

SIMBIOTES HEREDITARIOS CAUSANTES DE EFECTOS DELETÉREOS EN LOS ARTRÓPODOS

Michael E. N. Majerus

Department of Genetics, Cambridge University,
Downing Street, Cambridge, CB2 3EH, Reino Unido.
menm@mole.bio.cam.ac.uk

Resumen

En los artrópodos es común la presencia de simbioses intracelulares que se transmiten verticalmente entre hospedadores, de generación a generación. Cada vez resulta más patente que las interacciones entre muchos de esos simbioses y sus hospedadores son antagonistas. Muchas de las estrategias empleadas por los simbioses hereditarios para aumentar su propia abundancia son perjudiciales para sus hospedadores. Algunos incrementan su número mediante la reducción de la eficacia biológica de los individuos no infectados de la especie hospedadora (incompatibilidad citoplásmica), mientras que otros inducen en la reproducción o en la proporción sexual del hospedador diversos sesgos que favorecen a las hembras (feminización, inducción de la partenogénesis, androcidio). Cada una de estas estrategias del simbiote tiene sus características peculiares y todas ellas pueden haber tenido, y quizá tienen aún, consecuencias de importancia para la evolución pasada y presente de los hospedadores, y de los propios simbioses.

Palabras clave: Simbioses hereditarios, Distorsión de la proporción sexual, Incompatibilidad citoplásmica, Partenogénesis, Feminización, Androcidio, Conflicto intragenómico.

Deleterious inherited symbionts in arthropods

Abstract

Intracellular symbionts that are vertically transmitted down host generations are common in arthropods. It is becoming increasingly evident that the interactions of many of these symbionts and their hosts are antagonistic. Many of the strategies employed by inherited symbionts to increase their own prevalence are detrimental to their host. Some achieve increase by reducing the fitness of uninfected hosts (cytoplasmic incompatibility), while others induce various biases of host reproduction or sex ratio in favour of females (feminisation, parthenogenesis induction, male-killing). Each of these symbiont strategies has its own peculiar features and all may have had, and may still have, far reaching consequences on the evolution of hosts and of the symbionts themselves.

Key words: Inherited symbionts, Sex ratio distorters, Cytoplasmic incompatibility, Parthenogenesis, Feminisation, Male-killing, Intra-genomic conflict.

INTRODUCCIÓN

Muchas especies de artrópodos albergan endosimbioses de transmisión hereditaria. Debido a que la persistencia de estos simbioses hereditarios depende de modo tan íntimo de la de sus hospedadores, generalmente se ha supuesto que los microorganismos que son transmitidos de padres a hijos a lo largo de generaciones de hospedadores, con gran eficacia, deberían evolucionar con el tiempo hasta volverse beneficiosos para sus hospedadores. Sin embargo, los endosimbioses hereditarios disponen de otra estrategia evolutiva alternativa: pueden parasitar el sistema reproductor de sus hospedadores y manipularlo en beneficio propio, incluso si ello va en detrimento del hospedador. Se han encontrado varias de dichas manipulaciones, entre las que destacan la incompatibilidad citoplásmica (IC), la feminización, la inducción de partenogénesis (IP) y el androcidio¹.

Hace tiempo que se conocen distorsiones de la reproducción y de la proporción sexual en los artrópodos. Sin

embargo, el estudio de las causas de tales distorsiones ha sido a menudo difícil debido a la delicada naturaleza de los microorganismos causantes, puesto que éstos no sobreviven fuera del ambiente citoplasmático de las células de sus hospedadores. No obstante, los recientes avances en las técnicas de la Genética Molecular han permitido el estudio detallado de muchas de las distorsiones descubiertas hace tiempo. Además, el desarrollo de métodos moleculares para la detección e identificación de simbioses, por medio de su ADN, está produciendo un rápido aumento en el número de sistemas en que se conoce la participación de estos microbios.

Antes de considerar los mecanismos y las consecuencias ecológicas y evolutivas de los diferentes tipos de manipulación reproductora de los hospedadores por parte de los simbioses hereditarios, haré mención de algunas generalidades acerca de las relaciones entre los simbioses y sus hospedadores. Intuitivamente, el argumento de que los

simbiontes hereditarios deberían evolucionar hasta convertirse finalmente en beneficiosos para sus hospedadores parece razonable. El razonamiento es el siguiente. Puesto que el bienestar del microorganismo depende de la supervivencia y reproducción del hospedador, cualquier función de aquél que aumente la eficacia biológica de éste también será ventajosa para el simbiote. De ello se deduce que cualquier acción del simbiote que reduzca la eficacia biológica del hospedador será perjudicial para el propio simbiote y será eliminada por selección natural. Sin embargo, este argumento intuitivo olvida algunas estrategias alternativas por las cuales los simbiontes pueden prosperar a expensas de sus hospedadores. Dichas estrategias alternativas existen y son fáciles de imaginar.

Imagínese un endosimbiote hereditario que pasa de una generación a la siguiente en el citoplasma del gameto femenino. Éste es el modo de herencia de la mayor parte de los simbiontes hereditarios. Aunque tal simbiote obviamente proliferará si aumenta la eficacia biológica de los individuos infectados de la especie hospedadora, existen otros dos modos por los que también puede extenderse. En primer lugar, puede disminuir la eficacia biológica de los individuos no infectados. En segundo lugar, puede distorsionar la proporción sexual de su hospedador en favor de las hembras infectadas.

La incompatibilidad citoplásmica (IC) en hospedadores diploides sigue la primera de esas rutas. Las hembras infectadas dan lugar tanto a machos como a hembras infectados. El apareamiento de una hembra infectada tiene escasas consecuencias para su eficacia biológica, esté el macho infectado o no. Por el contrario, si una hembra no infectada se apareara con un macho infectado queda esterilizada y su eficacia biológica en adelante se ve reducida a cero. La incompatibilidad citoplásmica en organismos haplodiploides tiene un resultado diferente; la progenie de un cruce entre un macho infectado y una hembra no infectada está fuertemente sesgada hacia los machos, mientras que el cruce recíproco origina una progenie normal.

Se conocen varios mecanismos de distorsión de la proporción sexual. En el caso de la feminización, la proporción sexual primaria de los individuos infectados se sesga hacia las hembras debido a que los machos genotípicos se convierten en hembras fenotípicas. La inducción de partenogénesis en los Hymenoptera haplodiploides también afecta a la proporción sexual primaria de los hospedadores, al causar un aumento en la producción de hembras infectadas. Por el contrario, el androcidio distorsiona hacia la producción de hembras la proporción sexual secundaria de la progenie de las hembras infectadas. Las hembras infectadas producen, por lo general, cigotos masculinos y femeninos con igual probabilidad, pero la eficacia biológica de los cigotos masculinos se ve notablemente reducida (a veces, a cero), mientras que la de sus hermanas se incrementa.

La tabla 1 resume las principales características de las cuatro estrategias de manipulación empleadas por los simbiontes hereditarios causantes de efectos deletéreos, así como la diversidad taxonómica de los simbiontes y de sus hospedadores.

Comienza a estar claro que los endosimbiontes hereditarios son muy comunes en los artrópodos. Una revisión estimó, mediante el empleo de técnicas moleculares para la detección de un género de bacteria heredada, *Wolbachia*, que alrededor del 15% de las especies de insectos albergan bacterias de dicho género (Werren et al., 1995a). Esta estimación tan extraordinaria puede ser incluso conservadora, ya que se analizaron sólo uno o unos pocos individuos y las *Wolbachia* poco frecuentes probablemente pasaron inadvertidas.

Las interacciones con sus endosimbiontes hereditarios puede haber jugado un papel significativo en la evolución de los artrópodos. En esta revisión, discutiré primero cada uno de los tipos conocidos de manipulación del hospedador por parte de endosimbiontes hereditarios. A continuación, discutiré las consecuencias evolutivas de estos parásitos para sus hospedadores.

INCOMPATIBILIDAD CITOPLÁSMICA

La incompatibilidad citoplásmica (IC) se descubrió cuando se realizaron cruces entre mosquitos de poblaciones europeas, asiáticas y americanas y no se obtuvo ninguna progenie, o la progenie se obtenía solamente al realizar los cruces en una dirección. Por ejemplo, los cruces entre *Culex pipiens* de las poblaciones de Hamburgo y Oggelhausen producían una descendencia normal cuando las hembras procedían de Hamburgo, pero eran estériles cuando las hembras se tomaban de Oggelhausen. Además, al retrocruzar la progenie femenina de los cruces hembra de Hamburgo x macho de Oggelhausen con machos de cualquiera de las poblaciones parentales se obtenía descendencia normal. Sin embargo, los machos sólo producían progenie si se retrocruzaban con las hembras de Hamburgo. Este patrón de esterilidad mostró una herencia materna e indicó una asociación con factores citoplásmicos; de ahí el nombre que se dio al fenómeno. Finalmente, se averiguó que *Wolbachia* era la responsable (Yen & Barr, 1973). Desde el trabajo pionero sobre IC realizado por Laven en los años 50 (revisado en Laven, 1967), se ha encontrado IC en muchos taxones de insectos.

La incompatibilidad citoplásmica se produce cuando un macho portador de *Wolbachia* se apareara con una hembra que no hospeda la misma cepa de la bacteria. *Wolbachia* introduce una sustancia química en el esperma de su hospedador que hace inviable aquellos cigotos formados dentro de la hembra no portadora. Por tanto, una hembra no infectada que se apareara con un macho infectado queda esterilizada. Las restantes combinaciones de apareamiento no se ven afectadas.

En muchas especies con IC, dicho fenotipo puede curarse mediante un tratamiento con el antibiótico tetraciclina. También se han conseguido curas mediante la exposición de los individuos infectados a altas temperaturas (p. ej. 37 °C) durante varios días.

En general, se ha observado que la IC produce dos patrones de esterilidad. En uno de ellos, algunos cruces interpopulacionales parecían normales cuando los machos pertenecían a una de las poblaciones, pero eran estériles cuando procedían de la otra. En el otro, los cruces interpopulacionales daban lugar a pocos o ningún descendiente, independientemente de la dirección del cruce. La conclusión que se obtuvo de dichos patrones fue que algunos hospedadores albergan más de una cepa de *Wolbachia* inductora de IC (en adelante, *Wolbachia* IIC). Los cruces entre poblaciones portadoras de diferentes *Wolbachia* IIC son estériles en ambas direcciones. Y los cruces entre individuos de una población portadora de *Wolbachia* IIC y los de una población no portadora serán estériles sólo si el macho procede de la población portadora. En la mosca de la fruta *Drosophila simulans*, por ejemplo, se han observado ambos tipos de incompatibilidad, uni- y bidireccional, y se han encontrado cinco tipos de incompatibilidad en poblaciones naturales (Tabla 2; Hoffmann & Turelli, 1997).

La existencia de más de una cepa de *Wolbachia* IIC dentro de una especie plantea la posibilidad de una doble

Tabla 1

Resumen de la diversidad taxonómica y principales características de las estrategias manipuladoras de los simbiontes hereditarios causantes de efectos deletéreos.

Estrategia	Simbiontes	Hospedadores	Efecto del simbiote sobre la proporción sexual del hospedador	Eficiencia de la transmisión vertical	Presencia natural en las poblaciones infectadas	Congruencia de las filogenias del hospedador y del simbiote
Incompatibilidad citoplasmática	<i>Wolbachia</i>	Crustacea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera	Ninguno	0,95-1 En la naturaleza la presencia puede ser menor que en el laboratorio	0,8-1	Incongruentes, posible transmisión horizontal
	<i>Wolbachia</i>	Hymenoptera	Sesgo masculino de la proporción sexual primaria	> 0,99	1	
Feminización	<i>Wolbachia</i>	Isopoda, Lepidoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual primaria	0,8-0,9	0,06-0,7	
	Microsporidia	Amphipoda	Sesgo femenino de la proporción sexual primaria	0,8-0,9	0,05-0,3	
	Paramyxidia	Amphipoda	Sesgo femenino de la proporción sexual primaria	0,8-0,9		
	Desconocido	¿Copépodo?, ¿decápodo?	Sesgo femenino de la proporción sexual			
Inducción de partenogénesis	<i>Wolbachia</i>	Hymenoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual primaria	> 0,9	Generalmente 1, pero en <i>Trichogramma</i> existen poblaciones polimórficas	Incongruentes, posible transmisión horizontal
Androcidio tardío	Microsporidia	Diptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria por muerte de los machos en su último instar larvario	Variable. También puede haber altos niveles de transmisión horizontal	0,02-0,4	
Androcidio precoz	Flavobacteria	Coleoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria	> 0,99	0,13-0,23	Posiblemente congruentes
	<i>Rickettsia</i>	Coleoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria	0,80-0,90	0,01-0,09	Posiblemente incongruentes, con posible transmisión horizontal
	<i>Wolbachia</i>	Coleoptera, Lepidoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria	0,86-1 (Coleoptera); > 0,99 (Lepidoptera)	0,06 (Coleoptera) 0,20-1 (Lepidoptera)	No se ha resuelto
	Enterobacteriaceae	Hymenoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria	0,95	0,04-0,11	Transmisión horizontal del simbiote entre una avispa parasitoida y su mosca hospedadora
	<i>Spiroplasma</i> (Gr II)	Diptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria	0,90-0,99	0,05-0,12	
	<i>Spiroplasma</i> (Gr VI)	Coleoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria	0,90-1	0,02-0,86	Posiblemente incongruentes, con posible transmisión horizontal
Bacteria desconocida	Lepidoptera, Coleoptera	Sesgo femenino de la proporción sexual secundaria				

Tabla 2

Tipos de incompatibilidad y sus infecciones asociadas en *Drosophila simulans* (tomado de Hoffmann & Turelli, 1997).

Tipo de incompatibilidad	Infección	Incompatibilidad entre tipos*:						Aparición
		R	S	H	N	A	W	
R	wRi	-						Natural
S	wHa, wNo	bi	-					Natural
H	wHa	bi	uni	-				Natural
N	wNo	bi	uni	bi	-			Inducida por segregación
A/M	Sin nombre/wMa	uni	uni	uni	?	-		Natural
W	No infectado	uni	uni	uni	uni	nin	-	Natural
Sin nombre	wRi, wHa	uni	?	uni	?	?	uni	Producida por microinyección
Sin nombre	<i>Wolbachia</i> de <i>Aedes</i>	bi	?	bi	?	?	uni	Producida por microinyección

* bi = incompatibilidad bidireccional, los cruces en ambas direcciones muestran una tasa de eclosión reducida; uni = incompatibilidad unidireccional, los cruces en una dirección muestran tasas de eclosión reducidas; nin= ninguna.

infección en un mismo individuo. En realidad, existe evidencia de que ello ocurre, por ejemplo, en el mosquito *Aedes albopictus* de Texas (Siskins et al., 1995). La presencia de varias cepas de *Wolbachia* IIC en un individuo hospedador puede explicar algunos de los complejos patrones de incompatibilidad que se observan en los mosquitos (p. ej. Laven, 1957; Magnin et al., 1987).

Diversidad taxonómica de la IC

Se ha observado IC en los cruces interpopulacionales de muchas especies de insectos. En los mosquitos *Culex* y *Aedes* se ha observado IC tanto uni- como bidireccional. Lo mismo ocurre en *D. simulans* y otras especies de *Drosophila* (Hoffmann & Turelli, 1997). En el escarabajo de la harina, *Tribolium confusum*, y en el gorgojo *Hypera postica*, se ha encontrado IC unidireccional (Hsiao & Hsiao, 1985; Wade & Stevens, 1985). También se ha observado incompatibilidad unidireccional en el homóptero *Laodelphax striatellus* (Noda, 1984) y en dos especies de Lepidoptera, la polilla *Ephesia cautella* (Brower, 1976) y el piérido *Eurema hecabe* (Hiroki, com. pers.). Finalmente, se ha encontrado IC inducida por *Wolbachia* en la avispa parasitoide *Nassonia vitripennis*, con incompatibilidad tanto uni- como bidireccional, así como dobles infecciones (Breeuwer et al., 1992).

A pesar de la diversidad de especies que muestran IC inducida por *Wolbachia*, el número de especies que presentan el fenómeno no es desmesurado. Sin duda, esto refleja la falta de investigación. La mayoría de las especies en que se ha demostrado IC tienen importancia económica como vectores de enfermedades o como plagas de cultivos, o bien se trata de organismos experimentales bien conocidos. En vista de las estimas actuales que indican que *Wolbachia* está presente en el 10 al 20% de las especies de insectos (Werren et al., 1995a), probablemente se descubrirán en el futuro nuevos casos de *Wolbachia* IIC.

Eficiencia de la transmisión vertical y niveles de presencia en la naturaleza

La eficiencia de la transmisión vertical de los endosimbiontes de herencia materna, es decir, la proporción de descendientes que heredan el simbionte de su madre, varía tanto entre simbiontes como entre hospedadores. En *Wolbachia* IIC, las eficiencias de transmisión son altas, en general (Tabla 1), aunque varían entre cepas. Hay evidencia de transmisión

vertical incompleta en mosquitos y moscas de la fruta. En aquellos casos en los que la eficiencia de transmisión se ha examinado tanto en el laboratorio como en el campo se ha visto que la eficiencia es menor en el campo. Ello puede ser debido a la existencia de antibióticos naturales, a factores climáticos, como la temperatura, a la diapausa del hospedador o a los niveles de densidad de la bacteria.

La presencia natural de *Wolbachia* IIC sólo se ha analizado en profundidad en *D. simulans* y en *D. melanogaster*. Estudios de *D. simulans* en California han producido datos extremadamente interesantes sobre la dinámica del aumento de *Wolbachia* IIC en la naturaleza. Antes de 1988, sólo se encontraban poblaciones infectadas al sur de la cordillera Tehachapi, al sur del Valle Central. Entre 1988 y 1994 ha habido un rápido incremento en la presencia de infección en el Valle Central. Además, la dispersión observada es consistente con las predicciones teóricas basadas en los niveles de incompatibilidad y de eficacia de la transmisión vertical. Existe un acuerdo perfecto entre la frecuencia en equilibrio predicha, basada en la incompatibilidad media medida entre machos infectados y hembras no infectadas (0,55), la producción media de prole no infectada por parte de hembras portadoras (0,04) y la frecuencia media observada en cinco poblaciones del sur de la cordillera Tehachapi, y en cinco poblaciones de la parte meridional del Valle Central (Turelli & Hoffmann, 1995).

Otros datos sobre la presencia de IC en *D. simulans* y en *D. melanogaster* no concuerdan de modo tan perfecto con las predicciones teóricas. Parte del problema estriba en que no siempre resulta aparente si la IC ha alcanzado un equilibrio estable en una población concreta. Dicha dificultad se acentúa con unos datos de *D. simulans* que sugieren que la frecuencia de infección en el equilibrio puede fluctuar temporalmente como consecuencia de los cambios en los niveles de incompatibilidad y en las tasas de transmisión vertical (Hoffmann & Turelli, 1997). La inconsistencia entre la presencia predicha y la observada también puede estar en relación con el transporte de fruta por el hombre, proceso en el cual las moscas de la fruta pueden ser dispersadas a largas distancias. Parece claro que la tasa de dispersión de la IC de tipo R descrita por Turelli & Hoffmann (1991), que indicaban tasas de migración de unos 50 km por generación, dista de la explicable simplemente por la capacidad de vuelo.

Lo que es cierto es que la presencia de IC de tipo R ha aumentado, o lo está haciendo aún, de modo rápido en muchas partes del mundo. El agente denominado wRi está presente

actualmente en todas las poblaciones norteamericanas excepto las del sur de Florida, y en la mayor parte su frecuencia está próxima a la esperada en el equilibrio. También se ha encontrado una presencia alta de *wRi* en Costa Rica, Uruguay, Zimbabwe, Portugal y España. En la pasada década se encontraron menores frecuencias en Israel, Francia e Italia, y sería muy conveniente volver a estudiar dichas áreas para determinar si se trataba de frecuencias transitorias a medida que *Wolbachia* se dispersaba hasta alcanzar el equilibrio.

Mecanismos de incompatibilidad

Los mecanismos de incompatibilidad aún se conocen muy mal. En *C. pipiens*, la incompatibilidad parece ser provocada por la incapacidad de los espermatozoides portadores de *Wolbachia* IIC de fusionarse con los gametos femeninos que carecen de la misma *Wolbachia* (Jost, 1971). En *Drosophila* (O'Neill & Karr, 1990) y *Ephesia* (Kellen et al., 1981), el desarrollo del embrión se detiene en un estado temprano. En *N. vitripennis*, *Wolbachia* IIC interfiere con la condensación de los cromosomas de la dotación cromosómica paterna durante la primera división mitótica (Ryan et al., 1985; Reed & Werren, 1995). La dotación cromosómica paterna se pierde y como consecuencia la progenie lleva solamente la dotación materna, es haploide y, por tanto, masculina. Se desconoce la forma en que *Wolbachia* IIC interacciona con los cromosomas de su hospedador para impedir la condensación. En muchas especies sólo los espermatozoides jóvenes portan *Wolbachia* y no los maduros. Se ha propuesto, por tanto, que *Wolbachia* puede depositar en el esperma algún producto químico, o que puede retirar o modificar algún rasgo del esperma durante la espermatogénesis. Sin embargo, dista de saberse cuál de estas opciones es correcta, si lo es alguna de ellas.

Pese al desconocimiento de los mecanismos subyacentes a la IC, se sabe que la densidad de *Wolbachia* influye el nivel de incompatibilidad. El trabajo con varias especies ha demostrado que una mayor densidad de *Wolbachia* se relaciona con mayores niveles de incompatibilidad (p. ej., Binnington & Hoffmann, 1989). Sin embargo, la comparación entre especies también demuestra que la densidad bacteriana necesaria para causar un nivel específico de incompatibilidad varía de un caso a otro.

Efecto de la infección por *Wolbachia* IIC sobre la eficacia biológica del hospedador

El efecto de alojar *Wolbachia* IIC sobre la eficacia del hospedador necesita urgentemente de mayor investigación. La evidencia actual indica que en algunas especies existe una desventaja asociada con dicho rasgo. En experimentos de laboratorio, las hembras de *D. simulans* infectadas fueron menos fecundas que las no infectadas (Hoffmann et al., 1990), aunque los experimentos de campo no mostraron dicho efecto (Turelli & Hoffmann, 1995). Pese a que se han buscado, no se han demostrado efectos negativos en la eficacia biológica de otras especies de *Drosophila*. No obstante, se ha encontrado una reducción en la productividad en una cepa de *Tribolium* infectada por *Wolbachia* (Stevens & Wade, 1990).

Los efectos sobre la eficacia biológica también pueden manifestarse a través de la competencia espermática. En ensayos de laboratorio con *T. confusum*, Wade & Chang (1995) demostraron que el esperma de los machos infectados tenía menor capacidad competitiva que el de los machos no infectados. Este efecto podría alterar la dinámica de la

dispersión de *Wolbachia* IIC en una población, con un aumento de la dispersión en las especies más promiscuas.

Filogenia de *Wolbachia* IIC y sus hospedadores

Todos los agentes causantes de IC que se conocen pertenecen al complejo de *Wolbachia pipiens*. Dicho complejo agrupa un variado grupo de α -proteobacterias. Se sabe que los miembros de ese complejo infectan especies dentro de todos los órdenes principales de insectos, así como de otros artrópodos (ácaros, isópodos) y de otros filos (nematodos). Actualmente se han identificado más de 100 especies hospedadoras en los invertebrados, y el descubrimiento de nuevos hospedadores continúa.

Se sabe que, aparte de producir IC, los miembros de este complejo causan feminización, partenogénesis y androcidio. Además, algunos parecen no tener ningún efecto fenotípico sobre sus hospedadores y otros les son beneficiosos. El análisis filogenético, mediante el uso de tasas de sustitución sinónimas en el gen *ftsZ*, han demostrado que, dentro de los artrópodos hospedadores, el complejo incluye dos linajes principales que se separaron hace unos 50 millones de años (Werren et al., 1995b). El análisis filogenético de *Wolbachia*, mediante secuenciación de ARNr 16S y *ftsZ*, ha demostrado que las similitudes evolutivas entre *Wolbachia* de diferentes hospedadores no concuerdan con las relaciones evolutivas entre éstos (O'Neill et al., 1992; Werren et al., 1995a, b). Ello sugiere que en ocasiones tiene lugar la transmisión horizontal interespecífica de *Wolbachia*. Existe evidencia de que *Wolbachia* puede ser transferida horizontalmente entre insectos parásitos y sus hospedadores (Werren et al., 1995b) y parece existir un mayor grado de transmisión horizontal en la subdivisión A de *Wolbachia* que en la subdivisión B, particularmente en los últimos 2,5 millones de años. Dicho esto, no se sabe prácticamente nada acerca de los patrones y frecuencias de transferencia horizontal de estos simbiontes.

