

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/53055

IB/ 81898

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

RICARDO AUGUSTO TIBURCIO



RIQUEZA E VARIABILIDADE DA FLORA BACTERIANA DE *TOMOPLAGIA MINUTA* (DIPTERA, TEPHRITIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ricardo Augusto
Tiburcio
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Vera Nisaka Solferini

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

ORIENTADORA: PROFA. DRA VERA NISAKA SOLFERINI
CO-ORIENTADOR: PROF DR. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

UNIDADE 11 | 81898
Nº CHAMADA UNICAMP
T434r
V EX
TOMBO BC/ 53055
PROC 16 124/03
C D x
PREÇO 1715
DATA 08/04/03
Nº CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

TIBURCIO, RICARDO AUGUSTO

T434r

Riqueza e variabilidade da flora bacteriana de *Tomoplagia minuta* (Diptera, Tephritidae)/ Ricardo Augusto Tiburcio. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Vera Nisaka Solferini

Co-orientador: Wanderley Dias da Silveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia

1.Bacterias. 2.Diversidade biológica. 3. Dipteros.

I. Solferini, Vera Nisaka. II. Silveira, Wanderley Dias da.

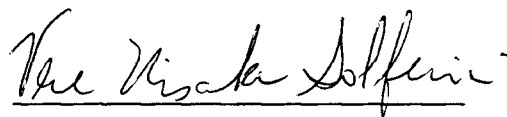
III.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

IV. Título.

Campinas, 04 de dezembro de 2002

Banca Examinadora

Profa Dra, Vera Nisaka Solferini
(Orientadora)



Prof Dr. Sérgio Russo Matioli



Prof Dr. Thomas Michael Lewinsohn



Prof Dr. Gilson Paulo Manfio



Dedico este trabalho a meus pais que sempre me apoiaram em meu desejo de ser cientista.

Agradecimentos

Agradeço...

À Vera, minha orientadora, pelo apoio, dedicação e competência colocados a minha disposição, que tanto me ajudaram a concretizar este trabalho.

Ao Wanderley, meu co-orientador, que ajudou a tornar possível este trabalho e ao pessoal de seu laboratório.

Aos demais professores do Depto. de Genética e Evolução que, de muitas formas, me ajudaram a concluir este trabalho e, principalmente, me mostraram como deve ser um verdadeiro profissional da ciência. E, especialmente, ao prof. Gonçalo A. Pereira, e a todo o pessoal de seu laboratório, por terem gentilmente permitido que eu compartilhasse de seus equipamentos e conhecimentos.

Aos membros da pré-banca, Profs. Sérgio Mاتيолли, Cláudio Messias e Valéria Maia, pela atenção dispensada a leitura e melhoria deste trabalho.

A todos os amigos deste laboratório (Veridiana, Juliana Farinacci, Flávia Fuchs, Sônia, Juliana Félix, Bruno, Karla, Aluana, Juliana José, Tereza, Teresa, Karine e Tiago Egger) e de fora dele (Horácio, Fernanda, Hermes, Adriano e muitos outros, tantos que não seria possível lembrar de todos aqui) que, ao longo destes anos, estiveram sempre presentes, não apenas com sugestões e auxílios sempre úteis (e freqüentemente salvadores), mas também com companheirismo, apoio e interesse. Sem vocês este não teria sido um tempo tão feliz!

Ao Herberth, ao Seu Pedro e a todos os demais servidores do Depto de Genética e Evolução, pelo apoio técnico oferecido durante este trabalho.

A Adriana, luz da minha vida.

... a todos vocês, e a todos os demais que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho, meu muito obrigado.

Agradeço a FAPESP pela bolsa e reserva técnica concedidas a este trabalho (Processo nº 99/05829-4)

Este trabalho faz parte do Programa BIOTA/FAPESP - O Instituto Virtual da Biodiversidade (www.biotasp.org.br).

ÍNDICE

• RESUMO	VII
• ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A IMPORTÂNCIA DAS COMUNIDADES DE MICROORGANISMOS SIMBIONTES NA HERBIVORIA	01
1.2. OS TEFRITÍDEOS E SEUS SIMBIONTES	04
1.3. OS MÉTODOS MOLECULARES NO ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS	11
1.4. OBJETIVOS	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. COLETAS	16
2.2. DISSECÇÃO E OBTENÇÃO DAS BACTÉRIAS	19
2.3. OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE rDNA 16S	20
2.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA	20
2.3.2. AMPLIFICAÇÃO	20
2.3.3. DGGE	22
2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	24
2.4.1. ANÁLISE DO PADRÃO DE BANDAS	24
2.4.2. RIQUEZA DE RIBOTIPOS DA MICROBIOTA DE <i>T. MINUTA</i>	24
2.4.3. VARIABILIDADE DE RIBOTIPOS ENTRE AS AMOSTRAS	26
2.4.3.1. ANÁLISE DE CLUSTER	27
2.4.3.2. NONMETRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING (MDS)	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. ANÁLISE DO PADRÃO DE BANDAS	29
3.2. RIQUEZA DE RIBOTIPOS DA MICROBIOTA DE <i>T. MINUTA</i>	36
3.3. VARIABILIDADE DE RIBOTIPOS ENTRE AS AMOSTRAS	42
3.3.1. ANÁLISES DE SIMILARIDADE	43
3.3.2. ANÁLISE DE CLUSTER	48
3.3.3. NONMETRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING (MDS)	51
3.3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
4. APÊNDICES	61
4.1. COLETAS	61
4.2. PROTOCOLOS	62
4.2.1. PROTOCOLO 1 - EXTRAÇÃO DE DNA	62
4.2.2. PROTOCOLO 2 - COMPOSIÇÃO E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR	63
4.2.3. PROTOCOLO 3 - DGGE	64
4.2.4. PROTOCOLO 4 - PURIFICAÇÃO DAS BANDAS OBTIDAS NO DGGE	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Resumo

As plantas são, de modo geral, um recurso alimentar de baixo valor nutricional, além de apresentarem uma série de defesas contra a herbivoria. Por estas razões, os animais que as utilizam como alimento precisam dispor de mecanismos que os auxiliem a superar estas limitações. Um destes mecanismos é a manutenção de associações simbióticas com microorganismos capazes de aproveitar de forma mais eficaz os nutrientes vegetais e contornar as defesas por eles apresentadas. De fato, a maioria dos herbívoros apresenta microbiotas simbiontes em seus aparelhos digestivos, sendo que um dos grupos que mais se destaca neste aspecto é o dos dípteros tefritídeos, cujas associações com bactérias são conhecidas há quase um século. Como a maioria das associações desta natureza, no entanto, as relações entre os tefritídeos, suas plantas hospedeiras e sua microbiota ainda não são completamente compreendidas. Entre os fatores que contribuem para esta deficiência se destaca o fato de que os métodos normalmente utilizados para estudos microbianos envolvem o cultivo do material coletado. Já foi demonstrado, no entanto, que apenas uma pequena fração das bactérias existentes pode ser cultivada com as técnicas disponíveis atualmente e, por isso, estudos que usem tais técnicas para caracterização de comunidades bacterianas serão necessariamente incompletos.

Com a finalidade de melhorar o entendimento sobre as relações entre os tefritídeos e seus simbiossiontes foi estudada a microbiota de *Tomoplagia minuta*, uma espécie endófaga de *Vernonanthura polianthes* (Asteraceae), composta comum em campos brasileiros. Para tentar avaliar o mais corretamente possível a riqueza desta comunidade microbiana um fragmento do gene do rDNA 16S foi amplificado com primers para o domínio Eubacteria, sem que se recorresse a uma etapa prévia de cultivo do material. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), capaz de separar fragmentos de um mesmo tamanho e seqüências diferentes. Com esta metodologia foram encontrados 24 fragmentos distintos nos géis, que correspondem a 24 ribotipos diferentes na microbiota de *T. minuta*. Este número é muito maior do que o encontrado em qualquer outro estudo sobre microbiotas de tefritídeos e comprova não apenas a grande riqueza destas comunidades, como também a necessidade de mudanças nas metodologias tradicionalmente empregadas nos estudos sobre elas. Descobriu-se ainda que a microbiota em questão parece ser razoavelmente uniforme em toda a espécie, apresentando, porém, maiores diferenças em relação a de *Cecidocharis* sp, uma outra espécie de tefritídeo que infesta *V. polianthes*.

