *gyrB* a kolem genu *groES*).

Genomické studie začínají v posledních letech ve fylogenetice bakterií dominovat, řada z nich ale problém P-endosymbiontů pomíjí. Creevey et al. (2004) mají ve svém datasetu, čítajícím 61 taxonů, buchneru, nevíme však, který typ, *Wigglesworthia* či *Blochmannia* (tedy P-endosymbionti v době vydání práce již osekvenovaní) chybí. Canbäck et al. (2004) využívají sekvencí dvou typů buchcery (APS a Sg) a *wigglesworthie*, ty vycházejí jako sesterské nejen při použití distanční metody neighbor-joining, ale i maximum likelihood. Naproti tomu Comas et al. (2007) využil kompletní sekvence 21 taxonů proteobakterií, mezi kterými byly mj. tři typy buchcery (APS, Bp a Sg) a dále druhy *Wigglesworthia glossinidia* a *Blochmannia floridanus*. Právě *Blochmannia* sloužila jako počáteční genom, pro jehož geny na počátku práce hledali orthology pomocí BLASTu. 200 orthologů bylo přítomno ve všech 21 taxonech, z těchto genů vznikl nejdůležitější dataset. Výsledné stromy obsahovaly monofyletickou skupinu *Blochmannia+Buchnera+Wigglesworthia*, tedy opět linii nejznámějších P-endosymbiontů, kterou se však přesto stále nedaří prokázat.

Porovnávání celých genomů ztěžují duplikace, během kterých vznikají paralogní geny. Ty pak mohou zapříčinit špatnou topologii výsledných stromů. Výrazným problémem je také

horizontální přenos genů (HGT nebo LGT, horizontal nebo lateral gene transfer), převážně proto, že není zatím jasné, jak moc zasahuje do struktury bakteriálních genomů. Je možné, že původ v horizontálním přenosu má až 60 % genů (Lerat et al., 2005), možná však jen 10 % (Susko et al., 2006) či pouze nepatrný počet (Ge et al., 2005).

Kromě klasických metod molekulární fylogenetiky je možno využít také změn ve struktuře genomu, např. fúze genů či přiřazení jiné aminokyseliny ke kodónu. Tyto metody ale ještě nejsou hojně používány, zatím se s nimi pracovalo převážně na menších mitochondriálních genomech. Práce založená na srovnání sekvencí aminokyselin podporuje buď monofylii skupiny *Buchnera*+*Wigglesworthia*+*Blochmannia* nebo při nejhorším parafylii ovšem s oddělením těchto tří samostatných linií v těsné blízkosti za sebou (Belda et al., 2005).

Závěr

P-endosymbionti slouží jako modelová skupina pro zkoumání některých obecných evolučních problémů, které vyplývají z jejich typických vlastností. Na P-endosymbiontech ze skupiny Enterobacteriaceae je navíc zajímavá jejich blízká příbuznost s velmi detailně zkoumaným druhem *Escherichia coli* a jejich společně sdílené – převážně molekulárně-biologické – apomorfie (synapomorfie) nebo naopak rozdíly. Ty navíc mohou sloužit jako ukázka toho, jakých funkcí se může endosymbiotický organismus vzdát, aniž by to ohrozilo jeho životaschopnost (byť se tím stává závislým na neměnném prostředí v těle hostitele). Pro správné pochopení P-endosymbiózy a evolučních procesů s ní souvisejících je však potřeba znát historii dnešního stavu a z ní vyplývajících vztahů. Jinými slovy, je potřeba znát fylogenezi P-endosymbiontů. Ta je však stále nejasná, neboť výsledky fylogenetických prací nejsou ve vzájemném souladu. Tomu by mohl pro budoucí práce pomoci větší důraz na volně žijící bakterie a převážně na S-endosymbionty, kteří (snad vzhledem k absenci oněch vlastností, pro které by se hodili k výzkumům obecných problémů) jsou zatím – až na pochopitelné výjimky (*Wolbachia*) – spíše přehlíženi, přestože v příbuzenství P-endosymbiotů zaujímají významná místa a fylogenetický strom, který by s nimi nepočítal, bude jistě méně spolehlivý a jeho topologie nebude pravděpodobně v pořádku.

