

Buchnera aphidicola, endosimbionte
primario del pulgón *Cinara cedri*,
tiene un genoma de 450Kb



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva



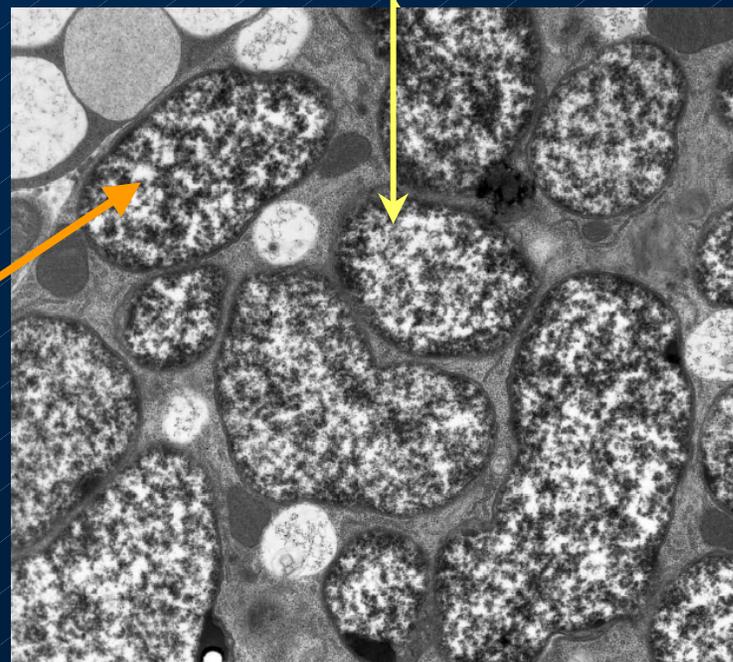
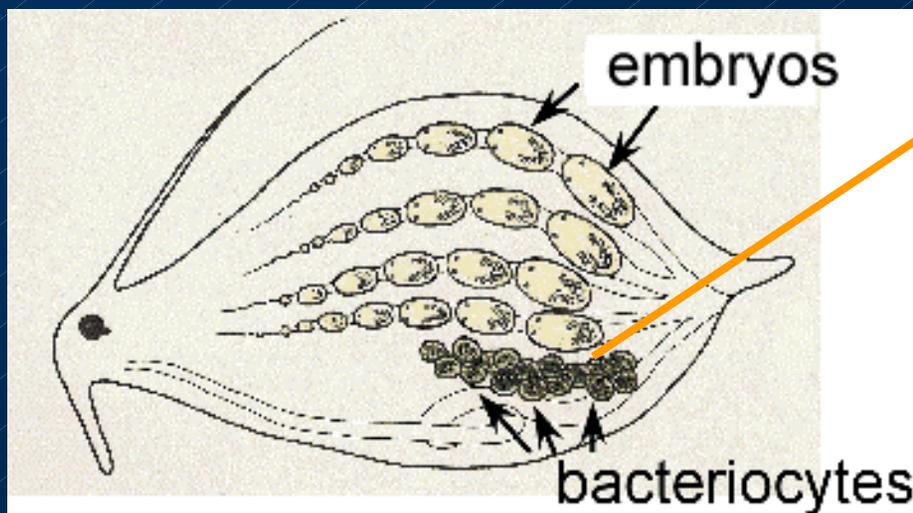
Introducción

- Mas del 20% de los insectos viven en relaciones de simbiosis con microorganismos, lo que les ha permitido explorar una gran variedad de nichos.
- En general estos insectos se caracterizan por alimentarse de dietas desequilibradas, que son suministradas por los simbiosites
- Los pulgones (Homoptera, Aphididae) se alimentan de la savia de las plantas, que es rica en azúcares pero pobre en compuestos nitrogenados
- *B. aphidicola*, endosimbionte primario de los pulgones les suministra nutrientes que son deficientes en su dieta, como aminoácidos esenciales
- Durante el proceso de adaptación a la vida intracelular, *B. aphidicola* ha sufrido cambios drásticos en su genoma
- Además de *B. aphidicola* algunos pulgones contienen bacterias adicionales denominadas Simbiosites Secundarios (SS), que podrían modificar la relación de mutualismo establecida entre *B. aphidicola* y el pulgón