Abstract

Plants are an alimentary resource of low nutritional value and present some defenses against herbivorous. Therefore, animals that use them as food sources must have mechanisms that help them to surpass these limitations. One of these mechanisms is the maintenance of symbiotic associations with microorganisms capable of using plant nutrients in a more efficient form and of skirting the defenses presented by them. In fact, the majority of the herbivorous presents bacterial symbiotic floras in their guts. Tephritidae (Diptera) is one of the most distinguished group in this aspect, with the first record of this association from the beginning of last century. As the majority of the interactions of this nature the relations between the tephritids, their plant hostesses and their bacterial microbiota are not still completely understood. Among the factors that contribute to this deficiency the methodologies normally used for microbial studies, that involve the culture of the material in study, can be detached. However, as only one small fraction of the existing bacteria can be cultivated with the available techniques, studies that use culture for characterization of bacterial communities will be incomplete.

To improve the understanding of the relations between the tephritids and their symbionts, the microbiota of *Tomoplagia minuta*, an endophagous species of *Vernonanthura polianthes* (Asteraceae), a

common head flower of Brazilian fields, was studied. To try to evaluate the wealth of this microbiota a fragment of the gene of rDNA 16S was amplified with universal primers for the domain eubacteria, without a previous stage of culture of the collected material. The PCR products were submitted to Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), capable of separating fragments of same size and different sequences. Twenty four distinct fragments were presents in the gels, that correspond to the twenty four different lineages in the bacterial microbiota of *Tomoplagia minuta*. This number is bigger than any one found in other studies on bacterial microbiota of tephritids, and not only proves the great richness of the microbiota of these insects, but also the necessity of changes in the traditionally used methodologies. The microbiota seems to be uniform in all the samples, still presenting some differences with the microbiota of *Cecidocharis sp*, another species of tephritid that also infests *V. polianthes*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DAS COMUNIDADES DE MICRORGANISMOS SIMBIONTES NA HERBIVORIA.

Embora formem a base de muitas cadeias alimentares, sendo assim a fonte primária de toda a matéria orgânica que flui por elas, as plantas são, de modo geral, um recurso alimentar de baixa qualidade (Jones, 1983). Os nutrientes fornecidos por elas em geral encontram-se desbalanceados (com carência ou excesso de um ou mais nutrientes em relação aos demais), conjugados com compostos tóxicos ou ainda presentes em formas não diretamente utilizáveis (como o carbono na celulose, por exemplo). Além disso, muitas plantas possuem defesas químicas e mecânicas de vários tipos contra a herbivoria. As químicas são em geral representadas pela produção de uma variedade de metabólitos secundários mais ou menos tóxicos aos herbívoros, enquanto as mecânicas podem ser, entre outras, a produção de cascas, espinhos e envoltórios rígidos em torno de ramos, sementes e frutos (que eventualmente podem contribuir para a dispersão destes últimos, ao permitir que transitem sem maiores danos pelo aparelho digestivo do animal). Por fim, as plantas são um recurso heterogêneo, apresentando variações temporais, espaciais e teciduais na disponibilidade e na produção tanto de nutrientes quanto de outras substâncias.

As limitações impostas pelas plantas ao seu uso como recurso alimentar impõem aos herbívoros a necessidade de possuírem mecanismos que lhes permitam contornar estas limitações. Estes mecanismos podem ser de natureza fisiológica (capacidade de metabolizar compostos secundários, por exemplo),

morfológica (desenvolvimento de órgãos como o papo e o rumem) e comportamental entre outras. Um dos tipos mais interessantes de mecanismo usado pelos animais, especialmente insetos, para lidar com essas dificuldades é o estabelecimento de relações simbióticas¹ com microrganismos. Em virtude do seu pequeno tamanho, das altas taxa de crescimento e reprodução, da tendência a ocorrerem em comunidades complexas e das suas capacidades metabólicas peculiares os microrganismos são capazes de realizar os seguintes processos (Jones, 1983):

1. concentrar nutrientes;
2. sintetizar nutrientes a partir de precursores simples;
3. converter componentes refratários ou nutricionalmente pobres em componentes úteis;
4. deconjugar complexos nutriente-nutriente e nutriente-não-nutriente;
5. detoxicar nutrientes;
6. operar em taxas metabólicas altas;
7. ocupar ambientes fisicamente pequenos em altas densidades;
8. adaptar-se fisiologicamente a mudanças na disponibilidade de recursos com maior rapidez do que os próprios insetos por meio de mudanças na densidade populacional ou alterações metabólicas;
9. adaptar-se evolutivamente às mudanças em longo prazo na disponibilidade de recursos com maior rapidez do que os próprios insetos.

¹ Neste trabalho o conceito de simbiose foi usado para se referir apenas à situação na qual dois ou mais organismos vivam em ligação física e fisiológica constante, sem qualquer implicação quanto ao significado ecológico desta ligação para os organismos envolvidos.

Assim, os microrganismos podem atuar em conjunto com os herbívoros na exploração dos seus recursos alimentares e, de fato, relações simbióticas são atualmente conhecidas em praticamente todas as ordens de insetos (Jones, 1993), bem como em muitos outros grupos de invertebrados. Estas relações, que envolvem bactérias, fungos e protozoários, podem variar desde o mutualismo estrito, no qual as espécies envolvidas não podem sobreviver separadamente, até o comensalismo, com o simbiote se aproveitando do material ingerido que não é utilizado pelo inseto (Douglas, 1998; Amann *et al.*, 1995; Cazemier *et al.*, 1997).

Estudos sobre o assunto têm contribuído para a descoberta de muitas espécies novas de microrganismos e, não por acaso, Amann *et al.* (1995) concluiu que o estudo detalhado das espécies de bactérias simbiotes de insetos pode elevar o número de espécies bacterianas conhecidas em várias ordens de magnitude. Infelizmente, e apesar dos estudos que vêm sendo feitos sobre o assunto, o papel da maioria das relações simbióticas entre insetos e microrganismos, bem como a exata composição das comunidades de microrganismos envolvidas, permanecem obscuros para a maioria dos casos conhecidos.

Dos muitos grupos de insetos que apresentam simbioses ainda não inteiramente compreendidas um dos mais interessantes é o dos tefritídeos (Diptera, Tephritidae). Estes insetos e suas microbiotas intestinais serão abordados na próxima seção, onde será feito um apanhado geral do estado de conhecimento sobre a composição e o papel destas, deixando evidente o quanto o assunto ainda permanece obscuro mesmo após décadas de pesquisa. Na última

seção serão abordadas metodologias moleculares recentemente introduzidas no estudo de comunidades microbiológicas que ampliaram em muito o conhecimento sobre elas e que, certamente, poderão fazer o mesmo para comunidades de microorganismos simbiotes como as apresentadas pelos tefritídeos.

1.2 OS TEFRITÍDEOS E SEUS SIMBIOTES

Os tefritídeos são dípteros de tamanho médio a pequeno, coloração corporal escura com bandas claras e asas manchadas (Borror *et al.*, 1989). Constituem uma das maiores famílias desta ordem, com aproximadamente 500 gêneros e 4200 espécies, a grande maioria delas endófaga. A família está dividida nas sub-famílias Dacinae, Trypetinae e Tephritinae, sendo que os membros das duas primeiras infestam predominantemente frutos, enquanto os da terceira utilizam as partes vegetativas e capítulos de asteráceas, além de flores de algumas outras famílias, eventualmente formando galhas. Os tefritídeos aparecem em todos os continentes, principalmente nas áreas temperadas e tropicais, onde se supõem que tenha surgido (Bateman, 1972). Evidências fósseis e biogeográficas sugerem que os gêneros mais antigos estão nas sub-famílias Dacinae e Trypetinae, sendo Tephritinae um grupo mais recente (Headrick & Goedem, 1998).

