

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Theoretical approach to the evolution of aphid
bacterial endosymbionts**

**Aproximación teórica a la evolución de los endosimbiontes
bacterianos de los áfidos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jorge Calle Espinosa

Directores

Francisco Montero Carnerero

Antonio Sánchez Torralba

Juli Peretó Magraner

Madrid



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**Theoretical approach to the evolution of aphid
bacterial endosymbionts**

*Aproximación teórica a la evolución de los
endosimbiontes bacterianos de los áfidos*

Una tesis presentada por **Jorge Calle Espinosa** para el grado de
Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.

Dirigida por:

Francisco Montero Carnerero
Antonio Sánchez Torralba
Juli Peretó Magraner



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20__

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Agradecimientos

Cuando todo lo que juzgues se base en tu propia sabiduría, te decantarás hacia el egoísmo y a desviarte del buen camino.

– Yamamoto Tsunetomo –

Con esta cita quiero comenzar la que, sin duda, se trata de la sección que más complicada me resulta de escribir. Pero, como dice el Hagakure, *si se piensa demasiado se llegan a conclusiones comunes y banales*, por lo que mejor escribiré *mientras respiro siete veces*.

A lo largo de estos últimos años, cada idea planteada, mala o buena, cada palabra escrita o eliminada, cada inspiración y cada bloqueo, me han hecho ver el doctorado como la pesca de un ejemplar digno en un mar aparentemente estéril a estas manos. No sé pescar, pero es imposible no sentirse como el viejo de *El viejo y el mar* cuando se investiga: días de lanzarse al mar para volver más ligero de lo que se partió. Días en los que pescas porque eres pescador, y parece que no sabes ser otra cosa. Días que preceden otros en los que, al fin, tras una pelea demoledora, ganada a fuerza de una voluntad alimentada de fracasos, recuperas un pez cuya carne parece justificar cada momento de escasez. Un pez que, sin embargo, apenas sirve de sustento pues, de vuelta a la costa, nutre al tiburón de la realidad y de las dudas, que conserva su botín aún tras ser abatido.

Así se termina el viaje, con la carcasa que representa tus logros a remolque de un pescador agotado movido por la inercia. Sin embargo, hasta aquí llega el símil, ya que en lugar de las miradas de lástima que uno esperaba encontrar a su vuelta, halla un banquete que complementa cada fragmento de triunfo que te queda, que te recuerda que a pesar de pescar solo, tu fuerza es la de los que te despiden y reciben en tierra.

Por todo esto gracias, Cristina, por darme cada día la serenidad para desahogarme y ser la claridad y la amabilidad que borra las dudas de mi cabeza.

Gracias a mi hermana, a mi madre y a mi padre, por su apoyo constante y sus palabras que, aunque nunca reconoceré como acertadas, acostumbra a ser las que necesito.

Gracias a Mis Basuritas, el círculo interior que ha respetado mis silencios y mis ausencias, y que siempre me da la tranquilidad de saber que hay alguien al otro lado.

Gracias Alberto, por soportar (no existe mejor término) cada gota de frustración que he sentido a lo largo del doctorado.

Gracias Laura, por ser ese algo más que te motiva a ir a trabajar, tan importante cuando la motivación escasea, y por permitirme aprender habilidades que van más allá de las que se presuponen en un científico y que merecen tanto o más reconocimiento.

Gracias Paco, siempre me has apoyado, y no me has juzgado a pesar de los muchos bloqueos mentales sufridos, en particular en esta última etapa. Cada gramo de confianza que me has dado ha sido un kilo menos de carga. Antonio, has sido el estímulo indispensable y la crítica imprescindible que ha llevado esta Tesis a tomar forma. He disfrutado cada segundo de nuestras *excesivas* conversaciones. Pero el pensamiento oriental y el de Nietzsche son filosofía. Juli, tu paciencia conmigo ha sido digna de elogio, no es fácil tratar con testarudos.

Gracias M^a Antonia y Javier, por haber sido referentes de carácter y de pulcritud profesional. M^a Antonia, para mi eres la fuerza a la que todos, hombres y mujeres por igual, debemos aspirar. Javier, para mi encarnas el buen ambiente laboral: profesionalidad, cooperación, buen humor y amabilidad. Espero que se me haya pegado algo de vosotros.

Gracias M^a Luz, por confiar en mis habilidades y darme la primera oportunidad en mi carrera de aprender en un laboratorio de investigación de verdad.

A todos, gracias.

Índice general

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción general	5
1.1. Los insectos como modelo de estudio de la endosimbiosis	5
1.2. Modelos para el estudio del surgimiento y estabilidad de las simbiosis mutualistas	7
1.3. Degradación genómica en endosimbiontes de insectos	11
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Endosimbiontes primarios: modelos de dinámica de poblaciones y productividad	19
3.1. Introducción	19
3.1.1. Desarrollo del bacterioma	20
3.1.2. Regulación del título bacteriano	21
3.1.3. Regulación del metabolismo insecto-endosimbionte	23
3.1.4. Consideraciones finales	24
3.2. Resultados	25
3.2.1. Primeras aproximaciones a un modelo de dinámica de pobla- ciones de los endosimbiontes en el áfido	25

3.2.2.	Modelo con restricción por número de bacteriocitos y desarrollo del bacterioma fijo	29
3.2.3.	Modelo con restricción por volumen y desarrollo del bacterioma fijo	32
3.2.4.	Modelos con reducción en el número de endosimbiontes asociada a la fertilidad del áfido	37
3.2.5.	Sobre el significado de t_c y su impacto en el modelado	49
3.2.6.	Impacto de la fagocitosis de endosimbiontes en la productividad del áfido	51
3.2.7.	Influencia de la tasa de crecimiento y la productividad de los endosimbiontes en la fertilidad del áfido	61
3.3.	Discusión	67
4.	Dinámica de poblaciones y cálculo de probabilidades de fijación en áfidos propagados <i>in vitro</i>	71
4.1.	Introducción	71
4.1.1.	Ciclos de vida	71
4.1.2.	Factores determinantes del polimorfismo en áfidos	74
4.2.	Resultados	76
4.2.1.	Diseño experimental	76
4.2.2.	Modelo de dinámica de poblaciones de áfidos propagados en laboratorio	80
4.2.3.	Cálculo de la probabilidad de fijación de mutaciones que afectan a la fertilidad y/o supervivencia del áfido	91
4.2.4.	Consideraciones en torno al impacto de la dinámica bacteriana en la propagación de mutaciones	103
4.3.	Discusión	111
5.	Algoritmo de simulación de la reducción genómica	115
5.1.	Introducción	115

5.1.1.	Fundamentos del <i>CBM</i>	116
5.1.2.	Refinamientos del <i>CBM</i> básico	117
5.1.3.	Aplicaciones del <i>CBM</i>	118
5.2.	Resultados	120
5.2.1.	Algoritmo de simulación de la reducción genómica	120
5.2.2.	Detalles de la simulación	125
5.2.3.	Características evolutivas del proceso de reducción genómica observado en los endosimbiontes primarios de insectos	127
5.3.	Discusión	134
6.	Discusión general	139
7.	Conclusiones	143
8.	Conclusions	145
9.	Métodos	147
	Bibliografía	148

Resumen

Los insectos parecen ser particularmente proclives a la convivencia con muy diversas bacterias con quienes establecen relaciones de muy variada índole. En particular, los endosimbiontes primarios se alojan en exclusiva en el interior de células especializadas del insecto denominadas bacteriocitos, se transmiten verticalmente a la descendencia, y establecen una relación de mutua dependencia con el hospedador. Las particularidades de los endosimbiontes primarios han probado ser valiosos modelos en el estudio de las características y consecuencias evolutivas de la transición de un modo de vida libre a uno de dependencia total de un hospedador.

Existen dos cambios que ocurren muy rápidamente en el genoma bacteriano tras la transición a un estilo de vida intracelular: el incremento masivo de secuencias de inserción (IS) y otros elementos móviles, y la aparición de un gran número de pseudogenes. Estos eventos desencadenan una masiva inhabilitación y pérdida de genes que desembocan en la constitución de un genoma prácticamente mínimo. A la luz de los datos actuales, adaptación, degeneración y evolución neutral son mecanismos posibles que pueden condicionar esta característica reducción genómica. Entonces, ¿qué fuerzas evolutivas están detrás de las características genómicas observadas en los endosimbiontes de insectos?

En la presente tesis se aborda esta cuestión mediante el modelado explícito del sistema *Acyrtosiphon pisum*-*Buchnera aphidicola*, haciendo hincapié en el impacto de la selección a nivel del hospedador en el proceso de fijación de mutaciones que inhabilitan la función de genes implicados en el metabolismo bacteriano. En particular, se desarrollan modelos que describen la dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el seno del bacterioma, así como la productividad de los mismos y la relación de esta con la fertilidad de los áfidos. Conocida la influencia de los endosimbiontes en el crecimiento de los áfidos se modela su dinámica de poblaciones en condiciones de laboratorio. Además, se desarrolla un método que permite calcular semi-analíticamente las probabilidades de fijación de mutaciones que afecten directa o indirectamente (*e.g.* alteraciones en el fenotipo de los endosimbiontes) a las capacidades de crecimiento de los áfidos. Finalmente, tomando los modelos y métodos de cálculo desarrollados, se simula el proceso de degradación genómica observado en los endosimbiontes primarios de insectos y se describen las características fundamentales del proceso.

La modelización del sistema *Acyrtosiphon pisum*-*Buchnera aphidicola* y su evolución ha permitido avanzar en la determinación de la importancia de la selección natural a nivel del hospedador en el proceso de degradación genómica al que se ven sometidos los endosimbiontes de insectos. Aceptando tres supuestos fundamentales (la fuente de alimento de los áfidos no varía en el tiempo y es accesible *ad libitum*, toda mutación que aparece en un endosimbionte se fija instantáneamente en el insecto en que este se aloja, y nunca coexisten dos o más mutaciones distintas en una misma población de áfidos), se ha determinado que este proceso de degradación se divide en dos etapas: la primera, que abarca la pérdida de prácticamente todos los genes eliminables, se caracteriza por una velocidad de degradación prácticamente constante, definida en función de la probabilidad de fijación de una mutación neutral. La segunda, correspondiente a los últimos 1 – 20 genes no esenciales pendientes de eliminar, procede a una velocidad muchísimo más lenta. El decremento observado es tan marcado que, si el tamaño de la población de áfidos es suficientemente grande, podría suponer la retención de los últimos genes no esenciales.

Las simulaciones efectuadas han permitido establecer, además, que la selección natural afecta al proceso evolutivo de dos maneras distintas: en primer lugar, determina las capacidades de crecimiento del sistema insecto-endosimbionte a lo largo del proceso de degradación genómica. En esta línea, para tamaños de población de áfidos razonablemente grandes, no se han observado pérdidas sustanciales en las capacidades de crecimiento del sistema insecto-endosimbionte a lo largo de la evolución, un hecho que apunta a que la selección a nivel del insecto podría ser suficiente para evitar la degeneración de las funciones de los endosimbiontes relevantes al sistema en su conjunto. En segundo lugar, la eficacia de la selección natural determina la magnitud de la deceleración del proceso de degradación observada al final del mismo.

En definitiva, la metodología desarrollada plantea por primera vez el estudio de la evolución de los endosimbiontes de insectos desde una perspectiva puramente dinámica, lo que ha permitido establecer claramente el papel de la selección natural en la reducción del genoma de los endosimbiontes primarios de insectos. Este trabajo sirve, por tanto, y con independencia de la validez de los supuestos en los que se basa, como punto de partida para futuras aproximaciones a la evolución de estos sistemas.

Abstract

Insects seem to be particularly prone to coexistence with very diverse bacteria with whom they establish relationships of varied nature. In particular, the primary endosymbionts are housed exclusively inside specialized cells of the insect called bacteriocytes, are transmitted vertically to the offspring, and establish a relationship of mutual dependence with the host. The peculiarities of primary endosymbionts have proven to be valuable models in the study of the characteristics and evolutionary consequences of the transition from a free-living mode to one of total dependence on a host.

There are two major events that occur rapidly in the bacterial genome after the transition of a bacterium to an intracellular lifestyle: the massive increase in insertion sequences (IS) and other mobile elements, and the appearance of a large number of pseudogenes. These events trigger a massive disabling and loss of genes that lead to the constitution of an almost minimal genome. In the light of current data, adaptation, degeneration and neutral evolution are possible mechanisms that can condition this characteristic genomic reduction. So, what evolutionary forces are behind the genomic characteristics observed in insect endosymbionts?

In the present thesis this issue is addressed through the modeling of the system *Acyrtosiphon pisum*-*Buchnera aphidicola*, emphasizing the impact of selection at the host level in the fixation of mutations that disable the function of genes involved in bacterial metabolism. In particular, models are developed that describe the growth dynamics of the endosymbionts within the bacterioma, as well as their productivity and its relationship with the fertility of the aphids. Given the influence of endosymbionts in the growth of aphids, their population dynamics are modeled under laboratory conditions. In addition, a method is developed that allows to semi-analytically calculate the fixation probability of mutations that directly or indirectly affect (*e.g.* alterations in the phenotype of the endosymbionts) the growth capacities of aphids. Finally, by using the models and calculation methods developed, the process of genomic degradation observed in the primary endosymbionts of insects is simulated and the fundamental characteristics of the process described.

The modeling of the *Acyrtosiphon pisum*-*Buchnera aphidicola* system and its evolution has allowed to advance in the determination of the importance of natural selection at the host level in the process of genomic degradation to which endosym-

bionts of insects are subjected. Accepting three fundamental assumptions (the food source of the aphids does not vary with time and is accessible *ad libitum*, any mutation that appears in an endosymbiont is instantaneously fixed in the insect in which it is lodged, and no more than one kind of mutation occurs simultaneously in the same aphid population), it has been determined that this degradation process is divided into two stages: the first, which covers the loss of practically all the genes that are eliminated in a particular simulation, is characterized by an almost constant rate of degradation whose value depends on the fixation probability of a neutral mutation. The second, corresponding to the last 1 – 20 non-essential genes to be eliminated, proceeds at a much slower speed. If the size of the aphid population is large enough, the observed decrease is so pronounced that the last non-essential genes could be retained.

The simulations carried out have also established that natural selection affects the evolutionary process in two different ways: first, it determines the growth capabilities of the insect-endosymbiotic system throughout the process of genomic degradation. In this line, for reasonably large aphid population sizes, no substantial decrease in the growth capabilities of the insect-endosymbiotic system have been observed throughout evolution, a fact that suggests that selection at the insect level could be enough to avoid the degeneration of the functions of the endosymbionts which are relevant to the system as a whole. Second, the effectiveness of natural selection determines the magnitude of the deceleration of the degradation process observed at its end.

In short, the methodology developed addresses for the first time the study of the evolution of insect endosymbionts from a purely dynamic perspective, made it possible to clearly establish the role of natural selection in the genome reduction of the primary endosymbionts of insects. This work serves, therefore, and regardless of the validity of the assumptions on which it is based, as a starting point for future approaches to the understanding of the evolution of these systems.

Capítulo 1

Introducción general

La simbiosis, en sentido amplio, puede entenderse como toda interacción biológica entre especies sostenida en el tiempo, sea esta de índole positiva, negativa o neutra. Cuando en esta interacción uno de los organismos participantes habita en el interior del otro, se habla de endosimbiosis. Hoy en día resulta indiscutible que las simbiosis han jugado un papel fundamental en configurar la biodiversidad tal y como la conocemos. En particular, la implicación de la endosimbiosis en el origen de la célula eucariota [1], permitió alcanzar nuevas cotas de complejidad, coloquialmente entendida, que no parecen tener su reflejo en el mundo de las bacterias y las arqueas. Por otra parte, que un organismo, en su interacción con otros, acabe integrándose en alguno de ellos parece oponerse a las interpretaciones más inmediatas de los mecanismos de acción de la selección natural: ¿cuál es la dinámica que, bajo el precepto de incrementar la propia presencia en la población, lleva a dos organismos coexistentes a llevar la cooperación o el altruismo hasta este extremo? Parece evidente, con lo apuntado hasta ahora, por qué esta pregunta, con todas sus ramificaciones, constituye una de las grandes cuestiones de la Biología de las últimas décadas.

1.1. Los insectos como modelo de estudio de la endosimbiosis

Los insectos parecen ser particularmente proclives a la convivencia con muy diversas bacterias con quienes establecen relaciones de muy variada índole [2], una característica que probablemente se relacione con su enorme éxito reproductivo [3]. Si estas bacterias se desarrollan fuera de los tejidos del hospedador (*e.g.* en la cavidad intestinal), se denominan ectosimbiontes. Por el contrario, si viven en el interior de los mismos, se denominan endosimbiontes. Estos últimos se clasifican, adicionalmente, en función del grado de interdependencia entre ellos y su hospedador [4-6]: (endo)simbiontes primarios o P-(endo)simbiontes y simbiontes secundarios o S-simbiontes. Los endosimbiontes primarios se transmiten verticalmente a la des-

endencia, se alojan en exclusiva en el interior de células especializadas del insecto denominadas bacteriocitos y establecen una relación de mutua dependencia con el hospedador. En particular, las relaciones entre los endosimbiontes primarios y los insectos son esencialmente de naturaleza nutricional: las bacterias aportan elementos que no están disponibles en cantidades adecuadas en la dieta del hospedador, como aminoácidos en el caso de insectos chupadores de savia, o vitaminas en el caso de determinados insectos hematófagos (si bien este provisionamiento no es exclusivo de este tipo de dietas [7-9]); o participan en el metabolismo del nitrógeno y del azufre [3, 10, 11].

Los simbioses secundarios, por otra parte, conservan la capacidad de vivir fuera del hospedador (que puede no ser único), pueden localizarse tanto en el interior como en el exterior de las células del hospedador, así como transmitirse tanto vertical como horizontalmente. A diferencia de los endosimbiontes primarios, los simbioses secundarios pueden ofrecer desde ventajas coyunturales al hospedador (*e.g.* incrementar la tolerancia a cambios de temperatura [12] o conferir resistencia a parásitos [13]), hasta actuar como parásitos reproductivos (*e.g.* *Wolbachia* [14]).

Las particularidades de los endosimbiontes primarios han probado ser valiosos modelos en el estudio de las características y consecuencias evolutivas de la transición de un modo de vida libre a uno de dependencia total de un hospedador [5]. El potencial de estos sistemas como modelo radica, esencialmente, en que se dispone de un gran número de relaciones insecto-endosimbionte que, debido a su distinta antigüedad, permiten caracterizar distintas etapas de este proceso; desde los cambios asociados al establecimiento del mutualismo (ver [15-18] como ejemplos paradigmáticos), hasta cambios genómicos en endosimbiosis ya asentadas [19].

A pesar de todo, las bondades de los sistemas insecto-endosimbionte no permiten abordar de forma fina una de las cuestiones más relevantes en torno a la endosimbiosis: su origen. La razón principal es que, a pesar de disponer de sistemas insecto-simbionte recientemente establecidos, se carece de información suficientemente detallada sobre la fisiología de la relación en sistemas en los que la endosimbiosis se encuentre en proceso de establecimiento. Puesto que la comprensión de la secuencia de cambios en el hospedador, al igual que en el huésped y en el contexto ecológico de ambos, son materia imprescindible para comprender la dinámica del establecimiento de la endosimbiosis, se hace necesario recurrir a otras aproximaciones para esclarecer el proceso.

1.2. Modelos para el estudio del surgimiento y estabilidad de las simbiosis mutualistas

Comprender el origen de la endosimbiosis no se limita a concretar las etapas que permiten la integración, más o menos definitiva, de las bacterias en su hospedador, sino que implica determinar qué circunstancias conducen a dos organismos que coexisten a iniciar este proceso. Partiremos, pues, de este punto: una bacteria y otro organismo coexisten en un determinado entorno y sabemos que, en el largo plazo, la primera acabará siendo un orgánulo o cuasi-orgánulo del segundo.

La primera cuestión es determinar qué tipo de relación pueden tener estos dos organismos que posibilite el escenario final planteado. En particular, ¿debe una bacteria pasar necesariamente por una etapa de parasitismo antes de establecer una relación en la que resulte beneficiosa para el futuro hospedador? Si consideramos en primer lugar interacciones del tipo bacteria-eucariota, un reciente estudio filogenético en el phylum Proteobacteria [20] apunta a que la respuesta a esta pregunta es negativa: los mutualistas del phylum Proteobacteria tienen su origen mayoritaria, pero no exclusivamente, en bacterias parásitas. Los ancestros restantes se circunscriben en el conjunto de bacterias de vida libre (i.e. sin relación a priori con otro eucariota). Además, los mutualistas que se asocian con este origen exhiben rasgos específicos atribuibles a la asociación con su hospedador obtenidos mediante transferencia horizontal, una característica menos común en mutualistas con ancestros parásitos [20]. Estos datos ilustran, por tanto, no sólo que el parasitismo es un camino probable pero no esencial para el establecimiento de la simbiosis, sino que distintos orígenes parecen implicar distintas idiosincrasias evolutivas. En el contexto de la interacción bacteria-bacteria la negativa es aún más clara, ya que existen numerosos casos documentados de *cross-feeding* (i.e. intercambio de metabolitos entre bacterias) que tienen un origen claramente no parásito (ver [21] para una revisión completa sobre el tema).

Por lo tanto, se parte de una situación en la que el futuro endosimbionte y su acompañante pueden mantener, *a priori*, una relación de cualquier naturaleza. En consecuencia, comprender los caminos que conducen a la integración del primero en el segundo, es esencialmente análogo a entender cómo evoluciona, en general, una simbiosis a lo largo del tiempo. Tradicionalmente, se ha establecido que las simbiosis mutualistas y las antagonicas evolucionan de maneras esencialmente distintas. Sin embargo, actualmente se acepta que las relaciones biológicas se circunscriben en un continuo entre parasitismo y mutualismo [22, 23]. La idea del continuo hace referencia al hecho de que una convivencia mutuamente provechosa tiene su origen, no en la cooperación, entendida como contribución sin coste; sino en la explotación recíproca, de la que existen grados que la aproximan, en mayor o menor medida, a la idea de parasitismo. Esta circunscripción es, además, altamente dinámica: cambios tanto intrínsecos como extrínsecos a los organismos implicados en una simbiosis

pueden y tienen un impacto en el tipo concreto de relación que esta define.

En esta línea, los modelos que tratan de abordar el origen y el mantenimiento de las simbiosis mutualistas centran sus esfuerzos en comprender las razones que impiden que este tipo de relaciones se rompa debido a la aparición de comportamientos de explotación entre los organismos que la componen o, en otras palabras, cómo de estables son estas relaciones a la aparición de *cheaters* (ver [24] para una discusión sobre este término). Dada la generalidad de la cuestión, se emplean muy diversas aproximaciones a su estudio [25].

La mayoría de los estudios del mutualismo a escala poblacional obtienen la abundancia de las distintas especies a lo largo del tiempo a partir de la representación del sistema en estudio mediante ecuaciones diferenciales o sus equivalentes discretos. En particular, muchos de estos modelos se basan en las ecuaciones de Lotka-Volterra generalizadas (gLV). Estas ecuaciones diferenciales ordinarias describen el cambio en el tiempo de una población de N especies en función de sus tasas de crecimiento intrínsecas y de cómo estas especies se relacionan, dos a dos, entre sí (*i.e.* si la presencia de una especie beneficia o perjudica a otra)[26]. A pesar del amplio rango de aplicaciones de gLV, estas presentan un importante número de limitaciones entre las que destacan el supuesto de homogeneidad espacial, la invariabilidad de las interacciones entre las distintas especies con el tiempo, así como del entorno en que estas se desarrollan, y la representación de las interacciones como funciones bilineales (*i.e.* la tasa de crecimiento de una especie vendrá condicionada por la abundancia de las especies con que se relaciona de manera lineal)[26].

Numerosas extensiones de las gLV se han propuesto con el fin de superar las limitaciones del modelo clásico, desde la inclusión de estructura espacial en la población y/o en el ecosistema [27, 28], hasta la adaptación de las gLV para representar mejor las interacciones basadas en el intercambio de metabolitos [29, 30].

A lo largo de las últimas dos décadas el estudio de la ecología evolutiva ha conducido al desarrollo del concepto de retroalimentación eco-evolutiva, base de los métodos de dinámica adaptativa [31, 32]. En términos sencillos, la dinámica adaptativa considera que la evolución de una población en el tiempo genera un impacto en su ecosistema y que este, a su vez, influye en la evolución en el tiempo, esto es, las dinámicas evolutiva y ecológica están acopladas. Esta retroalimentación conlleva, generalmente, que la acción de la selección natural sobre un fenotipo depende de la frecuencia de los distintos fenotipos en la población (selección dependiente de frecuencia), de forma que pueden darse situaciones en que la evolución propicie la extinción de la población [31].

En relación al problema del establecimiento del mutualismo, y en particular de la endosimbiosis, es destacable el trabajo de Richard Law y Ulf Dieckmann [33], en el que muestran que linajes separados pueden derivar en una simbiosis capaz de

reproducirse como una única unidad aun si la transferencia de recurso es completamente unidireccional de la víctima al explotador. En concreto, este fenómeno se produce si, en el proceso de desarrollo de defensas frente al explotador, los costes (y sus incrementos) experimentados por la víctima en su evolución son lo suficientemente grandes. Esto supone un incremento progresivo en la transmisión vertical, mantenido de generación en generación, de modo que explotador y víctima se reproducen cada vez más como una única unidad. En términos esenciales, los autores apuntan a que el factor crítico que propicia el establecimiento de la simbiosis es que existan más muertes que nacimientos para las dos especies cuando viven por separado (y correspondientemente más nacimientos que muertes en simbiosis), con independencia de las causas de este desequilibrio.

Además de los modelos tradicionales basados en el estudio de sistemas dinámicos, la teoría de juegos evolutiva representa un marco matemático ampliamente utilizado en el estudio de cómo la presión selectiva condiciona la evolución de las estrategias de agentes implicados en interacciones sujetas a potenciales conflictos [34, 35]. Brevemente, en este tipo de aproximaciones se supone que los organismos que forman parte de la población interactúan adoptando diversas estrategias (que pueden representar desde conductas y fenotipos a genomas) de un conjunto dado, de modo que el resultado de la interacción viene definido por un sistema de pagos preestablecido. Este sistema de pagos (el 'juego' en sí mismo) determina, en última instancia, qué estrategias o conjuntos de estrategias (y en consecuencia, qué organismos) y en qué cantidad estarán presentes en una población estable y, por tanto, si establecido dicho sistema de pagos es posible una cooperación sostenida en el tiempo.

La naturaleza del juego simulado conlleva, implícitamente, la definición del grado de conflicto asociado a la cooperación. Bajo esta perspectiva, uno de los juegos tradicionalmente más empleado en el estudio del mutualismo es el Dilema del Prisionero [36], ya que este se puede asociar a situaciones de máximo conflicto. En el Dilema del Prisionero un organismo puede optar por cooperar o no cooperar. Si dos organismos interaccionan de forma cooperativa, el beneficio para ambos es mayor al que se obtiene si los dos no cooperan. Sin embargo, cuando uno coopera y el otro no, el beneficio obtenido por el primero es superior al adquirible a través de la cooperación mutua. En estas condiciones, y bajo el supuesto de una población perfectamente mezclada, la selección natural actúa en contra de la cooperación. Sin embargo, aun con el sistema de pagos asociado al Dilema del Prisionero, determinadas variaciones en el modo de interacción de los jugadores (*e.g.* interacciones repetidas, heterogeneidad espacial) permite el surgimiento de un mutualismo estable [36]. A pesar de que el Dilema del Prisionero es el juego paradigmático en el estudio del mutualismo, otros tipos (bienes públicos, halcón-paloma, ventisquero) también se han aplicado con éxito [25, 37].

Un ejemplo interesante de la aplicación de un juego alternativo en el estudio

particular de la evolución de la explotación (entendida esta como una forma de mutualismo en la que un subconjunto de los organismos implicados obtienen la mayor parte del beneficio de la cooperación) puede encontrarse en [38]. En este trabajo se plantea la hipótesis del Rey Rojo (en contraposición a la hipótesis de la Reina Roja, ver [39] para una comparativa entre ambas), que plantea que si se parte de una relación mutualista consolidada (véase que se trataría del caso de una endosimbiosis primaria recién establecida), aquel organismo que se adapte más lentamente obtendrá, en el largo plazo, una mayor fracción de los beneficios de la simbiosis.

Si bien los modelos basados en teoría de juegos son capaces de predecir estrategias óptimas en situaciones sencillas, la necesidad de incluir factores adicionales como población finita, interacciones espaciales, comunicación entre individuos, *etc* requiere abordajes alternativos. Una de estas aproximaciones es la de los mercados biológicos [40]. Los mercados biológicos interpretan la cooperación entre organismos como un intercambio de recursos, bienes y/o servicios mutuamente beneficioso. Esto es, establecen una analogía entre la interacción entre organismos y un mercado humano. Tal y como se ha discutido anteriormente, el mutuo beneficio (el juego o el sistema de pagos) no es suficiente para comprender adecuadamente el proceso de aparición y evolución de las simbiosis mutualistas. A diferencia de la teoría de juegos clásica, los mercados biológicos consideran, adicionalmente, la posibilidad de que los distintos organismos tengan al menos cierta capacidad de elección en lo que a sus interacciones se refiere, así como mecanismos que les permitan castigar de algún modo las interacciones inconvenientes (capacidades implícitas en los agentes de los mercados humanos). Al incluir estos mecanismos, ampliamente observados en la naturaleza, se logra impedir la proliferación de *cheaters*, emergen fenómenos de competición y se facilita la especialización y, en consecuencia, la aparición de formas complejas de cooperación [40].

Por otra parte, en los modelos basados en agentes [34] cada agente (*i.e.* cada individuo de la población) tiene asociada información específica (un conjunto de genes, si quiere visualizarse de este modo) que determina qué decisiones toma en función de su contexto específico. El comportamiento del conjunto de la población se obtiene, por tanto, simulando la evolución de poblaciones de distintos agentes en el tiempo. Los diversos trabajos en muy distintas condiciones basados en los modelos basados en agentes conducen, en línea con las variantes más complejas de los modelos basados en teoría de juegos [35], a una conclusión general: el resultado de la dinámica explorada depende fuertemente de los parámetros de la simulación, de modo que es necesario ser particularmente prudente a la hora de extrapolar las conclusiones derivadas de estudios específicos.

Los métodos discutidos tienen en común que la cooperación, cuando se da, es directamente correspondida. Sin embargo, otras formas de mutualismo pueden emerger cuando los fenotipos cooperativos reciben beneficios indirectos al ayudar a otros fenotipos. Este concepto, denominado *fitness inclusivo* [41], plantea que el altruismo

puede emerger en una población en la que exista un nivel suficiente de covarianza genética [42]. En términos más concretos, esta covarianza puede deberse, entre otros, a la existencia de una determinada estructura espacial, a la capacidad de los fenotipos cooperativos de escoger otros de la misma naturaleza o de penalizar a los *cheaters* o, en su forma más inmediata, a la interacción con parientes cercanos. En este sentido, resulta interesante destacar que muchos de los mecanismos que conducen a un incremento de la covarianza genética también se han identificado como relevantes en el surgimiento y estabilización del mutualismo en las otras aproximaciones descritas.

En definitiva, las distintas aproximaciones al estudio del origen y mantenimiento del mutualismo coinciden en la identificación de ciertos mecanismos que permiten, en las condiciones adecuadas, promover la cooperación de manera estable: capacidad para entablar contacto con otros fenotipos cooperativos y castigar las interacciones con *cheaters*, interacciones sostenidas con los mismos individuos que derivan en una estructuración espacial de la población, diferencias entre los costes y beneficios de las distintas interacciones, usos diferenciales de los recursos disponibles, etcétera. Sin embargo, estas distintas aproximaciones también demuestran que la casuística de los modelos y casos de estudio existentes complican extraordinariamente la derivación de principios generales universalmente aplicables.

1.3. Degradación genómica en endosimbiontes de insectos

En la sección anterior se han discutido los mecanismos generales por los que dos organismos independientes pueden llegar a desarrollar una relación de mutua cooperación estable en el tiempo. En esta sección se discutirán las características genómicas particulares de los endosimbiontes primarios de insectos, así como la forma en la que estas se van modificando a lo largo de la evolución desde la adopción de un estilo de vida intracelular. Estas cuestiones, junto con otras relacionadas, han sido revisadas en multitud de trabajos [5, 19, 43-51], por lo que se resumirá la información más relevante orientada a la cuestión central sobre la que se articula la presente tesis: ¿qué fuerzas evolutivas están detrás de las características genómicas observada en los endosimbiontes de insectos?

Uno de los rasgos distintivos más remarcable de los genomas de los endosimbiontes primarios de insectos, junto a la elevada velocidad de acumulación de cambios en su genoma y el sesgo en la composición del mismo a favor los nucleótidos A+T, es su reducido tamaño, habitualmente entre 112-791 kilobases (normalmente menos de 300 genes). Los genes que tienden a conservarse corresponden a funciones esenciales como la replicación, transcripción y traducción del ADN (si bien normalmente restringida a un número muy limitados de rutas); y genes implicados en el

plegamiento y estabilidad de las proteínas. Estos últimos presentan unos elevados niveles de expresión basal en varios endosimbiontes, un hecho que se ha asociado al rescate de otras proteínas afectadas por mutaciones levemente deletéreas [19, 52]. Sin embargo, es destacable que la proteína simbionina en *Buchnera aphidicola* presenta, además de actividad chaperona, actividad fosfotransferasa acoplada a ATP [53], a diferencia de su homólogo en *E. coli*, la proteína GroEL; lo que sugiere que puede cumplir otras funciones relevantes.

Por otra parte, entre los genes habitualmente eliminados, destacan los responsables de la generación de determinados componentes de la envuelta bacteriana (*e.g.* lipopolisacáridos) y los implicados en la reparación del ADN. Estas dos carencias tienen implicaciones potenciales de gran relevancia en la evolución de los sistemas insecto-endosimbionte. En primer lugar, cambios potenciales en la envuelta bacteriana suponen una alteración en la frontera insecto-simbionte y, por ende, de sus propiedades fisicoquímicas (*e.g.* su permeabilidad). En segundo lugar, la falta de mecanismos de reparación del ADN puede suponer un incremento en la tasa de mutación de los endosimbiontes, tal y como se ha descrito en *Buchnera aphidicola* [54], un fenómeno con claras repercusiones evolutivas.

Es importante destacar que los endosimbiontes primarios pueden entenderse como versiones simplificadas de sus equivalentes de vida libre ya que, hasta la fecha, existen pocos casos documentados (ver [55] y [56]) de adquisición de genes por vía horizontal. La dificultad en el intercambio de información genética con otras bacterias, además de propiciar la acumulación de mutaciones deletéreas, supone que la pérdida de genes es prácticamente irreversible, un hecho que limita enormemente las capacidades adaptativas de los sistemas insecto-simbionte [45, 46].

Las características genómicas hasta ahora discutidas representan una descripción de las consecuencias a largo plazo de la endosimbiosis. En los últimos años, gracias a la disponibilidad de un gran número de genomas secuenciados correspondientes a linajes que recientemente han adoptado un estilo de vida huésped-dependiente, se ha conseguido profundizar en la caracterización de los procesos que conducen a dichas consecuencias [16, 43, 49, 51]. Existen dos cambios que ocurren muy rápidamente en el genoma bacteriano tras el cambio en su estilo de vida: el incremento masivo de secuencias de inserción (IS) y otros elementos móviles, y la aparición de un gran número de pseudogenes.

La proliferación de los elementos móviles tiene tres consecuencias [49]: en primer lugar, la transposición de IS conlleva habitualmente la inactivación de genes. Estos genes se degradarán posteriormente, contribuyendo a la reducción del genoma del endosimbionte. En segundo lugar, la transposición repetida de un mismo elemento genera regiones de homología a lo largo de todo el genoma, desencadenando un gran número de recombinaciones homólogas que implican un elevado número de reorganizaciones espontáneas del material genético, así como la delección de fragmentos

del mismo. Por último, muchos IS arrastran promotores que pueden actuar activando la expresión de genes vecinos. En conjunto, estos tres factores junto con las consecuencias derivadas del cambio de vida de la bacteria, definen el escenario que conduce a los endosimbiontes primarios que conocemos.

En conjunto, el incremento de la velocidad de acumulación de cambios en el genoma de los endosimbiontes, vinculado tanto a un potencial aumento de la tasa de mutación, como al del número de sustituciones no sinónimas (K_a) frente a sinónimas (K_s), expresado como la ratio K_a/K_s , y los efectos de la proliferación de elementos móviles durante los primeros estadios de la adaptación al hospedador, unidos a la presumible reducción en la población efectiva y a la disminución de las oportunidades de transferencia horizontal de genes asociados al cambio de estilo de vida [46], han llevado a concluir que la evolución de los endosimbiontes primarios está marcada por una progresiva degeneración funcional de su genoma asociada a la acumulación progresiva de mutaciones deletéreas [45, 57]. Un ejemplo notable de esta degradación funcional se observa en *Candidatus Carsonella ruddii*, endosimbionte del psílido *Pachypsylla venusta* [58], si bien el contexto biológico de esta degradación no está claro. Sin embargo, los datos disponibles no permiten confirmar de manera definitiva si este es el caso. De hecho, otras alternativas (evolución neutral, adaptación) pueden inferirse aproximándose a los mismos datos bajo otra perspectiva (ver [46] y [43] para una detallada discusión al respecto).

En primer lugar, la transición de un estado de vida libre a uno intracelular muy rico en nutrientes, supone un cambio de gran envergadura en el mapa de presiones selectivas al que se ve sometido el endosimbionte. Esto puede suponer un sustancial incremento en la fracción de mutaciones que son neutrales para el sistema insecto-endosimbionte, más aún si se produce la sobreexpresión constitutiva de chaperonas típica de estas bacterias [52]. La evaluación de los valores de K_a/K_s a escala genómica de varios endosimbiontes denotan una elevación del mismo en la mayoría de los genes. Dada la globalidad del efecto, y puesto que elevados valores de K_a/K_s se interpretan como una acción relajada de la selección natural o un decremento en la eficacia purificadora de la misma (véase la caja 2 y sus citas en [50] para una explicación detallada sobre K_a/K_s y sus limitaciones), la explicación más sencilla implica aceptar que los efectos de la deriva génica asociados a la disminución de la población efectiva y la limitada capacidad de intercambio de información genética con el entorno, supone una degeneración progresiva del genoma de los simbioses y no un proceso esencialmente neutral. Sin embargo, la existencia de genes particulares (esencialmente los que tienden a conservarse en estas bacterias) donde el valor de K_a/K_s es incluso inferior al de los correspondientes de bacterias de vida libre próximas (indicando, por tanto, la acción efectiva de la selección purificadora), unida a la riqueza del nuevo entorno antes citada, hace que la interpretación de los elevados valores de K_a/K_s observados en gran parte del genoma de los endosimbiontes sea compatible con la hipótesis de una acción de la selección natural relajada y, en consecuencia, de una reducción genómica esencialmente neutral [46].

Una síntesis reciente de los datos publicados en relación a la reducción genómica en bacterias de vida libre apunta a que esta reducción es un fenómeno ampliamente extendido, una observación congruente con el hecho de que un gran número de especies bacterianas no pueden cultivarse *in vitro* [57]. La generalidad de este fenómeno ha conducido a contrastar la hipótesis de si esta reducción genómica es fruto de un proceso de adaptación. Existen dos razones por las que la pérdida de genes puede suponer un efecto beneficioso en el organismo correspondiente: la disminución en los costes (energéticos y materiales) derivados del mantenimiento y la expresión de los genes eliminados, y la disminución del volumen bacteriano, con el concomitante incremento en la relación superficie/volumen.

En relación a la reducción de costes asociada a la pérdida de un gen, se ha estimado que el coste de replicación de un segmento de ADN de unos pocos nucleótidos podría ser suficiente como para que la selección natural pueda favorecer su eliminación siempre y cuando la población efectiva de la bacteria considerada sea lo suficientemente grande [59]. En este sentido, inserciones de gran tamaño en genomas de eucariotas (cuya población efectiva es probablemente mucho menor) pueden proliferar sin que la selección natural pueda eliminarlas eficientemente. En consecuencia, dado que es esperable que los endosimbiontes primarios presenten tamaños de población efectivos relativamente pequeños, el ahorro en costes asociado a la pérdida de un gen no es esperable que justifique un mecanismo adaptativo, más aún si aceptamos la abundancia de recursos del entorno intracelular del hospedador. Sin embargo, el coste combinado del mantenimiento, transcripción y traducción de un gen sí que es suficiente para que, aún con tamaños de población efectivos relativamente bajos, la selección pueda favorecer su eliminación [59]. Puesto que a lo largo de la evolución de los endosimbiontes se registran pérdidas de muchos elementos implicados en regulación [19], es de esperar que se den casos en los que un gen no esencial adquiera una expresión constitutiva. En estas circunstancias, la eliminación de dicho gen podría estar selectivamente favorecida.

Por otra parte, la reducción del volumen potencialmente asociada a la reducción del genoma bacteriano puede asociarse a varios efectos beneficiosos en el caso particular de los endosimbiontes primarios, todos ellos asociados al incremento concomitante en el ratio superficie/volumen. En primer lugar, en un entorno particularmente rico en nutrientes, no resulta descabellado plantear que el flujo de estos a través de la envuelta bacteriana y no su cantidad es lo que limita las funciones bacterianas. En consecuencia, un incremento de la superficie de contacto entre el citoplasma bacteriano y el del hospedador puede suponer, a efectos prácticos, un incremento en los flujos de intercambio de metabolitos consistentes con un sustancial incremento en el *fitness* del sistema. En este mismo sentido, un elevado ratio superficie/volumen hace más eficiente la generación de ATP en procariotas [60], lo que puede suponer una ventaja importante en los endosimbiontes primarios dado lo limitado de sus capacidades metabólicas.

En cualquier caso, a pesar de que los factores discutidos no supongan diferencias en *fitness* lo suficientemente marcadas como para que, atendiendo a los valores pertinentes de tamaño efectivo de población, la selección natural pueda actuar eficazmente condicionando la eliminación de determinados genes, si que pueden compensar efectos levemente deletéreos vinculados a la pérdida de función de los mismos, ampliando netamente el espacio neutral en el que se embebe la evolución de los endosimbiontes.

En definitiva, a la luz de los datos actuales, adaptación, degeneración y evolución neutral son mecanismos posibles que pueden condicionar la reducción genómica característica de los genomas de endosimbiontes primarios de insectos. La pregunta planteada al inicio de esta sección continúa, por tanto, irresuelta: ¿qué fuerzas evolutivas están detrás de las características genómicas observada en los endosimbiontes de insectos? A lo largo de esta tesis se abordará esta cuestión mediante el modelado explícito del sistema *Acyrtosiphon pisum-Buchnera aphidicola*, haciendo hincapié en el impacto de la selección a nivel del hospedador en el proceso de fijación de mutaciones que inhabilitan la función de genes implicados en el metabolismo bacteriano. En particular, a lo largo del capítulo 3 se desarrollarán modelos que describen la dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el seno del bacterioma, así como la productividad de los mismos y la relación de esta con la fertilidad de los áfidos. Conocida la influencia de los endosimbiontes en el crecimiento de los áfidos, en el capítulo 4 se modelará su dinámica de poblaciones en condiciones de laboratorio. Además, se desarrollará un método que permite calcular semi-analíticamente las probabilidades de fijación de mutaciones que afecten directa o indirectamente (*e.g.* alteraciones en el fenotipo de los endosimbiontes) a las capacidades de crecimiento de los áfidos. Finalmente, en el capítulo 5, tomando los resultados de los capítulos 3 y 4, se simulará el proceso de degradación genómica observado en los endosimbiontes primarios de insectos y se tratarán de describir las características fundamentales del proceso.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo principal de esta investigación es determinar la importancia de la selección natural a nivel del hospedador en el proceso de degradación metabólica al que se ven sometidos los endosimbiontes de insectos mediante el modelado del sistema *Acyrtosiphon pisum-Buchnera aphidicola*.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un modelo de la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes en el seno del áfido.
- Relacionar la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes y su productividad con la fertilidad del áfido hospedador.
- Determinar estrategias óptimas de regulación de la población de endosimbiontes bajo el supuesto de maximización de la productividad de los mismos a lo largo del tiempo.
- Modelar la dinámica de poblaciones de áfidos propagada en condiciones controladas de laboratorio.
- Calcular la probabilidad de fijación de mutaciones que afecten directa o indirectamente a las facultades reproductivas de los áfidos.
- Simular la pérdida de genes metabólicos en los endosimbiontes a lo largo de su evolución y caracterizar exhaustivamente el proceso.

Capítulo 3

Endosimbiontes primarios: modelos de dinámica de poblaciones y productividad

3.1. Introducción

La supervivencia de muchos insectos cuya alimentación es deficiente en determinados nutrientes depende de la actividad metabólica de los endosimbiontes bacterianos que alojan. Comprender la evolución de estos endosimbiontes viene de la mano, en consecuencia, del entendimiento de su dinámica y de los mecanismos por los que esta se regula. En concreto, existen tres procesos que es necesario caracterizar: el desarrollo y organización de los bacteriocitos, células especializadas que contienen a los endosimbiontes; el control del título bacteriano; y el intercambio de metabolitos entre el insecto y los endosimbiontes.

Atendiendo a las particularidades de estos sistemas, a lo largo de este capítulo, y tomando como referencia el sistema *Acrytosyphon pisum*-*Buchnera aphidicola*, se construyen y comparan diversos modelos de la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes en el seno de su hospedador en los que el impacto del confinamiento de las bacterias en el bacterioma, un tejido cuyo volumen varía a lo largo del desarrollo del insecto, adquiere una importancia capital. Adicionalmente, y con base en las dinámicas planteadas, se construye la función de fertilidad que relaciona la producción de nutrientes de los endosimbiontes con el número de descendientes del insecto progenitor por unidad de tiempo. Finalmente, se tratará de justificar la variación del título bacteriano observado en *Acrytosyphon pisum* bajo el prisma de la maximización del número de descendientes engendrados a lo largo de la vida del áfido.

3.1.1. Desarrollo del bacterioma

Los bacteriocitos son un tipo celular evolutivamente recurrente en sistemas insecto-bacteria. Estas células, en la mayoría de los casos conocidos (nótese la excepción en la hormiga carpintera *Camponotus floridanus*, [61]), se agrupan en una estructura diferenciada denominada bacterioma. A pesar de la ubicuidad de estas estructuras, los mecanismos que promueven su diferenciación aún no están bien caracterizados. De hecho, muy pocos estudios abordan esta problemática directamente.

Durante la diferenciación de los bacteriocitos en *Acyrtosiphon pisum*, tres factores de transcripción se expresan en un orden específico [62]: en primer lugar, se detecta expresión de Distal-less (*Dll*) en núcleos sincitiales en la región posterior del blastodermo del embrión momentos antes de la inoculación de los endosimbiontes. Conforme las bacterias entran en el embrión (estadio 7, ver [63] para una descripción completa de la embriogénesis), se asocian a los núcleos de los futuros bacteriocitos, que empiezan a expresar Ultrabithorax (*Ubx*), Abdominal-A (*Abd-A*) o ambas. Finalmente, tras concluir la inoculación, se detecta expresión de Engrailed (*En*). La expresión de *Ubx*, junto con otros homólogos importantes en la morfogénesis de *Drosophila melanogaster* (*Tslr*, *Knrl-1*, *ci*, *Hh* y *so*) también ha sido observada por otros autores [64]. Adicionalmente, la importancia de *Ubx* se ha puesto de manifiesto en *Nysius plebeius* [65].

Aceptando la expresión de *Dll* como marcador de la población de bacteriocitos, se observa que la formación del bacterioma de un áfido adulto transcurre en dos fases [62]: en primer lugar, los aproximadamente 8 núcleos de bacteriocito originales se dividen dando lugar a un sincitio de unos 32 núcleos (estadio 13). En este mismo estadio, una segunda subpoblación de 40-60 células procedentes del área cercana al extremo posterior de la banda germinal dorsal, con núcleos apreciablemente más pequeños que los que originan el bacterioma, comienzan a expresar *Dll*. En segundo lugar, a lo largo de los estadios 13-16, esta nueva subpoblación celular migra y se intercala entre los bacteriocitos primitivos, que desde el estadio 14 se compone de células uninucleadas poliploides formadas a partir del sincitio original.

Tanto los factores de transcripción cuya expresión correlaciona con la diferenciación de los bacteriocitos como los procesos mediante los que se configura el bacterioma adulto se mantienen incluso tras eliminar la población de endosimbiontes mediante tratamiento antibiótico [62]. Además, se han observado patrones semejantes en *Pemphigus spyrothecae*, e incluso en *Tuberaphis styraci*, donde *B. aphidicola*, el endosimbionte original, ha sido reemplazado por otro que no está confinado [62]. Estas observaciones, en su conjunto, apuntan a que la génesis del bacterioma está conservada y opera de manera independiente a las bacterias que aloja.

3.1.2. Regulación del título bacteriano

La población de endosimbiontes varía sustancialmente a lo largo de la vida de los hospedadores. Esta variación es muy dependiente del insecto considerado (ver [66] para una revisión al respecto) y sugiere un control fino de la población de endosimbiontes en respuesta a las necesidades específicas del hospedador en cada momento. En general, la población de endosimbiontes se incrementa de forma relativamente rápida durante los estadios previos a la fase adulta, donde el título alcanza el máximo. A partir de este momento es cuando se registran las mayores diferencias entre los distintos insectos.

En *Acyrtosiphon pisum*, por ejemplo, tras alcanzarse el título máximo aproximadamente en el ecuador del período reproductivo, se observa una disminución progresiva de la población de endosimbiontes hasta la muerte del áfido [67]. Un comportamiento semejante se observa en el gorgojo del trigo (*Sitophilus*) [68]: el título bacteriano en tejidos no reproductivos se ve incrementado hasta que el adulto alcanza los seis días de edad para luego disminuir rápidamente. Sin embargo, mientras que el patrón observado en *Acyrtosiphon pisum* se ha asociado a los requerimientos reproductivos del insecto [67], en *Sitophilus* se ha relacionado con la formación, tinción y endurecimiento de la cutícula. Un contrapunto de los comportamientos presentados se observa en el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* [69], ya que el título bacteriano no decrece en ningún momento a lo largo de la vida del insecto.

Además de las diferencias señaladas, es habitual encontrar variaciones en la evolución temporal del número de endosimbiontes entre machos y hembras de la misma especie. Por ejemplo, en las cochinillas *Planococcus kraunhiae* y *Pseudococcus comstocki* el sistema endosimbótico degenera progresivamente en los machos hasta prácticamente desaparecer en el adulto, mientras que en las hembras el título bacteriano sigue un patrón cualitativamente semejante al de *Acyrtosiphon pisum* [70].

Se han descrito varias vías a través de las cuales los hospedadores logran adecuar el crecimiento y actividad de los endosimbiontes a sus necesidades. La más destacable se refiere al confinamiento de los endosimbiontes en células especializadas. La existencia de los bacteriocitos permite, en primer lugar, generar un entorno que protege a las bacterias de la acción del sistema inmune del hospedador [71]. Además, permite generar un entorno específico en el que el hospedador puede modular la expresión de genes clave en diálogo metabólico con los endosimbiontes (ver siguiente apartado).

La importancia del aislamiento de los endosimbiontes ilustra que la regulación precisa de la respuesta inmune resulta capital en la interacción insecto-endosimbionte. En concreto, los hospedadores necesitan mantener una respuesta inmunitaria eficaz

contra patógenos sin que esto conlleve una agresión a la población de endosimbiontes. Por ejemplo, a pesar de que el papel de los genes inmunitarios en la regulación del título de *Buchnera* no es claro [66], *Acyrtosiphon pisum*, su hospedador, presenta un menor número de genes relacionados con inmunidad comparado con otros insectos que han divergido del áfido [72]. En particular, *Acyrtosiphon pisum* carece de muchos genes relacionados con la ruta de Immune Deficiency (*IMD*), así como de proteínas de reconocimiento del peptidoglicano (*PGRPs*), implicados en el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria humoral en *Drosophila* a través de las rutas de *Toll* e *IMD*. Estos resultados, junto con el hecho de que *Buchnera* es capaz de generar una respuesta inmunitaria en *Drosophila* [73], apuntan a que la atenuación de la respuesta inmunitaria en *Acrytosiphon pisum* ha facilitado su asociación con endosimbiontes gram-negativos. Esta atenuación, sin embargo, no impide que *Acrytosiphon pisum* responda a amenazas externas, si bien con particularidades como la falta de producción de péptidos antimicrobianos [66].

Otros insectos, por el contrario, adoptan una estrategia más activa en el control de sus endosimbiontes. En concreto, tanto *Sitophilus oryzae* como *Camponotus floridanus* son capaces de modular la actividad de la ruta *IMD* a lo largo de su desarrollo ([74] y [75] respectivamente). Adicionalmente, *Sitophilus oryzae* es capaz de modular el título de la población de *Sodalis pierontonius*, su endosimbionte, a través de la acción bacteriostática de coleopterina A, un péptido antimicrobiano cuya expresión se incluye entre los limitados genes inmunitarios expresados en el bacterioma de este insecto [71].

Otro elemento indispensable para el control del título bacteriano es un mecanismo que permita eliminar endosimbiontes. El estudio más reciente al respecto [76] establece que la degeneración del bacterioma observada en *Acyrtosiphon pisum* se desarrolla en tres fases: (1) hipervacuación derivada del retículo endoplasmático, (2) inducción de rutas de respuesta a estrés (activación de la autofagia y permeabilización mitocondrial en los espacios intravacuolares) y (3) degradación lisosomal de *Buchnera*. El proceso descrito se identifica como esencialmente distinto de la apoptosis, la autofagia y otros mecanismos no apoptóticos de muerte celular como la paraptosis, la necroptosis y la oncosis. Los mismos homólogos lisosomales implicados en la degradación de *Buchnera* también se han encontrado sobre-expresados en la pupa de *Camponotus floridanus* [75]. Alternativamente, se ha sugerido que los mecanismos degradativos que operan en el gorgojo son la autoplasmia y la apoptosis [68] y [77].

