

Preguntas y respuestas: Amigos (pero a veces enemigos) en el interior: la compleja ecología evolutiva de las simbiosis entre el huésped y los microbios

Resumen

Un avance notable en el estudio de las asociaciones entre huéspedes y microbios se produjo durante la última década, lo que llevó a reconocer que muchas de estas asociaciones son beneficiosas, y con frecuencia críticas, para una amplia gama de anfitriones. Aunque no está tan claro, los beneficios también serían notables para los microorganismos.

Se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de cómo la ecología y la evolución configuran asociaciones simples entre hospedadores y una o unas pocas especies microbianas, lo que puede servir como base para estudiar la ecología y evolución más complejas de las asociaciones hospedadoras con comunidades microbianas (microbiomas).

¿Qué es una simbiosis, un microbioma y un holobionte?

En términos generales, las simbiosis son asociaciones en las que un organismo (el simbiote) vive con otro (el hospedador) durante una fracción considerable de la vida del huésped. En el caso de las interacciones huésped-microbio, los simbioses microbianos se reproducen muchas veces durante una generación del huésped y persisten durante una fracción significativa de su vida. Según esta definición, la mayoría de los microbios asociados con enfermedades infecciosas no serían simbioses ya que se dividen replican y transmiten rápidamente a nuevos hospedadores y luego desaparecen. Algunos huéspedes están asociados con uno o unos pocos simbioses clave, mientras que en el resto de los casos la asociación es con una comunidad simbiótica. Estas comunidades, y los genes que contienen, se conocen como microbiomas.

El término simbiosis fue propuesto por Anton de Bary [1]. Más recientemente, Margulis y Fester [2] acuñaron el término "holobionte" que representa la suma del huésped y simbioses. A pesar de ser un término olvidado por un tiempo, hay un aumento reciente en la popularidad de este término [3, 4, 5], impulsado por el deseo de

Traducción y adaptación Pablo Adrián Otero

Este artículo es una traducción y adaptación del artículo: Q&A: Friends (but sometimes foes) within: the complex evolutionary ecology of symbioses between host and microbes. Autores: Nicole Gerardo y Gregory Hurst. Publicado en BMC Biology (2017) 15:126.

Figura de portada: Simbioses (Buchnera aphidicola) dentro de un bacteriocito de un áfido del guisante (Acyrtosiphon pisum). El objeto central (n) es el núcleo huésped, las células de Buchnera (b) son redondas y están empaquetadas en el citoplasma. (Foto: J. White y N. Moran, Universidad de Arizona) (Fuente: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050126.g001>).

Pablo A. Otero es biólogo (FCEN:UBA) y docente de biología.

reflejar la importancia de los microbios en la vida animal. Este término tiene un paralelo genético, el hologenoma, que representa la información genética compuesta del huésped y los simbioses [6, 7]. La utilidad de estos términos ha generado entre biólogos evolutivos, ecólogos, investigadores de simbiosis y microbiólogos un amplio debate y puntos de vista contrastantes [8, 9].

Cuando pienso en microbiomas, pienso en comunidades intestinales complejas y trasplantes fecales, ¿hay algo más que eso?

Si bien el proyecto de microbioma humano hizo hincapié en la compleja comunidad bacteriana dentro del intestino humano, que sabemos juega un papel importante en la digestión [10] y en la susceptibilidad a ciertas patologías [11], el proyecto también destacó la importancia de comunidades microbianas complejas en otros sitios del cuerpo humano [12, 13, 14], ya que estas también influyen en la salud y la enfermedad (por ejemplo [15]).

Aunque hay varios casos de ensamblajes microbianos diversos en otras especies hospedadoras, esto no es una regla universal. La ecología y la evolución de muchos organismos huésped están profundamente influenciadas por asociaciones con uno o unos pocos microbios dominantes. Por ejemplo, casi todos los áfidos, pequeños insectos que se alimentan de plantas, se asocian con la bacteria *Buchnera aphidicola*, que sintetiza los aminoácidos que los áfidos no obtienen de su dieta [16, 17] (Figura de portada).

Estas bacterias no se encuentran en el intestino sino en células específicamente adaptadas que albergan grandes cantidades de ellas. De la misma manera, muchas especies de plantas leguminosas poseen nódulos en sus raíces que albergan una o pocas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno. Estas bacterias influyen notablemente en el crecimiento de las plantas, particularmente en suelos pobres en nitrógeno [18, 19].

¿Por qué despiertan tanto entusiasmo las asociaciones de hospedadores y microbios?