As fêmeas dos tefritídeos dispõem de um ovipositor longo e extensível, utilizado para depositar os ovos no interior do tecido vegetal. Após a eclosão, as larvas passam por três estádios de desenvolvimento. Nas espécies que infestam asteráceas, as larvas empupam no próprio capítulo e os adultos emergem cerca de quatro semanas após a oviposição. No caso das espécies endófagas de frutas

as larvas em geral empupam no solo, após deixarem o fruto. A duração da vida dos adultos varia de menos de um mês até cerca de um ano (White & Elson-Harris, 1992; Borror *et al.*, 1989).

Petri (1909), estudando *Dacus oleae* (um tefritídeo que infesta azeitonas), descobriu no aparelho digestivo deste inseto a ocorrência de uma bactéria, identificada por ele como *Bacterium (Pseudomonas) savastanoi*. Observou ainda a existência de duas estruturas aparentemente relacionadas com a manutenção desta bactéria. A primeira consiste num bulbo cefálico, apêndice ao esôfago, que foi interpretado por Petri como sendo um "reservatório" da bactéria em questão. A segunda estrutura é uma modificação da parede dorsal do reto das fêmeas de *D. oleae*. Trata-se de um conjunto de túbulos, ou criptas, retais, onde estão presentes as bactérias encontradas no tubo digestivo. Ao passar pelo oviduto o ovo é pressionado contra estas criptas e contaminado pelas bactérias, que se desenvolverão na larva em cecos do intestino médio (Bateman 1972), passando posteriormente para a microbiota intestinal do adulto, provavelmente a partir da infecção do bulbo esofágico ainda durante a fase de pupa. Tais criptas não são comuns em outras espécies de tefritídeos, embora algumas espécies do gênero *Dacus* possuam canais entre o trecho final do intestino e o oviduto, que poderiam facilitar a contaminação dos ovos (Bateman 1972). Já o bulbo esofágico está presente em todas as espécies da família. Posteriormente, foram encontradas bactérias do aparelho digestivo de muitos outros tefritídeos, deixando claro que a presença de uma microbiota nestes órgãos é comum na família. Foi descoberto também que, de modo geral, os órgãos envolvidos na simbiose são maiores e mais complexos na sub-família Dacinae, e menores e mais simples na Trypetinae.

Embora a descoberta da microbiota dos tefritídeos tenha sido feita há mais de noventa anos, ainda não existe consenso sobre o seu significado na biologia destes dípteros. Segundo Drew & Lloyd (1988) as possibilidades vão desde serem apenas um item da dieta dos tefritídeos (p. ex. Drew *et al.*, 1983; Girollami, 1986) até a ocorrência de mutualismo estrito, situação na qual os tefritídeos e suas bactérias não poderiam sobreviver separados. Entre estes dois extremos há uma grande variedade de cenários propostos, como o de que as bactérias degradariam produtos tóxicos (inclusive inseticidas) presentes na alimentação dos tefritídeos (Boush & Matsumura 1967), ou a de que as bactérias teriam um papel importante na hidrólise de proteínas e na produção de aminoácidos ausentes na alimentação dos adultos (Bateman, 1972). Outros autores consideram ainda que as bactérias fornecem nutrientes ou metabólitos importantes apenas para um determinado momento do ciclo de vida dos tefritídeos influenciando, por exemplo, a sobrevivência e o desenvolvimento das larvas (Howard & Bush 1989). Matioli & Solferini (1993) propuseram para *Anastrepha* um cenário no qual as bactérias seriam "hospedadas" pela larva, ganhando assim proteção contra condições adversas encontradas nos frutos, especialmente o aumento na concentração de álcoois e compostos fenólicos decorrente da própria atividade bacteriana na polpa. O inseto por sua vez "ganharia" uma fonte de proteínas e um agente detoxicante, capacitando-o a explorar um leque maior de fontes de alimento.

Um ponto que poderia fornecer evidências indiretas sobre o tipo de relação existente entre os tefritídeos e sua microbiota seria a maneira pela qual esta é adquirida pelos insetos. A contaminação durante a oviposição observada em *Dacus oleae*, considerada como indicadora da elevada importância da microbiota,

não é encontrada em outras espécies, levando alguns autores a proporem vias alternativas para a sua aquisição pelos tefritídeos. Daser & Brandl (1992), por exemplo, demonstraram que, em vários gêneros, a microbiota presente nas larvas difere da dos adultos, de forma que a hipótese de transmissão desta pelo ovo está excluída nestas espécies. Drew *et al.* (1983) consideram que as bactérias encontradas nos adultos de *Dacus tryoni* provêm continuamente de sua alimentação, citando como evidências o baixo pH do papo e do estômago (entre 3,0 e 3,5), que impede ou inibe o crescimento da maioria das bactérias; a similaridade entre a microbiota do adulto e a de seu suposto alimento (folhas e frutos de amora) e o fato de que pseudomonídeos fluorescentes de leguminosas (bactérias não encontradas em tefritídeos) podem ser isolados do tubo digestivo de adultos de *D. tryoni* aos quais tenham sido oferecidos como parte da alimentação.

Por outro lado, existem boas evidências de que a microbiota presente no aparelho digestivo dos tefritídeos não é apenas consequência de sua alimentação. Ratner & Stoffolano (1982) notaram a formação de corpos membranosos contendo bactérias no bulbo esofágico de *Rhagoletis pomonella*. Segundo os autores, estes corpos, derivados da camada íntima do epitélio do bulbo, protegeriam as bactérias da acidez do papo e intestino médio durante sua passagem por estes órgãos, até sua liberação no ambiente menos ácido do intestino posterior. Desta forma, seria possível que uma microbiota permanente se estabelecesse neste local a partir de bactérias "cultivadas" no bulbo esofágico, conforme proposto inicialmente. A existência destes corpos membranosos, cuja única função aparente está relacionada com a manutenção da microbiota é, assim como o são as criptas

retais, uma boa evidência de que pelo menos algumas espécies de tefritídeos devem estabelecer simbioses estáveis com suas bactérias. Quanto à detecção nos adultos de bactérias presentes em seu alimento, Girolami (1986) demonstrou que, em *Ceratitis capitata*, a microbiota é adquirida durante o período larval, ainda que esta espécie seja capaz também de obtê-la pela alimentação. Por fim, a semelhança entre a microbiota dos tefritídeos e a das plantas das quais se alimentam pode significar que estas estão sendo contaminadas pelos tefritídeos durante o processo de regurgitação e re-ingestão do alimento realizado por muitos deles na fase adulta (Drew & Lloyd 1987).

Para compreender as relações entre tefritídeos e bactérias é fundamental que se conheça primeiro a composição, a diversidade e a variabilidade da microbiota em questão. Com este objetivo Daser & Brandl (1992) encontraram um total de 24 linhagens bacterianas distintas em larvas e adultos de oito espécies dos gêneros *Rhagoletis*, *Tephritis* e *Urophora*. Howard *et al.* (1985) caracterizaram a microbiota do bulbo esofágico de sete espécies do gênero *Rhagoletis*, encontrando também uma grande diversidade de linhagens. Já Boush *et al.* (1972) encontraram apenas quatro espécies de bactérias no trato digestivo da mosca de fruta caribenha *Anastrepha suspensa*. Mesmo com estes avanços, no entanto, ainda há muitas dúvidas sobre a composição da microbiota dos tefritídeos. Investigações recentes, por exemplo, não têm encontrado *P. savastanoi* em adultos de *D. oleae*, levantando a hipótese de que seu verdadeiro simbiote não seja esta bactéria e sim uma outra, mais difícil de cultivar e ainda não identificada (Girolami, 1986). O mesmo acontece com *R. pomonella* e seu suposto simbiote, *P. melophthora* (Howard & Bush, 1989). Além disso, muitos trabalhos reportam

que a linhagem bacteriana predominante pode variar até mesmo entre indivíduos de uma mesma população (Howard & Bush 1989). Todos estes trabalhos deixam claro que a composição, a abundância, a variabilidade e o papel da microbiota dos tefritídeos ainda estão longe de serem completamente elucidados.