Por último, ciertos endosimbiontes secundarios como *Rickettsia* en la mosca blanca *Bemisia tabaci* [78] y *Candidatus liberibacter* en el psílido asiático de los cítricos [79] también pueden influir en el título de los endosimbiontes primarios manipulando directa o indirectamente los mecanismos sobre los que la relación insecto-simbionte se sostiene.

3.1.3. Regulación del metabolismo insecto-endosimbionte

Actualmente, el papel tanto del hospedador como de las bacterias en el mantenimiento de las simbiosis nutricionales tan sólo se empieza a vislumbrar. Entre los sistemas habitualmente estudiados, resulta común que los endosimbiontes presenten genomas muy reducidos que retienen esencialmente genes indispensables para los procesos de replicación, transcripción y traducción, así como rutas metabólicas implicadas en el abastecimiento de nutrientes esenciales para el hospedador [19]. Estas rutas tienden a presentarse parcialmente incompletas, y su funcionalidad depende de la presencia de los genes complementarios en el hospedador adquiridos, en muchas ocasiones, de un donador bacteriano mediante transferencia horizontal. De hecho, se ha determinado que la expresión de estos genes complementarios es notablemente activa en los bacteriocitos de áfidos, cochinillas, psílidos y moscas blancas [80-83].

Esta complementación metabólica, unida a la aparente falta de elementos regulatorios en el genoma de los endosimbiontes, ha llevado a plantear que la regulación del metabolismo bacteriano en respuesta a las necesidades del hospedador recae, esencialmente, en este último. Por ejemplo, *Buchnera aphidicola* parece ser incapaz de adaptarse a potenciales variaciones en los requisitos nutricionales del áfido [84, 85]; una carencia que no se manifiesta en los bacteriocitos, que han demostrado ser capaces de ajustarse a los requerimientos del insecto. En concreto, se ha observado una prominente respuesta transcripcional en los bacteriocitos de áfidos alimentados con dietas empobrecidas en fenilalanina y tirosina (ambos esenciales) [86]. Además, se ha propuesto un mecanismo de inhibición por retroalimentación negativa en el que la acumulación del aminoácido esencial arginina en la hemolinfa de *Acrytosiphon pisum* reduce el transporte de glutamina (donador de nitrógeno esencial para la actividad metabólica de *Buchnera aphidicola*), regulando la biosíntesis de aminoácidos en consecuencia [87].

Nótese que a pesar de que en *Buchnera aphidicola* la mayor parte de los mecanismos de regulación de la expresión se han perdido [88], se aprecia una significativa regulación transcripcional, si bien estos cambios no responden a las necesidades del insecto [85]. Además, se han descrito variaciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos a lo largo del desarrollo del áfido potencialmente atribuibles a mecanismos de regulación post-transcripcional basados en *RNAs* pequeños [89]. En consecuencia, a pesar de que resulta razonable suponer un papel minoritario de *Buchnera aphidicola* en la regulación del metabolismo del sistema insecto-simbionte, no conviene descartar la posibilidad de que existan formas de regulación aún no caracterizadas.

Finalmente, el puzzle que representa la regulación del sistema insecto-bacteria se complica al considerar el transporte de productos génicos del hospedador al simbiote. Este mecanismo, si bien ampliamente reconocido en el caso de mitocondrias, cloroplastos y otras organelas, no se había observado hasta muy recientemente [90].

Este precedente ilustra no sólo la potencial amplitud de los mecanismos de diálogo entre los endosimbiontes y sus hospedadores, sino que presenta un primer paso en la comprensión de la transición final de un organismo a una organela [91].

3.1.4. Consideraciones finales

La amplia variedad de dinámicas bacterianas observadas en las distintas especies de insectos, aunque en muchas ocasiones cualitativamente semejantes, unida a las potenciales particularidades asociadas a los mecanismos de regulación de la población de los endosimbiontes dificulta el planteamiento de un modelo general con que simular la variación temporal del título y la productividad bacteriana en estos sistemas. En consecuencia, a lo largo de la tesis se tomará la relación *Acrytosyphon pisum*-*Buchnera aphidicola* como sistema de referencia, tal y como es habitual en el campo de la endosimbiosis.

A lo largo de la introducción se ha puesto de manifiesto la importancia del confinamiento de las bacterias en los sistemas insecto-bacteria en relación a la capacidad de los hospedadores de conservar una respuesta inmunitaria eficaz contra amenazas externas así como de cara al control del título y productividad bacteriana dada la aparentemente limitada capacidad de los endosimbiontes de regular su propio metabolismo. En consecuencia, y dada la ausencia de precedentes conocidos, en este capítulo se construyen y comparan diversos modelos de la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes en el seno de su hospedador en los que el único factor modulador de la misma será el crecimiento y degradación del bacterioma. Nótese que, puesto que la variación del número y tamaño de los bacteriocitos reflejan, en última instancia, los mecanismos regulatorios que operan en el hospedador, no se hace necesario incluir estos explícitamente en los modelos. Adicionalmente, dada la falta de información al respecto y con objeto de simplificar los modelos, se considerará que no existen variaciones en las necesidades de los áfidos a lo largo de su vida y que, en esta línea, los únicos cambios en la productividad de los endosimbiontes se refieren a la velocidad a la que estén creciendo en cada momento. La relación entre ambos factores, productividad y velocidad de crecimiento, se supondrá invariante en el tiempo por las mismas razones.

Finalmente, aunque la inclusión *ad hoc* de la morfogénesis y degradación del bacterioma reproduce adecuadamente la variación en el título bacteriano observada en *Acrytosyphon pisum*, se tratará de determinar si la degradación del bacterioma en este áfido responde a una optimización del número de descendientes engendrados a lo largo de su vida, a la transmisión de endosimbiontes a su descendencia o a otras causas, ya que no existe evidencia al respecto.

3.2. Resultados

3.2.1. Primeras aproximaciones a un modelo de dinámica de poblaciones de los endosimbiontes en el áfido

El crecimiento de los endosimbiontes primarios en áfidos se circunscribe al volumen definido por el bacterioma en el que se alojan. Esto quiere decir que, aún suponiendo que las bacterias estén saturadas de los sustratos necesarios para crecer y generar los productos para el hospedador, su dinámica se verá afectada en cada momento por el espacio disponible. Esta dinámica, por tanto, puede representarse inicialmente mediante una generalización de la ecuación diferencial logística o de Verhulst [92] en la que se incluye la ontogénesis del bacterioma:

$$dB/dt = \mu B (1 - B/B^{max}) \quad (3.1)$$

donde B es el número de endosimbiontes, μ la tasa de crecimiento exponencial correspondiente a la población bacteriana creciendo sin restricciones, y B^{max} el número máximo de bacterias que puede alojar el áfido, esto es, la capacidad máxima. Esta capacidad máxima, en general, integra, además de la limitación por volumen, las variaciones en el suministro de sustrato a la población bacteriana. Este último factor, sin embargo, puede descartarse *a priori*, especialmente al considerar poblaciones de insectos propagadas *in vitro*. La razón esencial es que los áfidos se alimentan de la savia que producen constantemente las plantas que parasitan [93], por lo que, salvo que el grado de infestación de la planta sea muy elevado u otros factores externos afecten a su productividad, parece sensato suponer que el influjo de savia al insecto está condicionado sólo por la capacidad de asimilación de este. Por otra parte, si bien este recurso podría destinarse mayoritariamente a los tejidos del insecto, privando a los simbiosiontes del mismo y potencialmente alejándolos del estado de saturación, resulta difícil plantear un escenario donde esto suceda. El motivo es que la función esencial de los endosimbiontes primarios en los insectos chupadores de savia es producir una cantidad elevada de aminoácidos así como algunas vitaminas, elementos que pueden asumirse imprescindibles para toda actividad que el insecto pueda llevar a cabo salvo, quizás, aquellas relacionadas en exclusiva con el consumo de energía. La energía, sin embargo, es improbable que suponga límite alguno, ya que la savia vegetal es inmensamente rica en fuentes de carbono [94], hasta el punto de que la gestión de la presión osmótica obliga a los insectos a excretar parte de los azúcares en forma de melaza [95]. Se puede, en consecuencia, y como primera aproximación, descartar la escasez de los productos presentes en la savia en el entorno bacteriano sea cual sea el caso. La función B^{max} , por lo tanto, puede definirse en última instancia como proporcional únicamente al volumen del bacterioma:

$$dB/dt = \mu B (1 - B/\rho V) \quad (3.2)$$

donde ρ es el número máximo de bacterias por unidad de volumen, que podemos suponer fijo, y V es el volumen del bacterioma, que depende del tiempo.

Es importante matizar que la dinámica explorada es la del número total de bacterias *exclusivamente* en el bacterioma del áfido. Es bien conocido que los áfidos, al reproducirse por partenogénesis, alojan en su seno embriones en desarrollo. Estos embriones, a partir del estadio 7 de desarrollo ([63], dato de *A.pisum*), alojan su propia población de endosimbiontes en desarrollo. Este hecho implica dos dificultades de cara al modelado de los sistemas endosimbionte-áfido: en primer lugar, las bacterias que se desarrollan en el embrión contribuyen potencialmente al desarrollo de este, una componente difícil de cuantificar que deberá considerarse al vincular la dinámica de los endosimbiontes en el bacterioma con la fertilidad del áfido. En segundo lugar, y en relación al problema que se discute en esta sección, todo embrión en desarrollo recibe un inóculo de bacterias de la madre. Esto implica que la dinámica de bacterias en el bacteriocito depende en cierta forma de la fertilidad del áfido y viceversa. En una primera aproximación, el número de bacterias inoculadas puede considerarse despreciable frente al número de endosimbiontes alojados en el bacterioma de un áfido medio, incluso considerando el número total de embriones que se inoculan a lo largo de su esperanza de vida [67]. Puesto que el modelo se construye sobre esta aproximación, es importante enfatizar que no es válido en los casos en los que la población de endosimbiontes en el bacterioma sea reducida o la eficacia de inoculación sea sustancialmente baja.

Para completar el planteamiento del modelo, es necesario definir el término de volumen en la ecuación 3.2. Este término se relaciona, en última instancia, con la ontogenia del bacterioma del insecto. El volumen del bacterioma queda definido por dos procesos diferentes [67]: la variación en el número de bacteriocitos que componen el órgano, y la correspondiente al volumen por bacteriocito. El resultado de la combinación de ambos procesos es un crecimiento logístico del volumen total hasta los trece días, seguido de una caída del mismo hasta el final de la vida del áfido.

Esta dinámica, sin embargo, no debe trasladarse directamente al término de volumen de la ecuación 3.2 sin plantearse previamente dos cuestiones. La primera se relaciona con las etapas en las que se producen pérdidas de volumen en el bacterioma, ya sea por la disminución del número de bacteriocitos, por la disminución del volumen por bacteriocito, o ambas: ¿qué mecanismos operan en estas reducciones y cómo afectan a los endosimbiontes? En segundo lugar, ¿es realmente el volumen total de bacterioma lo que restringe el crecimiento bacteriano o es el número de bacteriocitos el factor limitante? La respuesta a esta pregunta resulta, evidentemente, capital a la hora de construir el modelo, ya que la forma de la función V en

la ecuación 3.2 cambiaría sustancialmente. En particular, si el recurso limitante en el crecimiento de los endosimbiontes es el número de bacteriocitos, la disminución de la capacidad máxima comenzaría a los nueve días, en lugar de a los trece como ocurre con el volumen total [67]. Pero, ¿qué implicaría suponer que es el número de bacteriocitos el recurso limitante? Esencialmente, que la velocidad a la que la célula genera los recursos necesarios para sustentar a la población de endosimbiontes que crece en su seno (*e.g* membrana y enzimas necesarias para la gestión de sustratos y productos bacterianos) es mucho mayor que el crecimiento bacteriano en sí. De no ser así, el volumen total (que contendría implícitamente la generación de todos los recursos necesarios) se posicionaría como un mejor representante de agente limitante.

Comencemos por el caso de la reducción en el volumen por bacteriocito que se produce a partir de los 16-23 días (los datos que aparecen en [67] no permiten determinar el momento con más precisión). Puesto que, concomitantemente a la reducción del volumen por bacteriocito, se observa una pérdida de densidad de endosimbiontes en el bacterioma, podría suponerse que son signos que representan una degradación sistemática del tejido. Desgraciadamente, sin más información, determinar qué causa esta degradación no es factible. La interpretación más inmediata es que se trata de una forma de reciclar parte de los recursos invertidos en la construcción del bacterioma y el desarrollo de la población de endosimbiontes; y/o eliminar un tejido cuyo mantenimiento deja de resultar conveniente puesto que el áfido, en esta etapa, está en plena senescencia. Puesto que la desestructuración del bacterioma corresponde, aproximadamente, con lo que se considera el final del período reproductivo de los áfidos [67], no se incluirá esta etapa en el modelo.

Una vez considerada la reducción en el volumen por bacteriocito, es necesario considerar la disminución en el número de bacteriocitos que se produce a partir del noveno día de vida del insecto. En primer lugar, si consideramos, como parece razonable, que los endosimbiontes están más o menos homogéneamente dispersos entre las células que componen el bacterioma, la eliminación de una de ellas implica un destino análogo para los endosimbiontes que aloja. Resulta destacable que la pérdida de bacteriocitos coincide con el inicio del período reproductivo del áfido. Esta observación podría indicar que la pérdida de bacteriocitos es parte del mecanismo de inoculación de los embriones. De hecho, si tenemos en cuenta que, a lo largo del período reproductivo, el número de bacterias por bacteriocito oscila entre aproximadamente 130.000 y 175.000, y que se estima que el número de endosimbiontes inoculados a cada embrión es de unas 36700 bacterias [96], se deduce que se pueden inocular 3-5 embriones por bacteriocito. Si a lo largo del período reproductivo se eliminan al menos 35 bacteriocitos [67], se deduce que se pueden generar, suponiendo eficacia de transmisión perfecta, un mínimo de entre 105-175 descendientes. El número de descendientes de un áfido de la misma especie (*A.pisum*) y variedad (*Harris*) y criado en condiciones similares, bajo el supuesto de que sobreviva a lo largo de todo el período reproductivo, es de unos 108. Otras variantes de *A.pisum*

criadas en dos plantas diferentes pero a la misma temperatura (19.6 °C) produjeron, bajo el mismo supuesto, 52 y 66 descendientes [97].

Estos números parecen indicar dos apreciaciones. En primer lugar, las condiciones de cultivo así como la variedad de áfido parecen tener un impacto importante en la fecundidad del insecto, por lo que resulta conveniente tomar en consideración el orden de magnitud más que el número de descendientes específicos en las consideraciones en torno al modelo. En segundo lugar, parece existir un exceso potencialmente sustancial en el número de bacterias eliminadas en relación a las necesarias para inocular a los embriones. Esto se puede interpretar de distintas formas. Por una parte, puede indicar que, efectivamente, la disminución en el número de bacteriocitos es concomitante a la inoculación de los embriones, pero que este proceso es altamente ineficiente (nótese que se desconocen los detalles del proceso de inoculación [98]). Por otra parte, la degradación del bacterioma podría servir a otro propósito, por ejemplo, generar un pico de recurso para el áfido a través del consumo de los endosimbiontes, tal y como se sugiere en el caso del gorgojo de los cereales [68].

En resumen, todas estas consideraciones obligan a replantearse el modelo de dinámica bacteriana representado por la ecuación 3.2. En particular, se debe contrastar qué tipo de restricción (volumen o número de bacteriocitos) se ajusta mejor a los datos experimentales; así como incluir y comparar dos dinámicas de disminución en el número de bacteriocitos: una que imite la observación experimental, y otra proporcional al número de crías generadas por unidad de tiempo, es decir, de la fertilidad. La forma general de la ecuación diferencial que representa todas estas alternativas es:

$$dB/dt = \mu B (1 - B/\rho_K K) + H(t - t_c) \left[\frac{dB}{dt} \right]^{(-)} \quad (3.3)$$

donde K representa la restricción considerada (volumen total o número de bacteriocitos); ρ_K la densidad máxima correspondiente; H es la función escalón de Heaviside, situada en el tiempo de comienzo de la disminución del número de bacteriocitos; y $\left[\frac{dB}{dt} \right]^{(-)}$ representa la componente negativa de la variación en el número de endosimbiontes por unidad de tiempo, esto es, la cantidad de bacterias que se pierden como consecuencia de la degradación del bacterioma.

A lo largo de las secciones 3.2.2 y 3.2.3 se plantearán los modelos con desarrollo de bacterioma fijo bajo las restricciones por número de bacteriocitos y por volumen respectivamente. Ambos modelos se compararán al final de la sección 3.2.3, don-

de se determinará qué restricción resulta más razonable considerar. En la sección 3.2.4 se planteará el modelo con degradación del bacterioma asociada a fertilidad, donde además se comparará con los anteriores. En la sección 3.2.5 se discute la relación entre el metabolismo de los endosimbiontes (productividad por bacteria, tasa de crecimiento y la relación entre ambas) y el período pre-reproductivo (t_c). En la sección 3.2.6 se probará que, en un amplio rango de situaciones, no resulta conveniente para el áfido alimentarse de la bacteria. Finalmente, una vez concretados todos los aspectos del modelo que representa la dinámica bacteriana, se estudiará el comportamiento del mismo ante variaciones en sus parámetros en la sección 3.2.7.

3.2.2. Modelo con restricción por número de bacteriocitos y desarrollo del bacterioma fijo

Este modelo se construye como una modificación del presentado en la ecuación 3.2. En primer lugar, la restricción por volumen se sustituye por una basada en el número de bacteriocitos. En segundo lugar, a partir de t_c , las bacterias se eliminan proporcionalmente a la velocidad a la que desaparecen los bacteriocitos ($[\frac{dN}{dt}]^{(-)}$), siendo la constante de proporcionalidad la densidad de endosimbiontes en ese momento (*i.e.* el número de bacterias dividido por el número de bacteriocitos, B/N). La ecuación diferencial correspondiente es:

$$dB/dt = \mu B (1 - B/\rho_N N(t)) + H(t - t_c) \frac{B}{N} \frac{dN}{dt} \quad (3.4)$$

La ecuación 3.4 tiene la forma de una ecuación diferencial de Bernoulli [99] de orden 2 y puede, por tanto, integrarse:

$$B = \begin{cases} \frac{B_0 \rho_N e^{\mu t}}{B_0 \int_0^t (\mu/N) e^{\mu z} dz + \rho_N} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{B_{t_c} \rho_N N e^{\mu(t-t_c)}}{B_{t_c} (e^{\mu(t-t_c)} - 1) + \rho_N N_{t_c}} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.5)$$

donde B_0 representa el número inicial de endosimbiontes; y B_{t_c} y N_{t_c} el número de endosimbiontes y bacteriocitos a tiempo t_c respectivamente. Nótese que para $t > t_c$ no aparece integral explícita ya que esta puede integrarse para un N genérico.

Tal y como ha sido previamente descrito [67], el desarrollo del bacterioma en *Acyrtosiphon pisum* en número de células se ajusta, *grosso modo*, a un crecimiento

logístico seguido de una caída exponencial (ver figura 3.1).

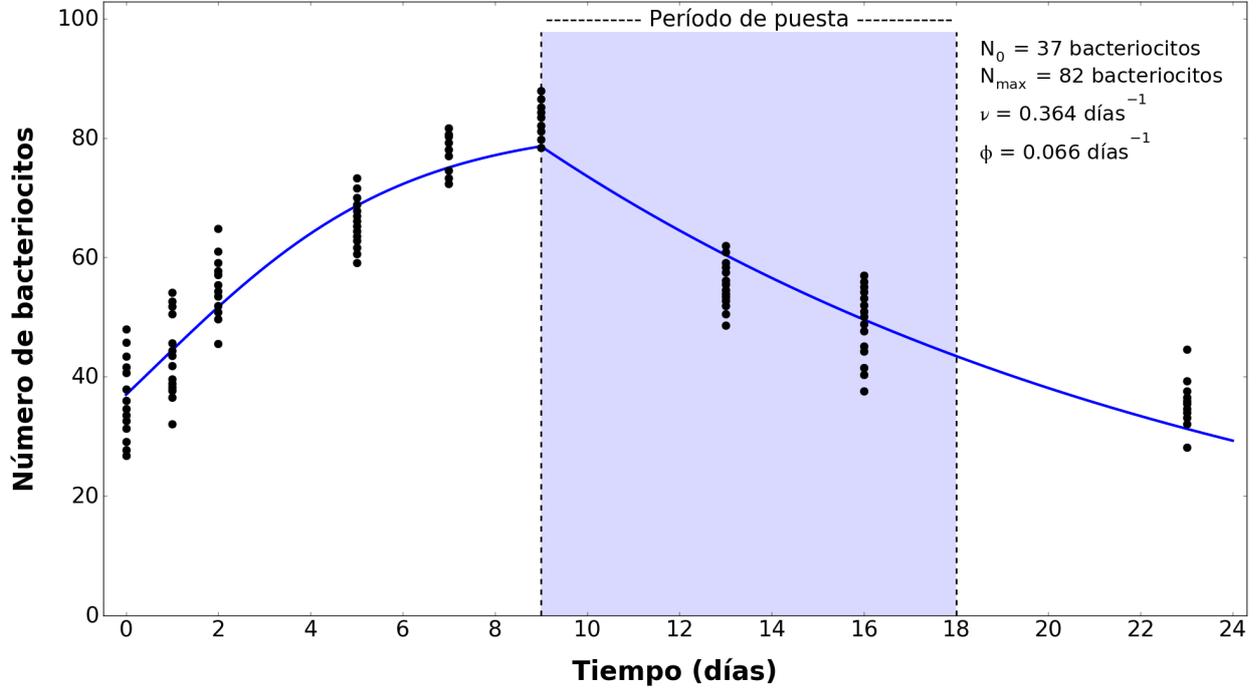


Figura 3.1: Representación de la dinámica de desarrollo del bacterioma en número de bacteriocitos. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros. El ajuste de los datos a la ecuación 3.6 se representa mediante la línea azul. Los resultados del ajuste en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura.

Si aceptamos este patrón como generalizable a otras especies, podemos expresar N como sigue:

$$N = \begin{cases} \frac{N_0 N_{max} e^{\nu t}}{N_{max} + N_0 (e^{\nu t} - 1)} & \text{si } t \leq t_c \\ N_{t_c} e^{-\phi(t-t_c)} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.6)$$

donde se observa que el número de células del bacterioma se incrementa, empezando con N_0 células, con una tasa de crecimiento exponencial ν , con un máximo asintótico definido por N_{max} , hasta t_c , momento en que el órgano, de N_{t_c} bacteriocitos, comienza a degradarse a una velocidad definida por el exponente ϕ (ver figura 3.1).

Finalmente, al sustituir la ecuación 3.6 en la 3.5 y resolviendo las integrales

pertinentes se obtiene:

$$B = \begin{cases} \frac{B_0 \rho_N N_{max} e^{\mu t}}{C_1 (e^{(\mu-\nu)t} - 1) + B_0 (e^{\mu t} - 1) + \rho_N N_{max}} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{B_{t_c} \rho_N N_{t_c} e^{(\mu-\phi)(t-t_c)}}{B_{t_c} (e^{\mu(t-t_c)} - 1) + \rho_N N_{t_c}} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.7)$$

donde $C_1 = B_0 \left(\frac{\mu}{\mu - \nu} \right) \left(\frac{N_{max} - N_0}{N_0} \right)$.

Una vez obtenida la ecuación explícita de la dinámica de B , es necesario comprobar si el modelo se ajusta razonablemente bien a los datos experimentales, o si, por el contrario, puede descartarse como inapropiado. Para ello, una vez fijados los parámetros correspondientes a la dinámica de N , se identificó el valor de los parámetros B_0 , ρ_N y μ que minimizan la suma de los cuadrados de las distancias entre los datos experimentales y los valores dados por el modelo. Los resultados de este ajuste se muestran en la figura 3.2.

El ajuste es bastante bueno para valores de $t < t_c$. Sin embargo, el modelo parece incapaz de reproducir adecuadamente la caída en el número de endosimbiontes. Más concretamente, parece imposible aproximarse al valor experimental de B a $t = 23$ sin alejarse sustancialmente de los valores correspondientes a otros tiempos. No debe considerarse, a pesar de todo, que la ecuación 3.7 es una mala aproximación experimental a la dinámica bacteriana observada. La razón esencial radica en la esperanza de vida de los áfidos en consideración. Tal y como se recoge en [67] (material suplementario), la supervivencia de los áfidos comienza a disminuir del 100 % a partir del día 16, alcanzando el 45 % a los 23 días y el 10 % a los 28 días. Esto quiere decir, que el punto al que es incapaz de aproximarse adecuadamente el modelo se corresponde a un tiempo de vida en el que sólo el 45 % de los áfidos sobreviven. Parece razonable suponer, en consecuencia, que la senescencia supone la violación de alguno de los supuestos sobre los que se han construido el modelo, esto es, o bien el insecto no se alimenta de suficiente savia como para mantener a los endosimbiontes en estado de saturación, o bien es incapaz de mantener la integridad estructural del bacterioma, o bien le resulta beneficioso generar un pico de recurso consumiendo la población bacteriana. De hecho, la violación de los citados supuestos puede ser beneficiosa en determinadas circunstancias. Supongamos, como ejemplo, que a partir de una determinada edad el áfido es incapaz de reproducirse y deja, además, de alimentarse de la planta: permitiría a los áfidos más jóvenes acceder a cantidades suficientes de savia y, por ende, incrementaría la supervivencia de la población. Adicionalmente, si se mantiene vivo mediante el consumo de sus propias estructuras, entre ellas el bacterioma y sus habitantes, se convertiría

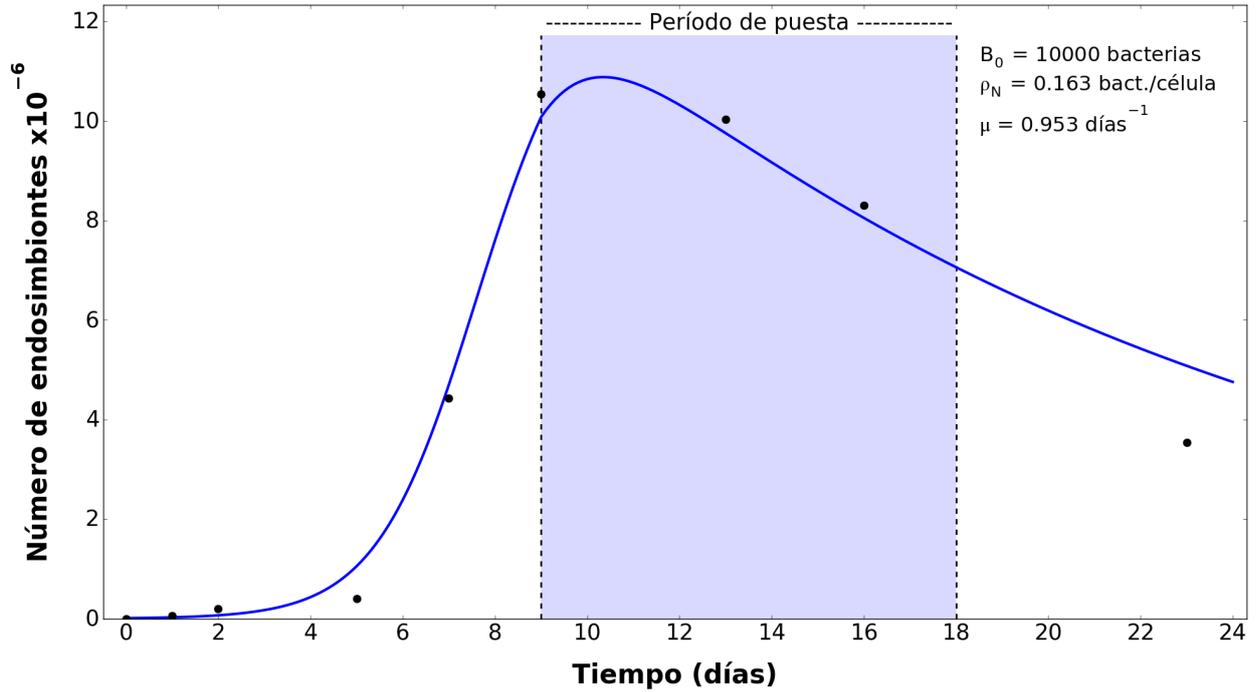


Figura 3.2: Representación de la dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el áfido. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros. El ajuste de los datos a la ecuación 3.7 se representa mediante la línea azul. Los resultados del ajuste en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura.

en una potencial presa de los diversos depredadores de la especie. Como el áfido en consideración ya no genera descendencia, su muerte no supone ningún perjuicio para la propagación de su estirpe. De hecho, implica lo contrario, ya que su muerte reemplaza la de otro ejemplar fértil. En definitiva, tomando en consideración que la etapa reproductiva de los áfidos termina en torno a los 18 días [67], que el desajuste del modelo se concentra fuera de este periodo, los datos de mortalidad y el posible impacto de la senescencia en la biología de los áfidos, se puede descartar el punto correspondiente a $t = 23$ (figura 3.3).

3.2.3. Modelo con restricción por volumen y desarrollo del bacterioma fijo

Este modelo está representado por la ecuación 3.3, tomando la restricción al crecimiento bacteriano (K) como el volumen del bacteriocito:

$$dB/dt = \mu B (1 - B/\rho_V V) + H(t - t_c) \frac{B}{N} \frac{dN}{dt} \quad (3.8)$$

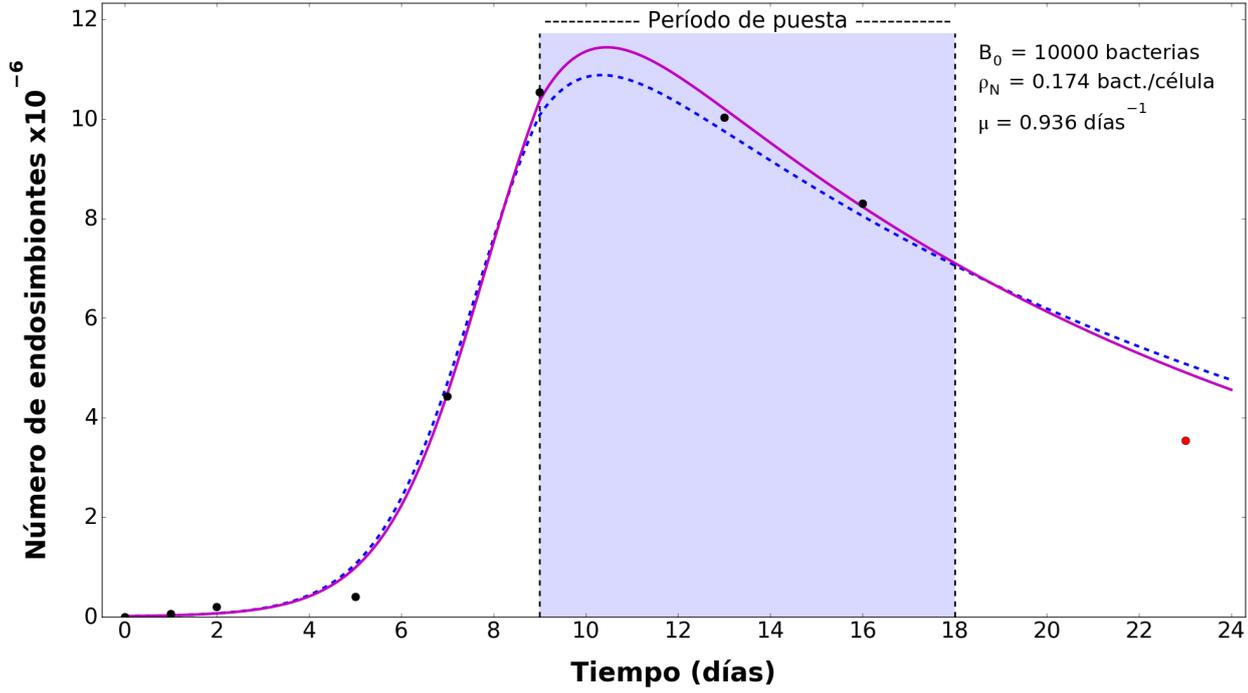


Figura 3.3: Representación de la dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el áfido con restricción por número de bacteriocitos. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. El ajuste de los datos a la ecuación 3.7 se representa mediante la línea morada. La línea azul discontinua representa el ajuste a *todos* los datos experimentales. Los resultados del ajuste correspondiente a la línea morada en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura.

donde V es el volumen del bacteriocito, ρ_V el número máximo de bacterias por unidad de volumen, N es el número de bacteriocitos, y H es la función escalón de Heaviside.

La expresión 3.8, de nuevo una ecuación diferencial de Bernoulli [99] de orden 2, puede integrarse analíticamente rindiendo:

$$B = \begin{cases} \frac{B_0 \rho_v e^{\mu t}}{B_0 \int_0^t (\mu/V(z)) e^{\mu z} dz + \rho_v} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{B_{t_c} \rho_v N e^{\mu(t-t_c)}}{B_{t_c} \int_{t_c}^t (\mu N(z)/V(z)) e^{\mu(z-t_c)} dz + \rho_v N_{t_c}} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.9)$$

donde, a diferencia del caso del modelo con restricción por número de bacteriocitos (ecuación 3.5), la integral necesaria para determinar B para $t > t_c$ no puede resolverse explícitamente.

Por otra parte, de los datos presentados en [67], no se puede extraer la función que representa el volumen total ya que, como se ha discutido previamente, se descarta en el modelo la disminución en el volumen por bacteriocito que comienza entre los 16-23 días. Para obtener dicha función, supondremos que el crecimiento del volumen es logístico, que la restricción de este crecimiento viene dada por el número de bacteriocitos a cada tiempo, y que toda disminución del volumen total es fruto de la disminución en dicho número. Estas consideraciones implican una ecuación diferencial análoga a la ecuación 3.4:

$$dV/dt = \omega V (1 - V/\mathcal{V}_N N(t)) + H(t - t_c) \frac{V}{N} \frac{dN}{dt} \quad (3.10)$$

donde ω es la tasa de crecimiento exponencial correspondiente, \mathcal{V}_N es el volumen máximo alcanzable por cada bacteriocito, y $[dN/dt]^{(-)}$ representa la componente de la variación de N con el tiempo que contribuye a su disminución.

La ecuación 3.10 tiene la forma de una ecuación diferencial de Bernoulli [99] de orden 2 y puede, por tanto, integrarse:

$$V = \begin{cases} \frac{V_0 \mathcal{V}_N e^{\omega t}}{V_0 \int_0^t (\omega/N) e^{\omega z} dz + \mathcal{V}_N} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{V_{t_c} \mathcal{V}_N N e^{\omega(t-t_c)}}{V_{t_c} (e^{\omega(t-t_c)} - 1) + \mathcal{V}_N N_{t_c}} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.11)$$

donde V_0 representa el volumen inicial del bacterioma; y V_{t_c} y N_{t_c} el volumen del bacterioma y el número de bacteriocitos a tiempo t_c respectivamente.

Incluyendo la expresión para N (ecuación 3.6) en 3.11 e integrando, obtenemos:

$$V = \begin{cases} \frac{V_0 \mathcal{V}_N N_{max} e^{\omega t}}{C_1 (e^{(\omega-\nu)t} - 1) + V_0 (e^{\omega t} - 1) + \mathcal{V}_N N_{max}} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{V_{t_c} \mathcal{V}_N N_{t_c} e^{(\omega-\phi)(t-t_c)}}{V_{t_c} (e^{\omega(t-t_c)} - 1) + \mathcal{V}_N N_{t_c}} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.12)$$

donde $C_1 = V_0 \left(\frac{\omega}{\omega - \nu} \right) \left(\frac{N_{max} - N_0}{N_0} \right)$.

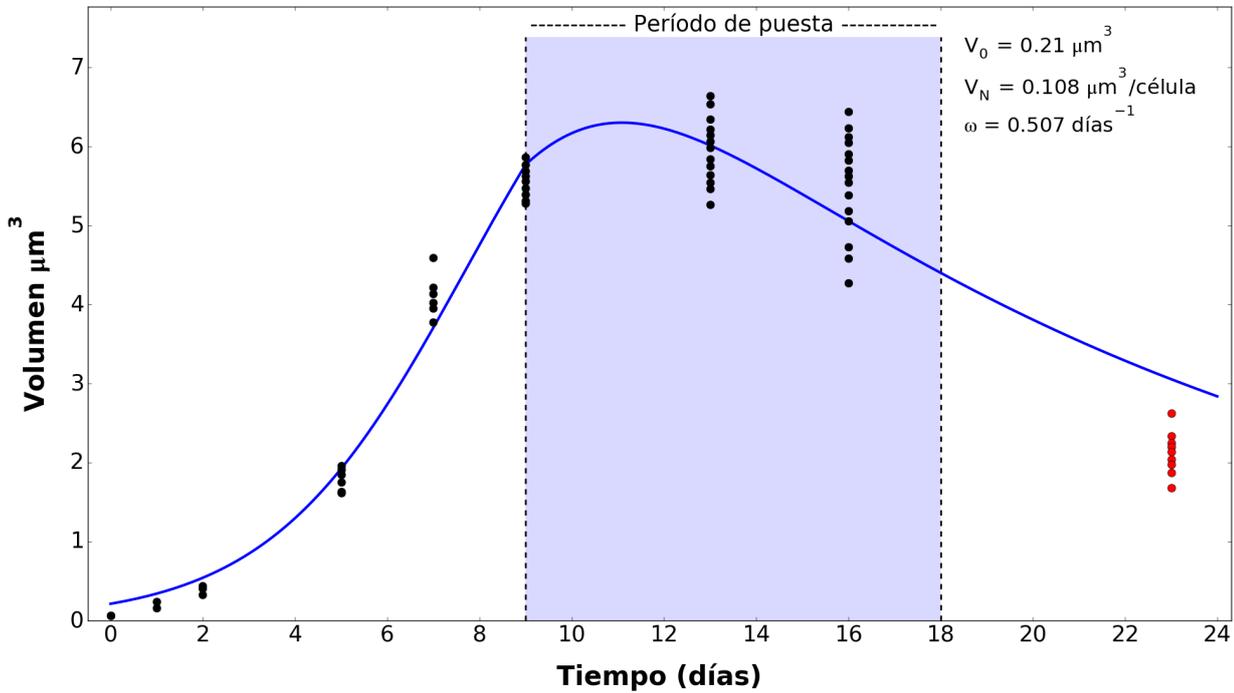


Figura 3.4: Representación del desarrollo del bacterioma del áfido en términos del volumen total del órgano. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. El ajuste de los datos a la ecuación 3.11 se representa mediante la línea azul. Los resultados del ajuste en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura.

Al ajustar la ecuación 3.11 a los datos de volumen total recogidos en [67], observamos que la expresión deducida se aproxima convenientemente a las observaciones experimentales (figura 3.4) con la excepción, ya discutida, de los puntos a $t = 23$.

Al incluirse las expresiones 3.6 y 3.12 en 3.9 y resolviendo las integrales presentes en dicha ecuación, se puede obtener la expresión explícita de la dinámica de B :

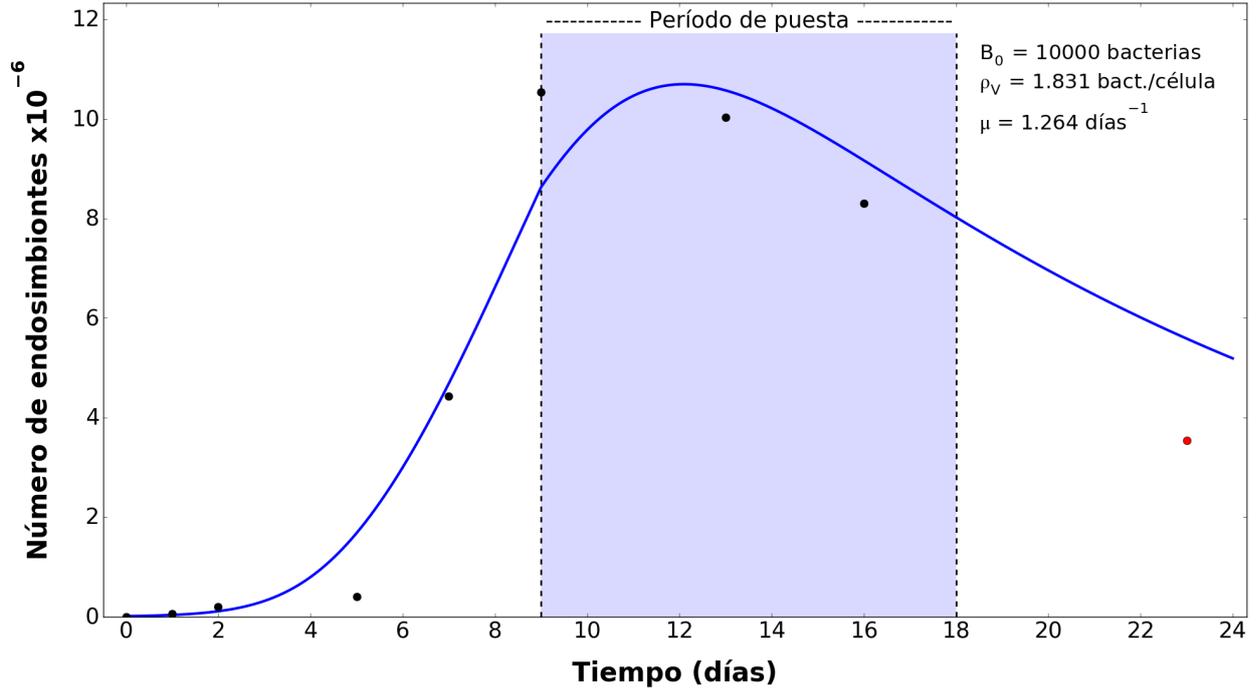


Figura 3.5: Representación de la dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el áfido con restricción por volumen. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. El ajuste de los datos a la ecuación 3.13 se representa mediante la línea azul. Los resultados del ajuste en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura.

$$B = \begin{cases} \frac{C_3 B_0 e^{\mu t}}{C_1 (e^{(\mu-\nu)t} - 1) + C_2 (e^{(\mu-\omega)t} - 1) + B_0 V_0 (e^{\mu t} - 1) + C_3} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{C_5 B_{t_c} e^{\mu(t-t_c)}}{C_4 (e^{(\mu-\omega)(t-t_c)} - 1) + B_{t_c} V_{t_c} (e^{\mu(t-t_c)} - 1) + C_5} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.13)$$

donde $C_1 = AB_0 \left(\frac{\mu}{\mu - \nu} \right); \quad C_2 = B_0 \left(\frac{\mu}{\mu - \omega} \right) (\mathcal{V}_N N_{max} - A - V_0);$

$$A = V_0 \left(\frac{\omega}{\omega - \nu} \right) \left(\frac{N_{max} - N_0}{N_0} \right); \quad C_3 = \mathcal{V}_N N_{max} B_0 \rho_V;$$

$$C_4 = B_{t_c} \left(\frac{\mu}{\mu - \omega} \right) (\mathcal{V}_N N_{t_c} - V_{t_c}); \quad C_5 = \mathcal{V}_N N_{t_c} B_{t_c} \rho_V$$

y B_{t_c} representa el número de endosimbiontes presentes en el bacterioma a tiempo t_c .

Una vez fijados los parámetros correspondientes a la dinámica de N y V , se procedió a la estimación de los parámetros exclusivos de la dinámica bacteriana (*i.e.* B_0 , ρ_V y μ). Los resultados del ajuste se recogen en la figura 3.5.

Una simple inspección visual demuestra que, a diferencia del caso de la restricción por N presentada en la sección 3.2.2 (ecuación 3.7), el modelo con desarrollo de bacterioma fijo y limitación por volumen no ajusta con una precisión deseable. En cualquier caso, y en pro de futuras disquisiciones, se comparó la bondad de ajuste de ambos modelos mediante el criterio de información de Akaike corregido (AIC_C , [100]), ver figura 3.6. Brevemente, el AIC_C es un estimador de la calidad relativa de distintos modelos que incorpora un término que penaliza aún más el exceso de parámetros (el AIC simple ya tiene en cuenta el número de parámetros libres de los modelos a comparar) de forma que lo hace compatible con conjuntos de datos pequeños. Cuanto menor es el AIC_C , más plausible es el modelo a la luz de los datos considerados. A partir de los valores de AIC_C obtenidos para los distintos modelos a comparar, se puede calcular una suerte de plausibilidad relativa, $\mathcal{L}_{rel}(i)$, que representa cómo de plausible es, dados unos datos, el modelo i con respecto al modelo de AIC_C mínimo. En el caso que nos ocupa, resulta evidente que se puede descartar el modelo restringido por V , con un $\mathcal{L}_{rel} = 2e - 5$, a favor del restringido por N .

3.2.4. Modelos con reducción en el número de endosimbiontes asociada a la fertilidad del áfido

Consideremos ahora el caso en que la reducción en el número de endosimbiontes en el compartimento materno de los áfidos se asocia, exclusivamente, a la inoculación de estos a la progenie. Bajo el supuesto de que el número de bacterias que se inoculan por embrión es constante (nótese que esta cifra incluye implícitamente la eficacia de inoculación), la ecuación diferencial correspondiente a la dinámica bacteriana es:

$$dB/dt = \mu B (1 - B/\rho_N N) - H(t - t_c) \epsilon F \quad (3.14)$$

donde ϵ es el número de endosimbiontes inoculados por embrión, y F es la función

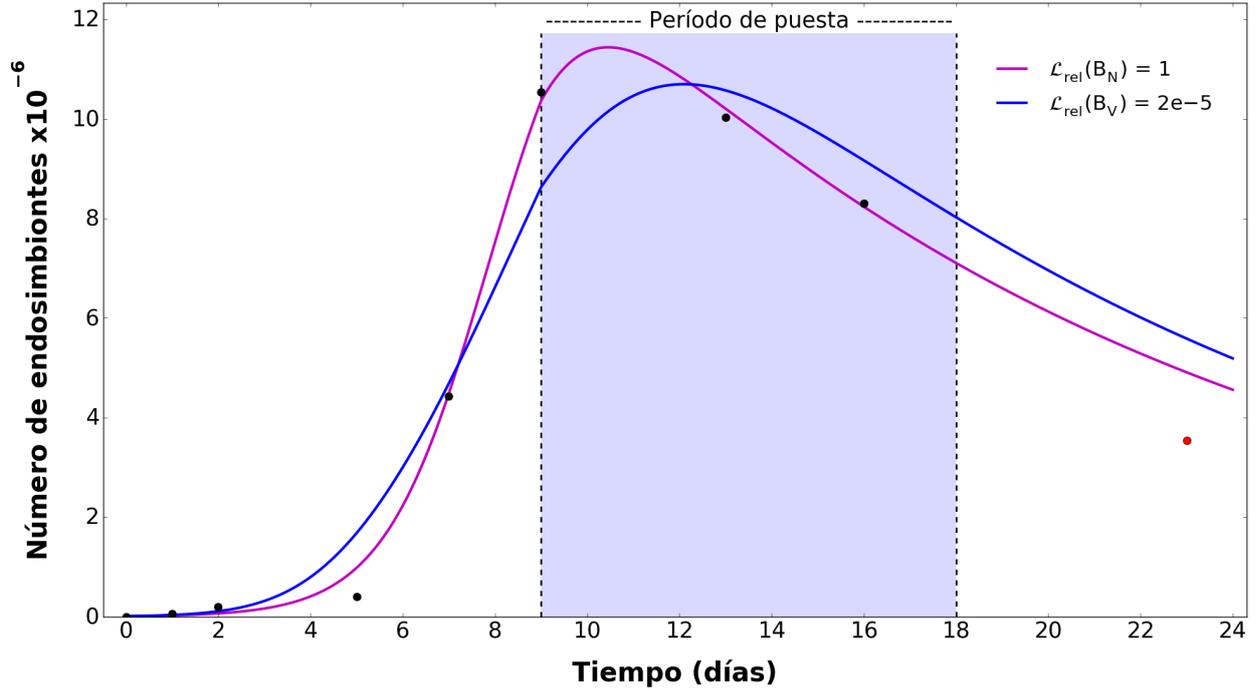


Figura 3.6: Comparativa de los modelos de dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el áfido con desarrollo de bacterioma fijo restringidos por N y por V . Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. El ajuste de los datos al modelo restringido por N (ecuación 3.7) se representa mediante la línea azul. El ajuste de los datos al modelo restringido por V (ecuación 3.13) se representa mediante la línea morada. La plausibilidad relativa (\mathcal{L}_{rel}) de cada modelo, calculada como $e^{\frac{AIC_C^{m^{in}} - AIC_C^i}{2}}$ se muestra explícitamente en la figura.

de fertilidad, definida como número de descendientes por unidad de tiempo.

La definición de F es, en última instancia, el eje central sobre el que se articula toda esta tesis, ya que vincula en último término el metabolismo de los endosimbiontes y la evolución de su número en el áfido, con la dinámica de poblaciones de este. Del mismo modo que en la construcción de todos los modelos anteriores se supuso que los endosimbiontes disponían de una fuente de sustratos *ad libitum*, una suposición que permitía considerar el desarrollo del bacterioma como único agente limitante del crecimiento bacteriano, se aceptará que la fertilidad del áfido no está limitada por la savia disponible para el insecto.

Adicionalmente, supondremos que no existe ninguna limitación intrínseca a la fertilidad, esto es, dados los recursos necesarios, el insecto puede engendrar descendencia sin límites. Todo esto implica, finalmente, que la fertilidad del áfido depende estrictamente de los compuestos producidos por los endosimbiontes.

Pero, ¿de qué forma depende la función de fertilidad de la dinámica bacteriana? Preliminarmente, se puede plantear la siguiente expresión:

$$F = Y_{EP}Y_{PB}(t, B, \dots) B \quad (3.15)$$

donde Y_{EP} representa el número de embriones que pueden generarse por unidad de producto generado por los endosimbiontes, e Y_{PB} es la productividad por bacteria, que potencialmente depende del tiempo, del número de endosimbiontes, y de otros parámetros dependientes del impacto de las variaciones en el contexto bacteriano en su metabolismo. Nótese que al introducir la productividad por bacteria en el modelo abrimos la puerta a la integración de modelos de máxima capacidad de producción, como son los estequiométricos basados en restricciones, una opción que se tratará en el capítulo 5.

Como primera aproximación, se puede considerar que el contexto bacteriano (*i.e.* entorno químico, acceso a recursos metabólicos, regulación, *etc*) es constante, con la salvedad de las variaciones en la tasa de crecimiento asociadas a la limitación de espacio en el bacterioma. Esto implica que construir la función Y_{PB} es equivalente a encontrar la relación entre la tasa de crecimiento bacteriano real μ^* , y la cantidad de recurso producido por bacteria. Resulta evidente que, sin un modelo del metabolismo de los endosimbiontes, obtener explícitamente esta relación es imposible. Sin embargo, parece sensato suponer, *a priori*, que esta relación es bien estrictamente no creciente o bien estrictamente no decreciente. Para que esto no fuese así, tendrían que darse situaciones en la que la producción de recurso fuese proporcional a la tasa de crecimiento bacteriano cuando esta toma valores bajos, y que a velocidades de crecimiento elevadas esta proporcionalidad se pierda; o bien el caso contrario. Si bien estas situaciones son concebibles, no representan casos habitualmente descritos en la literatura.

Aceptando la suposición de monotonidad no estricta, caben tres posibilidades :

1. El recurso producido por los endosimbiontes es un subproducto de su crecimiento (función creciente, figura 3.7, panel 'Proporcional').
2. El recurso se genera de forma independiente al crecimiento (función constante, figura 3.7, panel 'Independiente').
3. El recurso es necesario para el crecimiento bacteriano (función decreciente, figura 3.7, panel 'Competitiva').

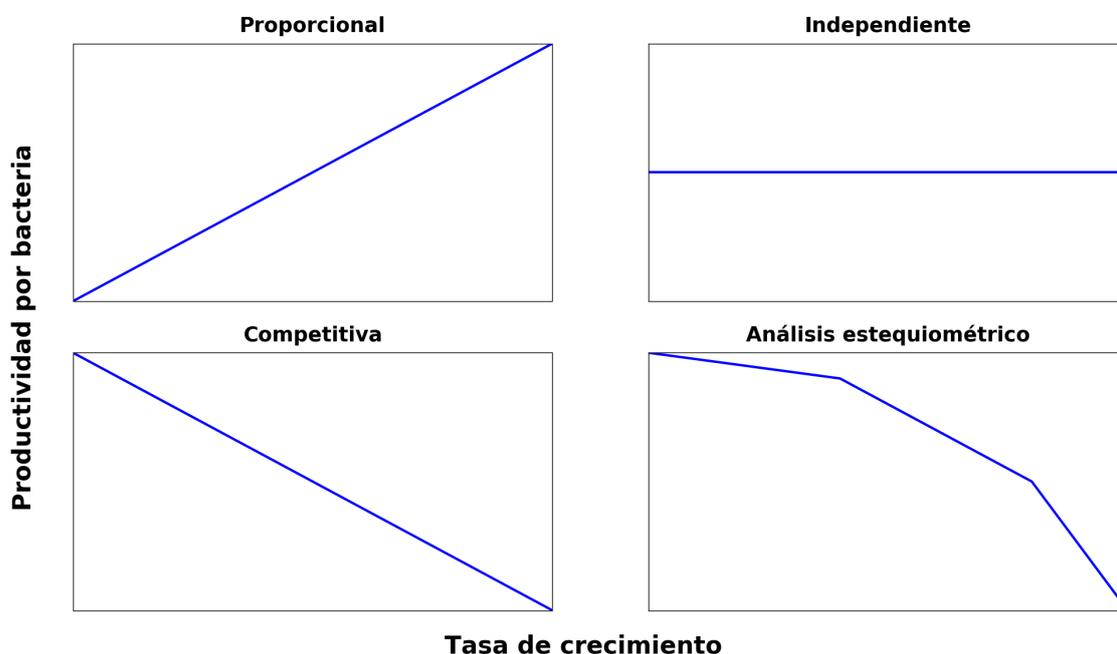


Figura 3.7: Representación de distintas relaciones entre la productividad (cantidad de producto por unidad de tiempo) por bacteria y la tasa de crecimiento real, $\mu^* = \mu(1 - B/\rho_N N)$. El panel titulado 'Proporcional' ilustra el caso en que el producto se genera acoplado al crecimiento. El panel titulado 'Independiente' ilustra el caso en que la producción y el crecimiento, dadas unas restricciones, no están relacionadas. El panel titulado 'Competitiva' ilustra el caso en que el crecimiento limita la generación de producto, el caso más creíble en el caso de la producción de aminoácidos. Finalmente, el panel titulado 'Análisis estequiométrico' ilustra el tipo de relación que se obtendría mediante el estudio de la red metabólica del endosimbionte mediante análisis estequiométrico.