La falta de correlación filogenética entre *Wolbachia* y sus hospedadores se extiende al efecto fenotípico de los simbiontes sobre sus hospedadores. Las *Wolbachia* que utilizan estrategias similares para manipular la reproducción del hospedador no constituyen un grupo homogéneo. Por ejemplo, las *Wolbachia* IIC no forman un grupo monofilético comparado con las que inducen partenogénesis. Del mismo modo, la *Wolbachia* androcida del escarabajo *Adalia bipunctata* está estrechamente emparentada con el agente IIC de *T. confusum*, mientras que la de *Acraea encedon* se agrupa con la *Wolbachia* inductora de partenogénesis de *Trichogramma deion* (Hurst et al., 1999a). Una explicación para esta falta de agrupamiento de las *Wolbachia* con efectos similares sobre el hospedador es que las distintas estrategias que emplean han evolucionado independientemente más de una vez. Ésta es, quizá, la explicación más probable, pero existen otras. Las diferentes estrategias pueden surgir debido a diferentes presiones selectivas sobre el comportamiento y la ecología de un hospedador. Las peculiaridades del genoma de un hospedador pueden proporcionar también oportunidades favorables o imponer restricciones selectivas sobre *Wolbachia*, de forma que el genoma del hospedador, o alguna parte del mismo, actúa como un determinante crítico de la manipulación expresada. También es posible que dentro de una especie hospedadora la evolución de un sistema supresor frente a un tipo de manipulación conduzca a la evolución de una manipulación alternativa que no es suprimida. Finalmente, como señalan Werren & O'Neill (1997), los genes que causan la manipulación pueden ser extracromosómicos y podrían heredarse independientemente de los genes utilizados para el análisis filogenético.

FEMINIZACIÓN

Patrones de feminización

De forma habitual, los endosimbiontes feminizantes hacen que los machos genéticos se transformen en hembras. En los organismos diploides, en los que el sexo está determinado de modo ancestral por los cromosomas sexuales, esto resulta en hembras tanto homogaméticas como heterogaméticas, pero en machos de un solo tipo.

Tómese como ejemplo el caso mejor estudiado, el de la cochinilla de humedad *Armadillidium vulgare*. La determinación sexual normalmente se basa en los cromosomas sexuales, con las hembras como sexo heterogamético (dos dotaciones cromosómicas diferentes, WZ) y los machos como homogaméticos (dos dotaciones genéticas similares, ZZ) (Juchault & Legrand, 1972). Los primeros estudios demostraron que algunas hembras producían progenies de proporción sexual fuertemente sesgada hacia las hembras, y que el rasgo era de herencia materna. Una observación cuidadosa no logró demostrar ninguna mortalidad mayor en la progenie masculina de las hembras que exhibían el rasgo, lo cual sugirió que no se trataba de androcidio. El hallazgo de que el rasgo podía transmitirse horizontalmente a las hembras WZ que no lo poseían, mediante la inyección de tejidos de las hembras con dicho rasgo, sugirió la participación de un simbionte (Legrand & Juchault, 1970). Esta suposición se confirmó al descubrirse una bacteria en las hembras que exhibían el rasgo, pero no en los machos (Martin et al., 1973).

Cuando se produjo la identificación molecular, se averiguó que el simbionte era una *Wolbachia*. Esta *Wolbachia* es sensible a la temperatura, y es destruida gradualmente a 30 °C (Juchault & Legrand, 1981a, b). Curiosamente, las hembras mantenidas a 30 °C y curadas, por tanto, de la infección producían una progenie fuertemente sesgada hacia los machos, lo cual sugiere que estas hembras eran genotípicamente machos, es decir ZZ, y que su fenotipo masculino era consecuencia de la bacteria que habían albergado (Rigaud et al., 1991). El examen de los cromosomas sexuales de *A. vulgare* en poblaciones hospedadoras de *Wolbachia* demostró que todas las hembras eran ZZ (Juchault et al., 1993). Por tanto, en dichas poblaciones la determinación sexual había pasado de estar bajo el control cromosómico a depender del simbionte. Todos los individuos eran ZZ y los portadores de *Wolbachia* eran hembras, mientras que los no portadores eran machos. La eficiencia de transmisión del simbionte es imperfecta y aproximadamente el 10% de la progenie no es infectada y, por tanto, es masculina. Normalmente, el proceso de feminización es completo, aunque ocasionalmente aparecen fenotipos intersexuales, debidos probablemente a la baja densidad bacteriana en algunos individuos, o a la falta de una sincronía exacta entre la actividad feminizante de la bacteria y el momento de determinación de los tejidos sexuales.

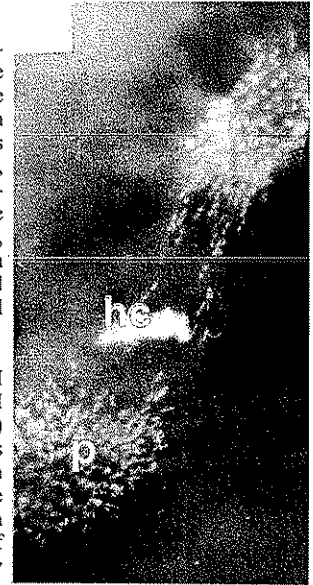
Diversidad de hospedadores y diversidad de feminizantes

Se han encontrado e identificado endosimbiontes feminizantes en varios Crustacea, y en un insecto. Dentro de los Crustacea, se han observado dos sistemas de feminización filogenéticamente diferentes, tanto en los hospedadores infectados como en los simbiontes responsables de la feminización. En los Isópoda, la feminización está causada por *Wolbachia* de la subdivisión B (Rousset et al., 1992). En los Amphipoda, los responsables de la feminización son eucariotas primitivos.

En base a la evidencia actual, la separación entre ambos sistemas dentro de los Crustacea es completa. De 80 especies

Fig. 1.- Imagen de microscopía óptica fluorescente que muestra la distribución de *Nosema granulosis* teñida con DAPI (p) respecto a los cromosomas del hospedador, durante la división embrionaria del hospedador (estado de 8-16 células). En la metafase, los microsporidia se localizan en grupos en polos opuestos del núcleo en división (cortesía del Dr. Alison Dunn).

Fig. 1.- Fluorescent LM showing distribution of DAPI stained *Nosema granulosis* (p) relative to host chromosomes during host embryonic division (8-16 cell stage). At metaphase the microsporidia are located in clusters at the opposite poles of the dividing nucleus (courtesy of Dr Alison Dunn).



estudiadas, 22 eran portadoras de *Wolbachia* y todas eran isópodos (Bouchon et al., 1998). En la mayor parte de las especies en las que se ha determinado el efecto de *Wolbachia*, produce feminización, aunque en *Porcellio dilatatus* induce IC (Bourtzis & O'Neill, 1998). A la inversa, los feminizantes no bacterianos están limitados a los anfípodos: *Gammarus duebeni* está infectado por dos Microsporidia; *Nosema granulosis* (Fig. 1), *Octosporea effeminans* (Smith & Dunn, 1991) y *Orchestia gammarella* hospedan al paramixidio *Paramartelia orchestia* (Ginsburger-Vogel & Desportes, 1979). Las transferencias artificiales por medio de microinyecciones tienen éxito cuando se realizan dentro de una especie y, en cierta medida, dentro de una clase, pero no entre clases. Algunos de estos experimentos de microinyección proporcionan evidencia indirecta de coevolución entre hospedador y simbionte. Así, la *Wolbachia* feminizante de *Chaetosphiloscia elongata*, filogenéticamente similar a la de *A. vulgare*, no produjo un efecto feminizante al ser transferida con éxito a esta última especie (Bouchon et al., 1998). Parece, pues, que el efecto feminizante depende mucho del hospedador. Esto tiene sentido si el mecanismo de feminización se basa en genes específicos de cada hospedador particular (Dunn & Rigaud, 1998).

La distribución dentro de los hospedadores de los distintos feminizantes es muy variable. *Wolbachia* y los Paramixidia suelen estar dispersos por todo el hospedador (Martin et al., 1973; Ginsburger-Vogel & Desportes, 1979), mientras que los Microsporidia están presentes exclusivamente en la línea germinal femenina. En *G. duebeni*, los Microsporidia pueden tener la capacidad de identificar, y de infectar con preferencia, los presuntos tejidos de la línea germinal (Hatcher et al., 1997), aunque el patrón de distribución observado también pudiera deberse a diferentes tasas de replicación de los Microsporidia en los tejidos somáticos con respecto a las células germinales. En cualquier caso, parece ser que la distribución de los Microsporidia específica de la línea germinal en *G. duebeni* es un resultado de la relativamente lenta tasa de replicación de aquéllos, lo que favorece una infección específica de las líneas celulares transmisoras (Dunn et al., 1995).

También es variable la presencia de los diversos feminizantes de Crustacea. En *G. duebeni* se han encontrado Microsporidia feminizantes en todas las poblaciones investi-

gadas, con unos niveles de presencia que oscilaban entre el 5 y el 30% (p. ej. Dunn et al., 1993). Por el contrario, la mayor parte de las poblaciones de *A. vulgare* carecen de *Wolbachia* feminizante (Juchault et al., 1993), aunque en este caso la situación se complica por la presencia de un factor feminizante no simbiótico (factor f), probablemente un transposón. No están claras las razones de la variabilidad en la presencia de los feminizantes, y en particular la baja presencia de *Wolbachia* feminizante en *A. vulgare*. Rigaud (1997) sugiere que las distribuciones y los patrones de presencia pueden ser una consecuencia de factores intrínsecos y extrínsecos específicos de cada sistema, y cuestiona la existencia de una explicación general. Ciertamente, esta es un área que requiere más investigación, con especial atención a la presencia de genes de resistencia, a efectos de interferencia con otros factores feminizantes y a las correlaciones entre los niveles de presencia y factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo y la salinidad.

Se han encontrado proporciones sexuales sesgadas y otros rasgos asociados, como la intersexualidad, en otros grupos de Crustacea. En algunos, los rasgos parecen estar controlados por genes nucleares o son inducidos ambientalmente. Sin embargo, se ha averiguado que la herencia citoplásmica está presente en el caso del cangrejo decápodo *Inachus dorsettensis* (Smith, 1905), del copépodo *Tigriopus japonicus* (Igarashi, 1964) y del cangrejo *Leptomithrax longipes* (Roper, 1979). No obstante, en cada uno de estos casos, no se ha confirmado aún la presencia de un simbiote causante (Rigaud, 1997).

La mayor parte de los ejemplos de feminización por endosimbiontes ocurren en Crustacea. Sin embargo, recientemente se ha encontrado dicho fenómeno en una especie asiática de polilla, *Ostrinia furnacalis* (Kageyama et al., 1998). La feminización en esta especie parece estar causada por una bacteria, ya que los sesgos hacia las hembras eran sensibles a la tetraciclina. En *O. furnacalis* se ha detectado una *Wolbachia*, filogenéticamente similar a la que produce feminización en *A. vulgare*, que es el presunto agente causal (Hoshizaki, com. pers.).

Además de este caso no crustaceo, Lawrence Hurst (1993) relaciona otras especies de artrópodos que pueden albergar factores sexuales citoplásmicos. Entre ellas figuran varios cóccidos, un áfido (Hemiptera) y una mariposa. En ninguno de estos casos se ha identificado al agente citoplásmico, y todavía debe verificarse si un simbiote se haya implicado en la determinación sexual del hospedador.

Sistemas de determinación sexual de los hospedadores susceptibles de feminización

El predominio de los Crustacea en todos los ejemplos de feminización inducida por simbiontes mencionados hasta el momento conduce a las siguientes cuestiones: ¿qué tiene de especial la determinación sexual en los Crustacea que hace que sea tan comúnmente trastocada? y ¿por qué es tan rara la feminización en otros taxones? Rigaud (1997) contrasta la feminización con la IC y señala la diversidad de simbiontes en la primera comparado con el único agente conocido, *Wolbachia*, causante de la segunda. Su conclusión es, por tanto, que la base fundamental de la feminización debe ser, en gran medida, una propiedad del hospedador más que de los microorganismos. Esta interpretación queda socavada en cierto modo si se consideran los endosimbiontes androcidas, en los que existe una diversidad filogenética tanto en los simbiontes como en los hospedadores. En el caso del androcidio, el éxito de un simbiote es resultado de la interacción entre la capacidad del

simbiote para manipular la reproducción del hospedador y la susceptibilidad del hospedador a dicha manipulación. Ésta última es consecuencia del sistema genético y el contexto ecológico del hospedador (Majerus & Hurst, 1997).

La determinación sexual en los Crustacea es relativamente lábil e incluye tanto heterogamia masculina como femenina. *A. vulgare* posee heterogamia femenina, y la temperatura y el fotoperíodo influyen en la determinación sexual. Por el contrario, en los *O. gammarellus* no infectados los machos son heterogaméticos y *G. duebeni* tiene un sistema de determinación sexual polifactorial que también se ve influido por el fotoperíodo. Sin embargo, mientras que la facilidad con que puede manipularse el sistema de determinación sexual del hospedador sin duda es importante, no deben olvidarse las capacidades de los simbiontes. La necesidad de flexibilidad por parte del simbiote puede entretenerse quizá por el hecho de que el feminizante de algunos Crustacea, y en el único insecto en que se conoce, es *Wolbachia*, que tiene una considerable flexibilidad en su manipulación de la reproducción del hospedador. Por tanto, quizá sea más preciso decir que la base fundamental de la feminización es consecuencia tanto de la flexibilidad fenotípica del simbiote como de la labilidad del sistema de determinación sexual del hospedador.

Mecanismo de la feminización

En *A. vulgare* la diferencia entre el desarrollo masculino o femenino parece depender de un único gen que bloquea la expresión del gen o los genes que provocan la diferenciación de la glándula androgénica. Esta glándula produce hormonas masculinas y si se impide su formación se obtiene un fenotipo femenino. Así, existe un mecanismo simple que permite a un simbiote hereditario feminizar a un macho genotípico, ya que todo lo que tiene que hacer es inhibir la diferenciación de la glándula androgénica. Aunque se desconoce la base molecular exacta de dicha inhibición, el simbiote parece imitar la acción de los "genes femeninos" que porta el cromosoma W y que inhiben la diferenciación de la glándula androgénica en los individuos WZ. Este mimetismo puede ser puramente fenotípico, y la perturbación en cualquier estado del proceso de desarrollo de la glándula androgénica podría conducir a la feminización.

Si la razón de que los Crustacea sean un "punto caliente" de endosimbiontes feminizantes se debe a la corruptibilidad de su sencillo sistema de determinación sexual, uno puede preguntarse por qué otros grupos no son tan susceptibles. La respuesta obvia es que los sistemas de determinación sexual de la mayoría de los organismos restantes no son tan fáciles de manipular. Por ejemplo, en *Drosophila* no se ha descubierto ningún cambio genético capaz de transformar un macho XY en una hembra viable y reproductivamente funcional. Es probable, pues, que tengan que operar conjuntamente varios factores para feminizar por completo a un macho cromosómico. La tarea de imitar un mecanismo de determinación sexual multifactorial sería obviamente más difícil para los potenciales feminizantes de insectos de lo que lo es en los Crustacea. La rareza de los endosimbiontes feminizantes en los insectos (un solo caso confirmado) puede ser simplemente un resultado de dicha dificultad.

Curiosamente, las *Wolbachia* feminizantes de Crustacea poseen un segundo mecanismo de feminización independiente del que afecta al desarrollo de la glándula androgénica. Dicho mecanismo se detectó por vez primera cuando se inyectaron estas *Wolbachia* en machos adultos con glándulas androgénicas totalmente desarrolladas y funcionales. El resultado fue una feminización gradual de dichos machos, con la produc-

ción de un fenotipo intersexual (Juchault & Legrand, 1985). Los análisis demostraron que aunque las glándulas androgénicas todavía producían hormona androgénica, y la hormona permanecía activa cuando se transfería a otros individuos, era ineficaz en su productor. Por tanto, es posible que *Wolbachia* interfiera de algún modo con los receptores de la hormona, en los tejidos diana. Se ignora por qué *Wolbachia* tienen dos mecanismos independientes que afectan a la determinación sexual de sus hospedadores; es algo que debe investigarse.

Conflicto intragenómico y genes de resistencia del hospedador

Una posible explicación del doble efecto feminizante de *Wolbachia* en *A. vulgare* es que se trata de una carrera de armamento entre los elementos citoplásmicos y el genoma nuclear. Como resultado de la diferencia de herencia, los genes nucleares, que generalmente son heredados de ambos progenitores, están en conflicto con los genes citoplásmicos (Werren, 1987; Hurst, 1992). En teoría, la presión selectiva resultante de este conflicto puede conducir a la producción de una proporción sexual sesgada hacia los machos por parte de las hembras no infectadas, que aumentan su eficacia a largo plazo simplemente produciendo el sexo más raro (Fisher, 1930). Como alternativa, la selección puede favorecer la existencia de genes nucleares que contrarrestan al feminizante de modo directo o indirecto. La acción directa puede consistir en causar la muerte de *Wolbachia* o reducir su eficiencia de transmisión vertical. La acción indirecta puede ser la supresión del efecto fenotípico del feminizante, o la alteración de los parámetros fisiológicos del desarrollo masculino. Ambas respuestas al conflicto genómico producido por la presencia de simbiontes feminizantes cuentan con algún apoyo empírico. Los experimentos de selección en *A. vulgare* han demostrado la presencia de genes autosómicos que pueden aumentar la proporción de machos en la progenie (Rigaud & Juchault, 1992). El apoyo para la presencia de genes de resistencia procede de los estudios del gen *M*, que contrarresta el efecto feminizante del factor *f*, el feminizante no simbiótico. Dicho factor *f* puede portar información feminizante derivada de, o similar a, la de los feminizantes microbianos, o puede insertarse en el (los) gen(es) masculino(s), alterando su función. El gen *M* se impone al factor *f*, restaurando un fenotipo masculino en presencia de *f*. No obstante, el gen *M* no es capaz de imponerse a las *Wolbachia* feminizantes, ya que aunque contrarresta la función feminizante primaria de estas bacterias, como demuestra el hecho de que el desarrollo sexual inicial procede hacia la diferenciación masculina, dicho desarrollo se detiene por el efecto feminizante secundario de *Wolbachia* y el desarrollo posterior conduce a la feminización, como resultado de la inactivación de la hormona androgénica. El efecto feminizante secundario de *Wolbachia* puede haber evolucionado, pues, en respuesta al gen *M* u otros genes de resistencia (Rigaud, 1997).

INDUCTORES DE LA PARTENOGENÉISIS

Gran parte de los seres vivos se entrega con profusión a la reproducción sexual. Sin embargo, una proporción importante de los organismos se reproduce asexualmente, bien de modo ancestral, bien como adquisición secundaria a partir de la sexualidad. La reproducción asexual secundaria se denomina partenogénesis, en la cual los nuevos individuos se originan a partir de huevos no fecundados. En las especies diploides, la evolución de la partenogénesis requiere dos pasos. En primer lugar, el huevo ha de ser capaz de desarrollarse sin la

penetración del espermatozoide como activadora. En segundo lugar, tiene que restaurarse el número diploide de cromosomas en el huevo haploide. No obstante, en algunos organismos, sólo las hembras son diploides, mientras que los machos son haploides y se originan sin fertilización. En estas especies haplodiploides, el desarrollo de los embriones masculinos se inicia sin el estímulo de la fecundación, y en su lugar han evolucionado otros mecanismos de inicio del desarrollo embrionario. Así pues, dichas especies sólo necesitan dar un paso evolutivo, la restauración del número diploide en las hembras, para llegar a la auténtica partenogénesis. Por esta razón, la partenogénesis es mucho más común en las especies haplodiploides que en las diploides.

Existen varios tipos de partenogénesis. Las especies haplodiploides ordinarias, en las que las hembras proceden de huevos fecundados y los machos de huevos no fecundados, se denominan arrenotocas. En la deuterotoquia, tanto machos como hembras proceden de huevos no fecundados, mientras que en la telitoquia se producen solamente descendientes de sexo femenino. La producción de descendientes femeninos únicamente, sin la necesidad de machos, plantea la posibilidad de que se encuentren implicados simbiontes citoplásmicos cuyos intereses se ven favorecidos por los hospedadores femeninos que pueden transmitirlos verticalmente. Esta participación se ha constatado en ciertos Hymenoptera haplodiploides.

Stouthamer et al. (1990a) obtuvieron la primera evidencia de que la telitoquia en Hymenoptera parasitoides implicaba factores citoplásmicos, en lugar de nucleares. Al utilizar machos de *Trichogramma pretiosum* producidos por tratamiento con temperatura, los intentos de introducir el genoma nuclear de un linaje telitoco en una línea arrenotoca de la misma especie, a lo largo de nueve generaciones, resultaron infructuosos. Posteriormente, la administración de diversos antibióticos o de altas temperaturas (más de unos 30 °C) a las hembras telitocas condujo a la producción de hijos (Stouthamer et al., 1990b). Esto condujo a la deducción de que el causante de la telitoquia en esta especie era algún tipo de microorganismo citoplásmico, probablemente una bacteria. La tinción lacmoide y el examen microscópico revelaron la presencia de una bacteria en los huevos de algunos linajes telitocos, pero no en aquéllos tratados con antibióticos o con temperatura, ni en los linajes arrenotocos (Stouthamer & Werren, 1993). El análisis del ADNr 16S reveló la presencia de una *Wolbachia* (Rousset et al., 1992; Stouthamer et al., 1993).

En la actualidad, la partenogénesis inducida por microorganismos se ha demostrado en más de 30 especies de avispas parasitoides. Todos los agentes causantes identificados hasta ahora pertenecen al género *Wolbachia*. Las *Wolbachia* implicadas no forman un grupo monofilético, sino que se hayan mezcladas con las *Wolbachia* que afectan a sus hospedadores de otros modos (p. ej., IC y androcidio). Esto sugiere que o bien la inducción de partenogénesis (IP) ha evolucionado varias veces independientemente dentro de las *Wolbachia*, o bien que los genes causantes de IP pueden transmitirse horizontalmente entre *Wolbachia*, por medio de intercambio de ADN mediado por partículas víricas o por plásmidos. Una tercera posibilidad es que la misma *Wolbachia* cause diferentes efectos en distintos hospedadores, por ejemplo IP en los haplodiploides e IC o androcidio en los diploides.

El análisis filogenético de algunas *Wolbachia* inductoras de partenogénesis (*Wolbachia* IP, en adelante), particularmente del género *Trichogramma*, ha proporcionado evidencia de la transmisión horizontal interespecífica del simbionte. Las *Wolbachia* de *Trichogramma* forman un grupo monofilético dentro de las *Wolbachia* IP, con el clado restringido a las especies de *Trichogramma* (Stouthamer et al., 1993; Werren

et al., 1995b). No obstante, dentro de una especie de *Trichogramma* existen varias *Wolbachia*, sin que exista congruencia entre la filogenia de los hospedadores y sus simbiontes (Schilthuisen & Stouthamer, 1997).