As dificuldades encontradas na pesquisa sobre a microbiota dos tefritídeos são, em parte, fruto da sua complexidade, pois é perfeitamente possível que a microbiota e seu papel não sejam os mesmos em todas as espécies da família. Por outro lado, não se pode ignorar o fato de que o volume de pesquisas sobre esta relação, embora crescente, ainda é pequeno, mesmo no que diz respeito a espécies mais importantes do ponto de vista econômico, como a mosca-da-maçã, *R. pomonella*, e a mosca-da-azeitona, *D. oleae*.

Para as espécies da sub-família Tephritinae, que representam mais de 40% do total de espécies da família (cerca de 1800 espécies no total, a maioria infestantes de capítulos), não existe praticamente nenhuma informação disponível sobre as suas relações com bactérias, sendo que a única revisão existente sobre este grupo (Headrick & Goeden, 1998) nem mesmo menciona a existência de simbiontes. A única referência encontrada sobre a da microbiota de tefritídeos infestantes de capítulos é o trabalho de Daser e Brandl (1992), que trata também de outros tefritídeos. A falta de pesquisas sobre o grupo é ainda mais grave em se considerando o importante papel ecológico destas espécies, especialmente no contexto das relações inseto-plantas no Brasil. De forma geral a família Tephritidae é responsável por cerca de 2/3 das espécies brasileiras de endófagos de compostas, com 80 espécies (18 gêneros), das quais 25 pertencem ao gênero

Tomoplagia (Prado, 2000), fornecendo assim um excelente modelo para o estudo das relações entre endófagos em geral e suas bactérias.

A microbiota de oito espécies de tefritídeos brasileiros dos gêneros *Tomoplagia*, *Tetreuaresta*, *Trupanea* e *Xanthaciura*, todos importantes endófagos de asteráceas brasileiras, foi estudada por Moretti (1998), que encontrou um total de vinte linhagens bacterianas nestes quatro gêneros. Mesmo assim o autor concluiu que os métodos bacteriológicos empregados restringiram a gama de detecção de espécies bacterianas e não geraram dados quantitativos para se determinar que espécie bacteriana é a predominante dentre as isoladas.

Dadas as conclusões do trabalho citado acima, bem como as dificuldades apresentadas por outros trabalhos com tefritídeos em caracterizar corretamente as microbiotas bacterianas em estudo, parece claro que qualquer pesquisa sobre o assunto deve buscar métodos de caracterização de comunidades bacterianas mais apurados do que os empregados até o momento. Tal necessidade se faz ainda mais forte no caso de estudos envolvendo espécies endófagas de Asteráceas, para as quais não se pode contar com praticamente nenhuma literatura que forneça pontos de partida para as sondagens ou dados para comparação com os resultados obtidos. A próxima seção apresentará alguns dos métodos da biologia molecular atualmente disponíveis que vem sendo utilizados com sucesso em estudos sobre comunidades de microorganismos, focando principalmente naqueles que serão utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

1.3 OS MÉTODOS MOLECULARES NO ESTUDO DE COMUNIDADES BACTERIANAS.

As dificuldades presentes na caracterização da microbiota dos tefritídeos mostradas na seção anterior não são exclusivas deste grupo. Na verdade, a maioria dos estudos sobre comunidades bacterianas, sejam elas simbiotes ou não, produz resultados que não estimam corretamente o número de espécies presentes e nem a abundância de cada uma delas (Amann *et al.*, 1995, Muyzer, 1998). Este problema decorre principalmente da metodologia tradicionalmente empregada neste tipo de estudo, que depende do cultivo *in vitro* do material coletado e da posterior identificação deste por meio de técnicas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, entre outras. Esta metodologia tem a vantagem de tornar as bactérias encontradas disponíveis para experimentos subseqüentes, sendo por isso a mais adequada para o estudo das características de uma espécie bacteriana em particular. No entanto, já foi largamente demonstrado que apenas uma pequena fração das espécies de bactérias pode ser cultivada pelas técnicas conhecidas atualmente (tabela 1.1). Por esta razão, as metodologias dependentes de cultivo não são as mais adequadas aos estudos de comunidades bacterianas, nos quais o objetivo primário é a caracterização detalhada da composição e da diversidade de espécies da comunidade. Além disso, estudos dependentes do cultivo de linhagens puras não podem ser considerados como verdadeiros estudos de ecologia (de comunidades microbianas), uma vez que ecologia é o estudo das relações entre os organismos e deles com seu meio ambiente (Muyzer, 1998).

Numa tentativa de contornar estas limitações, os estudos sobre as comunidades de microrganismos vêm passando por mudanças metodológicas decorrentes da introdução do uso de marcadores moleculares aliado à extração

direta de ácidos nucléicos a partir de amostras ambientais (Amann *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998). Estes marcadores, cuja aplicação geralmente não envolve etapas de cultivo *in vitro*, têm proporcionado enormes avanços na caracterização das comunidades destes organismos. De fato, foi graças a eles que se comprovou que estas comunidades são muito mais ricas e diversas do que se supunha e que a maior parte das espécies bacterianas, sejam as de vida livre ou as simbiotes, ainda permanece desconhecida, não podendo ser cultivada com as técnicas disponíveis, como suspeito há décadas pelos microbiologistas (Amann *et al.*, 1995).

Tabela 1.1 Porcentagem de bactérias cultiváveis em relação ao total de espécies observadas (em geral por contagem direta) em vários ambientes. Resumido de Amann *et al.* (1995).

Ambiente	Porcentagem
Água salgada	0,001 - 0,01%
Água doce	0,25%
Lagos mesotróficos	0,1 - 1%
Águas estuarinas limpas	0,1 - 3%
Lodo ativado	1 - 15%
Sedimentos	0,25%
Solo	0,3%

O emprego mais comum da biologia molecular (Muyzer *et al.*, 1996) na microbiologia envolve a extração do DNA de toda a comunidade em estudo sem uma etapa prévia de cultivo, seguida pela amplificação de uma região do DNA que possa servir como marcador para identificação das várias bactérias presentes. Uma das regiões mais utilizadas nesta abordagem é o RNA ribossômico (rRNA) 16S (Amann *et al.*, 1995), por estar presente em todas as bactérias, por serem conhecidos para ele tanto "primers" universais quanto específicos e por possuir regiões conservadas e variáveis, o que o torna útil para estudar tanto

comunidades com espécies próximas quanto comunidades com espécies pouco aparentadas.

Os produtos do PCR obtidos após a amplificação do DNA de toda a comunidade contêm uma mistura de fragmentos (em geral do mesmo tamanho) oriundos das diferentes espécies presentes nela, que devem então ser separados. Esta separação pode ser feita por meio de clonagem ou de técnicas especiais de eletroforese. O material clonado ou extraído dos géis de eletroforese torna-se então disponível para identificação por meio de seqüenciamento, digestão com enzimas de restrição, hibridização com sondas ou qualquer outro método adequado aos objetivos do trabalho. Aparentemente o PCR é capaz de amplificar a região escolhida até mesmo nas bactérias mais raras na comunidade, bem como detectar bactérias presentes em pequenas amostras, o que torna a metodologia bastante sensível.

Em uma revisão sobre o emprego de técnicas moleculares no estudo de comunidades bacterianas Amann *et al.* (1995) concluíram que estas técnicas são uma importante ferramenta para conhecer melhor a diversidade existente nos domínios Archaea e Bacteria. Um dos exemplos mais interessantes da validade desta conclusão, bem como do emprego da abordagem molecular na microbiologia, é o estudo da microbiota do cupim *Reticulitermes speratus*. Ohkuma & Kudo (1996) encontraram neste inseto 10 linhagens bacterianas próximas entre si que não pertencem a nenhum dos grupos conhecidos de bactérias. Além disso, os autores concluíram que a maior parte desta microbiota consiste de espécies desconhecidas e ainda não cultiváveis. O fato de terem sido encontradas tantas espécies novas numa microbiota considerada anteriormente como bem conhecida

evidencia as limitações das metodologias tradicionais de cultivo, bem como as potencialidades das novas técnicas moleculares como instrumento para a análise de comunidades bacterianas.