Teniendo en cuenta que el recurso generado por los endosimbiontes de áfidos son aminoácidos, esta última opción parece la más probable. En cualquier caso, la forma específica de la curva que representa la relación entre producción y crecimiento sigue sin poder determinarse. Ante esta vicisitud, aplicaremos la navaja de Ockham y supondremos una relación lineal, ya que es la forma más sencilla capaz de representar las tres opciones comentadas previamente. Es conveniente destacar que bajo las suposiciones habituales en torno al estudio del metabolismo desde la perspectiva del análisis estequiométrico [101], (ver figura 3.7, panel 'Análisis estequiométrico'), la relación buscada viene definida, necesariamente, por una colección de líneas rectas.

Finalmente, atendiendo a lo discutido hasta ahora, podemos expresar F mediante la siguiente relación lineal:

$$F = Y_{EP} \left[(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0) \left(\frac{\mu^*}{\mu} \right) + Y_{PB}^0 \right] B \quad (3.16)$$

donde Y_{PB}^μ y Y_{PB}^0 representan la productividad por bacteria cuando la tasa de crecimiento real es máxima y cero respectivamente; y el cociente $\frac{\mu^*}{\mu}$ representa la fracción de la tasa de crecimiento máxima a la que está operando la población bacteriana, que depende del tiempo.

Recordemos que, tal y como se plantea en la ecuación 3.14, el crecimiento bacteriano está inhibido por densidad, de forma que la fracción de la tasa de crecimiento máxima viene definida, precisamente, por el término que define dicha inhibición:

$$\frac{\mu^*}{\mu} = 1 - B/\rho_N N \quad (3.17)$$

Conocida la expresión de $\frac{\mu^*}{\mu}$ y sustituyéndola en 3.16, se obtiene la forma explícita de F :

$$F(t) = Y_{EP} \left[Y_{PB}^\mu - \frac{(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0)}{\rho_N N(t)} B(t) \right] B(t) \quad (3.18)$$

Una vez concretada la forma de F , es necesario plantear las ecuaciones correspondientes a la variación en el número de bacteriocitos.

Uno de los fundamentos de la construcción de este modelo es la suposición de que la disminución en el número de bacteriocitos observada experimentalmente se asocia al proceso de inoculación de los endosimbiontes a la progenie. Esto implica que, en la aproximación continua, cada vez que se inocula una bacteria, se pierde una cantidad de bacteriocitos de forma que la densidad bacteriana se conserva:

$$dN/dt = \nu N (1 - N/N_{max}) - H(t - t_c) \epsilon \frac{N}{B} F \quad (3.19)$$

La ecuación 3.14 no puede integrarse analíticamente en general. Sin embargo, en el caso particular de que la productividad sea independiente de la tasa de crecimiento (figura 3.7, panel 'Independiente'), sí que se puede obtener una expresión explícita

de la dinámica bacteriana. Si bien este caso se podría interpretar como anecdótico, lo cierto es que es una buena aproximación en un amplio abanico de situaciones. El primer caso, y el más evidente, es cuando la relación entre productividad y tasa de crecimiento es casi constante, esto es, $(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0) \approx 0$. Un segundo caso es cuando la máxima tasa de crecimiento bacteriano es mucho mayor que la velocidad de crecimiento del bacterioma (*i.e* $\mu \gg \nu$, ecuación 3.6). La razón es simple: si se cumple esta condición, la población bacteriana crecerá de forma proporcional a como crece el bacterioma, ya que cada pequeño incremento del bacterioma vendrá acompañado de un incremento concomitante y casi instantáneo de la población de bacterias que recupera la saturación (nótese que esta afirmación puede probarse fácilmente calculando el límite cuando μ tiende a infinito en las expresiones 3.13 y 3.7 a $t < t_c$, la etapa donde se representa sólo el crecimiento). Esto implica que $\mu^* \in (0, \nu)$ o $\mu^* \in (0, \omega)$ según el caso. Puesto que bajo este supuesto $\mu \gg \nu$ o $\mu \gg \omega$, únicamente si $|Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0| \gg 0$ la productividad por bacteria podría variar de forma apreciable a lo largo del tiempo. Nótese que *E.coli* presenta tasas de crecimiento de $5-30 \text{ días}^{-1}$ [102], y que el rango de tasas de crecimiento de bacterias del género *Mycobacterium*, un género de bacterias intracelulares caracterizado por su lento crecimiento, oscila entre $1-10 \text{ días}^{-1}$ [103]; y que el valor de ν estimado es de 0.364 días^{-1} . Estos datos implican que la aproximación es razonablemente buena en casos de reciente adquisición del endosimbionte así como durante las primeras etapas de la degradación metabólica de este. Esto es especialmente cierto al tener en cuenta que el áfido comienza a reproducirse cuando el bacterioma está completamente desarrollado y la población bacteriana cercana a saturación, hechos que implican una μ^* relativamente próxima a cero a $t \geq t_c$. Esta observación, de hecho, extiende la validez de la aproximación a tasas de crecimiento próximas, pero no inferiores, a la del bacterioma; siempre y cuando, como se ha indicado antes, $|Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0|$ no sea muy grande. En el caso de que μ sea lo suficientemente bajo como para que a $t = t_c$ la población de endosimbiontes no esté próxima a saturación, la aproximación dejaría de ser válida.

Finalmente, la aproximación es también válida para valores de μ próximos a cero, ya que, a lo largo del desarrollo, la población de endosimbiontes estaría tan lejos de saturar el bacterioma que $\mu^* \approx \mu$ durante toda la vida del áfido.

En definitiva, en muchos escenarios podemos considerar F directamente proporcional al número de bacterias:

$$F = Y_{EP} Y_{PB}^* B \quad (3.20)$$

donde Y_{PB}^* representa el valor de la productividad por bacteria derivado de considerar μ^*/μ constante en la ecuación 3.16.

Sustituyendo 3.20 en 3.19 e integrando, se obtiene la expresión explícita de la dinámica del número de bacteriocitos:

$$N = \begin{cases} \frac{N_0 N_{max} e^{\nu t}}{N_{max} + N_0 (e^{\nu t} - 1)} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{N_{t_c} N_{max} e^{\nu'(t-t_c)}}{N_{max} + N_{t_c} [\nu/\nu'] (e^{\nu'(t-t_c)} - 1)} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.21)$$

donde $\nu' = (\nu - \epsilon Y_{EP} Y_{PB}^*)$.

Finalmente, a partir de las expresiones 3.14, 3.20 y 3.21 se obtienen las expresiones explícitas de la dinámica bacteriana:

$$B = \begin{cases} \frac{B_0 \rho_N N_{max} e^{\mu t}}{C_1 (e^{(\mu-\nu)t} - 1) + B_0 (e^{\mu t} - 1) + \rho_N N_{max}} & \text{si } t \leq t_c \\ \frac{B_{t_c} \rho'_N N_{max} e^{\mu'(t-t_c)}}{C_2 (e^{(\mu'-\nu')(t-t_c)} - 1) + B_{t_c} (e^{\mu'(t-t_c)} - 1) + C_3} & \text{si } t > t_c \end{cases} \quad (3.22)$$

donde $\mu' = \mu - \epsilon Y_{EP} Y_{PB}^*$; $\nu' = \nu - \epsilon Y_{EP} Y_{PB}^*$; $\rho'_N = \left[\frac{\nu'}{\nu} \right] \left[\frac{\mu'}{\mu} \right] \rho_N$;

$$C_1 = B_0 \left(\frac{\mu}{\mu - \nu} \right) \left(\frac{N_{max} - N_0}{N_0} \right); \quad C_2 = B_{t_c} \left(\frac{\mu'}{\mu' - \nu'} \right) \left(\frac{N_{max} - [\nu/\nu'] N_{t_c}}{[\nu/\nu'] N_{t_c}} \right);$$

y $C_3 = \rho'_N N_{max}$.

Una vez definido el modelo, se procede al ajuste de los datos experimentales, al igual que en los casos anteriores (ver figura 3.8 para el ajuste de N y figura 3.9 para el de B).

Las conclusiones principales tras la inspección de las figuras 3.8 y 3.9 pueden resumirse en tres puntos:

- El ajuste del modelo dependiente de fertilidad, con independencia de la relación entre producción y crecimiento, es de gran precisión.

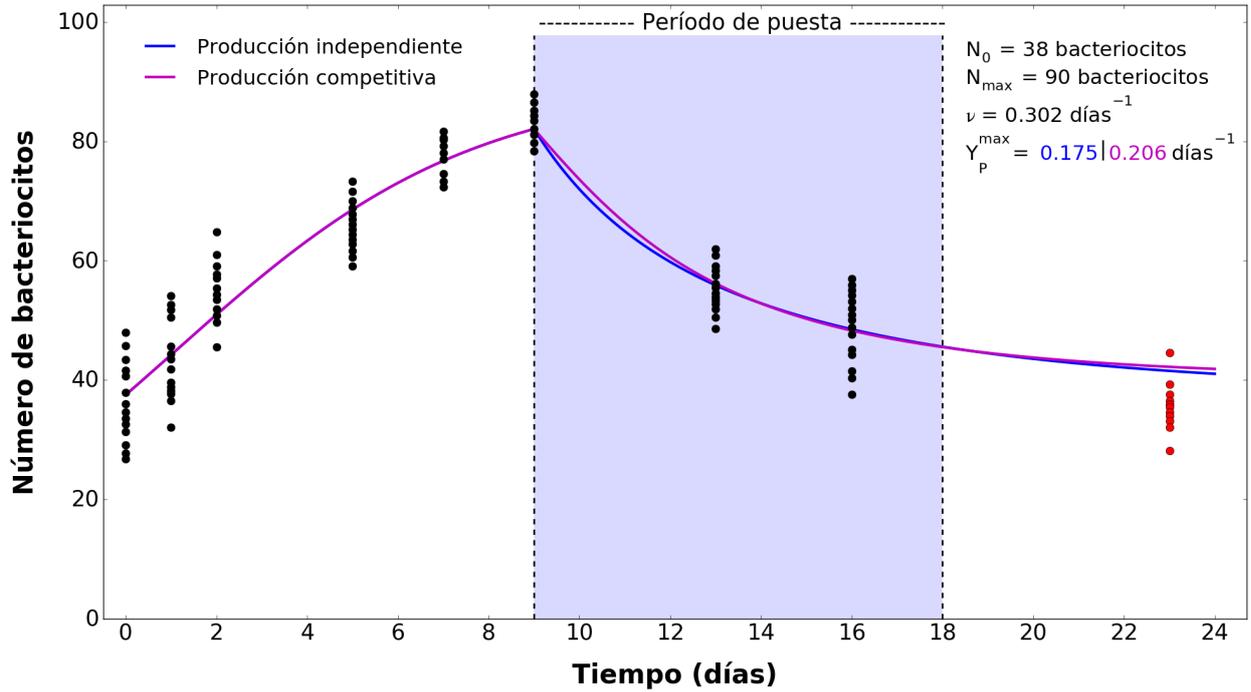


Figura 3.8: Representación del desarrollo del bacterioma del áfido en términos del número de bacteriocitos. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. La línea azul representa el caso de producción independiente del crecimiento ($Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, figura 3.7, panel 'Independiente'). La línea morada representa el caso de producción inversamente proporcional al crecimiento ($Y_{PB}^\mu = 0$, figura 3.7, panel 'Competitiva'). Los resultados del ajuste en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura.

- La diferencia entre la máxima productividad (Y_{PB}^0) correspondiente al caso de producción independiente ($Y_P^{max} = 0,175$, ver figura 3.9), e inversamente proporcional al crecimiento ($Y_P^{max} = 0,206$, ver figura 3.9), es sustancial en términos relativos ($>15\%$). Esto quiere decir que, para los parámetros obtenidos durante el ajuste, la aproximación de $\frac{\mu^*}{\mu}$ constante es válida sólo cualitativamente.
- La incapacidad del modelo de ajustar la dinámica bacteriana a $t = 23$ es mucho más marcada que en el caso de los modelos con desarrollo de bacterioma fijo. De hecho, tal y como se infiere de la ecuación 3.22, si $\mu > \nu$, el número de endosimbiontes no se aproxima a cero. Esta observación implica que, de considerar el modelo dependiente de fertilidad válido, las consideraciones discutidas en la sección 3.2.2 al respecto de la validez de los modelos en la última etapa de vida del áfido se hacen imprescindibles.

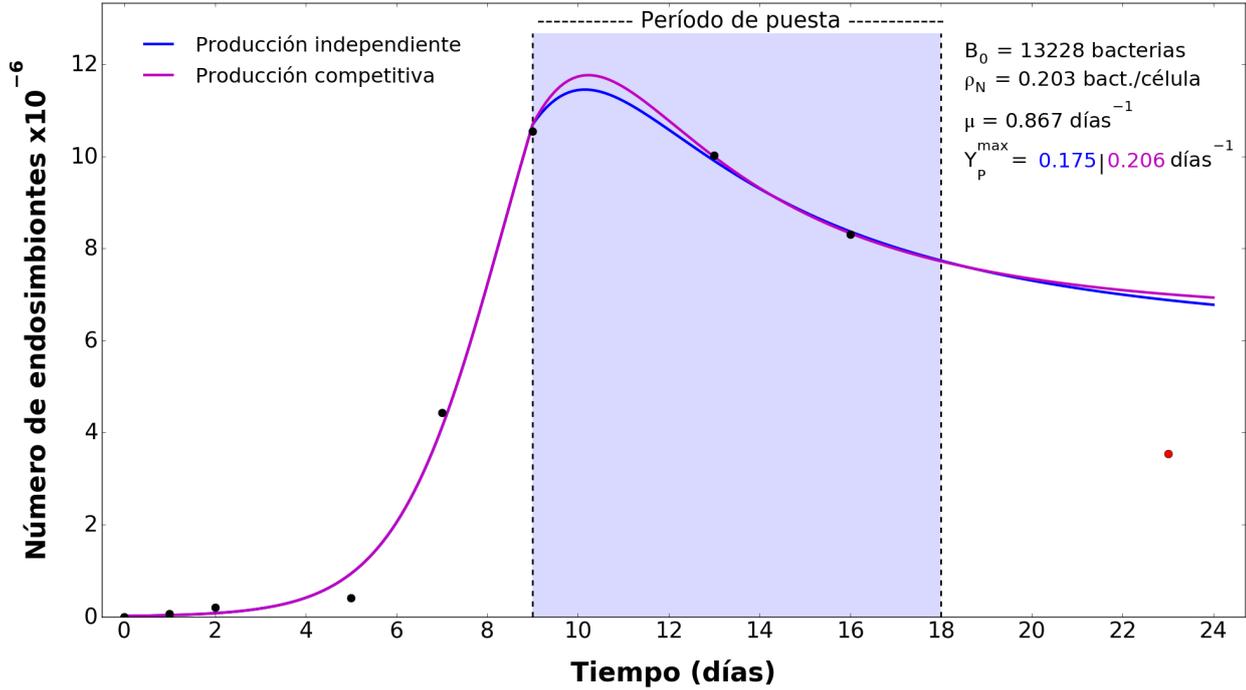


Figura 3.9: Representación de la dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el áfido. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. La línea azul representa el caso de producción independiente del crecimiento ($Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, figura 3.7, panel 'Independiente'). La línea morada representa el caso de producción inversamente proporcional al crecimiento ($Y_{PB}^\mu = 0$, figura 3.7, panel 'Competitiva'). Los resultados del ajuste en términos de los valores de los parámetros a optimizar se muestran explícitamente en la figura. Nótese que $Y_P^{max} = \epsilon Y_{EP} Y_{PB}^0$

Sin embargo, antes de confirmar la validez de los modelos, es necesario comprobar que el valor del producto del número de endosimbiontes transferidos por embrión parido ϵ , el número de embriones generables por unidad de producto Y_{EP} , y la cantidad de producto generado por cada 10^6 bacterias y por día (Y_{PB}^0), representado en el ajuste como un único parámetro (Y_P^{max}), es razonable. En primer lugar, ϵ toma un valor de en torno a 0.0367×10^6 bacterias por embrión si la eficacia de inoculación es del 100% [96]. En segundo lugar, el peso seco aproximado de un insecto recién nacido es de $60 \mu g$ [104]. De esta masa, se puede estimar que en torno al 19% [105] debe ser producida por los endosimbiontes si aceptamos que el producto generado por estos son aminoácidos esenciales. Por tanto, el valor de Y_{EP} es del orden de 0.09 embriones por μg de producto. Dado que el Y_P^{max} calculado es de en torno a 0.2 días^{-1} , el valor de Y_{PB}^0 debe ser de, a lo más, $60 \mu g$ de producto por cada 10^6 bacterias y por día. Si se toma como referencia *E. coli*, se estima que se producen entre 0.5 y 1 mmol de aminoácido por mmol de glucosa consumida [106].

Considerando que el consumo de glucosa es de unos 10 mmol por gramo de peso seco de bacteria por hora [107] y que el peso seco de una bacteria es del orden del picogramo [108], se deduce que se generan entre $1.2-2.4 \cdot 10^{-4}$ mmol de aminoácido por cada 10^6 bacterias y por día. El peso molecular de un aminoácido es de entre 75.07 y 204.23 g/mol. Por tanto, se puede concluir a partir de estos datos que el valor de Y_{PB}^0 debería ser del orden de 9-50 μg de producto por cada 10^6 bacterias y por día. Se puede concluir, a la sazón de estas cifras, que el valor de Y_P^{max} obtenido del ajuste es razonable, en términos de orden de magnitud. Nótese que los cálculos efectuados son altamente aproximados y que se ha considerado que ningún endosimbionte se pierde en el proceso de inoculación, por lo que las diferencias observadas podrían estar justificadas.

Una vez demostrado que el modelo dependiente de fertilidad es compatible con los datos experimentales, se hace necesario resolver si es preferible ceñirse a este, o al modelo con desarrollo de bacterioma fijo restringido por N (sección 3.2.2). Para comparar ambas aproximaciones, se recurrió de nuevo al AIC_C (ver sección 3.2.3) para establecer qué modelo es más plausible de cara a su compatibilidad con la dinámica observada tanto de N (figura 3.10) como de B (figura 3.11).

Los resultados son claros: los modelos dependientes de fertilidad son aparentemente más plausibles que el modelo con desarrollo de bacterioma fijo en lo que a los datos de N se refiere. Sin embargo, debido a que la distribución y número de datos resultan evidentemente insuficientes para decantarse por un modelo u otro (sería necesario enriquecer la información experimental a partir del noveno día), no es conveniente fiarse ciegamente de la calidad de los ajustes. A pesar de todo, los modelos dependientes de fertilidad presentan una ventaja esencial respecto al modelo con desarrollo de bacterioma fijo: son capaces de reproducir el desarrollo y degradación del bacterioma a partir de sus supuestos, y es esta capacidad explicativa la que decanta la balanza a su favor.

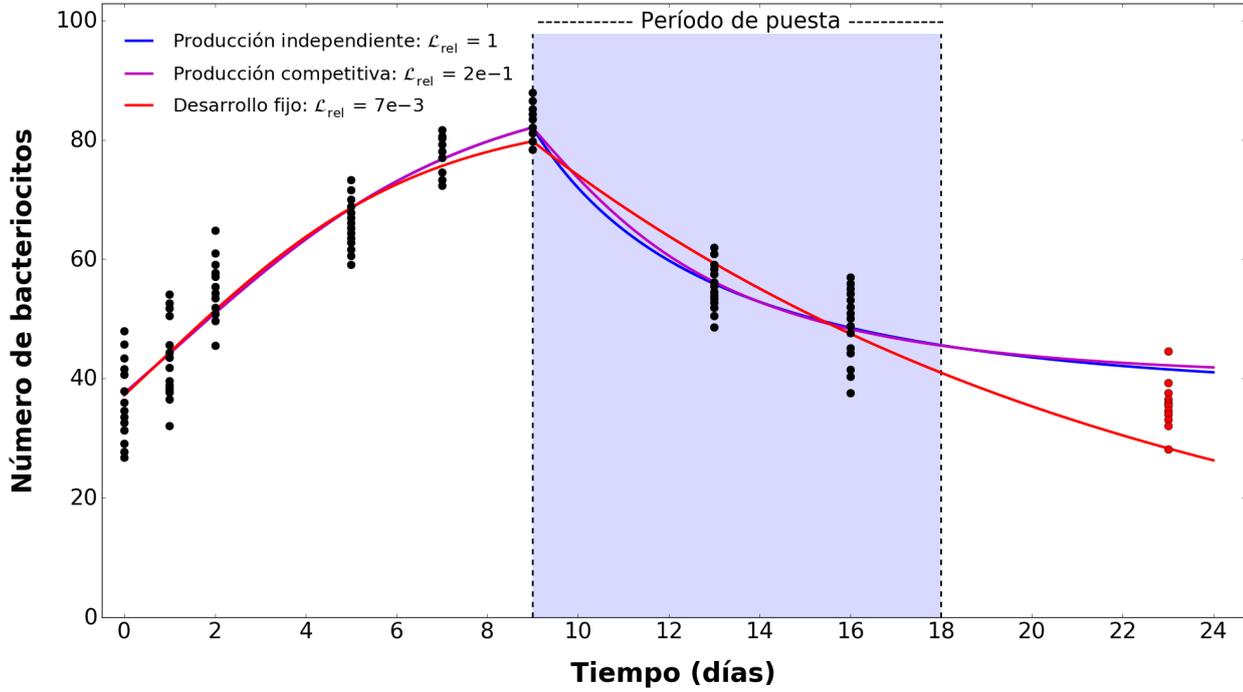


Figura 3.10: Comparativa de los modelos de dinámica de crecimiento del bacterioma en término del número de bacteriocitos dependiente de fertilidad y con desarrollo fijo. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. El ajuste de los datos al modelo dependiente de fertilidad, con producción independiente del crecimiento (ecuación 3.14, $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, figura 3.7, panel 'Independiente') se representa mediante la línea azul. El ajuste de los datos al modelo dependiente de fertilidad, con producción dependiente del crecimiento (ecuación 3.14, $Y_{PB}^\mu = 0$, figura 3.7, panel 'Competitiva') se representa mediante la línea morada. El ajuste de los datos al modelo con desarrollo del bacterioma fijo (ecuación 3.6) se representa mediante la línea roja. La plausibilidad relativa (\mathcal{L}_{rel}) de cada modelo, calculada como $e^{\frac{AIC_C^{min} - AIC_C^i}{2}}$, se muestra explícitamente en la figura.

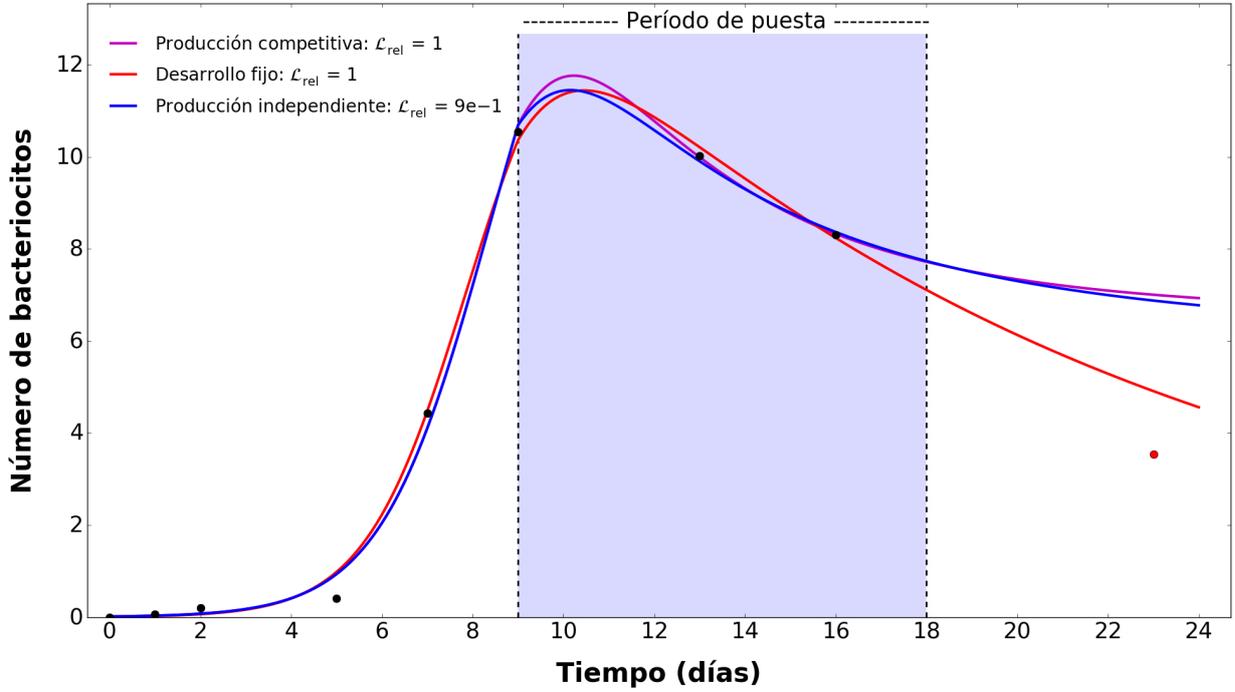


Figura 3.11: Comparativa de los modelos de dinámica de crecimiento de los endosimbiontes en el áfido dependiente de fertilidad y con desarrollo fijo. Los valores experimentales extraídos de [67] se representan como puntos negros, con la salvedad del correspondiente a $t = 23$, que se excluye del ajuste y se indica en rojo. El ajuste de los datos al modelo dependiente de fertilidad, con producción independiente del crecimiento (ecuación 3.18, $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, figura 3.7, panel 'Independiente') se representa mediante la línea azul. El ajuste de los datos al modelo dependiente de fertilidad, con producción dependiente del crecimiento (ecuación 3.19, $Y_{PB}^\mu = 0$, figura 3.7, panel 'Competitiva') se representa mediante la línea morada. El ajuste de los datos al modelo con desarrollo del bacterioma fijo (ecuación 3.7) se representa mediante la línea roja. La plausibilidad relativa (\mathcal{L}_{rel}) de cada modelo, calculada como $e^{\frac{AIC_C^{min} - AIC_C^i}{2}}$, se muestra explícitamente en la figura, con $Y_P^{max} = \epsilon Y_{EP} Y_{PB}^0$

3.2.5. Sobre el significado de t_c y su impacto en el modelado

Hasta ahora el parámetro t_c , considerado fijo, simbolizaba, simplemente, el momento en que el bacterioma comienza a degradarse. Sin embargo, como se ha apuntado anteriormente, la coincidencia entre el inicio del período reproductivo del áfido y la citada degeneración llevan a plantearse si esta consideración resulta apropiada. En concreto, parece sensato suponer que el inicio del período reproductivo viene determinado por uno de dos factores: o bien la cantidad de nutrientes a los que tiene acceso el áfido es suficiente como para que el momento en el que alcanza la madurez sexual dependa de factores intrínsecos que pueden asumirse fijos; o bien la disponibilidad de nutrientes es la que define dicho momento. De darse el primer caso, el t_c es constante y no hay más que añadir. En el segundo, y puesto que se acepta que los áfidos disponen de acceso *ad libitum* a la savia que los sustenta, se hace necesario relacionar el t_c con la productividad de los endosimbiontes.

Afortunadamente, una vez obtenido un modelo adecuado para la productividad bacteriana (ecuación 3.18, prescindiendo del término Y_{EP} , que únicamente permite obtener la productividad en forma de embriones por unidad de tiempo), el cálculo del t_c es sencillo, ya que únicamente hay que calcular el tiempo necesario para generar la cantidad de producto que implica el crecimiento y maduración sexual del insecto:

$$\Delta I = \int_0^{t_c} \left[Y_{PB}^\mu - \frac{(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0)}{\rho_N N(t)} B(t) \right] B(t) dt \quad (3.23)$$

donde ΔI representa la cantidad de producto necesaria para que el áfido alcance la madurez sexual; y $N(t)$ y $B(t)$ se calculan a partir del modelo deseado (ecuaciones 3.14 y 3.19 tras el análisis efectuado en las secciones 3 y 4).

El incremento de masa seca de un áfido desde que nace hasta que comienza a reproducirse es de unos $630 \mu g$ [104], de los cuales un 19% son aminoácidos esenciales [105], supuestamente producidos por los endosimbiontes. Atendiendo a esto, podemos estimar ΔI en unos $120 \mu g$ de producto. Fijados los valores de los parámetros que definen N (figura 3.8), se puede calcular el valor de t_c para distintos valores de μ así como de Y_{PB}^0 para los casos de producción competitiva ($Y_{PB}^\mu = 0$, figura 3.7, panel 'Competitiva') e independiente ($Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, figura 3.7, panel 'Independiente'), ver figura 3.12.

Una primera inspección de la figura 3.12 revela que la relación entre la productividad y la tasa de crecimiento bacteriano resulta crítica en el cálculo del t_c para valores de μ relativamente bajos. Este hecho deriva de que en las primeras etapas del desarrollo de la población bacteriana, la densidad de endosimbiontes es relati-

vamente baja, por lo que la tasa de crecimiento real de la población, que depende de esta densidad ($\mu(1 - B/\rho_N N)$) es, en consecuencia, relativamente elevada. Esto hace que en el caso de la producción competitiva con el crecimiento (*i.e* cuanto más rápido crezca la población bacteriana, menor es su productividad, figura 3.7, panel 'Competitiva'), la producción por parte de los endosimbiontes a tiempos cortos se ve apreciablemente afectada, incrementando sustancialmente el t_c .

Una segunda observación, de gran relevancia en lo que concierne a determinar el impacto de las variaciones en la máxima capacidad productiva y de crecimiento de los endosimbiontes, es que la influencia de la productividad es esencialmente nula a partir de un valor de Y_{PB}^0 bastante bajo (≈ 10). Un comentario análogo puede hacerse en relación a la tasa de crecimiento μ , cuya influencia sobre el t_c , se vuelve esencialmente inapreciable a partir de un $\mu = 5$, una tasa de crecimiento en el rango de las determinadas para bacterias del género *Mycobacterium*.

Por otra parte, es necesario discutir si el t_c calculado a partir de la ecuación 3.23 es compatible con los valores de μ y $\epsilon Y_{EP} Y_{PB}^0$ obtenidos del ajuste experimental (figura 3.9, sección 3.2.4), y la observación experimental de que el período reproductivo comienza, aproximadamente, el noveno día. Al fijar el valor de μ a 0.867, se observa que, para obtener un t_c entre 8.5 y 9.5 días, es necesario un valor de Y_{PB}^0 de entre 10.5 y 25 μg de producto por cada 10^6 bacterias y por día en el caso de producción competitiva (figura 3.7, panel 'Competitiva'), y de entre 4.6 y 8 en el caso de producción independiente (figura 3.7, panel 'Independiente'), para un valor de $Y_{EP} = 0,09$ embriones por μg de producto. Puesto que el caso más probable es el de producción competitiva, ya que el recurso suministrado por el áfido son aminoácidos, el intervalo a tener en cuenta es de entre 10.5 y 25 μg de producto por cada 10^6 bacterias. Sin embargo, estos valores son incompatibles con los deducidos en la sección 3.2.4) bajo el supuesto de inoculación perfecta. Para cuadrar las cifras, es necesario considerar que la eficiencia en la transferencia de endosimbiontes de la madre a los embriones sea de entre el 17 y el 40%. Esta ineficiencia en la inculación sería sintomática de un mecanismo que implique la liberación transitoria de endosimbiontes al medio extracelular, y no uno que se sustente en la formación de canales o la formación de vesículas de transporte. Afortunadamente, observaciones del proceso de inoculación *in vivo* apuntan a un mecanismo de inoculación del primer tipo [98], por lo que, hasta disponer de valores experimentales más fiables, se pueden aceptar los valores de eficiencia estimados. Nótese, sin embargo, que las estimaciones de Y_{EP} así como de ΔI son, a lo más, groseras, y pueden afectar apreciablemente a los valores de eficiencia obtenidos.

Finalmente, puesto que el objetivo último de lo aquí planteado es estudiar qué variaciones en la máxima capacidad productiva y de crecimiento de los endosimbiontes son fijables en la población de áfidos, es necesario establecer cuándo las capacidades metabólicas de los endosimbiontes no pueden reducir aún más el valor de t_c . Nótese que el crecimiento del áfido, así como el de los embriones que aloja,

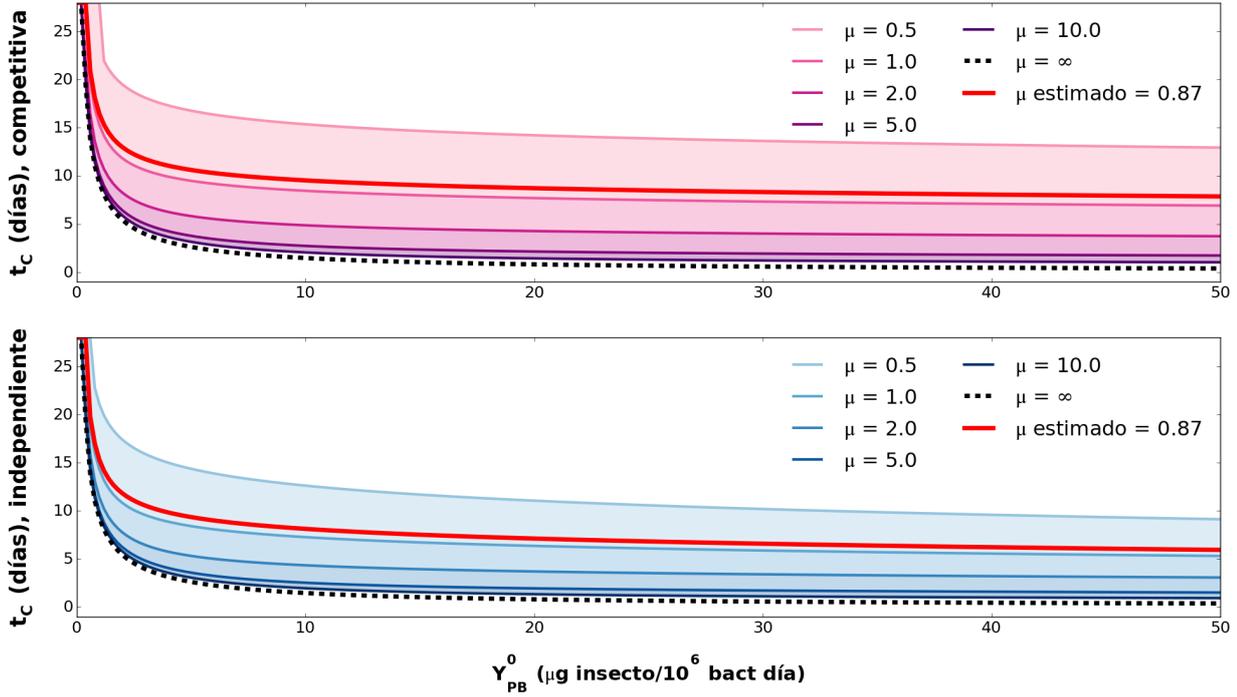


Figura 3.12: Impacto de la tasa de crecimiento (μ) y la productividad máxima (Y_{PB}^0) en el inicio del periodo reproductivo (t_c) en los casos de producción independiente (figura 3.7, panel 'Independiente', ecuación 3.18, $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, panel superior) y dependiente de crecimiento (figura 3.7, panel 'Competitiva', ecuación 3.19, $Y_{PB}^\mu = 0$, panel inferior). Los distintos valores de μ se representan mediante un gradiente de color en el que los tonos más oscuros corresponden a valores superiores. El caso límite de $\mu = \infty$ se indica con la línea punteada negra. Los valores correspondientes al μ estimado mediante el ajuste de los datos experimentales de [67] al modelo de dinámica bacteriana dependiente de fertilidad (sección 3.2.4, ver figura 3.9) se representan mediante la línea roja. Los valores de t_c se calcularon a partir de la ecuación 3.23 con un $\Delta I = 120 \mu\text{g}$ y los valores de los parámetros de N obtenidos del ajuste representado en 3.8.

debe proceder a una velocidad del orden de los eucariotas, por lo que no resulta *a priori* creíble que el t_c pueda tomar un valor demasiado bajo. Sin embargo, especies de áfidos como *Aulacorthum solani*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Uroleucon ambrosiae* presentan un t_c mínimo de unos 2 días [109]. En cualquier caso, tomando en consideración que para $\mu = 10$ y valores elevados de productividad el t_c obtenido es de en torno a 1 día, no merece la pena establecer un límite inferior a este parámetro.

3.2.6. Impacto de la fagocitosis de endosimbiontes en la productividad del áfido

En la sección 3.2.1 se planteó la posibilidad de que la disminución en el número de endosimbiontes a lo largo de la vida del áfido podía asociarse a dos causas.

La primera, la inoculación, potencialmente ineficiente, de bacterias a los embriones de insecto. La segunda, la obtención de un pico de recurso mediante ingesta de bacterias para abordar la etapa reproductiva de forma lo más temprana y eficiente posible. La primera causa se abordó en detalle en la sección 3.2.4, donde se mostró que la dinámica bacteriana observada se puede explicar adecuadamente recurriendo estrictamente a la pérdida de bacterias asociada al proceso de inoculación. La segunda, se discutirá a lo largo de esta sección.

En concreto, se tratará de contestar a la pregunta: ¿resulta conveniente para el áfido alimentarse de los endosimbiontes? Nótese que obtener una respuesta completa implica, en última instancia, determinar cuántos endosimbiontes deberían consumirse a cada tiempo, para maximizar el *fitness* del insecto. Esto supone el uso de cálculo variacional, ya que se debe obtener la función que maximiza una determinada función objetivo que representa dicho *fitness*. Las técnicas de optimización desarrolladas en el contexto del cálculo variacional, sin embargo, son de particular complejidad. A pesar de estas limitaciones, se trató de plantear y resolver el problema haciendo uso del paquete de *software* *APMonitor* [110].

Los resultados apuntaron a que, en un amplísimo rango de situaciones, no resulta conveniente ejercer ningún control activo sobre la población de endosimbiontes. Sin embargo, a la luz de lo comentado, la conclusión obtenida se aceptó de manera preliminar. Con objeto de contrastarla, se planteó la siguiente pregunta: ¿existe algún momento en el que el consumo súbito de una determinada cantidad de bacterias resulte conveniente al áfido? Esta cuestión, si bien no resuelve exhaustivamente el problema planteado al inicio de la sección, permite emplear técnicas matemáticas habituales para respaldar o desmentir la idea de que, en la mayoría de situaciones, la inacción es la mejor forma de control de la población de endosimbiontes.

El primer paso en la resolución del problema consiste en definir matemáticamente el significado de 'conveniente', esto es, construir una función objetivo. Puesto que se trabaja bajo el supuesto de que la fertilidad del áfido depende, en exclusiva, de la capacidad de la producción de los endosimbiontes que aloja, parece sensato articular esta función objetivo en torno a esta capacidad.

En la sección 3.2.4 se discutió la forma de la función que representa la producción por unidad de tiempo (ecuación 3.18, prescindiendo del término Y_{EP} , que únicamente permite obtener la productividad en forma de embriones por unidad de tiempo). Sin embargo, no se planteó el caso en que a un determinado tiempo se consuma una determinada cantidad de bacterias. Para obtener una expresión válida para este caso, hay que considerar únicamente que a tiempo de la perturbación $t = \tau$, la producción definida por la ecuación 3.18 (prescindiendo del término Y_{EP}) se incrementa una cantidad igual a la fracción de la masa bacteriana que suponga el producto, en este caso, aminoácidos. Además, en ese mismo instante, la población bacteriana se reducirá una cierta cantidad, por lo que la dinámica bacteriana y, po-

tencialmente, el desarrollo del bacterioma, se verán afectados a partir de $t > \tau$. El impacto específico dependerá de cómo se consuman los endosimbiontes. Si las bacterias se degradan intracelularmente, el bacterioma no se ve afectado, y la dinámica bacteriana cambiará al eliminarse una cierta cantidad de individuos de la población. Por otro lado, si las bacterias se eliminan consumiendo una fracción del bacterioma, tanto la dinámica bacteriana como el desarrollo del bacterioma se verán afectados, ya que la eliminación de endosimbiontes supone la degradación concomitante de una cantidad de bacterioma tal que la densidad de bacterias se conserva. Atendiendo a estas consideraciones, la expresión general de la productividad incluyendo el caso del consumo instantáneo de bacterias toma la siguiente forma:

$$P(t, \tau, \Delta B) = \begin{cases} \left[Y_{PB}^\mu - \frac{(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0)}{\rho_N N(t, 0, N_0)} B(t, 0, B_0) \right] B(t, 0, B_0) + \\ \quad + \delta(t - \tau) Y_\phi \Delta B & \text{si } t \leq \tau \\ \left[Y_{PB}^\mu - \frac{(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0)}{\rho_N N(t, \tau, N_\tau(1 - \mathcal{I} \Delta B / B_\tau))} B(t, \tau, B_\tau - \right. \\ \quad \left. - \Delta B) B(t, \tau, B_\tau - \Delta B) \right] & \text{si } t > \tau \end{cases} \quad (3.24)$$

donde τ es el tiempo en el que se consumen las bacterias; $\delta(t - \tau)$ es la función delta de Dirac centrada en τ ; Y_ϕ es la cantidad de producto que se obtiene por bacteria consumida; ΔB es el número de bacterias consumidas; $N_\tau = N(\tau, 0, N_0)$; $B_\tau = B(\tau, 0, B_0)$; \mathcal{I} toma un valor de 0 si las bacterias se consumen intracelularmente, y de 1 si se consumen mediante la degradación del bacterioma, conservando la densidad de endosimbiontes constante; y $B(t, z, B_z)$ y $N(t, z, N_z)$ corresponden a las ecuaciones 3.25 y 3.26, explicadas a continuación.

Las dinámicas de B y N , necesarias para evaluar la productividad P , se han discutido ampliamente en anteriores secciones. En particular, se trabajará con las ecuaciones 3.21 y 3.22 para $t < t_c$, ya que tener en cuenta la pérdida de bacterias y bacteriocitos asociados a la fertilidad únicamente complica los cálculos. Nótese que, a pesar de que estas ecuaciones están definidas como aproximaciones, son exactas para $t \leq t_c$, por lo que no existen problemas de imprecisión en su uso. Por cuestiones de conveniencia en términos de notación, a lo largo de la presente sección se emplearán las siguientes versiones de las ecuaciones 3.21 y 3.22 en las que el tiempo

inicial deja de ser 0 para incluirse como un parámetro a especificar. Además, en el caso de B , se divide el numerador y el denominador por el número de bacterias a tiempo inicial:

$$N(t, z, N_z) = \frac{N_z N_{max} e^{\nu(t-z)}}{N_{max} + N_z (e^{\nu(t-z)} - 1)} \quad (3.25)$$

$$B(t, z, B_z) = \frac{B_z \rho_N N_{max} e^{\mu(t-z)}}{C'_1 (e^{(\mu-\nu)(t-z)} - 1) + (e^{\mu(t-z)} - 1) + \rho_N N_{max} / B_z} \quad (3.26)$$

donde $C'_1 = \left(\frac{\mu}{\mu - \nu} \right) \left(\frac{N_{max} - N_z}{N_z} \right)$; z es el tiempo que se toma como inicial; y N_z y B_z representan el número de bacteriocitos y de endosimbiontes en el tiempo inicial, respectivamente.

Al comparar ahora la productividad bacteriana con consumo ($P_{con} = P(t, \tau, \Delta B)$) y sin consumo ($P_{ref} = P(t, \infty, 0)$), y atendiendo a la ecuación 3.24, se observa que (ver figura 3.13):

- P_{con} es idéntico a P_{ref} hasta $t = \tau$.
- P_{con} es superior a P_{ref} en $Y_\phi \Delta B$ a $t = \tau$, ya que es el instante en que se consumen los endosimbiontes.
- P_{con} es estrictamente menor a P_{ref} a partir de $t = \tau$, debido a la disminución de la población de endosimbiontes en el primer caso, ya que la productividad se incrementa con esta.

Atendiendo a esto, resultaría conveniente alimentarse de la población de endosimbiontes si el pico de producto obtenido a tiempo $t = \tau$ compensa la pérdida en la productividad que se produce a partir de entonces a sazón de la disminución en el número de bacterias. Pero, dado que un aumento de fertilidad temprano da más tiempo a la descendencia del áfido para tener, a su vez, descendientes, es razonable suponer que consumos de bacterias tempranos deben tener más peso que consumos tardíos, por lo que una función objetivo apropiada sería:

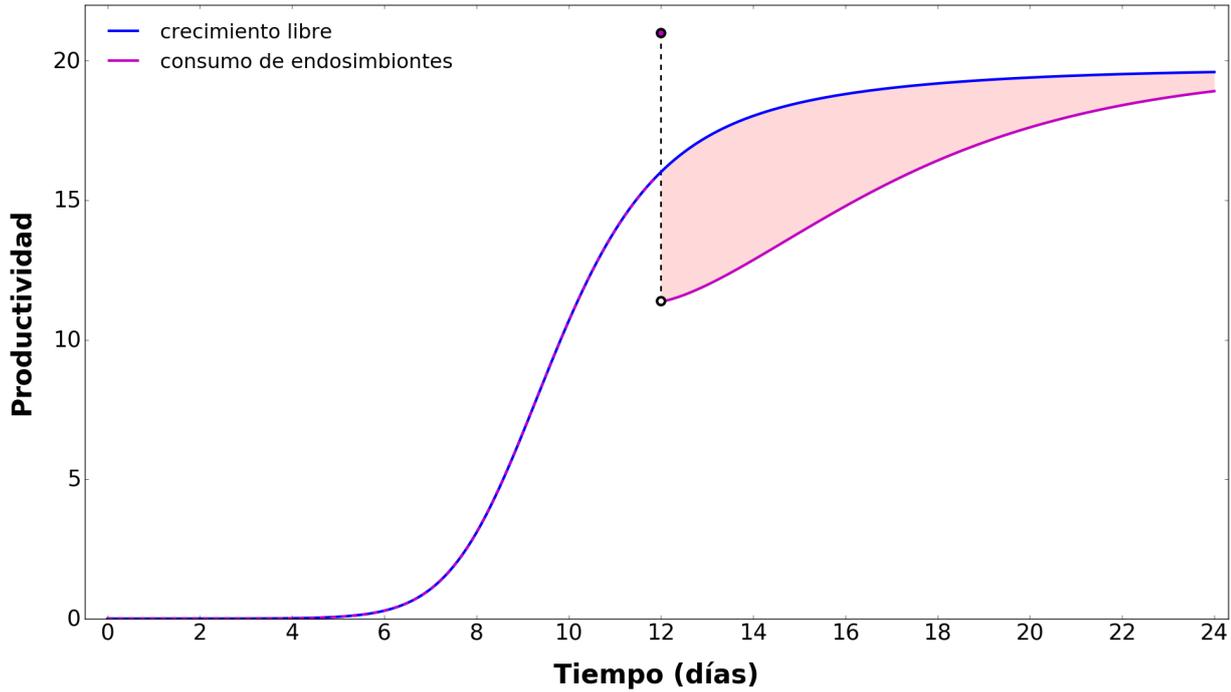


Figura 3.13: Impacto en la productividad del consumo puntual de endosimbiontes. La línea azul representa la productividad sin que haya consumo bacteriano. La línea morada representa la productividad con consumo bacteriano a tiempo = 12 días. La pérdida de productividad que se debe compensar mediante el producto obtenido a través del consumo bacteriano (punto morado) se representa mediante el área roja semitransparente.

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} [P_{con} - P_{ref}] dt \quad (3.27)$$

donde $P_{con} = P(t, \tau, \Delta B)$; $P_{ref} = P(t, \infty, 0)$; r es un parámetro que se variará arbitrariamente; y t_f es la esperanza de vida del áfido. El término exponencial se incluye para, modulando r , discutir casos en los que resulte más conveniente incrementar la productividad de forma temprana. La elección de esta función de pesos no es arbitraria, ya que la forma de la ecuación 3.27 reproduce la de la ecuación de Euler-Lotka [111], que permite calcular la tasa de crecimiento de una población libre de restricciones con generaciones solapantes, tal y como es el caso de los áfidos. Nótese que en los límites de integración ya se ha tenido en cuenta que las productividades son idénticas hasta $t = \tau$.

Una vez formulada una función objetivo razonable, se puede, finalmente, identificar en qué circunstancias resulta conveniente consumir endosimbiontes (*i.e.* casos

en que $\mathcal{F} > 0$), si es que tales circunstancias existen. Comenzaremos con el caso de consumo intracelular de bacterias ($\mathcal{I} = 0$ en la ecuación 3.24). Sustituyendo en la ecuación 3.27 obtenemos:

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[Y_{PB}^{\mu} (B_{con} - B_{ref}) - \frac{(Y_{PB}^{\mu} - Y_{PB}^0)}{\rho_N N_{ref}} (B_{con}^2 - B_{ref}^2) + \delta(t - \tau) Y_{\phi} \Delta B \right] dt \quad (3.28)$$

donde $B_{con} = B(t, \tau, B_{\tau} - \Delta B)$; $B_{ref} = B(t, \tau, B_{\tau})$ y $N_{ref} = N(t, \tau, N_{\tau})$. Desarrollando la diferencia de cuadrados:

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[Y_{PB}^{\mu} (B_{con} - B_{ref}) - \frac{(Y_{PB}^{\mu} - Y_{PB}^0)}{\rho_N N_{ref}} (B_{con} + B_{ref}) (B_{con} - B_{ref}) + \delta(t - \tau) Y_{\phi} \Delta B \right] dt \quad (3.29)$$

Definiendo la densidad a tiempo t como $\rho_{ref} = B_{ref}/N_{ref}$ (análogamente $\rho_{con} = B_{con}/N_{ref}$):

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[Y_{PB}^{\mu} (B_{con} - B_{ref}) - (Y_{PB}^{\mu} - Y_{PB}^0) \left(\frac{\rho_{con}}{\rho_N} + \frac{\rho_{ref}}{\rho_N} \right) (B_{con} - B_{ref}) + \delta(t - \tau) Y_{\phi} \Delta B \right] dt \quad (3.30)$$

Se puede considerar $Y_{PB}^{\mu} - Y_{PB}^0 \leq 0$, ya que el caso contrario implica que la tasa de crecimiento de los endosimbiontes es proporcional a la productividad, una situación difícil de concebir en el caso de la producción de aminoácidos, como es el caso del áfido. Atendiendo a esto, definimos $\alpha = Y_{PB}^{\mu}/Y_{PB}^0$. Puesto que resulta evidente que

$B_{con} - B_{ref} < 0$, se puede reexpresar la ecuación 3.30 de forma que cada término de la integral, con la salvedad del signo que lo precede, es positivo:

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[-Y_{PB}^0 \alpha (B_{ref} - B_{con}) - \right. \\ \left. - Y_{PB}^0 (1 - \alpha) \left(\frac{\rho_{con}}{\rho_N} + \frac{\rho_{ref}}{\rho_N} \right) (B_{ref} - B_{con}) + \delta(t - \tau) Y_{\phi} \Delta B \right] dt \quad (3.31)$$

Con objeto de simplificar el análisis, y dado que estamos interesados en identificar los casos en los que $\mathcal{F} > 0$ (*i.e.* situaciones en las que resulta conveniente consumir una determinada cantidad de bacterias), se realizarán diversas aproximaciones que reduzcan el valor de los términos negativos de la integral. Estas modificaciones implican que, si se deduce a partir de la aproximación que no resulta conveniente alimentarse de endosimbiontes, la conclusión será cierta también en el caso sin aproximar. Comencemos considerando que $(\rho_{ref}/\rho_N + \rho_{\phi}/\rho_N) > \rho_{ref}/\rho_N$:

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) < \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[-Y_{PB}^0 \alpha (B_{ref} - B_{con}) - \right. \\ \left. - Y_{PB}^0 (1 - \alpha) \frac{\rho_{ref}}{\rho_N} (B_{ref} - B_{con}) + \delta(t - \tau) Y_{\phi} \Delta B \right] dt \quad (3.32)$$

Como $\rho_{ref}/\rho_N < 1$, resulta evidente que el valor de α para el que el valor de la integral es máximo es $\alpha = 0$:

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) < \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[-Y_{PB}^0 \frac{\rho_{ref}}{\rho_N} (B_{ref} - B_{con}) + \delta(t - \tau) Y_{\phi} \Delta B \right] dt \quad (3.33)$$

Resolviendo la integral del término que contiene a la función delta:

$$\mathcal{F}(\tau, \Delta B) < \int_{\tau}^{t_f} -Y_{PB}^0 \frac{\rho_{ref}}{\rho_N} (B_{ref} - B_{con}) e^{-rt} dt + Y_{\phi} \Delta B e^{-r\tau} \quad (3.34)$$

Sustituyendo $\mathcal{F} = 0$ y despejando:

$$\frac{Y_{\phi}}{Y_{PB}^0} > \frac{1}{\Delta B} \int_{\tau}^{t_f} \frac{\rho_{ref}}{\rho_N} (B_{ref} - B_{con}) e^{-r(t-\tau)} dt \quad (3.35)$$

Por otra parte:

$$B_{ref} = \frac{\rho_N N_{max} e^{\mu(t-\tau)}}{C_1 (e^{(\mu-\nu)(t-\tau)} - 1) + (e^{\mu(t-\tau)} - 1) + \rho_N N_{max}/B_{\tau}} \quad (3.36)$$

$$B_{con} = \frac{\rho_N N_{max} e^{\mu(t-\tau)}}{C_1 (e^{(\mu-\nu)(t-\tau)} - 1) + (e^{\mu(t-\tau)} - 1) + \rho_N N_{max}/(B_{\tau} - \Delta B)} \quad (3.37)$$

siendo B_{τ} el número de bacterias a tiempo $t = \tau$; y $C_1 = \left(\frac{\mu}{\mu - \nu} \right) \left(\frac{N_{max} - N_0}{N_0} \right)$.