Los pulgones mantienen una asociación con *B. aphidicola* una γ -Proteobacteria, próxima a *E.coli*

SECCION LONGITUDINAL
DE UN PULGÓN

Buchnera aphidicola



Genomas de *Buchnera aphidicola* relevantes para entender la estructura y evolución del genoma

Primeros genomas
Secuenciados *B. aphidicola*
BAp y BSg



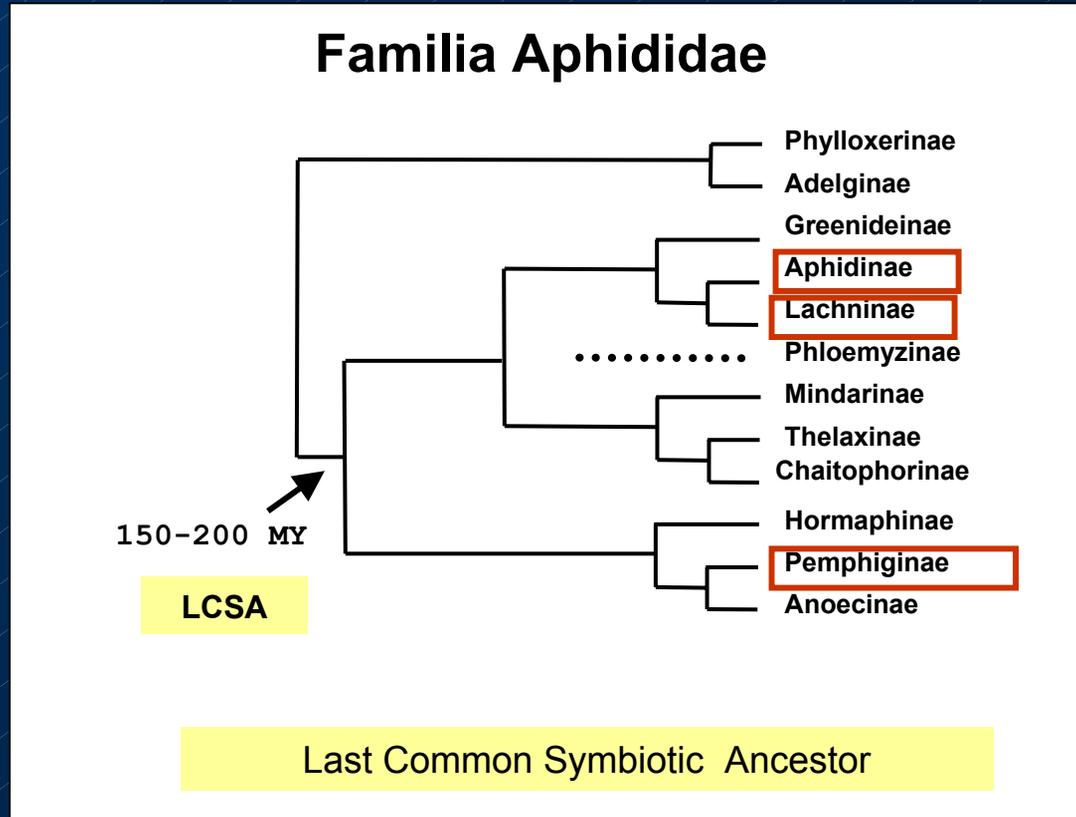
Genómica ambiental.
B. aphidicola BBp



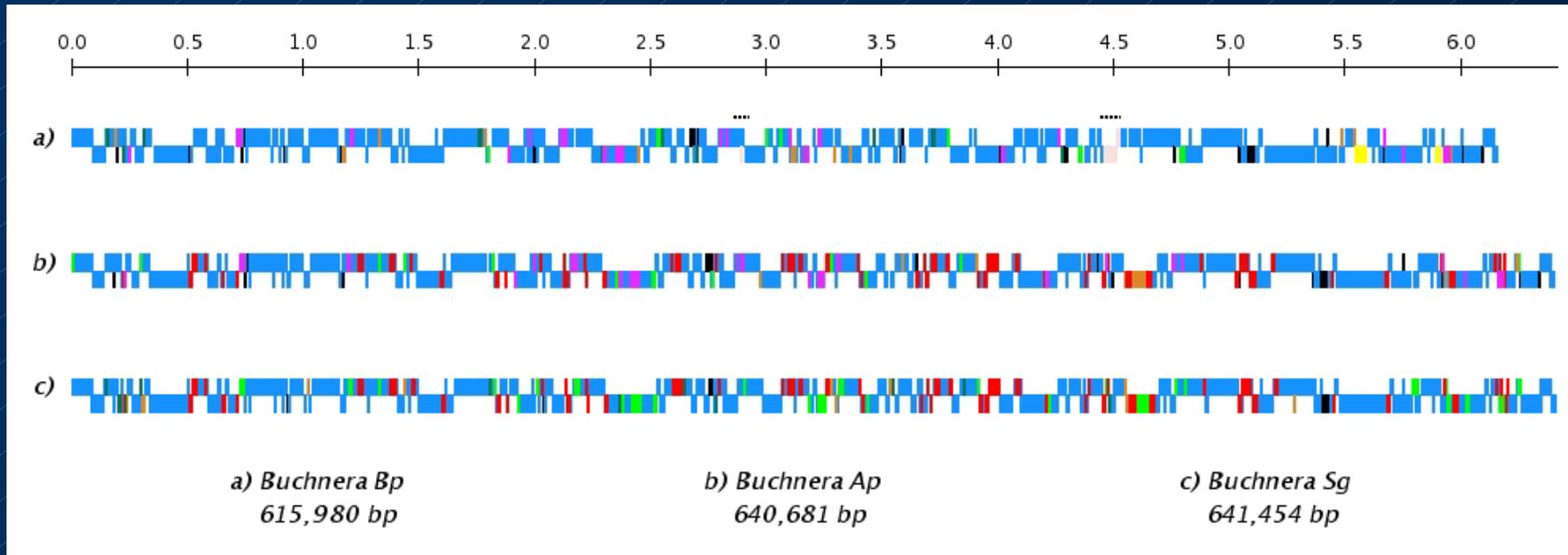
El genoma más pequeño
B. aphidicola C cedri



Ubicación filogenética de los pulgones que contienen a las bacterias cuyos genomas han sido secuenciados