Jak jsme viděli, jednotlivé geny (16S rDNA) pro výzkum fylogeneze nepostačují, je proto potřeba dál pokračovat ve čtení celých genomů. Práce s redukovanými genomy P-endosymbiontů by navíc mohla (spolu s pracemi na mitochondriích a plastidech eukaryot a se zlepšováním informačních technologií) přispět k vylepšení nástrojů genomických studií a

k vytvoření nových modelů pro porovnávání celých genomů a zaznamenávání rozdílů mezi nimi.

Důležitá je také práce na hmyzu, zvláště v oblasti koevoluce s endosymbionty a v hledání a popisování nových endosymbiontů – ti mohou po přidání do datasetů výrazně upravit výsledky fylogenetických studií.

Literatura

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M. et Aksoy, S. (2002): Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics* 32: 402-407.

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: 848-851.

Aksoy, S., Chen, X. et Hypša, V. (1997): Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera: Glossinidae). *Insect Molecular Biology* 6(2): 183-190.

Allen, J. M., Reed, D. L., Perotti, M. A. et Braig, H. R. (2007): Evolutionary Relationships of „*Candidatus* Riesia spp.“ Endosymbiotic *Enterobacteriaceae* Living within Hematophagous Primate Lice. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1659-1664.

Andersson, S. G. E. (2006): The Bacterial World Gets Smaller. *Science* 314: 259-260.

Baumann P., Baumann, L., Lai, C. Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A. et Clark, M. A. (1995): Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology* 49: 55-94.

Baumann, P., Baumann, L. et Clark, M. A. (1996): Levels of *Buchnera aphidicola* Chaperonin GroEL During Growth of the Aphid *Schizaphis graminum*. *Current Microbiology* 32: 279-285.

Baumann, P., Moran, N. A. et Baumann, L. (2006): Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Insects. In Dworkin, M. et Falkow, S. eds. (2006): *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer.

Belda, E., Moya, A. et Silva, F. J. (2005): Genome Rearrangement Distances and Gene Order Phylogeny on γ -Proteobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1456-1467.

Blua, M. J., Perring, T. M. et Madore, M. A. (1994): Plant virus-induced changes in aphid population development and temporal fluctuations in plant nutrients. *Journal of Chemical Ecology* 20: 691-707.

Canbäck, B., Tamas, I. et Andersson, S. G. E. (2004): A Phylogenomic Study of Endosymbiotic Bacteria. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1110-1122

Clark, M. A., Baumann, L., Thao, M. L., Moran, N. A. et Baumann, P. (2001): Degenerative Minimalism in the Genome of a Psyllid Endosymbiont. *Journal of Bacteriology* 183: 1853-1861.

Comas, I., Moya, A. et González-Candélas, F. (2007): From Phylogenetics to Phylogenomics: The Evolutionary Relationships of Insect Endosymbiotic γ -Proteobacteria as a Test Case. *Systematic Biology* 56: 1-16.

Conord, C., Despres, L., Vallier, A., Balmand, S., Miquel, C., Zundel, S., Lemperiere, G. et Heddi, A. (2008): Long-Term Evolutionary Stability of Bacterial Endosymbiosis in Curculionioidea: Additional Evidence of Symbiont Replacement in the Dryophthoridae Family. *Molecular Biology and Evolution* 25: 859-868.

Creevey, Ch. J., Fitzpatrick, D. A., Philip, G. K., Kinsella, R. J., O'Connell, M. J., Pentony, M. M., Travers, S. A., Wilkinson, M. et McInerney, J. O. (2004): Does a tree-like phylogeny only exist at the tips in the prokaryotes? *Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: 2551-2558.

Dale, C. et Moran, N. A. (2006): Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell* 126: 453-465.

Douglas, A. E. (1997): Parallels and contrasts between symbiotic bacteria and bacterial-derived organelles: evidence from *Buchnera*, the bacterial symbiont of aphids. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 1-9.