Mecanismo de la IP

Los estudios de organismos partenogenéticos han descubierto una gran variedad de modos en que puede producirse descendencia diploide a partir de huevos no fecundados. Dicha diversidad puede dividirse en dos grupos básicos: los que implican modificación meiótica, en la cual el número de cromosomas no se ve reducido durante la meiosis; y aquellos que implican modificación post-meiótica, en los cuales el número diploide es restaurado por la fusión de dos productos mitóticos haploides (Stouthamer, 1997). En los casos de IP por *Wolbachia* estudiados citológicamente, la ruta utilizada es la segunda. La meiosis tanto en hembras infectadas como no infectadas es similar, con la producción de un solo pronúcleo. En las hembras no infectadas (arrenotocas) la llegada del espermatozoide produce la fecundación y el desarrollo femenino normal. Si no llega ningún espermatozoide, el núcleo haploide se divide mitóticamente y las dos dotaciones cromosómicas formadas migran a polos opuestos durante la anafase de manera que se forman dos núcleos haploides. La división celular posterior sigue líneas similares, de modo que se forma un macho haploide. En las hembras infectadas, el proceso es el mismo hasta la anafase de la primera división mitótica. En este punto, ambas dotaciones cromosómicas migran al mismo polo y el resultado es un único producto mitótico diploide. Este comportamiento cromosómico se conoce como duplicación gamética. Aún se desconocen los métodos por los cuales *Wolbachia* afecta el comportamiento bioquímico y/o mecánico de los cromosomas del hospedador.

En los Hymenoptera con IP por *Wolbachia*, la temperatura a la cual son expuestas las larvas y las pupas influye en gran medida el sexo final de la progenie. En la mayor parte de las especies, a temperaturas inferiores a 26 °C toda la progenie es femenina, mientras que por encima de los 30 °C sólo se producen machos. A temperaturas intermedias pueden producirse tanto machos como hembras o ginandromorfos (Cabello & Vargas, 1985). Stouthamer (1997) sugiere que las diferencias en la proporción de tejidos masculinos y femeninos puede ser el resultado de un retraso en la duplicación gamética inducida por *Wolbachia*, es decir, su ausencia en la primera división mitótica. Esta hipótesis concuerda con la observación de una relación positiva entre un aumento de la temperatura y la proporción de tejido masculino. No obstante, si fuese cierta sería de esperar que la proporción mínima de tejido masculino en los ginandromorfos fuese de dos tercios, cosa que no ocurre, pues algunos individuos son predominantemente femeninos y sólo poseen un pequeño grupo anterior de células masculinas. Claramente, se requiere mayor investigación en esta área.

Dinámica de la infección por *Wolbachia*

En la mayoría de los Hymenoptera que hospedan *Wolbachia* IP la telitocia se ha fijado. Sin embargo, en muchas especies de *Trichogramma* coexisten individuos telitocos y arrenotocos, con baja presencia de *Wolbachia* (véase Stouthamer, 1997, para una revisión). Las causas de esta distribución de polimorfismo y monomorfismo todavía no están claras. Varios factores pueden producir polimorfismo: transmisión vertical incompleta; efectos negativos de la

infección sobre la eficacia biológica del hospedador; genes nucleares supresores; o una combinación de todos esos factores. Desgraciadamente, la evidencia empírica sobre dichos factores es todavía limitada. Sólo se han evaluado las tasas de transmisión vertical en cultivos de laboratorio, y tienden a ser altas: superiores al 90% en las especies de *Trichogramma* estudiadas (Stouthamer, 1997), si bien las tasas de transmisión parecen disminuir con la edad del hospedador. Se han demostrado grandes efectos negativos de la infección por *Wolbachia*, en forma de una reducción en la producción de descendientes, mediante la comparación de cepas de *Trichogramma* genéticamente idénticas, infectadas y no infectadas, sin limitación de hospedadores (Stouthamer et al., 1990a; Stouthamer & Luck, 1993). Sin embargo, si dichos efectos negativos ocurriesen en la naturaleza, la infección terminaría por desaparecer. Es posible que en poblaciones naturales la disponibilidad de hospedadores sea limitada, ya que en tales circunstancias las hembras infectadas producen más hijas que las no infectadas (Stouthamer, 1993). Finalmente, aunque el conflicto intragenómico debería imponer una presión selectiva a favor de genes nucleares supresores, la evidencia en apoyo de los mismos es dispersa e indirecta. Dicha evidencia se basa en dos casos, en diferentes especies, de segregación de la progenie virgen en individuos que producen sólo hembras y otros que producen sólo machos (Rössler & DeBach, 1972; Stouthamer, 1997).

La investigación sobre los efectos evolutivos de los simbiontes IP está todavía en su infancia. Desde que se descubrió la participación en la IP de *Wolbachia* heredadas citoplásmicamente, se han identificado más de 30 sistemas *Wolbachia*-Hymenoptera, el análisis filogenético ha demostrado la transferencia horizontal de los simbiontes y se ha avanzado en la comprensión de las bases citológicas de esta forma de partenogénesis. También se ha progresado considerablemente en la teoría de la dinámica poblacional y evolutiva de los inductores de partenogénesis (véase Stouthamer, 1997). Sin embargo, todavía existen grandes lagunas en el conocimiento de este fenómeno. ¿Por qué mecanismo afecta *Wolbachia* al comportamiento de los cromosomas del hospedador? ¿De qué modo surgen los ginandromorfos? ¿Tiene *Wolbachia* efectos negativos sobre la eficacia biológica de sus hospedadores en condiciones naturales? ¿Con qué frecuencia ocurre la transmisión horizontal (intra- o interespecífica) de *Wolbachia* en poblaciones naturales? ¿Existen genes supresores? ¿Está realmente restringida a los Hymenoptera la partenogénesis inducida por simbiontes? Todas estas cuestiones proporcionan un fértil campo para la investigación futura.

ANDROCIDAS

En cierto modo, el androcidio es el menos sofisticado de los mecanismos que distorsionan la proporción sexual utilizado por los simbiontes hereditarios. El mecanismo básico consiste en que el simbionte mata a los hospedadores masculinos pero no a los femeninos. Quizá como consecuencia de esta definición tan burda, el androcidio parece ser más diverso taxonómicamente, tanto en lo que atañe a los hospedadores como a los simbiontes, que otros tipos de distorsión de la proporción sexual empleados por los microorganismos hereditarios (Tabla 3). Dentro de los artrópodos, el androcidio se ha encontrado en cinco órdenes de insectos y en dos especies de ácaros. Además, los propios androcidas son taxonómicamente diversos, pues incluyen α y γ Proteobacteria, Micoplasma, Flavobacteria y Microsporidia.

Tabla 3
Androcidio en los coccinélidos.

Especie hospedadora	Países	Agente	Frecuencia	Evidencia*
<i>Adalia bipunctata</i>	Inglaterra, Escocia, Holanda, Dinamarca, Luxemburgo, Francia, Alemania, Polonia, Rusia, Kyrgyzia	<i>Rickettsia</i>	0,01-0,09	pssh; bte; hm; sa; sc; m; ADN; RCP
<i>Adalia bipunctata</i>	Alemania, Rusia	<i>Spiroplasma</i> (Grupo VI)	0,03-0,13	pssh; bte; hm; sa; sc; m; ADN; RCP
<i>Adalia bipunctata</i>	Rusia	Dos cepas de <i>Wolbachia</i>	cada una < 0,1	pssh; bte; hm; sa; sc; m; ADN; RCP
<i>Adalia 10-punctata</i>	Alemania	<i>Rickettsia</i>		pssh; bte; hm; sa; sc; m; ADN; RCP
<i>Harmonia axyridis</i>	Japón, Rusia, Corea del Sur	<i>Spiroplasma</i> (Grupo VI)	0,02-0,86	pssh; bte; hm; sa; sc; m; ADN; RCP
<i>Coleomegilla maculatus</i>	EE.UU.	Flavobacteria	0,23	pssh; bte; hm; sa; ADN; RCP
<i>Adonia variegata</i>	Turquía	Flavobacteria	0,13	pssh; bte; hm; sa; ADN; RCP
<i>Hippodamia 15-signata</i>	EE.UU.	Desconocido		pssh; bte; hm
<i>Cheilomenes 6-maculatus</i>	Japón	Probablemente <i>Spiroplasma</i> , (<i>Wolbachia</i> ha sido detectada en algunas líneas)	0,13	pssh; bte; hm; sa; RCP
<i>Coccinula sinensis</i>	Japón	Probablemente Flavobacteria	0,23	pssh; bte; hm; sa; RCP
<i>Propylea japonica</i>	Japón	Probablemente <i>Rickettsia</i>	0,07-0,26	pssh; bte; hm; sa; RCP
<i>Coccinella 7-punctata</i>	Inglaterra	Desconocido	< 0,01	pssh; bte
<i>Calvia 14-punctata</i>	Inglaterra	Desconocido		pssh; bte

*Evidencia consistente en: pssh = proporción sexual sesgada hacia las hembras; bte = baja tasa de eclosión de huevos en las líneas infectadas; hm = herencia materna; sa = sensibilidad a los antibióticos; sc = sensibilidad al calor; m = microscopía; ADN = secuenciación de ADN; RCP = detección del simbiote por medio de reacción RCP específica.

Androcidas precoces y tardíos

Laurence Hurst (1991) reconoció que la migración fuera de un hospedador puede verse facilitada por la muerte del hospedador masculino si el cadáver se descompone para liberar a los endosimbiontes. Argumentó que el androcidio debería ocurrir en un momento tardío del desarrollo para dar tiempo al androcida a replicarse dentro de su hospedador, de modo que pueda liberarse un gran número de individuos de golpe. Denominó a estos casos androcidas tardíos.

Los androcidas tardíos de transmisión horizontal pueden compararse con los endosimbiontes que matan a los machos y mueren en el proceso, pero al hacerlo aumentan la eficacia biológica de otras copias de sí mismos presentes en los hospedadores femeninos. El aumento de eficacia biológica de las hembras infectadas, resultante del androcidio, se denomina compensación de la eficacia biológica, ya que para que la estrategia androcida invada, dicho aumento de eficacia biológica debe compensar la mortalidad de la progenie masculina, así como cualquier coste que acarree a las hembras portadoras del endosimbionte. Debido a la naturaleza de la reproducción en la mayoría de los simbiotes microbianos, mucha o toda la progenie de una madre infectada llevará copias de un simbiote virtualmente idénticas por descendencia. Así, si mediante el androcidio el simbiote aumenta la eficacia biológica de las hermanas de los machos muertos, también se producirá un beneficio en eficacia biológica para las copias "exactas" del androcida que están en dichas hembras.

Se han identificado dos tipos de ventajas del androcidio. En primer lugar, se reduce la posibilidad de apareamiento con parientes próximos, en concreto hermanos, y con ello la depresión endogámica potencial. Una hembra infectada cuyos

hermanos han muerto por efecto de un androcida no puede cometer incesto. En segundo lugar, los recursos que podrían haber sido utilizados por los machos de una familia quedan disponibles para las hermanas. En el caso de la evitación de la endogamia, poco importa cuándo mueren los hospedadores masculinos, siempre y cuando lo hagan antes de la madurez reproductora. Sin embargo, si el beneficio del androcidio implica la redistribución de recursos, el máximo beneficio se obtiene si los hospedadores masculinos mueren antes de haber consumido una cantidad apreciable de los recursos. La redistribución de recursos conducirá, por tanto, a lo que Hurst (1991) llamó androcidio precoz.

Androcidas tardíos

Existen pocos ejemplos de androcidio tardío. Los casos confirmados se limitan a los mosquitos, grupo en el que se conoce la infección por *Microsporidia* androcidas para más de dos docenas de especies. Normalmente, las larvas masculinas del cuarto instar mueren. Los *Microsporidia* se transmiten a otros hospedadores cuando las larvas muertas liberan las esporas, que son ingeridas por otras larvas, bien directamente o de modo indirecto por medio de un copépodo intermediario. Además, la ingestión puede producirse por canibalismo larvario (Bechel & Sweeney, 1990). Las larvas recién infectadas se desarrollan normalmente; los simbiotes invaden inicialmente las células epiteliales de los ciegos gástricos y a partir de ahí pasan a los oenocitos. Ni las hembras ni los machos parecen verse afectados negativamente por estas infecciones tempranas, y las hembras transmiten el microsporidio a los huevos. Los machos de esta siguiente generación pueden morir, mientras que las hembras continúan transmi-

tiendo los simbiontes de modo vertical. No obstante, la infección por *Microsporidia* no siempre sigue esta vía. Algunos *Microsporidia* causan la muerte tanto de machos como de hembras, mientras que otros no matan a ninguno.

Estos ejemplos plantean varios interrogantes. ¿Cómo matan los *Microsporidia* a sus hospedadores? ¿Cómo se las arreglan algunos para matar selectivamente a los hospedadores macho y no a las hembras? ¿Por qué mueren los machos precisamente en el cuarto instar larvario? ¿Cuál es la razón para esa variedad en las estrategias empleadas por los diferentes *Microsporidia*, desde la patogenicidad para ambos sexos, pasando por el androcidio, hasta la inocuidad para ambos sexos? No todas estas cuestiones tienen una respuesta clara. En concreto, se desconoce el modo por el que los *Microsporidia* reconocen el sexo de su hospedador, y la forma en que lo matan.

Hurst (1991) propuso que provocar la muerte en el cuarto instar larvario es adaptativo para el androcida. Suponiendo, con razón, que la transmisión horizontal debe producirse en el agua y postulando que la fase de pupa, el estadio menos acuático del ciclo vital, puede dificultar la liberación del simbionte, Hurst dedujo que causar la muerte del hospedador en el último instar larvario, pero no antes, maximizaría el número de esporas de *Microsporidia* liberadas al agua.

La variabilidad de estrategias empleadas por los diferentes *Microsporidia* puede ser resultado de la probabilidad relativa de transmisión horizontal y vertical en situaciones ecológicas concretas (Hurst, 1991). Si los copépodos son comunes, la transmisión horizontal será eficaz, y podría esperarse letalidad de ambos sexos del hospedador. Sin embargo, si la transmisión vertical es eficaz y la transmisión horizontal no, debido a la escasez de copépodos, el androcidio resulta la estrategia más ventajosa. Sigue estando poco claro por qué ciertos *Microsporidia* son benignos para ambos sexos, aunque es posible que dicha estrategia sea beneficiosa si la transmisión vertical femenina mediante los huevos va acompañada de algún grado de transmisión sexual masculina durante la cópula (Hurst et al., 1997a).

Androcidio precoz

El androcidio precoz se ha encontrado en un grupo diverso de insectos hospedadores, y está causado por un igualmente variopinto grupo de bacterias, que incluye a *Spiroplasma* (Mollicutes), *Rickettsia*, *Wolbachia* (Rickettsiaceae), un pariente de *Blattabacterium* (Flavobacteria) y *Arsenophonus nasoniae* (Enterobacteriaceae). La variedad de agentes androcidas muestra claramente que el androcidio precoz ha evolucionado varias veces independientemente. De ello se deducen dos cosas: primero, que muchos tipos distintos de insectos tienen sistemas genéticos y ecologías susceptibles de ser invadidos por los androcidas y, segundo, que muchos microorganismos diferentes tienen la capacidad de reconocer y de matar de modo selectivo a sus hospedadores masculinos.

Los casos conocidos de androcidio precoz se diferencian de los androcidas tardíos en gran medida por la ausencia de transmisión horizontal significativa. A falta de una transmisión tal que conduzca a la infección regular de nuevos hospedadores, deben invocarse otros factores para equilibrar la pérdida de la progenie masculina y la vuelta a un estado no infectado en las hembras, como resultado de una transmisión vertical imperfecta del simbionte. Aunque es posible que la evitación de la endogamia proporcione esa ventaja, la depresión endogámica sufrida por los no infectados tiene que ser alta para dar suficiente ventaja a los infectados. Lo mismo se aplica a la redistribución de recursos. No obstante, los

rasgos etológicos y la ecología de algunos grupos pueden proporcionar un contexto en el que las hijas de las hembras infectadas obtienen un gran beneficio en recursos como resultado concreto de la muerte de los machos. Las ventajas que se han descubierto provienen de la reducción de la competencia por algún recurso limitado, de la redistribución de recursos aportados directamente por los progenitores, normalmente la madre, o de la reducción en la mortalidad que afecta a la progenie de las hembras no infectadas debido a los hábitos caníbales de los compañeros de prole.

Dentro de las ventajas del androcidio por redistribución de recursos, aquellos derivados de la muerte de los machos deben quedar disponibles preferentemente para las hembras infectadas, respecto a las no infectadas. En general, esto ocurrirá cuando la progenie femenina y masculina de una hembra se encuentra próxima entre sí. Este tipo de limitación significa que es improbable que la distribución del androcidio sea aleatoria en los invertebrados. Los grupos de especies con ciertas similitudes eto- o ecológicas serán particularmente propensos a la infección por androcidas precoces, mientras que otros grupos sin dichas características serán más o menos inmunes a dichos androcidas, simplemente porque existirá una compensación de la eficacia biológica insuficiente para que la estrategia androcida invada o evolucione.

Se ha observado un patrón no aleatorio de distribución del androcidio dentro de los invertebrados (Majerus & Hurst, 1996). Se conocen altas frecuencias de androcidio en los chinches (Hemiptera), las mariposas ninfálicas, especialmente del género *Acraea*, y las mariquitas (Coleoptera: Coccinellidae). Este último grupo ha sido el más extensamente estudiado y ha sido propuesto como sistema modelo para el estudio de muchos de los aspectos del androcidio precoz (Majerus & Hurst, 1997).

La diversidad de androcidas en los Coccinellidae

La producción de proporciones sexuales fuertemente sesgadas hacia las hembras en algunos individuos de *Adalia bipunctata* fueron señaladas por primera vez por Lusi (1947). Dicho sesgo tenía herencia materna. Posteriormente, se han encontrado proles completamente femeninas de herencia materna, curables mediante la administración de soluciones azucaradas con antibióticos a las hembras adultas (Fig. 2), en varias especies de coccinélidos (Tabla 3). En todos los casos, el sesgo femenino está asociado con una tasa de eclosión del 50%, lo cual sugiere que la proporción sexual primaria es normal pero que la proporción sexual secundaria está distorsionada debido a que los embriones masculinos mueren antes de eclosionar.

En su trabajo con poblaciones inglesas de *A. bipunctata* que exhibían un sesgo femenino en la proporción sexual de la progenie, Hurst et al. (1992) demostraron que dicho rasgo podía curarse con antibióticos, lo cual sugería la participación de una bacteria. El examen mediante microscopía óptica y electrónica de los hemocitos reveló la presencia de una bacteria en el citoplasma de las hembras que exhibían el sesgo femenino (Fig. 3), pero no en aquellas que producían una proporción sexual normal (Hurst et al., 1996). Mediante el uso de iniciadores bacterianos específicos, el análisis del gen ADNr 16S demostró que el androcida era una bacteria similar a *Rickettsia*, con una estrecha homología a los patógenos que producen el tifus murino y el tifus bovino (Werren et al., 1994).

Las muestras de *A. bipunctata* de otros países han demostrado que el androcidio está ampliamente distribuido en esta especie. Sin embargo, el análisis genético molecular ha demostrado que el agente causal del androcidio varía. Hasta la fecha se han identificado otras tres bacterias, una *Spiroplasma*

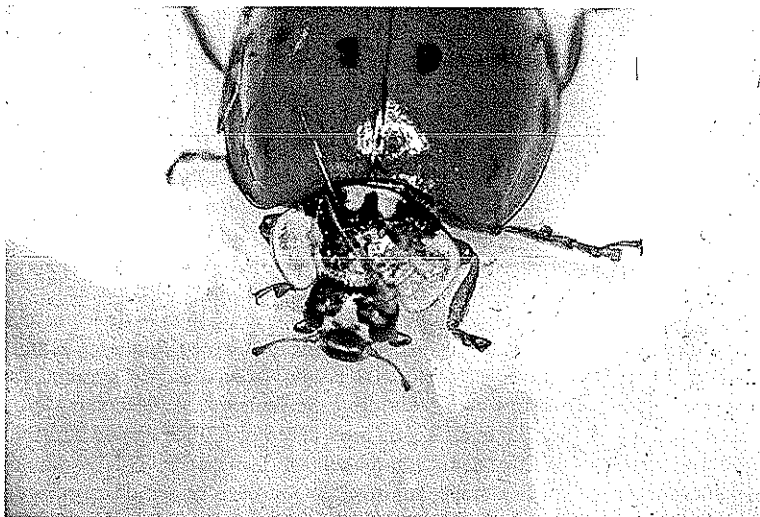


Fig. 2.- Tratamiento con antibióticos para curar el androcidio. Hembra infectada de *Harmonia axyridis* alimentándose de sirope con tetraciclina.

Fig. 2.- Antibiotic treatment to cure male-killing. Infected female of *Harmonia axyridis* feeding on tetracycline in golden syrup.

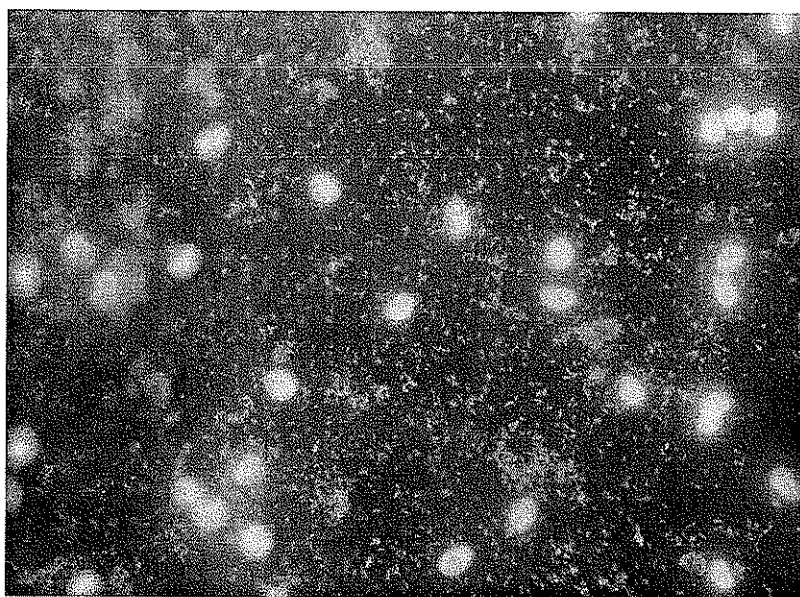


Fig. 3.- *Rickettsia* androcida de *Adalia bipunctata* tal y como aparece al teñir mediante DAPI los oocitos inmaduros de una ovariola. Se observa una alta densidad de bacterias (cortesía de J. H. G. v. d. Schulenburg).

Fig. 3.- The *Rickettsia* male-killer of *Adalia bipunctata* revealed by DAPI staining of immature oocytes from an ovariole. A high density of bacteria is visible (courtesy of J. H. G. v. d. Schulenburg).

(Hurst et al., 1999b) y dos cepas de *Wolbachia* (Hurst et al., 1999a). *Rickettsia* parece estar presente en solitario en Gran Bretaña. Sin embargo, en muchas otras localidades coexisten dos o más tipos de androcidas y a veces los cuatro están presentes. En realidad, se han obtenido los cuatro androcidas en una pequeña muestra (36 líneas maternas) recogida en una sola calle de Moscú (Majerus et al., en prensa). Los modelos teóricos sobre la evolución del androcidio sugieren que dos o más androcidas no pueden coexistir en una misma población hospedadora en equilibrio, excepto en presencia de supresores del androcidio e, incluso entonces, el espacio de parámetros para la coexistencia de los dos androcidas es muy limitado (Randerson et al., en prensa). El hallazgo de cuatro androcidas en una sola población, y la amplia distribución geográfica de los androcidas en cuestión (Hurst et al., 1999a, b) sugieren por tanto que las asunciones en que se basan esos modelos no son aplicables al caso de los coccinélidos.

Se ha demostrado la presencia de bacterias androcidas en otras ocho especies de coccinélidos y existe cierta evidencia de su presencia en dos más (Majerus & Hurst, 1997; Hurst et al., 1997a, b, 1999c; Majerus & Majerus, datos no publicados). Las bacterias que se han identificado son taxonómicamente diversas (Tabla 3). Dado el número aún pequeño de especies de coccinélidos en que se ha encontrado androcidio y el número aún menor en que se han identificado los androci-

das, es poco probable que se haya revelado toda la diversidad taxonómica de androcidas en esta familia.

Evidencia de redistribución de recursos

Si se consideran los rasgos etológicos y ecológicos de los coccinélidos, la asiduidad de los androcidas en dicho grupo no resulta sorprendente. Todos los coccinélidos que hospedan androcidas son afidófagos, ponen huevos en masas y presentan consumo larvario neonatal de los huevos de la misma puesta. En conjunto, estas características dan lugar a una alta compensación potencial en eficacia biológica como consecuencia del androcidio.

