
NOTA**DETECCIÓN DE LA BACTERIA ENDOSIMBIONTE *Wolbachia* EN LA ARAÑA LOBO *Allocosa alticeps* Y POSIBLES EFECTOS SOBRE LA PROPORCIÓN SEXUAL****Silvy Lurette^{1,2*}, Anita Aisenberg¹, Fernando G. Costa¹, José R. Sotelo-Silveira³ y Leticia Bidegaray-Batista¹**

¹ Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución, IIBCE, Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay.

² Consejo de Educación Secundaria, Montevideo, Uruguay.

³ Departamento de Genómica, IIBCE, Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay.

* Autor para correspondencia: Silvy Lurette - silvylurette@gmail.com.uy

RESUMEN

Se comunica por primera vez la detección de *Wolbachia* en el 48% de las hembras y 54% de los machos de *Allocosa alticeps* de la costa de Marindia y Lomas de Solymar, Departamento de Canelones, Uruguay. La presencia de este endosimbionte podría explicar el sesgo sexual hacia las hembras en esta especie.

Palabras clave: endosimbionte, *Wolbachia*, reproducción, sesgo en la proporción sexual.

ABSTRACT

Detection of *Wolbachia* endosymbiont bacteria in the wolf spider *Allocosa alticeps* and possible effects on the sex-ratio. We report for the first time the detection of *Wolbachia* in 48% of females and 54% of males of *Allocosa alticeps* from the coastline of Marindia and Solymar, Canelones province, Uruguay. The presence of this endosymbiont could explain the female-biased sex ratio in this wolf spider.

Keywords: endosymbiont, *Wolbachia*, reproduction, sex-ratio bias.

La proporción sexual primaria es la cantidad de machos y hembras que nacen en una población determinada, que en general presenta una relación 1:1 (Trivers & Willard, 1973). Sin embargo, esta proporción sexual puede variar por eventos que ocurran antes, durante o después de la fecundación, o incluso después del nacimiento. Un desvío en esta proporción sexual puede implicar cambios importantes en las estrategias sexuales de una especie o una población (Hamilton, 1967). Un sesgo en la proporción sexual a favor de las hembras convertiría a los machos en un recurso escaso, lo que podría llevar a que sean éstos los que elijan pareja, o que las parejas se formen por elección mutua llevando a comportamientos sexuales distintos a los típicos esperados (Aisenberg, 2014).

En artrópodos se ha detectado la presencia de bacterias endosimbiontes como *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Cardinium*, *Spiroplasma* y *Arsenophonus* (Duron *et al.*, 2008). Éstas son capaces de manipular la reproducción de su hospedador favoreciendo la reproducción y supervivencia de hembras infectadas, para aumentar así su propia transmisión (Charlat *et al.*, 2003; Duron *et al.*, 2008; Goodacre & Martin, 2013). Son heredadas por vía materna y se alojan principalmente en el citoplasma de las células germinales, viviendo de manera obligada en el ambiente celular (Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008). Los diferentes mecanismos que estas bacterias utilizan para alterar la reproducción han sido mayormente estudiados en *Wolbachia* (Rickettsiales, Anaplasmataceae). Éstos causan distintas modificaciones en el hospedador y su descendencia, tales como la muerte o feminización de los machos, inducción de la partenogénesis femenina, e incompatibilidad citoplasmática. Los tres primeros mecanismos producen sesgo en la proporción sexual favoreciendo a las hembras (Goodacre & Martin, 2013; Werren *et al.*, 2008), mientras que el cuarto hace inviable la descendencia entre machos infectados con hembras no infectadas, o hembras infectadas con otra cepa de la bacteria.

Estudios realizados en los últimos catorce años, indican la presencia de *Wolbachia* en diversas especies de arañas de distintas familias de Araneomorfas, incluyendo las arañas lobo (Goodacre & Martin, 2013). En algunos casos, también se han estudiado sus efectos en la reproducción de poblaciones hospedadoras. En las arañas *Oedothorax gibbosus* y *Pityohyphantes phrygianus* (Linyphiidae), se ha comprobado que el desvío en la proporción sexual a favor de las hembras está relacionado con la presencia de *Wolbachia* (Gunnarsson *et al.*, 2009; Vanthournout *et al.*, 2011).