El fenotipo es crítico para el estudio de la biología de un organismo. A los biólogos nos interesa medir diferentes rasgos en los organismos, y luego entender las causas próximas (mecanicistas) y últimas (evolutivas) que producen esos fenotipos. Estudiamos el fenotipo para conocer cómo los organismos interactúan con el mundo que los rodea y para comprender mejor las enfermedades (y cómo tratarlas). Además estudiamos el componente hereditario de la variación fenotípica a nivel de la población porque es la base de la evolución.

La investigación en una gran variedad de sistemas indica que muchos fenotipos no son simplemente el resultado de sus genomas, sino que están influenciados por las asociaciones con microbios. Fundamentalmente las interacciones con microbios dan forma a toda la vida en la tierra, y la variación fenotípica natural de los organismos multicelulares (y, de hecho, muchos de células unicelulares) está asociada con la presencia de microbios particulares o de una la comunidad microbiana. Experimentalmente, el fenotipo se modifica cuando los organismos se crían axénicamente (por ejemplo, [20, 21]), y en algunos casos, eliminar un microorganismo hace que no se desarrollen o produzcan descendientes viables [22]. Comprender los impactos en el fenotipo de la simbiosis en la función del ecosistema, la seguridad alimentaria y la salud humana ofrece oportunidades para mejorar el bienestar.

En la naturaleza la variación en los fenotipos del huésped puede ser impulsada por los microbios de muchas maneras. En algunos casos se debe a la presencia/ausencia de un determinado microbio (o su genotipo), y en comunidades microbianas más complejas, es importante la variedad y abundancia relativa de las diferentes especies de la comunidad [23]. Además, puede ser importante la abundancia absoluta de microbios. Desde hace tiempo es conocido el impacto de la abundancia de microbios en el fenotipo en estudios de interacciones binarias entre insectos y simbioses hereditarios (por ejemplo [24, 25]), y ahora se considera cada vez más importante en las comunidades polimicrobianas [26, 27]. Las causas y dinámicas próximas de todos estos niveles de variación requieren una explicación y comprender sus motivos podría facilitar la manipulación de la comunidad con fines terapéuticos (por ejemplo, [11, 28]).

Los simbioses son buenos chicos, ¿verdad?

En términos generales, los simbioses son microbios que forman asociaciones a largo plazo con sus anfitriones; por lo que persisten durante una fracción significativa de la vida del huésped y se reproducen muchas veces dentro de una generación de este. La asociación a largo plazo contrasta con muchos otros patógenos, que llegan, se replican y se eliminan (o matan a su huésped). Sin embargo, esto no significa que los patógenos sean malos y los simbioses sean buenos. Algunas bacterias pueden ser persistentes y perjudiciales, como es el caso de la infección por *Clostridium difficile* [29]. Del mismo modo, *Wolbachia pipientis* (Figura 1), una bacteria que se encuentra en una amplia gama de especies de insectos, se transmite solo por las hembras y muestra fenotipos deletéreos según el sexo, por ejemplo, mata los embriones masculinos producidos por madres infectadas. En este último caso, no hay efectos en las hembras, pero llevar el microbio puede ser costoso [30].

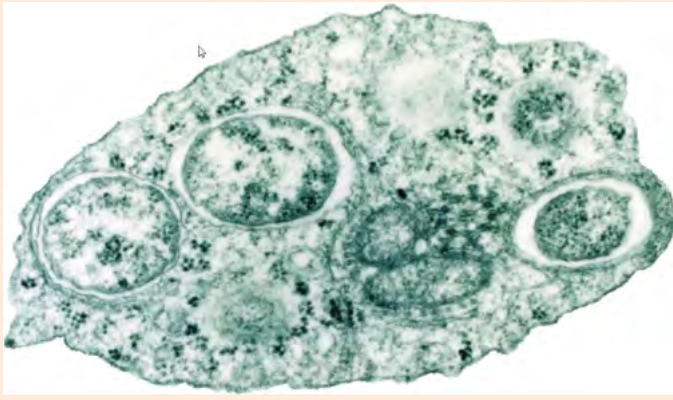


Figura 1: Micrografía electrónica de transmisión de Wolbachia dentro de una célula de insecto (Imagen cortesía de Scott O'Neill).
(Fuente: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020076.g001>).