La mayor parte del trabajo que ha mostrado una ventaja de recursos por androcidio se ha realizado con *A. bipunctata* infectada por una *Rickettsia*. Los estudios del comportamiento de alimentación de las larvas han comprobado que la tasa de mortalidad de los neonatos por carencia de alimento es alta (Wratten, 1976). Esta alta mortalidad es consecuencia del corto tiempo de que disponen las larvas para encontrar presas antes de morir de hambre, y su baja tasa de captura de los áfidos que encuentran. Aunque uno podría imaginar que la selección favoreciese un mayor tiempo de desarrollo, y un huevo mayor, de forma que las larvas neonatas estuviesen mejor equipadas para la captura de presas, el comportamiento

Fig. 4.- El consumo de los huevos muertos por androcidio, por parte de las larvas femeninas en su misma puesta, es la base de la ventaja por redistribución de recursos que el androcidio proporciona en los coccinélidos. En este caso, las larvas neonatas de *Harmonia axyridis*, que resultaron ser todas hembras, consumen huevos no eclosionados (presuntamente machos) infectados por una *Spiroplasma* androcida.

Fig. 4.- Consumption by female larvae of clutch mate, male-killed eggs is the basis of a resource advantage due to male-killing in coccinellids. Here neonate larvae of *Harmonia axyridis*, shown to be all female, consume unhatched eggs (assumed to be male) infected with a *Spiroplasma* male-killer.



canibal de las larvas neonatas hacia los huevos de su misma puesta impide esto, ya que los que eclosionan más tarde son con frecuencia consumidos por las larvas de eclosión más temprana. El hábito de consumir cualquier huevo no eclosionado de su puesta antes de dispersarse está en el centro de la redistribución de recursos en los coccinélidos. La tasa de eclosión de masas de huevos puestos por las hembras no infectadas por androcidas es, en general, del 90%. Esto contrasta con las tasas de eclosión iguales o inferiores al 50% en las puestas de las hembras infectadas. Por tanto, en las puestas infectadas las larvas neonatas que serán predominante o exclusivamente hembras tendrán, en promedio, un huevo masculino muerto para consumir (Fig. 4), comparado con una media de 0,1 huevos disponibles para las larvas neonatas de las puestas no infectadas. Los recursos obtenidos por el consumo de un solo huevo permiten a las larvas neonatas sobrevivir un 50% más de tiempo que las que no disponen de ese alimento (Majerus, 1994). El mayor tiempo de supervivencia y el mayor tamaño de las larvas en dispersión de una puesta infectada conducen a una mayor área de búsqueda, un desarrollo larvario más rápido del primer instar y mayor probabilidad de supervivencia hasta la primera ecdisis, particularmente a bajas densidades de áfidos (Majerus, 1994).

Una reducción en la probabilidad de canibalismo de los embriones femeninos por parte de sus compañeros de puesta puede constituir una ventaja secundaria del androcidio durante el desarrollo temprano de las hembras infectadas, según han propuesto Hurst et al. (1992). La tasa de eclosión de los huevos de los coccinélidos no infectados rara vez alcanza el 100%. Los huevos no eclosionados son de dos tipos: huevos no fértiles, y huevos con señales de desarrollo embrionario pero que no han logrado eclosionar. En este último tipo, algunos mueren durante el desarrollo temprano por causas desconocidas, mientras que otros son consumidos por sus hermanos. La retirada de las larvas de las masas de huevos a medida que eclosionan, para impedir el canibalismo de huevos, conduce a un aumento significativo de la tasa de eclosión de las puestas no infectadas, pero no de las infectadas (Majerus, 1994). De ello se deduce que en las puestas no infectadas muere una proporción significativamente más alta de hembras por canibalismo que en las puestas infectadas. Esto es intuitivamente razonable pues el androcidio debería reducir tanto el número de larvas de eclosión temprana, los canibales potenciales, como la proporción de embriones femeninos entre los huevos no eclosionados a lo largo del periodo de eclosión (Hurst et al., 1992).

En los coccinélidos afidófagos, la vía de redistribución de recursos desde los machos infectados, y por tanto muertos, hacia las hembras infectadas es obvio y fácilmente imaginable. En otros casos de androcidio precoz la ventaja resultante de la muerte de los machos no está tan clara. En algunas otras especies existen pruebas indirectas, procedentes de consideraciones ecológicas, de que el androcidio también proporciona recursos adicionales. En el chinche *Oncopeltus fasciatus*, los recursos adicionales obtenidos por el consumo de los huevos muertos por androcidio proporcionan a las larvas neonatas más tiempo para encontrar legumbres adecuadas de su planta nutricia (Ralph, 1977; Hurst & Majerus, 1993). En *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae), un parasitoide de los puparios de Calliphoridae, y en *Caraphractus cinctus* (Hymenoptera: Mymaridae), un parasitoide de los huevos de escarabajos acuáticos, la reducción de la competencia entre hermanos dentro de un hospedador, como resultado del androcidio, puede reducir la mortalidad de las hembras restantes y las supervivientes pueden ser mayores y más fecundas (Jackson, 1958; Skinner, 1985). En *Ips latidens* (Coleoptera: Scolytidae) las hembras ponen huevos en un sistema de túneles y las interacciones entre larvas jóvenes ocurren principalmente entre hermanos. Las observaciones de alta mortalidad y canibalismo sugieren que existe competencia por el floema del que se alimentan las larvas (Miller & Borden, 1985). Por tanto, es probable que el androcidio disminuya la densidad larvaria local y, por tanto, la competencia entre, y el canibalismo de, las hembras infectadas. En *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae), la competencia por lugares donde tejer, que son limitados, entre larvas neonatas en dispersión conduce a una alta mortalidad de las larvas de primer instar (MacLellan, 1973). Una vez más, la reducción de la densidad producida por el androcidio puede conducir a una mayor supervivencia de las hembras infectadas, con respecto a las no infectadas. Se necesita evidencia empírica para confirmar el aumento de eficacia biológica de las hembras infectadas en todos estos ejemplos. En otras especies con presencia supuesta o confirmada de simbiontes androcidas, la probabilidad de una redistribución de recursos por androcidio no se ha determinado o se considera baja por consideraciones ecológicas.

Wolbachia* androcidas en las mariposas del género *Acraea

Hace mucho que se conoce la producción de proporciones sexuales sesgadas en la mariposa ninfálica *Acraea encedon*.

Ya en 1914 Poulton encontró que algunas hembras producían prole únicamente femenina, mientras que otras producían tanto machos como hembras. El rasgo "proporción sexual" tiene herencia materna (Owen, 1970). En los Lepidoptera, las hembras son el sexo heterogamético. Por tanto, los rasgos de herencia materna pueden ser consecuencia de genes en los cromosomas W, de genes mitocondriales o de endosimbiontes hereditarios. De hecho, las puestas totalmente femeninas de *A. encedon* se atribuyeron en principio a un cromosoma W derivante que distorsionaba la proporción sexual primaria, debido a que la cantidad de hijas producidas en el laboratorio era similar a la producida por puestas normales. No obstante, dado que la supervivencia de las mariposas criadas en el laboratorio es, con frecuencia, dependiente de la densidad, este argumento era potencialmente erróneo, y se reexaminó el caso (Jiggins et al., 1999).

A partir de muestras tomadas inicialmente en las costas ugandesas del Lago Victoria, se obtuvieron las tasas de eclosión y las proporciones sexuales de la descendencia de 35 hembras. De ellas, sólo cinco produjeron hijos e hijas; las otras 30 sólo produjeron hijas. La tasa de eclosión no superó el 50% en ninguna de estas 30 familias, mientras que en las familias normales se registraron tasas de eclosión de hasta el 100%, lo cual condujo a sospechar que el rasgo era debido a un androcida (Jiggins et al., 1998). Esto se confirmó alimentando a las larvas de las puestas exclusivamente femeninas con hojas empapadas en antibióticos. Los adultos resultantes produjeron prole tanto masculina como femenina. El análisis genético molecular reveló posteriormente la presencia de una *Wolbachia* (Hurst et al., 1999a).

El hallazgo de otra *Wolbachia* androcida, además de la presente en *A. bipunctata*, es significativo por tres razones. En primer lugar, demuestra que las *Wolbachia* androcidas no están restringidas a un solo grupo, los coccinélidos, que por su peculiar ecología son especialmente susceptibles a los androcidas. En segundo lugar, refuerza la duda sobre las estimas de la proporción de insectos infectados por *Wolbachia*, obtenidas en estudios que han considerado un pequeño número de individuos de las especies hospedadoras potenciales (Hurst et al., 1999a). Y finalmente, demuestra que no todos los endosimbiontes androcidas detectan el sexo masculino de su hospedador mediante la identificación de una región del cromosoma Y, ya que aunque los machos de *A. bipunctata* son heterogaméticos, son las hembras el sexo heterogamético en *A. encedon*.

Se han encontrado *Wolbachia* androcidas en varias especies más de *Acraea*. *A. encedana*, una especie gemela de *A. encedon*, hospeda una *Wolbachia* idéntica o muy similar a la presente en *A. encedon* respecto al gen *wsp* (Jiggins et al., datos no publicados), mientras que *A. eponina* alberga una *Wolbachia* no tan similar (Jiggins, datos no publicados). *A. acerata*, *A. pharsalus* y *A. alcinoe* también hospedan *Wolbachia*, pero los efectos fenotípicos de ésta no se han elucidado (Jiggins, datos no publicados).

Los androcidas de *A. encedon* y *A. encedana* muestran algunos rasgos muy interesantes. Además de las similitudes obvias, ambas *Wolbachia* son muy parecidas, de herencia materna y sensibles a los antibióticos, matan a los embriones masculinos antes de su eclosión, tienen una gran transmisión vertical (igual o superior al 95%) y aparecen con gran frecuencia (Chanter & Owen, 1972; Gordon, 1982; Jiggins et al., 1998, en prensa), al menos en algunas poblaciones. Combinados, todos estos rasgos conducen a proporciones sexuales poblacionales muy sesgadas hacia las hembras.

Tomando como base los niveles estimados de presencia y transmisión vertical, y asumiendo que el androcida estaba en

equilibrio, Jiggins et al. (datos no publicados) estimaron el éxito reproductor global de las hembras de *A. encedana* infectadas respecto a las no infectadas. El valor mínimo estimado (dentro de los límites de confianza del 95%) fue de 1.55. Esto es extraordinariamente alto (cf. el valor medio de 1.16 para la población inglesa de *A. bipunctata* infectada por *Rickettsia*), especialmente si se considera que no se ha demostrado la existencia de factores implicados en la compensación de la eficacia biológica. Una posible explicación para este alto valor es que la asunción de que la población está en equilibrio no es válida, aunque existe evidencia de que algunas poblaciones de *A. encedon*, y probablemente de *A. encedana*, han estado fuertemente sesgadas hacia las hembras durante muchas generaciones (Owen & Chanter, 1969; Owen et al., 1994; Gordon, 1984). Jiggins et al. (datos no publicados) discuten los factores que podrían ser responsables del alto grado de compensación de eficacia biológica necesario para explicar los datos observados en *A. encedon* y *A. encedana*. Señalan que los huevos se ponen en grandes masas, que las larvas neonatas consumen algunos huevos no eclosionados, y que las larvas se alimentan de modo agregado durante los cuatro primeros instars. Por tanto, es posible la redistribución de recursos, tanto a través del consumo de los huevos hermanos como por una reducción de la competencia por el alimento. Sin embargo, no existe evidencia alguna para estas especies de que la planta nutricia sea fuertemente limitante, y es difícil imaginar que la mera redistribución de recursos, por sí sola, sea responsable del alto grado de presencia de *Wolbachia*, dada la transmisión vertical incompleta. Tras reconocer esto, especulan que un beneficio directo de la infección sobre la fecundidad femenina puede ser responsable del alto éxito reproductor de las hembras infectadas. Esta hipótesis debería contrastarse pues, si se confirma, representaría el primer caso de un efecto dual parasitario/beneficioso en una bacteria hereditaria.

Consecuencias de la distorsión de la proporción sexual poblacional

Las bacterias androcidas producen proporciones sexuales adultas altamente sesgadas hacia las hembras en algunas poblaciones de sus hospedadores. En *A. bipunctata* y en *H. axyridis*, se han encontrado poblaciones en las que más de dos tercios de los individuos son hembras (Zakharov et al., 1996; Majerus et al., 1998). En *A. encedon* y *A. encedana*, se han encontrado poblaciones con proporciones sexuales aún más espectaculares, con más del 95% de hembras (Jiggins et al., 1998, en prensa). Los grandes sesgos en la proporciones sexuales poblacionales pueden determinar qué sexo compite por una pareja. Normalmente, dado que los machos tienen la capacidad de reproducirse más deprisa que las hembras, los machos compiten entre sí por el acceso a aquellas, mientras que las hembras eligen entre varios machos. Sin embargo, en las poblaciones en las que la presencia de, por ejemplo, un androcida reduce la proporción de machos en la población, tanto la intensidad de la competencia masculina como las oportunidades de elección femenina se ven reducidas. De hecho, si la proporción sexual se distorsiona lo bastante a favor de las hembras, hasta el punto que los machos son limitantes, los papeles respectivos de cada sexo pueden llegar a invertirse (Trivers, 1972).

En *A. bipunctata* y *H. axyridis*, como resultado del potencialmente extenso periodo reproductor y los altos niveles de promiscuidad de que son capaces los machos (Majerus, 1994) es probable que las hembras sigan siendo el sexo limitante, incluso en poblaciones muy sesgadas hacia las hembras. No obstante, se ha encontrado cierta variedad de

Fig. 5.- Hembra de *Acraea encedon* en vuelo sobre un lugar de exhibición (lek) en el campus de la Universidad de Makerere, Kampala, Uganda (cortesía de F. M. Jiggins).

Figure 5.- Female *Acraea encedon* flying over a lekking site on the campus of Makerere University, Kampala, Uganda (courtesy of F. M. Jiggins).



patrones de elección de pareja, tanto en *A. bipunctata* como en *H. axyridis*, incluida una débil elección masculina por las hembras (Osawa & Nishida, 1992; Majerus, 1998).

Los estudios de *A. encedon* que demuestran que en las poblaciones muy sesgadas hacia las hembras muchas de ellas mueren sin aparearse (p. ej. Owen & Chanter, 1969) sugieren que en este caso los machos son limitantes. Los estudios recientes del comportamiento de las mariposas en algunas poblaciones con alto sesgo de la proporción sexual han conducido a la observación de una inversión de los papeles sexuales. La más sorprendente de ellas es un comportamiento femenino de exhibición en leks. En muchas especies se conocen los leks masculinos, áreas desprovistas de valor como recurso en las que los machos se congregan y compiten por las hembras. En las poblaciones de *A. encedon* y *A. encedana* con proporción sexual fuertemente sesgada hacia las hembras, son las hembras vírgenes las que se congregan en dichos leks (Fig. 5; Jiggins et al., en prensa). Las hembras en dichos leks parecen competir entre sí por los apareamientos. Además, una explicación para los datos que muestran un mayor grado de virginidad entre las hembras infectadas por *Wolbachia* que entre las no infectadas (Jiggins et al., en prensa) es que los machos eligen entre las hembras en base a su estatus de infección. Obviamente, dicho comportamiento sería adaptativo para los machos. Aquí, la invasión y dispersión de un androcida ha invertido el papel general de competencia masculina y ha causado un cambio sustancial del sistema de apareamiento.

Un corolario inesperado en especies con alta presencia de androcidas es que la selección debería favorecer el incesto, dado que para la mayoría de los machos sus hermanas serán el grupo de hembras que con mayor certeza no estará infectado por androcidas.

Supresores del androcidio

Según la teoría de la proporción sexual, en ausencia de competencia local por el apareamiento, los sesgos de la proporción sexual hacia cualquiera de los sexos debería conducir a selección a favor del sexo más raro (Fisher, 1930; Hamilton, 1967). El androcidio aleja de la igualdad las proporciones sexuales poblacionales, a veces de modo considerable. En dichas poblaciones, la selección en favor de la producción de machos debería ser intensa, como resultado de la ventaja de producir el sexo más raro y de la selección

sobre el genoma nuclear para resistir a la mortalidad impuesta sobre el mismo por el genoma citoplásmico de los androcidas. Las proporciones sexuales sesgadas hacia las hembras, producto de la invasión de los androcidas, pueden conducir a la evolución, bien de supresores nucleares de aquellos, bien a mecanismos que sesguen la proporción sexual hacia los machos. Esto último podría ocurrir mediante la distorsión de la proporción sexual primaria o de la secundaria hacia los machos, siempre y cuando la pérdida de descendientes femeninos sea compensada por el aumento en las probabilidades de supervivencia de la progenie masculina. En teoría, esto es plausible sólo cuando la producción sesgada hacia los machos es muy beneficiosa debido a proporciones sexuales poblacionales extremadamente sesgadas hacia las hembras. Existen ciertos indicios de sesgos masculinos en algunas familias de *A. encedon* (Owen & Chanter, 1969) que cumplen esas condiciones.

En caso de evolucionar, los supresores del androcidio pueden actuar de varias maneras. Pueden matar al androcida, o reducir su eficiencia de transmisión vertical al suprimir la tasa de replicación del simbionte, o pueden impedir al simbionte la muerte de machos, bien bloqueando el reconocimiento de los machos por parte del simbionte, o bien bloqueando el propio proceso de muerte.

La investigación reciente sugiere que los supresores del androcidio han evolucionado al menos en una especie. El coccinélido *Cheilomenes sexmaculatus* hospeda un androcida. Dos de las 15 hembras silvestres capturadas en Japón produjeron descendencia significativamente sesgada hacia las hembras. De diez hembras F_1 de dichas líneas, cruzadas con machos F_1 de líneas de proporción sexual normal, sólo tres produjeron sesgos femeninos significativos. En una, prácticamente toda la progenie era femenina; en las otras dos se obtuvieron proporciones 2:1 a favor de las hembras. Las otras líneas produjeron proporciones sexuales normales (Majerus & Majerus, datos no publicados). Las tres líneas sesgadas hacia las hembras procedían de apareamientos con machos de una familia (MF5), mientras que las siete familias normales tenían progenitores masculinos de otras líneas (MF1 o MF8). La hipótesis propuesta para explicar estos resultados fue que los machos MF1 y MF8 eran homocigotos para un supresor del androcidio. Por el contrario, los machos MF5 eran de dos tipos, bien homocigotos para el alelo no supresor, bien heterocigotos para el supresor. En estos últimos machos, la mitad del esperma portaría el supresor y así permitiría sobrevivir a los machos que heredasen de su madre dicho supresor. El resto del esperma carecería del

supresor y los machos resultantes morirían. El resultado sería una proporción sexual 2:1 de hembras a machos, como se observaba.

Para contrastar esta hipótesis se cambiaron los machos de las familias F_1 . El progenitor masculino MF5 del cruce que había producido sólo descendientes femeninos se cambió por un macho de una familia que producía una proporción sexual normal. Este proceso condujo a una alteración de la proporción sexual de la progenie en ambas líneas. La hembra que había producido previamente sólo hembras comenzó a producir hijos e hijas en cantidades más o menos equivalentes. Y al contrario, la hembra que había producido una proporción sexual normal comenzó a producir descendencia fuertemente sesgada hacia las hembras, tras un pequeño retraso (Majerus & Majerus, datos no publicados).

Los patrones de cambio en la proporción sexual de la progenie de estas líneas, y resultados similares de cruces posteriores, apoyan la hipótesis de un solo gen supresor. Además, sugieren que el supresor es un "gen de rescate" que actúa impidiendo la expresión fenotípica del androcida, en lugar de matar la bacteria o de reducir su eficiencia de transmisión vertical.

Probablemente no es casualidad que el supresor descubierto en *C. sexmaculatus* sea un solo gen. Al considerar la selección contra la infección, Hurst et al. (1997a) propusieron que los modificadores poligénicos que retrasan la mortalidad masculina en los infectados no pueden evolucionar. Su razonamiento se basa en la propuesta de que la muerte precoz de los machos es beneficiosa para las hermanas debido a que se maximiza la cantidad de recursos redistribuidos hacia las mismas. Así, un modificador que retardase la muerte de los infectados de forma que algunos machos infectados todavía muriesen antes de reproducirse, mientras que otros sobreviviesen hasta la edad reproductora, no sólo conferiría un aumento de eficacia biológica a través de la supervivencia de algunos machos, sino también conduciría a una reducción en el beneficio en eficacia biológica de los parientes como resultado del derroche de nutrientes utilizados por los machos que comienzan el desarrollo pero mueren antes de reproducirse.

CONCLUSIÓN

Cada vez está más claro que los simbioses hereditarios son muy comunes en los artrópodos. Muchos de dichos simbioses son beneficiosos. Pero una parte considerable de los mismos son deletéreos y, más que ser beneficiosos para sus hospedadores, mantienen relaciones antagonistas con parte de ellos. La existencia y aparición común de tales simbioses tiene tres consecuencias importantes. En primer lugar, a un nivel general, es difícil imaginar que pueda conseguirse una comprensión completa de la biología global de cualquier especie de artrópodo sin considerar los simbioses que hospeda, independientemente de la naturaleza de las interacciones entre hospedador y simbioses. Las presiones coevolutivas, sea cual sea su dirección, tendrán probablemente un impacto considerable sobre ambos miembros de una asociación. En el caso de los simbioses deletéreos ya está claro que pueden alterar de modo fundamental la determinación sexual del hospedador, pueden invertir la dirección de la selección sexual, o causar la evolución de genes de rescate o supresores del simbiote. A buen seguro, otras consecuencias evolutivas de la invasión por simbioses deletéreos aún están por descubrir.

Segundo, la dispersión de cualquier simbiote a través de una población hospedadora causa un descenso inmediato en la diversidad del ADN mitocondrial (ADNmt) en la misma. Como tanto el simbiote como las mitocondrias tienen herencia citoplásmica, se encuentran ligados en la práctica.

Por tanto, la dispersión del simbiote a partir de una o unas pocas hembras inicialmente infectadas extenderá los mitotipos de esas fundadoras por toda la población. Los efectos de ello se dejarán sentir cualquiera que sea el simbiote hereditario, pero los efectos de los androcidas pueden ser mayores que los de otros tipos, debido a la presencia normalmente baja de androcidas y al constante reclutamiento de individuos no infectados a partir de los infectados, por la transmisión vertical imperfecta (Johnstone & Hurst, 1996; Majerus & Hurst, 1997). Se considera improbable que los cambios selectivos impuestos sobre el ADNmt por la dispersión de simbioses tenga un impacto significativo sobre la evolución adaptativa de los hospedadores. No obstante, para los biólogos evolutivos que utilizan el ADNmt como herramienta para estudiar el flujo genético, el tamaño poblacional o la historia de las poblaciones, los efectos de la dispersión de simbioses sobre la diversidad del ADNmt significa que en dicha especie el ADNmt no puede utilizarse como marcador neutro. La falta de diversidad en el ADNmt de una población no tiene por qué reflejar un bajo tamaño efectivo de la población o cuellos de botella genéticos. Puede significar simplemente la presencia pasada o presente de un simbiote hereditario.

En tercer lugar, los endosimbioses IIC y los simbioses que distorsionan la proporción sexual pueden tener aplicaciones considerables en el control de plagas (véase Siskins et al., 1997, para una revisión). Pueden imaginarse varias estrategias para su uso. Primero, los endosimbioses que sesgan a los agentes de control biológico, como las avispas parasitoides o los coccinélidos afidófagos, en favor de las hembras pueden utilizarse para aumentar el impacto del agente de control biológico, o para reducir los costes de un programa de control. En el caso de los Hymenoptera parasitoides, sólo las hembras tienen un efecto negativo sobre la plaga. Por tanto, un simbiote hereditario que produzca sólo hembras sería comercialmente beneficioso. Los androcidas de los coccinélidos también pueden ser beneficiosos si la presencia del simbiote aumenta la densidad de hembras en la población, incluso si dicho aumento se hace esencialmente a expensas de los machos. Ello se debe a que la tasa de alimentación de los coccinélidos hembra a lo largo de su vida es significativamente mayor que la de los machos.