Allocosa brasiliensis (Petrunkevitch, 1910) y *A. alticeps* (Mello-Leitão, 1944) (Araneae, Lycosidae) presentan distribución simpátrica y sincrónica (Costa *et al.*, 2006). Habitan arenales costeros de Argentina, Brasil y Uruguay (Fig. 1). Construyen cuevas bajo la arena, donde permanecen resguardadas durante el día y en los meses fríos, volviéndose activas durante las noches de verano (Costa, 1995; Costa *et al.*, 2006). Ambas especies presentan inversión de los roles sexuales y de dimorfismo sexual respecto a los roles generalizados en arañas (Aisenberg *et al.*, 2007; Aisenberg & Costa, 2008). Es decir, los machos son más grandes que las hembras, y son las hembras las que buscan y cortejan a los machos. Por otro lado, estudios previos de laboratorio y campo con individuos de Marindia, Canelones, sugieren un fuerte sesgo hacia las hembras en *A. alticeps* pero no así en *A. brasiliensis* (Aisenberg & Costa, 2008).

En este contexto, nos planteamos detectar la presencia de *Wolbachia* en *A. alticeps* y *A. brasiliensis* bajo la hipótesis de que el endosimbionte pueda explicar el sesgo a favor de las hembras en la primera especie. Para esto, se capturaron y analizaron hembras y machos adultos de *A. alticeps* y *A. brasiliensis* en las localidades de Marindia (11 hembras y 6 machos de *A. alticeps* y 10 hembras y 3 machos de *A. brasiliensis*) y Solymar (12 hembras y 5 machos de *A. alticeps* y 9 hembras y 4 machos de *A. brasiliensis*), Departamento de Canelones, Uruguay. Se realizaron extracciones de ADN a partir del abdomen de la araña con el kit de extracción PureLink Genomic DNA (Invitrogen). Para descartar potenciales contaminaciones del contenido gastrointestinal, también se realizaron extracciones a partir de dos patas para cinco ejemplares. Todas las extracciones fueron cuantificadas en el espectrofotómetro NanoDrop1000. Se amplificaron por PCR fragmentos de los genes *wsp* (que codifican para una proteína de pared celular) y 16SrRNA (que transcriben la subunidad ribosomal 16S). Los pares



Fig. 1. Izquierda: playa de Solymar (arriba) y Marindia (abajo); derecha: macho de *Allocosa brasiliensis* (arriba), foto M. Casacuberta; y de *Allocosa alticeps* (abajo). Foto: Á. Laborda.

de *primers* específicos utilizados para detectar *Wolbachia* fueron: [*wsp*] WSP81F y WSP691R (Jeyaprakash & Hoy, 2000) y [16SrRNA] 16Swolb99F y 16Swolb994R (O'Neill *et al.*, 1992). En cada amplificación de PCR (*wsp* y 16SrRNA) se incluyó como control positivo una muestra obtenida en estudios preliminares para la cual se obtuvo amplificación para los dos genes. Adicionalmente, en las muestras que no se obtuvo producto de PCR, se amplificó un fragmento del gen mitocondrial *cox1* (citocromo oxidasa 1) con los pares de primers C1-J-1490 y C1-N-2198 (Folmer *et al.*, 1994) como control adicional de la calidad del ADN. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para comprobar que los fragmentos amplificados pertenecieran solo a *Wolbachia*, se secuenciaron los productos de PCR de un grupo de muestras. Las secuencias fueron comparadas mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) con la base de datos disponibles en el NCBI para nucleótidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias obtenidas para el 16SrRNA también se compararon y clasificaron utilizando la base datos SILVA (<http://www.arb-silva.se/>) y sus aplicaciones específicas para ARN ribosomal (Quast *et al.*, 2012; Priesse *et al.*, 2012; Yilmaz *et al.*, 2013).

Se identificó por primera vez *Wolbachia* en el 48% de hembras y 54% de los machos de *A. alticeps* de ambas localidades (Fig. 2). Es la primera vez que se reporta la presencia de