A partir de 3.36 y 3.37 y operando:

$$B_{ref} - B_{con} = \frac{\Delta B \rho_N^2 N_{max}^2 e^{\mu(t-\tau)}}{[K(t)B_{\tau} + \rho_N N_{max}]^2 - \Delta B K(t) [K(t)B_{\tau} + \rho_N N_{max}]} \quad (3.38)$$

siendo $K(t) = C_1 (e^{(\mu-\nu)(t-\tau)} - 1) + (e^{\mu(t-\tau)} - 1)$.

Simplificando el denominador de 3.38 haciendo $\Delta B = 0$ (de forma que $B_{ref} - B_{con}$

toma un valor menor que el real) y sustituyendo en la desigualdad 3.35:

$$\frac{Y_\phi}{Y_{PB}^0} > \int_{\tau}^{t_f} \frac{\rho_{ref} \rho_N N_{max}^2 e^{(\mu-r)(t-\tau)}}{[C_1 (e^{(\mu-\nu)(t-\tau)} - 1) B_\tau + (e^{\mu(t-\tau)} - 1) B_\tau + \rho_N N_{max}]^2} dt \quad (3.39)$$

La desigualdad 3.39 tiene la ventaja de no depender de ΔB , por lo que, fijados los parámetros de la dinámica de N y de B , los valores de Y_ϕ/Y_{PB}^0 para los cuales el consumo intracelular de endosimbiontes es conveniente pueden estimarse variando únicamente τ , μ y r . Puesto que la integral en 3.39 es, en general, decreciente con μ (datos no mostrados), y dado que r (que no debe tomar valores demasiado altos) pierde influencia conforme μ crece, los cálculos se efectuaron fijando un valor de $r = 0,5$ (figura 3.14).

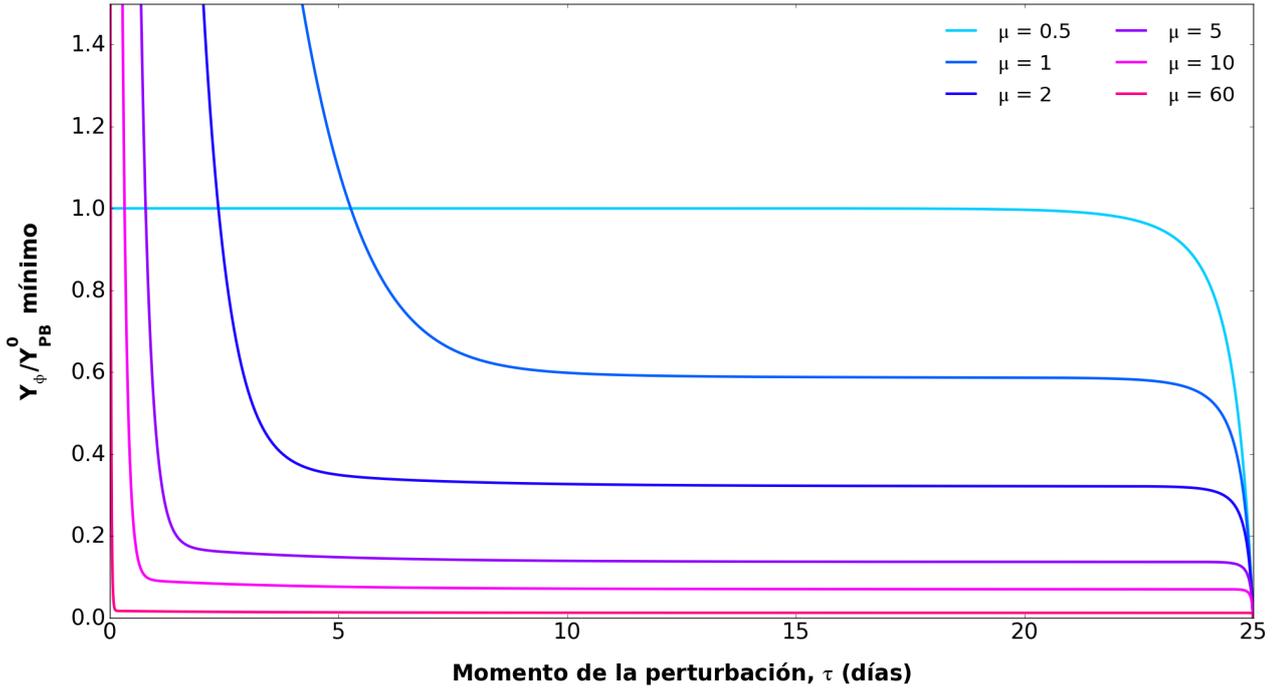


Figura 3.14: Representación de los valores mínimos de la relación entre la cantidad de producto obtenido por bacteria consumida y su productividad máxima (Y_ϕ/Y_{PB}^0) a partir de los cuales resulta conveniente para el insecto alimentarse de la población de endosimbiontes a tiempo $t = \tau$ para distintas tasas de crecimiento μ y un $r = 0,5$ en la función objetivo (ecuación 3.27), calculados de acuerdo a la desigualdad 3.39.

Puesto que en torno al 52% del peso seco de una *E.coli* son aminoácidos [112] y sabiendo que 10^6 bacterias pesan del orden de $1 \mu g$ [108], $Y_\phi < 0,52 \mu g/10^6$ bacterias, ya que no todos los aminoácidos serán los producidos por los endosimbiontes. Esto implica que, para que $Y_\phi/Y_{PB}^0 > 0.1$ la productividad $Y_{PB}^0 < 5$. En estas circunstancias, sólo para tasas de crecimiento muy elevadas ($\mu > 10$ días⁻¹), correspondientes a bacterias de vida libre, y productividades muy bajas, resultaría de interés alimentarse de la población de los endosimbiontes. Por otra parte, con independencia de los parámetros, a valores muy próximos a la esperanza de vida del insecto, siempre es conveniente consumir la población bacteriana en su práctica totalidad, ya que, evidentemente, estas no tienen margen para producir nada después de la muerte del áfido.

Una vez discutido el caso del consumo intracelular de endosimbiontes, se hace necesario deducir si las conclusiones alcanzadas son extrapolables al caso del consumo de bacterias asociado a la degradación del bacterioma ($\mathcal{I} = 1$ en la ecuación 3.24). El consumo por degradación, a diferencia del intracelular, sí que afecta a la dinámica de N . Sin embargo, dado que la degradación del bacterioma no afecta a la densidad bacteriana, se deduce que $B_{con}/N(t, \tau, N_\tau(1 - \Delta B/B_\tau)) = B_{ref}/N(t, \tau, N_\tau) = \rho$. Incluyendo esta igualdad en la expresión de \mathcal{F} obtenemos:

$$\mathcal{F} = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[Y_{PB}^\mu (B_{con} - B_{ref}) - \frac{(Y_{PB}^\mu - Y_{PB}^0)\rho}{\rho N} (B_{con} - B_{ref}) + \delta(t - \tau) Y_\phi \Delta B \right] dt \quad (3.40)$$

Expresando de nuevo $Y_{PB}^\mu = \alpha Y_{PB}^0$ y sustituyendo:

$$\mathcal{F} = \int_{\tau}^{t_f} e^{-rt} \left[-Y_{PB}^0 \alpha (B_{ref} - B_{con}) - Y_{PB}^0 (1 - \alpha) \frac{\rho}{\rho N} (B_{ref} - B_{con}) + \delta(t - \tau) Y_\phi \Delta B \right] dt \quad (3.41)$$

ecuación idéntica a la ecuación 3.32 salvo por la desigualdad. En consecuencia, todo

lo deducido y comentado para el caso del consumo intracelular de endosimbiontes es aplicable al caso del consumo mediante degradación del bacterioma.

En definitiva, tal y como se pretendía demostrar, en un amplísimo rango de escenarios no resulta conveniente para el insecto alimentarse de los endosimbiontes que alojan.

3.2.7. Influencia de la tasa de crecimiento y la productividad de los endosimbiontes en la fertilidad del áfido

Una vez concretada la naturaleza definitiva del modelo de dinámica bacteriana (modelo descrito en la sección 3.2.4 con t_c variable y sin fagocitosis de endosimbiontes de ningún tipo) y su relación con la fertilidad de los áfidos (sección 3.2.4), se hace necesario caracterizar el impacto de los parámetros metabólicos (tasa de crecimiento, μ ; productividad a máxima tasa de crecimiento, Y_{PB}^μ ; y máxima productividad, Y_{PB}^0) en la forma de la función de fertilidad (*i.e.* número de hijos paridos por unidad de tiempo a cada tiempo).

Para una primera exploración del citado impacto, se graficó la función de fertilidad para unas pocas parejas de valores de μ e Y_{PB}^0 (figuras 3.15 y 3.16).

Las figuras muestran que la función de fertilidad presenta algunas tendencias claras, con independencia de si la relación entre la productividad y la tasa de crecimiento es competitiva o independiente (figura 3.7): a mayores valores de productividad (Y_{PB}^0), antes se vuelve no nula (*i.e.* menor es el t_c , figura 3.12), más se aproxima el tiempo al que dicha función alcanza el máximo al t_c , y más pronunciada es la caída. Todos los citados efectos se vuelven más marcados cuanto mayor es la tasa de crecimiento (μ). El caso del valor máximo es más complejo ya que, aunque en general parece crecer con la productividad, en el caso de producción independiente existe un valor de Y_{PB}^0 para el que el máximo de la función de fertilidad alcanza un valor máximo en los casos de $\mu = 0.5$ y $\mu = 1$ días⁻¹.

Las tendencias observadas permiten describir la función de fertilidad, *grosso modo*, a partir del momento en que toma por primera vez un valor no nulo (*i.e.* el t_c), su valor máximo (F_{max}), y alguna métrica que represente la velocidad a la que decae (λ). Esta caracterización permite explorar el espacio de parámetros de forma más exhaustiva (nótese que la influencia de μ e Y_{PB}^0 en el t_c ya se estudió en la sección 3.2.5, figura 3.12).

La característica esencial que debe cumplir λ para que resulte una métrica de interés es que debe depender únicamente de la forma de la curva, esto es, no debe depender ni del t_c ni del par F_{max} - t_{max} . Además, resulta conveniente que su interpretación sea lo más directa posible. Atendiendo a estos factores, se decidió definir

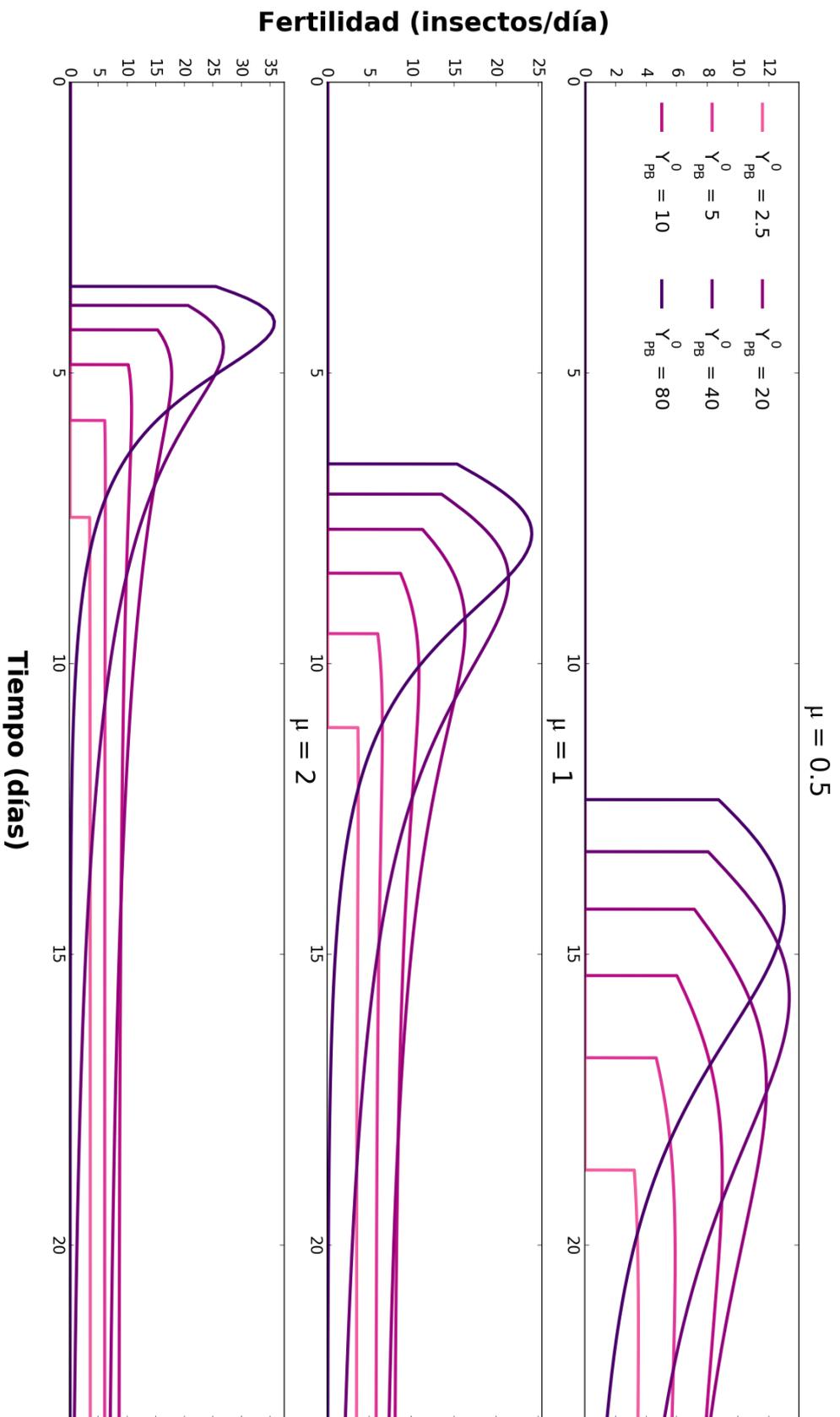


Figura 3.15: Funciones de fertilidad asociadas a distintos valores de tasa de crecimiento (μ) y productividades (Y_{PB}^0) de los endosimbiontes para el caso de producción competitiva (figura 3.7, panel 'Competitiva', $Y_{PB}^{\mu} = 0$). Las funciones fueron obtenidas a partir del modelo descrito en la sección 3.2.4 con un t_c variable obtenido a través de la ecuación 3.23, un valor de Y_{EP} de 0.09 embriones por μg de producto, y una eficiencia de inoculación del 25 % ($\epsilon = 4$).

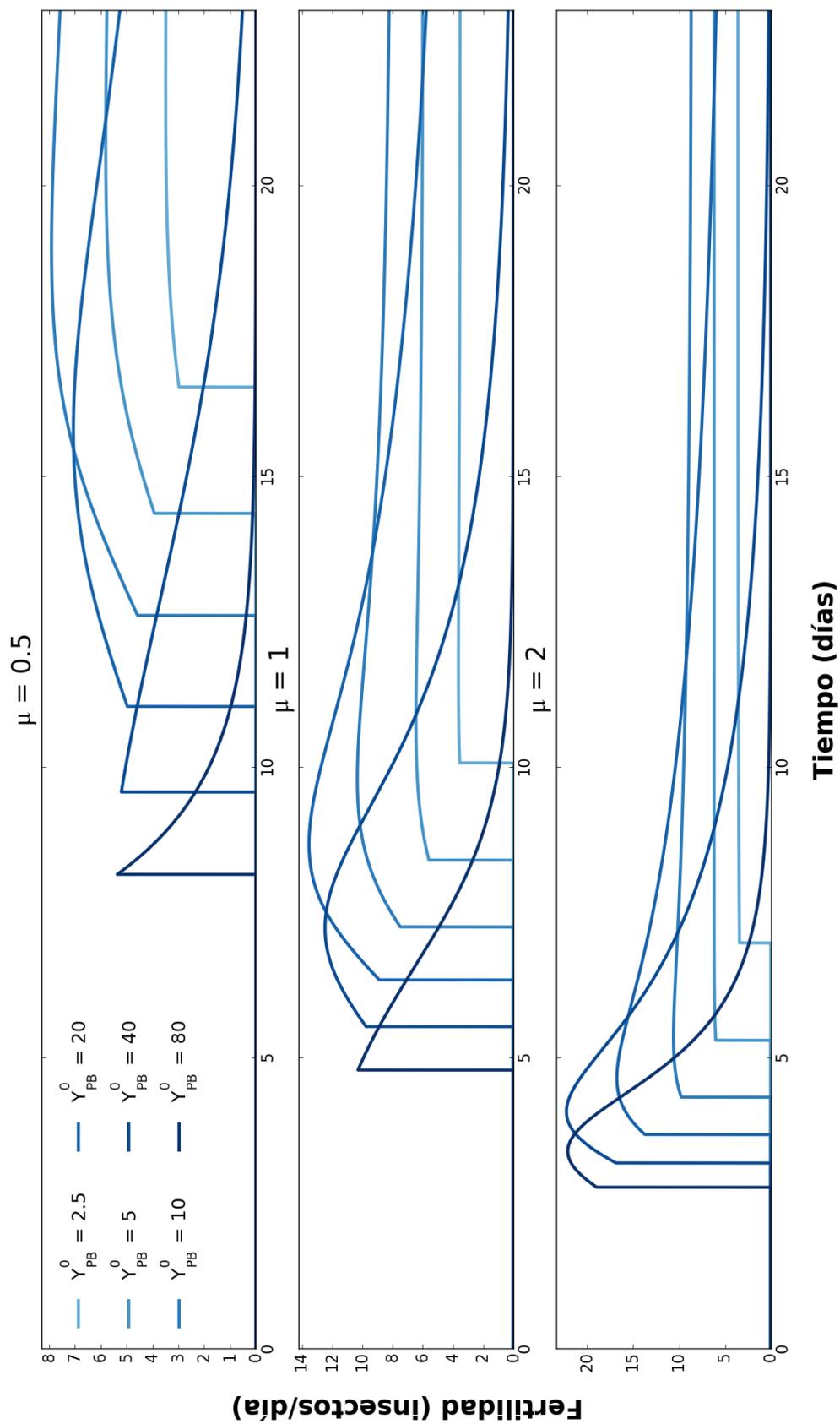


Figura 3.16: Funciones de fertilidad asociadas a distintos valores de tasa de crecimiento (μ) y productividades (Y_{PB}^0) de los endosimbiontes para el caso de producción independiente (figura 3.7, panel 'Independiente', $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$). Las funciones fueron obtenidas a partir del modelo descrito en la sección 3.2.4 con un t_c variable obtenido a través de la ecuación 3.23, un valor de Y_{EP} de 0.09 embriones por μg de producto, y una eficiencia de inoculación del 25% ($\epsilon = 4$).

λ como sigue:

$$\lambda = \frac{\int_{t_c}^{\infty} F(t)dt}{F_{max}(t_f - t_c)} \quad (3.42)$$

donde $F(t)$ representa la función de fertilidad; y t_f representa la esperanza de vida del áfido.

La λ así definida no representa otra cosa que el cociente entre el área bajo la función de fertilidad (calculada hasta la esperanza de vida del áfido) y el área del rectángulo de base $t_f - t_c$ y altura F_{max} . Cuanto menor sea este ratio más acentuada será la caída de la función de fertilidad, ya que la geometría de esta función se aproxima *grosso modo* a un triángulo rectángulo.

Una vez concretada la forma de caracterizar la velocidad de decaimiento de la función de fertilidad, se exploró la influencia de μ e Y_{PB}^0 en dicho decaimiento (figura 3.17).

Los resultados concuerdan con lo discutido al respecto de la figuras 3.15 y 3.16: la masa de la función de fertilidad se concentra cada vez más hacia el t_c conforme se incrementa Y_{PB}^0 , y esta concentración es tanto más rápida cuanto mayor sea la tasa de crecimiento. Más finamente, se observa que la disminución de λ más apreciable se produce a partir de un $Y_{PB}^0 \approx 10$ (nótese que este valor también marcaba un cambio cualitativo de régimen en el t_c , figura 3.12), un efecto particularmente marcado para valores de $\mu \geq 5$. En términos de dinámica de poblaciones, un decremento de λ implica que se engendran un número mayor de áfidos a tiempos más tempranos, a costa de parir un menor número de descendientes a tiempos mayores. Puesto que la probabilidad de supervivencia del áfido es mayor cuanto menor sea su edad, la disminución de λ supone una ventaja evidente para el insecto. Pero además, una distribución de la función de fertilidad concentrada en torno a tiempos bajos resulta ventajosa en términos de la capacidad de crecimiento de la población de áfidos, tal y como se deduce de la ecuación de Euler-Lotka [111]. Nótese, sin embargo, que si la disminución de λ supone una pérdida apreciable en el total de descendientes del áfido, la capacidad de crecimiento sí podría verse resentida.

En línea con lo comentado, se calculó el número total de descendientes en función de la tasa de crecimiento y la productividad bacteriana (figura 3.18). La figura muestra que para todo μ y tanto en el caso de producción independiente como competitiva (figura 3.12), el total de descendientes presenta un único máximo para un valor de Y_{PB}^0 de entre 10 y 30 μg por cada 10^6 bacterias y día, como se ve en la figura 3.18. A partir de dicho máximo, el total de descendientes decrece tanto más abruptamente cuanto mayor es μ , y de forma mucho más acentuada en el caso de la

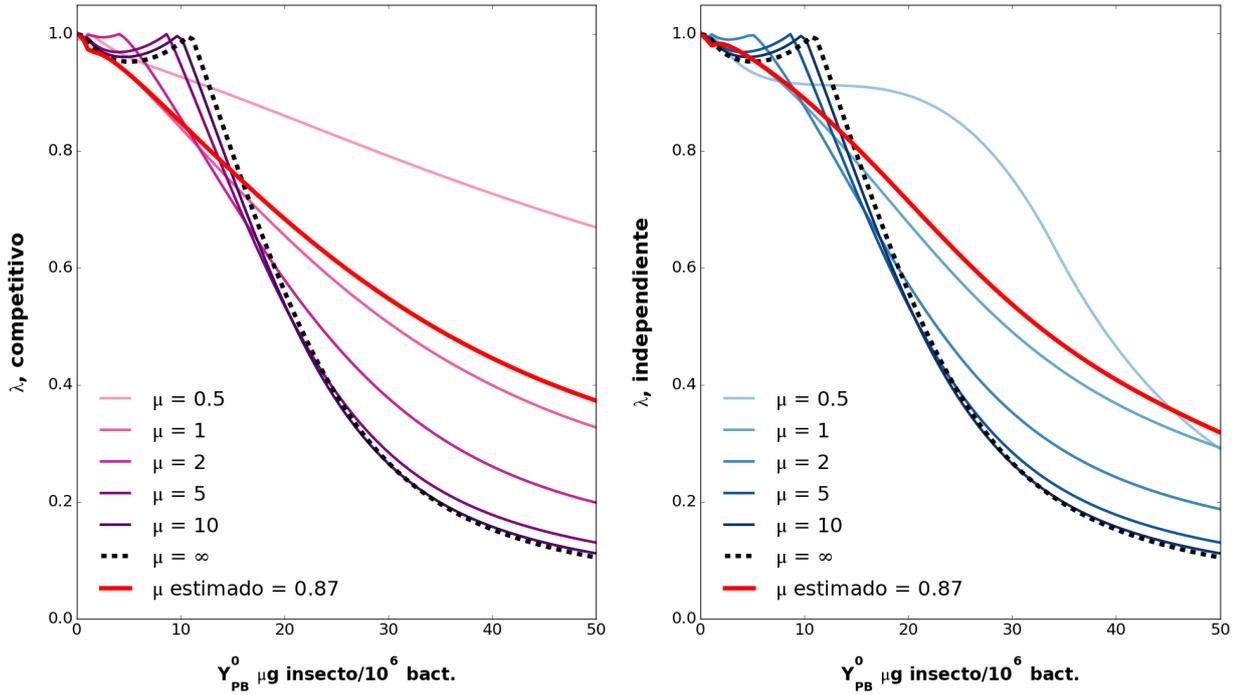


Figura 3.17: Representación de la velocidad de decaimiento de la función de fertilidad en términos de la métrica λ (ecuación 3.42) para distintos valores de tasa de crecimiento μ y productividad Y_{PB}^0 bajo los supuestos de producción independiente (figura 3.7, panel 'Independiente', $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, tonos azules) y competitiva (figura 3.7, panel 'Competitiva', $Y_{PB}^\mu = 0$, tonos morados). Los cálculos se llevaron a cabo a partir del modelo descrito en la sección 3.2.4 con un t_c variable obtenido a través de la ecuación 3.23, un valor de Y_{EP} de 0.09 embriones por μg de producto, y una eficiencia de inoculación del 25 % ($\epsilon = 4$).

producción independiente. Este descenso, sin embargo, parece menos marcado que el observado para λ (figura 3.17), por lo que no resulta descabellado anticipar que el impacto neto del incremento de μ e Y_{PB}^0 en la tasa de crecimiento de la población de áfidos será positivo.

En definitiva, el incremento de μ e Y_{PB}^0 supone un sesgo de la función de fertilidad hacia $t = t_c$, a costa de sacrificar capacidad reproductiva neta a partir de valores Y_{PB}^0 próximos a $15 \mu g$ por cada 10^6 bacterias y día. Estas alteraciones en la función de fertilidad podrían ofrecer ventajas en lo que a la capacidad de crecimiento de la población de insectos se refiere, tal y como se deduce de la ecuación de Euler-Lotka [111]. Este comportamiento de la función de fertilidad, si bien puede parecer extraño, ha sido observado en diversas especies de áfidos en campo [113].

Finalmente, resta comentar la variación de F_{max} con las capacidades metabólicas de los endosimbiontes. En la figura 3.19 se observa que F_{max} crece de forma aparentemente hiperbólica en la mayoría de casos, y que ese crecimiento hiperbóli-

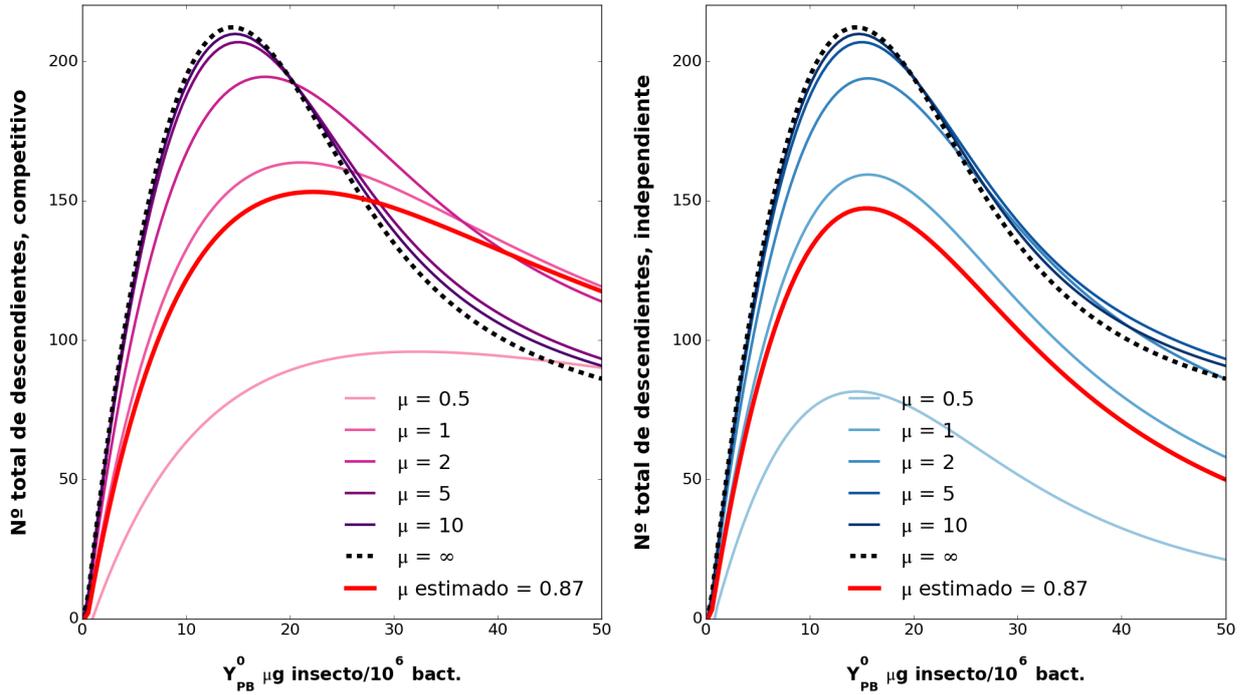


Figura 3.18: Representación del número total de descendientes por áfido para distintos valores de tasa de crecimiento μ y productividad Y_{PB}^0 bajo los supuestos de producción independiente (figura 3.7, panel 'Independiente', $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, tonos azules) y competitiva (figura 3.7, panel 'Competitiva', $Y_{PB}^\mu = 0$, tonos morados). Los cálculos se llevaron a cabo a partir del modelo descrito en la sección 3.2.4 con un t_c variable obtenido a través de la ecuación 3.23, un valor de Y_{EP} de 0.09 embriones por μg de producto, y una eficiencia de inoculación del 25 % ($\epsilon = 4$).

co se aproxima progresivamente a uno lineal conforme se incrementa μ . Además, y al igual que con el resto de propiedades de la función de fertilidad estudiadas, el impacto del incremento en este parámetro se amortigua abruptamente a partir de valores de μ entre 2 y 5 días⁻¹. Este incremento hiperbólico, sin embargo, no puede extrapolarse a todas las situaciones. De hecho, para el caso de producción independiente y valores de μ menores de 2 días⁻¹, F_{max} crece hasta adoptar un valor máximo para luego disminuir de forma sustancialmente lenta. Esta particularidad no debe atribuirse necesariamente a la naturaleza independiente de la producción, ya que incrementos en la eficiencia de inoculación (disminuciones del valor de ϵ , sección 3.2.4) hacen que se produzcan efectos semejantes bajo el supuesto de producción competitiva (datos no mostrados).

El comportamiento de F_{max} tiene importantes implicaciones en términos de la validez del modelo de dinámica de poblaciones de los endosimbiontes planteado en la sección 3.2.4. En concreto, el incremento de F_{max} con Y_{PB}^0 define un rango de valores de Y_{PB}^0 para los que el modelo es compatible con la realidad. Es evidente que F_{max} no puede ser arbitrariamente grande, ya que un áfido no puede, fisiológica-

mente, parir una cantidad cualquiera de descendientes en un día. Como referencia, un áfido de la especie *Acyrtosiphon pisum* es capaz de parir unos 12 insectos por día. Si aceptamos este valor como una aproximación de la máxima capacidad a la que pueden generar los áfidos descendencia por razones fisiológicas, se deduce que para valores de $\mu \geq 1$, el valor máximo de Y_{PB}^0 compatible es de en torno a $15 \mu g$ de producto por cada 10^6 bacterias y por día. Este valor se incrementa dramáticamente para valores inferiores de μ , ya que, para estos valores, el crecimiento de F_{max} con Y_{PB}^0 se estanca apreciablemente. Este valor máximo de Y_{PB}^0 definiría el punto a partir del cual se estaría generando un exceso de producto. Este exceso de producto puede perderse (*e.g.* excretándolo en forma de melaza), o almacenarse para momentos en los que la función de fertilidad tome valores inferiores al límite fisiológico. Nótese, sin embargo, que el valor de F_{max} depende, adicionalmente, de Y_{EP} y ϵ , valores que se han fijado a lo largo de esta sección. Puesto que la estimación de estos parámetros ha sido, a lo más, grosera, dada la falta de evidencia experimental, y puesto que tampoco se dispone de información sobre cómo se gestiona, de existir, el exceso de producto, se decidió suponer que el áfido opera siempre por debajo del límite fisiológico de F_{max} .

No conviene concluir la sección sin enfatizar que todo lo discutido se sostiene sobre el supuesto de que el t_c que define la fertilidad es el mínimo posible dados unos parámetros metabólicos. Puesto que el número de bacterias presente en el momento en que comienza el período reproductivo resulta capital de cara a definir la forma de la función de fertilidad, y se ha observado que ciertas propiedades de la misma (esencialmente el número total de descendientes, aunque también la fertilidad máxima a valores de μ bajos) no son siempre crecientes con μ e Y_{PB}^0 , es posible que existan presiones selectivas que favorezcan a los áfidos que comiencen a reproducirse más tarde que el t_c mínimo.

3.3. Discusión

La importancia del bacterioma como pilar fundamental de la interacción insecto-endosimbionte es ampliamente reconocida (ver sección 3.1). En esta línea, al considerar que el crecimiento y degradación del bacterioma es el único elemento que regula el título bacteriano en el sistema *Acrytosiphon pisum-Buchnera aphidicola* (ver secciones 3.2.1-3.2.4), se logran ajustes a los datos experimentales, en general, de gran precisión. En particular, los modelos desarrollados describen adecuadamente la variación del título bacteriano hasta los 16 días de edad, esto es, hasta prácticamente el final del período reproductivo del áfido. A partir de entonces, el número de endosimbiontes está apreciablemente sobreestimado (ver figuras 3.3, 3.5 y 3.9). Nótese que este hecho es compatible con la observación de que, en esta misma etapa, se produce una disminución en la densidad de endosimbiontes en el bacterioma [67], un mecanismo de reducción del título bacteriano que no se ha tenido en cuenta en ningún caso. Sea como sea, tal y como se ha discutido previamente (ver sección

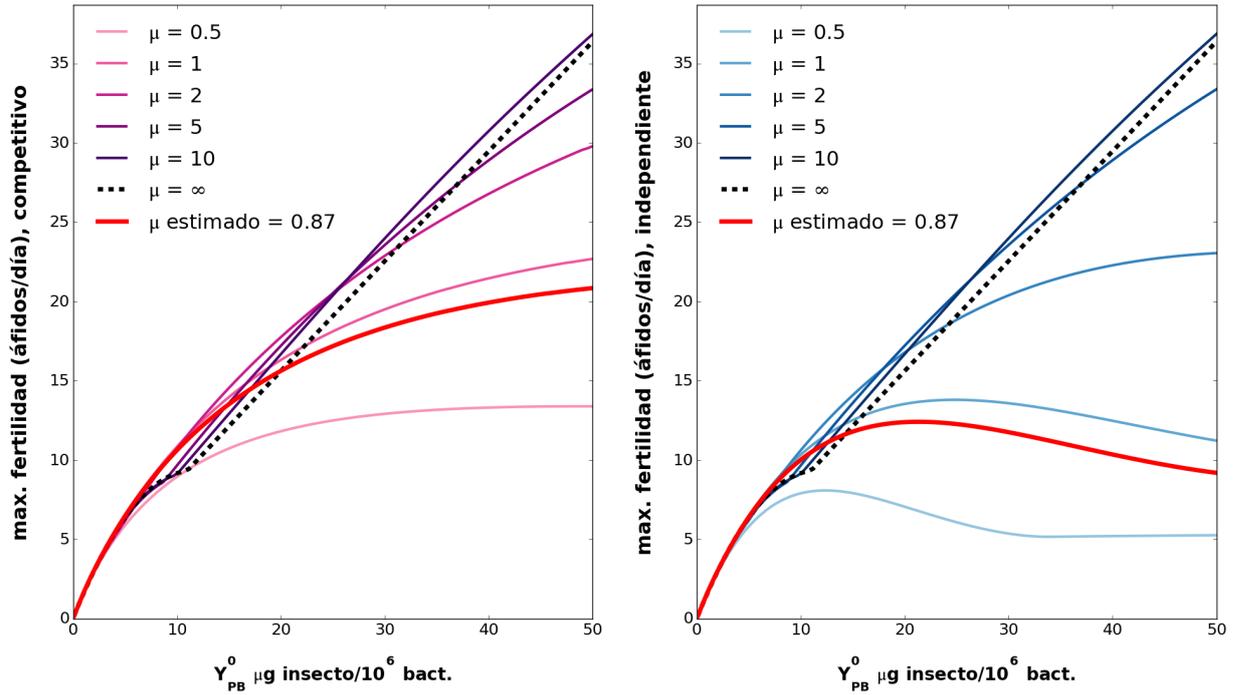


Figura 3.19: Representación del máximo de la función de fertilidad (F_{max}) para distintos valores de tasa de crecimiento μ y productividad Y_{PB}^0 bajo los supuestos de producción independiente (figura 3.7, panel 'Independiente', $Y_{PB}^\mu = Y_{PB}^0$, tonos azules) y competitiva (figura 3.7, panel 'Competitiva', $Y_{PB}^\mu = 0$, tonos morados). Los cálculos se llevaron a cabo a partir del modelo descrito en la sección 3.2.4 con un t_c variable obtenido a través de la ecuación 3.23, un valor de Y_{EP} de 0.09 embriones por μg de producto, y una eficiencia de inoculación del 25 % ($\epsilon=4$).

3.2.2), es posible que los supuestos sobre los que se articulan los modelos (esencialmente el que se refiere a que el flujo de nutrientes en el insecto es constante) no se cumplan en áfidos senescentes.

La comparación de los modelos, por otro lado, ofrece pocos resultados concluyentes. En primer lugar, la figura 3.6 muestra claramente que suponer que el número de bacteriocitos y no el volumen del bacterioma es el agente determinante de la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes permite ajustarse más a la realidad experimental. Sin embargo, es importante enfatizar que el desconocimiento de la forma específica en que el volumen de los bacteriocitos varía con el tiempo puede ser la razón última de la menor calidad del ajuste. En consecuencia, a la luz de estos resultados, no parece sensato descartar ninguna de las hipótesis. En segundo lugar, la comparativa entre los modelos con desarrollo del bacterioma fijo (sección 3.2.2) y dependiente de la fertilidad del áfido (sección 3.2.4), no ofrece resultados que permitan, objetiva y definitivamente, decantarse por una opción u otra (ver figura 3.11).

Nótese, sin embargo, que el modelo dependiente de fertilidad, a diferencia de los

demás, aporta una explicación mecanística a la degradación del bacterioma observada en *Acrytosyphon pisum*, a saber: la causa de la degradación del bacterioma es la inoculación de los embriones de áfido. Pero, ¿se puede concluir que no existe otra razón que justifique esta degradación? En esta línea se exploró si el consumo de los endosimbiontes, sea mediante la degradación del bacterioma o por el consumo directo de las bacterias, podría resultar beneficioso al áfido en términos de su fertilidad (ver sección 3.2.6). Las conclusiones del estudio son claras: no parece razonable suponer que el consumo de la población de endosimbiontes resulte beneficioso al áfido en términos de su fertilidad salvo a tiempos cercanos al final de la esperanza de vida del mismo. Atendiendo a esto, la degradación del bacterioma debe responder o a la inoculación de su descendencia, tal y como supone el modelo dependiente de fertilidad, o a otras razones.

Para que el modelo dependiente de fertilidad ajuste adecuadamente a los datos experimentales, y considerando los valores de parámetros definidos a lo largo del capítulo, es necesario que la eficacia de inoculación sea relativamente pequeña (no más del 40%). En la sección 3.2.1 se estimó, a partir de datos obtenidos de diversas fuentes, que a partir de un bacterioma pueden inocularse entre 2-5 embriones. Si tenemos en cuenta que, a pesar de que el mecanismo de inoculación no es claro, aparentemente no funciona con eficiencia máxima [98], y que el número total mínimo de descendientes inoculables a partir de la población de endosimbiontes de un áfido adulto es de unos 150 (muchos más de los que se observan normalmente [97]), eficacias tan bajas como la estimada son asumibles.

Si sumamos la adecuación del modelo dependiente de fertilidad a las distintas observaciones experimentales al hecho de que la degradación del bacterioma comienza exactamente cuando el áfido alcanza la madurez sexual, parece sensato hipotetizar que la citada degradación se debe a la inoculación de los embriones, si bien otras razones no están excluidas. Es importante destacar que, aun si se probara que la degradación del bacterioma se asocia a la transferencia de endosimbiontes a la descendencia, no se podría concluir que el modelo dependiente de fertilidad es más apropiado que el que supone un desarrollo fijo, ya que ambos son compatibles con esta hipótesis.

La construcción de modelos de la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes en el insecto compatibles con datos experimentales define el primer paso en la comprensión de como las mutaciones en estas bacterias evolucionan en el tiempo, ya que su actividad en el insecto es indispensable para que éste se desarrolle y reproduzca y, por ende, es uno de los elementos esenciales que definen su *fitness*. En esta línea, las funciones de fertilidad construidas a partir de los modelos con restricciones basadas en el número de bacteriocitos (ver secciones 3.2.2 y 3.2.4) presentan, a lo largo del período reproductivo del insecto, una forma cualitativamente semejante a la descrita para distintas especies de áfidos [97]. De hecho, al considerar el modelo con degradación del bacterioma asociada a la fertilidad del áfido, se observa que

cuanto más temprano comienza el insecto a reproducirse (*i.e.* cuanto menor es su t_c , ver sección 3.2.5), más rápidamente decae la fertilidad con la edad del mismo (ver sección 3.2.7, figuras 3.15 y 3.16), una característica previamente puesta de manifiesto al comparar las funciones de fertilidad de distintas especies de áfidos [113].

En definitiva, se ha logrado construir una relación entre el metabolismo de *Buchnera aphidicola* y la fertilidad de *Acrytosiphon pisum* compatible con una amplia variedad de datos experimentales; una relación que, si aceptamos como extrapolable a otras especies de áfidos, sienta las bases sobre las que construir el *fitness* del insecto y, en consecuencia, caracterizar la evolución de este tipo de endosimbiontes.

Capítulo 4

Dinámica de poblaciones y cálculo de probabilidades de fijación en áfidos propagados *in vitro*

4.1. Introducción

Este capítulo tiene como objetivo desarrollar un método de cálculo de la probabilidad de fijación de mutaciones que afecten directa o indirectamente (*e.g.* mutaciones en los endosimbiontes que alteran sus capacidades metabólicas) a las facultades reproductivas de los áfidos, esto es, que alteren de algún modo cuándo se reproducen y/o el número de descendientes a que pueden dar lugar. Con este objetivo en mente, resulta evidente que el primer paso no es otro que construir un modelo que represente adecuadamente la dinámica de poblaciones de los áfidos y así, simultáneamente, construir el paisaje de *fitness* que definirá, en última instancia, las probabilidades de fijación buscadas.

La construcción de un modelo adecuado para representar la dinámica de poblaciones de los áfidos exige comprender en profundidad su ciclo de vida, así como la influencia de distintos factores ambientales en el mismo. A lo largo de esta sección se recogerá lo esencial de estos aspectos. Para una explicación más completa se recomienda consultar [114] (capítulo 3), fuente esencial de la información presentada en esta sección.

4.1.1. Ciclos de vida

La complejidad de los ciclos de vida de los áfidos tienen su razón última en las variaciones en el ecosistema asociadas a cambios estacionales [115], entre ellos la variación en la composición de la savia vegetal de la que estos insectos se alimentan [116-118]. En primavera, las hojas crecen e importan aminoácidos a través de la savia, lo que favorece el desarrollo y capacidad reproductiva de los áfidos. En ve-

rano, cuando las hojas han madurado, el floema transporta esencialmente azúcares, lo que limita sustancialmente el nitrógeno disponible para los insectos. En otoño, el valor nutricional del floema se recupera a consecuencia de la senescencia del follaje, que conlleva la exportación de aminoácidos. En definitiva, a lo largo del año, sólo se dan dos períodos relativamente cortos en los que la planta hospedadora resulta favorable a los áfidos, intercalados con períodos más largos donde no lo es tanto. A estas fluctuaciones en la calidad del alimento, hay que añadir los cambios en la temperatura a la que se ven expuestos los áfidos, carentes de mecanismos internos de regulación térmica [119], así como variaciones en la actividad de depredadores y otros eventos de índole climática [115]. Como respuesta a este entorno cambiante, los áfidos han desarrollado un marcado polimorfismo gracias al cual han conseguido establecerse como uno de los insectos más prolíficos conocidos.

En función del número de especies de plantas que sirven de hospedador, los ciclos de vida de los áfidos se pueden clasificar en monoicos o dioicos. En el primer caso (el más habitual), los áfidos completan su ciclo de vida en una única especie vegetal o en un conjunto de especies relacionadas, mientras que en el segundo, alternan entre dos conjuntos de especies no relacionadas.

En los ciclos dioicos, morfos (*i.e.* variedad polimórfica) capaces de reproducción sexual se emparejan y reproducen durante la segunda mitad del verano y otoño, depositando huevos en el hospedador primario, típicamente una planta leñosa. Estos huevos son capaces de soportar las bajas temperaturas del invierno, de forma que cuando llega la primavera, eclosionan, dando lugar a la primera generación de áfidos. Las causas exactas que desencadenan la eclosión no son conocidas [120], si bien se ha conseguido inducir la misma *in vitro*, además de establecerse la importancia de la congelación de los huevos durante la hibernación, de los ciclos diarios de temperatura y del fotoperiodo [121].

Los áfidos que emergen de los huevos se denominan fundatrices. Estos morfos, se reproducen por partenogénesis y se caracterizan por ser áltamente fecundos [122, 123]. Las fundatrices dan lugar a una segunda generación de insectos de características similares, las fundatrigenias, que producen descendencia alada. Esta nueva generación de áfidos migra al hospedador secundario (sufriendo importantes pérdidas), normalmente una planta herbácea (entre las que se incluyen muchas de interés agrícola), y da lugar a varias generaciones, ápteras (*i.e.* sin alas) o aladas según las condiciones de cada progenitor, de insectos a lo largo del verano. A partir de la segunda mitad de esta estación, comienzan a generarse machos alados y hembras gimnóparas (*i.e.* hembras que, mediante partenogénesis, dan lugar a hembras ovíparas), que migran de vuelta al hospedador primario. Aquí, las gimnóparas dan lugar a hembras ovíparas que se reproducen con los machos, cerrando el ciclo. Nótese que el ciclo expuesto debe tomarse sólo como referencia, ya que existen muchas variantes. Una de las más reseñables concierne a las especies en las que la forma de hibernación no es el huevo, sino la fundatrix, como es el caso de *Brachycaudus*

helichrysi [124].

Los ciclos monoicos, por otra parte, pueden concebirse como ciclos dioicos en los que se suprimen las fases y los morfos implicados en la migración entre los hospedadores primario y secundario. Esto no implica que estas especies de áfidos no den lugar a formas aladas, ya que estas siguen siendo necesarias en la dispersión de la población a hospedadores no infestados.

A pesar de las semejanzas, existen diferencias de importancia entre los ciclos dioicos y monoicos en lo que concierne a las características de los distintos morfos que intervienen en los mismos. En las especies de áfidos que presentan ciclos dioicos, las fundatrices, así como las fundatrigenias, presentan diferencias sustanciales con las hembras partenogénéticas que se desarrollan en el hospedador secundario. En concreto, poseen un mayor número de ovarias (*i.e* estructura ovárica donde se generan los óvulos), son más grandes y de forma mucho más redondeada [122]; todas características asociadas con una fecundidad muy superior [123]. En las especies monoicas, sin embargo, las diferencias entre las fundatrices y otras hembras partenogénéticas son mucho menos pronunciadas. Otra diferencia reseñable, concierne a la generación de las formas sexuales. En las especies monoicas, a diferencia de las dioicas, tanto los machos como las hembras ovíparas son engendrados por el mismo tipo de hembra partenogénética, habitualmente áptera, denominada sexúpara.

En general, puede deducirse que los áfidos que siguen ciclos dioicos presentan morfos más diversos y especializados, más allá de los atribuibles a la migración entre dos hospedadores distintos. Esta característica se ha atribuido a la tendencia de estas especies de áfidos a formar agallas en el hospedador primario en primavera. De hecho, muchas especies de *Pemphiginae* y *Hormaphidinae* son capaces de producir morfos especializados en la defensa y reparación de estas agallas, caracterizados por ser ninfas jóvenes usualmente estériles [125, 126].

Adicionalmente, existen ciertas especies de las tribus *Fordini* y *Hormaphidinae* que presentan ciclos bienales (ver 7.2.5 *Two-year life cycles* en [127] para un ejemplo); además de no pocos casos en los que la especie adopta una estrategia híbrida entre monoica y dioica, en la que la alternancia entre hospedadores ocurre en paralelo a la partenogénesis continua en el hospedador secundario.

A pesar de la rica casuística de los ciclos de vida de los áfidos, sus particularidades son aún mayores. Los ciclos descritos hasta ahora presentaban una fase de reproducción sexual (ciclo holocíclico). Sin embargo, este no siempre es el caso (ciclo anholocíclico). En determinadas circunstancias, como por ejemplo en regiones cálidas y/o con una relación hospedador primario-áfido baja, no se generan huevos como forma de hibernación, sino que se emplean hembras partenogénéticas [128]. Este tipo de comportamientos implica la existencia de morfos específicos o de patrones de comportamientos particulares que permitan sobrevivir al invierno. Sin

embargo, esencialmente a causa de la predación, el número de insectos que sobreviven a la primavera es siempre sustancialmente inferior al observado en los áfidos con ciclos holocíclicos [128]. Finalmente, determinados clones de áfido presentan un tipo de ciclo entre holocíclico y anholocíclico, en el que se generan machos o hembras ovíparas, pero no ambos.

4.1.2. Factores determinantes del polimorfismo en áfidos

La clave de la supervivencia de los áfidos radica en su capacidad para generar los morfos adecuados en el momento oportuno. Tal y como se ha planteado al describir los distintos ciclos de vida en la subsección anterior, en términos generales, se identifican los siguientes morfos principales: hembras partenogenéticas ápteras y aladas, formas de reproducción sexual (machos y hembras ovíparas), y formas de resistencia, que pueden ser huevos o variantes fenotípicas de hembras partenogenéticas.

La generación de formas sexuales, con independencia de si el áfido sigue un ciclo monoico o dioico, viene desencadenada por dos factores principales [129]: el fotoperiodo (*i.e.* parte del día en que un ser vivo está expuesto a la luz) y la temperatura. En concreto, son el incremento en el número de horas de oscuridad, y el descenso de las temperaturas los factores que determinan la generación de estas formas. Las formas sexuales son las responsables de generar huevos, que sirven como forma de hibernación para superar el invierno. Sin embargo, las condiciones mencionadas no son exclusivas del otoño, sino que también pueden darse en primavera, aunque las formas sexuales no tienden a aparecer en esta estación. Este hecho se asocia a la existencia de un reloj interno, sensible a la temperatura, capaz de impedir la generación de formas sexuales a partir de las primeras generaciones descendientes de las fundatrices [130].

Existen, sin embargo, especies de áfidos que, debido a sus hábitos de alimentación (*e.g.* áfidos que extraen su alimento de raíces), son incapaces de percibir con precisión el fotoperiodo. En estos casos, la generación de los correspondientes morfos sexuales se produce en respuesta al cese del crecimiento de la planta hospedadora [131] y/o al descenso de las temperaturas [132], con independencia del número de horas de luz al que se expongan.

Las hembras partenogenéticas aladas se generan ante la necesidad de la población de dispersarse a otros hospedadores, sean del mismo tipo o diferente, según sea la especie monoica o dioica y la etapa del ciclo. Resulta lógico, en consecuencia, que los factores que inducen la diferenciación de estos morfos sean el grado de hacinamiento [133], el estatus nutricional del hospedador [134-136] y la presencia de depredadores [137]. Nótese que la temperatura, en este caso, ejerce un efecto esencialmente coadyuvante, limitando el desarrollo de formas aladas cuando toma valores elevados o notablemente bajos (temperaturas bajo cero).

Cuando la población de áfidos se incrementa, la probabilidad de que dos individuos contacten físicamente también aumenta, y es este contacto físico (en regiones concretas de la anatomía del insecto) el que desencadena la generación de formas aladas. Sin embargo, existen especies como *Myzus persicae* que se caracterizan por no ser gregarios. En estos casos, la influencia de los estímulos físicos en la diferenciación de morfos alados es sustancialmente menos marcada que en el caso de especies gregarias [137].

De cara al estatus nutricional del hospedador, se ha evidenciando la relevancia del déficit de determinados metabolitos (ciertas vitaminas, aminoácidos, *etc*) en la diferenciación de morfos alados. Estos resultados, tomados en conjunto, implican que es el valor nutricional general de la savia, más que la presencia de metabolitos concretos, el factor responsable de este polimorfismo [114] (capítulo 3).

Por último, existe evidencia de un incremento en la producción de formas aladas en respuesta al ataque de escarabajos depredadores, si bien no existe tal evidencia para el caso de ataques de parasitoides. Este comportamiento, sin embargo, no es general, ya que varias especies emplean tácticas de defensa alternativas. En esta línea, la presencia en la población de áfidos de hormigas mutualistas se ha asociado con la inhibición de morfos alados [138].

Las formas de resistencia de los áfidos, además de los huevos, se relacionan no sólo con la hibernación, sino también con la defensa ante las condiciones adversas asociadas al verano: elevadas temperaturas y escasez de alimento asociada tanto al incremento en la población de áfidos como al final de la fase de crecimiento y maduración de las hojas del hospedador. Las hembras partenogenéticas especializadas en hibernar o estivar suelen ser particularmente pequeñas, presentar tejidos de reserva más desarrollados y baja capacidad reproductiva [122]. En determinadas especies, los morfos de estivación presentan características aún más peculiares, como es el caso de insectos de la especie *Periphyllus testudinaceus*, donde adoptan formas planas protegidas por placas [114] (capítulo 3). La inducción de los morfos estivales de resistencia puede asociarse a una respuesta directa a cambios en el hospedador (hojas maduras *v.s.* hojas en crecimiento), como a factores intrínsecos que anticipan estos cambios [114] (capítulo 3).