Douglas, A. E. (2003): *Buchnera* Bacteria and Other Symbionts of Aphids. In Bourtzis, K. et Miller, T. A. eds. (2003): *Insect Symbiosis*. CRC Press. 347 pp.

Douglas, A. E., Minto, L. B. et Wilkinson, T. L. (2001): Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *The Journal of Experimental Biology* 204: 349-358.

Fukatsu, T. (2001): Secondary Intracellular Symbiotic Bacteria in Aphids of the Genus *Yamatocallis* (Homoptera: Aphididae: Drepanosiphinae). *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5315-5320.

Fukatsu, T. et Nikoh, N. (1998): Two Intracellular Symbiotic Bacteria from the Mulberry Psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3599-3606.

Funk, D. J., Helbling, L., Wernegreen, J. J. et Moran, N. A. (2000): Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. *Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 2517-2521.

Ge, F., Wang, Li-S. et Kim, J. (2005): The Cobweb of Life Revealed by Genome-Scale Estimates of Horizontal Gene Transfer. *PloS Biology* 10: e316.

Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., González-Candelas, F., Latorre, A., Rausell, C., Kamerbeek, J., Gadau, J., Hölldobler, B., Ham, R. C. H. J. van, Gross, R. et Moya, A. (2003): The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 100: 9388-9393.

Gottlieb, Y., Ghanim, M., Gueguen, G., Kontsedalov, S., Vavre, F., Fleury, F. et Zchori-Fein, E. (2008): Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *FASEB Journal*, 22: 2591-2599.

- Gruwell, M. A., Morse, G. E. et Normark, B. B. (2007): Phylogenetic congruence of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) and their primary endosymbionts from the phylum Bacteroidetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 267-280.
- Hassan, A. K. M., Moriya, S., Baumann, P., Yoshikawa, H. et Ogasawara, N. (1996): Structure of the *dnaA* region of the endosymbiont, *Buchnera aphidicola*, of aphid *Schizaphis graminum*. *DNA Research* 3: 415-419.
- Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G. et Nardon, P. (1998): Molecular Characterization of the Principal Symbiotic Bacteria of the Weevil *Sitophilus oryzae*: A Peculiar G + C Content of an Endocytobiotic DNA. *Journal of Molecular Evolution* 47: 52-61.
- Herbeck, J. T., Degnan, P. H. et Wernegreen, J. J., (2005): Nonhomogeneous Model of Sequence Evolution Indicates Independent Origins of Primary Endosymbionts Within the Enterobacteriales (γ -Proteobacteria). *Molecular Biology and Evolution* 22: 520-532.
- Hogenhout, S. A., Wilk, F. van der, Verbeek, M., Goldbach, R. W. et van den Heuvel, J. F. J. M. (1998): Potato Leafroll Virus Binds to the Equatorial Domain of the Aphid Endosymbiotic GroEL Homolog. *Journal of Virology* 72: 358-365.
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M. et Fukatsu, T. (2006): Strict Host-Symbiont Cospeciation and Reductive Genome Evolution in Insect Gut Bacteria. *PLoS Biology* 4: e337.
- Hypša, V. et Křížek, J. (2007): Molecular Evidence for Polyphyletic Origin of the Primary Symbionts of Sucking Lice (Phthiraptera, Anoplura). *Microbial Ecology* 54: 242-251.
- Hypša, V. et Nováková, E. (2009): Insect symbionts and molecular phylogenetics. In Bourtzis, K. et Miller, T. A. eds. (2009): *Insect Symbiosis*. CRC Press.
- Chen, D.-Q. et Purcell, A. H. (1997): Occurrence and Transmission of Facultative Endosymbionts in Aphids. *Current Microbiology* 34: 220-225.
- Chen, D.-Q., Campbell, B. C. et Purcell, A. H. (1996): A New Rickettsia from a Herbivorous Insect, the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Current Microbiology* 33: 123-128.
- Cheng, Q. et Aksoy, S. (1999): Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes *in vivo* in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Molecular Biology* 8(1): 125-132.
- Charles, H., Heddi, A., Guillaud, J., Nardon, C. et Nardon, P. (1997): A Molecular Aspect of Symbiotic Interactions between the Weevil *Sitophilus oryzae* and Its Endosymbiotic Bacteria: Over-expression of a Chaperonin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239: 769-774.
- Janda, J. M. (2006): New Members of the Family Enterobacteriaceae. In Dworkin, M. et Falkow, S. eds. (2006): *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Springer.
- Komaki, K. et Ishikawa, H. (1999): Intracellular Bacterial Symbionts of Aphids Possess Many Genomic Copies per Bacterium. *Journal of Molecular Evolution* 48: 717-722.