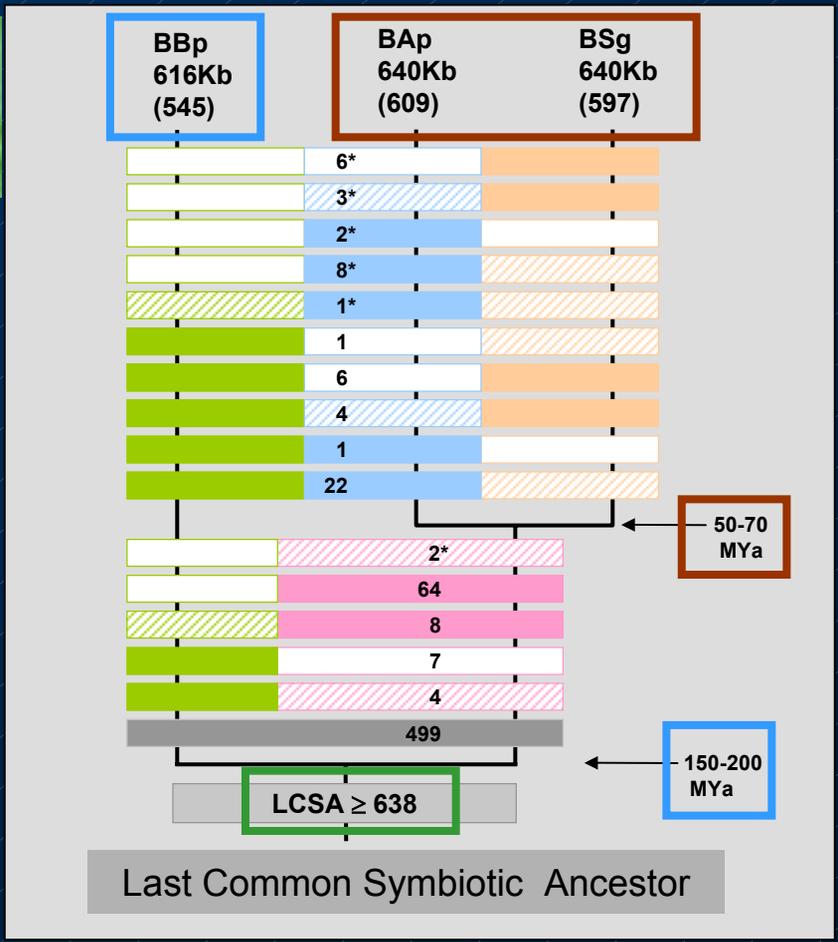
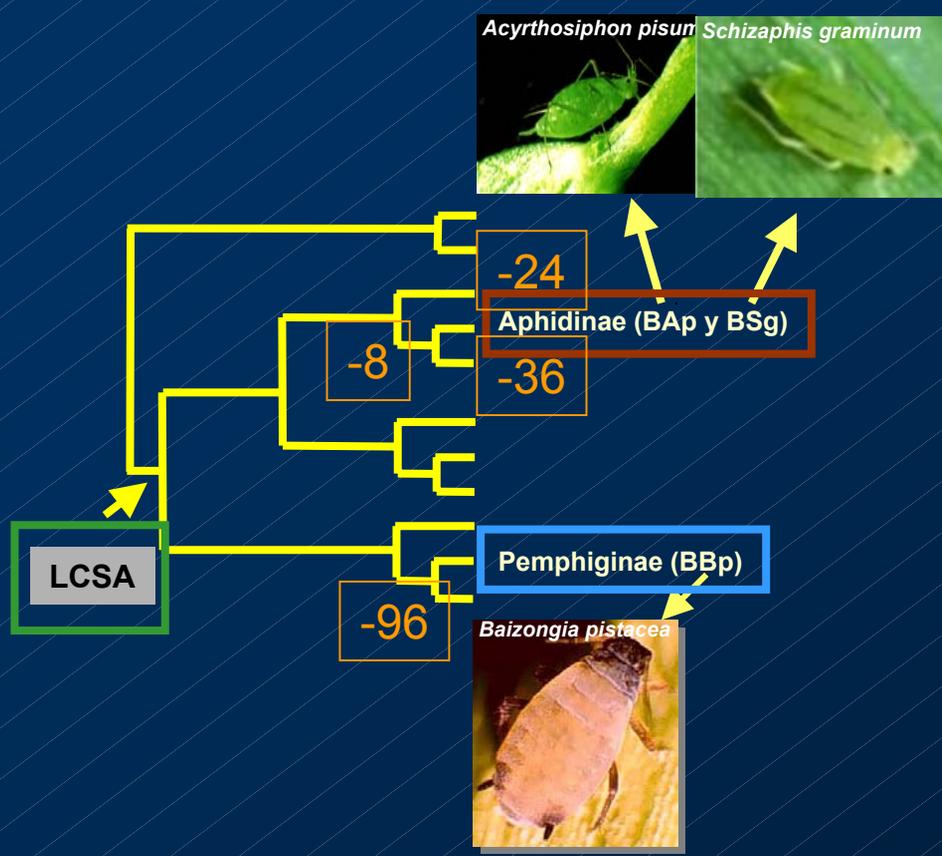
Comparación del orden génico de los tres genomas secuenciados.