Una alternativa es el empleo de agentes IIC, mediante liberación en masa, para causar esterilidad en las poblaciones receptoras, del mismo modo que se han usado machos esterilizados por radiaciones para controlar a *Cochliomyia hominivorax* en diversos países (p. ej., Krasfur et al., 1987). Esta metodología ya se ha usado en ensayos piloto con cierto número de especies diana, con un grado variable de éxito (Siskins et al., 1997).

Una tercera estrategia consiste en el empleo de los simbioses como vectores portadores de genes. La base de esta idea es que si fuese posible extender un nuevo simbiote, portador de genes "útiles", hasta alcanzar un alto nivel de presencia en la población diana, como es de esperar en un agente IIC, los genes útiles se difundirían por toda la población a partir de un inóculo relativamente pequeño. En este contexto, un gen útil debe cumplir dos requisitos fundamentales. En primer lugar, debe ser transferible a un simbiote hereditario y posteriormente ser transmitido verticalmente con una eficiencia casi perfecta. En segundo lugar, debe ser expresado en el fondo genético de la especie plaga, es decir, debe ser un gen dominante. Los genes que cumplen dichos requerimientos y aparecen de modo natural en los simbioses hereditarios son improbables. Por tanto, para llevar a cabo esta idea debería recurrirse a la tecnología del ADN recombinante y producir cepas de insectos/simbioses transgénicos.

El estudio de los simbiontes deletéreos de los artrópodos ha florecido en la última década, en gran medida gracias a las técnicas de genética molecular. Un grupo de simbiontes, *Wolbachia*, ha recibido especial atención debido a la variedad de formas en que los miembros de dicho grupo manipulan la reproducción de los hospedadores. El descubrimiento reciente de *Wolbachia* androcidas significa que los miembros de este grupo emplean los cuatro grandes tipos de manipulación del hospedador (IC, feminización, IP y androcidio). Según el conocimiento actual, dos de dichas manipulaciones (IC e IP) son causadas exclusivamente por *Wolbachia*. Esto puede ser cierto pero también es posible que la gran atención que se ha dado a *Wolbachia*, desde el desarrollo de sondas específicas para dicho grupo (Rousset et al., 1992) ha causado un sesgo de estudio hacia el mismo. Sería de gran valor el escrutinio a gran escala de artrópodos en busca de otros simbiontes hereditarios ya conocidos por su comportamiento ultraegoísta, especialmente debido a que el reciente descubrimiento de *Wolbachia* aparentemente beneficiosas en los nematodos (Bandi et al., 1998) ha ampliado tanto el número de taxones hospedadores por *Wolbachia* como el tipo de interacciones con sus hospedadores (Rigaud, 1999). Puede adaptarse y explotar una variedad taxonómica de hospedadores y ajustar su manipulación del hospedador a las particularidades del ciclo vital o el sistema genético del mismo. Surge la pregunta acerca de que, asumiendo que *Wolbachia* lleva a cabo realmente un mayor tipo de manipulaciones distintas de sus hospedadores que otros simbiontes, ¿qué tiene *Wolbachia* de especial? ¿Posee algún rasgo genético o reproductor que le hace inherentemente plástica y adaptable? ¿Es simplemente más abundante y capaz de transferencia horizontal, de modo que las oportunidades de invasión y manipulación de un hospedador con éxito se dan con más frecuencia que en otros grupos? Todas estas cuestiones deben ser abordadas.

Durante el periodo de rápido aumento en el conocimiento de los endosimbiontes de efectos deletéreos, también han avanzado considerablemente las bases teóricas. Se han

estudiado las causas subyacentes de las diferentes manipulaciones, la dinámica de poblaciones de las interacciones simbiote-hospedador y las reacciones evolutivas de los hospedadores a los simbiontes. Muchas de las predicciones teóricas sobre estos sistemas aún requieren de un contraste empírico. Curiosamente, a medida que se acumula la evidencia empírica concerniente a los modelos, parece que muchas de las asunciones básicas de los modelos generales se ven comprometidas para casos particulares. Por ejemplo, con respecto a los androcidas en los coccinélidos, los modelos han supuesto que el beneficio en recursos para los miembros supervivientes de una puesta infectada se repartiría equitativamente entre dichos supervivientes. Las investigaciones recientes han demostrado que eso no es así, sino que existe considerable variación en la ventaja obtenida por los supervivientes (Fakhouri & Majerus, datos no publicados). Los modelos también han predicho que dos o más androcidas sólo podrían coexistir en la misma población bajo un conjunto muy limitado de circunstancias (Randerson et al., en prensa), pero se ha demostrado que una población contiene cuatro simbiontes androcidas diferentes. En este caso, el problema puede ser simplemente que el modelo supone que los supresores nucleares matarían o reducirían la transmisión vertical del androcida. No considera un supresor que simplemente impide el androcidio. Para otras estrategias se han encontrado contradicciones similares entre las predicciones teóricas y las observaciones empíricas. Es de esperar que los modelos mejorarán con la nueva evidencia empírica. Pero es posible que la dinámica de muchas interacciones simbiote-hospedador y las carreras de armas coevolutivas a que dan lugar dependan de modo tan importante de los detalles genéticos y ecológicos concretos de cada caso que los modelos generales tengan poco valor para cada caso concreto. El cuestionamiento de Thierry Rigaud (1997) de la existencia de una explicación general para las distribuciones y presencia de los feminizantes puede aplicarse a las restantes estrategias de los endosimbiontes hereditarios.

NOTAS

¹ A falta de vocablo mejor, traduciré con el neologismo 'androcidio' el término inglés 'male-killing'. [Nota del traductor].

BIBLIOGRAFÍA

- BANDI, C., ANDERSON, T. J. C., GENCHI, C. & BLAXTER, M. L., 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **265**: 2407-2413.
- BECHNEL, J. J. & SWEENEY, A. W., 1990. *Amblyospora trinus* n. sp. (Microsporida: Amblyosporidae) in the Australia mosquito *Culex halifaxi* (Diptera: Culicidae). *J. Protozool.*, **37**: 584-592.
- BINNINGTON, K. C. & HOFFMANN, A. A., 1989. *Wolbachia*-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *J. Invert. Path.*, **54**: 344-352.
- BOUCHON, D., RIGAUD, T. & JUHAULT, P., 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **265**: 1081-1090.
- BOURTZIS, K. & O'NEILL, S. L., 1998. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. *Bioscience*, **48**: 287-293.
- BREEUWER, J. A. J., STOUTHAMER, R., BARNES, S. M., PELLETIER, D. A., WEISBURG, W. G. & WERREN, J. H., 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Ins. Mol. Biol.*, **1**: 25-36.
- BROWER, J. H., 1976. Cytoplasmic incompatibility: occurrence in stored product pest *Ephestia cautella*. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **69**: 1011-1015.
- CABELLO, T. & VARGAS, P., 1985. Temperature as a factor influencing the form of reproduction of *Trichogramma cordubensis*. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, **100**: 434-441.
- CHANTER, D. O. & OWEN, D. F., 1972. The inheritance and population genetics of sex ratio in the butterfly *Acraea ecedon*. *J. Zool.*, **166**: 363-383.
- DUNN, A. M. & RIGAUD, T., 1998. Horizontal transfer of parasitic sex ratio distorters between crustacean hosts. *Parasitology*, **117**: 15-19.
- DUNN, A. M., ADAMS, J. & SMITH, J. E., 1993. Transovarial transmission and sex ratio distortion by a microsporidian parasite in a shrimp. *J. Invert. Path.*, **61**: 248-252.
- DUNN, A. M., HATCHER, M. J., TERRY, R. S. & TOFTS, C., 1995. Evolutionary ecology of vertically transmitted parasites: transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni*. *Parasitology*, **111**: S91-S109.

- FISHER, R. A., 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford, 272 pp.
- GINSBURGER-VOGEL, T. & DESPORTES, I., 1979. Structure and biology of *Marteilia* sp. in the amphipod *Orchestia gammarellus*. *Marine Fisheries Rev.*, **41**: 3-7.
- GORDON, I. J., 1984. Mimicry, migration and speciation in *Acraea encedon* and *Acraea encedana*. En: R. I. VANE-WRIGHT & P. R. ACKERY (eds.) *The Biology of Butterflies*. Academic Press, Londres: 193-196.
- HAMILTON, W. D., 1967. Extraordinary sex ratios. *Science*, **156**: 477-488.
- HATCHER, M. J., DUNN, A. M. & TOFTS, C., 1997. The effect of the embryonic bottleneck on vertical microparasite transmission. En: R. CUTHBERTSON, N. HOLCOMBE & P. PATON (eds.) *Computation in Cellular and Molecular Biological Systems*. World Scientific, Singapur: 339-351.
- HOFFMANN, A. A. & TURELLI, M., 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. En: S. L. O'NEILL, A. A. HOFFMANN & J. H. WERREN (eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford: 42-80.
- HOFFMANN, A. A., TURELLI, M. & HARSHMAN, L. G., 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, **126**: 933-948.
- HSIAO, C. & HSIAO, T. H., 1985. Rickettsia as the cause of cytoplasmic incompatibility in the alfalfa weevil, *Hypera postica*. *J. Invert. Path.*, **45**: 244-246.
- HURST, G. D. D. & MAJERUS, M. E. N., 1993. Why do maternally inherited micro-organisms kill males? *Heredity*, **71**: 81-95.
- HURST, G. D. D., MAJERUS, M. E. N. & WALKER, L. E., 1992. Cytoplasmic male killing elements in *Adalia bipunctata* (Linnaeus)(Coleoptera:Coccinellidae). *Heredity*, **69**: 84-91.
- HURST, G. D. D., WALKER, L. E. & MAJERUS, M. E. N., 1996. Bacterial infection of hemocytes associated with the maternally inherited male-killing trait in British populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata*. *J. Invert. Path.*, **68**: 286-292.
- HURST, G. D. D., HURST, L. D. & MAJERUS, M. E. N., 1997a. Cytoplasmic sex-ratio distorters. En: S. L. O'NEILL, A. A. HOFFMANN & J. H. WERREN (eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford: 125-154.
- HURST, G. D. D., HAMMARTON, T. M., BANDI, C., MAJERUS, T. M. O., BERTRAND, D. & MAJERUS, M. E. N., 1997b. The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria. *Genet. Res.*, **70**: 1-6.
- HURST, G. D. D., JIGGINS, F. M., SCHULENBURG, J. H. G. v. d., BERTRAND, D., WEST, S. A., GORIACHEVA, I. I., ZAKHAROV, I. A., WERREN, J. H., STOUTHAMER, R., & MAJERUS, M. E. N., 1999a. Male-killing *Wolbachia* in two species of insects. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **266**: 735-740.
- HURST, G. D. D., SCHULENBURG, J. H. G. v. d., MAJERUS, T. M. O., BERTRAND, D., ZAKHAROV, I. A., BAUNGAARD, J., VÖLKL, W., STOUTHAMER, R. & MAJERUS, M. E. N., 1999b. Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. *Ins. Mol. Biol.*, **8**: 133-139.
- HURST, G. D. D., BANDI, C., SACCHI, L., COCHRANE, A. G., BERTRAND, D., KARACA, I. & MAJERUS, M. E. N., 1999c. *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited Flavobacteria that kill males only. *Parasitology*, **118**: 125-134.
- HURST, L. D., 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male-killers. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **244**: 91-99.
- HURST, L. D., 1992. Intragenomic conflict as an evolutionary force. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **248**: 135-140.
- HURST, L. D., 1993. The incidences, mechanisms and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.*, **68**: 121-193.
- IGARASHI, S., 1964. Modification of sex ratio by feeding the ovisacs in *Tigriopus japonicus*. *Science Reports, Tohoku University, Series IV*, **30**: 85-88.
- JACKSON, D. J., 1958. Observations on the biology of *Caraphractus cinctus* Walker (Hymenoptera: Mymaridae), a parasitoid of the eggs of Dytiscidae. I. Methods of rearing and numbers bred on different host eggs. *Trans. R. Ent. Soc. Lond.*, **110**: 533-554.
- JIGGINS, F. M., HURST, G. D. D. & MAJERUS, M. E. N., 1998. Sex-ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. *Heredity*, **81**: 87-91.
- JIGGINS, F. M., HURST, G. D. D. & MAJERUS, M. E. N., 1999. How common are meiotically driving sex chromosomes in insects? *Am. Nat.*, **154**: 481-483.
- JIGGINS, F. M., HURST, G. D. D. & MAJERUS, M. E. N., En prensa. Sex role reversal as a result of female biased sex ratios in an African butterfly. *Proc. R. Soc. Lond. B*
- JOHNSTONE, R. A. & HURST, G. D. D., 1996. Maternally inherited male-killing microorganisms may confound interpretation of mtDNA variation in insects. *Biol. J. Linn. Soc.*, **58**: 453-470.
- JOST, E., 1971. Meiosis in the male of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* and fertilization in the *Culex pipiens*-complex. *Canad. J. Genet. Cytol.*, **13**: 237-250.
- JUCHAULT, P. & LEGRAND, J. J., 1972. Croisements de néo-mâles expérimentaux chez *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé, Isopode, Oniscoïde). Mise en évidence d'une hétérogamétie femelle. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III*, **274**: 1387-1389.
- JUCHAULT, P. & LEGRAND, J. J., 1981a. Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs contrôlant le sexe dans les populations du Crustacé Isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. II - Populations hébergeant le facteur féminisant F (bactérie intracytoplasmique). *Arch. Zool. Expér. Gén.*, **122**: 65-74.
- JUCHAULT, P. & LEGRAND, J. J., 1981b. Contribution à l'étude qualitative et quantitative des facteurs contrôlant le sexe dans les populations du Crustacé Isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latr. II - Populations n'hébergeant pas le facteur féminisant F (bactérie intracytoplasmique). *Arch. Zool. Expér. Gén.*, **122**: 117-131.
- JUCHAULT, P. & LEGRAND, J. J., 1985. Contribution à l'étude du mécanisme de l'état réfractaire à l'hormone androgène chez les *Armadillidium vulgare* Latreille (Crustacé, Isopode, Oniscoïde) hébergeant une bactérie féminisante. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **60**: 463-467.
- JUCHAULT, P., RIGAUD, T. & MOCQUARD, J. P., 1993. Evolution of sex determination and sex ratio variability in wild populations of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Isopoda): a case study in conflict resolution. *Acta Oecol.*, **14**: 547-562.
- KAGEYAMA D., HOSHIZAKI, S. & ISHIKAWA, Y., 1998. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, **81**: 311-316.
- KELLEN, W. R., HOFFMANN, D. F. & KWOCK, R. A., 1981. *Wolbachia* sp. (Rickettsiales: Rickettsiaceae) a symbiont of the almond moth *Ephestia cautella*, ultrastructure and influence on host fertility. *J. Invert. Path.*, **37**: 273-283.
- KRASFUR, E. S., WHITTEN, C. J. & NOVY, J. E., 1987. Screwworm eradication in North and Central America. *Parasitology Today*, **3**: 131-137.
- LAVEN, H., 1967. Speciation and evolution in *Culex pipiens*. En: J. WRIGHT & R. PAL (eds.) *Genetics of Insect Vectors of Disease*. Elsevier, Amsterdam: 251-275.
- LEGRAND, J. J. & JUCHAULT, P., 1970. Modification expérimentale de la proportion des sexes chez les Crustacés Isopodes terrestres: induction de la thélygénie chez *Armadillidium vulgare* (Latr.). *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III*, **270**: 706-708.
- LUSIS, J. J., 1947. Some aspects of the population increase in *Adalia bipunctata* 2. The strains without males. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **57**: 825-828.
- MACLELLAN, C. R., 1973. Natural enemies of the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana*, in the Australian capital territory. *Can. Ent.*, **105**: 681-700.
- MAGNIN, M., PASTEUR, N. & RAYMOND, M., 1987. Multiple incompatibilities within populations of *Culex pipiens* L. in southern France. *Genetica*, **74**: 125-130.
- MAJERUS, M. E. N., 1994. *Ladybirds. New Naturalist Series 81*. HarperCollins, Londres, 368 pp.
- MAJERUS, M. E. N., 1998. *Melanism: Evolution in Action*. Oxford University Press, Oxford, 338 pp.
- MAJERUS, M. E. N. & HURST, G. D. D., 1996. Extension to the genome. *The Genetical Society Newsletter*, **32**: 6.
- MAJERUS, M. E. N. & HURST, G. D. D., 1997. Ladybirds as a model system for the study of male-killing symbionts. *Entomophaga*, **42**: 13-20.
- MAJERUS, M. E. N. & MAJERUS, T. M. O., 1999. Female biased sex ratio due to male-killing in the Japanese ladybird *Coccinula sinensis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecol. Entomol.*, **25**: 1-5

- MAJERUS, M. E. N., SCHULENBURG, J. H. G. v. d. & ZAKHAROV, I. A., En prensa. Multiple cause of male-killing in a single sample of the 2 spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae), from Moscow. *Heredity*
- MAJERUS, T. M. O., MAJERUS, M. E. N., KNOWLES, B., WHEELER, J., BERTRAND, D., KUZNETZOV, V. N., UENO, H. & HURST, G. D. D., 1998. Extreme variation in the prevalence of inherited male-killing microorganisms between three populations of the ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Heredity*, **81**: 683-691.
- MARTIN, G., JUHAULT, P. & LEGRAND, J. J., 1973. Mise en évidence d'un micro-organisme intracytoplasmique symbionte de l'Oniscoïde *Armadillidium vulgare* L., dont la présence accompagne l'intersexualité ou la féminisation totale des males génétiques de la lignée thélygène. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III*, **276**: 2313-2316.
- MILLER, D. R. & BORDEN, J. H., 1985. Life history and biology of *Ips latidens* (Leconte) (Coleoptera: Scolytidae). *Can. Ent.*, **117**: 859-871.
- NODA, H., 1984. Cytoplasmic incompatibility in a rice planthopper. *J. Hered.*, **75**: 345-348.
- O'NEILL, S. L. & KARR, T. L., 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, **348**: 178-180.
- O'NEILL, S. L., GIORDANO, R., COLBERT, A. M. E., KARR, T. L. & ROBERTSON, H. M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**: 2699-2702.
- OSAWA, N. & NISHIDA, T., 1992. Seasonal variation in elytral colour polymorphism in *Harmonia axyridis* (the ladybird beetle): the role of non-random mating. *Heredity*, **69**: 297-307.
- OWEN, D. F., 1970. Inheritance of sex ratio in the butterfly *Acraea ecedon*. *Nature*, **225**: 662-663.
- OWEN, D. F. & CHANTER, D. O., 1969. Population biology of tropical African butterflies. Sex ratio and genetic variation in *Acraea ecedon*. *J. Zool.*, **157**: 345-374.
- OWEN, D. F., SMITH, D. A. S., GORDON, I. J. & OWINY, A. M., 1994. Polymorphic Müllerian mimicry in a group of African butterflies: a reassessment of the relationship between *Danaus chrysippus*, *Acraea ecedon* and *Acraea ecedana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J. Zool.*, **232**: 93-108.
- POULTON, E. B., 1914. W.A. Lamborn's breeding experiments upon *Acraea ecedon* (Linn.) in the Lagos district of West Africa, 1910-12. *J. Linn. Soc. Lond.*, **32**: 391-416.
- RALPH, C. P., 1977. Effect of the host plant density on populations of a specialized seed sucking bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Ecology*, **58**: 799-809.
- RANDERSON, J. P., SMITH, N. G. C. & HURST, L. D., En prensa. The evolutionary dynamics of male-killers and their hosts. *Heredity*.
- REED, K. M. & WERREN, J. H., 1995. Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Mol. Reprod. Devel.*, **40**: 408-418.
- RIGAUD, T., 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. En: S. L. O'NEILL, A. A. HOFFMANN & J. H. WERREN (eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford: 81-101.
- RIGAUD, T., 1999. Further *Wolbachia* endosymbiont diversity: a tree hiding in a forest. *Trends Ecol. Evol.*, **14**: 212-213.
- RIGAUD, T. & JUHAULT, P., 1992. Genetic control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscoidea). *Heredity*, **68**: 47-52.
- RIGAUD, T., SOUTY-GROSSET, C., RAIMOND, R., MOCQUARD, J.P. & JUHAULT, P., 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): Recent acquisitions. *Endocytobiosis and Cell Research*, **7**: 259-273.
- ROPER, D. S., 1979. Distribution of the spider crab, *Leptomithrax longipes* and evidence of bacterially induced feminisation. *New Zealand J. Marine and Freshwater Res.*, **13**: 303-307.
- RÖSSLER, Y. & DEBACH, P., 1972. The biosystematic relations between a thelytokous and arrhenotokous form of *Aphytis mytilaspidis*. I. The reproductive relations. *Entomophaga*, **17**: 391-423.
- ROUSSET, F., BOUCHON, D., PINTUREAU, B., JUHAULT, P. & SOLIGNAC, M., 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **250**: 91-98.
- RYAN, S. L., SAUL, G. B. & CONNER, G. W., 1985. Aberrant segregation of R-locus genes in male progeny from incompatible crosses in *Mormoniella*. *J. Hered.*, **76**: 21-26.
- SCHILTHUIZEN, M. & STOUTHAMER, R., 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **264**: 361-366.
- SISKINS, S. P., BRAIG, H. R. & O'NEILL, S. L., 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **261**: 325-330.
- SISKINS, S. P., CURTIS, C. F. & O'NEILL, S. L., 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. En: S. L. O'NEILL, A. A. HOFFMANN & J. H. WERREN (eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford: 155-175.
- SKINNER, S. W., 1985. Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting sex ratios in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, **109**: 745-754.
- SMITH, D., 1905. Note on a Gregarine (*Aggregata inachi* n. sp.) which may cause the parasitic castration of its host (*Inachus dorsettensis*). *Mitteilungen. Zoologisches Station Neapel*, **17**: 406-410.
- SMITH, J. E. & DUNN, A. M., 1991. Transovarial transmission. *Parasitology Today*, **7**: 146-148.
- STEVENS, L. & WADE, M. J., 1990. Cytoplasmically inherited reproductive incompatibility in *Tribolium* flour beetles: the rate of spread and effect on population size. *Genetics*, **124**: 367-372.
- STOUTHAMER, R., 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*, **38**: 3-6.
- STOUTHAMER, R., 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. En: S. L. O'NEILL, A. A. HOFFMANN & J. H. WERREN (eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford: 102-124.
- STOUTHAMER, R. & LUCK, R. F., 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomol. Experiment. Appl.*, **67**: 150-157.
- STOUTHAMER, R. & WERREN, J. H., 1993. Microorganisms associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Invert. Path.*, **61**: 6-9.
- STOUTHAMER, R., PINTO, J. D., PLATNER, G. R. & LUCK, R. F., 1990a. Taxonomic status of thelytokous forms of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ann. Ent. Soc. Am.*, **83**: 475-481.
- STOUTHAMER, R., LUCK, R. F. & HAMILTON, W. D., 1990b. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **87**: 2424-2427.
- STOUTHAMER, R., BREEUWER, J. A. J., LUCK, R. F. & WERREN, J. H., 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, **361**: 66-68.
- TRIVERS, R. L., 1972. Parental investment and sexual selection. En: B. CAMPBELL (ed.) *Sexual Selection and the Descent of Man, 1871-1971*. Aldine-Atherton, Chicago, IL: 136-179.
- TURELLI, M. & HOFFMANN, A. A., 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature*, **353**: 440-442.
- TURELLI, M. & HOFFMANN, A. A., 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, **140**: 1319-1338.
- WADE, M. J. & CHANG, N. W., 1995. Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite, *Wolbachia*. *Nature*, **373**: 72-74.
- WADE, M. J. & STEVENS, L., 1985. Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (Genus *Tribolium*). *Science*, **227**: 527-528.
- WERREN, J. H., 1987. The coevolution of autosomal and cytoplasmic sex ratio factors. *J. Theor. Biol.*, **124**: 317-334.
- WERREN, J. H. & O'NEILL, S. L., 1997. The evolution of heritable symbionts. En: S. L. O'NEILL, A. A. HOFFMANN & J. H. WERREN (eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford: 1-41.
- WERREN, J. H., HURST, G. D. D., ZHANG, W., BREEUWER, J. A. J., STOUTHAMER, R. & MAJERUS, M. E. N., 1994. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.*, **176**: 388-394.