La existencia de morfos de estivación y de hibernación ilustran cómo la temperatura es un factor estresante capital en el desarrollo y reproducción de los áfidos [139]. Entre los 3 y los 25 °C, el incremento en la temperatura se relaciona con una mejoría en el desempeño de los áfidos, determinado esencialmente en las hembras partenogenéticas. Si la temperatura supera estos valores, el efecto es dramáticamente opuesto: la capacidad reproductiva y el desarrollo de los áfidos se ve abruptamente afectada, un efecto que se ha asociado a la gran inestabilidad térmica característica de las proteínas de los endosimbiontes primarios, encargados de la producción de

metabolitos esenciales para el insecto [119]. El impacto específico de la temperatura es altamente variable entre las distintas especies de áfidos e incluso entre clones, ya que existe un cierto grado de adaptabilidad frente a variaciones en los valores óptimos de temperatura. Esta adaptabilidad, curiosamente, es mucho más limitada a temperaturas altas, si bien la presencia de determinados endosimbiontes secundarios (también relacionados con la resistencia a parasitoides y otras formas de estrés) se ha vinculado a la resistencia a estas condiciones [140].

Existen otras formas de estrés ambiental (*e.g.* humedad, viento) con influencia directa o indirecta en el desempeño de los áfidos, así como una variedad fenotípica apreciable aun dentro de morfos específicos [114] (capítulo 3). Sin embargo, los factores y formas discutidos hasta ahora son suficientes para mostrar la enorme complejidad que es necesario condensar en un modelo completo de la dinámica de poblaciones de los áfidos, así como la gran cantidad de particularidades asociadas a las distintas especies de los mismos. Ambas características, complejidad e idiosincrasia, comienzan a perfilar la necesidad de configurar un modelo simplificado de laboratorio sobre el que llevar a cabo los objetivos planteados al comienzo de esta sección.

4.2. Resultados

4.2.1. Diseño experimental

Tal y como se ha desarrollado en la sección 4.1, existen muchas dificultades a la hora de plantear modelos que representen adecuadamente la dinámica de poblaciones de los áfidos en campo. Estas dificultades se circunscriben no sólo al ámbito del modelado, que debe ser capaz de representar y tratar la influencia de muy diversos factores, sino que también se dan importantes limitaciones experimentales, esencialmente relacionadas con el solapamiento de generaciones y la constante variación de las condiciones del entorno.

Esta problemática, sin embargo, puede reducirse muy sustancialmente si la población de áfidos se propaga en laboratorio en condiciones controladas. En particular, es posible mantener condiciones de temperatura, alimentación y hacinamiento tales que la población de áfidos se componga íntegramente de hembras partenogénicas; y propagar esta población sólo con estos morfos. Obviamente, esta forma de mantener a la población de áfidos se aleja en mucho de las condiciones naturales. No se debe olvidar, sin embargo, que el objetivo perseguido aquí es comprender mejor cómo operan las fuerzas evolutivas sobre el genoma de endosimbiontes obligados; y que la adecuación de los modelos empleados a la realidad ecológica es secundaria a su manejabilidad.

Nótese, por otra parte, que al estar interesados en cuantificar el efecto de la selección natural sobre mutaciones que afecten a las facultades reproductivas de los áfidos, se trabajará siempre con dos poblaciones distintas: la silvestre y la mutante, indicadas mediante el superíndice s y m respectivamente en las variables correspondientes.

En definitiva, se tratará con hembras de áfido que se reproducen por partenogénesis, tanto silvestres como mutantes, que competirán y se propagarán de acuerdo al sistema de pases esquematizado en la figura 4.1. Por claridad, la notación que se empleará en la descripción de este protocolo se resume en la figura 4.2.

De acuerdo a este esquema, se parte de una población total fija de $A(0)$ individuos recién nacidos, divididos en $A^m(0)$ áfidos mutantes y $A^s(0)$ áfidos silvestres. Esta población inicial, que denominaremos inóculo, se dejará crecer, confinada, en condiciones de temperatura y alimentación controladas una cantidad de días suficiente para que el número total de áfidos sea uno dado. A este número de días lo denominaremos tiempo de muestreo (t_m). Al transcurrir estos t_m días, la población de áfidos estará compuesta de un total de $A(t_m)$ individuos, $A^m(t_m)$ mutantes y $A^s(t_m)$ silvestres. Este total de áfidos presentará una distribución de edades concreta ($\mathbf{I}(t_m)$ para el total e $\mathbf{I}^m(t_m)$ e $\mathbf{I}^s(t_m)$ para los áfidos mutantes y los silvestres respectivamente). De todas las edades presentes, sólo un subconjunto de ellas corresponderán a individuos en edad fértil. Al total de áfidos fértiles a tiempo t se le denominará $A_f(t)$ ($A_f^m(t)$ y $A_f^s(t)$ al hablar de mutantes y silvestres respectivamente).

Para iniciar una nueva población a partir de una población desarrollada previamente, se efectuará un pase. En particular, se seleccionarán al azar $A(0)$ individuos fértiles de los $A_f(t_m)$ presentes a tiempo t_m . Entre los $A(0)$ individuos seleccionadas habrá una determinada cantidad de individuos mutantes ($A^m(0)$) y silvestres ($A^s(0)$), cuyo valor específico vendrá dado de acuerdo a una determinada distribución de probabilidad definida por el método de selección. Esto es, $A^m(0)$ y $A^s(0)$ son variables aleatorias.

Estos $A(0)$ seleccionados se transferirán a un nuevo entorno, donde a cada individuo se le dejará parir a un único descendiente antes de eliminarlo del mismo. De este modo, garantizamos que el nuevo inóculo esté formado por individuos recién nacidos. El inóculo se desarrollará del modo previamente descrito, hasta que se procede a llevar a cabo un nuevo pase. El número de pases que se han efectuado previos al desarrollo de una determinada población se denotará mediante un superíndice numérico a la izquierda en las variables correspondientes. Por ejemplo, ${}^3A_f^m(t_m)$ representa el número de mutantes fértiles a tiempo t_m de una población que tiene 3 pases. Con esta notación, la población original a partir de la cual se han obtenido las siguientes se denotará con el superíndice izquierdo 0 (*e.g.* ${}^0A^m(0)$ para indicar el total de mutantes en el inóculo de la población original).

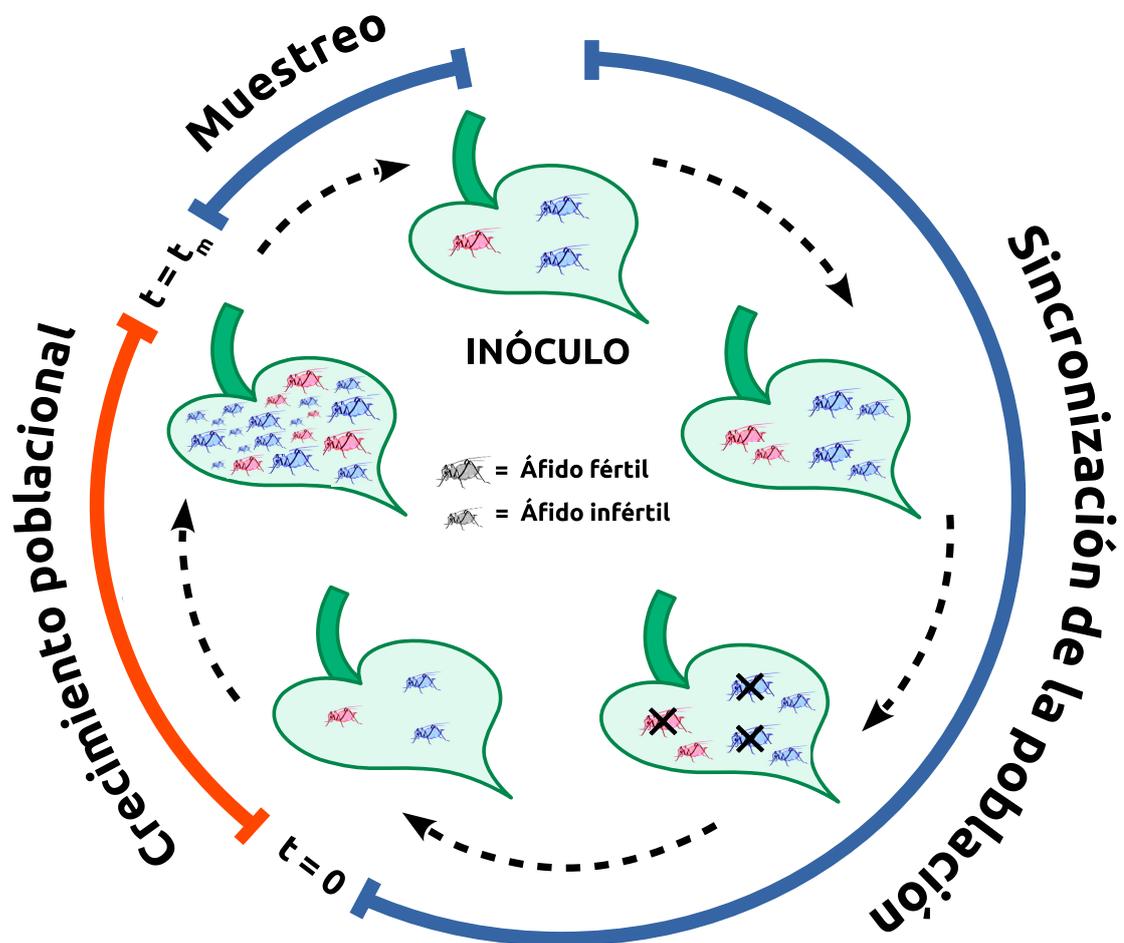


Figura 4.1: Esquema del sistema de pases empleado para la propagación de la población de áfidos. El protocolo se divide en tres etapas. Durante la etapa de muestreo se seleccionan aleatoriamente, de la población correspondiente al pase anterior, un número fijo de áfidos fértiles (*i.e.* maduros sexualmente) que servirá de inóculo y contendrá, en general, insectos mutantes y silvestres. Tras esta etapa, y con objeto de homogeneizar la edad de los áfidos de la población, se dejará a cada uno parir un único descendiente. Inmediatamente después se retirarán los progenitores, dejando únicamente las ninfas. Estas dos etapas, indicadas en azul, transcurren en menos de un día. Después de la sincronización, la población de áfidos se deja crecer t_m días, tras lo cual, se seleccionará el inóculo correspondiente al siguiente pase, cerrándose el ciclo.

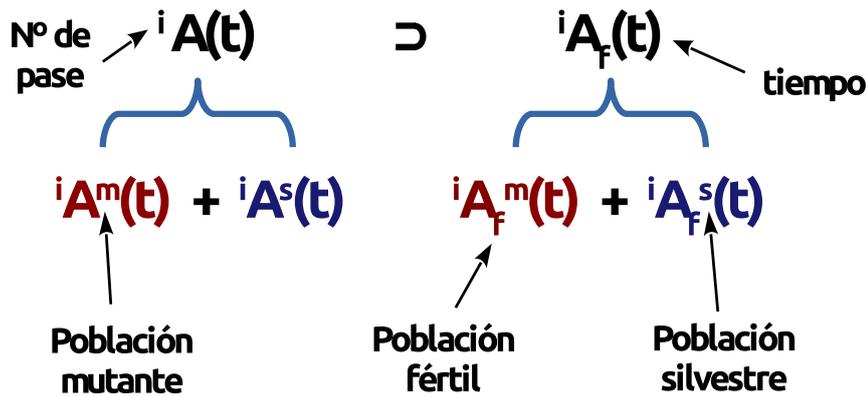


Figura 4.2: Resumen de la notación empleada en la caracterización de las distintas poblaciones de áfidos. En general A es una función dependiente, entre otras variables, del tiempo (t), que representa el total de áfidos. La subpoblación particular a la que se hace referencia se indica mediante un conjunto de sub- y super-índices que se describen a continuación: m y s señalan la subpoblación de mutante o silvestre respectivamente; f indica que se trata de insectos fértiles (*i.e.* maduros sexualmente); e i muestra el número de pases que se han efectuado previos al desarrollo de una determinada población.

El sistema de pases aquí planteado presenta una serie de ventajas. En primer lugar, la población de áfidos crece de forma semejante a como lo haría un cultivo celular (con la excepción de que la existencia de una distribución de edades exige un abordaje mediante generaciones solapantes), lo que simplifica enormemente el desarrollo de un modelo matemático que describa este crecimiento (ver sección 4.2.2). En esta línea es importante destacar la importancia de la elección de t_m , el tiempo que se deja crecer a la población antes de proceder a efectuar un pase. Al dejar crecer una población de áfidos en un entorno de espacio limitado, es posible que aparezcan efectos de hacinamiento que influyan más allá de la limitación de la capacidad reproductiva de los integrantes de la población. De particular interés es la generación de hembras partenogenéticas aladas, ya que su comportamiento reproductivo así como los costes asociados a su génesis deberían tenerse en cuenta en el modelo de dinámica de poblaciones, complicándolo innecesariamente. En consecuencia, se deberá escoger un t_m tal que la población de áfidos crezca lo suficiente, pero sin alcanzar valores de hacinamiento elevados que puedan desencadenar efectos no deseados. En esta línea resulta conveniente definir t_m como el tiempo necesario para que la población de áfidos alcance la densidad deseada, ya que de esta forma se controla el efecto del hacinamiento con independencia de la población específica estudiada.

Otra ventaja clara del esquema experimental propuesto es que la probabilidad de fijación queda claramente definida y, tal como se discutirá en la sección 4.2.3, puede calcularse semi-analíticamente. La razón es que, al realizar pases de una población

compuesta por áfidos mutantes y silvestres, llegará un momento en que el inóculo que se tome para efectuar el siguiente pase esté compuesto por áfidos de un sólo tipo. La probabilidad de fijación queda definida, por tanto, como la probabilidad de que, tras un número infinito de pases, la población obtenida a partir de un inóculo inicial dado ($A(0)$ individuos, con ${}^0A^m(0)$ áfidos mutantes y ${}^0A^s(0)$ silvestres) esté compuesta sólo por mutantes.

Finalmente, las características de una población de áfidos desarrollada del modo descrito a partir de un determinado inóculo (${}^nA_f^m(t_m)$, ${}^nA_f^s(t_m)$, etc) dependen únicamente de la composición de este. Como esta composición depende a su vez, exclusivamente, de las características de la población del pase anterior (de ${}^{n-1}A_f^m(t_m)$, ${}^{n-1}A_f^s(t_m)$ concretamente), no es necesario conocer toda la historia de una población pasada n veces para caracterizarla, sino que es suficiente con saber cómo es la población en el pase anterior. Esta propiedad, tal y como se verá en la sección 4.2.3, es la clave para el cálculo de la probabilidad de fijación y otras magnitudes de interés.

4.2.2. Modelo de dinámica de poblaciones de áfidos propagados en laboratorio

Esta sección está dedicada a desarrollar el modelo que representará el crecimiento de la población de áfidos a partir del inóculo $A(0)$ hasta el tiempo t_m en que se lleva a cabo el pase (ver sección 4.2.1 y figura 4.1). Recordemos que el único morfo a tener en consideración es el de hembras partenogenéticas, y que todas las condiciones ambientales, salvo el grado de hacinamiento se mantendrán fijas.

Bajo estos supuestos, parece sensato modelar el crecimiento de la población de áfidos entre pase y pase de acuerdo a una ecuación logística:

$$dA/dt = rA(1 - A/A_{max}) \quad (4.1)$$

donde A representa el número total de áfidos; A_{max} el número máximo de insectos alcanzable; y r es la tasa de crecimiento intrínseco de la población (*i.e.* la tasa de crecimiento supuesto un crecimiento exponencial).

Otros autores han empleado variantes de esta misma ecuación en las que se incluyen la influencia de depredadores y otros factores ambientales, como base para construir modelos que describan la dinámica de poblaciones de los áfidos en campo ([141] y referencias en el mismo). No obstante, la inhibición por densidad planteada en estos trabajos no es lineal (*i.e.* de la forma $(1 - A/A_{max})$, con A_{max} constante), sino de orden superior (*i.e.* de la forma $(1 - A^n/A_{max})$ para $n \geq 2$ y A_{max} constante). Alternativamente, se ha planteado que la inhibición del crecimiento depende, no

de la densidad instantánea (*i.e.* A/A_{max}), sino de la acumulada, esto es, del total de áfidos generados desde la iniciación de la población [142] (capítulo 1). Sin embargo, el hecho de que en modelos de campo se incluya una dependencia super-lineal con la densidad no implica que esta deba incorporarse en el modelo de laboratorio aquí planteado. La razón de la inclusión de esta dependencia super-lineal en los modelos de campo es, esencialmente, representar la despoblación asociada a la emigración de la población de los morfos alados [142] (capítulo 1), un factor irrelevante en el caso de poblaciones confinadas.

La tasa de crecimiento intrínseca, r , necesaria para concretar el modelo junto con A_{max} , es un parámetro que depende, en última instancia, de la fertilidad de los áfidos a cada edad y tiempo, y de la fracción de individuos que alcanzan una determinada edad. Puesto que las generaciones en los áfidos solapan, esto es, existen ventanas de tiempo en las que la generación parental y su descendencia engendran hijos simultáneamente, el valor de r podría obtenerse a partir de la ecuación de Euler-Lotka [111]:

$$1 = \int_{t_c}^{\infty} e^{-ra} F(a) S(a) da \quad (4.2)$$

donde $F(a)$ representa la fertilidad (*i.e.* número de hijos paridos por unidad de tiempo) de un áfido de edad a ; $S(a)$ la fracción de áfidos que alcanzan la edad a ; y t_c el inicio del período reproductivo.

Sin embargo, la ecuación 4.2 supone implícitamente que la estructura de edades de la población en crecimiento es la estacionaria. Esto es, para que el valor de r obtenido sea válido, la fracción de áfidos en la población de cada una de las edades debe tomar un valor específico, en concreto, el que emergería de una población creciendo exponencialmente una cantidad infinita de tiempo. Bajo este supuesto, y descartando los efectos inhibitorios de la densidad (término $1 - A/A_{max}$ en la ecuación 4.1), el número de áfidos debería crecer exponencialmente siempre. Sin embargo, esto es evidentemente falso durante los primeros días de desarrollo poblacional [143], especialmente si se parte de un conjunto de individuos recién nacidos.

Esta observación hace necesario plantear una forma alternativa de representar el crecimiento poblacional que tenga en cuenta la estructura de edades a cada tiempo. Una manera adecuada de incluir este factor es el uso de matrices de Leslie [144].

Las matrices de Leslie (o modelo de Leslie) son un modelo discreto de crecimiento poblacional, que incluye la estructura de edades, válido bajo los supuestos de ausencia de migración, entorno ilimitado (*i.e.* crecimiento libre), en el que únicamente un sexo (normalmente el femenino) es considerado. Como tal modelo discreto, el tiem-

po se aproxima considerando que avanza en saltos de magnitud Δt . Cuanto menor sea el valor de este Δt , mejor será la aproximación. Esta representación del eje del tiempo, supone que la población queda dividida naturalmente en categorías definidas por un determinado rango de edades: $[0, \Delta t)$, $[\Delta t, 2\Delta t)$, ... , $[k\Delta t, (k + 1)\Delta t)$, ... , $[(n - 1)\Delta t, n\Delta t)$. Si denominamos $\mathbf{I}(T)$ al vector de subpoblaciones por edades de dimensión $n \times 1$ que representa cuántos individuos de cada categoría hay a tiempo $T\Delta t$, con T un número natural, la ecuación de recurrencia que define su dinámica es:

$$\mathbf{I}(T + 1) = \mathbf{L}\mathbf{I}(T) \quad (4.3)$$

que se resuelve trivialmente rindiendo:

$$\mathbf{I}(T) = \mathbf{L}^T \mathbf{I}(0) \quad (4.4)$$

donde $\mathbf{I}(0)$ es el vector que representa el número de individuos en cada rango de edades en la población inicial y \mathbf{L} la matriz de Leslie, de dimensión $n \times n$ y con la siguiente forma:

$$\mathbf{L} = \begin{pmatrix} F_0 & F_1 & F_2 & \cdots & F_n \\ S_0 & 0 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & S_1 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & & \vdots \\ 0 & 0 & & S_{n-1} & 0 \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

donde S_a es la fracción de individuos que alcanzan la edad $a + \Delta t$; y F_a representa el número de hijos paridos por un individuo de edad a en el intervalo de $[a, a + \Delta t)$. Nótese que no todos los individuos de edad a sobreviven a una edad $a + \Delta t$, por lo que los valores F_a sólo corresponden a la integral de la función de fertilidad F entre $t = a$ y $t = a + \Delta t$ si suponemos que las muertes se concentran en $t = a + \Delta t$. De hecho, el valor exacto de F_a está acotado por:

$$S_a \int_a^{a+\Delta t} F(t) dt \leq F_a \leq \int_a^{a+\Delta t} F(t) dt \quad (4.6)$$

Obsérvese que si el término de supervivencia $S_a = 1$, F_a es exacto.

La ecuación 4.4, sin embargo, no se puede emplear directamente para representar la dinámica de poblaciones de los áfidos aquí descrita ya que, como ya se ha mencionado, las matrices de Leslie exigen suponer un crecimiento no inhibido por densidad. Se han llevado a cabo diversas modificaciones del modelo de Leslie de forma que se adapte a un crecimiento logístico con una capacidad máxima dada ([145] y referencias en el mismo). Sin embargo, dada la naturaleza fenomenológica del modelo logístico, estas aproximaciones acostumbran a ser insatisfactorias en algún sentido.

En particular, según el mecanismo por el que se produce la inhibición por densidad, podrían verse afectadas la fertilidad de los individuos de la población, su supervivencia, o ambas. Además, en función de cómo se modifiquen estos parámetros, la distribución de edades a cada tiempo, así como la existencia y características de una población límite a la que tender se verán afectadas. Puesto que los mecanismos que definen estas cuestiones son habitualmente desconocidos, es virtualmente imposible decantarse por un modelo de inhibición por densidad u otro.

Por ejemplo, en [145], se plantea (para valores de $r \leq \log(3)$) una manera de incluir la inhibición por densidad de forma que la población tienda a un total y a una distribución de edades previamente especificados. Esta flexibilidad a la hora de definir las características de la población límite tiene la ventaja de poder ajustar con relativa facilidad observaciones experimentales al modelo, aún sin poseer información sobre los detalles de cómo opera la inhibición por densidad. Sin embargo, para lograr esta tendencia, los términos de la matriz \mathbf{L} no pueden modificarse arbitrariamente. Esto implica que el modelo es potencialmente incompatible con ciertas formas de inhibición por densidad. Por ejemplo, en el citado trabajo, para alcanzar asintóticamente la distribución de edades correspondiente al crecimiento exponencial modelado mediante las matrices de Leslie, modifican todos los términos de \mathbf{L} . Si se considerara, por ejemplo, que la inhibición del crecimiento opera únicamente reduciendo la fertilidad de los individuo (*i.e.* disminuyendo el valor de F_0, F_1, \dots, F_n en \mathbf{L} , ver ecuación 4.5), esta aproximación no sería válida.

Pero también hay que tener en cuenta la forma en que la población se aproxima a la capacidad máxima. Si aceptamos que cualquier forma de modificar \mathbf{L} es válida, el modelo presentado en [145], y analizado en [146] para el caso de una distribución de edades asintótica idéntica a la del modelo de Leslie de crecimiento exponencial, la población en crecimiento se aproxima cada vez más a la límite si y sólo si \mathbf{L} es una matriz primitiva (*i.e.* tal que existe un número natural para el que todos los elementos de la matriz elevada a dicho número son estrictamente positivos). En caso contrario, la población orbitará alrededor de la población límite buscada. Esta última situación contrasta con el modelo logístico representado por la ecuación 4.1, en el que la población nunca decrece. Además, la relación intrínseca entre las adaptaciones del modelo de Leslie como la presentada en [145] con el mapa logístico

[147], implica que la convergencia puede no darse, ya que la población entra en régimen caótico para valores de $r \geq \log(3)$. De nuevo, en función del mecanismo de inhibición subyacente, la posibilidad de que el total de individuos de la población decrezca, o entre en régimen caótico, resulta aceptable o no.

Para evitar tales complicaciones, y puesto que la supervivencia de los áfidos mantenidos como hembras partenogénicas no parece verse afectada por la densidad (100 % de supervivencia hasta una edad de 16 días, [67], material suplementario), y dado que el comportamiento de la población a densidades elevadas no es de interés en el caso estudiado (ver sección 4.2.1), la dinámica de poblaciones de los áfidos se simuló mediante la siguiente relación de recurrencia (compárese con la relación de recurrencia 4.3):

$$\mathbf{I}(T + 1) = \left(\mathbf{I} - \frac{1}{A_{max}} \mathbf{I}_{\Sigma}(T) \right) \mathbf{L} \mathbf{I}(T) \quad (4.7)$$

donde $\mathbf{I}(T)$ e $\mathbf{I}(T + 1)$ son vectores que representan cuántos individuos de cada rango de edades hay a tiempo $T\Delta t$ y $(T + 1)\Delta t$ respectivamente, \mathbf{L} es la matriz de Leslie descrita en la ecuación 4.5, de dimensión $n \times n$; \mathbf{I} es la matriz identidad; A_{max} es una medida del número de áfidos que es capaz de alojar el entorno; e $\mathbf{I}_{\Sigma}(T)$ es una matriz $n \times n$ con la siguiente forma:

$$\mathbf{I}_{\Sigma}(T) = \begin{pmatrix} \|\mathbf{I}(T)\|_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \end{pmatrix} \quad (4.8)$$

siendo $\|\mathbf{I}(T)\|_1$ la 1-norma del vector $\mathbf{I}(T)$ (*i.e.* la suma de sus componentes en valor absoluto). Nótese que dada la forma de la matriz $\mathbf{I}_{\Sigma}(T)$ el término inhibitorio de la ecuación 4.7 afecta únicamente a los términos de \mathbf{L} relacionados con la fertilidad (*i.e.* la primera fila de la matriz \mathbf{L}), pero no a los términos de supervivencia S_a .

Una vez construido el modelo, es necesario especificar cómo se obtienen los parámetros que lo concretan. Comenzando por la matriz de Leslie \mathbf{L} , se puede aceptar que los términos de supervivencia S_i toman valores de 1 dados los datos presentados en [67] (material suplementario). Los términos asociados a la fertilidad F_i se calcularán a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6, que se convierte en igualdad al ser $S_i = 1$ para todo i . En particular, se emplearán las ecuaciones correspondientes al modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número

de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Por último, la edad final a la que se supondrá que los áfidos dejan de reproducirse será de 18 días, ya que la supervivencia *in vitro* decae abruptamente a partir de esta edad ([67], material suplementario).

Nótese que en el capítulo 3 se concluyó que, pese a que todos los modelos de dinámica bacteriana restringidos por número de bacteriocitos ofrecen resultados de ajuste similares, el modelo con degradación del bacterioma asociado a la fertilidad del áfido exigía menos supuestos. Sin embargo, en el modelo de dinámica de poblaciones de áfidos presentado en la ecuación de recurrencia 4.7, la dependencia con la fertilidad implica que la matriz de Leslie \mathbf{L} varía con el tiempo. La razón radica en que el término de inhibición por densidad $\left(\mathbb{I} - \frac{1}{A_{max}} \mathbf{I}_{\Sigma}(T)\right)$ afecta a los términos de fertilidad F_i . Esto es, afecta a la función de fertilidad F y, en consecuencia, a la dinámica de poblaciones de los endosimbiontes, que se emplea, a su vez, para construir los términos F_i . La inclusión de esta dependencia temporal de \mathbf{L} implica que los términos F_i deben recalcularse tras cada aplicación de la recurrencia 4.7. Esto supone un incremento muy sustancial del coste computacional, hasta el punto de resultar inabordable (a la luz del equipo disponible) al considerar el número de veces que será necesario construir la dinámica de poblaciones de los áfidos. Todas estas razones justifican la elección del modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo para la obtención de la matriz de Leslie \mathbf{L} .

En relación al valor de la capacidad máxima de la población A_{max} , vendrá dado por criterios técnicos más que teóricos. Si suponemos que se mantiene a la población de áfidos con dieta artificial en cajas circulares de 10 cm de radio, y suponemos que un áfido medio ocupa del orden de 3 mm² de superficie, la población máxima que el disco es capaz de soportar es de unos 10000 insectos, por lo que será el valor que se fijará de aquí en adelante.

Tal y como se indicó previamente, el modelo deducido es una aproximación discreta de la situación real, en la que el tiempo (salvando cuestiones de física a pequeña escala) es una variable que toma valores reales y existen, en consecuencia, infinitas categorías en la población de áfidos, cada una caracterizada por una edad específica. Se hace necesario, en consecuencia, determinar si reduciendo la magnitud de los saltos a los que avanza el tiempo (Δt) el modelo converge, así como determinar un valor de Δt para el que se pueda considerar que la aproximación es suficientemente buena. Para ello, se graficó la variación del número total de áfidos con el tiempo para valores progresivamente menores de Δt (*i.e.* un número cada vez mayor de categorías) de forma que, si las curvas se aproximan cada vez más a una límite, se puede aceptar la convergencia y determinar el valor de Δt con el que trabajar. Los resultados obtenidos, junto a una comparativa de la dinámica basada en matrices de Leslie (ecuación 4.7) y en el modelo logístico basado en ecuación de Euler-Lotka (ecuación 4.1) se representan en la figura 4.3.

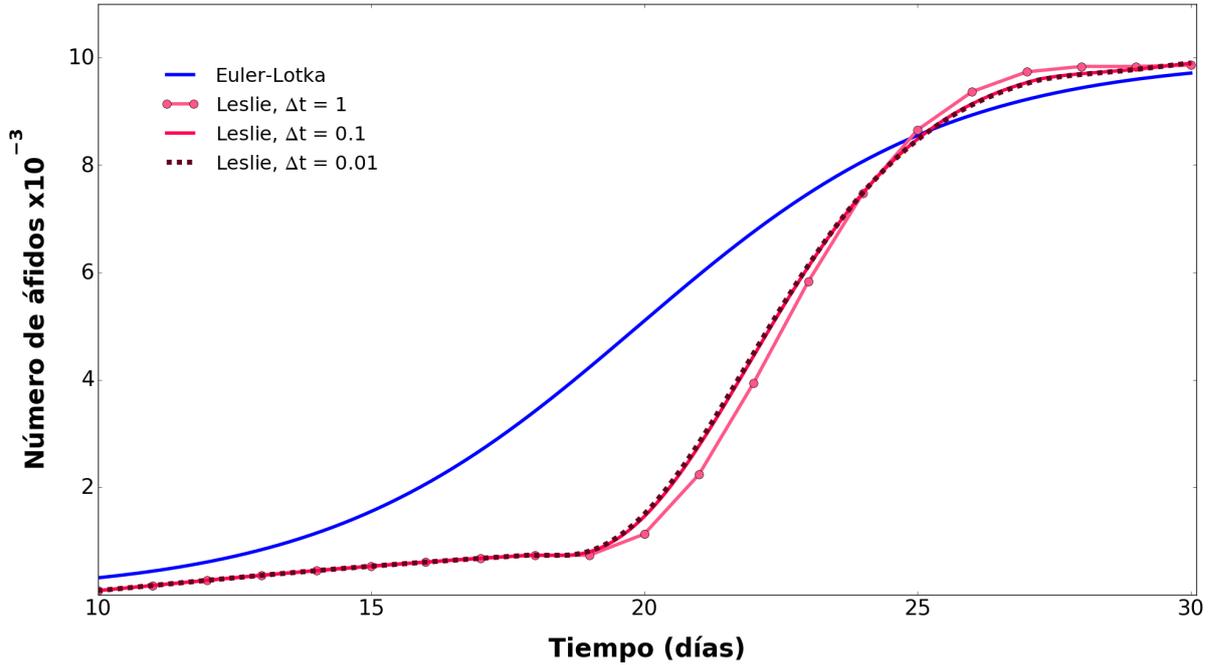


Figura 4.3: Representación de la dinámica de poblaciones de los áfidos de acuerdo al modelo logístico basado en la ecuación de Euler-Lotka (línea azul, ecuación 4.1) y al modelo de Leslie con inhibición por densidad (ecuación 4.7) con distinto número de categorías (*i.e.* distintos valores de Δt , líneas rojas). La matriz de Leslie \mathbf{L} se construyó de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = 10^4$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros del modelo de la dinámica bacteriana corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $\mu = 0,936$ 1/días; $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $Y_{PB}^0 = 10 \mu g$ de producto por cada 10^6 bacterias; $Y_{PB}^\mu = 0 \mu g$ de producto por cada 10^6 bacterias; $\Delta I = 120 \mu g$ de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de emplear matrices de Leslie en el cálculo de la dinámica de poblaciones de los áfidos, ya que la curva es radicalmente distinta a la que se obtiene a partir del modelo logístico (ecuación 4.1) parametrizado de acuerdo a la tasa de crecimiento intrínseco r de la ecuación de Euler-Lotka (ecuación 4.2). De cara a la convergencia, no se aprecian diferencias entre las dinámicas calculadas con $\Delta t = 0,1$ y $\Delta t = 0,01$. Atendiendo a esto, se aceptará que un tamaño de paso de $\Delta t = 0,1$ (180 categorías) es suficiente para aproximar adecuadamente la dinámica de poblaciones de los áfidos.

Hasta ahora se ha considerado el crecimiento de una población compuesta por una única población de áfidos, esto es, una población en la que todos los individuos están caracterizados por la misma matriz de Leslie \mathbf{L} . Para compatibilizar el modelo

de dinámica de poblaciones planteado con el diseño experimental representado en la figura 4.1 es necesario generalizar la relación de recurrencia 4.7 al caso de dos poblaciones distintas (mutante y silvestre), compuesta cada una por individuos caracterizados por una matriz de Leslie concreta (\mathbf{L}_m y \mathbf{L}_s respectivamente).

La generalización buscada es trivial, especialmente si aceptamos que el A_{max} es común a las dos poblaciones consideradas. En concreto, la dinámica de cada población particular tiene que venir dada por una relación de recurrencia análoga a la presentada en la ecuación 4.7, con la diferencia de que el único término no nulo de la matriz $\mathbf{I}_\Sigma(T)$ debe ser el total de todas las poblaciones, y no sólo de la población particular considerada. Formalmente:

$$\begin{pmatrix} \mathbf{I}^m(T+1) \\ \mathbf{I}^s(T+1) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \left(\mathbb{I} - \frac{1}{A_{max}} \mathbf{I}_\Sigma^{total}(T)\right) \mathbf{L}_m & 0 \\ 0 & \left(\mathbb{I} - \frac{1}{A_{max}} \mathbf{I}_\Sigma^{total}(T)\right) \mathbf{L}_s \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{I}^m(T) \\ \mathbf{I}^s(T) \end{pmatrix} \quad (4.9)$$

donde los índices m y s representan a las poblaciones mutante y silvestre respectivamente; e $\mathbf{I}_\Sigma^{total}(T)$ es una matriz con la siguiente forma:

$$\mathbf{I}_\Sigma^{total}(T) = \begin{pmatrix} \|\mathbf{I}^m(T)\|_1 + \|\mathbf{I}^s(T)\|_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & 0 \end{pmatrix} \quad (4.10)$$

Antes de mostrar algún ejemplo de la dinámica de poblaciones de los áfidos y, en particular, de los áfidos fértiles, es necesario describir cualitativamente el comportamiento básico del modelo definido mediante las ecuaciones 4.9 y 4.10. En primer lugar, recordemos que los áfidos comienzan a reproducirse a una determinada edad (t_c) que viene definida, en última instancia, por las capacidades metabólicas de los endosimbiontes que alojan. En consecuencia, los mutantes y los áfidos silvestres comenzarán a reproducirse, en general, a tiempos distintos. La función de fertilidad, a partir de t_c disminuye progresivamente tras alcanzar un máximo, normalmente no más de cinco días después del inicio del período reproductivo. Si una población homogénea (sea mutante o silvestre) crece a partir de un inóculo de $A(0)$ individuos de edad 0, la población total se mantendrá en $A(0)$ hasta exactamente $t = t_c$. En ese instante, los áfidos del inóculo, ahora sexualmente maduros, comenzarán a reproducirse. Como los descendientes no serán sexualmente maduros, entre $t = t_c$ y $t = 2t_c$ la población crecerá proporcionalmente a $A(0)$. Este crecimiento sería estrictamente lineal si la función de fertilidad fuese constante a partir de $t = t_c$ y no existiese

inhibición del crecimiento por densidad. Puesto que no es el caso, el crecimiento se atenuará progresivamente con el tiempo, esencialmente por el envejecimiento de la población, ya que la inhibición por densidad, salvo que la capacidad máxima sea pequeña, será despreciable en ese momento. A tiempo $t = 2t_c$, la población estará compuesta por descendientes directos de los áfidos del inóculo cuya edad oscilará entre 0 y t_c días, además de los áfidos del propio inóculo, de no haber fallecido a causa de la edad. A partir de este momento es cuando el solapamiento generacional y, en consecuencia, el crecimiento logístico (exponencial de no existir inhibición por densidad) comienza. Conforme la población crece, la inhibición por densidad también, lo que implica que el número de descendientes a cada tiempo se hace cada vez menor. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los áfidos mueren. Esto quiere decir que, para valores del total de la población próximos a la capacidad máxima es posible que haya etapas en las que la mortalidad supere a la natalidad, lo que implicaría una disminución local del total de la población. Esta disminución viene acompañada de la correspondiente reducción del término de densidad. La población, en consecuencia, volverá a crecer hasta valores próximos a la capacidad máxima, momento en que la mortalidad superará de nuevo a la natalidad, repitiéndose el ciclo indefinidamente. Esto es, al aproximarse el total de la población a la capacidad máxima, esta oscilará indefinidamente.

Consideremos ahora qué ocurre con los áfidos fértiles, población que define, en última instancia, la composición del siguiente pase. Nótese que lo discutido a continuación es extrapolable a otras subpoblaciones de áfidos definidas mediante un único rango de edades. Como el inóculo inicial está compuesto de ninfas de 0 días de edad, el total de áfidos fértiles será nulo hasta $t = t_c$, momento en que la totalidad del inóculo será fértil. A partir de ese instante, la dinámica de esta subpoblación sigue una tendencia completamente análoga a la del total de la población, con una diferencia: debido a que los áfidos fértiles dejan de serlo antes de morir, las oscilaciones de esta subpoblación son más marcadas (*i.e.* tienen una mayor amplitud) que las correspondientes a las de la población total.

Finalmente, al considerar la evolución temporal de la población total y fértil desarrollada a partir de un inóculo mixto compuesto por áfidos mutantes y silvestres, es de esperar un comportamiento análogo a los discutidos con la importante salvedad de la diferencia en las capacidades metabólicas y, en consecuencia, en las funciones de fertilidad de los dos tipos de insectos. Estas diferencias se manifiestan en la dinámica de dos formas.

En primer lugar, los áfidos con peores capacidades metabólicas (supongamos que sean los mutantes) comenzarán a reproducirse más tarde que los otros (nótese, además, que este desfase también implica que la máxima fertilidad de los áfidos mutantes se alcanza más tarde que la correspondiente a la población silvestre, un hecho de capital importancia de cara a entender cómo varía la frecuencia de áfidos mutantes fértiles con el tiempo). Esto supone un retraso en la dinámica que, debido

a la inhibición por densidad, resulta perjudicial en el corto plazo a la población mutante, ya que cuando esta comience a incrementarse, los áfidos silvestres habrán consumido parte de la capacidad máxima del sistema.

En segundo lugar, y si consideramos el modelo de dinámica bacteriana independiente de la fertilidad del áfido (ver capítulo 3), el total de descendientes engendrados por un áfido mutante será menor que el correspondiente a un áfido silvestre. Este hecho supone que, en la dinámica a largo plazo del sistema, la población mutante terminará por extinguirse. Un ejemplo de dinámica de una población mixta de áfidos (inóculo de 10 individuos, 5 de ellos mutantes) en la que se muestran los comportamientos justificados se representa en la figura 4.4. Obsérvese, efectivamente, la tendencia decreciente de las curvas rojas (población mutante).

Una vez conocidas las características de la evolución temporal de una población mixta de insectos, es inmediato deducir cómo varía la frecuencia de áfidos mutantes entre la población fértil (χ) con el tiempo (ver figura 4.5). Recordemos que el desarrollo de una población de áfidos propagada a partir de ninfas de 0 días de edad se puede dividir en cuatro etapas: maduración sexual del inóculo (la población no crece), crecimiento *cuasi* lineal (el número de áfidos fértiles es constante e idéntico al tamaño de inóculo), crecimiento exponencial (la primera generación de áfidos alcanza la madurez sexual) y estacionamiento oscilatorio (el total de la población oscila en torno a valores próximos a la capacidad máxima, sin sobrepasarla). Estas etapas vienen definidas por el tiempo que tarda un áfido en alcanzar la madurez sexual, esto es, de t_c . Nótese que la dinámica de poblaciones de los áfidos fértiles es la de la población total, pero desfasada. Esto es, cuando la población total entra en la fase exponencial, la de áfidos fértiles entra en la *cuasi* lineal. La evolución de χ en el tiempo, por tanto, depende de la relación entre los tiempos a los que los áfidos silvestres y mutantes comienzan a reproducirse (t_c^s y t_c^m respectivamente); o lo que es lo mismo, de cómo solapan las distintas fases de crecimiento de las poblaciones mutante y silvestre. Por simplicidad (el resto de casos se pueden resolver sin mucha dificultad) discutiremos el caso en que las etapas son prácticamente coincidentes, correspondiente a mutaciones ligera y moderadamente deletéreas (ver figura 4.5).

En el caso planteado, el valor de χ sólo resulta de interés durante la etapa de crecimiento exponencial, ya que es entonces cuando se procede a inocular una nueva población (ver sección 4.2.1 y figura 4.1). En cualquier caso, en la etapa de maduración sexual, χ o no está definido (ningún áfido ha alcanzado la madurez sexual) o es cero (sólo los áfidos silvestres del inóculo han alcanzado la madurez sexual); mientras que en la *quasi* lineal χ toma un valor constante e idéntico a la frecuencia de mutantes en el inóculo (todos los áfidos del inóculo y sólo estos son fértiles). En la etapa exponencial, la población fértil crece de forma *quasi* lineal. Como los áfidos silvestres entran en esta etapa antes que los mutantes, existe una primera y breve etapa en la que χ o bien decrece (los únicos mutantes fértiles son los del inóculo mientras que los silvestren se incrementan) o bien es nula (los mutantes del inóculo

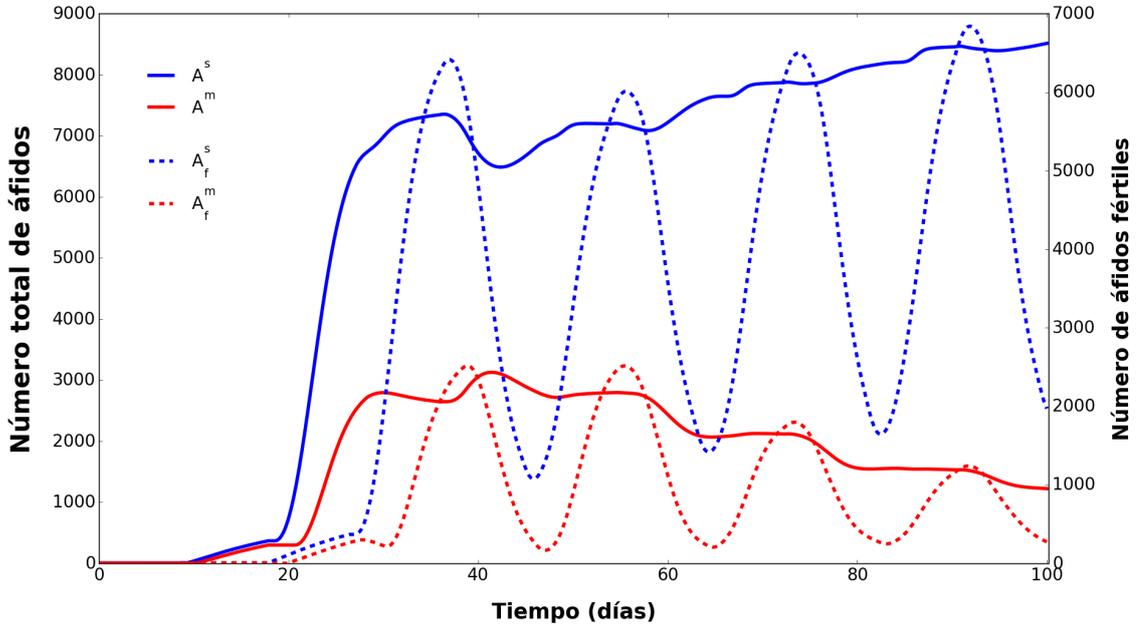


Figura 4.4: Representación de la dinámica de una población mixta de áfidos. La población inicial se compone de 5 ninfas mutantes y 5 silvestres de 0 días de edad. La línea azul continua representa el total de áfidos silvestres (A^s) mientras que la línea continua roja señala a la población mutante total (A^m). Las líneas punteadas representan el número de áfidos fértiles mutantes (A_f^m , rojo) y silvestres (A_f^s , azul). La matriz de Leslie correspondiente a la población silvestre \mathbf{L}_s se construyó de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = 10^4$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros del modelo de la dinámica bacteriana corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $\mu = 0,936$ 1/días; $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $Y_{PB}^0 = 10$ μg de producto por cada 10^6 bacterias; $Y_{PB}^\mu = 0$ μg de producto por cada 10^6 bacterias; $\Delta I = 120$ μg de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto. La matriz de Leslie correspondiente a la población mutante \mathbf{L}_m se construyó de forma análoga, siendo las únicas diferencias los valores de μ e Y_{PB}^0 , que son un 90% de los correspondientes a la población silvestre.

han muerto). Cuando la población mutante entra en fase exponencial, tanto la población fértil como la mutante están creciendo *quasi* linealmente. Esto supone que χ se mantendrá prácticamente constante en esta etapa. Más finamente, como la fertilidad de los áfidos (sean del tipo que sean) decrece con la edad, χ crecerá ligeramente con el tiempo, ya que los áfidos silvestres fértiles serán, de media, mayores que los mutantes. Llegado el momento, el número de áfidos silvestres fértiles comenzará a crecer exponencialmente, ya que los áfidos de segunda generación habrán alcanzado la madurez sexual. En consecuencia, χ decae bruscamente hasta que la segunda generación de áfidos mutantes alcanza la madurez sexual. A partir de entonces, el comportamiento descrito se repetirá, cualitativamente, de forma cíclica, si bien con valores de χ cada vez menores.

Hasta ahora se ha considerado, de acuerdo al modelo experimental representado en la figura 4.1, que todos los individuos que componen el inóculo son recién nacidos. Sin embargo, no es razonable suponer que la sincronización del inóculo sea perfecta. Teniendo en cuenta la importancia del desfase en la evolución de χ , se hace necesario evaluar la influencia de imprecisiones en la sincronización en la evolución de esta variable. Si suponemos que se puede garantizar que todos los individuos del inóculo tengan entre 0 y 1 días de edad, determinar para qué distribuciones de edades específicas en el inóculo se obtienen cotas superiores e inferiores de χ resulta un problema nada trivial. Sin embargo, parece sensato aproximar el rango explorando los casos de máximo desfase en el inóculo (*i.e.* todos los mutantes tienen 1 (ó 0) días de edad y todos los áfidos silvestres tienen 0 (o 1) día de edad para calcular la cota superior (inferior)). Los resultados se recogen en la figura 4.5. Tal y como se puede observar, las imprecisiones en la sincronización del inóculo tienen un importante efecto en la frecuencia de mutantes en la población fértil. De hecho, cuando la población ha alcanzado un 50 % de la máxima (*i.e.* en el momento de muestreo), la frecuencia de mutantes varía entre 0.33 y 0.43, un rango nada desdeñable. Nótese, además, que los valores empleados para definir los rangos en los que se mueve χ no son universalmente válidos, por lo que la imprecisión podría ser aún mayor. Estas cuestiones, en consecuencia, deberán considerarse a la hora de interpretar las probabilidades de fijación y otras magnitudes relacionadas.

4.2.3. Cálculo de la probabilidad de fijación de mutaciones que afectan a la fertilidad y/o supervivencia del áfido

En la sección 4.2.1 se definió la probabilidad de fijación como la probabilidad de que, tras un número infinito de pases, la población obtenida a partir de un inóculo inicial dado (formado por áfidos mutantes y silvestres), esté compuesta sólo por mutantes. Además, se destacó que la composición del inóculo correspondiente al pase n tan sólo depende del número de áfidos mutantes (${}^{n-1}A_f^m(t_m)$) y silvestres (${}^{n-1}A_f^s(t_m)$) fértiles presentes a tiempo del pase (t_m) en la población correspondiente al pase $n - 1$. Las variables ${}^{n-1}A_f^m(t_m)$ y ${}^{n-1}A_f^s(t_m)$ dependen, a su vez, de la com-

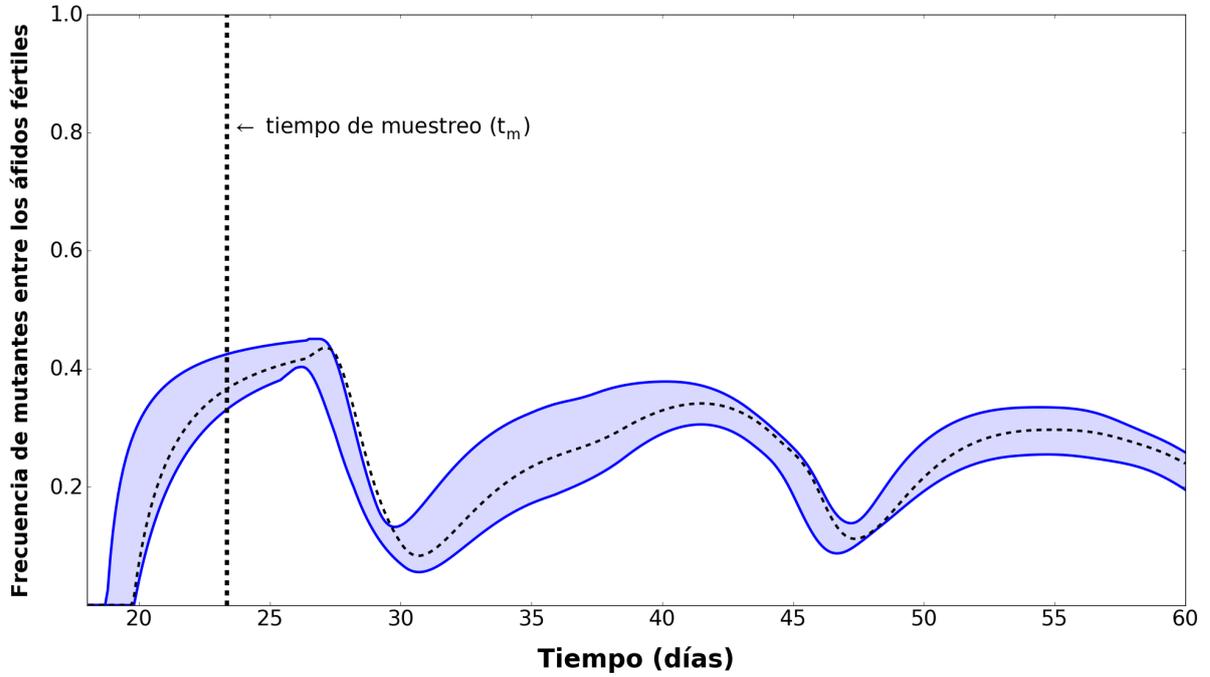


Figura 4.5: Representación de la evolución temporal de la frecuencia de mutantes entre los áfidos fértiles. La población inicial se compone de 5 ninfas mutantes y 5 mutantes silvestres de 0-1 días de edad. El rango de los valores de frecuencia cubierto por distintas distribuciones de edad de la población inicial se indica mediante el área azul. La línea negra discontinua señala el punto donde la población total alcanza un 50 % de la máxima. La matriz de Leslie correspondiente a la población silvestre \mathbf{L}_s se construyó de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = 10^4$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros del modelo de la dinámica bacteriana corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $\mu = 0,936$ 1/días; $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $Y_{PB}^0 = 10$ μg de producto por cada 10^6 bacterias; $Y_{PB}^\mu = 0$ μg de producto por cada 10^6 bacterias; $\Delta I = 120$ μg de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto. La matriz de Leslie correspondiente a la población mutante \mathbf{L}_m se construyó de forma análoga, siendo las únicas diferencias los valores de μ e Y_{PB}^0 , que son un 90 % de los correspondientes a la población silvestre.

posición en número de áfidos mutantes (${}^{n-1}A^m(0)$) y silvestres (${}^{n-1}A^s(0)$), siempre $A(0)$ individuos en total, presentes en el inóculo correspondiente al pase $n - 1$. Esto implica que, dado un modelo de dinámica de poblaciones como el planteado en la sección 4.2.2, la composición del inóculo correspondiente al pase n (*i.e.* ${}^nA^m(0)$ y ${}^nA^s(0)$), dependerá únicamente de la composición del inóculo correspondiente al pase $n - 1$.

Esta propiedad indica, en última instancia, que la probabilidad de obtener un determinado inóculo en el pase n depende solamente del inóculo anterior. Los procesos estocásticos en los que, como este, la probabilidad de que ocurra un evento depende solamente del evento inmediatamente anterior, se denominan cadenas de Markov [148]. La teoría de las cadenas de Markov permite obtener, de manera sencilla, mucha información sobre el proceso en estudio a partir de la matriz de transición que lo caracteriza. Los elementos $M_{i,j}$ de esta matriz de transición, que denominaremos \mathbf{M} , representan la probabilidad de que partiendo del estado i se alcance el estado j en un paso. En el presente caso, los distintos estados corresponden a las distintas composiciones de inóculos posibles, y un paso corresponde a un pase.