Sólo cuatro pequeñas reordenaciones: dos inversiones y dos translocaciones entre *B. Bp* y las otras dos.

Los tres genomas han retenido un orden génico casi perfecto desde su divergencia a partir del LCSA. Podemos hablar de un **orden génico fósil** de *B. aphidicola*.

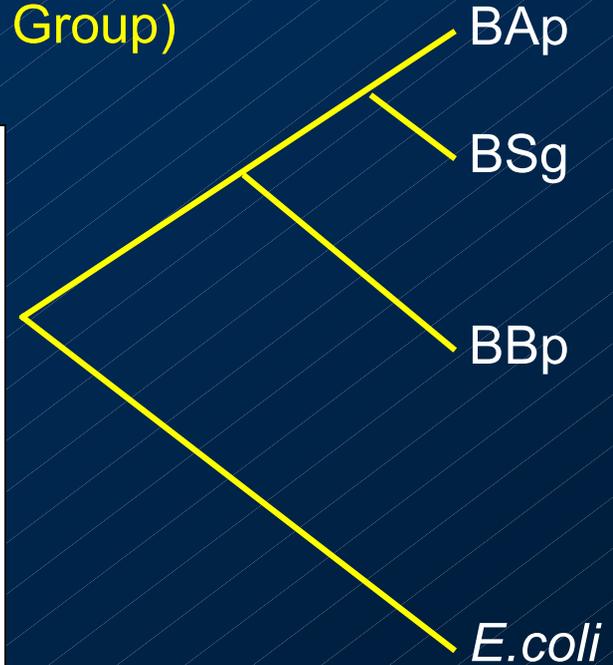
Comparación del contenido génico de los tres genomas secuenciados.



Naturaleza de las pérdidas

COGs (Cluster of Orthologous Group)

Código	Description	Pérdidas	Convergentes
C	Energy production and conversion	2	0
D	Cell division and chromosome partitioning	1	0
E	Amino acid transport and metabolism	12	3
F	Nucleotide transport and metabolism	7	1
G	Carbohydrate transport and metabolism	4	0
H	Coenzyme metabolism	21	6
I	Lipid metabolism	7	0
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	6	1
K	Transcription	4	2
L	DNA replication, recombination and repair	11	0
M	Cell envelope biogenesis, outer membrane	18	2
N	Cell motility and secretion	7	0
O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5	3
P	Inorganic ion transport and metabolism	6	3
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	1	0
R	General function prediction only	10	4
S	Function unknown	9	2
T	Signal transduction mechanisms	1	0
U	Signal transduction mechanisms genes	1	0



Las pérdidas son selectivas y están relacionadas con las dietas particulares de cada hospedador

Conclusiones de la comparación de los tres genomas

- Conservación del orden génico en los distintos linajes
- Drásticas disminución del tamaño del genoma por pérdida de genes

Estasis evolutiva en el genoma de *B. aphidicola*

“La evolución de *B. aphidicola* sería un caso de evolución degenerativa, más que adaptativa y el destino final sería **la extinción**”

“*B. aphidicola* fue esencial para el éxito evolutivo de los pulgones en los momentos iniciales de la radiación, pero la diversificación ecológica de los pulgones no puede atribuirse a la diversidad genética de la bacteria”.

El genoma de *B. aphidicola* de varias subfamilias de pulgones sigue sufriendo un proceso reductivo

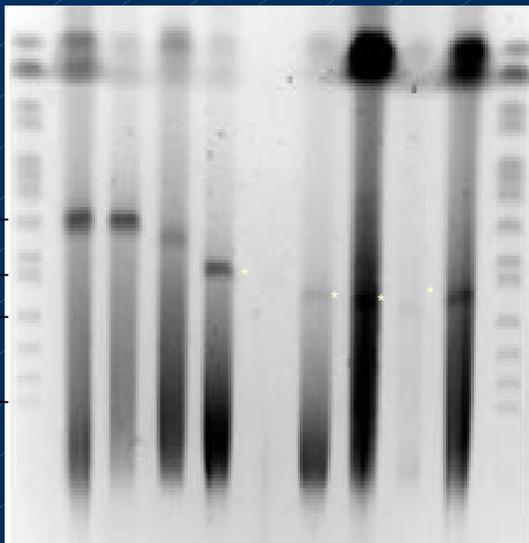
Especies

Tamaño del genoma (Kb)