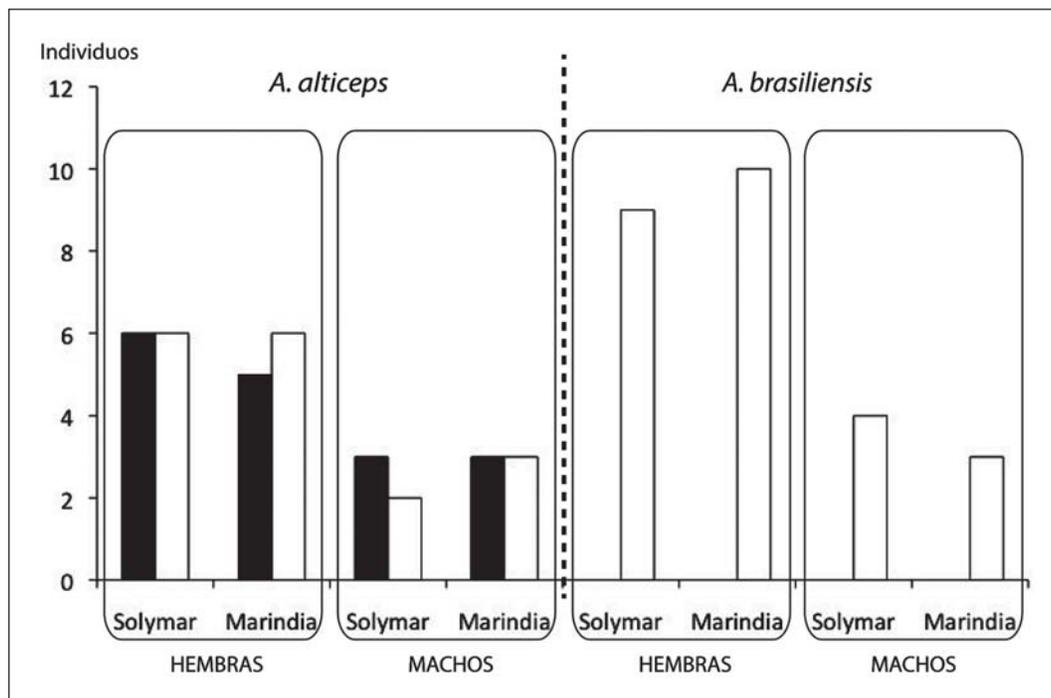


Fig. 2. Número de individuos en los que se detectó (barra negra) y en los que no se detectó *Wolbachia* (barra blanca); discriminados por localidad y sexo para *Allocosa alticeps* y *Allocosa brasiliensis*.

Wolbachia en esta especie. No se detectó esta endobacteria ni en machos ni en hembras de *A. brasiliensis*. Se obtuvieron secuencias de 552 pares de bases (pb) para el gen *wsp* y de 852 pb para el gen *16SrRNA* (GenBank: KU041136 y KU041135, respectivamente). Las secuencias para el *16SrRNA* y para *wsp* fueron idénticas dentro de cada uno de los genes. Las comparaciones con la base de datos del NCBI confirmaron que la endobacteria encontrada es *Wolbachia*; con porcentajes de identidad >96% (*e-value* 0) para *wsp*, y del 99% (*e-value* 0) para *16SrRNA*. Los resultados de clasificación obtenidos con la base de datos SILVA confirman su identidad con un porcentaje de identidad de 98%.

La detección de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en *A. alticeps* y su prevalencia en poblaciones naturales, sumado a los resultados de estudios previos de laboratorio y campo donde se reportó un fuerte sesgo hacia las hembras en esta especie (Aisenberg & Costa, 2008), sugieren que esta bacteria endosimbionte podría ser la causante del sesgo encontrado. Considerando que se encontraron resultados similares en las dos localidades muestreadas se descarta que se trate de una infección puntual. Por otro lado, no se detectó *Wolbachia* en *A. brasiliensis*, que no presentó sesgo en su proporción sexual ni en el campo ni en el laboratorio. Estas evidencias, si bien indirectas, apoyan la hipótesis de la relación causa-efecto entre la presencia de *Wolbachia* y el

sesgo hacia las hembras en *A. alticeps*. Futuros estudios utilizando antibióticos que anulen la acción de la bacteria y registrando la proporción sexual de la descendencia de los individuos tratados, podrán confirmar la relación entre la presencia de *Wolbachia* y el sesgo en la proporción sexual hacia las hembras. También será necesario identificar otras bacterias endosimbiontes que pudieran estar presentes ya que en especies de arañas linífidas, se ha encontrado sesgo sexual aún en ausencia de *Wolbachia* (Vanthournout & Hendrickx, 2015). Esto sugiere que otros factores podrían estar incidiendo, así como co-infecciones de varias endobacterias.