- WERREN, J. H., WINDSOR, D. & GUO, L. R., 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **261**: 55-63.
- WERREN, J. H., ZHANG, W. & GUO, L. R., 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*-reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **261**: 55-63.
- WRATTEN, S. D., 1976. Searching by *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) and escape behaviour of its aphid and ciccadellid prey on lime (*Tilia x vulgaris* Hayne). *Ecol. Entomol.*, **1**: 139-142.
- YEN, J. H. & BARR, A. R., 1973. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *J. Invert. Path.*, **22**: 242-250.
- ZAKHAROV, I. A., HURST, G. D. D., CHERNYSHOVA, N. E. & MAJERUS, M. E. N., 1996. The maternally inherited bacterium causing female bias in the Petersburg population of *Adalia bipunctata* does not belong to the genus *Rickettsia*. *Russian J. Genetics*, **32**: 1303-1306.

Evolution and Phylogeny of Arthropoda

DELETERIOUS INHERITED SYMBIONTS IN ARTHROPODS

Michael E. N. Majerus

Introduction

Many species of arthropod harbour inherited endosymbionts. Because persistence of these symbionts is so intimately dependent on their hosts, it has generally been assumed that, over time, micro-organisms that are transmitted down host generations from parent to offspring with high efficiency, will evolve to become beneficial to their hosts. This is indeed the case in some instances, for example *Buchnera* in aphids and *Blattabacteria* the mutualistic gut bacteria of cockroaches and termites. However, an alternative evolutionary strategy is available to inherited symbionts: they can parasitise host reproductive systems, manipulating them to the symbiont's benefit, even if this is to the detriment of the host. Various such manipulations have been recorded, these including cytoplasmic incompatibility (CI), feminisation, parthenogenesis induction (PI) and male-killing.

Reproductive and sex ratio distortions in arthropods have been known for a considerable time. However, investigations of the causes of such distortions have often been difficult because of the delicate nature of the causal micro-organisms which means that they do not survive outside the cytoplasmic environment of their hosts' cells. Recent advances in molecular genetic techniques have allowed close study of many distortions that were first described long ago. Furthermore, the development of methodologies for detecting and identifying symbionts via their DNA is resulting in a rapid increase in the number of known systems involving these microbes.

Before considering the mechanics and the ecological and evolutionary consequences of different types of host reproductive manipulation by inherited symbionts, some general points about the relationships between symbionts and hosts merit attention. The view that heritable micro-organisms should evolve to become beneficial to their hosts is intuitively sensible. The argument goes

like this. As the well-being of the micro-organism depends on the survival and reproduction of the host, any function of the symbiont which increases host fitness will also be advantageous to the symbiont. It follows that any action by the symbiont which reduces host fitness might be expected to be detrimental to the symbiont and so excluded by selection. However, this intuitive argument neglects alternative strategies by which symbionts may increase at the expense of hosts. Such alternative strategies exist and are easy to envisage.

Imagine a symbiont that is maternally inherited in the cytoplasm of the female gamete. This is the observed pattern of inheritance of most heritable symbionts. While such a symbiont will obviously spread if it increases the fitness of infected hosts, there are two other ways in which it may also increase. First, it may decrease the fitness of uninfected hosts. Second, it may distort the sex ratio of its host in favour of infected females.

Cytoplasmic incompatibility in diploid hosts follows the first of these routes. Infected females produce both infected males and infected females. If infected females mate with either infected or uninfected males, there is little consequence on fitness. However, if an uninfected female mates with an infected male, she is rendered sterile, her further fitness being effectively reduced to zero. Cytoplasmic incompatibility in haplodiploid organisms has a different outcome, progeny between an infected male and an uninfected female being strongly male-biased, while the reciprocal cross is normal.

Several mechanisms of sex ratio distortion are known. In the case of feminisation, the primary sex ratio of infected hosts is biased towards females because infected genotypic males become phenotypic females. Parthenogenesis induction in haplodiploid Hymenoptera also effects the primary sex ratio of hosts, causing an increase in the production of infected females.

Table 1.
Summary of the taxonomic diversity and basic characteristics of manipulative strategies of deleterious inherited symbionts.

Strategy	Symbionts	Range of hosts	Effect of symbiont on host sex ratio	Vertical transmission efficiency	Field prevalence within infected populations	Host/symbiont phylogenetic congruence
Citoplasmic incompatibility	<i>Wolbachia</i>	Crustacea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera	None	0.95-1 Field levels may be lower than those in lab.	0.8-1	Incongruent, suggesting horizontal transmission
	<i>Wolbachia</i>	Hymenoptera	Male bias in primary sex ratio	> 0.99	1	
Feminisation	<i>Wolbachia</i>	Isopoda, Lepidoptera	Female bias in primary sex ratio	0.8-0.9	0.06-0.7	
	Microsporidia	Amphipoda	Female bias in primary sex ratio	0.8-0.9	0.05-0.3	
	Paramyxidia	Amphipoda	Female bias in primary sex ratio	0.8-0.9		
	Unknown	Copepod?, decapod crab?	Female-biased sex ratio			
Parthenogenesis induction	<i>Wolbachia</i>	Hymenoptera	Female bias in primary sex ratio	> 0.9	Generally 1, but in <i>Trichogramma</i> polymorphic populations occur	Incongruent, suggesting horizontal transmission
Late male-killing	Microsporidia	Diptera	Female bias in secondary sex ratio due to male death in final larva instars	Variable. High levels of horizontal transmission may also occur	0.02-0.4	
Early male-killing	Flavobacteria	Coleoptera	Female bias in secondary sex ratio	> 0.99	0.13-0.23	Possibly congruent
	<i>Rickettsia</i>	Coleoptera	Female bias in secondary sex ratio	0.80-0.90	0.01-0.09	Probably incongruent, suggesting horizontal transmission
	<i>Wolbachia</i>	Coleoptera, Lepidoptera	Female bias in secondary sex ratio	0.86-1 (Coleoptera); > 0.99 (Lepidoptera)	> 0.06 (Coleoptera) 0.20-1 (Lepidoptera)	Unresolved
	Enterobacteriaceae	Hymenoptera	Female bias in secondary sex ratio	0.95	0.04-0.11	Horizontal transmission of symbiont between parasitoid wasp and its fly host
	<i>Spiroplasma</i> (Gr II)	Diptera	Female bias in secondary sex ratio	0.90-0.99	0.05-0.12	
	<i>Spiroplasma</i> (Gr VI)	Coleoptera	Female bias in secondary sex ratio	0.90-1	0.02-0.86	Probably incongruent, suggesting horizontal transmission
Unknown bacteria	Lepidoptera, Coleoptera	Female bias in secondary sex ratio				

Conversely, male-killing distorts the secondary sex ratio among progeny of infected females towards females. Infected females typically produce male and female zygotes with equal likelihood, but the fitness of male zygotes is substantially reduced (often to zero), while that of their female siblings is enhanced.

Table 1 summarises the basic characteristics of the four known manipulative strategies of deleterious inherited symbionts and the taxonomic diversity of both the symbionts and their hosts.

It is becoming apparent that inherited endosymbionts are very common in arthropods. A survey using a molecular screen for the presence of one genus of inherited bacteria, *Wolbachia*, estimated around 15% of insect species harbour bacteria from this genus (Werren et al., 1995a). Even this extraordinary estimate is probably conservative, as only one or a few individuals of many species were screened, and *Wolbachia* with low prevalence are likely to have been missed.

The interactions between arthropods and their heritable endosymbionts may have played a significant role in the evolution of arthropods. In this review, I will first discuss each of the known host manipulations achieved by detrimental heritable endosymbionts, before discussing the evolutionary consequences of these parasites to their hosts.

Cytoplasmic incompatibility

Cytoplasmic incompatibility was first discovered when crosses between mosquitoes from European, Asian and American populations failed to produce offspring, or produced offspring only when performed in one direction. For example, crosses of *Culex pipiens* from Hamburg and Ogglehausen populations produced normal progeny when females were drawn from Hamburg, but failed when females came from Ogglehausen. Furthermore, female progeny from Hamburg female x Ogglehausen male crosses, when backcrossed to males from either parental population, were normal, but males only produced issue when backcrossed to Hamburg females. This pattern of reproductive failures demonstrated maternal inheritance and indicated an association with cytoplasmic factors, hence the name given to the

phenomenon. Eventually, *Wolbachia* were found to be responsible (Yen & Barr, 1973). Since the early work on CI by Laven in the 1950s (reviewed in Laven, 1967), CI has been reported from many insect taxa.

Cytoplasmic incompatibility occurs if a male carrying a CI *Wolbachia* mates with a female that does not bear the same *Wolbachia*. The bacterium places a chemical in the sperm of its host which renders inviable those zygotes formed within the female parent that do not bear the *Wolbachia*. Essentially, therefore, an uninfected female that mates with an infected male is rendered sterile. Other mating combinations are not affected.

In many species showing CI, the phenotype can be cured by treatment with the antibiotic tetracycline, and cures have also been effected by exposing infected strains to high temperatures (e.g. 37°C) for several days.

In general, CI has been observed to produce two patterns of reproductive failure. First, some inter-population crosses appeared normal when males were drawn from one population, but failed when males were drawn from the other. Alternatively, other inter-population crosses produced few if any offspring, irrespective of which way round crosses were performed. The deduction from these patterns was that some hosts harbour more than one strain of CI *Wolbachia*. Crosses between populations that bear different strains fail in both directions. Conversely, crosses between a population which bears a CI *Wolbachia* and one that does not only fail if the male is drawn from the CI bearing population. In the fruit fly *Drosophila simulans*, for example, both unidirectional and bi-directional incompatibility have been recorded, with five naturally occurring incompatibility types having been recorded (Table 2; Hoffmann & Turelli, 1997).

The existence of more than one CI *Wolbachia* within a species raises the possibility of double infection within an individual. There is evidence that this does occur, for example in the mosquito *Aedes albopictus* from Texas (Siskins et al., 1995). The presence of multiple strains of CI *Wolbachia* in one host individual may explain some of the complex patterns of incompatibility seen in mosquitoes (Laven, 1967; Magnin et al., 1987).

Table 2.
Incompatibility types and associated infections in *Drosophila simulans* (after Hoffmann & Turelli, 1997).

incompatibility type	Infection	Incompatibility between types*:						Occurrence
		R	S	H	N	A	W	
R	wRi	-						Natural
S	wHa, wNo	bi	-					Natural
H	wHa	bi	uni	-				Natural
N	wNo	bi	uni	bi	-			Induced by segregation
A/M	Unnamed/ wMa	uni	uni	uni	?	-		Natural
W	Uninfected	uni	uni	uni	uni	none	-	Natural
Unnamed	wRi, wHa	uni	?	uni	?	?	uni	Produced by microinjection
Unnamed	<i>Wolbachia</i> from <i>Aedes</i>	bi	?	bi	?	?	uni	Produced by microinjection

* bi = bidirectional incompatibility, crosses in both directions showing reduced egg hatch rates; uni = unidirectional incompatibility, crosses in one direction only showing reduced egg hatch rates.

Taxonomic diversity of CI

Cytoplasmic incompatibility has been observed in inter-population crosses of many insect species. In *Culex* and *Aedes* mosquitoes, both unidirectional and bi-directional CI have been observed. The same is true of *D. simulans* and several other *Drosophila* species (Hoffmann & Turelli, 1997). In the flour beetle, *Tribolium confusum*, and the alfalfa weevil, *Hypera postica*, unidirectional CI has been detected (Hsiao & Hsiao, 1985; Wade & Stevens, 1985). Unidirectional incompatibility has also been observed in the planthopper *Laodelphax striatellus* (Noda, 1984) and in two species of Lepidoptera, the almond moth, *Ephesia cautella* (Brower, 1976), and the pierid butterfly, *Eurema hecabe* (Hiroki, pers. comm.). Finally, *Wolbachia* induced CI has been observed in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*, with unidirectional and bi-directional incompatibility and double-infections all having been observed (Breeuwer et al., 1992).

Despite the diversity of species exhibiting *Wolbachia* induced CI, the number of species showing the phenomenon is not huge. This is undoubtedly purely the result of lack of work. Most species in which CI has been demonstrated either have economic importance as disease carriers or crop pests, or they are well researched scientific organisms. Given current estimates that *Wolbachia* are present in 10-20% of insect species (Werren et al., 1995a), many additional examples of CI inducing *Wolbachia* will surely be revealed in the future.

Transmission efficiency and field prevalence levels

The vertical transmission efficiency of maternally inherited symbionts, that is the proportion of progeny that inherit the symbiont from their mother, varies both between symbionts and hosts. Among CI *Wolbachia*, vertical transmission efficiencies are generally high (Table 1), although the rate varies between lines. Evidence of incomplete vertical transmission comes from both mosquitos and fruit flies. Where vertical transmission efficiencies have been assessed both in laboratory and field, the level is usually lower in the field. The existence of naturally occurring antibiotics, climatic factors, particularly temperature, host diapause and bacterial density levels, may all influence vertical transmission.

The prevalence of CI *Wolbachia* has only been extensively assayed in *D. simulans* and *D. melanogaster*. Studies in California, on *D. simulans*, have given some extremely interesting data on the dynamics of increase in CI *Wolbachia* in the wild. Prior to 1988, infected populations were only found south of the Tehachapi range, south of the Central Valley. Between 1988 and 1994, there was an extremely rapid increase in prevalence in the Central Valley. Furthermore, the observed spread is consistent with theoretical predictions based upon the levels of incompatibility and vertical transmission efficiency. There is exact agreement between the predicted equilibrium frequency, based on the mean measured incompatibility between infected males and uninfected females (0.55), the mean measured uninfected progeny produced by infected females (0.04), and the average frequency observed both in five populations from south of the Tehachapi range, and in five populations from the southern Central Valley (Turelli & Hoffmann, 1995).

Other data on CI prevalences in *D. simulans* and *D. melanogaster* show less perfect agreement with theoretical predictions. Part of the problem is that it is not always apparent whether CI has reached a stable equilibrium in a particular

population. This difficulty is exacerbated by data from *D. simulans* suggesting that the equilibrium frequency of infection may fluctuate over time as a consequence of changes in incompatibility levels and vertical transmission rates (Hoffmann & Turelli, 1997). Inconsistencies between observed and predicted prevalences may also result when fruit is transported by man, flies being carried long distances in the process. Certainly the northward rate of spread of CI type R, described by Turelli & Hoffmann (1991), which indicated migration rates of around 50 km/generation, is far greater than can be accounted for merely by flight.

What is certain is that the prevalence of CI type R has increased or is increasing rapidly in many parts of the world. The agent wRi now occurs in all monitored North American populations except those in southern Florida, and in most its frequency is close to the expected equilibrium. High prevalences of wRi have also been reported from Costa Rica, Uruguay, Zimbabwe, Portugal and Spain. Lower frequencies have been reported from Israel, France and Italy in the last decade, and it would be helpful to remonitor these areas to determine whether these were transitional prevalences as the *Wolbachia* spread through to equilibrium.

Mechanisms of incompatibility

The mechanisms of incompatibility are poorly understood. In *C. pipiens*, incompatibility appears to result from failure of sperm bearing a CI *Wolbachia* to fuse properly with female gametes that lack the same *Wolbachia* (Jost, 1971). In *Drosophila* (O'Neill & Karr, 1990) and *Ephesia* (Kellen et al., 1981), embryo development is suppressed at an early stage. In *N. vitripennis*, CI *Wolbachia* interfere with chromosome condensation of the paternal chromosome set during the first embryonic mitotic division (Ryan et al., 1985; Reed & Werren, 1995). The paternal chromosome set is lost with the result that progeny carry just the maternal set, are thus haploid and so are male. The way that CI *Wolbachia* interacts with the chromosomes of its host, causing condensation failure, is not known. In many species only young sperm bear *Wolbachia*: mature sperm do not. It is thus argued that *Wolbachia* may either deposit into sperm some chemical, or may remove or modify some feature of sperm during spermatogenesis. However, which of these, if either, is correct, awaits clarification.

Despite the lack of knowledge of the underlying mechanics of CI, it is known that *Wolbachia* density influences incompatibility levels. Evidence from various species has shown that increased *Wolbachia* density is correlated with higher incompatibility (e.g. Binnington & Hoffmann, 1989). However, comparison between species also shows that the bacterial density needed to cause a specific level of incompatibility varies between cases.

Effects of CI *Wolbachia* infection on host fitness

The effect of bearing CI *Wolbachia* on host fitness urgently warrants research. Current evidence indicates that in some species there is a fitness disadvantage associated with the trait. In laboratory experiments, infected females of *D. simulans* were less fecund than uninfected females (Hoffmann et al., 1990), although field experiments did not show this effect (Turelli & Hoffmann, 1995). Negative effects on host fitness have not been shown in other *Drosophila* species despite being sought, but a reduction in productivity has been recorded for one strain of *Tribolium* infected with *Wolbachia* (Stevens & Wade, 1990).

Fitness effects of bearing *Wolbachia* may also occur through sperm competition. In laboratory tests on *T. confusum*, Wade & Chang (1995) showed that sperm from infected males had a competitive advantage over sperm from uninfected males. Such an effect would alter the dynamics of the spread of CI *Wolbachia* through a population, the rate of spread being enhanced in promiscuous species.

Phylogeny of CI *Wolbachia* and their hosts

All CI causing agents known belong to the *Wolbachia pipientis* complex. This complex comprises a widespread assemblage of α -Proteobacteria. Members of this complex are known to infect species within all the major orders of insects as well as some other arthropods (mites, isopods) and phyla (nematodes). Currently, over 100 invertebrate host species have been identified, and new hosts are being discovered regularly.

Apart from causing CI, members of this complex are known which cause feminisation, parthenogenesis and male-killing. In addition, some appear to have no phenotypic effect on their hosts while some are beneficial. Phylogenetic analysis, using synonymous substitution rates in the *ftsZ* gene, have shown that within arthropod hosts, the complex involves two main lineages that diverged about 50 million years ago (Werren et al., 1995b). Phylogenetic analysis of *Wolbachias*, using 16S rRNA and *ftsZ* sequences, has shown that the evolutionary similarities between *Wolbachias* in different hosts are not concordant with host evolutionary relationships (O'Neill et al., 1992; Werren et al., 1995a,b). This suggests that inter-specific horizontal transmission of *Wolbachias* must occur at times. There is evidence that *Wolbachia* can transfer between parasitic insects and their hosts (Werren et al., 1995b), and there appears to have been more horizontal transmission in the A sub-division of *Wolbachia* than in the B sub-division, particularly over the last 2.5 million years. That said, virtually nothing is known about the patterns and frequencies of horizontal transfer of these symbionts.

The lack of phylogenetic correlation between *Wolbachias* and their hosts extends to the phenotypic effect of the symbionts on their hosts. *Wolbachias* which use different strategies to manipulate host reproduction do not group together. For example, the CI *Wolbachias* do not form a monophyletic group compared to those that induce parthenogenesis. Similarly, the male-killing *Wolbachia* of the coccinellid beetle *Adalia bipunctata* is most closely related to the CI agent of *T. confusum*, while that of the butterfly *Acraea encedon* aligns with the PI *Wolbachia* of the wasp *Trichogramma deion* (Hurst et al., 1999a). One explanation of this lack of tight grouping of *Wolbachias* with particular effects on hosts is that the various strategies employed by *Wolbachia* have each evolved independently more than once. This is perhaps the most likely explanation, but others exist. Different strategies may arise due to different selection imposed by a host's behaviour and ecology. Particulars of a host's genome may also provide favourable openings or impose selective constraints upon *Wolbachia*, so that the host's genome, or some part of it, acts as a critical determinant of the manipulation expressed. It is also feasible that within a host species, the evolution of a suppresser system against one type of manipulation leads to the evolution of an alternative unsuppressed manipulation. Finally, as Werren & O'Neill (1997) point out, the genes that cause manipulation may be extrachromosomal, and so would be inherited independently of the genes used for phylogenetic analysis.

Feminisation

Pattern of feminizing

Characteristically, feminizing endosymbionts cause genetic males to be transformed into females. In diploids in which sex is ancestrally determined by sex chromosomes, this results in both heterogametic and homogametic females, but males of only one type.

Taking the best studied case, that of feminisation in the woodlouse *Armadillidium vulgare*, as an example, sex determination is normally based upon sex chromosomes, with females being heterogametic, carrying two different sex chromosomes (WZ), and males being homogametic (ZZ) (Juchault & Legrand, 1972). Early studies showed that some females produced strongly female-biased progenic sex ratios and that the trait was maternally inherited. Careful observation failed to reveal significant male-

biased mortality among progeny of females exhibiting the trait, suggesting that male-killing was not involved. The finding that the trait could be horizontally transferred to WZ females lacking the trait, by injection of tissues from females with the trait, suggested involvement of a symbiont (Legrand & Juchault, 1970). This was confirmed when a bacterium was detected in females showing the trait, but not in males (Martin et al., 1973).

Molecular identification followed, the symbiont being a *Wolbachia*. This *Wolbachia* is temperature sensitive, a temperature of 30°C gradually destroying the bacterium (Juchault & Legrand, 1981a,b). Interestingly, females reared at 30°C, and thus cured of the bacterium, produced strongly male-biased progeny, suggesting that these females were genotypically male, i.e. ZZ, and that their female phenotype was the consequence of the bacterium they had carried (Rigaud et al., 1991). Examination of the sex chromosomes of *A. vulgare* from populations harbouring the *Wolbachia*, showed that all females were ZZ (Juchault et al., 1993). In these populations, therefore, the control of sex determination has changed from sex chromosome dependent to symbiont dependent. All individuals are ZZ, with those carrying the *Wolbachia* being female, and those lacking it being male. The vertical transmission efficiency of the symbiont is imperfect, with, on average, approximately 10% of progeny being uninfected and so male. The feminisation process is usually complete, although intersexes do occur occasionally, possibly resulting from low bacterial density, or lack of exact synchrony between bacterial feminizing activity and the timing of sexual tissue determination.

Range of hosts and range of feminizers

Feminizing endosymbionts have been recorded and identified from a number of crustaceans, and from one insect. Within the Crustacea, two distinct phylogenetic systems of feminisation have been observed, both in respect of the hosts infected and the symbionts responsible for feminisation. In isopods, feminisation is caused by B sub-division *Wolbachia* (Rousset et al., 1992). In the Amphipoda, primitive eukaryotes are responsible for feminisation.

On current evidence, the discretion of the two systems in the Crustacea seems complete. Of 80 species studied, 22 were found to bear *Wolbachia*, all these being isopods (Bouchon et al., 1998). In most of those in which the phenotypic effect of the *Wolbachia* has been ascertained, it causes feminisation, although in one, *Porcellio dilatatus*, it induces CI (Bourtzis & O'Neill, 1998). Conversely, non-bacterial feminizers are confined to the Amphipoda, *Gammarus duebeni* being infected with two Microsporidia, *Nosema granulosis* (Fig. 1) and *Octosporea effeminans* (Smith & Dunn, 1991), and *Orchestia gammarellus* hosting the paramyxidial, *Paramartelia orchestia* (Ginsburger-Vogel & Desportes, 1979). Artificial transfers via microinjection are successful within species and to some extent within classes, but not between classes. Some microinjection experiments provide circumstantial evidence of co-evolution between host and symbiont. Thus, the feminising *Wolbachia* from *Chaetophiloscia elongata* which is phylogenetically similar to that of *A. vulgare*, when successfully transferred into *A. vulgare*, failed to produce a feminising effect (Bouchon et al., 1998). It appears then that the feminising effect may be highly host specific. This makes sense if the mechanism of feminisation relies on genes specific to particular hosts (Dunn & Rigaud, 1998).

The different feminizers vary in their distribution within hosts. *Wolbachia* and Paramyxidia tend to be scattered throughout their hosts (Martin et al., 1973; Ginsburger-Vogel & Desportes, 1979), while Microsporidia are present exclusively in the female germline. In *G. duebeni*, Microsporidia may have the ability to identify and preferentially infect putative germline tissues (Hatcher et al., 1997), although differential replication rates of the Microsporidia in somatic compared to germline cells would also produce the observed distribution pattern. Either way, it appears that the germline specific nature of microsporidian distribution in *G. duebeni* probably results from the relatively slow replication rate of the Microsporidia, necessitating infection specificity to transmitting cell lines (Dunn et al., 1995).