Subfamilias

1.	<i>Acyrtosiphum pisum</i>	670	<i>Aphidinae</i>
2.	<i>Macrosiphum rosae</i>	670	<i>Aphidinae</i>
3.	<i>Baizongia pistaceae</i>	640	<i>Pemphiginae</i>
4.	<i>Tetraneura caerulescens</i>	565	<i>Pemphiginae</i>
5.	<i>Thelaxes suberi</i>	550	<i>Thelaxinae</i>
6.	<i>Chaitophorus populeti</i>	520	<i>Chaitophorinae</i>
7.	<i>Cinari cedri</i>	450	<i>Lachninae</i>
8.	<i>Cinara cupressi</i>	475	<i>Lacnninae</i>
9.	<i>Cinara tujafilina</i>	475	<i>Lachninae</i>

Y 1 2 3 4 5 6 7 8 9 Y



PFGE

Secuenciación del genoma de *B. aphidicola* de *Cinara cedri* (BCc)

La secuenciación y caracterización del contenido génico de este genoma tan reducido y su comparación con los previamente secuenciados:

- ¿Qué genes son esenciales para la vida endosimbiótica?
- ¿Qué mecanismos están implicados en el proceso de reducción? (deleciones, pseudogenización, “slippage”, etc.)
- ¿Son adaptativos o degenerativos los procesos de acomodación a la vida intracelular de *Buchnera* a su hospedador particular?
- ¿El genoma está tan degradado que no puede realizar las funciones necesarias para la vida simbiótica y estamos asistiendo a un reemplazamiento por los SS?

Secuenciación del genoma de BCc



B.aphidicola

Tercer tipo
de bacteria
Wolbachia

R-type o PASS "Pea Aphid Seconary Symbiont"

Secuenciación del genoma de BCc



Cinara cedri

Colección de *C. cedri* en poblaciones naturales



Extracción de bacteriocitos

(varios gramos de pulgones)



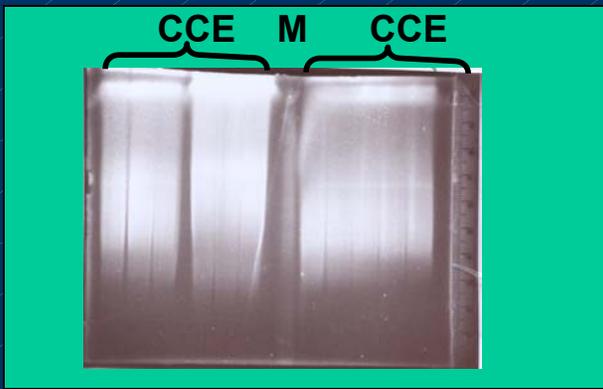
Inclusión en bloques de agarosa “plugs”

(*C. cedri* contiene gran cantidad de SS que no pueden separarse de *B. aphidicola* durante la extracción del DNA bacteriano)

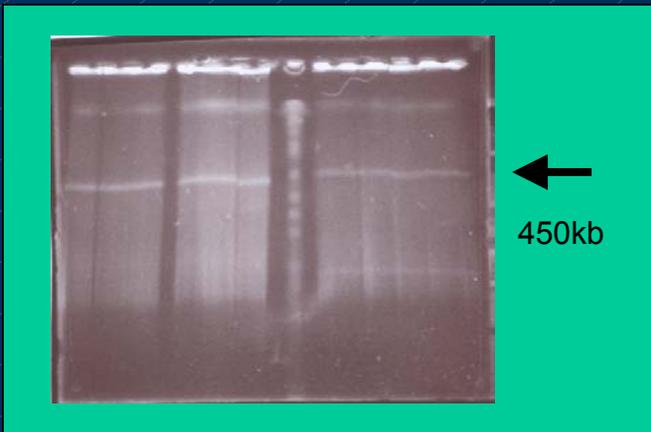


Los plugs se someten a una PFGE inicial para eliminar contaminaciones





Los plugs se recuperan de los pocillos y se digieren con *RsrII* para linearizar el DNA cromosómico de *B. aphidicola* Cce