Por otro lado, a partir de nuestros resultados surgen nuevas interrogantes sobre la relación entre la presencia de *Wolbachia* y la inversión de roles sexuales descrita en esta especie. Esta relación ya se ha demostrado que existe en la mariposa *Acraea encedon* (Jiggins *et al.*, 2000). También sería interesante determinar y estudiar el mecanismo que utiliza *Wolbachia* para sesgar la proporción sexual hacia las hembras en *A. alticeps*. Sin dudas, este hallazgo abre nuevas líneas de investigación para estudiar la relación entre la presencia de este endosimbionte y los caracteres que estén bajo selección sexual, lo que permitirá entender mejor las causas que llevaron al extraordinario comportamiento que presentan estas arañas.

Agradecemos a A. Albín, F. Bollatti, M. Carballo, F. Cargnelutti, A. Carlozzi, M. De León, K. Pérez, R. Postiglioni, E. Stanley, por colaborar en las salidas de campo. A Á. Laborda y M. Casacuberta por proporcionarnos las fotografías. También agradecemos a Fernando Pérez-Miles y un revisor anónimo por sus comentarios que mejoraron la calidad del manuscrito. Esta investigación fue financiada por el programa Acortando Distancias 2014 (ANII y Prociencia-ANEP), y el proyecto Fondo Clemente Estable FCE_3_2013_1_100607.

REFERENCIAS

- Aisenberg A. 2014. Adventurous females and demanding males: sex role reversal in a neotropical spider. Pp. 163-182. *En*: Macedo R. H. & Machado G. (Eds.). *Sexual Selection: Perspectives and Models from the Neotropics*. Academic Press, Londres.
- Aisenberg A. & Costa F. G. 2008. Reproductive isolation and sex-rol reversal in two sympatric sand-dwelling wolf spiders of de genus *Allocosa*. *Canadian Journal of Zoology*, 86: 648-658.
- Aisenberg A., Viera C. & Costa F. G. 2007. Daring females, devoted males, and reversed sexual size dimorphism in the sand-dwelling spider *Allocosa brasiliensis* (Araneae, Lycosidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 29-35.
- Charlat S., Hurst G. D. D. & Mercot H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetic*, 19: 217-223.
- Costa F. G. 1995. Ecología y actividad diaria de las arañas de la arena *Allocosa* spp. (Araneae, Lycosidae) en Marindia, localidad costera del sur del Uruguay. *Revista Brasileira de Biología*, 55: 457-466.
- Costa F. G., Simó M. & Aisenberg A. 2006. Composición y ecología de la fauna epígea de Marindia (Canelones, Uruguay) con especial énfasis en las arañas: un estudio de dos años con trampas de intercepción. Pp 427-436. *En*: Menafrá R., Rodríguez-Gallego L., Scarabino F. & Conde D. (Eds.) *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Vida Silvestre, Montevideo.

- Duron O., Bouchon D., Boutin S., Bellamy L., Zhou L., Engelstädter J. & Hurst G. D. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology*, 6: 27.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Goodacre S. & Martin O. 2013. Endosymbiont Infections in Spiders. Pp. 93-105. *En: Nentwig W. (Ed.) Spider Ecophysiology*. Springer, Heidelberg, New York, Dordrecht, London.
- Gunnarsson B., Goodacre S. L. & Hewitt G. M. 2009. Sex ratio, mating behavior and *Wolbachia* infections in a sheet web spider. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 181-186.
- Hamilton W. D. 1967. Extraordinary sex ratios. *Science*, 156: 477-488.
- Jeyaprakash A. & Hoy M. A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9: 393-405.
- Jiggins F. M., Hurst G. D. & Majerus M. E. 2000. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267: 69-73.
- O'Neill S. L., Giordano R., Colbert A. M., Karr T. L. & Robertson H. M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 2699-2702.
- Pruesse E., Peplies J. & Glöckner F. O. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28: 1823-1829.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J. & Glöckner F. O. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41: D590-D596.
- Trivers R. L. & Willard D. E. 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science*, 179: 90-92.
- VanThournout B. & Hendrickx F. 2015. Endosymbiont dominated bacterial communities in a dwarf spider. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0117297
- VanThournout B., Swaegers J. & Hendrickx F. 2011. Spiders do not escape reproductive manipulations by *Wolbachia*. *BMCEvolutionary Biology*, 11: 15.
- Werren J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42: 587-609.
- Werren J. H., Baldo L. & Clark M. E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 741-751.
- Yilmaz P., Parfrey L. W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W. & Glöckner F. O. 2013. The SILVA and "All-species living tree project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42: D643-D648.

Fecha de recepción: 09 de Octubre de 2015.
Fecha de aceptación: 12 de Noviembre de 2015.