Puesto que el total de individuos en el inóculo es siempre de $A(0)$ por diseño experimental, cada posible inóculo está caracterizado unívocamente por el número de mutantes en el mismo ($A^m(0)$). A cada posible valor de $A^m(0) \in [0, A(0)]$ le corresponderá, de acuerdo al modelo de dinámica de poblaciones correspondiente, unos valores específicos de $A_f^m(t_m, A^m(0))$ y $A_f^s(t_m, A^m(0))$, donde el término $A^m(0)$ añadido al paréntesis indica la dependencia con la composición del inóculo.

De acuerdo al diseño experimental presentado en la sección 4.2.1, del total de áfidos fértiles a tiempo t_m en el pase $n - 1$ (${}^{n-1}A_f(t_m, A^m(0)) = {}^{n-1}A_f^m(t_m, A^m(0)) + {}^{n-1}A_f^s(t_m, A^m(0))$) se seleccionan sin reposición $A(0)$ individuos al azar para conformar el nuevo inóculo. En consecuencia, la probabilidad de que en este inóculo haya un determinado número de mutantes ${}^nA^m(0)$, condicionada a que el número de mutantes en el inóculo previo sea de ${}^{n-1}A^m(0)$, vendrá dada por una distribución hipergeométrica [149]:

$$P({}^nA^m(0)|{}^{n-1}A^m(0)) = \frac{\binom{{}^{n-1}A_f^m(t_m, A^m(0))}{{}^nA^m(0)} \binom{{}^{n-1}A_f^s(t_m, A^m(0))}{A(0) - {}^nA^m(0)}}{\binom{{}^{n-1}A_f^m(t_m, A^m(0)) + {}^{n-1}A_f^s(t_m, A^m(0))}{A(0)}} \quad (4.11)$$

donde $P({}^nA^m(0)|{}^{n-1}A^m(0))$ representa la probabilidad de que en el inóculo correspondiente al pase n haya ${}^nA^m(0)$ mutantes condicionada a que hubiera ${}^{n-1}A^m(0)$ mutantes en el inóculo correspondiente al pase $n - 1$. Esto es, los distintos valores

de $P({}^n A^m(0) | {}^{n-1} A^m(0))$ definen las entradas M_{ij} de la matriz de transición \mathbf{M} , de dimensiones $A(0) + 1 \times A(0) + 1$, que caracteriza el proceso.

Conocida la matriz de transición, el vector $P({}^n A^m(0))$ (vector de estados) que tiene por componentes las probabilidades de que en el inóculo correspondiente al pase n haya $0, 1, 2, \dots, A(0)$ mutantes viene dado por:

$$P({}^n A^m(0)) = \mathbf{M}^n P({}^0 A^m(0)) \quad (4.12)$$

donde $P({}^0 A^m(0))$ es el vector de estados inicial.

La matriz \mathbf{M} presenta varias características particulares, puesto que si el número de mutantes en un inóculo ($A^m(0)$) es 0 o $A(0)$, todas las poblaciones propagadas a partir de entonces están compuestas únicamente de áfidos silvestres o de mutantes respectivamente. En la terminología de las cadenas de Markov, se dice que los estados $A^m(0) = 0$ e $A^m(0) = A(0)$ son estados absorbentes. Atendiendo a esto, \mathbf{M} debe tener la siguiente estructura:

$$\mathbf{M} = \begin{pmatrix} 1 & \mathbf{G}_M & 0 \\ 0 & \mathbf{G} & 0 \\ 0 & \mathbf{G}_S & 1 \end{pmatrix} \quad (4.13)$$

donde \mathbf{G}_M y \mathbf{G}_S son matrices $1 \times A(0) - 1$ que contienen las probabilidades de pasar de un estado de transición (*i.e.* un estado que no es absorbente, esto es $A^m(0) \neq 0$ y $A^m(0) \neq A(0)$) a los estados absorbentes correspondientes a sólo áfidos mutantes y sólo áfidos silvestres respectivamente; y \mathbf{G} es una matriz $(A(0) - 1) \times (A(0) - 1)$ cuyos componentes son las probabilidades de pasar de un estado transitorio a otro. Nótese que todas las columnas de \mathbf{M} suman 1, de manera que se satisfaga la probabilidad total.

Atendiendo a la ecuación 4.13, se puede reexpresar la ecuación 4.12 como sigue:

$$P({}^n A^m(0)) = \begin{pmatrix} 1 & \mathbf{G}_M & 0 \\ 0 & \mathbf{G} & 0 \\ 0 & \mathbf{G}_S & 1 \end{pmatrix}^n P({}^0 A^m(0)) \quad (4.14)$$

desarrollando la potencia de la matriz:

$$P(^n A^m(0)) = \begin{pmatrix} 1 & \mathbf{G}_M \sum_{i=1}^n \mathbf{G}^{i-1} & 0 \\ 0 & \mathbf{G}^n & 0 \\ 0 & \mathbf{G}_S \sum_{i=1}^n \mathbf{G}^{i-1} & 1 \end{pmatrix} P(^0 A^m(0)) \quad (4.15)$$

Nótese que, en la ecuación 4.15, cada componente de los términos $\mathbf{G}_M \mathbf{G}^{i-1}$ del sumatorio, representa la probabilidad de alcanzar en exactamente i pases el estado absorbente de sólo mutantes partiendo de un inóculo con el número de mutantes correspondiente a dicha componente. Puesto que la probabilidad de fijación P_f puede definirse como la probabilidad de alcanzar en cualquier número de pases el estado absorbente de sólo mutantes, en consecuencia:

$$P_f = \left\| \lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}_M \sum_{i=1}^n \mathbf{G}^{i-1} P(^0 A^m(0)) \right\|_1 \quad (4.16)$$

donde $P(^0 A^m(0))$ representa la distribución de probabilidad del número de mutantes en el inóculo inicial; y $\|\cdot\|_1$ representa la norma matricial calculada sumando el valor absoluto de todas sus componentes. Resolviendo el sumatorio (ver Caja 1), obtenemos:

$$P_f = \left\| \lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}_M (\mathbb{I} - \mathbf{G}^n) (\mathbb{I} - \mathbf{G})^{-1} P(^0 A^m(0)) \right\|_1 \quad (4.17)$$

Si suponemos que $\|\mathbf{G}\|_1^{sub} < 1$, con $\|\cdot\|_1^{sub}$ la 1-norma subordinada de \mathbf{G} (*i.e.* la suma absoluta de las columnas de la matriz \mathbf{G}), $\lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}^n = \mathbf{O}$, con \mathbf{O} la matriz nula (ver Caja 2). En consecuencia:

$$P_f = \left\| \mathbf{G}_M (\mathbb{I} - \mathbf{G})^{-1} P(^0 A^m(0)) \right\|_1 \quad (4.18)$$

Caja 1: Resolución de $\sum_{i=1}^n \mathbf{G}^{i-1}$.

Sea:

$$S = \sum_{i=1}^n \mathbf{G}^{i-1} = \sum_{i=0}^{n-1} \mathbf{G}^i$$

Multiplicando ambos lados de la igualdad por $(\mathbf{I} - \mathbf{G})$:

$$\begin{aligned} S(\mathbf{I} - \mathbf{G}) &= \mathbf{I} - \mathbf{G} + \mathbf{G} - \mathbf{G}^2 + \mathbf{G}^2 + \dots - \mathbf{G}^{n-1} + \mathbf{G}^{n-1} - \mathbf{G}^n \\ S(\mathbf{I} - \mathbf{G}) &= \mathbf{I} - \mathbf{G}^n \end{aligned}$$

Suponiendo $(\mathbf{I} - \mathbf{G})$ invertible:

$$S = (\mathbf{I} - \mathbf{G}^n)(\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-1}$$

La condición $\|\mathbf{G}\|_1^{sub} < 1$ no tiene por qué cumplirse en general. Para que $\|\mathbf{G}\|_1^{sub} = 1$, debe ser imposible obtener un inóculo compuesto únicamente por mutantes o áfidos silvestres al realizar un pase, con independencia del número de mutantes ($A^m(0)$) del inóculo (obviamente mixto) del pase anterior. Esto es, debe existir algún índice tal que las columnas de las matrices \mathbf{G}_M y \mathbf{G}_S correspondientes a este índice sean nulas. Para ello, debe existir algún $A^m(0) \in (0, A(0))$, tal que $A_f^m(t_m, A^m(0)) < A(0)$ y $A_f^s(t_m, A^m(0)) < A(0)$, o lo que es lo mismo, tanto el número de mutantes fértiles $A_f^m(t_m, A^m(0))$ como el número de áfidos silvestres fértiles $A_f^s(t_m, A^m(0))$ debe ser menor al número de individuos en el inóculo. De no cumplirse esto, siempre se podrían tomar $A(0)$ mutantes o $A(0)$ áfidos silvestres, lo que implicaría que para cada $0 < A^m(0) < A(0)$, la componente correspondiente de \mathbf{G}_M y/o la de \mathbf{G}_S sería no nula. Nótese que esta condición también implica que no pueden existir estados absorbentes mixtos, esto es, con áfidos mutantes y silvestres. La razón es análoga a la recién expuesta: para que exista un estado absorbente mixto, en el momento del muestreo deberían existir exactamente $A(0)$ áfidos fértiles. De no ser el caso, la probabilidad de alcanzar cualquiera de los estados siempre será menor que uno y, por ende, el estado de partida no puede ser absorbente.

En definitiva, para poder emplear la ecuación 4.18, se debe cumplir que, para todo $A^m(0) \in (0, A(0))$, el número de áfidos mutantes o bien el de silvestres a tiempo de muestreo debe ser mayor que el tamaño de inóculo ($A_f^m(t_m, A^m(0)) \geq A(0)$ o $A_f^s(t_m, A^m(0)) \geq A(0)$). En consecuencia, una condición suficiente es que la población de áfidos fértiles a tiempo de muestreo sea de al menos el doble que el tamaño de inóculo ($A_f(t_m, A^m(0)) \geq 2A(0)$). Puesto que, salvo que los áfidos presenten una capacidad reproductiva muy baja, es de esperar que tras t_m días la población total

al menos se duplique, se descartarán las situaciones en las que esto no suceda.

Adicionalmente a la probabilidad de fijación, resulta de gran interés determinar cuándo se produce la fijación, en caso de darse. Si denominamos \mathcal{N}_{fix}^m a la variable aleatoria que representa el pase al que se produce la fijación del mutante, la probabilidad de que una mutación se fije en n pases ($P(\mathcal{N}_{fix}^m = n)$), tal y como se ha deducido previamente en esta sección, viene dada por:

$$P(\mathcal{N}_{fix}^m = n) = \|\mathbf{G}_M \mathbf{G}^{n-1} P(^0A^m(0))\|_1 \quad (4.19)$$

La probabilidad de que la fijación se produzca en n pases condicionada a que se produzca dicha fijación será:

$$P(\mathcal{N}_{fix}^m = n \mid fijación) = \|\mathbf{G}_M \mathbf{G}^{n-1} P(^0A^m(0))\|_1 / P_f \quad (4.20)$$

El número medio de pases hasta la fijación, $\overline{\mathcal{N}_{fix}^m}$, puede calcularse, entonces, como sigue:

$$\overline{\mathcal{N}_{fix}^m} = \sum_{n=1}^{\infty} n P(\mathcal{N}_{fix}^m = n \mid fijación) \quad (4.21)$$

sustituyendo el valor de $P(\mathcal{N}_{fix}^m = n \mid fijación)$ de acuerdo a la ecuación 4.20:

$$\overline{\mathcal{N}_{fix}^m} = \sum_{n=1}^{\infty} n \|\mathbf{G}_M \mathbf{G}^{n-1} P(^0A^m(0))\|_1 / P_f \quad (4.22)$$

Puesto que la matrix $\mathbf{G}_M \mathbf{G}^{n-1} P(^0A^m(0))$ tiene componentes no negativas, el sumatorio de la ecuación 4.22 puede incluirse en la norma, de forma que:

$$\overline{\mathcal{N}_{fix}^m} = \|\mathbf{G}_M \left(\sum_{n=1}^{\infty} n \mathbf{G}^{n-1} \right) P(^0A^m(0))\|_1 / P_f \quad (4.23)$$

Resolviendo el sumatorio (ver Caja 3), obtenemos:

$$\overline{\mathcal{N}_{fix}^m} = \|\mathbf{G}_M(\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-2}P(^0A^m(0))\|_1/P_f \quad (4.24)$$

El valor de $\overline{\mathcal{N}_{fix}^m}$, sin embargo, no da una idea adecuada del tiempo necesario para lograr que la mutación se fije, ya que no considera el número de intentos necesarios para que la mutación considerada se fije. Afortunadamente, la distribución de probabilidades que describe el número de intentos necesarios para la fijación (\mathcal{E}) es sencillo. Puesto que cada intento es independiente, para que $\mathcal{E} = k$, es necesario que se hayan dado exactamente $k - 1$ intentos fallidos previos al exitoso. Puesto que la probabilidad de fijación determina la probabilidad de que un intento tenga o no éxito, se deduce que:

$$P(\mathcal{E} = k) = (1 - P_f)^{k-1}P_f \quad (4.25)$$

Atendiendo a esta distribución, el número medio de intentos necesarios para que la mutación se fije ($\overline{\mathcal{E}}$) es de (ver Caja 4):

$$\overline{\mathcal{E}} = 1/P_f \quad (4.26)$$

Cada intento fallido puede interpretarse como un intento en que la población silvestre es la que se fija. Por ello, la distribución del número de pases necesarios para eliminar a la mutación de la población es análoga a la del número de pases necesarios para fijar la mutación (ecuación 4.20). En consecuencia, el número medio de pases necesarios para eliminar la mutación ($\overline{\mathcal{N}_{fix}^s}$) es:

$$\overline{\mathcal{N}_{fix}^s} = \|\mathbf{G}_S(\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-2}P(^0A^s(0))\|_1/(1 - P_f) \quad (4.27)$$

Tomando en cuenta las ecuaciones 4.24, 4.26 y 4.27, y puesto que la media de la suma de variables aleatorias es la suma de las medias correspondientes, el número medio de pases necesarios para que se fije la mutación considerando los intentos fallidos, $\overline{\mathcal{T}_{fix}}$ es:

$$\overline{\mathcal{T}_{fix}} = (1/P_f - 1)\overline{\mathcal{N}_{fix}^s} + \overline{\mathcal{N}_{fix}^m} \quad (4.28)$$

Caja 2: Condiciones para las que $\lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}^n = \mathbf{O}$.

Se define el radio espectral ρ de la matriz \mathbf{G} como el máximo de los módulos de sus autovalores. De acuerdo al teorema de Jordan para matrices, toda matriz \mathbf{G} puede descomponerse como sigue:

$$\mathbf{G} = \mathbf{P}\mathbf{D}\mathbf{P}^{-1}$$

con \mathbf{D} una matriz diagonal por bloques en la que cada bloque \mathbf{D}_i tiene la forma:

$$\mathbf{D}_i = \begin{pmatrix} \lambda_k & 1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \lambda_k & 1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & \lambda_k \end{pmatrix}$$

Considerando esta descomposición, se tiene que:

$$\mathbf{G}^n = \mathbf{P}\mathbf{D}^n\mathbf{P}^{-1}$$

Si $\rho(\mathbf{G}) < 1$, se tiene que:

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}^n = \mathbf{O}$$

donde \mathbf{O} es la matriz nula.

Sea $\|\cdot\|$ una norma matricial, λ_ρ el autovalor de \mathbf{G} de módulo máximo, y v un autovector asociado a λ_ρ . Entonces:

$$\|\mathbf{G}\mathbf{v}\| \leq \|\mathbf{G}\| \|\mathbf{v}\| \Rightarrow |\lambda_\rho| \|\mathbf{v}\| \leq \|\mathbf{G}\| \|\mathbf{v}\| \Rightarrow |\lambda_\rho| \leq \|\mathbf{G}\| \Rightarrow \rho(\mathbf{G}) \leq \|\mathbf{G}\|$$

En consecuencia, una condición suficiente para que $\lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}^n = \mathbf{O}$ es, por tanto, que $\|\mathbf{G}\|_1^{sub} < 1$, con $\|\cdot\|_1^{sub}$ la 1-norma subordinada, que no es más que la máxima suma absoluta de las columnas de la matriz correspondiente.

Caja 3: Resolución de $\sum_{i=1}^{\infty} i\mathbf{G}^{i-1}$.

Para resolver el sumatorio infinito, primero se resolverá el caso finito con n sumandos y posteriormente se tomará el límite $n \rightarrow \infty$. Sea:

$$S = \sum_{i=1}^n i\mathbf{G}^{i-1}$$

Multiplicando ambos lados de la igualdad por $(\mathbf{I} - \mathbf{G})$:

$$S(\mathbf{I} - \mathbf{G}) = \mathbf{I} + 2\mathbf{G} - \mathbf{G} + 3\mathbf{G}^2 - 2\mathbf{G}^2 + \dots + n\mathbf{G}^{n-1} - (n-1)\mathbf{G}^{n-1} - n\mathbf{G}^n$$

$$S(\mathbf{I} - \mathbf{G}) = \mathbf{I} + \mathbf{G} + \mathbf{G}^2 + \dots + \mathbf{G}^{n-1} - n\mathbf{G}^n$$

$$S(\mathbf{I} - \mathbf{G}) = \sum_{i=0}^{n-1} \mathbf{G}^i - n\mathbf{G}^n$$

Suponiendo $(\mathbf{I} - \mathbf{G})$ invertible y sustituyendo el valor de $\sum_{i=0}^{n-1} \mathbf{G}^i$ de acuerdo a lo deducido en la Caja 1:

$$S = (\mathbf{I} - \mathbf{G}^n) (\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-2} - n\mathbf{G}^n (\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-1}$$

$$S = [n\mathbf{G}^{n+1} - (n+1)\mathbf{G}^n + 1] (\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-2}$$

Tomando ahora el límite cuando $n \rightarrow \infty$ y sabiendo que $\lim_{n \rightarrow \infty} \mathbf{G}^n = 0$ si $\|\mathbf{G}\|_1^{sub} < 1$ (ver Caja 2) se deduce que bajo este supuesto:

$$\sum_{i=1}^{\infty} i\mathbf{G}^{i-1} = (\mathbf{I} - \mathbf{G})^{-2}$$

Caja 4: Cálculo de $\bar{\mathcal{E}}$

La expresión de la media de la distribución del número de intentos necesarios para que una mutación se fije (\mathcal{E} , ecuación 4.25) de acuerdo al modelo experimental descrito en la sección 4.2.1 es:

$$\bar{\mathcal{E}} = \sum_{k=1}^{\infty} k(1 - P_f)^{k-1} P_f$$

El sumatorio $\sum_{k=1}^{\infty} k(1 - P_f)^{k-1}$ se resolvió en la Caja 3. Sustituyendo:

$$\bar{\mathcal{E}} = P_f (1/P_f^2) = 1/P_f$$

Que es la expresión correspondiente a la ecuación 4.26.

Uno de los factores capitales que definen la probabilidad de fijación (si bien implícitamente) es el tamaño del inóculo. Resulta evidente que si el número de mutantes en el inóculo de la población inicial es fijo, a mayor tamaño de inóculo menor probabilidad de fijación. Sin embargo, existen otros efectos que es imprescindible considerar antes de proceder a realizar cálculo alguno. El primero, en línea con lo comentado, es el impacto del tamaño de inóculo en la probabilidad de fijación con independencia de la frecuencia de mutantes en el mismo. El segundo se relaciona con la sensibilidad de la probabilidad de fijación a errores en el proceso de sincronización (sección 4.2.1). En la figura 4.6 se observa claramente que, aún manteniendo la fracción inicial de mutantes constante, el tamaño de inóculo influye fuerte y negativamente en la probabilidad de fijación de las mutaciones deletéreas, mientras que las correspondientes a las neutrales no varían. En concreto, el logaritmo de la probabilidad de fijación anti-correlaciona casi perfectamente ($r = -0,99997$ para el caso graficado) con el tamaño de inóculo, si bien se aprecia una sutil desviación con respecto a la recta de regresión a valores de tamaño de inóculo bajos. Si ahora se considera la influencia del tamaño de inóculo cuando lo que se mantiene constante es el número (y no la fracción) de mutantes en el mismo, se observa una anti-correlación de la misma calidad entre el logaritmo del cociente entre la probabilidad de fijación de la mutación considerada y la de una neutral con el tamaño de inóculo. Puesto que en todos los casos considerados, y en concordancia con los cálculos de Kimura [150], la probabilidad de fijación de una mutación neutral coincide con la frecuencia de mutantes en el inóculo, se deduce que la variación de la probabilidad de fijación con el tamaño de inóculo tiene la siguiente forma:

$$P_f(A(0)) = \frac{A^m(0)}{A(0)} e^{-(aA(0)+b)} \quad (4.29)$$

donde a y b son constantes que dependen de la mutación considerada.

De cara al impacto de los errores en la sincronización, resulta claro que la probabilidad de fijación es extremadamente sensible a los mismos, en línea con lo deducible en relación a los resultados presentados en la sección 4.2.2, figura 4.5. El rango de las probabilidades de fijación calculadas es tanto menor cuanto menor sea el tamaño del inóculo, llegando a ser inferior a un orden de magnitud para valores iguales o inferiores a 6. Afortunadamente, si se acepta la relación presentada en la ecuación 4.29 como válida en general, se puede trabajar con tamaños de inóculo pequeños y extrapolar los valores de probabilidad de fijación obtenidos para valores mayores. Esto presenta la doble ventaja de minimizar el impacto de errores en la sincronización a nivel experimental, y de reducir sustancialmente los tiempos de cálculo, ya que la matriz \mathbf{G} tiene dimensiones $(A(0) - 1) \times (A(0) - 1)$ y el cálculo de la probabilidad de fijación requiere la inversión de esta (ecuación 4.18).

Es imprescindible concluir esta subsección enfatizando que todo lo discutido al respecto del tamaño del inóculo derivan de cálculos efectuados tomando una población máxima de áfidos A_{max} de 1000 veces el tamaño de inóculo considerado en cada caso. El objeto de definir A_{max} en función del tamaño del inóculo es lograr que dos poblaciones de áfidos idénticas que se propagan empleando tamaños de inóculos diferentes presenten la misma dinámica de crecimiento, de forma que el incremento del tamaño de inóculo tiene el sentido del incremento en el tamaño de la población de áfidos considerada.

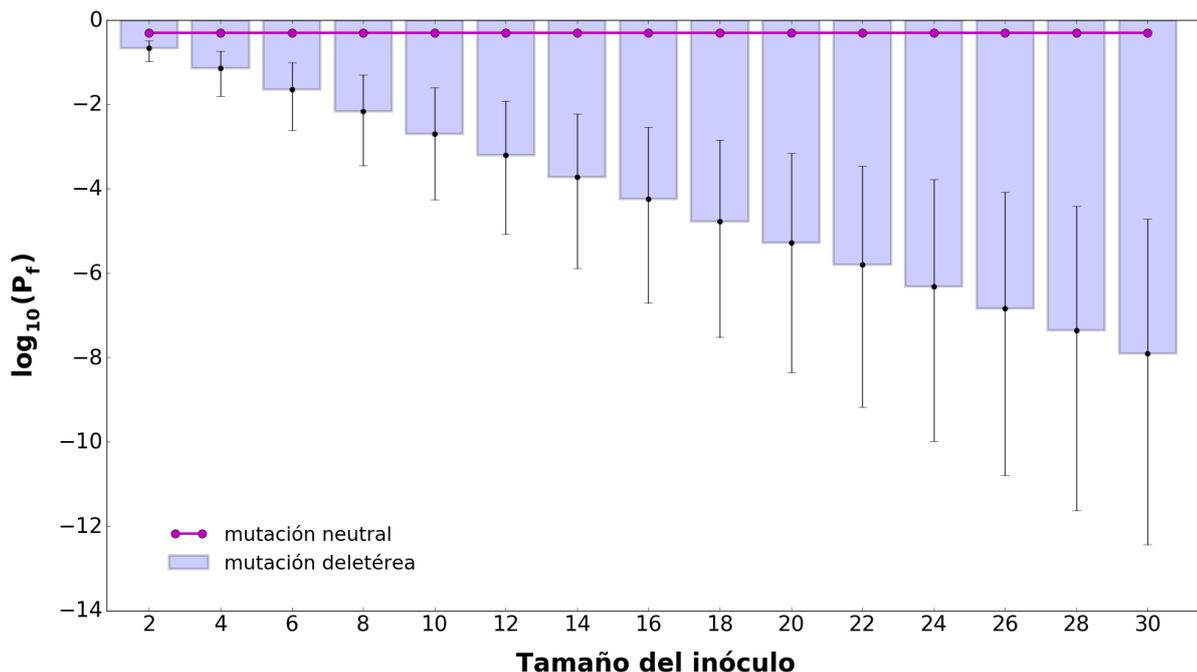


Figura 4.6: Impacto del tamaño de inóculo ($A(0)$) en la probabilidad de fijación (P_f) de mutaciones neutrales (línea morada) y deletéreas (columnas azules). La fracción de mutantes en el inóculo es del 50% en todos los casos. La variación en el valor de las probabilidades de fijación asociadas a errores en la sincronización de la población (ver sección 4.2.1) en el caso de la mutación deletérea se indica mediante una barra de error sobre las columnas. Los valores máximos y mínimos de estas barras corresponden a un desfase de edades entre áfidos mutantes y silvestres de un día. La altura de las columnas representa la probabilidad de fijación en el caso de un inóculo perfectamente sincronizado (*i.e.* mutantes y no mutantes de la misma edad). La matriz de Leslie \mathbf{L} se construyó de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = A(0)10^3$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros del modelo de la dinámica bacteriana corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $\mu = 0,936$ 1/días; $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $Y_{PB}^0 = 10$ μg de producto por cada 10^6 bacterias; $Y_{PB}^\mu = 0$ μg de producto por cada 10^6 bacterias; $\Delta I = 120$ μg de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto. La matriz de Leslie correspondiente a la población mutante \mathbf{L}_m se construyó de forma análoga, siendo las únicas diferencias los valores de μ e Y_{PB}^0 , que son un 90% de los correspondientes a la población silvestre.

4.2.4. Consideraciones en torno al impacto de la dinámica bacteriana en la propagación de mutaciones

A lo largo de la sección 4.2.3, al hablar de áfidos que alojan una población de endosimbiontes mutantes se considera que dichos áfidos contienen una población

bacteriana íntegramente mutante. Esto es, no se estudia la dinámica de fijación de la mutación en la población de endosimbiontes, sino qué sucede al disponer en competición una población de áfidos con endosimbiontes silvestres con otra de áfidos portadores exclusivamente de endosimbiontes mutados. Nótese que si suponemos que cuando aparece una mutación en la población de endosimbiontes alojada en el insecto, esta se fija instantáneamente (*i.e.* toda la población se convierte en mutante a la vez), nunca puede existir un insecto con poblaciones mixtas de endosimbiontes y, por ende, los cálculos realizados corresponderían exactamente a la probabilidad de fijación de dicha mutación. A pesar de que el citado supuesto (la homogeneización inmediata de la población endosimbionte de mutantes en el hospedador en el que aparecen) es, en general, poco realista, cabe plantearse si las probabilidades de fijación calculadas vía esta simplificación son una cota superior de las reales. La respuesta es, en general, negativa. Pongamos un ejemplo: si consideramos una mutación particularmente deletérea para los áfidos, un insecto que contenga una población íntegra de mutantes tendrá serios problemas para competir contra la población silvestre. En cambio, los endosimbiontes mutantes sí que pueden extenderse por la población si se mantienen en frecuencias bajas en los bacteriomas de sus hospedadores. Este hecho supondría que el *fitness* medio de la población disminuye, de forma que, a diferencia del caso anterior, los áfidos con una mayor frecuencia de bacterias mutantes pueden proliferar. Procediendo de este (seguramente lento) modo, la mutación altamente deletérea puede llegar a fijarse. De esta forma, la probabilidad de fijación de una mutación muy deletérea sería mayor en insectos con población bacteriana mixta que con la población homogénea que se ha venido suponiendo este capítulo.

Consideremos ahora, por el contrario, una mutación deletérea casi neutral. Resulta complicado plantearse qué estrategia favorece más el proceso de fijación: fijarse primero en un áfido y que este compita con el resto de la población, extenderse gradualmente como el caso de la mutación altamente deletérea antes descrita, o una estrategia mixta con un cierto grado de contribución de cada una de las anteriores. De ser la primera, la suposición de la fijación instantánea del mutante en el primer hospedador en que aparece (suposición compatible con los cálculos desarrollados en este capítulo) conduciría a una sobrestimación de su probabilidad de fijación, al contrario que en el caso de la mutación altamente deletérea. De ser la segunda, las probabilidades de fijación de ambas mutaciones aquí calculadas estarían subestimadas, posiblemente en similar medida. En cualquier caso, parece sensato aceptar que las probabilidades de fijación calculadas bajo el supuesto de fijación instantánea en el primer hospedador permitirían comparar cualitativamente la eficacia con la que dos mutaciones se extienden en la población, con la consideración particular de que las especialmente negativas estarían en realidad subestimadas.

Resulta conveniente advertir en este punto que existe una diferencia conceptual sustancial entre la probabilidad de fijación y la velocidad a la que esta se produce, ambos conceptos asociables a la eficacia de expansión de una mutación, pero siendo

a priori posible que a probabilidades de fijación apreciables les correspondan, en cambio, tiempos de fijación largos. Sin embargo, tal y como se deduce de la ecuación 4.28, probabilidad de fijación y velocidad de fijación están, afortunadamente, altamente relacionadas, por lo que la validez de la probabilidad de fijación calculada bajo el supuesto de fijación instantánea en el primer hospedador se mantendría sea cual sea la interpretación que se dé a la eficacia de expansión.

Independientemente de estas consideraciones y objeciones, sí hay casos donde la suposición de que sólo existen áfidos con poblaciones homogéneas de endosimbiontes se ajusta bastante a la realidad. Estos casos se dan cuando, en el momento de engendrar descendencia, un tipo de endosimbionte, mutante o silvestre, domina sobre el otro hasta el punto de que resulta improbable inocular endosimbiontes del tipo no dominante a la descendencia. Más concretamente, supongamos que, en un momento dado, durante el crecimiento de la población de endosimbiontes una bacteria muta espontáneamente. Supongamos que la tasa de crecimiento de los citados endosimbiontes es de μ_s mientras que la del mutante es de μ_m . Supongamos además que la dinámica de poblaciones del total de los endosimbiontes en el bacterioma del áfido puede ser descrita mediante el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned} dB_s/dt &= \mu_s B_s \mathcal{J}(t, B_s, B_m) \\ dB_m/dt &= \mu_m B_m \mathcal{J}(t, B_s, B_m) \end{aligned} \quad (4.30)$$

donde B_s y B_m representan el número de endosimbiontes silvestres y mutantes; y \mathcal{J} es una función que en general depende del tiempo, de B_s y de B_m . Nótese que la función \mathcal{J} se supone común a las dos poblaciones, mutante y silvestre, en línea con la consideración de que el tamaño del bacterioma es el causante último de la inhibición del crecimiento.

Si se define $\chi(t)$ como la fracción de bacterias mutantes a cada tiempo se tiene que:

$$d\chi/dt = d\left(\frac{B_m}{B_m + B_s}\right)/dt = \frac{dB_m/dt}{B_m + B_s} - \frac{B_m}{B_m + B_s} \frac{dB_m/dt + dB_s/dt}{B_m + B_s} \quad (4.31)$$

Sustituyendo las expresiones 4.30 y considerando $\chi = B_m/(B_m + B_s)$:

$$d\chi/dt = (\mu_m - \mu_s) \chi (1 - \chi) \mathcal{J}(t, B_s, B_m) \quad (4.32)$$

La ecuación diferencial 4.32 es separable y se integra rindiendo:

$$\chi(t) = \frac{1}{(B(\tau) - 1) e^{(\mu_s - \mu_m) \int_{\tau}^t \mathcal{J}(z) dz} + 1} \quad (4.33)$$

donde se ha incluido la condición inicial $\chi(\tau) = 1/B(\tau)$, siendo τ el momento en el que aparece la mutación, y $B(\tau)$ el número de endosimbiontes presentes en el bacterioma a dicho tiempo. Es importante considerar que cuanto más tarde aparezca el mutante (*i.e.* cuanto mayor sea τ), en menor frecuencia estará en el momento de su aparición. La situación más favorable es, por tanto, que el mutante aparezca entre las bacterias que componen el inóculo.

Si la tasa de crecimiento de la población bacteriana en su conjunto es lo suficiente alta, el bacterioma del áfido estará saturado de endosimbiontes en el momento de reproducirse. Si el bacterioma se encuentra saturado, y mientras no se inocule ningún embrión, la composición de la población de endosimbiontes es fija. Esto es, si μ_m y, especialmente, μ_s son suficientemente elevados, la fracción de mutantes en el bacterioma en el momento de la reproducción se puede considerar invariante e igual a $\chi_{\infty} = \lim_{t \rightarrow \infty} \chi(t)$. Conocido χ_{∞} , y puesto que el número de bacterias en el bacterioma es muy elevado, se puede calcular la probabilidad de transferir un determinado número de mutantes a la descendencia sin más que recurrir a una distribución binomial.

Conocido \mathcal{J} , el valor de χ_{∞} es fácilmente calculable a partir de la ecuación 4.33. Si bien distintas formas de \mathcal{J} se discutieron en el capítulo 3 para el caso de una población homogénea de bacterias, todas ellas se fundamentan en una ecuación logística en la que la capacidad máxima, que representa el bacterioma, varía con el tiempo. Esto es, la dinámica de crecimiento bacteriano considerada es de la forma:

$$dB/dt = \mu B(1 - B/K(t)) \quad (4.34)$$

siendo μ la tasa de crecimiento pertinente; B el total de bacterias y K la capacidad máxima, que es una función estrictamente creciente acotada entre K_{min} y K_{max} . Tomando esta expresión y considerando el sistema de ecuaciones 4.30, se deduce que:

$$\mathcal{J}(t) = 1 - B(t)/K(t) \quad (4.35)$$

Atendiendo a la expresión 4.33 se deduce que, cuanto menor sea el valor de $\int_{\tau}^{\infty} \mathcal{J}(z)dz$, menor será χ_{∞} para el caso de mutaciones que favorezcan el crecimiento bacteriano ($\mu_s < \mu_m$). El caso de las mutaciones perjudiciales ($\mu_s > \mu_m$) es, evidentemente, el opuesto: cuanto menor sea el valor de $\int_{\tau}^{\infty} \mathcal{J}(z)dz$, mayor será χ_{∞} . Como tratamos de determinar valores de μ_s , μ_m y τ para los que la probabilidad de transferir a la descendencia únicamente endosimbiontes silvestres o únicamente endosimbiontes mutantes sea muy elevada, podemos obtener límites conservadores para los tres parámetros de interés si tomamos una cota inferior del valor de $\int_{\tau}^{\infty} \mathcal{J}(z)dz$.

Una cota sencilla puede obtenerse a partir de las ecuaciones 4.34 y 4.35 sin más que tomar $K(t)$ fijo e igual a $K(\tau)$ y suponiendo que las poblaciones bacterianas son indistinguibles y presentan una tasa de crecimiento $\mu = \max(\mu_s, \mu_m)$. Bajo estas consideraciones, y de la solución explícita de 4.34, se tiene que:

$$\mathcal{J}(t) = \frac{K(\tau) - B(\tau)}{B(\tau)e^{\mu(t-\tau)} + K(\tau) - B(\tau)} \quad (4.36)$$

sustituyendo la expresión en la ecuación 4.33, integrando, y tomando el límite $t \rightarrow \infty$ se obtiene:

$$\chi_{\infty} = \frac{1}{(B(\tau) - 1)(B(\tau)/K(\tau))^s + 1} \quad (4.37)$$

siendo $s = \frac{\mu_m - \mu_s}{\max(\mu_m, \mu_s)}$, que tiene la forma típica de un coeficiente de selección.

La expresión recogida en la ecuación 4.37 permite calcular, bajo las aproximaciones comentadas, la fracción de endosimbiontes mutantes en el momento en el que el áfido comienza a reproducirse. Puesto que se ha supuesto que esta fracción no cambia a lo largo del período reproductivo del insecto, es inmediato derivar la probabilidad de obtener un descendiente con una composición bacteriana particular. En concreto, y puesto que el número de bacterias en un áfido adulto es muy elevado, la probabilidad de inocular a un embrión con un número concreto de endosimbiontes mutantes se ajusta a una distribución binomial:

$$P(B_m(0) = k) = \binom{B(0)}{k} \chi_{\infty}^k (1 - \chi_{\infty})^{B(0)-k} \quad (4.38)$$

donde $B_m(0)$ es la variable aleatoria que representa el número de endosimbiontes mutantes inoculados al embrión; y $B(0)$ es el número total de bacterias transferidas al mismo.

La distribución recogida en la ecuación 4.38 es el último elemento necesario para conocer la naturaleza de los descendientes de un áfido en términos de la composición de bacterias de su bacterioma. Si bien existen $B(0) + 1$ tipos diferentes de insectos en función del número de endosimbiontes mutantes con que fueron inoculados, podemos dividirlos en dos categorías: insectos con poblaciones bacterianas mixtas, e insectos con poblaciones bacterianas homogéneas. En un sentido estricto, las poblaciones homogéneas son aquellas que corresponden a inóculos bacterianos compuestos únicamente por mutantes o no mutantes (valores de $k = B(0)$ y $k = 0$ en la ecuación 4.38 respectivamente). Sin embargo, resulta sensato relajar ligeramente este criterio con objeto de obtener una visión más realista de la distribución de áfidos en términos de la composición de bacterias de su bacterioma sin necesidad de analizarla explícitamente. En esta línea, se puede encontrar una pareja de valores k_{inf} y k_{sup} tales que la probabilidad de obtener un descendiente de 2ª generación (*i.e* hijo de alguno de los descendientes del áfido donde apareció el primer mutante) con una población de bacterias homogénea, silvestre y mutante respectivamente, sea superior a un valor $1 - \epsilon$ dado.

Este cálculo es equivalente al efectuado para el caso de la aparición de un mutante a tiempo $t = \tau$, con la única diferencia de que, en este caso, 'surgen' k mutantes a tiempo $t = 0$. Considerando esta observación, el valor de χ_∞ correspondiente a un insecto inoculado con k mutantes es:

$$\chi(k)_\infty = \frac{1}{\left(\frac{B(0) - k}{k}\right) (B(0)/K(0))^s + 1} \quad (4.39)$$

Considerando esta ecuación y la distribución de probabilidad 4.38, los valores k_{inf} y k_{sup} buscados deben cumplir:

$$(1 - \chi(k_{inf})_\infty)^{B(0)} \geq 1 - \epsilon \quad (4.40)$$

$$\chi(k_{sup})_\infty^{B(0)} \geq 1 - \epsilon \quad (4.41)$$

O equivalentemente, sustituyendo la ecuación 4.39 en las ecuaciones 4.40 y 4.41 y despejando:

$$k_{inf} = \left\lfloor B(0) \left[\frac{[B(0)/K(0)]^s (1 - (1 - \epsilon)^{1/B(0)})}{1 - (1 - [B(0)/K(0)]^s) (1 - (1 - \epsilon)^{1/B(0)})} \right] \right\rfloor \quad (4.42)$$

$$k_{sup} = \left\lceil B(0) \left[\frac{[B(0)/K(0)]^s (1 - \epsilon)^{1/B(0)}}{1 - (1 - [B(0)/K(0)]^s) (1 - \epsilon)^{1/B(0)}} \right] \right\rceil \quad (4.43)$$

donde $\lfloor \cdot \rfloor$ y $\lceil \cdot \rceil$ representan las funciones suelo y techo respectivamente.

Se está ya en disposición de calcular la probabilidad de que la descendencia de un áfido en cuyo seno surge un mutante a la edad de $t = \tau$ esté compuesta en su totalidad por individuos con poblaciones homogéneas de bacterias según el criterio k_{inf} - k_{sup} . Si suponemos que el áfido tiene un total de D descendientes y aceptamos que los embriones inoculados con menos de k_{inf} y más de k_{sup} mutantes presentan, en términos efectivos, una población homogénea de endosimbiontes (áfidos *quasi*-homogéneos), la distribución del número de áfidos *quasi*-homogéneos (\mathcal{H}) es:

$$P(\mathcal{H} = h) = \binom{D}{h} P_{\mathcal{H}}^h (1 - P_{\mathcal{H}})^{D-h} \quad (4.44)$$

con:

$$P_{\mathcal{H}} = \sum_{k=0}^{k_{inf}} P(B_m(0) = k) + \sum_{k=k_{sup}}^{B(0)} P(B_m(0) = k) \quad (4.45)$$

En la figura 4.7 se observa que, tal y como se anticipó al principio de esta sección, la suposición de que la dinámica de fijación de la mutación en la población de endosimbiontes puede ignorarse, sólo es razonable en el caso de mutaciones que alteren muy sustancialmente la tasa de crecimiento de los endosimbiontes. De hecho, en relación a las mutaciones ventajosas ($s \geq 0$), si se interpreta el valor selectivo de la mutación s como se definió en la ecuación 4.37 (nótese que entonces toma valores entre -1 y 1), sólo se podría aceptar el supuesto para inóculos de endosimbiontes relativamente pequeños (del orden de centenas) y, en estos casos, sólo para muta-

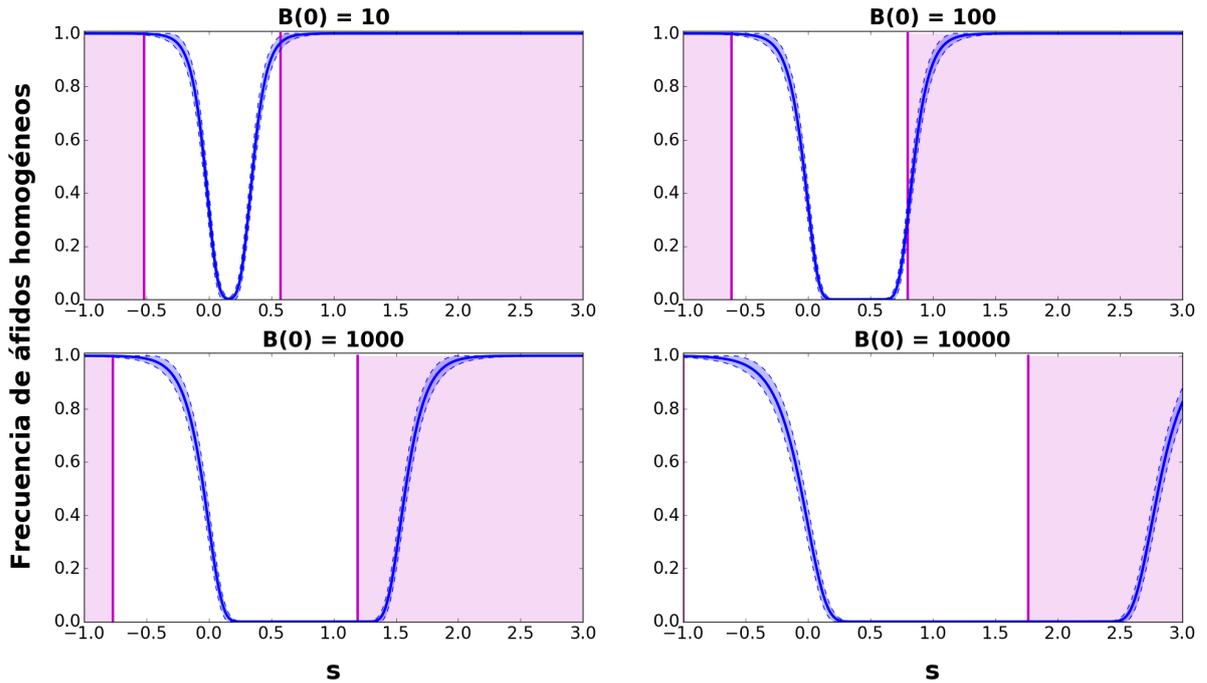


Figura 4.7: Estudio del rango de validez del supuesto de descendencia homogénea. En la figura se recoge la variación de la media \pm desviación típica (línea azul y área coloreada en el mismo tono) de la frecuencia de descendientes homogéneos ($\epsilon = 0$) con el valor selectivo de la mutación considerada (s) para distinto número de endosimbiontes transferidos al embrión ($B(0)$) bajo el supuesto razonable de que un áfido adulto engendra $D = 50$ descendientes. Las áreas moradas indican para qué mutaciones se puede aceptar que la descendencia está compuesta íntegramente por áfidos *quasi*-homogéneos ($\epsilon = 10^{-3}$, $P(\mathcal{H} \geq 0,999)$). En todos los casos se considera que la mutación aparece en el inóculo del áfido parental ($\tau = 0$). $K(0) = 8 \times 10^6$ bacterias.

ciones que incrementen la tasa de crecimiento de los endosimbiontes silvestres más de 2.35 veces para el caso de $B(0) = 10$ y más de 5 veces para el caso de $B(0) = 100$.

Nótese, sin embargo, que si a la hora de definir \mathcal{J} (ver ecuación 4.36) se toma la tasa de crecimiento μ como la tasa de crecimiento de los endosimbiontes silvestres (μ_s) en lugar de como el máximo entre la de la población silvestre y la mutante ($\max(\mu_m, \mu_s)$), aunque no se obtiene una cota inferior estricta de $\int_{\tau}^{\infty} \mathcal{J}(z) dz$, sí se obtiene una aproximación razonable o, en el peor de los casos, una cota superior del valor de la integral. Atendiendo a esta reinterpretación del valor selectivo como

$s = \frac{\mu_m - \mu_s}{\mu_s}$ y de acuerdo a la figura 4.7, se puede descartar la dinámica de fijación de la mutación en la población de endosimbiontes para inóculos de endosimbiontes de hasta 10000, si bien la tasa de crecimiento de los endosimbiontes mutantes sigue teniendo que ser muy superior a la de los silvestres (> 3 veces para tamaños de inóculo del orden de 10000).

En conjunto, parece razonable suponer que una mutación se fija instantáneamente en la población de los endosimbiontes únicamente cuando la tasa de crecimiento del mutante supera en varias veces a la del silvestre. Este tipo de casos, obviamente, no parecen muy probables si se interpreta al endosimbionte mutante como una variante genética del silvestre. Sin embargo, si en su lugar se considera al endosimbionte mutante como una bacteria competidora de una especie/cepa distinta (*e.g.* un endosimbionte secundario que pierda la capacidad de vivir fuera del bacterioma), sí que es razonable suponer que su tasa de crecimiento es varias veces superior a la del endosimbionte silvestre.

En definitiva, la suposición de que la dinámica de fijación de la mutación en la población de endosimbiontes puede ignorarse es válida para mutaciones muy beneficiosas e inóculos de endosimbiontes pequeños (< 10) o para el estudio de procesos de reemplazamiento del endosimbionte por otra bacteria de su entorno. Puesto que en *Acrytosyphon pisum* el tamaño de inóculo estimado es de 36700 bacterias [96], el supuesto en esta especie sólo sería válido en el segundo caso.

Conclusiones semejantes se alcanzan al considerar mutaciones deletéreas ($s < 0$). Nótese que en estos casos, ambas interpretaciones del valor selectivo ($s = \frac{\mu_m - \mu_s}{\max(\mu_m, \mu_s)}$ y $s = \frac{\mu_m - \mu_s}{\mu_s}$) coinciden. En particular, se puede aceptar que una mutación se elimina a efectos prácticos de la población de endosimbiontes si la tasa de crecimiento del endosimbionte del mutante es sustancialmente menor que la del silvestre y el inóculo bacteriano es del orden del millar o menos ($\mu_m \leq 0,23$ para $B(0) = 1000$, $\mu_m \leq 0,39$ para $B(0) = 10$ y $\mu_m \leq 0,48$ para $B(0) = 10$).

4.3. Discusión

La enorme complejidad de los ciclos de vida de los áfidos unida a la gran variedad de factores que afectan a su dinámica (ver sección 4.1) impiden plantear modelos manejables de su dinámica. En esta línea, se ha planteado un sencillo diseño experimental (sección 4.2.1) para estudiar la dinámica de expansión de mutaciones en la población de áfidos en el que se eliminan todos los factores que afectan al crecimiento de los áfidos salvo la naturaleza de los endosimbiontes que alojan y, potencialmente, efectos de hacinamiento. Este diseño define un sólido punto de partida sobre el que, progresivamente, incluir de manera controlada la influencia de otros factores (temperatura, variación en la dieta, *etc*) en la evolución de los sistemas áfido-endosimbionte.

El diseño experimental planteado presenta dos ventajas de cara al modelado del proceso evolutivo en estudio: en primer lugar, permite construir un modelo del

crecimiento de la población de áfidos manejable y contrastable experimentalmente (sección 4.2.2). En segundo lugar, al mantenerse constantes las condiciones de propagación de la población de insectos, se puede aplicar el formalismo de las cadenas de Markov para determinar características claves del proceso evolutivo, tales como la probabilidad de fijación de una mutación y el tiempo necesario para que esta fijación se produzca (sección 4.2.3).

En relación al modelo planteado para representar la dinámica de poblaciones de los áfidos, se trata de un modelo discreto basado en matrices de Leslie en el que los insectos se dividen en un número finito de categorías en función de su edad. Este abordaje, a diferencia de otras aproximaciones habitualmente empleadas como la ecuación de Euler-Lotka (ver figura 4.3), permite representar adecuadamente el crecimiento de una población de áfidos con independencia de su estructura de edades (*i.e.* cuantos insectos hay de cada categoría). Sin embargo, es necesario señalar que esta discretización supone limitaciones notables en determinadas circunstancias. En particular, si se quiere calcular con precisión, por ejemplo, la probabilidad de fijación de una mutación casi neutral que altera muy levemente el momento en que el insecto empieza a reproducirse (*i.e.*, su t_c), es necesario considerar que el tiempo avanza en saltos Δt de muy pequeña magnitud (lo que implica dividir a los insectos en un número extraordinariamente elevado de categorías), con el potencialmente inasumible coste computacional que ello implica. La razón de esta necesidad deriva del hecho de que, a la luz del modelo, el t_c del insecto mutante es indistinguible del del silvestre salvo que se diferencien en una cantidad varias veces superior a la magnitud de Δt .

En la línea de las potenciales limitaciones técnicas asociadas al diseño experimental y a los protocolos de cálculo desarrollados en este capítulo, resulta indispensable destacar la importancia de la sincronización de la población de áfidos al inocular una nueva población (ver sección 4.2.1) de cara al cálculo de la probabilidad de fijación de una determinada mutación. Recordemos que este proceso permite obtener una población compuesta íntegramente por ninfas recién nacidas a partir de una población de áfidos fértiles de diversas edades. Al poder considerar que todos los áfidos que componen el inóculo tienen la misma edad, sólo es necesario conocer el número de mutantes que hay en el mismo para que éste quede completamente caracterizado. Esto supone que si el tamaño de inóculo $A(0)$ es de 10, existen 11 tipos distintos de inóculo y, en consecuencia, la matriz de transición \mathbf{M} (ver ecuación 4.13) tiene una dimensión de 11x11. De no sincronizarse la población, el inóculo estaría caracterizado no sólo por el número de mutantes, sino por cuántos individuos de cada edad y tipo hay presentes en el mismo. Esto supondría que el número de inóculos distintos, si se clasifican los áfidos en un número finito de categorías en función de la edad, crece combinatorialmente con el número de categorías, lo que podría hacer intratable la obtención y uso de la matriz \mathbf{M} .

Esta limitación técnica unida al hecho de que los errores en el proceso de sincro-

nización tienen un impacto enorme en la probabilidad de fijación calculada (tanto más cuanto mayor sea el tamaño de inóculo considerado; ver figura 4.6) supone que el proceso de sincronización debe ser lo más preciso posible para que los cálculos basados en la matriz \mathbf{M} (probabilidad de fijación, tiempo medio para la fijación, *etc*) sean válidos. Afortunadamente, esta problemática puede atenuarse en el caso del cálculo de la probabilidad de fijación si se trabaja con inóculos relativamente pequeños gracias a la relación observada entre esta y el tamaño del inóculo (ver ecuación 4.29), si bien no hay que olvidar que es una relación basada en un conjunto limitado de observaciones y, por ende, podría no ser universalmente válida.

No conviene concluir el capítulo sin enfatizar que el método de cálculo de las probabilidades de fijación aquí desarrollado es estrictamente válido para mutaciones que afecten directamente a los áfidos o para comparar insectos que tienen poblaciones homogéneas de bacterias diferentes. Al considerar mutaciones que aparecen al nivel de los endosimbiontes, el empleo de estos métodos supone implícitamente que las mutaciones se fijan instantáneamente en la población bacteriana en el áfido en que surgen. Esta suposición, tal y como se deduce en la sección 4.2.4, es una buena aproximación a la realidad si el número de bacterias que se inoculan a los embriones es pequeño y/o el endosimbionte mutante considerado presenta una tasa de crecimiento mucho mayor que la de los endosimbiontes silvestres. Esta última situación es concebible, por ejemplo, si el mutante adquiere la capacidad de incorporar algún metabolito complejo del entorno; o si se interpreta como 'endosimbionte mutante' a una especie distinta que entra en competición con la población silvestre. En cualquier caso, si bien este supuesto no permite una interpretación absoluta de los valores de probabilidad de fijación (y derivados) obtenidos, si parece sensato aceptar que permite comparar cualitativamente el impacto de distintas mutaciones entre sí, particularmente si no son muy perjudiciales.