A separação e a identificação dos produtos obtidos na amplificação do DNA da comunidade bacteriana em estudo podem ser feitos por vários métodos, alguns dos quais já foram citados. Um dos avanços mais interessantes nesta área foi a introdução por Muyzer *et al.* (1993) da técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) para a obtenção de um "fingerprint" da comunidade bacteriana em estudo. Esta técnica, desenvolvida inicialmente para o estudo de mutações de ponto (Fischer & Lerman, 1979), permite separar fragmentos de DNA de com o mesmo tamanho e seqüências distintas, como os produzidos pela amplificação do DNA de uma comunidade bacteriana, com base nas diferenças nas condições de desnaturação entre eles. A eletroforese é realizada à temperatura elevada (60 a 65 °C) num gel de poliacrilamida em gradiente de substâncias desnaturantes (uma mistura de uréia e formamida) polimerizado de modo que a amostra encontra concentrações cada vez maiores destas substâncias à medida que percorre o gel. Quando cada fragmento encontra a concentração que desnatura seu sítio mais instável sua velocidade de migração cai drasticamente. Assim é possível separar os diferentes fragmentos obtidos pela amplificação do DNA total da comunidade antes de identificá-los, economizando uma grande quantidade de trabalho de identificação, seja ele feito por hibridização, seqüenciamento, digestão ou qualquer outro método. Além disso, a técnica pode até mesmo dispensar estas etapas em trabalhos onde o enfoque esteja na riqueza e variabilidade da comunidade em si, e não na identificação das espécies. Dado o custo ainda

elevado da maioria das técnicas utilizadas na identificação das seqüências obtidas (especialmente no que diz respeito ao seqüenciamento), bem como o tempo e esforço necessários para aplicar estas técnicas à um grande número de amostras (como geralmente se obtém nesta área), o DGGE se mostra uma opção bastante promissora em pesquisas sobre comunidades de microrganismos.

As técnicas moleculares descritas acima já demonstraram de forma definitiva a precariedade do conhecimento atual sobre as comunidades bacterianas, sejam elas simbiotes ou não, tendo se mostrado também capazes de resolver muitos dos problemas metodológicos causadores desta precariedade. Por estas razões parece natural propor o seu uso para o estudo da microbiota dos tefritídeos, e tentar responder com elas algumas das muitas questões ainda sem solução sobre esta microbiota.

1.4 OBJETIVOS

O Objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade e a riqueza da microbiota do tubo digestivo de *Tomoplagia minuta* (Diptera, Tefritidae), espécie endófaga de *Vernonanthura polianthes*, uma composta típica de áreas impactadas, usando como marcador um fragmento do gene do RNA 16S. Além disso, foi avaliada a adequação da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) para estudos de microbiotas simbiotes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETAS

Neste trabalho foi escolhida *Tomoplagia minuta* (figura 2.1.1) como modelo para estudos da microbiota do tubo digestivo de tefritídeos endófagos de compostas. Esta espécie infesta exclusivamente capítulos de *Vernonanthura polianthes*, uma Asterácea arbustiva da sub-família Vernonineae comum em áreas impactadas como campos e pastagens abandonadas, onde é encontrada em considerável abundância sendo possível, portanto, obter um suprimento também abundante de *T. minuta* com um investimento relativamente pequeno de tempo, recursos e esforço. Além disso, o fato de *T. minuta* infestar exclusivamente *V. polianthes* evita a necessidade de introduzir uma variável a mais (hospedeiro de origem da coleta) no estágio inicial da pesquisa sobre a microbiota de endófagos de compostas.

A obtenção no campo de adultos de *T. minuta* é bastante difícil e, portanto, optou-se por obtê-los a partir das larvas e ovos desta espécie que infestam os capítulos de *V. polianthes*, num procedimento que vem sendo utilizado com sucesso em estudos sobre os endófagos de compostas brasileiros há mais de uma década (Lewinsohn, 1991).

Cada indivíduo de *V. polianthes* amostrado foi considerado uma coleta independente e de cada um deles foi extraído o maior número possível (em geral várias centenas) de capítulos, que foram acondicionados em frascos de plástico transparente de cerca de dois litros fechados com tela de nylon. Os frascos foram observados diariamente, sempre no período da tarde, para verificar a emergência

de adultos de *T. minuta*. Os adultos encontrados foram removidos do frasco plástico e transferidos para tubos de vidro pequenos (cerca de três centímetros de comprimento por um de diâmetro) fechados com algodão, onde foram alimentados por alguns dias com mel diluído em água. Após este período os indivíduos foram dissecados para remoção do aparelho digestivo.

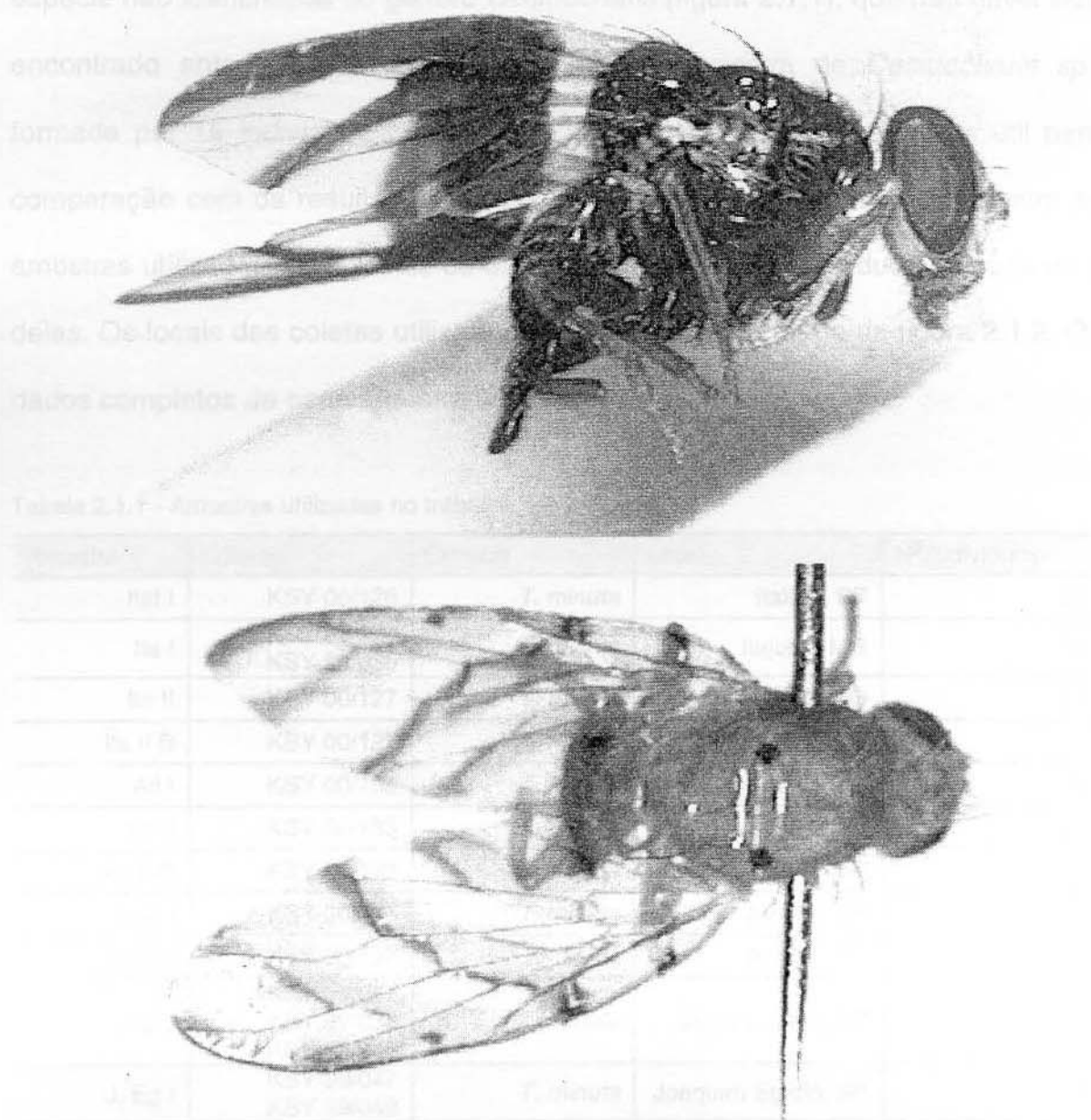
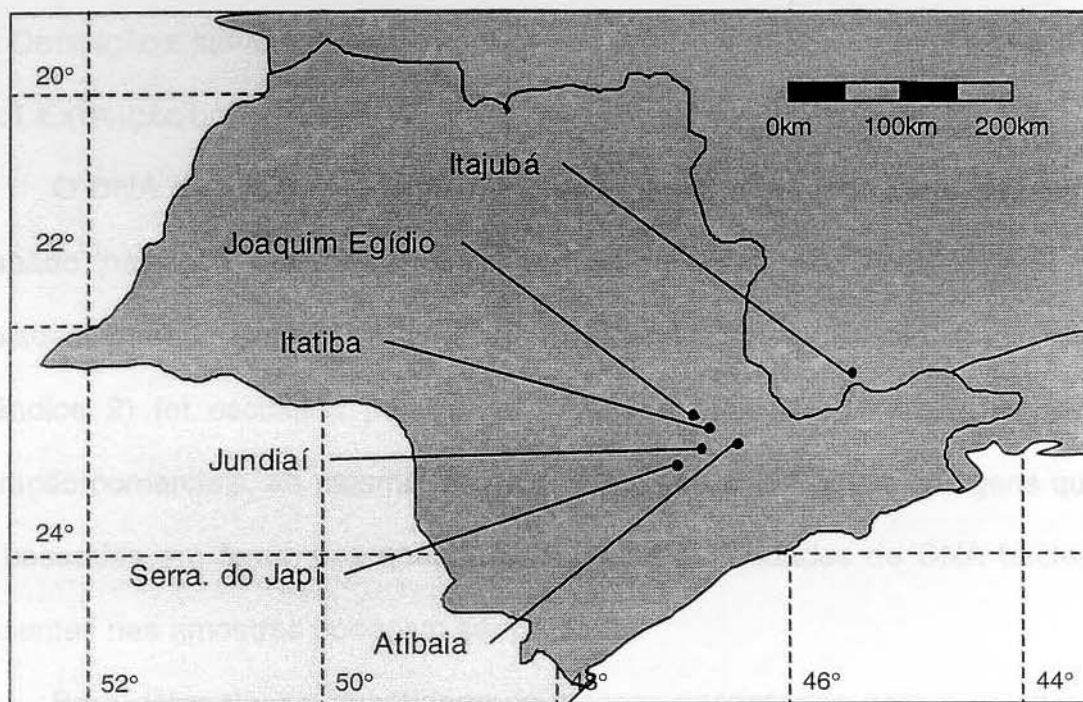