Se purifica la banda de 450 Kb tras un PFGE

Construcción de genotecas parciales

Secuenciación, unión de “contigs”, identificación de genes, etc.

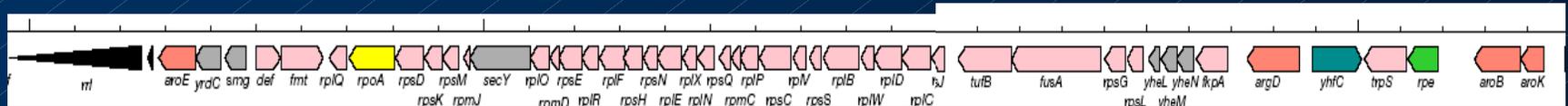
Secuenciar los “gaps”

Resultados de la secuenciación del genoma de BCc

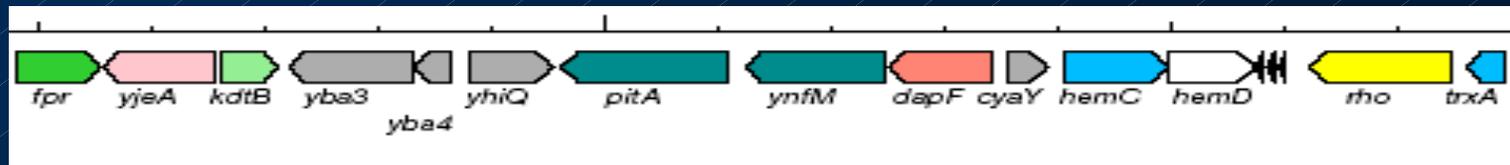


Ejemplos

- Contig 1: region entre *rrl* (rDNA 23S) y *aroK* (shikimato kinasa)



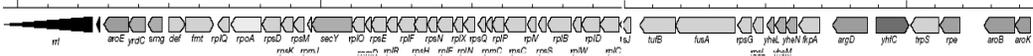
- Contig 2: region entre *fpr* (ferredoxin-NADP reductasa) y *trxA* (tiorredoxina)



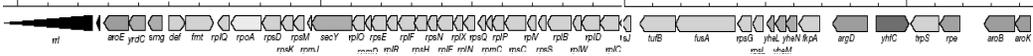
(a)

rri-aroK

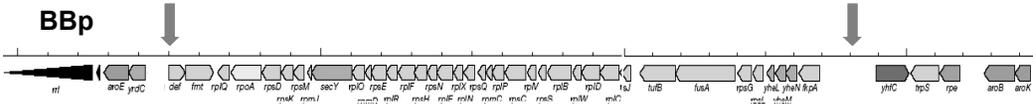
BAp



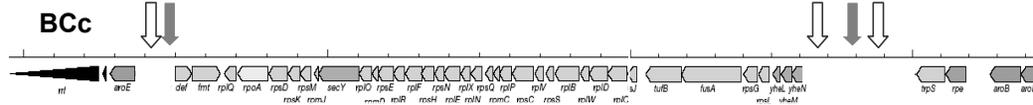
BSg



BBp



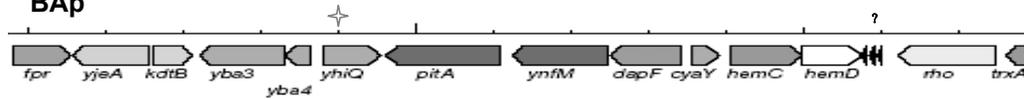
BCc



(b)