Si los microbios solos (o sus comunidades) son beneficiosos o costosos a menudo depende del contexto ecológico de la asociación. Por ejemplo, muchos simbioses de animales y vegetales, desde hongos que crecen dentro de las hojas de las plantas [31, 32] hasta bacterias presentes en insectos [33], protegen a sus huéspedes de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, en presencia del agente de la enfermedad, la asociación con el microbio es beneficiosa. Sin embargo, en ausencia del agente patógeno, los recursos que consume el simbiote pueden suponer costos sustanciales para el huésped, de modo que el simbiote puede disminuir en frecuencia en la población [34]. De hecho, cuando los beneficios dependen del contexto, un hospedador puede intentar reducir el número de simbioses para minimizar los costos. En las leguminosas, por ejemplo, a los nódulos de la raíz con bacterias que no fijan el nitrógeno se les suministran menos recursos, lo que lleva a una reducción en la cantidad de simbioses [35] (Figura 2).

A menudo es un desafío determinar si un simbiote proporciona beneficios o tiene costos asociados. A menudo los beneficios en el valor adaptativo para los anfitriones se determinan comparando su supervivencia y reproducción cuando tienen y no tienen asociación con un microbio de interés en particular. Esto es fácil en sistemas en los que se puede eliminar un solo microbio sin perturbar al resto de la comunidad microbiana (por ejemplo, [36]). Sin embargo, sigue siendo un desafío cuando la eliminación de un microbio está inevitablemente unida a la perturbación de toda la comunidad microbiana. Además, el uso de antibióticos puede tener efectos no específicos que pueden aparentar un beneficio en la presencia del microbio. La tetraciclina, por ejemplo, afecta la función mitocondrial eucariota, de modo que los individuos tratados sufren un perjuicio fisiológico directo [37]. Además, la adaptación de un huésped a la presencia de un microbio puede llevar a que se reduzca el valor adaptativo al eliminarlo, independientemente de si ese microbio contribuyó de manera ancestral al hospedador [38].

Entonces, ¿qué determina qué especies de microorganismos se asocian a un individuo?

Los simbioses microbianos asociados a un individuo son producto de tres procesos: adquisición inicial, replicación en el huésped y pérdida por mortalidad o transmisión. Los mecanismos subyacentes a estos procesos varían dramáticamente entre las especies. En algunos huéspedes, como los humanos, los microbios se adquieren durante el nacimiento y durante toda la vida. Por lo tanto, la reserva microbiana ambiental con la que se hace contacto es uno de los impulsores de los microbios que se transporta. La proximidad de los familiares hace que la transmisión de simbioses entre miembros de la familia sea un evento relativamente común, y esto puede ser mayor aún en el caso de una madre y su descendencia [39]. Sin embargo, eso no significa que los microbiomas sean conjuntos aleatorios de especies derivados de esta red de contactos. La variación genética del huésped, las respuestas inmunitarias, las preferencias dietéticas y la comunidad microbiana que ya forman parte de un huésped conforman lo que se mantiene y se elimina [40, 41]. La composición de la comunidad también puede cambiar a lo largo de la vida, por ejemplo, como ocurre después del destete en mamíferos [42, 43].

La presencia de factores microbianos y del hospedador que estructuran el ensamblaje de los microbiomas se hace evidente en el fenómeno de filosisimiosis: la tendencia en las especies hospedadoras más relacionadas evolutivamente a tener ensamblajes microbianos más similares [44]. Este patrón se ha observado en múltiples grupos de animales, desde Hydra hasta mamíferos [45, 46]. Además, la variación de la composición de la comunidad microbiana tiene una heredabilidad dentro de las especies, aunque esto explica solo una minoría de la variación interindividual en la composición [47].

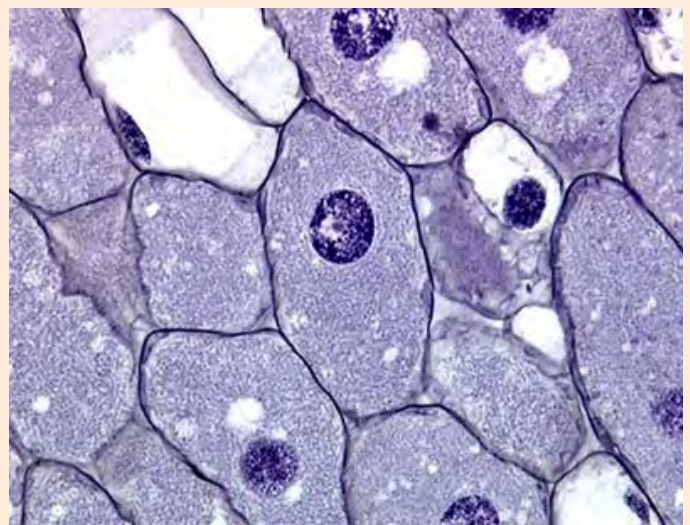


Figura 2: Células de raíz invadidas por bacterias Rhizobium que tienen una longitud de 1 a 2 μm y un diámetro de 0.1 μm (x40). Foto: M. Halit Umar. (Fuente: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html>).