Prevalence of different crustacean feminizers also varies. In *G. duebeni*, feminising Microsporidia have been found in all populations surveyed, with prevalence levels varying from 5 to 30% (e.g. Dunn et al., 1993). In contrast, most populations of *A. vulgare* lack feminising *Wolbachia* (Juchault et al., 1993), although here the presence of a non-symbiont feminising factor

(f factor) which is probably a transposable element, complicates the situation. The reasons for the variability in feminizer prevalences, and particularly the low prevalence of feminising *Wolbachia* in *A. vulgare*, are not clear. Rigaud (1997) suggests that distributions and prevalence levels may be a consequence of intrinsic and extrinsic factors specific to each system, and questions whether a general explanation exists. This is certainly an area that needs further work, with particular attention being paid to presence of resistance genes, to interference effects from other feminising factors and to correlations between prevalences and environmental factors such as temperature, photoperiod and salinity.

Female-biased sex ratios and associated traits, such as intersexuality, have been reported from other groups of crustaceans. In some, traits appear to be controlled by nuclear genes or are environmentally induced. However, cytoplasmic inheritance has been implicated in the decapod crab *Inachus dorsettensis* (Smith, 1905), the copepod *Tigriopus japonicus* (Igarashi, 1964) and in the crab *Leptomithrax longipes* (Roper, 1979), although in each of these cases, the presence of a causal symbiont awaits verification (Rigaud, 1997).

Most cases of feminisation by endosymbionts involve crustaceans. However, the phenomenon has recently been reported from a species of moth, the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Kageyama et al., 1998). Feminisation in this species appears to be caused by a bacterium, as female biases were shown to be tetracycline sensitive. A *Wolbachia*, phylogenetically similar to that causing feminisation in *A. vulgare*, has been detected in *O. furnacalis*, and is a candidate causal agent (Hoshizaki, pers. comm.).

In addition to this non-crustacean case, Laurence Hurst (1993) lists other Arthropod species that may harbour cytoplasmic sex factors. These include several coccids, an aphid (Hemiptera) and one butterfly. In none of these cases has the cytoplasmic agent been identified, and symbiont involvement in host sex determination has yet to be verified.

Sex determination systems of hosts susceptible to feminisation

The preponderance of crustaceans in the above mentioned instances of symbiont induced feminisation leads to the questions: what is special about sex determination in the crustaceans that it is so commonly compromised? and why is feminisation so rare in other taxa? Rigaud (1997) contrasts the situation of feminisation with that of CI, noting the diversity of symbionts in the former compared to the single known agent, *Wolbachia*, that causes the latter. He draws the conclusion that the fundamental basis of feminisation must, therefore, be largely a property of the host rather than the microorganisms. This interpretation is perhaps undermined to some extent by a consideration of male-killing endosymbionts in which there is phylogenetic diversity in both the symbionts causing male-killing and their hosts. In the case of male-killing, the success of a symbiont results from interaction involving both the ability of the symbiont to manipulate its host's reproduction and the tractability of the host to such manipulation, the latter being a consequence of both the host's genetic systems and its ecological context (Majerus & Hurst, 1997).

Sex determination in the Crustacea is relatively labile, with both male and female heterogamety occurring. *A. vulgare* is female heterogametic, with both temperature and photoperiod also influencing sex determination. By contrast, in uninfected *O. gammarellus* males are heterogametic and *G. duebeni* has a polyfactorial sex determination system which is also under the influence of photoperiod. However, while the ease with which a host's sex determination system can be manipulated is undoubtedly important, symbiont abilities should not be disregarded. The need for flexibility on the part of the symbiont is perhaps gleaned from the fact that the feminizers in some Crustacea, and the single known insect case, are *Wolbachia*, which has considerable flexibility in its manipulation of host reproduction. It is perhaps more precise, therefore, to say that the fundamental basis of feminisation is consequent upon both the phenotypic flexibility of the symbiont and the lability of the host's sex determination system.

Mechanism of feminisation

In *A. vulgare*, the difference between developing into a male or a female appears to depend on a single gene which blocks the expression of the gene(s) that cause androgenic gland differen-

tiation. This gland produces male hormones, and if its formation is suppressed, a female phenotype results. There is thus a fairly simple mechanism by which an inherited symbiont may feminize a genotypic male, for all it has to do is inhibit the differentiation of the androgenic gland. Although the precise molecular basis of this inhibition is unknown, the symbiont seems to mimic the action of 'female genes' carried on the W chromosome that inhibit androgenic gland differentiation in WZ individuals. This mimicry may be purely phenotypic, with disruption at any stage during androgenic gland development leading to feminisation.

If the reason that the Crustacea are a 'hot-spot' for feminising endosymbionts is the corruptibility of their simple sex determination system, we should ask why other groups are not as susceptible. The obvious answer is that the sex determination systems of most other organisms are not so easily manipulated. In *Drosophila*, for example, no simple genetic change has been discovered which will change an XY male into a viable and reproductively functional female. It is likely then that several factors have to operate in concert to fully feminize chromosomal males. The task of mimicking a multifactorial sex determining mechanism would obviously be harder for potential feminizers in insects than it is in Crustacea. The rarity of endosymbiotic feminizers in insects (only one confirmed case) may simply be a function of this difficulty.

Surprisingly, the feminising *Wolbachia* of crustaceans have a second feminising mechanism, independent of that affecting the androgenic gland development. This was first detected when these *Wolbachia* were injected into adult males with fully differentiated and functional androgenic glands. The result was the gradual feminisation of these males, with an intersex phenotype being produced (Juchault & Legrand, 1985). Analysis showed that although the androgenic glands still produced androgenic hormone, and the hormone remained active when transferred to other individuals, it was ineffective in its producer. It is thus possible that the *Wolbachia* in some way interferes with the hormone's receptors in target tissues. Why *Wolbachia* have two independent mechanisms that affect host sex determination is not known and warrants investigation.

Intragenomic conflict and host resistant genes

One possible reason for the double feminising effect of *Wolbachia* in *A. vulgare* is that it is a consequence of an arms race between cytoplasmic elements and the nuclear genome. As a result of the differences in inheritance, nuclear genes which are generally inherited from both parents, are in conflict with cytoplasmic genes (Werren, 1987; Hurst, 1992). Theoretically, selection resulting from this conflict may lead to a male-biased sex ratio being produced by uninfected females, who increase their long-term fitness simply by producing the rarer sex (Fisher, 1930). Alternatively, selection may favour nuclear genes which counteract the feminizer either directly or indirectly. Direct action may be by either killing the *Wolbachia* or reducing its vertical transmission efficiency. Indirect action may be by suppressing the phenotypic effect of the feminizer, or by altering the physiological parameters of male development. Both responses to the intra-genomic conflict arising from the presence of symbiotic feminizers are supported by some strands of evidence. Selection experiments in *A. vulgare* have shown the presence of autosomal genes that can increase the proportion of males in progeny (Rigaud & Juchault, 1992). Support for the presence of resistance genes comes from studies on a gene, *M*, which counteracts the feminising effect of the non-symbiotic feminising factor *f*. This *f* factor may either carry feminising information derived from, or similar to, that of microbial feminizers, or it may insert into the male gene(s), disrupting their masculinizing function. The *M* gene over-rides the *f* factor, restoring a male phenotype in the presence of *f*. However, the *M* gene cannot over-ride the feminising *Wolbachia*, for although it counteracts the primary feminising function of this bacterium, as shown by the fact that initial sexual development is towards male differentiation, this development is halted by the secondary feminising effect of the *Wolbachia*, and further development is towards femaleness due to inactivation of androgenic hormone. The secondary feminising effect of *Wolbachia* may thus have evolved in response to the *M* gene or other resistance genes (Rigaud, 1997).

Parthenogenesis inducers

Much of the biotic world indulges in sexual reproduction. However, a significant proportion of organisms reproduce asexually, either ancestrally, or secondarily when asexuality has evolved from sexuality. Secondary asexual reproduction is termed parthenogenesis, with new individuals arising from unfertilised eggs. In diploid species, the evolution of parthenogenesis requires two steps. First, the egg has to be able to develop without the catalyst of sperm penetration of the egg. Second, the diploid number of chromosomes has to be restored in the haploid egg. In some organisms, however, only females are diploid, males being haploid, and arising without fertilisation. In these haplodiploid species, development of male embryos is initiated without the stimulus of fertilisation, so other mechanisms of initiation of embryonic development had to evolve. These species thus only need to achieve one evolutionary step, the restoration of the diploid number in females, to become fully parthenogenetic. It is for this reason that parthenogenesis is much commoner in haplodiploid species than in diploid species.

A variety of types of parthenogenesis exist. Normal haplodiploid species, in which females result from fertilised eggs and males from unfertilised eggs, are called arrhenotokous. In deuterotoky, both males and females arise from unfertilised eggs, while thelytoky involves the production of just female offspring. The production of only female offspring, without the need for males, raises the possible involvement of cytoplasmic symbionts whose interests are favoured by female hosts which can vertically transmit them. This involvement has been realised in a number of haplodiploid Hymenoptera.

The first evidence that thelytoky in parasitoid Hymenoptera involved cytoplasmic rather than nuclear factors, was obtained by Stouthamer et al. (1990a). Using *Trichogramma pretiosum*, attempts to introgress the nuclear genome of a thelytokous lineage, via males produced by temperature treatment, into a conspecific arrhenotokous line over nine generations, failed. Subsequent administration of various antibiotics or high temperatures (> about 30°C), to thelytokous females, led to the production of some sons (Stouthamer et al., 1990b). This led to the deduction that a cytoplasmic micro-organism, probably a bacterium, caused thelytoky in this species. Lacmoid staining and microscopic examination revealed a bacterium to be present in eggs of some thelytokous lines, but not in antibiotic or temperature treated lines, or in arrhenotokous lines (Stouthamer & Werren, 1993). Analysis of the 16S rRNA gene revealed the presence of a *Wolbachia* (Rousset et al., 1992; Stouthamer et al., 1993).

Microbe-induced parthenogenesis has now been found in over 30 species of parasitoid wasp. All causative agents identified to date are *Wolbachias*. The *Wolbachia* involved do not form a monophyletic group within the *Wolbachia*, but are intermixed

with *Wolbachia* that affect hosts in other ways (e.g. CI and male-killing). This suggests that either PI has evolved independently several times in the *Wolbachia*, or that the genes that cause PI can be horizontally transferred between *Wolbachias*, through DNA exchange involving virus-like particles or plasmids. A third possibility is that the same *Wolbachia* causes different effects in different hosts, for example PI in haplodiploids, and CI or male-killing in diploids.

Phylogenetic analysis of a number of PI *Wolbachias*, particularly in the genus *Trichogramma*, has provided evidence for interspecific horizontal transmission of the symbiont. *Wolbachias* from *Trichogramma* species form a monophyletic group within the parthenogenesis inducing *Wolbachia*, the clade being restricted to *Trichogramma* species (Stouthamer et al., 1993; Werren et al., 1995b). However, within a *Trichogramma* species, different *Wolbachias* exist, with no congruence between host and symbiont phylogeny (Schilthuisen & Stouthamer, 1997).

Mechanism of PI

Studies of parthenogenetic organisms have shown considerable diversity in the way diploid offspring can result from unfertilised eggs. This diversity can be split into two basic groups: those involving meiotic modification, in which chromosome number is not reduced during meiosis, and those involving post-meiotic modification, in which the diploid number is restored after the meiotic formation of a single pronucleus, typically by the fusion of two haploid mitotic products (Stouthamer, 1997). In cases of *Wolbachia*-induced parthenogenesis studied cytologically, the latter of these routes is utilised. Meiosis in infected and uninfected females is the same, a single pronucleus being produced. In uninfected females (arrhenotokous), arrival of sperm leads to fertilisation and normal female development. If no sperm arrives, the haploid pronucleus divides mitotically, with the two sets of chromosomes formed migrating to opposite poles at anaphase, two haploid nuclei resulting. Further cell division proceeds along similar lines so that a haploid male is produced. In infected females, the process is the same to anaphase of the first mitotic division. At this point, both sets of chromosomes migrate to the same pole, resulting in a single diploid mitotic product. This chromosomal behaviour is known as gametic duplication. The methods by which *Wolbachia* affect the biochemical and/or mechanical behaviour of host chromosomes are currently unresolved.

In Hymenoptera showing *Wolbachia* induced parthenogenesis, the temperature to which larvae and pupae are exposed strongly influences the sex of subsequent progeny. For most species, at temperatures below 26°C all progeny are female, while over 30°C only males result. At temperatures between these limits,

Table 3
Male-killing in coccinellid species.

Host species	Countries	Agent	Prevalence	Evidence*
<i>Adalia bipunctata</i>	England, Scotland, Holland, Denmark, Luxembourg, France, Germany, Poland, Russia, Kyrgyzia	<i>Rickettsia</i>	0.01-0.09	f-bsr; hhr; mi; as; hs; m; sDNA; PCR
<i>Adalia bipunctata</i>	Germany, Russia	<i>Spiroplasma</i> (Group VI)	0.03-0.13	f-bsr; hhr; mi; as; hs; m; sDNA; PCR
<i>Adalia bipunctata</i>	Russia	Two strains of <i>Wolbachia</i>	each < 0.1	f-bsr; hhr; mi; as; hs; m; sDNA; PCR
<i>Adalia 10-punctata</i>	Germany	<i>Rickettsia</i>		f-bsr; hhr; mi; as; hs; m; sDNA; PCR
<i>Harmonia axyridis</i>	Japan, Russia, South Korea	<i>Spiroplasma</i> (Group VI)	0.02-0.86	f-bsr; hhr; mi; as; hs; m; sDNA; PCR
<i>Coleomegilla maculatus</i>	U.S.A.	Flavobacterium	0.23	f-bsr; hhr; mi; as; sDNA; PCR
<i>Adonia variegata</i>	Turkey	Flavobacterium	0.13	f-bsr; hhr; mi; as; sDNA; PCR
<i>Hippodamia 15-signata</i>	U.S.A.	Unknown		f-bsr; hhr; mi
<i>Cheilomenes 6-maculatus</i>	Japan	Probably <i>Spiroplasma</i> , (<i>Wolbachia</i> also detected in some lines)	0.13	f-bsr; hhr; mi; as; PCR
<i>Coccinula sinensis</i>	Japan	Probably Flavobacterium	0.23	f-bsr; hhr; mi; as; PCR
<i>Propylea japonica</i>	Japan	Probably <i>Rickettsia</i>	0.07-0.26	f-bsr; hhr; mi; as; PCR
<i>Coccinella 7-punctata</i>	England	Unknown	< 0.01	f-bsr; hhr
<i>Calvia 14-punctata</i>	England	Unknown		f-bsr; hhr

*Evidence given as: f-bsr = female-biased sex ratio; hhr = low egg hatch rate in infected lines; mi = maternal inheritance; as = antibiotic sensitive; hs = heat sensitive; m = microscopy; sDNA = DNA sequencing; PCR = detection of symbiont using symbiont-specific PCR reaction.

males, females and gynandromorphs may all be produced (Cabello & Vargas, 1985). Stouthamer (1997) suggests that differences in the proportion of male and female tissues may be the result of *Wolbachia* induced gametic duplication being delayed, i.e. not occurring at the first mitotic division. This hypothesis accords with the observation of a positive correlation between increasing temperature and the proportion of male tissue. However, if true, one would expect that the minimum proportion of male tissue in gynanders would be two-thirds which is not the case, some individuals being predominantly female with only small anterior clusters of male cells. Further work is clearly needed in this area.

Dynamics of *Wolbachia* infection

In most Hymenoptera harbouring PI *Wolbachia*, thelytoky has been fixed. However, in most *Trichogramma* species both thelytokous and arrhenotokous individuals coexist, with *Wolbachia* prevalence generally being low (reviewed in Stouthamer, 1997). The reasons for this distribution of polymorphism and monomorphism are not clear. Polymorphism may result from a variety of factors: incomplete vertical transmission; negative fitness effects of *Wolbachia* infection on the host; nuclear suppresser genes, or a combination of these factors. Unfortunately, empirical evidence relating to these factors is as yet limited. Vertical transmission rates have only been assessed in laboratory cultures, where they tend to be high: > 90% for *Trichogramma* species tested (Stouthamer, 1997), although transmission rates apparently decline with host age. Strong negative fitness effects of *Wolbachia* infection, through reduced offspring production, have been shown by comparison of genetically identical infected and uninfected lines of *Trichogramma* exposed to unlimited hosts (Stouthamer *et al.*, 1990a; Stouthamer & Luck, 1993). However, if such negative effects occur in the field, infection should be lost. It is probable that in the field host availability is limited, and under such conditions infected females produce more daughters than do uninfected females (Stouthamer 1993). Finally, although the conflict between the cytoplasmic genome and the nuclear genome should impose a selection pressure that would favour the evolution of nuclear suppresser genes, evidence for the existence of such suppressers is sparse and circumstantial. The evidence comes from two instances, in different species, of segregation of virgin progeny into those which produced only females and those which produced only males (Rössler & DeBach, 1972; Stouthamer, 1997).

Research into the evolutionary effects of PI symbionts is still in its infancy. Since the involvement of cytoplasmically inherited *Wolbachia* in PI was first discovered, achievements have included the identification of over 30 *Wolbachia*-Hymenoptera systems, considerable phylogenetic analysis demonstrating interspecific horizontal transfer of symbionts and understanding of the cytological basis of such parthenogenesis. Theoretical considerations of the population and evolutionary dynamics of parthenogenesis inducers have also advanced considerably (see Stouthamer 1997). However, there are still many gaps in our knowledge. Mechanistically, how does *Wolbachia* affect the behaviour of host chromosomes? How precisely do gynanders arise? Does *Wolbachia* impose negative fitness effects upon its hosts in field situations? How frequent is horizontal transmission of *Wolbachia* (either intra or interspecific) in the wild? Do suppresser genes exist? Is symbiont induced parthenogenesis really restricted to the Hymenoptera? These questions provide a fertile field for future investigation.

Male-killers

In some ways, male-killing is the least sophisticated of the mechanisms of sex ratio distortion practised by inherited symbionts. The basic mechanism involved is for the symbiont to kill male but not female hosts. It is perhaps a consequence of the coarseness of this approach that male-killing appears to be more taxonomically diverse, both in respect of hosts and symbionts, than other types of sex ratio distortion employed by inherited micro-organisms (Table 3). Among arthropods, male-killing has been reported from five orders of insects and two species of mites. In addition, male-killers themselves are taxonomically diverse, with α and γ Proteobacteria, Mycoplasma, Flavobacteria and Microsporidia being recorded.

Early and late male-killers

Laurence Hurst (1991) recognised that migration out of a host may be facilitated by killing male hosts if the corpse then decays to release the endosymbionts. He argued that the killing of male hosts should occur in later development to allow the male-killer time to replicate within its host, so that large numbers of individuals would be released after host death. He termed such cases late male-killers.

Horizontally transmitted late male-killers can be contrasted with endosymbionts which kill males and die in the process, but in doing so increase the fitness of copies of themselves in female hosts. The increase in the fitness of infected females resulting from male-killing is called fitness compensation, because for the male-killer to invade, such fitness increases have to compensate for the death of male progeny and any costs incurred by females bearing the endosymbiont. Because of the nature of reproduction in most microbial symbionts, many or all progeny of an infected mother will carry copies of a symbiont which are virtually identical as a result of descent. Thus, if by killing male hosts the symbiont increases the fitness of the dead males' sisters, a fitness benefit will also accrue to 'exact' copies of the male-killer within these females.

Two types of advantage to male-killing have been identified. First, the probability of mating with close relations, specifically brothers, will be reduced, with a potential consequent reduction in inbreeding depression. An infected female whose brothers have been killed by a male-killer, cannot indulge in full-sib mating. Second, the resources that would have been used by sons of an infected female may become available to female siblings. In the case of inbreeding avoidance, it matters little when male hosts are killed, as long as it is prior to reproductive maturity. However, if the benefit of male-killing involves resource reallocation, greatest benefit will be gained if male hosts are killed before they have consumed appreciable resources. Resource reallocation will therefore lead to what Hurst (1991) called early male-killing.

Late male-killers

Few examples of late male-killers exist. Confirmed instances are confined to mosquitoes, of which over two dozen species are known to be infected with male-killing Microsporidia. Typically, fourth instar male larvae die. Microsporidia are transmitted to other hosts when spores are released from dead male larvae and are ingested by other larvae, either directly, or indirectly via a copepod intermediary. In addition, ingestion may result from host larval cannibalism (Bechel & Sweeney, 1990). Newly infected larvae develop normally, the symbionts initially invading epithelial cells of the gastric caeca from where they invade oenocytes. Neither female nor male hosts appear to be adversely affected by these novel infections, and females transmit the microsporidian to eggs. The males in this following generation may be killed, while females continue to transmit the symbionts vertically. However, infection by microsporidians does not always follow this path. Some microsporidians cause death in both males and females, while others kill neither.

These cases beg several questions. How do the microsporidians kill their hosts? How do some selectively kill male rather than female hosts? Why are males killed precisely in the fourth larval instar? What is the reason for the variation in the strategies employed by different microsporidians, some being pathogenic to both sexes, some just to males and some to neither sex? Not all of these questions have clear answers. In particular, the methods by which microsporidians ascertain the sex of their host, and the way they kill hosts, are unknown.

Hurst (1991) argued that causing death in the fourth larval instar is adaptive for the male-killer. Suggesting, justifiably, that horizontal transmission needs to occur in water, and postulating that the pupal case, the last aquatic stage of the life-cycle, might bar symbiont release, he deduced that causing host death in the final larval instar, but not before, would maximise the number of microsporidian spores released into the water.

The variability in strategies employed by different microsporidians may result from the relative likelihood of vertical and horizontal transmission in particular ecological situations (Hurst, 1991). If copepods are common, horizontal transmission will be efficient and lethality of both host sexes might be expected. However, if vertical transmission is efficient and horizontal

transmission inefficient because copepods are scarce, male-killing would be the most advantageous strategy. Why some microsporidians are benign to both sexes remains unclear, although it is possible that such a strategy would be beneficial if vertical transmission via eggs in females was coupled with some degree of sexual transmission from males during copulation (Hurst et al., 1997a).

Early male-killing

Early male-killing has been recorded from a diverse array of insect hosts, and is caused by a diverse array of bacteria, including *Spiroplasma* (Mollicutes), *Rickettsia*, *Wolbachia* (Rickettsiaceae), a *Blattabacterium* relative (Flavobacteria) and *Arsenophonus nasoniae* (Enterobacteriaceae) (Table 1). The diversity of male-killing agents shows that early male-killing has evolved independently many times. Two deductions follow: first, many different types of insect have genetic systems and ecologies that are liable to invasion by male-killers, and second, many different micro-organisms have the capacity to recognise and differentially kill male hosts.

Known cases of early male-killing contrast with those of late male-killing largely through the absence of significant horizontal transmission. In the absence of such transmission leading to regular new infection of uninfected hosts, other factors have to be invoked to balance both the loss of male progeny and the reversion to uninfected status of some females due to the imperfect vertical transmission of the symbiont. While it is possible that avoidance of inbreeding provides such an advantage, the inbreeding depression suffered by non-infecteds must be high to provide sufficient inbreeding avoidance advantage to infecteds. The same may be said for resource reallocation. However, behavioural traits and the ecologies of some host groups may provide a context in which high resource benefits are obtained by daughters of infected females, specifically as a result of the death of males. Identified advantages result from reductions in competition for some limited resource, from the reallocation of resources directly provided to progeny by the parents, usually the mother, or from the reduction in the mortality that falls upon the progeny of uninfected females due to the cannibalistic habits of clutch mates.

In the context of advantages to male-killing through resource reallocation, the resources made available to females from the death of males must become preferentially available to infecteds compared to uninfecteds. This will generally be the case when male and female progeny from one mother are found in close proximity. It is this type of limitation which means that the distribution of male-killers is unlikely to be random in the invertebrates. Groups of species with certain behavioural or ecological similarities will be prone to early male-killer infection, while other groups lacking such characteristics will be relatively immune to these male-killers simply because there will be insufficient fitness compensation from male-killing to allow for the invasion or evolution of this strategy.