Capítulo 5

Algoritmo de simulación de la reducción genómica

5.1. Introducción

A lo largo de los capítulos 3 y 4 se han desarrollado elementos necesarios en el proceso de comprensión de la dinámica evolutiva de los endosimbiontes de áfidos. En particular, se han construido modelos de la dinámica de poblaciones de estos endosimbiontes en su hospedador, se ha establecido la relación entre esta dinámica y la cantidad de producto generado por la población bacteriana a cada tiempo, y se ha definido, en condiciones experimentales precisas, cómo depende la dinámica de poblaciones de los áfidos de esta productividad. En última instancia, se ha establecido una relación entre las capacidades metabólicas de los endosimbiontes y el *fitness* del áfido que los hospeda. Además, y gracias a esta relación, se han deducido propiedades esenciales (probabilidad de fijación y distribución de tiempos hasta la fijación) que caracterizan, al menos cualitativamente, la dinámica evolutiva de mutaciones que aparecen en este tipo de sistemas. Conocidos estos elementos, se está ya en disposición de abordar el proceso de degradación genómica al que se ven sometidos los endosimbiontes. En concreto, se modelizará el proceso de pérdida de genes metabólicos ampliamente observado en estas bacterias (ver capítulo 1).

Dado que el objeto de estudio son los genes metabólicos de los endosimbiontes, se hace necesario determinar la funcionalidad de las redes metabólicas de estos a partir de su genoma y otros datos bioquímicos disponibles. Las diversas aproximaciones a la obtención de una descripción integrada y predictiva del funcionamiento de redes metabólicas complejas que existen hoy en día pueden clasificarse, de forma grosera, en dos categorías. La primera aborda el metabolismo como un sistema dinámico representado mediante un número apropiado de ecuaciones diferenciales que contienen, en última instancia, toda la información cinética y mecanística de las reacciones químicas que lo componen. La segunda, estudia las propiedades del metabolismo que derivan de su topología (*i.e.* de la forma en que las reacciones conectan los distintos metabolitos entre sí, de su estequiometría), de la direcciona-

lidad de las reacciones que lo conforman, y otras restricciones como el flujo máximo que puede llevar una reacción.

Si bien es cierto que la aproximación dinámica es, a todas luces, mucho más completa, es poco habitual disponer de la información necesaria para definir y parametrizar las ecuaciones que rigen esta dinámica. Por el contrario, las aproximaciones basadas en la estequiometría (*CBM* de *Constraint-Based stoichiometric Modeling*), si bien más limitadas, sólo requieren conocer la estructura de la red metabólica, que puede inferirse a partir del genoma del organismo en estudio [151]. En esta línea, y dada la necesidad de tratar el metabolismo de los endosimbiontes al completo, se recurrirá al *CBM* para caracterizar el mismo (para una introducción detallada al *CBM* consultar [101]).

5.1.1. Fundamentos del *CBM*

El *CBM* se fundamenta en el estudio de la topología, estructura o estequiometría característica de la red metabólica de interés. Formalmente, esta topología viene dada por dos elementos: la matriz estequiométrica \mathbf{N} , una matriz de dimensiones $\mathbf{m} \times \mathbf{r}$ donde \mathbf{r} es el número de reacciones, \mathbf{m} es el número de metabolitos, y la componente N_{ij} representa el coeficiente estequiométrico asociado al metabolito i en la reacción j ; y el conjunto de reacciones irreversibles, que indica cuáles de las reacciones de la red operan, a nivel práctico, en una única dirección.

A partir de la matriz \mathbf{N} , y descartando los efectos de dilución asociados al crecimiento del organismo en estudio, la variación de la concentración (expresada habitualmente en *mmol* por gramo de peso seco, *mmol/gDW*) en el tiempo viene dada por:

$$d\mathbf{c}/dt = \mathbf{N}\mathbf{v}(t) \quad (5.1)$$

donde $d\mathbf{c}/dt$ representa el vector de las derivadas de la concentración de los distintos metabolitos con respecto al tiempo; y $\mathbf{v}(t)$ es el vector que representa la distribución de flujos a cada tiempo, esto es, el vector cuyas componentes vienen dadas por la velocidad a la que opera cada una de las reacciones del sistema en cada momento.

El vector $\mathbf{v}(t)$ depende, en general, además del tiempo, de las concentraciones de todos los metabolitos del sistema así como de otros parámetros normalmente desconocidos. Esto es, es la función que contiene toda la información sobre la cinética del sistema. La ecuación 5.1 es compatible, por tanto, con las dos aproximaciones previamente descritas, ya que contiene tanto la información topológica de la red metabólica (matriz \mathbf{N}) como la cinética, a través del vector $\mathbf{v}(t)$ y sus dependencias.

El metabolismo implica, normalmente, reacciones rápidas y una elevada tasa de reposición de los distintos metabolitos en comparación con la cinética de los eventos de regulación. El *CBM* parte de esta premisa y supone, que a una escala temporal suficientemente grande, las concentraciones de los metabolitos y las velocidades de reacción (o al menos su media) pueden considerarse constantes (aproximación de estado *pseudo*-estacionario). Esto es, la ecuación 5.1 puede aproximarse a:

$$\mathbf{N}\mathbf{v} = 0 \tag{5.2}$$

donde se observa que el sistema de ecuaciones diferenciales de la ecuación 5.1 pasa a convertirse en un sistema homogéneo de ecuaciones lineales caracterizado, en exclusiva, por la matriz estequiométrica \mathbf{N} . Esta ecuación representa, en última instancia, el balance de materia del sistema: la velocidad de producción y consumo de los distintos metabolitos debe coincidir. Es importante destacar que, dada la existencia de reacciones irreversibles, determinadas componentes del vector v nunca podrán tomar valores negativos y, en consecuencia, la ecuación 5.2 debe resolverse en el marco del álgebra convexa y no del álgebra lineal.

La ecuación 5.2 unida a la definición del conjunto de reacciones irreversibles y a otras potenciales restricciones sobre los valores que pueden tomar los distintos flujos del sistema, definen, en última instancia, el conjunto de distribuciones de flujo compatibles con una red metabólica dada en las condiciones definidas por estas restricciones.

5.1.2. Refinamientos del *CBM* básico

A pesar de que el *CBM* en su planteamiento más básico sólo considera la topología de la red metabólica en estudio, se han ido incorporando mejoras, normalmente en la forma de restricciones adicionales sobre la metodología elemental que permiten, al menos parcialmente, lidiar con sus limitaciones.

Uno de los elementos clave en los métodos basados en el *CBM* es la definición del conjunto de reacciones irreversibles. La direccionalidad de las reacciones se determina en ensayos bioquímicos *in vitro* que, normalmente, no reproducen con precisión las condiciones fisicoquímicas que se dan *in vivo*. Estas discrepancias pueden implicar errores en la definición del conjunto de reacciones irreversibles con importantes consecuencias en la modelización. Atendiendo a esta problemática, se han desarrollado diversos métodos que aplican restricciones termodinámicas más rigurosas que permiten limitar el flujo a través de las distintas reacciones de acuerdo a los valores de energía libre de Gibbs asociados a las mismas [152-155]. Obviamente, no

es habitual disponer de los valores de los distintos parámetros termodinámicos de todos los metabolitos que forman parte de una red metabólica. Afortunadamente, recientes avances en teoría de contribución de grupos permiten estimar los valores de energía libre de Gibbs estándar desconocidos [156], de manera que las aproximaciones termodinámicas descritas se hacen factibles.

Por otra parte, los modelos basados en *CBM* se pueden complementar con inclusión de la regulación a nivel génico (transcripción, traducción, *etc*). Existen dos formas de integrar el impacto de la regulación a nivel génico en el *CBM*: la primera consiste, sencillamente, en emplear datos experimentales de expresión (transcriptómica, proteómica, *etc*) de los distintos genes metabólicos para restringir el flujo a través de las restricciones correspondientes [110, 157]. La segunda implica integrar una representación matemática de la red de regulación y/o señalización con la red metabólica en estudio de forma que se obtiene un modelo más fidedigno de la realidad biológica que mejora la capacidad predictiva del *CBM* clásico y, además, puede sugerir interacciones regulatorias previamente inexploradas [158-160].

Finalmente, la que quizás pueda considerarse la limitación fundamental del *CBM* es su naturaleza estacionaria (ver sección 5.1.1. Los cálculos basados en *CBM* asumen que el metabolismo alcanza un estado en que la velocidad de las distintas reacciones no varía con el tiempo. Sin embargo, si podemos aceptar que este estado se alcanza lo suficientemente rápido, se puede integrar el *CBM* con un modelo dinámico que caracterice la evolución del entorno del organismo cuyo metabolismo se está estudiando. Esta idea es la base del *flux balance analysis dinámico* (dFBA, [161, 162]), una variante del *flux balance analysis* (sección 5.1.3) que permite, bajo el supuesto de que el organismo trata de optimizar algún objetivo particular (*e.g* la maximización de su crecimiento), representar con precisión el crecimiento del organismo y la concentración de sustratos y productos de interés en el medio extracelular a cada tiempo.

5.1.3. Aplicaciones del *CBM*

Tal y como se ha discutido a lo largo de esta sección, el *CBM* y sus diversas variantes permiten identificar, dadas una red metabólica y un conjunto de restricciones sobre las reacciones que la componen, el conjunto de distribuciones de flujo compatibles con ambas bajo el supuesto de estado *pseudo*-estacionario. Pero, ¿de qué manera esta información resulta útil en el estudio de la biología de un organismo? De entre todas las distribuciones de flujo posibles, la mayoría, con bastante seguridad, resultan inconvenientes a la célula en las condiciones consideradas. Por ello, una de las primeras aplicaciones del *CBM* desarrolladas, el *flux balance analysis* (FBA), tiene como objetivo identificar distribuciones de flujo particulares que correspondan a estados fisiológicos de interés. En el FBA se define un objetivo celular y, tras incorporar restricciones que limiten el flujo de entrada de sustratos a la

red metabólica, el objetivo definido es optimizado. El resultado de la optimización se compone de dos elementos: un valor (único) correspondiente al objetivo celular considerado, y al menos una distribución de flujos compatible con dicho valor. Se deduce, entonces, que las distribuciones de flujo óptimas identificadas (o un subconjunto de ellas) representan el estado fenotípico de la célula.

Puesto que normalmente se supone, en particular al tratar el metabolismo bacteriano, que los organismos buscan maximizar su crecimiento, resulta habitual emplear este criterio como objetivo celular. Para representar el crecimiento en una red metabólica, sencillamente se introduce una reacción, normalmente denominada reacción de biomasa, que toma como sustratos los elementos necesarios para que el organismo en consideración 'crezca' (*i.e.* aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, ATP, *etc.*). Dada la reacción de biomasa, resulta sencillo obtener el valor de máxima producción de biomasa y de alguna de las distribuciones de flujo asociadas a ese valor mediante programación lineal. Sin embargo, es imprescindible hacer hincapié en la que es una de las mayores limitaciones del FBA: el objetivo celular no emerge del modelo sino que viene dado por el investigador. Esto implica que, al establecer dicho objetivo, se está suponiendo implícitamente cómo se comporta la célula, una suposición que, como todas, debe ser convenientemente justificada mediante argumentos experimentales o teóricos. En esta línea se han llevado a cabo trabajos en los que el objetivo celular no se impone, sino que se infiere de datos experimentales bajo el supuesto de que estos corresponden a una situación óptima [163-165]. Afortunadamente, estos estudios apuntan a que, al menos para el caso de *E. coli* [163] y *S. cerevisiae* [164], la suposición de que el objetivo celular es la maximización de la producción de biomasa es razonable, si bien no debe suponerse extrapolable a todos los casos [166].

Se han desarrollado numerosas variantes del FBA con objeto de caracterizar el conjunto de distribuciones de flujo compatibles con el resultado del problema de optimización o para incluir consideraciones adicionales que proporcionen fenotipos más realistas (ver [167] para una revisión de los mismos). La caracterización de las distintas soluciones al problema de optimización resulta capital en la adecuada interpretación de cualquiera de las variantes del FBA ya que no resulta extraño que muy distintos fenotipos metabólicos sean compatibles con estas soluciones.

La posibilidad de maximizar un determinado objetivo en el contexto de un modelo que contempla el metabolismo al completo hace posible determinar *in silico* la importancia de las distintas reacciones y/o genes metabólicos en el desempeño de un determinado organismo o, de manera análoga, establecer el impacto que supondría la inhabilitación de estos. Este tipo de aproximaciones tienen un gran interés tanto a nivel biotecnológico, en el contexto del diseño *in silico* de cepas para la producción de compuestos de interés; como a nivel clínico en la determinación de potenciales dianas en el diseño de antibióticos y similares, así como en investigación biológica básica, al permitir identificar genes y/o reacciones esenciales para un organismo en

distintos contextos, o deducir y caracterizar interacciones ecológicas basadas en el intercambio de nutrientes (ver [167] para una revisión completa sobre los distintos métodos basados en *CBM* y sus aplicaciones).

En este orden de ideas, se han llevado a cabo simulaciones basadas en *CBM* que toman como objetivo, al igual que el presente capítulo, comprender el proceso de degradación genómica observado en los endosimbiontes de insectos. En particular, Pál *et al* [168] logran obtener redes metabólicas mínimas altamente semejantes a la de *Buchnera aphidicola* mediante la delección sucesiva de genes con escaso impacto en las capacidades metabólicas de la bacteria (simplificadas en forma de una ecuación de biomasa modificada), partiendo de un modelo a escala completa del metabolismo de *E.coli*. Sobre esta idea fundamental, Yizhak *et al* [169] tratan de correlacionar, con moderado éxito, el orden de pérdida de los genes observados en las simulaciones con el inferible a partir de la filogenia de estos endosimbiontes.

Sin embargo, a pesar de la compatibilidad de los resultados obtenidos en estos estudios con las observaciones experimentales, la falta de detalles a la hora de establecer el modelo de evolución empleado no permite abordar preguntas como qué delecciones son más probables en cada etapa de la degradación genómica, ni identificar puntos en los que esta degradación se acelera o se frena, ni otras cuestiones de interés en una comprensión fina de la evolución de estos organismos. Con el fin de abordar estas cuestiones, en este capítulo se combinan técnicas basadas en *CBM* con los modelos dinámicos y métodos de cálculo de probabilidades de fijación presentados en los capítulos 3 y 4 para simular la degradación genómica de los endosimbiontes y caracterizar exhaustivamente el proceso.

5.2. Resultados

5.2.1. Algoritmo de simulación de la reducción genómica

Con objeto de explorar las características evolutivas del proceso de reducción genómica observado en los endosimbiontes primarios de insectos, se desarrolló un sencillo algoritmo para simular la pérdida gradual de genes metabólicos a partir de los resultados obtenidos en los capítulos 3 y 4. Brevemente, se parte de la red metabólica obtenida a partir del genoma deseado, y se eliminan genes secuencialmente hasta llegar a un genoma mínimo en el sentido de que la eliminación de cualquier otro gen supondría la extinción del insecto. El gen particular que se elimina en cada paso se determina al azar de acuerdo a una distribución de probabilidades cuya obtención se detalla más adelante en esta misma sección. Dada la naturaleza aleatoria de la selección de los genes a eliminar, se repitió la simulación el número de veces necesarias para garantizar que las propiedades evolutivas determinadas sean representativas.

La determinación de la probabilidad de que el siguiente gen eliminado sea uno en particular representa el eje central del algoritmo. Para ello, supondremos que en el proceso evolutivo nunca hay más de una mutación en proceso de fijación. Esto es, si aparece un mutante en la población, hasta que esta elimine a los mutantes o toda la población se vuelva mutante no aparecerá otra mutación. Además, consideraremos que las únicas mutaciones que pueden darse son inhabilitaciones (*e.g.* deleciones) de genes metabólicos, y que la probabilidad de que aparezca una determinada mutación es idéntica sea cual sea la que se considere.

Bajo estos supuestos, resulta sencillo calcular la probabilidad de que aparezca una determinada mutación Δ_i (en este caso, una deleción) y que esta se fije en la población. Puesto que todas las mutaciones tienen la misma probabilidad de aparecer, si existen Δ_{\forall} mutaciones posibles, la probabilidad de que surja particularmente la mutación Δ_i será de $1/\Delta_{\forall}$. Si dada esta mutación, la probabilidad de fijación de la misma es de iP_f , la probabilidad de que surja la mutación Δ_i y se fije será:

$$P_i = {}^iP_f/\Delta_{\forall} \quad (5.3)$$

De manera análoga, la probabilidad ${}^{\neg}P_i$ de que aparezca la mutación Δ_i y **no** se fije será:

$${}^{\neg}P_i = (1 - {}^iP_f)/\Delta_{\forall} \quad (5.4)$$

Tomando como referencia la ecuación 5.4, se puede calcular la probabilidad ${}^{\neg}P$ de que no se produzca la fijación de cualquier mutación que aparezca, una vez aparecida, sin más que sumar las probabilidades correspondientes a cada una de ellas:

$${}^{\neg}P = \sum_{i=1}^{\Delta_{\forall}} (1 - {}^iP_f)/\Delta_{\forall} = 1 - \overline{P}_f \quad (5.5)$$

dónde \overline{P}_f es la probabilidad de fijación media del conjunto de mutaciones posibles.

Estamos ya en disposición de calcular la probabilidad kP_i de que la mutación Δ_i aparezca y se fije tras la aparición y no fijación de $k-1$ mutaciones, sean cuales sean. Considerando las ecuaciones 5.3 y 5.5 y puesto que la aparición y fijación/purga de cada mutación es un evento independiente, la probabilidad buscada es:

$${}^k P_i = (1 - \overline{P}_f)^{k-1} {}^i P_f / \Delta_{\forall} \quad (5.6)$$

Finalmente, la probabilidad ${}^{\exists} P_i$ de que la siguiente mutación fijada en la población sea Δ_i , con independencia del número de intentos fallidos de fijación que hayan sido necesarios será:

$${}^{\exists} P_i = \sum_{k=1}^{\infty} (1 - \overline{P}_f)^{k-1} {}^i P_f / \Delta_{\forall} \quad (5.7)$$

dónde el sumatorio se puede resolver analíticamente (ver Caja 1 y Caja 2 en el capítulo 4) rindiendo:

$${}^{\exists} P_i = \frac{{}^i P_f}{\Delta_{\forall} \overline{P}_f} \quad (5.8)$$

La ecuación 5.8 permite determinar, conocidas las probabilidades de fijación de todas las delecciones de genes metabólicos de un genoma, con qué probabilidad el siguiente gen eliminado es uno dado. En el capítulo 4 se dedujo la probabilidad de fijación de mutaciones que afecten al sistema insecto-simbionte a partir de la dinámica de poblaciones de una población mixta de áfidos mutantes y silvestres en unas condiciones dadas. En consecuencia, el único componente restante para poder calcular las distintas ${}^{\exists} P_i$ y llevar a cabo la simulación de reducción genómica es la determinación del impacto de cada una de las delecciones en la capacidad de crecimiento de la población de áfidos.

Afortunadamente, en el capítulo 3 se construyen diversos modelos que relacionan alteraciones en las capacidades metabólicas de los endosimbiontes con la función de fertilidad del áfido, que determina en última instancia las propiedades de crecimiento de la población de áfidos. En particular, además de otros parámetros que no dependen estrictamente del metabolismo de los endosimbiontes, es necesario conocer la función que relaciona la productividad de las bacterias, Y_{PB} , con su tasa de crecimiento μ^* (que debe variar entre 0 y la tasa de crecimiento máxima μ), una función que se supone no varía con el tiempo.

Puesto que en la simulación se parte de determinado genoma, se puede reconstruir la red metabólica asociada y emplear los métodos de análisis estequiométrico presentados en la sección 5.1, en particular, *FBA* (5.1.3). Brevemente, en la red metabólica correspondiente se definen dos reacciones de biomasa, una correspondiente

al endosimbionte y otra al insecto, y se limita el flujo de entrada de recursos al sistema de manera que se simule el medio intracelular del bacteriocito (ver Caja 5). Para construir la función Y_{PB} se comienza determinando el valor de μ maximizando el flujo a través de la reacción de biomasa del endosimbionte. Una vez obtenido μ , se fija el flujo a través de la reacción de biomasa a la cantidad deseada de valores $\mu^* \in [0, \mu]$, y para cada μ^* fijado, se maximiza el flujo a través de la reacción de la función de biomasa del insecto. De este modo la función Y_{PB} se obtiene punto a punto. Los valores de Y_{PB} correspondiente a tasas de crecimiento μ^* no exploradas se determinan mediante interpolación lineal.

Caja 5: Cálculo del número medio de mutaciones que deben aparecer antes de que una se fije.

La ecuación 5.5, permite calcular la probabilidad de que una mutación cualquiera aparezca y no se fije. En consecuencia, resulta evidente que la probabilidad P de que una mutación cualquiera aparezca y se fije es:

$$P = \overline{P_f}$$

Mediante un razonamiento análogo al que permite obtener la ecuación 5.6 se deduce la probabilidad $P(\mathcal{K}_{fix} = k)$ de que alguna mutación se fije después de que hayan surgido $k - 1$ mutaciones que se han eliminado de la población:

$$P(\mathcal{K}_{fix} = k) = (1 - \overline{P_f})^{k-1} \overline{P_f}$$

El valor medio de \mathcal{K}_{fix} será, en consecuencia:

$$\overline{\mathcal{K}_{fix}} = \sum_{k=1}^{\infty} k(1 - \overline{P_f})^{k-1} \overline{P_f}$$

El sumatorio puede resolverse analíticamente (ver Caja 4 en el capítulo 4) rindiendo:

$$\overline{\mathcal{K}_{fix}} = 1/\overline{P_f}$$

que es el resultado buscado.

Conocidas las funciones Y_{PB} para el genoma de partida y todas las posibles deleciones se obtienen las correspondientes probabilidades de fijación y, en consecuencia, haciendo uso de la ecuación 5.8 se puede determinar la distribución de probabilidades de acuerdo a la cual se escogerá cuál es el siguiente gen eliminado. En definitiva, el algoritmo con que se simulará la reducción genómica de los endo-

simbiontes primarios se esquematiza como sigue:

1. Δ_{\forall} = número de genes metabólicos restantes en el genoma.
2. Para cada gen metabólico Δ_i :
 - a) Eliminar de la red metabólica correspondiente al genoma las reacciones que no pueden operar en ausencia del gen Δ_i .
 - b) Obtener la función Y_{PB} correspondiente a la red metabólica resultante.
 - c) Calcular la probabilidad de fijación iP_f a partir de la función Y_{PB} obtenida en el paso anterior (capítulos 3 y 4).
3. Calcular la probabilidad de fijación media \overline{P}_f .
4. Si $\overline{P}_f = 0$ (*i.e.* todos los genes restantes son esenciales):
 - a) Finalizar simulación.
5. Si $\overline{P}_f > 0$:
 - a) Determinar ${}^{\exists}P_i$ (*i.e.* la probabilidad de que el siguiente gen eliminado sea Δ_i) a partir de \overline{P}_f y las Δ_{\forall} probabilidades de fijación iP_f calculadas (ecuación 5.8).
 - b) Seleccionar al azar, de acuerdo a las ${}^{\exists}P_i$ determinadas, qué gen será el siguiente que se elimina del genoma.
 - c) Eliminar el gen seleccionado del genoma y las reacciones que no pueden operar en su ausencia del mismo de la red metabólica.
 - d) Volver al paso 1.

5.2.2. Detalles de la simulación

En la sección 5.2.1 se plantea el algoritmo general sobre el que sustentan las simulaciones de reducción genómica. Sin embargo, existen muchos detalles que influyen en los resultados que es imprescindible especificar. El primer aspecto a concretar es el genoma de partida. Todos los modelos desarrollados a lo largo de esta tesis representan situaciones en las que el endosimbionte ha perdido la capacidad de vivir fuera de los tejidos del hospedador. En consecuencia, el genoma de partida ideal debería corresponder con el de una endosimbiosis primaria recientemente establecida. Sin embargo, no se dispone de tal genoma, menos aún de un modelo de calidad de la red metabólica asociado al mismo. Dada esta limitación, se decidió tomar como organismo de partida a *E.coli* y el modelo metabólico *iJR904* [170] (descargado de 'http://bigg.ucsd.edu/models/iJR904' en abril del 2019) por dos razones: la primera, y al igual que *Buchnera aphidicola*, es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*. La segunda, es que *E.coli* es uno de los microorganismos más estudiados y, en consecuencia, el modelo *iJR904* es de los más contrastados disponibles.

Partir del genoma correspondiente a una bacteria de vida libre implica que hay que ser particularmente cuidadoso de cara a interpretar los resultados de la simulación. En particular, conviene descartar los resultados correspondientes a los primeros genes eliminados, ya que estas deleciones podrían corresponder a estadios previos a la endosimbiosis obligada. Nótese, sin embargo, que tras la transición al estilo de vida intracelular se pierden una gran número de genes (ver capítulo 1), por lo que no es de esperar que haya que descartar una parte importante de las simulaciones.

El segundo aspecto a concretar son las ecuaciones de biomasa correspondientes al endosimbionte y al áfido. Con respecto a la primera, se empleará la que viene definida en el propio modelo *iJR904*. Nótese que el hecho de que la ecuación de biomasa empleada incluya componentes como los lipopolisacáridos, ausentes en determinados simbiontes (*Buchnera aphidicola* en particular [171]), unido a que la composición del endosimbionte seguramente varíe a lo largo de su evolución implican, nuevamente, que la interpretación de las simulaciones debe considerarse en un sentido cualitativo.

La biomasa del áfido, por otro lado, se construyó como sigue: en primer lugar se definió un producto P que se obtuvo combinando en las proporciones adecuadas los aminoácidos esenciales y las vitaminas producidas por el endosimbionte. Concretamente, P se compone de 12 aminoácidos esenciales (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano y valina) [172] y de riboflavina [7]. Las fracciones molares correspondientes a los aminoácidos se obtuvieron a partir de los valores presentados en la Tabla 4 de [172], mientras que la de la rivo flavina, dada la falta de evidencia experimental, se definió arbitrariamente de forma que, tal y como corresponde a una vitamina, fuese mucho

menor que el resto (ver Cuadro 5.1). En segundo lugar, se escalaron estas fracciones molares con objeto de que las unidades del flujo a través de la reacción de biomasa del áfido fuese de μg de P por cada 10^6 bacterias y día (las unidades asignadas a los valores de productividad Y_{PB} a lo largo de la tesis). Para ello se consideró que el peso seco de una bacteria es del orden de $1pg$ y que las unidades de los flujos a través de las reacciones (salvo las ecuaciones de biomasa) en el modelo metabólico eran de mmol por gramo de peso seco de bacteria y por hora.

Componente	Fracción molar	Peso molecular	Coef. estequiométrico
Arginina	0.106506	174	3.110400
Histidina	0.037450	155	1.093682
Isoleucina	0.104647	131	3.056104
Leucina	0.168126	131	4.909934
Lisina	0.158033	146	4.615183
Metionina	0.030279	149	0.884253
Cisteína	0.016733	121	0.488666
Fenilalanina	0.075165	165	2.195120
Tirosina	0.062682	181	1.830560
Treonina	0.098804	119	2.885459
Triptófano	0.010624	204	0.310264
Valina	0.130941	117	3.824008
Rivoflavina	0.000008	376	0.000233

Cuadro 5.1: Reacción de biomasa del áfido. La biomasa del áfido viene dada por los metabolitos de la columna *Componente* en las proporciones indicadas en la columna *Fracción molar*. Los valores correspondientes a la columna *Coef. estequiométrico* indican el coeficiente estequiométrico correspondiente a la reacción de biomasa del áfido de forma que las unidades del flujo a través de esta sean de μg por cada 10^6 bacterias y día, suponiendo que el peso seco de una bacteria es del orden de $1pg$ y que las unidades de los flujos a través de las reacciones en el modelo metabólico eran de mmol por gramo de peso seco de bacteria y por hora.

Análogamente a lo discutido para el caso de la reacción de biomasa del endosimbiontes, dada la potencial variedad en la composición del áfido en función de la edad, la especie, el momento evolutivo y la planta parasitada, la ecuación de biomasa obtenida para el insecto debe asumirse como una aproximación cualitativa a los valores reales.

El último aspecto a considerar de cara a la simulación es la definición de las restricciones que se aplicarán en el modelo metabólico para el cálculo de la función Y_{PB} (ver sección 5.2.1). Dicho de otra forma, es necesario establecer a qué sustratos tiene acceso el endosimbionte y en qué cantidad, así como otras posibles limitaciones que actúen sobre el metabolismo del endosimbionte. En esta línea, y con objeto de poder comparar este trabajo con otros similares en la bibliografía [168, 169], se permitió la

entrada de glucosa y glutamato de forma que el flujo total de carbono se limitó a 60 mmol por gramo de peso seco de bacteria y por hora. Adicionalmente se permitió la entrada de CO_2 , Fe^{2+} , H^+ , H_2O , K^+ , Na^+ , NH_4^+ , O_2 , fosfato y SO_4^{2-} *ad libitum*.

A pesar de su uso en trabajos previos, resulta evidente que las restricciones consideradas podrían no ser representativas de las condiciones de vida intracelulares de un endosimbionte, ya que es de esperar que estos tengan acceso a una amplia gama de metabolitos intermedios presentes en el citosol del insecto. La capacidad para transportar moléculas más allá de la glucosa y el glutamato se ha demostrado (indirectamente) en un gran número de sistemas insecto-simbionte, ya que no resulta inhabitual que ciertas rutas de síntesis esenciales estén total o parcialmente incompletas (ver [173] como ejemplo). Esto implica que, a lo largo de la evolución, los sistemas insecto-simbionte han adquirido (si no disponían ya de ellos) medios que facilitan el intercambio de metabolitos hospedador-simbionte, eventos que seguramente tuvieron una importancia determinante en la configuración del metabolismo de los endosimbiontes tal y como lo conocemos. Podría pensarse, en consecuencia, que considerar un medio metabólicamente limitado como el aquí planteado, unido al hecho de que este se mantiene invariante a lo largo de la simulación, resulta de escaso interés de cara a la comprensión de la evolución de los endosimbiontes. Sin embargo, tal y como se verá en la sección 5.3, la simplicidad y naturaleza constante del medio empleado permite comprender pautas de este proceso que servirán para dar sentido a futuras simulaciones con medios variables más complejos cuyos resultados serían, de otro modo, ininterpretables.

Por último, y con el fin de evitar que el número de embriones generados por día supere los 15 (los áfidos acostumbran a presentar fertilidades máximas inferiores a este valor), la productividad máxima Y_{PB}^{max} se restringió a valores menores de 11.68 μg de producto por cada 10^6 bacterias y día.

5.2.3. Características evolutivas del proceso de reducción genómica observado en los endosimbiontes primarios de insectos

El primer aspecto a explorar de las simulaciones llevadas a cabo de acuerdo a las condiciones presentadas en la sección 5.2.2 hace referencia a la velocidad a la que se eliminan los genes en cada momento del proceso evolutivo. Puesto que se conoce, en cada etapa de la degradación, la probabilidad de fijación de cada uno de los genes restantes así como su número, se puede determinar cual es el número medio de veces $\overline{K_{fix}}$ que debe aparecer una mutación que inhabilite algún gen antes de que esta inhabilitación se fije en la población (ver Caja 5).

Es necesario destacar que el valor de $\overline{K_{fix}}$ no proporciona una medida de tiempo absoluta por sí sólo. En concreto, hay que tener en cuenta adicionalmente el

tiempo medio necesario para que cada mutación surgida se elimine o fije en la población (nótese que el tiempo necesario para que la mutación aparezca es casi siempre despreciable frente al de eliminación/fijación). Afortunadamente, tal y como se demostró en el capítulo 4 sección 4.2.3, el tiempo total es esencialmente proporcional al número de veces que debe aparecer una mutación antes de fijarse cuando las probabilidades de fijación no son muy elevadas, lo que ocurre en la mayoría de las ocasiones (tómese como referencia que para una población de insectos que se mantiene mediante pases de sólo 10 individuos la probabilidad de fijación de una mutación neutral es de 0.1).

Todas las consideraciones planteadas se sustentan en el supuesto que establece que nunca hay dos o más mutaciones presentes en la misma población. De no cumplirse este, existen dos cuestiones a considerar de cara a la interpretación de $\overline{K_{fix}}$: la primera es que los valores de probabilidad de fijación reales serán, seguramente, mayores que los calculados bajo el supuesto, lo que implica que el valor de $\overline{K_{fix}}$ estará sobrestimado. La razón radica en que el *fitness* medio de una población compuesta sólo por áfidos silvestres será siempre mayor o igual a otra que contenga mutantes del tipo considerado en este capítulo. Por tanto, los áfidos que presenten la mutación de la que queremos conocer su probabilidad de fijación tendrá mayor o igual ventaja al competir contra una población mixta que al competir con una que no presente mutantes. La segunda cuestión es que la tasa de mutación, a diferencia de los casos en los que se cumple el supuesto, tiene un papel esencial de cara a determinar qué tiempo corresponde a un valor de $\overline{K_{fix}}$ dado (*e.g.* si aparecen 10 mutaciones por unidad de tiempo y $\overline{K_{fix}} = 10$, será necesaria una unidad de tiempo para que aparezca la mutación que se va a fijar en la población). En cualquier caso, a pesar de que en estas condiciones no resulta sencillo interpretar el valor de $\overline{K_{fix}}$ en términos de tiempo absoluto, sí que se puede emplear en modo comparativo, ya que es de esperar que las dos cuestiones discutidas afecten de manera semejante a todas las mutaciones. Esto es, se puede emplear el valor de $\overline{K_{fix}}$ para determinar posibles momentos de la evolución en los que se produzca un freno en el proceso de degradación.

En esta línea, se representaron los valores de $\overline{K_{fix}}$ correspondientes a varias trayectorias evolutivas en las condiciones expuestas en la sección 5.2.2 suponiendo que los pases de mantenimiento de la población de áfidos se llevan a cabo con inóculos de 10 y 100 individuos (figura 5.1). Los resultados son claros: la pérdida de genes comienza con un valor de $\overline{K_{fix}}$ prácticamente igual al correspondiente a una situación en la que todas las delecciones son neutrales ($\log_{10}(\overline{K_{fix}}) = 1$ para $A(0) = 10$ y $\log_{10}(\overline{K_{fix}}) = 2$ para $A(0) = 100$), continúa creciendo muy lentamente hasta que se han eliminado la mayor parte de los genes no esenciales y entonces, para los últimos genes eliminados (1-20 genes), el valor de $\overline{K_{fix}}$ se dispara. Una exploración más fina de las trayectorias (ver ampliaciones en la figura 5.1) muestra un característico aspecto serrado (más marcado para $A(0) = 100$) al final del proceso de degradación.

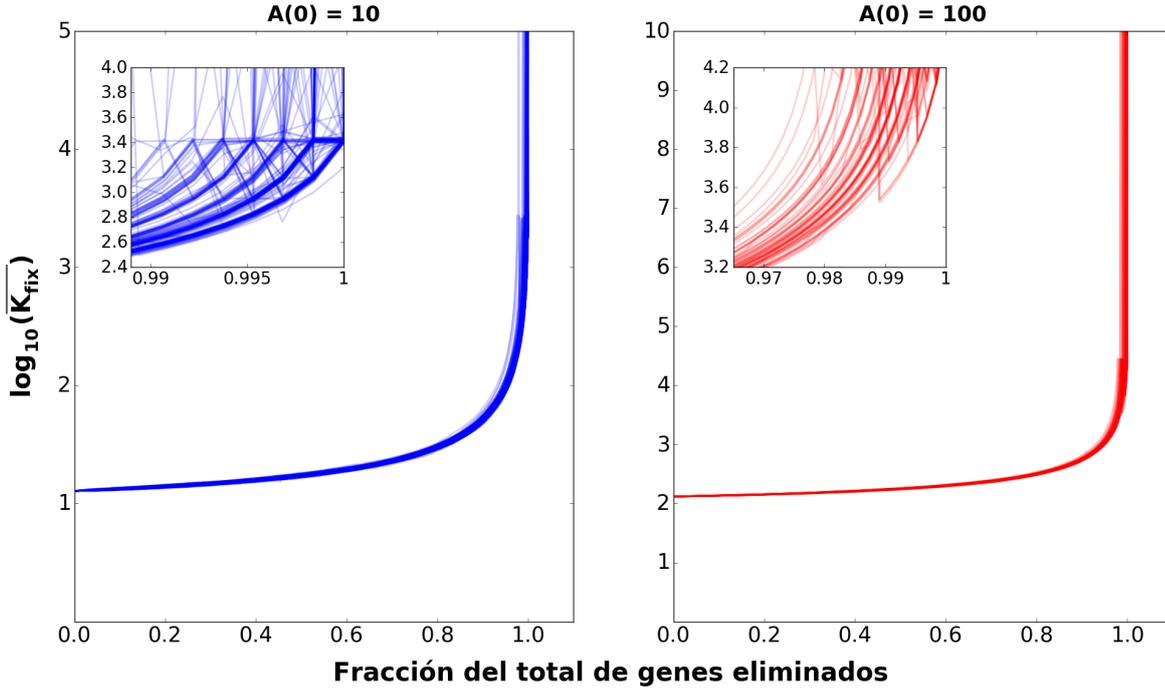


Figura 5.1: Representación de los valores de $\overline{K_{fix}}$ a lo largo del proceso de degradación genómica. Las condiciones con que se llevaron a cabo las simulaciones son las descritas en la sección 5.2.2, para áfidos propagados mediante pases de $A(0) = 10$ (líneas azules) y $A(0) = 100$ individuos (líneas rojas). Las matrices de Leslie \mathbf{L} se construyeron de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = A(0)10^3$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros correspondientes al desarrollo del bacterioma corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $\Delta I = 120 \mu g$ de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto.

Estos resultados sugieren, tal y como se deduce de la relación entre $\overline{K_{fix}}$ y la probabilidad de fijación media $\overline{P_f}$ (ver Caja 5), que los genes eliminados en prácticamente toda la trayectoria son neutrales, y que el incremento de $\overline{K_{fix}}$ corresponde esencialmente al incremento progresivo en la fracción de genes esenciales para el metabolismo del endosimbionte. La aparición de dientes de sierra se asocia, precisamente, a aquellas pocas situaciones en las que se elimina un gen con un marcado impacto en el desempeño del áfido: el valor de $\overline{K_{fix}}$ se incrementa bruscamente (pérdida de gen no neutral) para luego recuperar el valor basal (los genes eliminados son, de nuevo, neutrales), que crece rápidamente.

Para confirmar si la dinámica evolutiva observada respondía, efectivamente, a una pérdida continuada de genes neutrales salpicada por unos pocos eventos de de-

lección no neutrales, se investigó como variaba la frecuencia de delecciones neutrales, letales y demás a lo largo del proceso de degradación (ver figura 5.2). Los resultados confirman la hipótesis: la fracción de delecciones ni letales ni neutrales es muy baja y se mantiene así a lo largo del proceso evolutivo, de modo que los genes eliminados son en su mayoría neutrales y el incremento de $\overline{K_{fix}}$ se debe a la disminución del valor de la probabilidad de fijación media $\overline{P_f}$ asociado al incremento en la fracción de delecciones letales para el sistema áfido-endosimbionte. Para llegar a esta conclusión es necesario tener en cuenta que el valor de $\overline{K_{fix}}$ depende únicamente de la probabilidad de fijación media $\overline{P_f}$ de todas las mutaciones posibles (ver Caja 5). En las condiciones de la simulación, las mutaciones no neutrales y no letales son, necesariamente, deletéreas. En consecuencia, las probabilidades de fijación correspondientes variarán entre 0 y la probabilidad de fijación de una mutación neutral. En consecuencia, el valor de $\overline{K_{fix}}$ está acotado como sigue:

$$\overline{K_{fix}} \in \left(\frac{1}{(f_N + f_O)P_f^N}, \frac{1}{f_N P_f^N} \right) \quad (5.9)$$

donde f_N es la fracción de mutaciones neutrales, f_O es la fracción de mutaciones no neutrales no letales y P_f^N es la probabilidad de fijación de una mutación neutral. Nótese que $(f_N + f_O)P_f^N$ es la probabilidad de fijación media si las mutaciones no neutrales no letales son consideradas neutrales y, análogamente $f_N P_f^N$ es la probabilidad de fijación media si las mutaciones no neutrales no letales son tratadas como letales.

De acuerdo a la figura 5.2, al principio del proceso de degradación $f_N = 0,75$ y $f_O = 0,061$. Puesto que $P_f^N = 1/A(0)$ siendo $A(0)$ el tamaño de inóculo y de acuerdo a la ecuación 5.9, para $A(0) = 10$ tenemos que $\overline{K_{fix}} \in (12, 13)$, mientras que para $A(0) = 100$ tenemos que $\overline{K_{fix}} \in (123, 133)$. Cuando se han eliminado 600 genes (prácticamente al final del proceso evolutivo) las medianas de las frecuencia de mutaciones neutrales y no neutrales no letales son $f_N = 0,13$ y $f_O = 0,02$ para $A(0) = 10$ y $f_N = 0,12$ y $f_O = 0,1$ para $A(0) = 100$. Con estos valores $\overline{K_{fix}} \in (77, 83)$ y $\overline{K_{fix}} \in (454, 833)$ respectivamente. Todos estos cálculos, tal y como se ha señalado previamente, demuestran que el incremento de $\overline{K_{fix}}$ se debe a la disminución del valor de la probabilidad de fijación media $\overline{P_f}$ asociado al incremento en la fracción de delecciones letales. Esto es, con independencia de que la selección natural sea capaz de evitar o no la fijación de mutaciones deletéreas, la velocidad a la que se produce la degradación genómica se mantendrá, esencialmente, invariante.

Una vez confirmada la naturaleza de la dinámica evolutiva resta cuantificar y caracterizar el freno en la velocidad de degradación genómica observado en las últimas etapas de la misma. Para ello, se determinó el valor máximo de $\overline{K_{fix}}$ de cada

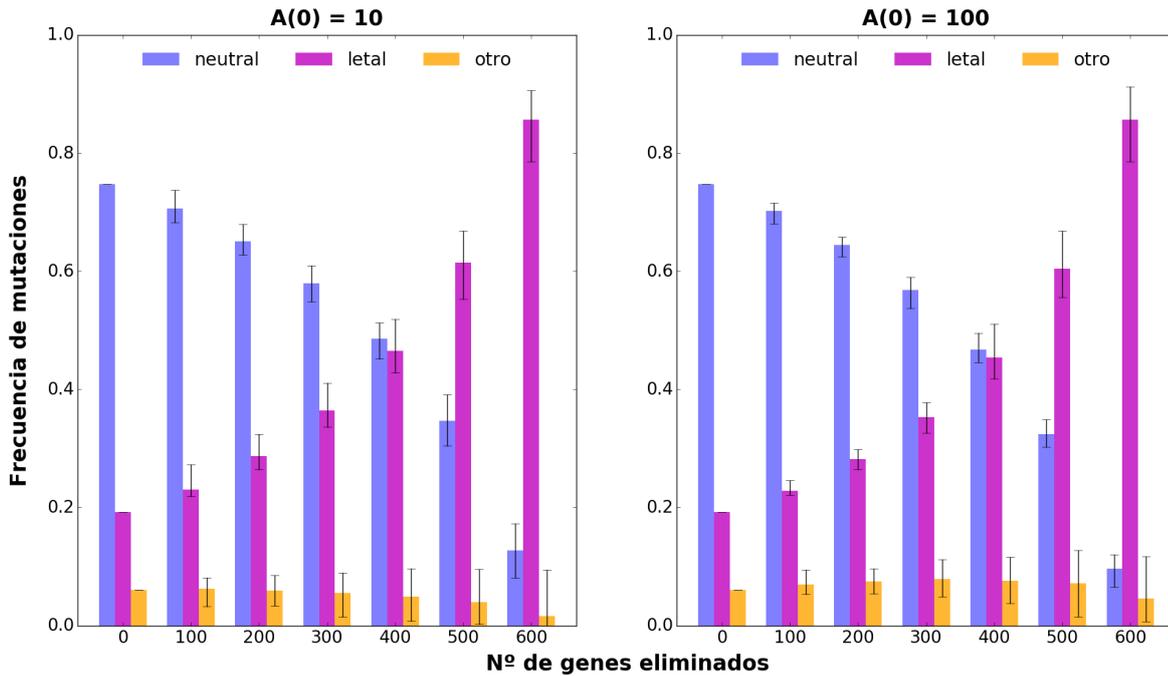


Figura 5.2: Distribución del impacto de las deleciones a lo largo del proceso de degradación genómica. La altura de las columnas representa la mediana de las frecuencias correspondientes a las distintas simulaciones llevadas a cabo. Los valores máximos y mínimos de estas frecuencias se indican mediante barras de error. Las mutaciones se dividieron en tres categorías: neutrales (en azul), letales (en morado) y otras (en naranja). Las condiciones con que se llevaron a cabo las simulaciones son las descritas en la sección 5.2.2, para áfidos propagados mediante pases de $A(0) = 10$ (líneas azules) y $A(0) = 100$ individuos (líneas rojas). Las matrices de Leslie \mathbf{L} se construyeron de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = A(0)10^3$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros correspondientes al desarrollo del bacterioma corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $\Delta I = 120 \mu g$ de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto.

trayectoria ($\overline{K_{fix}^{max}}$) como medida de la magnitud del freno y se determinó el tiempo de transición de la curva de $\overline{K_{fix}}$ frente a la fracción del total de genes eliminados como medida del momento en el que el freno se pone de manifiesto (figura 5.3). Los resultados son, de nuevo, claros: en primer lugar, tal y como se intuía en la figura 5.1, el freno comienza a actuar al final del proceso evolutivo (cuando aproximadamente el 90% de los genes a eliminar se han perdido). En segundo lugar, el freno es inmensamente mayor cuando el número de áfidos que sirve de inóculo para una nueva población es de 100 (nótese que en todas las simulaciones la máxima población de áfidos se define proporcionalmente al tamaño del inóculo). En tercer

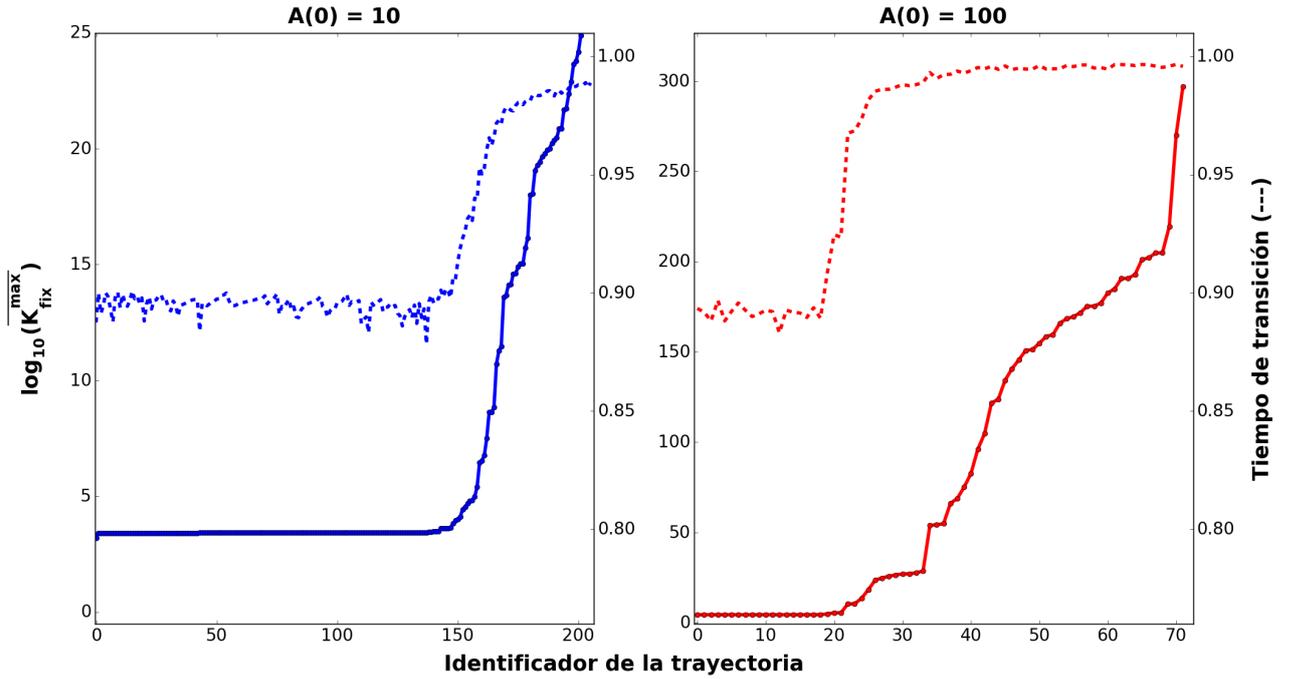


Figura 5.3: Caracterización del freno en la velocidad de degradación genómica observado en las últimas etapas del mismo. Se representan el valor máximo de $\overline{K_{fix}}$ ($\overline{K_{fix}^{max}}$, línea continua) y el tiempo de transición de la curva de $\overline{K_{fix}}$ frente a la fracción del total de genes eliminados (línea discontinua) correspondiente a cada una de las simulaciones llevadas a cabo. Cada punto corresponde a una simulación. Las condiciones con que se llevaron a cabo las simulaciones son las descritas en la sección 5.2.2, para áfidos propagados mediante pases de $A(0) = 10$ (líneas azules) y $A(0) = 100$ individuos (líneas rojas). Las matrices de Leslie \mathbf{L} se construyeron de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = A(0)10^3$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros correspondientes al desarrollo del bacterioma corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $\Delta I = 120$ μg de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto.

lugar, existe una apreciable variabilidad en el valor de $\overline{K_{fix}^{max}}$ en función de la trayectoria particular considerada, aparentemente mayor cuanto mayor sea el tamaño de inóculo. En particular, para un tamaño de inóculo de 10, una gran mayoría de las trayectorias presentan valores de $\overline{K_{fix}^{max}}$ relativamente bajos, entre 1000 y 10000, mientras que para un tamaño de inóculo de 100, los valores de $\overline{K_{fix}^{max}}$ se distribuyen más uniformemente en un intervalo de $10^5 - 10^{200}$.

Finalmente, se determinó de qué manera varía la tasa de crecimiento intrínseca r (calculada mediante la ecuación de Euler-Lotka [111], ver ecuación 4.1) del sistema áfido-endosimbionte a lo largo de la evolución (figura 5.4), ya que en las condiciones

de propagación de los insectos (ver sección 4.2.1) la velocidad de crecimiento de la población es un buen indicador de *fitness*. Nótese el hecho de que, a diferencia de la velocidad de degradación del genoma (figura 5.1), la variación de r sí que depende de la eficacia con la que actúa la selección natural. Los resultados muestran, como es de esperar, que cuando el tamaño de inóculo es de 100, r no varía apreciablemente salvo al final del proceso de degradación, momento que corresponde al freno brusco en la velocidad a la que se produce la misma (ver figuras 5.1 y 5.3). Con un tamaño de inóculo de 10, sin embargo, se produce una reducción del valor de r de hasta el 10% tras la inhabilitación del 90% de los genes. Si bien esta reducción puede parecer pequeña, hay que considerar que los valores de tasa de crecimiento μ de los endosimbiontes correspondientes a los genomas más degradados toman valores superiores a 10 días^{-1} , y que los valores de productividad máxima Y_{PB}^{max} sólo están por debajo del establecido como límite superior prácticamente al final del proceso evolutivo. Puesto que cuando μ es apreciablemente superior a la velocidad de crecimiento del bacterioma, la función de fertilidad del áfido se vuelve notablemente insensible a cambios en este parámetro, se deduce que una variación en r del 10% puede interpretarse como sustancial.

En conjunto, parece razonable suponer que la reducción genómica observada en los endosimbiontes de los áfidos se ajusta a un proceso de degradación esencialmente neutral cuya velocidad sufre un freno súbito cuando quedan 1-20 genes no esenciales por eliminar, cuya magnitud depende fuertemente de la trayectoria y el tamaño de inóculo empleado al propagar la población de insectos. Esto implica que, a pesar de la existencia del freno, existirán trayectorias en las que este no tenga una influencia apreciable en el proceso evolutivo (*i.e.* los últimos genes no esenciales se perderán en un tiempo razonable) mientras que en otras podría suponer la conservación de genes no esenciales en el genoma del endosimbionte. Por otro lado, a pesar de que la velocidad de degradación genómica no varía con la eficacia con la que actúa la selección natural, las capacidades metabólicas y el *fitness* correspondientes a los endosimbiontes más reducidos sí que se ven apreciablemente afectados por esta.