En otros sistemas, las relaciones se ajustan aún más mediante mecanismos específicos de transmisión de microbios de la madre a la descendencia. En los insectos, por ejemplo, los microbios comúnmente pasan de la hembra a su progenie. Este mecanismo de transmisión vertical puede ser configurado por los rasgos del huésped para asegurar la transmisión de simbioses beneficiosos a huevos o embriones (por ejemplo [48]). Alternativamente, las madres pueden impregnar de simbioses la superficie de los huevos o depositarlos cerca de los huevos para que las crías los consuman a una edad temprana [49, 50]. De hecho, algunas especies exhiben comportamientos especializados para buscar estos simbioses tan pronto como nacen [51]. Recíprocamente, algunos microbios han desarrollado la capacidad de infectar los huevos del huésped y transmitirlos verticalmente. *Wolbachia* en *Drosophila*, por ejemplo, tiene la capacidad de invadir las células madre que generan la línea germinal y el soma de los huevos de insectos [52].

¿Por qué las partes evolucionan para estar en simbiosis?

Podemos imaginar varias vías evolutivas, mutuamente no excluyentes, hacia las simbiosis. El microbio podría evolucionar de ser de vida libre a esta asociado a un huésped, o podría evolucionar de ser patogénico a ser simbiote. Además, el huésped podría evolucionar para nutrir un microbio o microbios particulares en su propio beneficio.

Existe una fuerza de selección para mejorar la simbiosis en el caso que el valor adaptativo relativa de las partes en la simbiosis sea mayor que fuera de la simbiosis. Por ejemplo, si un microbio tiene un valor adaptativo mayor en simbiosis que libre en el ambiente, la selección generalmente actuará para promover la fase simbiótica. La selección para ingresar a la simbiosis puede aumentar cuando existen compensaciones en el valor adaptativo en simbiosis en comparación con fuera de ella. Existen buenas evidencias de la presencia de estas ventajas y desventajas: las cepas de *Vibrio fischeri* que se comportan bien en simbiosis con calamares tienen menor aptitud ambiental que las cepas que están menos adaptadas a la simbiosis pero mejor adaptadas a la fase ambiental [53]. Lo equivalente para un hospedador es una mayor aptitud en simbiosis lo que seleccionaría la adquisición y el mantenimiento de los simbioses, seguida de una adaptación a la presencia de simbioses que aumentaría la diferencia de aptitud relativa entre los anfitriones con y sin simbioses.

Los procesos de evolución y adaptación del simbiote y del hospedador están enlazados: la evolución de un hospedador para explotar a un simbiote puede ir seguida de la evolución del simbiote para asociarse con el hospedador a medida que pierde su fase ambiental, y la evolución de un microbio para ser simbiótico

puede ser seguida por la evolución del huésped para mantener la simbiosis [54].

¿Qué condiciones favorecen la evolución del mutualismo?

El mutualismo se define como una interacción en la que ambas partes se benefician de la asociación. Muchas simbiosis que tienen beneficios para los anfitriones (al menos en algunos contextos ecológicos) se presume que son mutualismos. Sin embargo, las simbiosis pueden ser explotadoras: una parte se beneficia de la otra sin que la otra parte se beneficie a cambio [55]. De hecho, comúnmente tenemos poca comprensión cuantitativa de los beneficios o costos de las simbiosis para en el caso de los microbios [56].

Se presume que muchos microbios simbióticos incrementan su valor adaptativo a través de la transmisión vertical de una generación de hospedadores a la siguiente, asegurando así la presencia en el futuro. Además, se presume que la competencia entre microorganismos es menor dentro del huésped en comparación con la guerra microbiana que implica la mayoría de los entornos externos. Sin embargo, no sabemos si el antepasado del simbiote, ahora asociado con el hospedante, tuvo una reproducción aún mayor, porque rara vez conocemos los detalles sobre el valor adaptativo de los microbios u hospedadores en la etapa inicial de la evolución de estas asociaciones [56, 57].