Figura 2.1.1 Indivíduos de *Cecidocharis sp* (em cima) e *T. minuta* (em baixo).

Neste trabalho foram utilizadas doze coletas de *V. polianthes*, que forneceram ao todo onze amostras de *T. minuta* (algumas coletas renderam mais de uma amostra, e algumas amostras tem indivíduos de mais de uma coleta), cada uma delas formada por cerca de vinte a trinta indivíduos obtidos de uma mesma planta ou de plantas próximas. Além disso, foi obtida uma amostra de uma espécie não identificada do gênero *Cecidocharis* (figura 2.1.1), que não havia sido encontrado anteriormente em *V. polianthes*. A amostra de *Cecidocharis sp.*, formada por 15 indivíduos provenientes de várias plantas, mostrou-se útil para comparação com os resultados obtidos para *T. minuta*. A tabela 2.1.1 mostra as amostras utilizadas, seus locais de origem e o número de indivíduos de cada uma delas. Os locais das coletas utilizadas são mostrados no mapa da figura 2.1.2. Os dados completos de cada amostra estão no apêndice 1.

Tabela 2.1.1 - Amostras utilizadas no trabalho.

Amostra	Coletas	Espécie	Local	Nº Indivíduos
Itat I	KSY 00/126	<i>T. minuta</i>	Itatiba, SP	30
Ita I	KSY 99/034 KSY 99/035	<i>T. minuta</i>	Itajubá, MG	20
Ita II	KSY 00/127	<i>T. minuta</i>	Itajubá, MG	24
Ita II B	KSY 00/127	<i>T. minuta</i>	Itajubá, MG	26
Ati I	KSY 00/132	<i>T. minuta</i>	Atibaia, SP	26
Ati II	KSY 00/133	<i>T. minuta</i>	Atibaia, SP	26
Ati II B	KSY 00/133	<i>T. minuta</i>	Atibaia, SP	21
Jund I	KSY 00/135	<i>T. minuta</i>	Jundiaí, SP	27
Jund II	KSY 00/137	<i>T. minuta</i>	Jundiaí, SP	26
Japi I	KSY 99/037 KSY 99/039 KSY 99/040	<i>T. minuta</i>	Serra do Japi, SP	23
J. Eg I	KSY 99/047 KSY 99/049	<i>T. minuta</i>	Joaquim Egídio, SP	13
Ceci I	Várias coletas	<i>Cecidocharis sp.</i>	Vários locais	15



Figuras 2.1.2 Locais das coletas utilizadas neste trabalho.

As amostras Ita I, Japi I e J.Eg I. foram obtidas a partir de indivíduos congelados previamente em nitrogênio líquido, enquanto as demais amostras foram obtidas de indivíduos vivos. As exicatas das plantas coletadas serão depositadas no herbário UEC.

2.2 Dissecção e OBTENÇÃO DAS BACTÉRIAS.

A dissecção do aparelho digestivo foi realizada inteiramente em bancada de fluxo laminar. As moscas foram anestesiadas com éter e tiveram sua superfície esterilizada pela imersão por alguns segundos em hipoclorito de sódio 5%. O tubo digestivo, incluindo o papo, foi removido e transferido para um micro tubo de 1,5 ml contendo água MilliQ esterilizada, sendo então macerado suavemente.

2.3 OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RDNA 16S.

2.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA.

O DNA da microbiota foi extraído do material dissecado com um protocolo baseado na ação precipitadora de ácidos nucleicos do CTAB (Brometo de Hexadecil-trimetil Amônio, Sigma nº H-6269). Este protocolo (protocolo 1, apêndice 2) foi escolhido por ter se mostrado mais eficiente que os kits de extração comerciais, ao mesmo tempo em que não exige tantas lavagens quanto os baseados em fenol, nas quais as pequenas quantidades de DNA bacteriano presentes nas amostras poderiam ser perdidas.

Para determinar a quantidade de moscas necessárias para a obtenção de DNA bacteriano suficiente para o PCR foram realizadas amplificações a partir de extrações piloto realizadas com número crescente de indivíduos, até que fossem obtidas amplificações bem sucedidas de forma sistemática. Desta forma estabeleceu-se um mínimo de 15 indivíduos para que se obtivesse uma boa amplificação.

2.3.2 AMPLIFICAÇÃO.

Para caracterizar a microbiota de *T. minuta* foi utilizado um fragmento do rDNA 16S com cerca de 465 pares de bases (bp), compreendido entre as posições 338 e 803 do gene. Os "primers" utilizados para a amplificação foram:

"primer" direto: (355) 3'-CGA CGG AGG GCA TCC TCA-5' (338) e

"primer" reverso: (803) 3'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-5' (785).

Estes "primers" foram escolhidos por amplificarem a região acima em qualquer bactéria (Amman *et al.*, 1995). Além disso, o fragmento engloba a região variável V3, o que ajuda a aumentar o número de bactérias distinguíveis pelo método. Em princípio poderiam ter sido utilizados outros pares de "primers" capazes de amplificar fragmentos maiores, mas estes não seriam adequados para o uso com DGGE, que separa apenas fragmentos com até 500 bp (Muyzer *et al.*, 1996).

Na extremidade 5' do "primer" direto (posição 338) foi acrescentada a seguinte seqüência (Muyzer *et al.*, 1996):

3'-GGG GGG CAC GGG GGC GGG GCG GGC GGC GCG CGC GCG C-5'.