- Kono, M., Koga, R., Shimada, M. et Fukatsu, T. (2008): Infection Dynamics of Coexisting Beta- and Gammaproteobacteria in the Nested Endosymbiotic System of Mealybugs. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4175-4184.
- Lamelas, A., Pérez-Brocal, V., Gómez-Valero, L., Gosalbes, M. J., Moya, A. et Latorre, A. (2008): Evolution of the Secondary Symbiont “*Candidatus Serratia symbiotica*” in Aphid Species of the Subfamily Lachninae. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4236-4240.
- Lefèvre, C., Charles, H., Vallier, A., Delobel, B., Farrell, B. et Heddi, A. (2004): Endosymbiont Phylogenesis in the Dryophthoridae Weevils: Evidence for Bacterial Replacement. *Molecular Biology and Evolution* 21: 965-973.
- Lerat, E., Daubin, V., Ochman, H. et Moran, N. A. (2005): Evolutionary Origins of Genomic Repertoires in Bacteria. *PloS Biology* 3: e130.
- Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H., Rose, H., Slaytor, M., Maekawa, K., Bandi, C. et Noda, H. (2000): Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Current Biology* 10: 801-804.
- Marais, A., Bové, J.-M. et Renaudin, J. (1996): Characterization of the *recA* Gene Regions of *Spiroplasma citri* and *Spiroplasma melliferum*. *Journal of Bacteriology* 178: 7003-7009.
- McCutcheon, J. P. et Moran, N. A. (2007): Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 104: 19392-19397.
- Moran, N. A. (1996): Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 93: 2873-2878.
- Moran, N. A. et Telang, A. (1998): Bacteriocyte-Associated Symbionts of Insects. *Bioscience* 48: 295-304.
- Moran, N. A. et Baumann, P. (2000): Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology* 3: 270-275.
- Moran, N. A., Russell, J. A., Koga, R. et Fukatsu, T. (2005): Evolutionary Relationships of Three New Species of *Enterobacteriaceae* Living as Symbionts of Aphids and Other Insects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3302-3310.
- Nakabachi, A. et Ishikawa, H. (1999): Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *Journal of Insect Physiology* 45: 1-6.
- Nakabachi, A. et Ishikawa, H. (2000): Polyamine Composition and Expression of Genes Related to Polyamine Biosynthesis in an Aphid Endosymbiont, *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3305-3309.

- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A. et Hattori, M. (2006): The 160-Kilobase Genome of the Bacterial Endosymbiont *Carsonella*. *Science* 314: 267.
- Ohtaka, C., Nakamura, H. et Ishikawa, H. (1992): Structures of Chaperonins from an Intracellular Symbiont and Their Functional Expression in *Escherichia coli groE* Mutants. *Journal of Bacteriology* 174: 1869-1874.
- Olivier, A., Lee, H.-Y. et Côté, J.-Ch. (2005): Study of the heterogeneity of 16S rRNA genes in γ -proteobacteria: Implications for phylogenetic analysis. *Journal of General and Applied Microbiology* 51: 395-405.
- Pérez-Brocal, V., Gil, R., Ramos, S., Lamelas, A., Postigo, M., Michelena, J. M., Silva, F. J., Moya, A. et Latorre, A. (2006): A Small Microbial Genome: The End of a Long Symbiotic Relationship? *Science* 314: 312-313.
- Rio, R. V. M., Hu, Y. et Aksoy, S. (2004): Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *Trends in Microbiology* 12: 325-336.
- Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., Kobayashi, M., Tomita, T. et Fukatsu, T. (2006): Symbiotic Bacteria Associated with Stomach Discs of Human Lice. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7349-7352.
- Sato, S. et Ishikawa, H. (1997a): Expression and Control of an Operon from an Intracellular Symbiont Which Is Homologous to the *groE* Operon. *Journal of Bacteriology* 179: 2300-2304.
- Sato, S. et Ishikawa, H. (1997b): Structure and Expression of the *dnaKJ* Operon of *Buchnera*, an Intracellular Symbiotic Bacteria of Aphid. *Journal of Biochemistry* 122: 41-48.
- Sauer, C., Stackebrandt, E., Gadau, J., Hölldobler, B. et Gross, R. (2000): Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1877-1886.
- Scarborough, C. L., Ferrari, J. et Godfray, H. C. J. (2005): Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science* 310: 1781.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. et Ishikawa, H. (2000): Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407: 81-86.
- Schröder, D., Deppisch, H., Obermayer, M., Krohne, G., Stackebrandt, E., Hölldobler, B., Goebel, W. et Gross, R. (1996): Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Molecular Microbiology* 21(3): 479-489.
- Spaulding, A. W. et von Dohlen, C. D. (1998): Phylogenetic Characterization and Molecular Evolution of Bacterial Endosymbionts in Psyllids (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Molecular Biology and Evolution* 15: 1506-1513.

- Susko, E., Leigh, J., Doolittle, W. F. et Baptiste, E. (2006): Visualizing and Assessing Phylogenetic Congruence of Core Gene Sets: A Case Study of the γ -Proteobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1019-1030.
- Takiya, D. M., Tran, P. L., Dietrich, C. H. et Moran, N. A. (2006): Co-cladogenesis spanning three phyla: leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts. *Molecular Ecology* 15: 4175-4191.
- Tamas, I., Klasson, L., Canbäck, B., Näslund, A. K., Eriksson, A.-S., Wernegreen, J. J., Sandström, J. P., Moran, N. A. et Andersson, S. G. E. (2002): 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. *Science* 296: 2376-2379.
- Unterman, B. M., Baumann, P. et McLean, D. L. (1989): Pea Aphid Symbiont Relationships Established by Analysis of 16S rRNAs. *Journal of Bacteriology* 171: 2970-2974.
- Thao, M. L. et Baumann, P. (2004): Evolutionary Relationships of Primary Prokaryotic Endosymbionts of Whiteflies and Their Hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3401-3406.
- Thao, M. L., Clark, M. A., Baumann, L., Brennan, E. B., Moran, N. A. et Baumann, P. (2000): Secondary Endosymbionts of Psyllids Have Been Acquired Multiple Times. *Current Microbiology* 41: 300-304.
- Thao, M. L., Clark, M. A., Burckhardt, D. H., Moran, N. A. et Baumann, P. (2001): Phylogenetic Analysis of Vertically Transmitted Psyllid Endosymbionts (*Candidatus Carsonella ruddii*) Based on *atpAGD* and *rpoC*: Comparisons with 16S–23S rDNA-Derived Phylogeny. *Current Microbiology* 42: 419-421.
- Thao, M. L., Gullan, P. J. et Baumann, P. (2002): Secondary (γ -Proteobacteria) Endosymbionts Infect the Primary (β -Proteobacteria) Endosymbionts of Mealybugs Multiple Times and Coevolve with Their Hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3190-3197.
- Wernegreen, J. J. (2002): Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* 3: 850-831.
- Wernegreen, J. J. (2004): Lessons in Conflict Resolution. *PloS Biology* 2: 307-311.
- Yoshida, N., Oeda, K., Watanabe, E., Mikami, T., Fukita, Y., Nishimura, K., Komai, K. et Matsuda, K. (2001): Chaperonin turned insect toxin. *Nature* 411: 44.