Lo que sí sabemos es que hay una variedad de circunstancias en las cuales es más probable que las partes evolucionen hacia el mutualismo. La condición más propicia para impulsar las simbiosis hacia el mutualismo es cuando el simbiote se transmite verticalmente, pasando de padres a hijos. Aquí, el valor adaptativo del simbiote está más estrechamente vinculado a la supervivencia y la reproducción del huésped, lo que lleva a la selección para mejorar el valor adaptativo del huésped [58]. Como la selección en el simbiote actúa y mejora la condición física del anfitrión, este es seleccionado para nutrirlo. Sin embargo, incluso en estas asociaciones, los intereses del valor adaptativo pueden no estar completamente alineados, y los microbios y los anfitriones pueden explotarse entre sí (lo suficiente) para maximizar su propia aptitud física [30, 59].

Sin embargo, el mutualismo puede evolucionar sin transmisión vertical mientras las partes interactúen comúnmente. La elección del socio, donde una parte reconoce a la otra para formar una interacción, permite además la evolución al mutualismo, lo que permite la coevolución [60, 61]. Por ejemplo, la simbiosis calamar-*Vibrio* es una en la que la interacción del huésped y el microbio se reforma en cada generación a través de procesos de colonización específicos, y donde coinciden los intereses de valor adaptativo del calamar y *Vibrio*, al menos probablemente con respecto a la supervivencia del huésped [62].

A veces las cosas evolucionan para ser co-dependientes: fusiones simbióticas.

¿Por qué ocurre esto?

Las vidas de los microbios y sus anfitriones pueden llegar a estar altamente entrelazadas. La adaptación de una parte a la otra puede resultar en dependencia, un requisito obligatorio para la otra parte. Por ejemplo, la evolución del desarrollo de un anfitrión puede darse dentro del contexto de la simbiosis. En ese caso la pérdida del simbionte conduce entonces al fracaso para desarrollarse o prosperar. Uno ejemplo de esto se registró en las plantas de *Psychotria*, que no se desarrollaron cuando las semillas se lavaron para eliminar las bacterias (obra de Miede y von Faber, citada en [63]) (Figura 3). Ahora se sabe que la ausencia de bacterias *Burkholderia* simbióticas, que en las plantas adultas forman nódulos de las hojas y se transmiten a las semillas, es la causa de este fallo de desarrollo [64, 65]. Sorprendentemente, la dependencia puede evolucionar rápidamente, como se ha observado durante los estudios de laboratorio de las interacciones ameba-microbio [66].

Lo anterior ocurre igualmente en los microorganismos simbiotes. La reducción del genoma del microorganismo simbionte (en comparación con el ancestro de vida libre) se produce rápidamente después de la evolución de la simbiosis intracelular [67]. La pérdida de genes puede asociarse con la selección para la pérdida de vías metabólicas provistas por los huéspedes [68, 69], o por la acumulación de mutaciones perjudiciales asociadas con el tamaño restringido de la población y la ausencia de oportunidades para la recombinación [70]. La pérdida de vías metabólicas crea una trayectoria evolutiva en la que los simbiotes se asocian de forma obligatoria con el huésped.

¿La dependencia los hace más resilientes o hay consecuencias negativas?

Las relaciones de dependencia pueden ser de larga duración, como es el caso de las mitocondrias en los eucariotas y los cloroplastos en las plantas. Sin embargo, no está claro si las fusiones simbióticas necesariamente crean linajes más persistentes. La dependencia de un anfitrión de un simbionte puede reducir su capacidad de recuperación, ya que se ve afectado, no solo por los factores que lo afectan a él mismo, sino también por aquellos que afectan a su simbionte. Además, los simbiotes dependientes a menudo se convierten en un eslabón débil debido a la degradación del genoma. *Buchnera*, la bacteria de la que dependen los áfidos, por ejemplo, tiene muchas proteínas que funcionan mal como resultado de la acumulación de mutaciones [70, 71]. Las altas temperaturas desestabilizan las proteínas de *Buchnera*, haciendo que el simbionte requerido sea el "punto débil" bajo el estrés térmico [72].

Las cosas se complican más cuando hay más de un simbionte involucrado. Los modelos de comunidades polimicrobianas indican que las fuertes interacciones mutualistas/dependientes entre los microbios desestabilizan la composición del microbioma. Esto se debe a que la pérdida de uno o de un par de microbios mutualistas hace que el otro sea propenso a la pérdida. De hecho, se predice que la mayor estabilidad microbiana se da en un escenario de competencia entre cepas de microbios en lugar de en el mutualismo [73].

¿Cuáles son las preguntas más apremiantes en el estudio de la ecología evolutiva de las interacciones huésped-simbionte?