A non-random pattern of male-killer distribution within the invertebrates has been observed (Majerus & Hurst, 1996). Hot-spots for male-killing are known in the milkweed bugs (Hemiptera), nymphalid butterflies, particularly of the genus *Acraea*, and the ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). The latter group has been most extensively studied, and has been proposed as a model system for the study of many aspects of early male-killing (Majerus & Hurst, 1997).

The diversity of male-killers in the Coccinellidae

Strongly female-biased sex ratios produced by some female *Adalia bipunctata* were first reported by Lusia (1947). The female-biased sex ratio was maternally inherited. Subsequently, maternally inherited all female broods, curable with antibiotics administered in to adult females in sugar syrup (Fig. 2), have been found in a number of coccinellid beetles (Table 3). In each case, the female-bias is associated with half egg hatch-rate, suggesting that the primary sex ratio is normal, but that the secondary sex ratio is distorted because male embryos die before hatching.

Working with English stocks of *A. bipunctata* showing the female-biased trait, Hurst et al. (1992) showed that the trait was curable with antibiotics, suggesting a bacterium was involved. Light and electron microscopy of hemocytes revealed a bacterium

in the cytoplasm of females with the sex ratio trait (Fig. 3), but not in those producing a normal sex ratio (Hurst et al., 1996). Using general bacterial specific primers, sequence analysis of the 16S rDNA gene showed the male-killer to be a *Rickettsia*-like bacterium, with close homology to the pathogens that produce murine typhus and cattle scrub fever (Werren et al., 1994).

Samples of *A. bipunctata* from other countries have shown that male-killing is widely distributed in this species. However, molecular genetic analysis has shown that the causal agent of male-killing varies. To date, three other bacteria, a *Spiroplasma* (Hurst et al., 1999b) and two strains of *Wolbachia* (Hurst et al., 1999a) have been identified. The *Rickettsia* appears to occur on its own in Britain. However, in other localities different male-killers co-exist, all four sometimes being present together. Indeed, from one small sample (36 matrilines) from Moscow, all four male-killers were recovered (Majerus et al., in prep.). Theoretical models of the evolution of male-killing suggest that two or more male-killers cannot coexist in a single host population at equilibrium, except in the presence of male-killer suppressors, and even then, the parameter space for coexistence is severely limited (Randerson et al., in press). The finding of four male-killers in a single population, and the wide geographical distribution of the male-killers in question (Hurst et al., 1999a,b) therefore suggest that the assumptions upon which these models are based are inapplicable to the coccinellid case.

Presence of male-killing bacteria has been demonstrated in eight other coccinellid beetles and there is some evidence to suggest their presence in two more (Majerus & Hurst, 1997; Hurst et al., 1997a,b, 1999c; Majerus & Majerus, in press). The bacteria that have been identified are taxonomically diverse (Table 3). Given the still small number of species of coccinellid in which male-killing has been sought and the even smaller number in which the male-killers have been identified, it is unlikely that the full taxonomic diversity of male-killers in this family has yet been revealed.

Evidence of resource reallocation

The commonness of male-killers in coccinellids is not surprising if the behaviour and ecology of these beetles are considered. All coccinellids in which male-killers have been found, are aphidophagous, oviposit in clutches and exhibit neonate larval consumption of sibling eggs. These habits provide the potential for high fitness compensation to accrue from male-killing.

Most work showing a resource advantage to male-killing has involved *A. bipunctata* infected with a *Rickettsia*. Studies of the foraging behaviour of larvae have shown that the mortality rate of neonates due to starvation is high (Wratten, 1976). This high mortality results from the short time that neonate larvae have to find prey before starvation, and their low success rate in capturing aphids encountered. Although one might imagine selection would favour longer development in a larger egg, so that neonate larvae were better equipped to capture prey, the cannibalism by neonate larvae clutch-mates precludes this, as late hatchers are often killed and consumed by early hatching larvae. The habit of consuming unhatched eggs in their clutch before dispersing is at the centre of the resource reallocation in coccinellids. The hatch-rate of egg clutches laid by females not infected with male-killers is typically around 90%. This compares to hatch-rates below 50% in clutches from infected females. Thus, in infected clutches, neonate larvae which will be predominantly, or exclusively, female, will have, on average, one male-killed egg to consume (Fig. 4), compared to an average of about 0.1 unhatched eggs available to neonate larvae from uninfected clutches. The additional resources gained by eating a single egg allow neonate larvae to survive half as long again as those denied such a meal (Majerus, 1994). The longer survival time, and larger size of dispersing larvae from a male-killed clutch leads to a greater search area, more rapid first instar larval development and higher likelihood of survival to first ecdysis, particularly at low aphid densities (Majerus, 1994).

Hurst et al. (1992) suggested that male-killing may provide a second advantage to infected females in early development, by reducing the probability of female embryos being cannibalised by clutch mates. The egg hatch rate of uninfected coccinellids is rarely 100%. Unhatched eggs are characteristically of two types, infertile eggs, and those that show signs of embryonic development but fail to hatch. Of the latter type, some die during embryonic development from unknown cause, while others are killed and

eaten by siblings. Removal of larvae from egg clutches as they hatch, thus preventing sibling egg cannibalism, leads to a significant increase in hatch-rates of uninfected clutches, but not of infected clutches (Majerus, 1994). The deduction is that a significantly greater proportion of females die due to sibling cannibalism in uninfected than in infected clutches. This is intuitively sensible for male-killing should reduce the number of early hatching larvae, the potential cannibalisers, and the proportion of females amongst the unhatched eggs of a clutch over the hatching period (Hurst et al., 1992).

In aphidophagous coccinellids, the pathway of resource reallocation from infected, and thus killed males, predominantly to infected females, is obvious and easily envisaged. In other cases of early male-killing, the advantage accruing from the death of males is less clear. Circumstantial evidence, emanating from ecological considerations, exists for a resource advantage to male-killing in some other species. In the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, additional resources obtained through the consumption of male-killed eggs may give neonate larvae more time to find suitable seed pods of their foodplant (Ralph, 1977). In *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of blow fly puparia, and *Caraphractus cinctus* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of water beetles, reduction in competition between siblings within single hosts, as a result of male death, may reduce mortality of remaining females and surviving females may be larger and more fecund (Jackson, 1958; Skinner, 1985). In *Ips latidens* (Coleoptera: Scolytidae), females lay eggs in a tunnel system, interactions between young larvae being predominantly between siblings. Observations of high mortality and cannibalism suggest competition for the phloem upon which the larvae feed (Miller & Borden, 1985). Male-killing is thus likely to reduce local larval density and so competition for, and cannibalism of, infected females. In *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae), competition among dispersing neonate larvae for spin up sites, which are limited, leads to high first instar larval mortality (MacLellan, 1973). Again, the reduction in density resulting from male-killing may lead to increased survival of infected compared to uninfected females. Empirical evidence is needed to establish increased fitness of infected females in all of these instances. In other species shown or thought to bear male-killing symbionts, the likelihood of a resource advantage accruing from male-killing has either not been ascertained or is deemed low from ecological considerations.

Male-killing *Wolbachia* in butterflies of the genus *Acraea*

The nymphalid butterfly *Acraea encedon* has long been known to produce biased sex ratios. As early as 1914, Poulton reported that some females produce only female progeny. The sex ratio trait is inherited maternally (Owen, 1970). In the Lepidoptera, females are the heterogametic sex. Thus, maternally inherited traits may be a consequence of genes on the W chromosomes or of mitochondrial genes or of inherited endosymbionts. Indeed, all female broods in *A. encedon* were initially ascribed to a driving W chromosome which distorted the primary sex ratio because all female broods produced similar numbers of progeny as normal broods. However, given that survival of laboratory bred butterfly larvae is frequently density dependent, this reasoning was potentially flawed, and the case was re-examined (Jiggins et al., 1999).

Working initially with samples collected on the Ugandan shores of Lake Victoria, egg hatch rates, and offspring sex ratios were obtained from 35 females. Of these only five produced both sons and daughters, the other 30 producing just daughters. In none of the all female families were egg hatch-rates over 50%, while in normal families hatch-rates up to 100% were recorded, leading to the suspicion that the trait was due to a male-killer (Jiggins et al., 1998). This was confirmed by feeding larvae from all female broods on leaves dipped in antibiotics, whereupon the resulting adults produced both male and female progeny. Molecular genetic analysis then revealed the presence of a *Wolbachia* (Hurst et al., 1999a).

The finding of another male-killing *Wolbachia*, in addition to those in *A. bipunctata*, is significant for three reasons. First, it shows that male-killing *Wolbachia* are not restricted to a single group, the coccinellids, which, due to their specific ecology, are particularly prone to male-killers. Second, it reinforces the query

raised over estimates of the proportion of insect species that are infected by *Wolbachia* obtained from surveys involving a small number of individuals of a potential host species (Hurst et al. 1999a). Third, it shows that not all male-killing endosymbionts detect that they are in males by identifying a region of the Y chromosome, for while males are heterogametic in *A. bipunctata*, it is the females that are heterogametic in *A. encedon*.

Several other species of *Acraea* have been shown to harbour male-killing *Wolbachia*. *A. encedana* a sibling species to *A. encedon*, harbours a *Wolbachia* identical to, or very similar to that in *A. encedon* with respect to the *wsp* gene (Jiggins et al., unpublished data), while *A. eponina* bears a less closely similar *Wolbachia* which distorts the sex ratio towards females (Jiggins, unpublished data). *A. acerata*, *A. pharsalus* and *A. alcinoe*, also harbour *Wolbachias*, but the phenotypic effects have not been ascertained (Jiggins, unpublished data).

The male-killers in *A. encedon* and *A. encedana* show some very interesting features. In addition to the obvious similarities: both bear very similar maternally inherited, antibiotic sensitive *Wolbachia* that kill male host embryos before they hatch from eggs, the *Wolbachia* have high vertical transmission (95% or greater) and occur at very high prevalences (Chanter & Owen, 1972; Gordon, 1984; Jiggins et al., 1998, in press), at least in some populations. These features combined lead to very female-biased population sex ratios.

On the basis of estimated levels of prevalence and vertical transmission, and assuming the male-killer was at equilibrium, Jiggins et al. (in prep. a) estimated the life-time reproductive output of infected relative to uninfected females for *A. encedana*. The minimum value estimate (within 95% confidence limits) was 1.55. This is extraordinarily high (cf. a mean value of 1.16 for an English *A. bipunctata* population infected with *Rickettsia*), particularly as factors involved in fitness compensation have not been demonstrated. One possible explanation for this high value is that the assumption that the population is at equilibrium is not valid, although there is evidence that some populations of *A. encedon*, and probably *A. encedana* have been strongly female-biased for many generations (Owen & Chanter, 1969; Owen et al., 1994; Gordon, 1984). Jiggins et al. (unpublished data) discuss factors that could lead to the high fitness compensation necessary to account for observed data in *A. encedon* and *A. encedana*. They note that eggs are laid in large batches, that neonate larvae consume some unhatched eggs, and larvae feed aggregatively for the first four instars. Resource reallocation is thus possible, both through sibling egg consumption and reduced competition for food. However, in neither species is there evidence that larval foodplant is strongly limiting, and it is difficult to conceive that resource reallocation alone could be responsible for the high prevalence level of the *Wolbachia* in the light of the incomplete vertical transmission. Recognising this, they speculate that a direct benefit of infection on female fecundity may be responsible for the high reproductive success of infecteds. This possibility needs testing, for if ascertained, it would represent the first case of a dual parasitic/beneficial effect for an inherited bacterium.

Consequences of population sex ratio distortion

Male-killing bacteria produce highly female-biased sex ratios in some host populations. In both *A. bipunctata* and *H. axyridis*, populations in which over two-thirds are female have been recorded (Zakharov et al., 1996; Majerus et al., 1998). More spectacularly, in both *A. encedon* and *A. encedana*, populations in which females comprise over 95% have been recorded (Jiggins et al., 1998, in press). Strong biases in population sex ratios might influence which sex competes for mates. Usually, as males have the potential to reproduce faster than females, males compete with one another for access to females while females choose between males. However, in populations where the presence of a sex ratio distorter, such as a male-killer, reduces the proportion of males in the population, both the intensity of male competition and the opportunity of female choice would be reduced. Indeed, if the sex ratio is sufficiently distorted towards females, so that males were limiting, the respective roles of the sexes could be reversed (Trivers, 1972).

In *A. bipunctata* and *H. axyridis*, as a result of the potentially long reproductive period, and the high levels of promiscuity of which males are capable (Majerus, 1994), it is likely that females remain the limiting sex, even in quite strongly female-biased populations. However, in both *A. bipunctata* and *H.*

axyridis a variety of mate choice patterns, including weak male choice of females, have been recorded (Osawa & Nishida, 1992; Majerus, 1998).

Studies of *A. encedon*, showing that in highly female-biased populations many females die without mating (e.g. Owen and Chanter, 1969), suggest that here males are limiting. Recent studies of the behaviour of butterflies in some highly female-biased populations have led to observations of sex role reversed behaviours. The most striking of these is of female lekking behaviour. Male leks, resource lacking arenas where males congregate and compete for mates, are known in many taxa. In highly female-biased populations of *A. encedon* and *A. encedana*, it is virgin females that congregate at resource lacking sites (Fig. 5; Jiggins et al., in press). Females within these arenas appear to compete for matings. Furthermore, one explanation of data showing a higher level of virginity among *Wolbachia*-infected than uninfected females (Jiggins et al., in press) is that males choose between females on the basis of infection status. Such a behaviour would obviously be adaptive for males. Here then, invasion and spread of a male-killer has reversed the general pattern of mate competition, producing a substantial change in the mating system.

One unexpected corollary in species with high prevalence male-killers, is that selection could favour full sibling male mating preferences, because for the majority of males, one group of females that they may be sure are not infected with a male-killer would be their sisters.

Male-killer suppressers

On the basis of sex ratio theory, in the absence of local mate competition, biases in the sex ratio towards one sex or the other should result in selection favouring the rarer sex (Fisher, 1930; Hamilton, 1967). Male-killing biases population sex ratios away from parity, in some cases severely so. In such populations, selection for male production should be intense, both as a result of the advantage of producing the rarer sex, and as a result of selection acting upon the nuclear genome to resist the mortality imposed upon it by the cytoplasmic genome via male-killers. Female-biased population sex ratios, as a result of invasion by male-killers, may lead to the evolution of either nuclear suppressers of male-killers, or of mechanisms which bias the sex ratio towards males. The latter could occur by distortion of the primary sex ratio or by distortion of the secondary sex ratio towards males, as long as the loss of female offspring were off-set by increased survival chances for male progeny. Theoretically, this is plausible only when biased male production is strongly beneficial due to highly female-biased population sex ratios. There is some evidence of male biases in some families of *A. encedon* (Owen & Chanter, 1969), which would fit this criterion.

If nuclear suppressers of male-killers were to evolve, they could act in various ways. They might kill the male-killer, or reduce its vertical transmission efficiency by suppressing the replication rate of the symbiont, or they might prevent the symbiont from killing males, either by blocking male host recognition by the symbiont, or by blocking the act of killing males.

Recent work suggests that in one species at least, a male-killing suppresser has evolved. The coccinellid *Cheilomenes sexmaculatus* harbours a male-killer. Two out of 15 wild caught Japanese females produced significantly female-biased progeny. Of ten F_1 females from these lines, crossed to F_1 males from normal lines, only three produced significant female biases. In one, virtually all progeny were female, while in the others, 2:1 female:male ratios resulted. The other lines produced normal sex ratios (Majerus & Majerus, unpublished data). The three female-biased lines all resulted from matings with males from one family (MF5), while the seven normal families all had male parents from other lines (MF1 or MF8). The hypothesis raised to explain these results was that MF1 and MF8 males were homozygous for a male-killer suppresser. Conversely, MF5 males were of two types, some being homozygous for the non-suppresser allele, while others were heterozygous for the suppresser. In these later males, half the sperm would carry the suppresser and so allow males which inherited the male-killer to survive, while the other sperm would lack the suppresser, so resulting males with the male-killer would die, giving the 2:1 female:male ratio observed.

To test this hypothesis, the males of two of the F_1 families were swapped. The MF5 male parent from the cross producing

only female progeny was swapped with a male from a family producing a normal sex ratio. This procedure resulted in an alteration in progenic sex ratios of both lines. The female which had previously produced only females began to produce sons and daughters in roughly equal numbers. Conversely, the female which had been producing a normal sex ratio, after a short lag, began to produce strongly female-biased progeny (Majerus & Majerus, unpublished data).

The patterns of change in the progenic sex ratios in these lines, and similar results from subsequent crosses, support a single suppresser gene hypothesis. Furthermore, they suggest that the suppresser is a 'rescue' gene, acting by preventing the phenotypic expression of the male-killer, rather than by killing the bacterium or reducing its vertical transmission efficiency.

That the suppresser discovered in *C. sexmaculatus* is a single gene is probably not coincidental. Hurst et al. (1997a), in considering selection against infection, argue that polygenic modifiers that act to delay male death in infecteds would not evolve. Their rationale is based upon the proposition that early death of males is beneficial to female siblings because resources that are made available to the infected female siblings are thus maximised. Thus, a modifier that retarded death of infecteds so that some infected males still die before reproducing while others survived to reproductive age, would not only confer a fitness increase through the survival of some males, but would also lead to reduced kin fitness benefit as a result of the waste of nutrients used by infected males that develop to some extent but die before reproducing.

Conclusion

It is becoming increasingly clear that inherited symbionts occur very commonly in arthropods. Many of these symbionts are beneficial. However, a sizeable proportion are deleterious, and rather than being beneficial to their hosts, they are antagonistic towards some hosts. The existence and common occurrence of such symbionts have three important consequences. First, at the most general level, it is difficult to conceive that a thorough understanding of the overall biology of any arthropod species is achievable without an appreciation of the symbionts it carries, whatever the nature of the symbiont-host interactions. Co-evolutionary pressures, whatever their direction are likely to have considerable impact on both members of an association. In the case of deleterious symbionts it is already apparent that symbionts may fundamentally alter host sex determination and mode of reproduction, may reverse the direction of sexual selection, or cause the evolution of symbiont suppresser and rescue genes. Other evolutionary consequences of the invasion of deleterious symbionts certainly await discovery.

Second, the spread of any maternally inherited symbiont through a host population will cause an immediate decrease in the diversity of mitochondrial DNA (mtDNA) in that population. As both symbiont and mitochondria are cytoplasmically inherited, they are effectively linked. The spread of a symbiont from one, or a small number, of initially infected host females, therefore, pulls the mitotypes of these founders through the population. Effects will be seen for all deleterious symbionts, although the effects in the case of male-killers may be greater than for other systems, due to the usually low prevalence of male-killers, and the constant recruitment of uninfecteds from infecteds due to imperfect vertical transmission (Johnstone & Hurst, 1996; Majerus & Hurst, 1997). It is thought unlikely that selective sweeps imposed on mtDNA by the spread of symbionts will impact significantly the adaptive evolution of hosts (but see Majerus & Hurst, 1997). However, for evolutionary biologists who use mtDNA as a tool to study gene-flow, population size or population history, the effects of symbiont spread on mtDNA diversity mean that in such species, mtDNA cannot be used as a neutral marker. Lack of mtDNA diversity in a population need not reflect low effective population size or genetic bottlenecks. It may simply reflect past or current presence of an inherited symbiont.

Third, CI and sex ratio distorting endosymbionts might have considerable applications in pest control (reviewed by Siskins et al., 1997). Several strategies of use can be envisaged. First, endosymbionts that bias biological control agents, such as parasitoid wasps or aphidophagous coccinellids, in favour of females, may be used to increase the impact of the control agent, or reduce costs of a control program. In the case of parasitoid

Hymenoptera, only females have a negative effect on the host. Thus a heritable symbiont that caused only females to be produced would be commercially beneficial. Benefits may also arise from male-killers in coccinellids if the presence of the symbiont increased the density of females in the population, even if this increase were essentially at the expense of males. This is because the food intake of female coccinellids throughout their lives is significantly greater than that of males.

An alternative would be to employ CI agents, by mass release, to cause sterility in recipient populations, much as mass releases of males sterilised by radiation were used to control *Cochliomyia hominivorax* in several countries (e.g. Krasfur et al., 1987). Such a methodology has already been used in pilot trials with various targets and varying degrees of success (Siskins et al., 1997).

A third strategy would be to employ symbionts as gene transport vectors. The basis of this idea is that if a novel symbiont, bearing 'useful' genes, were likely to spread to high prevalence in a target population, as might be expected of a CI agent, the useful genes would be carried through the population from a relatively small initial release. A useful gene in this context would have to fulfil two critical requirements. First, it would have to be transferable into an inherited symbiont and be vertically transmitted thereafter with almost perfect efficiency. Second it would need to be expressed on the genetic background of the pest species, i.e. it would have to be a dominant gene. Genes fulfilling these requirements and occurring naturally in inherited symbionts are improbable. Therefore, if this idea is to become a reality, it will require the use of recombinant DNA technology to produce transgenic insect/symbiont strains.

The study of deleterious symbionts of arthropods has blossomed over the last decade, largely through molecular genetic methodologies. One group of symbionts, the *Wolbachias* have received particular attention because of the variety of ways that members of this group manipulate host reproduction. The recent discovery of male-killing *Wolbachias* means that members of this group are known to employ each of the four major types of host manipulation (CI, feminising, PI and male-killing). Current knowledge is that two of these manipulations (CI and PI) are exclusively the province of *Wolbachias*. This may be so, but it is also feasible that the close attention that has been paid to the *Wolbachias*, since the development of *Wolbachia*-specific probes (Rousset et al., 1992), has caused a study bias in favour of this group. Large scale screening of arthropods for other groups of inherited symbionts known to have ultra-selfish behaviour would certainly be of value, particularly if allied to studies of the phenotypic effects of symbionts thus detected. That said, there can be little doubt that *Wolbachia* is an extraordinarily adaptable

heritable symbiont, particularly as the recent discovery of apparently beneficial *Wolbachias* in nematode worms (Bandi et al., 1998) has broadened both their known host range and their effects (Rigaud, 1999). It can adapt to and exploit taxonomically diverse hosts and gear its manipulation to the particularities of the host's life-history or genetic systems. The question arises, assuming that *Wolbachia* really do have a wider range of host manipulations than other symbiotic groups, what is extraordinary about *Wolbachia*? Does it possess some special genetic or reproductive feature which make it inherently plastic and adaptable? Is it simply more prevalent and capable of horizontal transfer, so that opportunities for successful host invasion and manipulation occur more frequently than for other groups? These possibilities need to be addressed.

During the period of rapidly increasing knowledge of deleterious symbionts, theoretical considerations have also advanced considerably. The under-lying causes of various manipulations, the population dynamics of symbiont-host interactions and the evolutionary reaction of hosts to symbionts have all been considered. Many of the theoretical predictions of these systems await testing. Interestingly, as empirical evidence bearing on theoretical models accumulates, it appears that many of the basic assumptions of generalised models are compromised for specific cases. For example, in respect of male-killers in coccinellids, models have assumed that resource benefits accruing to surviving members of a male-killed clutch would be averaged out over the survivors. Recent work has shown this not to be the case, with considerable variance in the survival advantage gained by survivors being observed (Fakhouri & Majerus, unpublished data). Models have also predicted that two or more male-killers would only be able to coexist within one population in a very restricted set of circumstances (Randerson et al., in press), yet one population has been shown to contain four different male-killers. Here the problem may be simply that the model assumes that nuclear suppressors would kill or reduce the vertical transmission of the male-killer. It does not consider a suppressor which prevents the symbiont killing males. Similar contradictions between theoretical predictions and empirical observations exist for other strategies. It is to be hoped that models will improve in the light of empirical evidence. Yet it is possible that the dynamics of many host-symbiont interactions and the co-evolutionary arms races that they produce, depend so crucially on the precise genetic and ecological details of each case that generalised models have little value for specific cases. Thierry Rigaud's (1997) questioning of whether a generalised explanation of the distributions and prevalence levels of feminizers may be applicable to all deleterious inherited endosymbiont strategies.