fpr-trxA

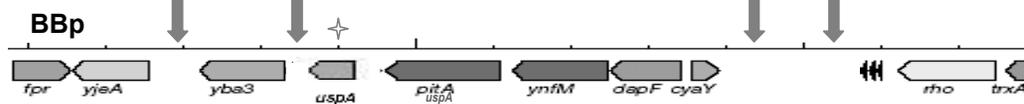
BAp



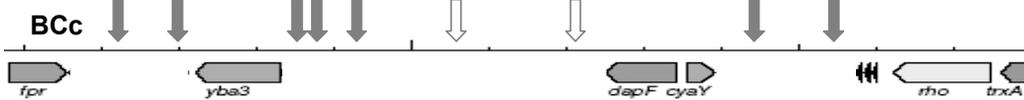
BSg



BBp



BCc



Resumen de la compación de las dos regiones en los cuatro genomas de *B. aphidicola*

	rrl-aroK				fpr-trxA			
	BAp	BSg	BBp	BCce	BAp	BSg	BBp	BCce
start position	539,872	540,695	508,449	?	614,858	615,691	591,760	?
end position	574,364	574,741	541,741	?	627,911	628,538	603,373	?
length (bp)	34,493	34,047	33,293	28,691	13,054	12,848	11,614	5,888
%G+C	30.5%	29.5%	29.2%	26.1%	25.9%	24.9%	24.8%	21.8%
ORFs	47	47	45	42	13	10	10	6
pseudogenes	0	0	0	0	1	4	0	0
tRNAs	1	1	1	1	3	3	3	3
rRNAs	1	1	1	1	0	0	0	0

reducción:

longitud:

15,5%

52,9%

nº de genes:

9,3%

45,6%

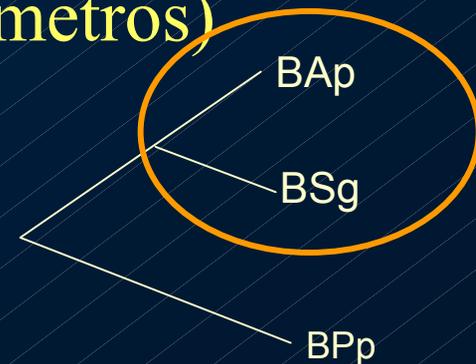
Análisis cuantitativo de la naturaleza de los genes preservados y/o desaparecidos en las dos regiones

a) Naturaleza de los genes perdidos en BCc

	Informacionales	Resto	Total
BCc:	35	12	47
Resto (BAp, BSg, BBp):	37	22	59
Esperados BCc	29.5	17.5	
$\chi^2 : 13,5. 2 \text{ gdl}, p < 0,05$			

b) Los genes menos similares son más propensos a perderse que los más conservados (K-2parametros)

Preservados:	47	(0.2011 ± 0.0516)
Desaparecidos:	14	(0.3561 ± 0.1874)
t-Student:	3.06,	13.6 gdl p = 0.009



Conclusiones de la comparación de las dos regiones en los cuatro genomas

- *B. aphidicola* BCc ha sufrido un proceso reductivo aún mas dramático que las cepas previamente secuenciadas
- El contenido en G+C es menor que en los otros genomas, tanto en la región codificante como en las regiones intergénicas
- La disminución en el tamaño del genoma es principalmente debido a la pérdida de regiones codificantes y no a un acortamiento de las regiones intergénicas
- La pérdida de genes no es uniforme a lo largo del genoma y es altamente dependiente de la naturaleza del contenido génico: genes implicados en procesos de información están más preservados
- El orden génico está conservado

Profesores

Andrés Moya

Francisco J. Silva

Amparo Latorre

Contratados

Rosario Gil (Ramón y Cajal)

Doctorandos

Laura Gómez-Valero

Vicente Pérez-Brocal

Técnicos

Silvia Ramos

Cooperaciones

Entomología

José M. Michelena

Pilar González-Funes

Biología Celular

José M. García Verdugo

Mario Soriano-Navarro