Nuestra comprensión de la ecología evolutiva de las interacciones binarias (es decir, entre un huésped y un simbionte particular) está bien desarrollada en comparación con el ensamblado y evolución de comunidades polimicrobianas complejas. Se reconoce que un enfoque 'de abajo hacia arriba', donde los modelos se construyen a partir de la funcionalidad para predecir las dinámicas de la comunidad, será particularmente útil para predecir la dinámica y evolución de los microbiomas [74, 75]. Sin embargo, la complejidad inherente a estos modelos y la falta de valores fundados para muchos de los parámetros han limitado hasta la fecha la utilidad de este enfoque. En cambio, se ha desarrollado un marco más pragmático que ha pronosticado dinámicas de la comunidad a partir de asociaciones estadísticas observadas: ¿qué taxones tienen abundancias asociadas de manera positiva/negativa?; ¿cómo varía la abundancia con la dieta [76, 77]? Un inconveniente de estos modelos es que tienen una base conceptual más débil y, como resultado, pueden predecir mal la respuesta a eventos no caracterizados.

En ausencia de una sólida base teórica predictiva, ¿podemos abordar empíricamente los impactos y la dinámica de los microbiomas? En términos de fenotipo, existe un conocimiento funcional cada vez mayor de microbios particulares: los recursos que utilizan y los metabolitos que secretan [78]. También está aumentando nuestra comprensión de las variantes genéticas del huésped asociadas con la variación de microbiomas [79]. Sin embargo, los flujos causales que unen el microbioma con el fenotipo del huésped a veces son esquivos. Mucho se basa todavía en la asociación de la constitución de los microbiomas con el fenotipo y, como ocurre con todas las asociaciones estadísticas, tienen tres posibles flujos causales: el microbioma conduce al fenotipo, el fenotipo conduce a los microbiomas, o ambos son producidos por otros agentes externos. Las pruebas experimentales de causalidad son difíciles; sin embargo, los experimentos de manipulación, en los que se mide el impacto de los trasplantes de comunidades microbianas, han permitido la inferencia causal [80].

Si bien se está avanzando para definir el impacto de los microbiomas en los fenotipos, muchos parámetros centrales siguen estando mal descritos. Por ejemplo, la teoría evolutiva nos dice que la tendencia hacia las interacciones beneficiosas y la asociación aumentan con la asociación prolongada y también depende de las vías de transmisión. Ambos parámetros son comúnmente poco conocidos. Con respecto a la duración de la asociación, generalmente no sabemos cuánto tiempo se retiene un linaje simbiote particular (en lugar de los simbiotes dentro de un grupo de especies) en un individuo huésped. Como corolario, sabemos que la rotación se produce dentro de los microbiomas, pero no tanto sobre la importancia relativa de los factores que pueden impulsar este cambio. ¿Se trata de un cambio externo, como la dieta o los patógenos, o es una forma de sucesión y rotación impulsada internamente? El segundo parámetro

clave, la transmisión, también es comúnmente poco conocido. Si la transmisión se produce a la progenie, los parientes, los miembros de la misma especie o los heteroespecíficos son de importancia clave para determinar la dinámica evolutiva. Además, si la transmisión se produce directamente o después de la replicación en el ambiente es importante para determinar la importancia del estado simbiótico en el valor adaptativo del microbio. A pesar de la importancia del proceso de transmisión para determinar las trayectorias evolutivas, no tenemos una comprensión clara de la transmisión en la mayoría de los sistemas con comunidades complejas [81]. Descubrir el ensamble y la dinámica de los microbiomas dentro de los individuos sigue siendo un gran desafío evolutivo, y será crítico a medida que avancemos para comprender su importancia en la configuración del fenotipo del huésped y la evolución del huésped.

Referencias Bibliográficas

Nota: la bibliografía de la sección «Traducciones» es citada y reproducida tal cual figura en el artículo original.