Esta seqüência, rica em C+G, acrescenta ao produto de PCR um sítio com temperatura de dissociação mais alta que qualquer outro sítio já presente na região amplificada, o que melhora em muito a sensibilidade do DGGE (Sheffield *et al.*, 1989).

A reação de PCR foi feita utilizando a técnica de "touchdown". Esta técnica consiste em iniciar a reação com uma alta temperatura de hibridação, que garante alta especificidade à reação às custas de um menor rendimento. A temperatura de hibridação vai sendo então diminuída em um grau por ciclo, até atingir uma temperatura que garanta um maior rendimento à reação, quando o produto desejado já está em abundância. Este procedimento foi empregado com o intuito de eliminar uma banda inespecífica de cerca de 1000 bp presente nas primeiras tentativas de amplificação. A composição e as condições utilizadas nas reações de PCR são mostradas no protocolo 2, apêndice 2. As reações utilizadas nos géis de DGGE foram feitas num volume final de 50 µl, para que se pudesse utilizar uma

quantidade maior de DNA. Com isso tentou-se garantir que mesmo seqüências raras estivessem presentes na reação em quantidade suficiente para serem amplificadas. As reações de padronização do PCR foram feitas num volume final de 25 µl.

2.3.3 DGGE.

Como resultado do PCR obteve-se para cada amostra uma mistura de fragmentos de mesmo tamanho e seqüências distintas, refletindo as várias bactérias presentes na amostra. Estes fragmentos foram separados por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

O DGGE foi conduzido em um aparato para eletroforese vertical HOFER SE 600. Foram utilizados géis de poli-acrilamida 6% com 16 cm de altura por 14 cm de largura e 1 mm de espessura. Cada gel comportava até 20 amostras de 50 µl cada. As corridas foram mantidas por 16 h em tensão constante de 100 V. O tampão de corrida (TAE) foi mantido na temperatura constante de 65 °C por meio de um banho circulador. O protocolo completo dos géis de DGGE é mostrado no apêndice 2, protocolo 3.

Para determinar as concentrações de desnaturante ótimas para este trabalho foi utilizado um gel com variação da faixa de desnaturante de 0 a 80%. Neste gel as bandas se concentraram entre 45 e 55% e entre 65 e 80% de desnaturante (figura 2.3.3.1). Por esta razão decidiu-se submeter cada amostra a duas corridas eletroforéticas, uma em cada faixa de concentração. Além disso, foram feitas réplicas das amplificações de cada amostra, para avaliar a

reprodutibilidade da técnica e também detectar seqüências que porventura amplificassem em apenas uma delas.

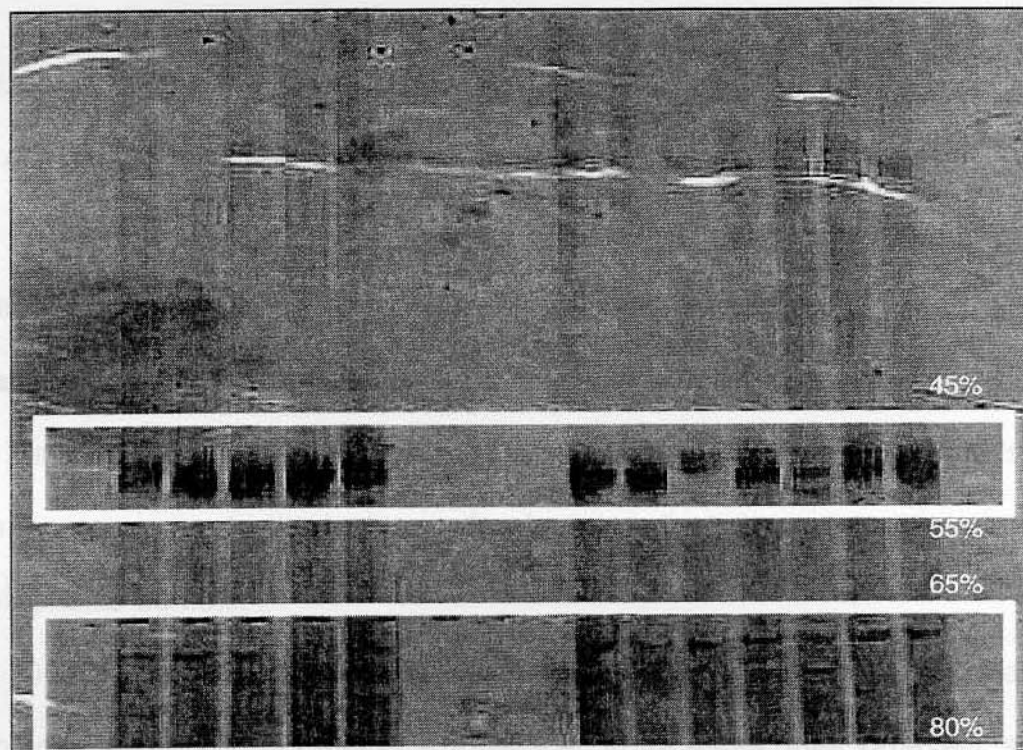


Figura 2.3.3.1 Gel para determinação das faixas de desnaturante a serem utilizadas no trabalho. As porcentagens se referem a concentração de desnaturante naquela altura do gel. As faixas utilizadas estão marcadas em branco. A ordem das amostras no gel é Itat I, Ita II, Ita II B, Ati I, Ati II, Ati II B, Jund I, Jund II, Ceci I, Ita I, Japi I e J.Eg I

Para a revelação das bandas dos géis de DGGE foi utilizada a coloração com prata (Pharmacia Biotech PlusOne DNA Silver Staining Kit, nº 70-5006-88), considerada a técnica mais sensível para detecção de DNA em géis de poliacrilamida.

Cada uma das bandas obtidas no DGGE foi removida do gel e purificada (protocolo 4, apêndice 2). Quarenta destas bandas removidas foram escolhidas ao acaso e re-amplificadas, para testar se tinham o tamanho correto (cerca de 500 bp) e não se tratavam de quimeras ou outros artefatos. Em todos os casos foram

obtidos produtos do tamanho desejado, confirmando-se assim a validade da informação obtida com o DGGE.

2.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS.

2.4.1 ANÁLISE DO PADRÃO DE BANDAS

Cada uma das bandas obtidas no DGGE foi considerada como um ribotipo distinto². A frequência de aparecimento de cada banda foi avaliada a fim de sondar a existência de um conjunto mínimo de ribotipos que esteja presente em todas as amostras. Foram procurados também ribotipos pouco frequentes, que sirvam como elemento de destaque de alguma amostra ou conjunto de amostras em relação as demais.

O efeito do tamanho da amostra sobre a quantidade de bandas nela observada foi avaliado por meio da correlação entre estas duas variáveis, a fim de verificar se amostras maiores permitem uma melhor avaliação da riqueza da microbiota, ou se o PCR é realmente capaz de amplificar até mesmo os ribotipos mais raros, tornando desnecessário o uso de amostras grandes.

2.4.2 RIQUEZA DE LINHAGENS DA MICROBIOTA DE *T. minuta*.

As amostras de *T. minuta* foram utilizadas para calcular estimativas de riqueza para a microbiota desta espécie. Para tanto foram utilizadas apenas estimativas que não dependem da abundância relativa de cada ribotipo para o seu cálculo, uma vez que a metodologia empregada não fornece esta informação.

² O termo ribotipo foi empregado neste trabalho com o sentido de um grupo de bactérias suficientemente distintas das demais para ser detectado pelos métodos utilizados, sem qualquer implicação no que diz respeito a outras diferenças genéticas ou de qualquer outra natureza.

Alguns autores (por exemplo, Ampe & Miambi, 2000) utilizam a intensidade das bandas nos géis como medida de abundância, o que não é confiável devido a possibilidade de introdução durante a extração e amplificação das amostras de desvios na relação entre intensidade das bandas e abundância dos ribotipos. A respeito destes desvios ver, por exemplo, Wintzingerode *et al.* (1997), Suzuki & Giovannoni (1996) e Farrelly *et al.* (1995).