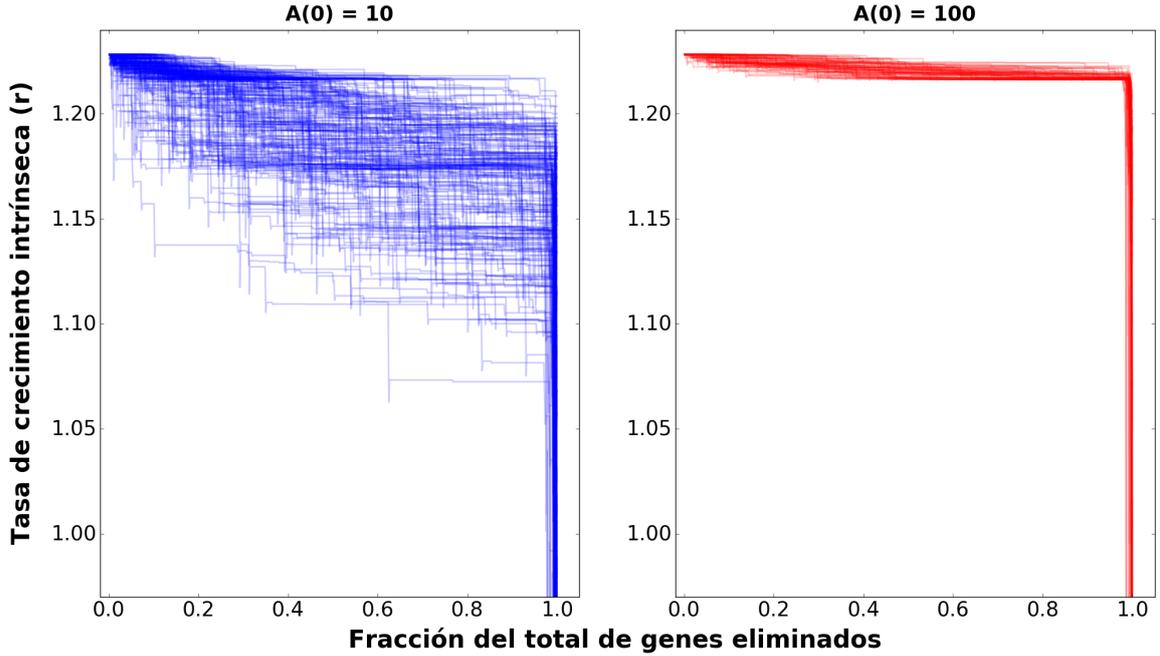


Figura 5.4: Representación de la tasa de crecimiento intrínseca normalizada r a lo largo del proceso de degradación genómica. Las condiciones con que se llevaron a cabo las simulaciones son las descritas en la sección 5.2.2, para áfidos propagados mediante pases de $A(0) = 10$ (líneas azules) y $A(0) = 100$ individuos (líneas rojas). Las matrices de Leslie \mathbf{L} se construyeron de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.2.2: $A_{max} = A(0)10^3$ áfidos, $S_i = 1$ para todo i , edad máxima de 18 días, y los F_i calculados a partir de la función de fertilidad (F) presentada en el capítulo 3 (ecuación 18), empleando la ecuación 4.6. La dinámica bacteriana se calculó empleando el modelo de dinámica bacteriana con desarrollo de bacterioma fijo, restringido por número de bacteriocitos (capítulo 3, ecuación 7) y edad a la que comienza la reproducción (t_c) variable (capítulo 3, ecuación 23). Los parámetros correspondientes al desarrollo del bacterioma corresponden al ajuste ilustrado en la figura 3 del capítulo 3: $N_{max} = 82$ bacteriocitos; $N_0 = 37$ bacteriocitos; $\nu = 0,364$ 1/días; $\phi = 0,066$ 1/días; $\Delta I = 120 \mu g$ de producto; e $Y_{EP} = 0,09$ insectos por μg de producto.

5.3. Discusión

El método de simulación empleado permite determinar, conocidas las probabilidades de fijación de todas las mutaciones posibles (la pérdida de la función de todos los genes metabólicos en este caso), con qué probabilidad el siguiente gen inhabilitado será uno determinado. A partir de esta información se calcula, además, el número medio de mutaciones que deben darse antes de que un gen se inhabilite ($\overline{K_{fix}}$, ver Caja 5). Esta aproximación implica, en consecuencia, que en cada paso de la simulación se inhabilita necesariamente un gen, con independencia de si esta inhabilitación podría darse en realidad debido a que el tiempo necesario para que esta sucediese fuera demasiado grande. En otras palabras: es posible identificar frenos (*i.e.* puntos en los que el valor de $\overline{K_{fix}}$ se incrementa apreciablemente) en el proceso de degradación genómica.

Uno de los elementos más destacados en torno a la evolución de endosimbiontes de insectos que recientemente han adquirido este estatus es la rápida y dramática reducción del número de genes funcionales [16, 49] que experimenta su genoma. Las nuevas condiciones de vida del endosimbionte (transferencia vertical estricta, entorno rico en nutrientes) han llevado a considerar que los cambios genómicos observados son resultado tanto de la reducción de la presión selectiva sobre muchos genes como de la incapacidad de ésta de actuar eficientemente sobre el sistema insecto-bacteria (si bien recientemente se ha sugerido que la degradación genómica observada podría ser, de hecho, favorecida por la selección natural [46]). En esta línea, los resultados obtenidos al simular la degradación genómica de este tipo de bacterias apuntan a que, efectivamente, la inhabilitación de la mayor parte de los genes no tiene consecuencias en el áfido en el momento en el que se produce. Aún más, se ha demostrado que la velocidad de degradación genómica no se ve apreciablemente afectada con independencia de la eficacia con que actúe la selección natural.

Sin embargo, el hecho de que la eficacia con que actúe la selección natural no afecte a la velocidad de degradación genómica no implica que esta no sea relevante en el proceso evolutivo. En particular, cuanto más eficientemente actúe la selección natural, más improbable será que las mutaciones no neutrales no letales que se fijen tengan un impacto importante en el *fitness* del áfido. Esto es, las pérdidas sustanciales de *fitness* se dan tanto más tarde en el proceso de degradación cuanto más intensamente actúe la selección natural. Como la degradación sufre un freno apreciable en sus últimas etapas (ver figura 5.1), una selección natural eficiente podría evitar la eliminación de genes no esenciales que afecten apreciablemente al *fitness* del insecto. En este sentido, trabajar con poblaciones de áfidos compuestas por, como máximo, 50000 individuos, y mantenerlas mediante pases de 100 insectos (ver sección 4.2.1) se demuestra suficiente como para impedir, en términos efectivos, la pérdida de *fitness* a lo largo de la mayor parte del proceso de degradación. De hecho, si tal y como se infiere de la magnitud del freno observado en este caso (figura 5.3) los últimos genes no esenciales no se inhabilitan en un tiempo razonable, la funcionalidad del endosimbionte no se ve apreciablemente afectada a lo largo de la evolución. Con poblaciones más pequeñas (menores de 5000 individuos) y tamaños de inóculo más discretos (10 insectos), en cambio, sí que se observa una apreciable degeneración funcional en los endosimbiontes (figura 5.4). Sin embargo, puesto que la población efectiva de los áfidos se estima superior a 100000 individuos [174, 175], este último caso es, *a priori*, descartable.

Es importante enfatizar que en el presente capítulo sólo se han considerado mutaciones de tipo deleción, esto es, mutaciones que inhabilitan completamente la función de un gen. Por tanto, a pesar de que los resultados obtenidos apuntan a que la pérdida de genes metabólicos a lo largo de la evolución de los endosimbiontes primarios de los áfidos es, esencialmente, un proceso quasi-neutral, no hay que

descartar la posibilidad de que la función de determinados genes se pierda de forma progresiva. Esto podría permitir la eliminación de genes que, de otra forma, quedarían retenidos incluso en el genoma de los endosimbiontes más reducidos.

Hasta ahora se ha hablado de la existencia de un freno 'apreciable' en sus últimas etapas (ver figura 5.1). La precaución tomada a la hora de hacer referencia a este comportamiento se refiere al hecho de que la velocidad de degradación se caracteriza mediante $\overline{K_{fix}}$. Este valor, como se ha discutido en la sección 5.2.3, es aproximadamente proporcional al tiempo absoluto sólo si en ningún momento coexisten dos o más mutantes de distinta naturaleza. De no cumplirse el supuesto, la tasa de mutación cumpliría un papel determinante en la interpretación de $\overline{K_{fix}}$ como medida de tiempo: valores relativamente grandes, si las tasas de mutación son elevadas, podrían estar asociados a tiempos no demasiado elevados. Esto supone que la magnitud del freno correspondiente a poblaciones de áfidos propagadas mediante inóculos de 10 individuos, que en muchos casos se asocia a valores de $\overline{K_{fix}} < 10000$ (figura 5.3, líneas azules), seguramente no sea suficiente como para evitar la inhabilitación de los últimos genes no esenciales. Sin embargo, para tamaños de inóculo de 100, los valores máximos de $\overline{K_{fix}}$ acostumbran a ser superiores a 10^{20} (figura 5.3, líneas rojas), por lo que el freno sí que podría suponer la evitación de la pérdida de los últimos genes no esenciales y el notable impacto en el *fitness* que ello supondría.

Todas las simulaciones llevadas a cabo en este capítulo suponen una serie de restricciones en los flujos de entrada de diversos sustratos a los endosimbiontes (ver sección 5.2.2). En concreto, se supone que los únicos metabolitos complejos que pueden entrar al sistema son glucosa y glutamato y nunca en cantidades superiores a las correspondientes a un flujo de entrada de carbono máxima de 60 mmol por gramo de peso seco de endosimbionte y por hora. Sin embargo, los detalles de la comunicación metabólica insecto-simbionte no se conocen [176]. De hecho, evidencia indirecta apunta a que los endosimbiontes seguramente tengan acceso a una variedad sustancial de metabolitos [176]. En consecuencia, no sería descabellado suponer que los resultados aquí representados no sean representativos. Esto implicaría que el número de mutaciones letales disminuiría a costa de incrementar el número de mutaciones neutrales y deletéreas. Si este incremento afectase preferencialmente a las mutaciones neutrales, entonces las deletéreas se mantendrían en baja frecuencia y la dinámica evolutiva discutida en este capítulo sería aplicable, si bien la magnitud de la reducción en el *fitness* del sistema áfido-endosimbionte podría variar. En caso de que se incremente esencialmente la frecuencia de mutaciones deletéreas, y a diferencia del caso anterior, la velocidad de degradación genómica sí que podría verse afectada por la eficacia con que actúa la selección natural. Sin embargo, tras la inhabilitación de varios genes, llegará un momento en que la flexibilidad (*i.e.* el número de rutas disponibles para llevar a cabo la misma función) será lo suficientemente baja como para que la frecuencia de mutaciones no neutrales no esenciales se reduzca enormemente. A partir de este momento, la dinámica evolutiva será análoga a la descrita en este capítulo.

En otro orden de cosas, si bien la restricción del flujo de carbono a 60 mmol por gramo de peso seco de endosimbionte y por hora permite obtener valores razonables de tasa de crecimiento y productividad en *E. coli*, el genoma empleado como ancestro de los endosimbiontes en las simulaciones, los valores de tasa de crecimiento y productividad correspondientes a los genomas mínimos (*i.e.* 100% de genes esenciales) son mucho más altos que los obtenidos al ajustar los datos experimentales (ver capítulo 3). En concreto, la tasa de crecimiento μ estimada en los ajustes es del orden de 1 día^{-1} , mientras que en las correspondientes a los genomas mínimos es mayor de 10 día^{-1} . La productividad máxima Y_{PB}^{max} , por otro lado, es de unos 10 μg de producto por cada 10^6 bacterias y día en el caso del ajuste, y de entre 10-20 μg de producto por cada 10^6 bacterias y día en el caso de los genomas mínimos. Si bien una ligera variación en el valor máximo de flujo de carbono permitiría ajustar sin problemas las discrepancias en torno a Y_{PB}^{max} , las de μ no son salvables de este modo. Este hecho sugiere la existencia de factores no tenidos en cuenta que afectan particularmente a la tasa de crecimiento de los endosimbiontes, ya sea la existencia de alteraciones en los genes no metabólicos implicados en el crecimiento o la acción del áfido sobre las bacterias que aloja.

Finalmente, es necesario discutir las simulaciones llevadas a cabo en este capítulo en relación a las presentadas en [168, 169]. En primer lugar, hay que señalar que el objetivo del presente trabajo es caracterizar la dinámica evolutiva de los simbioses, mientras que los otros exploran la caracterización metabólica de los genomas mínimos obtenidos al final del proceso de degradación [168] y el orden en el que los genes metabólicos se pierden [169]. En ambos trabajos la simulación de la degradación genómica consiste, simplemente, en la delección iterativa y al azar de genes metabólicos cuya eliminación tiene un impacto arbitrariamente pequeño en la productividad de los componentes necesarios para el crecimiento del sistema insecto-simbionte. A pesar de la sencillez de la aproximación, las características de los genomas mínimos obtenidos en [168] coinciden sustancialmente con las correspondientes a los aquí obtenidos. Esta coincidencia es fácilmente justificable atendiendo al hecho de que, a lo largo del proceso de degradación, la fracción de delecciones no neutrales no letales es pequeña (ver figura 5.2). Esto supone que la mayoría de los genes eliminados son neutrales y, por tanto, cumplen el criterio establecido en [168]. Como este criterio implica la aceptación de mutaciones con un pequeño impacto en las capacidades metabólicas del endosimbionte, las pequeñas diferencias que pudiesen surgir en el resto de casos se ve amortiguada. Comprendida una de las posibles razones que justifican la coincidencia de resultados, es indudable que se pueden dar circunstancias en las que esta coincidencia deje de darse. En consecuencia, a pesar de que el método propuesto en [168] es mucho más eficiente en términos de coste computacional, su validez queda restringida a determinadas circunstancias particulares. Por otra parte, caracterizar el orden en que se pierden los genes a lo largo de la evolución exige disponer de un número suficiente de trayectorias evolutivas. Por desgracia, el número de trayectorias calculadas no es suficiente para satisfacer este

objetivo, por lo que no se ha podido determinar si las conclusiones presentadas en [169], basadas en el algoritmo propuesto en [168], son compatibles con el abordaje al problema de la evolución de los endosimbiontes planteado en esta tesis.

Capítulo 6

Discusión general

La pregunta que ha motivado esta tesis es sencilla: ¿qué papel tiene la selección natural en el proceso de degradación genómica al que se ven sometidos los endosimbiontes de insectos? Sin embargo, como sucede con casi todas las preguntas sencillas, no es fácil dar una respuesta. Habitualmente se ha abordado este problema desde el punto de vista de la genómica comparativa (ver capítulo 1 sección 1.3 para un resumen al respecto), pero este tipo de aproximaciones rara vez proporcionan conclusiones cerradas y plenamente satisfactorias. Pocos estudios han enfocado el problema desde una perspectiva diferente [177-179].

O'Fallon [179], basándose en la ecuación para la probabilidad de fijación de mutaciones sometidas a deriva y selección natural planteada por Kimura [150], y suponiendo, al igual que en el presente trabajo, que la mutación en consideración se fija primero en la población bacteriana y luego en la del insecto, se deduce la probabilidad de fijación de una mutación en la población de insectos en función de su valor selectivo (tanto de cara al endosimbionte como al insecto) y de la población efectiva de bacterias e insectos. Además, se deriva cómo variaría esta expresión al permitir la existencia de transferencia horizontal de los endosimbiontes. Con estas expresiones en la mano, se concluye que en condiciones de transferencia horizontal nula, la acumulación de mutaciones deletéreas en el genoma de los endosimbiontes puede verse frenada por dos factores: la correlación entre el *fitness* bacteriano y el del hospedador, y la actuación de la selección natural a nivel del mismo. En concreto, se plantea que el cuello de botella en la transmisión de endosimbiontes de la madre a los descendientes afecta en exclusiva a la capacidad de la selección natural de actuar sobre las mutaciones a nivel de los endosimbiontes, por lo que si el *fitness* del huésped y el del hospedador están correlacionados, la selección natural a nivel del insecto podría ser suficiente para evitar la acumulación de mutaciones deletéreas para el sistema. Este cuello de botella, además, evita la proliferación de mutaciones egoístas (*i.e.* mutaciones que favorecen a los endosimbiontes pero perjudican al insecto).

Por otra parte, Rispe y Morán [177] así como Pettersson y Berg [178] recurren a

una aproximación dinámica en la que se tienen en cuenta explícitamente a todos los individuos de la población. De hecho, puede considerarse que el modelo planteado por Pettersson y Berg [178] representa una extensión del propuesto por Rispe y Morán [177] que permite considerar tamaños de población mayores. En estos trabajos se acepta, entre otros supuestos, que los genomas acumulan un número cada vez mayor de mutaciones levemente deletéreas con exactamente el mismo valor selectivo. Sin embargo, mientras que Rispe y Morán [177] concluyen que la selección natural a nivel del insecto no es suficiente para evitar de manera efectiva la degradación funcional del genoma de los endosimbiontes, Pettersson y Berg [178] llegan a la conclusión opuesta. La razón de que, a pesar de las semejanzas metodológicas se alcancen conclusiones tan dispares, radica en el impacto que tiene el incremento en la población a nivel de los insectos en la evitación de la acumulación de mutaciones: mientras que Rispe y Morán [177] determinan que la eficacia de la selección natural crece de manera logarítmica, Pettersson y Berg [178] identifican un crecimiento exponencial. Dado que las conclusiones de Rispe y Morán [177] se basan en la extrapolación de ajustes llevados a cabo con tamaños de población relativamente pequeños, parece sensato decantar la balanza de la razón a favor de los resultados expuestos por Pettersson y Berg [178]. En otro orden de cosas, y en sintonía con O'Fallon [179], ambos trabajos sugieren que la transferencia de un número pequeño de bacterias a la descendencia evita la proliferación de mutaciones egoístas a costa de disminuir la eficacia de la selección natural a nivel de los endosimbiontes.

¿Cómo encajan los resultados de esta tesis con estas conclusiones y qué aportan de nuevo? En primer lugar, la metodología desarrollada plantea por primera vez el estudio de la evolución de los endosimbiontes de insectos desde una perspectiva puramente dinámica: en los trabajos de Rispe y Morán [177], Pettersson y Berg [178], y O'Fallon [179] las mutaciones se representan como una variación en un *fitness* abstracto; en esta tesis, por el contrario, no se define explícitamente *fitness* alguno, sino que este emerge naturalmente del comportamiento del sistema. Esta aproximación al problema permite caracterizar la influencia de características específicas del sistema en el proceso evolutivo. El ejemplo más significativo hace referencia a la importancia del desarrollo del bacterioma en la dinámica de los endosimbiontes. El hecho de que el bacterioma presente una tasa de crecimiento en el orden de los eucariotas, unido a que los endosimbiontes primarios se encuentran confinados en el mismo, supone que no existen diferencias sustanciales en el comportamiento del sistema insecto-simbionte ante variaciones sustanciales de la tasa de crecimiento bacteriana siempre y cuando esta sea apreciablemente superior a la del bacterioma. Puesto que los procariontes, en general, presentan tasas de crecimiento muy superiores que los eucariotas, esta situación es de esperar al menos al principio de la evolución de los endosimbiontes. Esta insensibilidad supone que mutaciones que alteren (a bien o a mal) la tasa de crecimiento de los endosimbiontes serán, a efectos prácticos, prácticamente neutrales. En consecuencia, el mero confinamiento de la población bacteriana en un tejido específico previene la proliferación de mutaciones egoístas, que no podrán ser seleccionados ya que no aportan una ventaja apreciable

al endosimbionte.

En segundo lugar, todos los modelos planteados se han desarrollado con un diseño experimental en mente (ver capítulo 4, sección 4.2.1), por lo que los resultados derivados de los mismos son, *a priori*, contrastables. Además, cada aspecto del sistema insecto-simbionte y su evolución (crecimiento de los endosimbiontes en el bacterioma, dinámica de poblaciones del insecto, desarrollo del bacterioma, cálculo de probabilidades de fijación) se han modelado de manera relativamente independiente, por lo que resulta sencillo incluir modificaciones en aquellos módulos en caso de que sea necesario.

En tercer lugar, relacionar explícitamente el metabolismo bacteriano con la dinámica de poblaciones del áfido permite emplear herramientas de la biología de sistemas en la caracterización del proceso evolutivo. En particular, el empleo del análisis estequiométrico permite caracterizar el efecto de todas las posibles deleciones en las capacidades metabólicas de los endosimbiontes. Al poder relacionar este efecto con la dinámica de poblaciones de los insectos, se puede determinar con qué frecuencia una deleción tiene una determinada probabilidad de fijarse y, en consecuencia, se ha logrado caracterizar con relativa finura la dinámica evolutiva de los endosimbiontes en lo que a pérdida de genes refiere (capítulo 5). Dado el tipo de aproximaciones empleadas por Rispe y Morán [177], Pettersson y Berg [178], y O'Fallon [179], este tipo de análisis no es posible dada su falta de un modelo dinámico explícito.

Finalmente, y en línea con Pettersson y Berg [178] y O'Fallon [179], se ha concluido que la presión selectiva a nivel de la población de los áfidos es capaz, supuesto un tamaño de población razonablemente grande, de impedir eficazmente la proliferación de mutaciones deletéreas. Además, dada la forma en que el metabolismo de los endosimbiontes influencia la dinámica de poblaciones de los áfidos (capítulo 3), se concluye que cuando el endosimbionte presenta unas capacidades metabólicas limitadas, la probabilidad de que una mutación ligeramente deletérea se fije es prácticamente nula. De manera análoga, una mutación ligeramente beneficiosa en estas circunstancias proliferará en la población rápidamente. Esto quiere decir que, aún si las capacidades metabólicas de los endosimbiontes llegan a reducirse a niveles bajos, la probabilidad de que existan mutaciones deletéreas fijables se reducirían enormemente, dando la oportunidad de que surjan retromutaciones o mutaciones beneficiosas que reviertan, al menos en parte, la pérdida de funcionalidad. Por desgracia, no se pueden discutir algunos de los resultados presentados por Rispe y Morán [177], Pettersson y Berg [178], y O'Fallon [179], ya que en estos trabajos se contempla la fijación a nivel de la población de endosimbionte, mientras que en esta tesis esta dinámica se obvia (si bien su impacto en la interpretabilidad de los cálculos efectuados se discute en la sección 4.2.4). En esta línea, la incorporación de esta dinámica a los modelos planteados representa el siguiente paso natural en este trabajo.

Capítulo 7

Conclusiones

La modelización del sistema *Acyrtosiphon pisum*-*Buchnera aphidicola* y su evolución ha permitido avanzar en la determinación de la importancia de la selección natural a nivel del hospedador en el proceso de degradación genómica al que se ven sometidos los endosimbiontes de insectos. En particular:

- El confinamiento de los endosimbiontes en el bacterioma del hospedador implica que mutaciones que alteren la tasa del crecimiento de los endosimbiontes serán prácticamente neutrales siempre y cuando esta tasa de crecimiento sea suficientemente superior a la del bacterioma. Este hecho implica que las mutaciones egoístas, en general, no se verán favorecidas.
- Bajo el supuesto de que la presencia de los endosimbiontes no supone coste alguno al hospedador, existen muy pocas circunstancias en las que el consumo (menos aún el control) de la población bacteriana resulte beneficioso para el insecto.
- La probabilidad de fijación P_f de mutaciones deletéreas que afecten al sistema insecto-simbionte depende fuertemente del tamaño de inóculo $A(0)$ empleado en la propagación controlada de la población de áfidos ($P_f \propto e^{-aA(0)+b}/A(0)$). Nótese que el tamaño de la población de insectos escala con $A(0)$.
- La degradación genómica de los endosimbiontes parece operar a una velocidad prácticamente constante, definida por la probabilidad de fijación de una mutación neutral, hasta que se han perdido $> 90\%$ de los genes eliminados en cada trayectoria evolutiva particular. Tras esta primera etapa se aprecia un decremento brusco de la misma que, si el tamaño de la población de áfidos es suficientemente grande, podría suponer la retención de 1 – 20 genes no esenciales.
- La velocidad de degradación del genoma de los endosimbiontes es esencialmente independiente de la capacidad de la selección natural de evitar la fijación de mutaciones deletéreas.

- La eficacia de la selección natural determina las capacidades de crecimiento del sistema insecto-endosimbionte a lo largo del proceso de degradación genómica.
- Para tamaños de población de áfidos razonablemente grandes (no más de 50000 individuos propagados mediante pases de 100 insectos fértiles), no se observan pérdidas sustanciales en las capacidades de crecimiento del sistema insecto-endosimbionte a lo largo de la evolución. Este hecho apunta a que la selección a nivel del insecto podría ser suficiente para evitar la degeneración de las funciones de los endosimbiontes relevantes al sistema en su conjunto.

Todas las conclusiones presentadas derivan de tres supuestos fundamentales: la fuente de alimento de los áfidos no varía en el tiempo y es accesible *ad libitum*, toda mutación que aparece en un endosimbionte se fija instantáneamente en el insecto en que este se aloja, y nunca coexisten dos o más mutaciones distintas en una misma población de áfidos. En futuros trabajos se extenderán los modelos y métodos de cálculo desarrollados a situaciones en las que estos supuestos no se cumplan así como a otros insectos que presenten características particulares distintas a las de los áfidos.

Capítulo 8

Conclusions

The modeling of the *Acyrtosiphon pisum*-*Buchnera aphidicola* system and its evolution has allowed to advance in the determination of the importance of natural selection at host level in the process of genomic degradation to which the endosymbionts of insects are subjected. In particular:

- The confinement of the endosymbionts in the host bacterioma implies that mutations that alter the growth rate of the endosymbionts will be practically neutral as long as this growth rate is sufficiently higher than that of the bacterioma. This fact implies that selfish mutations, in general, will not be favored.
- Under the assumption that the presence of the endosymbionts does not imply any cost to the host, there are very few circumstances in which the consumption (even less the control) of the bacterial population is beneficial for the insect.
- The probability of fixation P_f of deleterious mutations that affect the insect-symbiont system depends strongly on the inoculum size $A(0)$ used in the controlled propagation of the aphid population ($P_f \propto e^{-aA(0)+b}/A(0)$). Note that the maximum size of the insect population scales with $A(0)$.
- The genomic degradation of the endosymbionts seems to operate at an almost constant speed until $> 90\%$ of the eliminated genes have been lost. The particular value of this speed is defined by the probability of fixing a neutral mutation. After this first stage there is an abrupt decrease of the same, which, if the size of the aphid population is sufficiently large, could suppose the retention of 1 – 20 non-essential genes.
- The rate of the endosymbionts genome degradation is essentially independent of the ability of natural selection to avoid the fixation of deleterious mutations.
- The effectiveness of natural selection determines the growth capabilities of the insect-endosymbiotic system throughout the genomic degradation process.

- For reasonably large aphids population sizes (no more than 50000 individuals propagated by passes of 100 fertile insects), no substantial losses in the growth capabilities of the insect-endosymbiotic system are observed throughout evolution. This fact suggests that the selection at the level of the insect could be sufficient to avoid the degeneration of the functions of the endosymbionts relevant to the system as a whole.

All the conclusions presented here derive from three fundamental assumptions: the food source of the aphids does not vary in time and is accessible *ad libitum*, any mutation that appears in an endosymbiont is instantaneously fixed in the insect in which it is lodged, and two or more different mutations never coexist in the same population of aphids. Future studies will extend the models and calculation methods to situations in which these assumptions do not hold as well as to other insects that have particular characteristics different from those of aphids.

Capítulo 9

Métodos

Los parámetros y condiciones particulares empleados en la obtención de los resultados de esta tesis se describen en las secciones correspondientes. Todas las integraciones numéricas se llevaron a cabo haciendo uso de las funciones `scipy.integrate.quad` (función a integrar definida explícitamente) y `scipy.integrate.simps` (integración de conjunto de datos) de la librería *SciPy* [180] con las opciones por defecto. Para la resolución numérica de ecuaciones algebraicas se empleó la función `scipy.integrate.brentq` de la misma librería, también con las opciones por defecto.

Los estudios de *CBM* se realizaron utilizando *COBRAPy* [181]. Los problemas de optimización lineal (determinación del máximo valor de flujo a través de las reacciones de biomasa del áfido y del endosimbionte, capítulo 5) se resolvieron mediante el *Gurobi Solver*, accedido a través de *COBRAPy*. La eliminación de los genes se representó mediante la limitación a cero del flujo de las reacciones asociadas (nótese que se emplearon las relaciones gen-reacción del modelo *iJR904* [152] para determinar si una reacción asociada a un determinado gen puede operar en ausencia de este).

El código desarrollado para este trabajo se programó en *Python*, y se puede solicitar a los autores. Todos los cálculos efectuados se llevaron a cabo en un ordenador de sobremesa de 4 núcleos (2 hilos por núcleo), con un procesador Intel(R) Core(TM) i7-3770 CPU @ 3.40GHz y 8GiB DIMM DDR3 Synchronous 1333 MHz (0.8 ns), corriendo Fedora 3.14.27-100.fc19.x86_64 Linux OS. El tiempo medio de cálculo de una probabilidad de fijación (capítulo 4) es del orden de segundos para tamaños de inóculo $A(0) \leq 100$. Cada simulación de una reducción genómica completa (capítulo 5) tarda del orden de días (menos de dos días para tamaños de inóculo $A(0) \leq 100$). En las simulaciones se consideraron como efectivamente neutras mutaciones que alterasen la tasa de crecimiento o la productividad máxima del endosimbionte menos de 10^{-5} unidades correspondientes. A las probabilidades de fijación de las mutaciones neutras se les asignó un valor de $1/A(0)$, ya que en todos los casos en que se calculó la probabilidad de fijación de una mutación neutral de acuerdo a lo presentado en el capítulo 4 se obtuvo este resultado.

Bibliografía

- (1) Martin, W. F.; Garg, S. y Zimorski, V. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2015**, *370*, 20140330.
- (2) Bourtzis, K. y Miller, T. A., *Insect symbiosis*; CRC Press: 2003.
- (3) Moran, N. A.; Plague, G. R.; Sandstrom, J. P. y Wilcox, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 14543-14548.
- (4) Baumann, P. *Annual Review of Microbiology* **2005**, *59*, 155-189.
- (5) Moya, A.; Peretó, J.; Gil, R. y Latorre, A. *Nature Reviews Genetics* **2008**, *9*, 218-229.
- (6) Gil, R.; Latorre, A.; Gil, R. y Latorre, A. *Life* **2019**, *9*, 21.
- (7) Nakabachi, A. e Ishikawa, H. *Journal of Insect Physiology* **1999**, *45*, 1-6.
- (8) Manzano-Marín, A. y Latorre, A. *Genome Biology and Evolution* **2014**, *6*, 1683-1698.
- (9) Santos-Garcia, D.; Juravel, K.; Freilich, S.; Zchori-Fein, E.; Latorre, A.; Moya, A.; Morin, S. y Silva, F. J. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, 2254.
- (10) Zientz, E.; Dandekar, T. y Gross, R. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2004**, *68*, 745-70.
- (11) López-Sánchez, M. J.; Neef, A.; Peretó, J.; Patiño-Navarrete, R.; Pignatelli, M.; Latorre, A. y Moya, A. *PLoS Genetics* **2009**, *5*, ed. por Bordenstein, S. R., e1000721.
- (12) Montllor, C. B.; Maxmen, A. y Purcell, A. H. *Ecological Entomology* **2002**, *27*, 189-195.
- (13) Oliver, K. M.; Russell, J. A.; Moran, N. A. y Hunter, M. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 1803-1807.
- (14) Stouthamer, R.; Breeuwer, J. A. J. y Hurst, G. D. D. *Annual Review of Microbiology* **1999**, *53*, 71-102.
- (15) Clayton, A. L.; Oakeson, K. F.; Gutin, M.; Pontes, A.; Dunn, D. M.; von Niederhausern, A. C.; Weiss, R. B.; Fisher, M. y Dale, C. *PLoS Genetics* **2012**, *8*, ed. por Guttman, D. S., e1002990.
- (16) Oakeson, K. F. y col. *Genome Biology and Evolution* **2014**, *6*, 76-93.
- (17) Manzano-Marín, A. y Latorre, A. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 32590.

- (18) Manzano-Marín, A.; Lamelas, A.; Moya, A. y Latorre, A. *PLoS ONE* **2012**, *7*, ed. por Horn, M., e47274.
- (19) Moran, N. A. y Bennett, G. M. *Annual Review of Microbiology* **2014**, *68*, 195-215.
- (20) Sachs, J. L.; Skophammer, R. G.; Bansal, N. y Stajich, J. E. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2013**, *281*, 20132146-20132146.
- (21) D'Souza, G.; Shitut, S.; Preussger, D.; Yousif, G.; Waschina, S. y Kost, C. *Natural Product Reports* **2018**, *35*, 455-488.
- (22) Pérez-Brocal, V.; Latorre, A. y Moya, A. en; Springer, Berlin, Heidelberg: 2011, págs. 215-243.
- (23) Sachs, J. L.; Essenberg, C. J. y Turcotte, M. M. *Trends in ecology & evolution* **2011**, *26*, 202-9.
- (24) Jones, E. I.; Afkhami, M. E.; Akçay, E.; Bronstein, J. L.; Bshary, R.; Frederickson, M. E.; Heath, K. D.; Hoeksema, J. D.; Ness, J. H.; Pankey, M. S.; Porter, S. S.; Sachs, J. L.; Scharnagl, K. y Friesen, M. L. *Ecology Letters* **2015**, *18*, ed. por van Dam, N., 1270-1284.
- (25) Friesen, M. L. y Jones, E. I. *Methods in molecular biology* **2012**, *804*, 481-499.
- (26) Gonze, D.; Coyte, K. Z.; Lahti, L. y Faust, K. *Current Opinion in Microbiology* **2018**, *44*, 41-49.
- (27) Wang, M.-X. y Ma, Y.-Q. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **2014**, *395*, 228-235.
- (28) Abbott, K. C.; Karst, J.; Biederman, L. A.; Borrett, S. R.; Hastings, A.; Walsh, V. y Bever, J. D. *PLOS ONE* **2015**, *10*, ed. por Balestrini, R., e0125788.
- (29) Hoek, T. A.; Axelrod, K.; Biancalani, T.; Yurtsev, E. A.; Liu, J. y Gore, J. *PLOS Biology* **2016**, *14*, ed. por Balaban, N., e1002540.
- (30) Momeni, B.; Xie, L. y Shou, W. *eLife* **2017**, *6*, DOI: 10.7554/eLife.25051.
- (31) Ferriere, R. y Legendre, S. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2012**, *368*, 20120081-20120081.
- (32) Zhang, Z.; Yan, C.; Krebs, C. J. y Stenseth, N. C. *Ecological Modelling* **2015**, *312*, 374-384.
- (33) Law, R. y Dieckmann, U. *Proceedings of the Royal Society of London* **1998**, *265*, 1245-1253.
- (34) Adami, C.; Schossau, J. e Hintze, A. *Physics of Life Reviews* **2016**, *19*, 1-26.
- (35) Roca, C. P.; Cuesta, J. A. y Sánchez, A. *Physics of Life Reviews* **2009**, *6*, 208-249.
- (36) Taylor, C. y Nowak, M. A. *Evolution* **2007**, *61*, 2281-2292.

- (37) Bshary, R.; Zuberbühler, K. y van Schaik, C. P. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2016**, *371*, 20150091.
- (38) Bergstrom, C. T. y Lachmann, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 593-598.
- (39) Veller, C.; Hayward, L. K.; Hilbe, C. y Nowak, M. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114*, E5396-E5405.
- (40) Hammerstein, P. y Noë, R. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2016**, *371*, 20150101.
- (41) Jaffe, K. *SpringerPlus* **2016**, *5*, 1092.
- (42) Frank, S. A. *Journal of Theoretical Biology* **1994**, *170*, 393-400.
- (43) MartÁñez-Cano, D. J.; Reyes-Prieto, M.; MartÁñez-Romero, E.; Partida-MartÁñez, L. P.; Latorre, A.; Moya, A. y Delaye, L. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *5*, 742.
- (44) Keeling, P. J. y McCutcheon, J. P. *Journal of Theoretical Biology* **2017**, *434*, 75-79.
- (45) Bennett, G. M. y Moran, N. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, 10169-10176.
- (46) Wernegreen, J. J. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2015**, *1360*, 16-35.
- (47) Moran, N. A.; McCutcheon, J. P. y Nakabachi, A. *Annual Review of Genetics* **2008**, *42*, 165-190.
- (48) José Gosalbes, M.; Latorre, A.; Lamelas, A. y Moya, A. *International Journal of Medical Microbiology* **2010**, *300*, 271-278.
- (49) Moran, N. A. y Plague, G. R. *Current Opinion in Genetics & Development* **2004**, *14*, 627-633.
- (50) Wernegreen, J. J. *Current Opinion in Genetics & Development* **2017**, *47*, 83-90.
- (51) Latorre, A. y Manzano-Marín, A. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2017**, *1389*, 52-75.
- (52) Maisnier-Patin, S.; Roth, J. R.; Fredriksson, Å.; Nyström, T.; Berg, O. G. y Andersson, D. I. *Nature Genetics* **2005**, *37*, 1376-1379.
- (53) Morioka, M.; Muraoka, H.; Yamamoto, K. e Ishikawa, H. *The Journal of Biochemistry* **1994**, *116*, 1075-1081.
- (54) Moran, N. A.; McLaughlin, H. J. y Sorek, R. *Science* **2009**, *323*, 379-382.
- (55) Sloan, D. B. y Moran, N. A. *Biology letters* **2012**, *8*, 986-9.
- (56) Nikoh, N.; Hosokawa, T.; Moriyama, M.; Oshima, K.; Hattori, M. y Fukatsu, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 10257-10262.

- (57) Giovannoni, S. J.; Cameron Thrash, J. y Temperton, B. *The ISME Journal* **2014**, *8*, 1553-1565.
- (58) Tamames, J.; Gil, R.; Latorre, A.; Peretó, J.; Silva, F. J. y Moya, A. *BMC Evolutionary Biology* **2007**, *7*, 181.
- (59) Lynch, M. y Marinov, G. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, 201514974.
- (60) Lane, N. y Martin, W. *Nature* **2010**, *467*, 929-934.
- (61) Sauer, C.; Dudaczek, D.; Hölldobler, B. y Gross, R. *Applied and environmental microbiology* **2002**, *68*, 4187-93.
- (62) Braendle, C.; Miura, T.; Bickel, R.; Shingleton, A. W.; Kambhampati, S. y Stern, D. L. *PLoS Biology* **2003**, *1*, ed. por Benjamin Normark, e21.
- (63) Miura, T.; Braendle, C.; Shingleton, A.; Sisk, G.; Kambhampati, S. y Stern, D. L. *Journal of Experimental Zoology* **2003**, *295B*, 59-81.
- (64) Rabatel, A.; Febvay, G.; Gaget, K.; Duport, G.; Baa-Puyoulet, P.; Sapountzis, P.; Bendridi, N.; Rey, M.; Rahbé, Y.; Charles, H.; Calevro, F. y Colella, S. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 235.
- (65) Matsuura, Y.; Kikuchi, Y.; Miura, T. y Fukatsu, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 9376-81.
- (66) Skidmore, I. H. y Hansen, A. K. *Insect Science* **2017**, *24*, 910-928.
- (67) Simonet, P.; Duport, G.; Gaget, K.; Weiss-Gayet, M.; Colella, S.; Febvay, G.; Charles, H.; Viñuelas, J.; Heddi, A. y Calevro, F. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 19967.
- (68) Vigneron, A.; Masson, F.; Vallier, A.; Balmand, S.; Rey, M.; Vincent-Monégat, C.; Aksoy, E.; Aubailly-Giraud, E.; Zaidman-Rémy, A. y Heddi, A. *Current Biology* **2014**, *24*, 2267-2273.
- (69) Dossi, F. C. A.; da Silva, E. P. y Cònsoli, F. L. *Microbial Ecology* **2014**, *68*, 881-889.
- (70) Kono, M.; Koga, R.; Shimada, M. y Fukatsu, T. *Applied and environmental microbiology* **2008**, *74*, 4175-84.
- (71) Masson, F.; Zaidman-Rémy, A. y Heddi, A. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2016**, *371*, 20150298.
- (72) Gerardo, N. M. y col. *Genome Biology* **2010**, *11*, R21.
- (73) Douglas, A. E.; Bouvaine, S. y Russell, R. R. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2011**, *278*, 333-338.
- (74) Anselme, C.; Vallier, A.; Balmand, S.; Fauvarque, M.-O. y Heddi, A. *Applied and environmental microbiology* **2006**, *72*, 6766-72.

- (75) Ratzka, C.; Gross, R. y Feldhaar, H. *Journal of Insect Physiology* **2013**, *59*, 611-623.
- (76) Simonet, P.; Gaget, K.; Balmand, S.; Ribeiro Lopes, M.; Parisot, N.; Buhler, K.; Duport, G.; Vulsteke, V.; Febvay, G.; Heddi, A.; Charles, H.; Callaerts, P. y Calevro, F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2018**, *115*, E1819-E1828.
- (77) Masson, F.; Vallier, A.; Vigneron, A.; Balmand, S.; Vincent-Monégat, C.; Zaidman-Rémy, A. y Heddi, A. *Journal of Innate Immunity* **2015**, *7*, 290-301.
- (78) Kliot, A.; Cilia, M.; Czosnek, H. y Ghanim, M. *Journal of virology* **2014**, *88*, 5652-60.
- (79) Vyas, M.; Fisher, T. W.; He, R.; Nelson, W.; Yin, G.; Cicero, J. M.; Willer, M.; Kim, R.; Kramer, R.; May, G. A.; Crow, J. A.; Soderlund, C. A.; Gang, D. R. y Brown, J. K. *PLOS ONE* **2015**, *10*, ed. por Boykin, L. M., e0130328.
- (80) Hansen, A. K. y Moran, N. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 2849-54.
- (81) Husnik, F.; Nikoh, N.; Koga, R.; Ross, L.; Duncan, R. P.; Fujie, M.; Tanaka, M.; Satoh, N.; Bachtrog, D.; Wilson, A. C. C.; von Dohlen, C. D.; Fukatsu, T. y McCutcheon, J. P. *Cell* **2013**, *153*, 1567-78.
- (82) Sloan, D. B.; Nakabachi, A.; Richards, S.; Qu, J.; Murali, S. C.; Gibbs, R. A. y Moran, N. A. *Molecular Biology and Evolution* **2014**, *31*, 857-871.
- (83) Luan, J.-B.; Chen, W.; Hasegawa, D. K.; Simmons, A. M.; Wintermantel, W. M.; Ling, K.-S.; Fei, Z.; Liu, S.-S. y Douglas, A. E. *Genome Biology and Evolution* **2015**, *7*, 2635-2647.
- (84) Moran, N. A.; Dunbar, H. E. y Wilcox, J. L. *Journal of bacteriology* **2005**, *187*, 4229-37.
- (85) Reymond, N.; Calevro, F.; Viñuelas, J.; Morin, N.; Rahbé, Y.; Febvay, G.; Laugier, C.; Douglas, A.; Fayard, J.-M. y Charles, H. *Applied and environmental microbiology* **2006**, *72*, 7760-6.
- (86) Colella, S.; Parisot, N.; Simonet, P.; Gaget, K.; Duport, G.; Baa-Puyoulet, P.; Rahbé, Y.; Charles, H.; Febvay, G.; Callaerts, P. y Calevro, F. *Frontiers in Physiology* **2018**, *9*, 1498.
- (87) Price, D. R. G.; Feng, H.; Baker, J. D.; Bavan, S.; Luetje, C. W. y Wilson, A. C. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 320-5.
- (88) Brinza, L.; Viñuelas, J.; Cottret, L.; Calevro, F.; Rahbé, Y.; Febvay, G.; Duport, G.; Colella, S.; Rabatel, A.; Gautier, C.; Fayard, J.-M.; Sagot, M.-F. y Charles, H. *Comptes Rendus Biologies* **2009**, *332*, 1034-1049.
- (89) Hansen, A. K. y Degnan, P. H. *The ISME Journal* **2014**, *8*, 2490-2502.

- (90) Nakabachi, A.; Ishida, K.; Hongoh, Y.; Ohkuma, M. y Miyagishima, S.-y. *Current Biology* **2014**, *24*, R640-R641.
- (91) McCutcheon, J. P. y Keeling, P. J. *Current Biology* **2014**, *24*, R654-R655.
- (92) Peleg, M.; Corradini, M. G. y Normand, M. D. *Food Research International* **2007**, *40*, 808-818.
- (93) Vilcinskis, A., *Biology and ecology of aphids*.
- (94) Dinant, S.; Bonnemain, J.-L.; Girousse, C. y Kehr, J. *Comptes Rendus Biologies* **2010**, *333*, 504-515.
- (95) Douglas, A. E. *Journal of Experimental Botany* **2006**, *57*, 747-754.
- (96) Mira, A. y Moran, N. *Microbial Ecology* **2002**, *44*, 137-143.
- (97) Morgan, D.; Walters, K. F. y Aegerter, J. N. *Bulletin of entomological research* **2001**, *91*, 47-52.
- (98) Koga, R.; Meng, X.-Y.; Tsuchida, T. y Fukatsu, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, E1230-E1237.
- (99) Polianin, A. D. (D.; Zaitsev, V. F. y Za©Øit©Lsev, V. F., *Handbook of exact solutions for ordinary differential equations*; Chapman & Hall/CRC: 2003.
- (100) Banks, H. y Joyner, M. L. *Applied Mathematics Letters* **2017**, *74*, 33-45.
- (101) Palsson, B., *Systems biology : properties of reconstructed networks*; Cambridge University Press: 2006, pág. 322.
- (102) Andersen, K. B. y von Meyenburg, K. *Journal of bacteriology* **1980**, *144*, 114-23.
- (103) Cook, G. M.; Berney, M.; Gebhard, S.; Heinemann, M.; Cox, R. A.; Danilchanka, O. y Niederweis, M. *Advances in Microbial Physiology* **2009**, *55*, 81-319.
- (104) Brough, C. N.; Dixon, A. F. G. y Kindlmann, P. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1990**, *56*, 269-275.
- (105) Review of the nutritive value of edible insects., vol. 2010, Lecture Notes in Computer Science, vol. 2010, Food y Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome, Italy, 2008.
- (106) Kaleta, C.; Schäuble, S.; Rinas, U. y Schuster, S. *Biotechnology Journal* **2013**, *8*, 1105-1114.
- (107) Weaver, D. S.; Keseler, I. M.; Mackie, A.; Paulsen, I. T. y Karp, P. D. *BMC Systems Biology* **2014**, *8*, 79.
- (108) Dennis, P. P. y Bremer, H. *EcoSal Plus* **2008**, *3*, DOI: 10.1128/ecosal.1.5.2.3.
- (109) Conti, B. F. D.; Bueno, V. H. P.; Sampaio, M. V. y Sidney, L. A. *Revista Brasileira de Entomologia* **2010**, *54*, 654-660.

- (110) Hedengren J. APMonitor Optimization Suite., 2014.
- (111) Lotka, A. J. *The Annals of Mathematical Statistics* **1939**, *10*, 144-161.
- (112) Stouthamer, A. H. *Antonie van Leeuwenhoek* **1973**, *39*, 545-565.
- (113) Wyatt, I. J. y White, P. F. *The Journal of Applied Ecology* **1977**, *14*, 757.
- (114) Van Emden, H. F. (F. y Harrington, R., *Aphids as crop pests*; CABI: 2007, pág. 717.
- (115) Karley, A. J.; Parker, W. E.; Pitchford, J. W. y Douglas, A. *Ecological Entomology* **2004**, *29*, 383-388.
- (116) Douglas, A. E. *Ecological Entomology* **1993**, *18*, 31-38.
- (117) Kennedy, J. S.; Ibbotson, A. y Booth, C. O. *Annals of Applied Biology* **1950**, *37*, 651-679.
- (118) Kundu, R. y Dixon, A. *The Journal of Animal Ecology* **1995**, *64*, 245.
- (119) Wernegreen, J. J. *Current Opinion in Microbiology* **2012**, *15*, 255-262.
- (120) Dixon, A. F. G. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1977**, *8*, 329-353.
- (121) Via, S. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1992**, *65*, 119-127.
- (122) Dixon, A. F. G. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* **2009**, *127*, 87-99.
- (123) Wellings, P. W.; Leather, S. R. y Dixon, A. F. G. *The Journal of Animal Ecology* **1980**, *49*, 975.
- (124) Gupta, P. R. y Thakur, J. R. *Annals of Applied Biology* **1993**, *122*, 215-221.
- (125) Stern, D. L. y Foster, W. A. *Biological Reviews* **1996**, *71*, 27-79.
- (126) Kurosu, U.; Aoki, S. y Fukatsu, T. *Proceedings of the Royal Society of London* **2003**, *270*, DOI: 10.1098/rsbl.2003.0026.
- (127) Dixon, A. F. G. en *Aphid Ecology An optimization approach*; Springer Netherlands: Dordrecht, 1985, págs. 128-170.
- (128) Leather, S. R. *Journal of Applied Entomology* **1993**, *116*, 217-233.
- (129) Lees, A. *Journal of Insect Physiology* **1959**, *3*, 92-117.
- (130) Lees, A. *Journal of Insect Physiology* **1960**, *4*, 154-175.
- (131) Forrest, J. *Journal of Insect Physiology* **1970**, *16*, 2281-2292.
- (132) Moran, N.; Seminoff, J. y Johnstone, L. *Physiological Entomology* **1993**, *18*, 296-302.
- (133) Johnson, B. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1965**, *8*, 49-64.
- (134) Dixon, A. F. G. y Glen, D. M. *Annals of Applied Biology* **1971**, *68*, 11-21.
- (135) Mittler, T. E. y Dadd, R. H. *Annals of the Entomological Society of America* **1966**, *59*, 1162-1166.

- (136) Johnson, B. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1966**, 9, 213-222.
- (137) Müller, C. B.; Williams, I. S. y Hardie, J. *Ecological Entomology* **2001**, 26, 330-340.
- (138) El-Ziady, S. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* **2009**, 35, 30-38.
- (139) Bale, J. S. y Tatchell, G. M. *Mathematical Population Studies* **1995**.
- (140) Burke, G.; Fiehn, O. y Moran, N. *The ISME Journal* **2010**, 4, 242-252.
- (141) Piyaratne, M.; Zhao, H. y Meng, Q. *Ecological Modelling* **2013**, 253, 9-16.
- (142) Kindlmann, P. y Dixon, A. F. en *Aphid Biodiversity under Environmental Change*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2010, págs. 1-20.
- (143) Tenhumberg, B. *Nature Education Knowledge* **2010**, 3, 2.
- (144) Hansen, P. E. *Mathematical Population Studies* **1989**, 2, 37-67.
- (145) Kessler, B. y Davis, A. *The Mathematical Scientist* **2016**.
- (146) Allen, L. J. *Mathematical Biosciences* **1989**, 95, 179-187.
- (147) May, R. M. *Nature* **1976**, 261, 459-467.
- (148) Stroock, D. W., *An introduction to Markov processes*, pág. 203.
- (149) Skala, M. *arxiv* **2013**.
- (150) Kimura, M. *Journal of Applied Probability* **1964**, 1, 177-232.
- (151) Thiele, I. y Palsson, B. Ø. *Nature protocols* **2010**, 5, 93-121.
- (152) Henry, C. S.; Jankowski, M. D.; Broadbelt, L. J. y Hatzimanikatis, V. *Biophysical journal* **2006**, 90, 1453-61.
- (153) Henry, C. S.; Broadbelt, L. J. y Hatzimanikatis, V. *Biophysical Journal* **2007**, 92, 1792-1805.
- (154) Fleming, R.; Thiele, I.; Provan, G. y Nasheuer, H. *Journal of Theoretical Biology* **2010**, 264, 683-692.
- (155) Hoppe, A.; Hoffmann, S. y Holzhütter, H.-G. *BMC systems biology* **2007**, 1, 23.
- (156) Jankowski, M. D.; Henry, C. S.; Broadbelt, L. J. y Hatzimanikatis, V. *Biophysical journal* **2008**, 95, 1487-99.
- (157) Becker, S. A. y Palsson, B. O. *PLoS Computational Biology* **2008**, 4, ed. por Sauro, H. M., e1000082.
- (158) Shlomi, T.; Eisenberg, Y.; Sharan, R. y Ruppin, E. *Molecular systems biology* **2007**, 3, 101.
- (159) Covert, M. W.; Xiao, N.; Chen, T. J. y Karr, J. R. *Bioinformatics* **2008**, 24, 2044-2050.

- (160) Min Lee, J.; Gianchandani, E. P.; Eddy, J. A. y Papin, J. A. *PLoS Computational Biology* **2008**, *4*, ed. por Ouzounis, C. A., e1000086.
- (161) Mahadevan, R.; Edwards, J. S.; Doyle, F. J. y 3rd *Biophysical journal* **2002**, *83*, 1331-40.
- (162) Gomez, J. A. y Barton, P. I. *Methods in molecular biology* **2018**, *1716*, 353-370.
- (163) Burgard, A. P. y Maranas, C. D. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *82*, 670-677.
- (164) Gianchandani, E. P.; Oberhardt, M. A.; Burgard, A. P.; Maranas, C. D. y Papin, J. A. *BMC bioinformatics* **2008**, *9*, 43.
- (165) Kumar, V. S. y Maranas, C. D. *PLoS Computational Biology* **2009**, *5*, ed. por Ouzounis, C. A., e1000308.
- (166) Schuster, S.; Pfeiffer, T. y Fell, D. A. *Journal of Theoretical Biology* **2008**, *252*, 497-504.
- (167) Lewis, N. E.; Nagarajan, H. y Palsson, B. O. *Nature Reviews Microbiology* **2012**, *10*, 291-305.
- (168) Pál, C.; Papp, B.; Lercher, M. J.; Csermely, P.; Oliver, S. G. y Hurst, L. D. *Nature* **2006**, *440*, 667-670.
- (169) Yizhak, K.; Tuller, T.; Papp, B. y Ruppin, E. *Molecular systems biology* **2011**, *7*, 479.
- (170) Reed, J. L.; Vo, T. D.; Schilling, C. H. y Palsson, B. O. *Genome Biology* **2003**, *4*, R54.
- (171) Shigenobu, S.; Watanabe, H.; Hattori, M.; Sakaki, Y. e Ishikawa, H. *Nature* **2000**, *407*, 81-86.
- (172) Sandström, J. P. y Moran, N. A. *Physiological Entomology* **2001**, *26*, 202-211.
- (173) Macdonald, S. J.; Lin, G. G.; Russell, C. W.; Thomas, G. H. y Douglas, A. E. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2012**, *279*, 2965-2973.
- (174) Funk, D. J.; Wernegreen, J. J. y Moran, N. A. *Genetics* **2001**, *157*, 477.
- (175) Abbot, P. y Moran, N. A. *Molecular ecology* **2002**, *11*, 2649-60.
- (176) Mergaert, P.; Kikuchi, Y.; Shigenobu, S. y Nowack, E. C. *Trends in Microbiology* **2017**, *25*, 703-712.
- (177) Rispe, C. y Moran, N. A. *The American Naturalist* **2000**, *156*, 425-441.
- (178) Pettersson, M. E. y Berg, O. G. *Genetica* **2007**, *130*, 199-211.
- (179) O'Fallon, B. *Evolution* **2008**, *62*, 361-373.
- (180) Jones, E.; Oliphant, T.; Peterson, P. y col. SciPy: Open source scientific tools for Python., [Online; accessed [today]], 2001-.

- (181) Ebrahim, A.; Lerman, J. A.; Palsson, B. O. e Hyduke, D. R. *BMC Systems Biology* **2013**, *7*, 74.