1. de Bary A. Die Erscheinung der symbiose. Strasbourg: R J Trubner; 1879.
2. Margulis L, Fester R. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. Cambridge: MIT press; 1991.
3. Bordenstein SR, Theis KR. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* 2015;13(8):e1002226.
4. Bosch TCG, Miller DJ. The Holobiont Imperative. Vienna: Springer-Verlag; 2016.
5. Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, et al. Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems.* 2016;1(2):e00028–16.
6. Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *Fems Microbiol Rev.* 2008;32(5):723–35.
7. Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. *mBio.* 2016;7(2):e01395–15.
8. Moran NA, Sloan DB. The hologenome concept: helpful or hollow? *PLoS Biol.* 2015;13(12):e1002311.
9. Douglas AE, Werren JH. Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *mBio.* 2016;7(2):e02099.
10. Larsbrink J, Rogers TE, Hemsworth GR, McKee LS, Tauzin AS, Spadiut O, et al. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature.* 2014;506(7489):498–502.
11. Fuentes S, van Nood E, Tims S, Heikamp-de Jong I, ter Braak CJ, Keller JJ, et al. Reset of a critically disturbed microbial ecosystem: faecal transplant in recurrent *Clostridium difficile* infection. *ISME J.* 2014;8(8):1621–33.
12. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 2009;324(5931):1190–2.
13. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4680–7.
14. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *Journal of bacteriology.* 2010;192(19):5002–17.
15. Leitich H, Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Practice Res Clin Obstetrics Gynaecol.* 2007;21(3):375–90.
16. Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp APS. *Nature.* 2000;407:81–6.
17. Wilson ACC, Ashton PD, Calevo F, Charles H, Colella S, Febvay G, et al. Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol Biol.* 2010;19:249–58.
18. Burdon JJ, Gibson AH, Searle SD, Woods MJ, Brockwell J. Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian *Acacia*: within-species interactions. *J Appl Ecol.* 1999;36(3):398–408.
19. Zahran HH. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(4):968–89. table of contents.
20. Ridley E, Wong A, Westmiller S, Douglas A, Ridley EV, Wong AC, Westmiller S, Douglas AE. Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 2012;7:e36765.
21. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15451–5.
22. Douglas AE. Requirement of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) for their symbiotic bacteria. *Ent Exp Appl.* 1992;65:195–8.
23. Hurst GDD. Extended genomes: symbiosis and evolution. *Interface Focus.* 2017;7(5):20170001.
24. Hurst GDD, Johnson AP, von der Schulenburg JHG, Fuyama Y. Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics.* 2000;156(2):699–709.
25. Chrostek E, Marialva MSP, Esteves SS, Weinert LA, Martinez J, Jiggins FM, et al. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003896.
26. Sanders J, Łukasik P, Frederickson M, Russell J, Koga R, Knight R, et al. Dramatic differences in gut bacterial densities correlate with diet and habitat in rainforest ants. *Integrative Comparative Biol.* 2017;icx088:1–18.
27. Hammer TJ, Janzen DH, Hallwachs W, Jaffe SP, Fierer N. Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(36):9641–6.
28. Panigrahi P, Parida S, Nanda NC, Satpathy R, Pradhan L, Chandel DS, et al. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature.* 2017;548(7668):407–12.

29. Barbut F, Richard A, Hamadi K, Chomette V, Burghoffer B, Petit J-C. Epidemiology of recurrences or reinfections of clostridium difficile-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2386-8.
30. Hurst GDD, Frost CL. Reproductive parasitism: maternally inherited symbionts in a biparental world. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(5):a017699.
31. Clay K. Fungal endophytes of grasses. *Annu Rev Ecol Systemat*. 1990;21:275-97.
32. Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15649-54.
33. Oliver KM, Smith AH, Russell JA. Defensive symbiosis in the real world - advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Functional Ecol*. 2014;28:341-55.
34. Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2008;275(1632):293-9.
35. Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature*. 2003;425(6953):78-81.
36. Fukatsu T, Hosokawa T. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(1):389-96.
37. Ballard JW, Melvin RG. Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. *Insect Mol Biol*. 2007;16(6):799-802.
38. Douglas AE, Smith DC. Are endosymbioses mutualistic? *Trends Ecol Evol*. 1989;4:350-2.
39. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013;11(8):e1001631.
40. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559-63.
41. van Opstal EJ, Bordenstein SR. Rethinking heritability of the microbiome. *Science*. 2015;349(6253):1172-3.
42. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(7):e177.
43. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med*. 2016;8(343):343ra82.
44. Brucker RM, Bordenstein SR. The roles of host evolutionary relationships (genus: Nasonia) and development in structuring microbial communities. *Evolution*. 2012;66(2):349-62.
45. Brooks AW, Kohl KD, Brucker RM, van Opstal EJ, Bordenstein SR. Phyllosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS Biol*. 2016;14(11):e2000225.
46. Moeller AH, Caro-Quintero A, Mjungu D, Georgiev AV, Lonsdorf EV, Muller MN, et al. Cospeciation of gut microbiota with hominids. *Science*. 2016;353(6297):380-2.
47. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhan R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014;159(4):789-99.
48. Koga R, Meng X-Y, Tsuchida T, Fukatsu T. Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte-embryo interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):E1230-E7.
49. Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol*. 2006;4:1841-51.
50. Salem H, Florez L, Gerardo N, Kaltenpoth M. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2015;282(1804):20142957.
51. Nalepa CA. Origin of termite eusociality: trophallaxis integrates the social, nutritional, and microbial environments. *Ecol Entomol*. 2015;40(4):323-35.
52. Frydman HM, Li JM, Robson DN, Wieschaus E. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature*. 2006;441(7092):509-12.
53. Wollenberg MS, Ruby EG. Phylogeny and fitness of *Vibrio fischeri* from the light organs of *Euprymna scolopes* in two Oahu, Hawaii populations. *ISME J*. 2012;6(2):352-62.
54. Law R, Dieckmann U. Symbiosis through exploitation and the merger of lineages in evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1998;265(1402):1245.
55. Lowe CD, Minter EJ, Cameron DD, Brockhurst MA. Shining a light on exploitative host control in a photosynthetic endosymbiosis. *Curr Biol*. 2016;26(2):207-11.
56. Garcia JR, Gerardo NM. The symbiont side of symbiosis: do microbes really benefit? *Front Microbiol*. 2014;5:510.
57. Hoang KL, Morran LT, Gerardo NM. Experimental evolution as an underutilized tool for studying beneficial animal-microbe interactions. *Front Microbiol*. 2016;7:1444.
58. Ewald PW. Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;503:295-306.
59. Chong RA, Moran NA. Intraspecific genetic variation in hosts affects regulation of obligate heritable symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(46):13114-9.
60. Sachs JL, Skophammer RG, Regus JU. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 2:10800-7.
61. Sachs JL, Mueller UG, Wilcox TP, Bull JJ. The evolution of cooperation. *Quarterly Rev Biol*. 2004;79(2):135-60.
62. McFall-Ngai M. Divining the essence of symbiosis: insights from the squid-Vibrio model. *PLoS Biol*. 2014;12(2):e1001783.
63. Cowles HC. Hereditary symbiosis. *Bot Gazette*. 1915;59(1):61-3.
64. Van Oevelen S, De Wachter R, Vandamme P, Robbrecht E, Prinsen E. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (Rubiaceae, angiosperms) and proposal of '*Candidatus Burkholderia kirkii*' sp. nov. *Int J Systematic Evol Microbiol*. 2002;52(6):2023-7.
65. Van Oevelen S, De Wachter R, Robbrecht E, Prinsen E. Induction of a crippled phenotype in *Psychotria* (Rubiaceae) upon loss of the bacterial endophyte. *Bulg J Plant Physiol, Special Issue*. 2003;2003:242-7.
66. Jeon KW. Development of cellular dependence on infective organisms - microsurgical studies in amoebas. *Science*. 1972;176(4039):1122.
67. Boscaro V, Kolisko M, Felletti M, Vannini C, Lynn DH, Keeling PJ. Parallel genome reduction in symbionts descended from closely related free-living bacteria. *Nat Ecol Evol*. 2017;1(8):1160-7.
68. Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER. The Black Queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *mBio*. 2012;3(2):e00036-12.
69. Husnik F, Nikoh N, Koga R, Ross L, Duncan RP, Fujie M, et al. Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*. 2013;153(7):1567-78.
70. Moran NA. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):2873-8.
71. van Ham RCHJ, Kamerbeek J, Palacios C, Rausell C, Abascal F, Bastolla U, et al. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(2):581-6.
72. Dunbar HE, Wilson ACC, Ferguson NR, Moran NA. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol*. 2007;5(5):1006-15.
73. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science*. 2015;350(6261):663-6.
74. Karlsson FH, Nookaew I, Petranovic D, Nielsen J. Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome. *Trends Biotechnol*. 2016;34(6):251-8.
75. Bucci V, Xavier JB. Towards predictive models of the human gut microbiome. *J Mol Biol*. 2014;426(23):3907-16.
76. Marino S, Baxter NT, Huffnagle GB, Petrosino JF, Schloss PD. Mathematical modeling of primary succession of murine intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):439-44.
77. Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon JI. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*. 2011;333(6038):101-4.
78. Manor O, Levy R, Borenstein E. Mapping the inner workings of the microbiome: genomic- and metagenomic-based study of metabolism and metabolic interactions in the human microbiome. *Cell Metabolism*. 2014;20(5):742-52.
79. Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, Mujagic Z, Imhann F, Vila AV, et al. The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet*. 2016;48(11):1407-12.
80. Kohl KD, Weiss RB, Cox J, Dale C, Dearing MD. Gut microbes of mammalian herbivores facilitate intake of plant toxins. *Ecol Lett*. 2014;17(10):1238-46.
81. Browne HP, Neville BA, Forster SC, Lawley TD. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nat Rev Micro*. 2017;15(9):531-43.