As estimativas de riqueza independentes de abundância podem ser divididas em dois grupos: as não paramétricas e as baseadas em extrapolações da curva de acumulação de espécies (Gotelli & Cowell, 2001). Dentre as não paramétricas foram utilizadas as seguintes neste trabalho:

1. Bootstrap: calculada com base na proporção de amostras em que cada ribotipo ocorre.
2. Jackknife de 1ª e 2ª ordem: baseadas no número de ribotipos únicos (presentes em apenas uma amostra), e duplos (presentes em duas amostras).
3. Chao 2: também baseada no número de ribotipos raros.
4. ICE (Incidence-based Coverage Estimator): baseada no conceito de "sample coverage", que é a probabilidade de encontro de cada ribotipo observado levando em conta o total de linhagens presentes.

Das estimativas baseadas em extrapolações da curva de acumulação de espécies foram utilizadas neste trabalho apenas as duas versões da equação de Michaelis-Menten:

1. MMRuns e MMMeans: a estimativa modela e extrapola uma curva do coletor a partir do modelo do mesmo nome, desenvolvido inicialmente para estudo de cinéticas de reações bioquímicas.

Além destas estimativas foram calculadas ainda as curvas de acumulação de espécies e de Coleman (equivalente a curva de rarefação), que servem como base para comparação das estimativas de riqueza. Todas as estimativas foram calculadas com o programa EstimateS 6 versão beta 1 (Colwell, 1997), usando 100 aleatorizações dos dados originais.

2.4.3 VARIABILIDADE DE LINHAGENS ENTRE AS AMOSTRAS.

O estudo da variabilidade da microbiota de *T. minuta* e *Cecidocharis sp.* foi feito através do cálculo de matrizes de similaridade entre amostras e do estudo dos padrões correlatos de agrupamento (cluster) e de ordenação, segundo a metodologia proposta por Legendre & Legendre (1997).

As similaridades entre as amostras foram calculadas com base em três índices binários: Simple Matching (SM), Jaccard (JA) e Russel & Rao (RR), escolhidos por serem baseados em aspectos diferentes dos dados originais. Não foram utilizados índices baseados em dados quantitativos, já que as técnicas utilizadas não fornecem dados desta natureza. As matrizes de similaridade obtidas foram comparadas entre si por meio da correlação de Mantel normalizada (r_M), para verificar se não existiam pares de índices com alta correlação sendo que, em nos casos positivos, um deles foi descartado. A significância desta correlação não foi testada, pois as matrizes de similaridade não são independentes. As matrizes

de similaridade e as correlações entre elas foram calculadas com o programa NTSYS.

As matrizes de similaridade foram correlacionadas também com a matriz das distâncias geográficas entre as amostras, para verificar a influência da distância na composição da microbiota. A significância desta correlação foi calculada com o uso de uma distribuição nula gerada por 2000 bootstraps. A amostra de *Cecidocharis sp.* não foi incluída nesta análise por ser proveniente de diversos pontos de coleta. Esta análise também foi realizada com o programa NTSYS.

2.4.3.1 ANÁLISE DE CLUSTER.

A partir dos índices de similaridade foram realizadas análises de cluster para sondar a existência de agrupamentos entre as amostras que possam evidenciar subgrupos na microbiota de *T. minuta*, bem como diferenças consistentes entre as amostras de *T. minuta* e a amostra de *Cecidocharis sp.* Estas análises foram realizadas por meio de dois algoritmos: UPGMA, escolhido por preservar as relações de posicionamento entre as amostras e Ligação simples, escolhido por manter as relações de distância entre amostras, fornecendo assim um resultado contrastante com o UPGMA (Legendre & Legendre, 1998).

Para cada um dos dendrogramas obtidos na análise de cluster foi calculado um valor de correlação cofenética. Estas correlações não tiveram sua significância testada, pois as matrizes de similaridade originais e cofenéticas não são independentes. As análises de cluster e de correlação cofenética foram implementadas com o programa NTSYS.

2.4.3.2 NONMETRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING (MDS).

Para complementar a análise de variabilidade foi utilizada a ordenação em espaço reduzido por Nonmetric Multidimensional Scaling (MDS). Este método permite a ordenação de "objetos" (amostras ou indivíduos) em qualquer número desejado de dimensões a partir das matrizes de distância. Como medida de distância foram utilizados os complementos $(1-s_{ij})$ das similaridades. Para determinar o número ideal de dimensões da ordenação foram feitas, para cada uma das distâncias, implementações com número decrescente de dimensões, iniciando com cinco. A solução de cada dimensionalidade teve como configuração inicial o resultado da solução de dimensionalidade imediatamente superior, exceto pela de cinco dimensões. As matrizes de distância obtidas pelo MDS foram correlacionadas com as matrizes originais de similaridade por meio do coeficiente de Mantel padronizado (r_M), para avaliar a distorção imposta a estas pela ordenação. O MDS foi implementado com o pacote Statistica (StatSoft Inc, 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DO PADRÃO DE BANDAS.

Os géis de DGGE apresentaram 24 bandas claramente destacáveis, sendo 14 delas na faixa de desnaturante entre 45% e 55% e 10 na faixa entre 65% e 80%. Cada uma das bandas foi considerada como pertencendo a um ribotipo distinto. A tabela 3.1.1 mostra o padrão final obtido para as 12 amostras.

Tabela 3.1.1 Padrão de bandas obtidas (em cinza) para as dez amostras analisadas. O total de bandas de cada amostra é mostrado no fim da respectiva coluna. As frequências de ocorrência de cada banda são mostradas no fim de cada linha.

Banda	Amostras												Total
	Itat I	Ita I	Ita II	Ita II B	Ati I	Ati II	Ati II B	Jund I	Jund II	Japi I	J.Eg I	Ceci I	
1													11
2													1
3													2
4													2
5													1
6													6
7													12
8													2
9													6
10													8
11													5
12													9
13													3
14													5
15													2
16													12
17													4
18													8
19													1
20													9
21													10
22													3
23													12
24													9
Total	14	8	10	12	12	12	12	14	12	9	19	9	143

O número de linhagens variou mais de 100% entre as amostras de *T. minuta* (entre 8 e 19 linhagens por amostra, média = 12,18 e desvio padrão = 2,79). Esta variação poderia, em princípio, indicar a existência de diferenças entre as amostras, de forma que a microbiota deste tefritídeo não fosse única. No entanto também foi observada uma relação crescente entre o número de bandas obtidas em cada amostra e o número de moscas nela utilizadas, como é mostrado na figura 3.1.1. Esta relação entre o tamanho da amostra e o número de espécies nela observada é obtida na maioria dos trabalhos sobre riqueza de espécies pois, de forma geral, as espécies encontradas em uma única amostra são apenas uma fração do total existente na comunidade, mesmo quando esta amostra representa um grande esforço amostral. Desta forma as diferenças no número de linhagens obtidas entre amostras devem, em princípio, ser entendidas como resultado das diferenças nos tamanhos destas. Por extensão, esta observação sugere que o tamanho das amostras deve ser maximizado em trabalhos que empreguem o tipo de metodologia aqui utilizado, a fim de se obter uma representação mais acurada da riqueza da comunidade microbiana em estudo. Uma discussão completa dos efeitos de estimar a riqueza com base em amostras ao invés de indivíduos pode ser encontrada em Gotelli & Colwell (2001).

Uma possível explicação para a relação crescente entre o número de bandas obtidas e o tamanho da amostra vem do fato de que o PCR parece ser sensível a diferenças na abundância relativa dos DNAs das diferentes linhagens presentes na comunidade (Suzuki & Giovannoni, 1996), tendo maior probabilidade de amplificar as seqüências mais abundantes na mistura inicial, que muito provavelmente se originam das linhagens mais abundantes na microbiota. Além

disso, a observação empírica da existência de uma relação positiva entre o tamanho da amostra e o número de bandas obtidas sugere que o PCR não é sempre capaz de amplificar uma dada seqüência independentemente de sua abundância, e que o uso de reações de PCR mais volumosas, baseadas numa quantidade maior de DNA, como foi feito neste trabalho, não é o bastante para evitar este problema. Isto deixa aberta a possibilidade de que existam linhagens pouco abundantes na microbiota de *T. minuta* que não tenham sido percebidas.

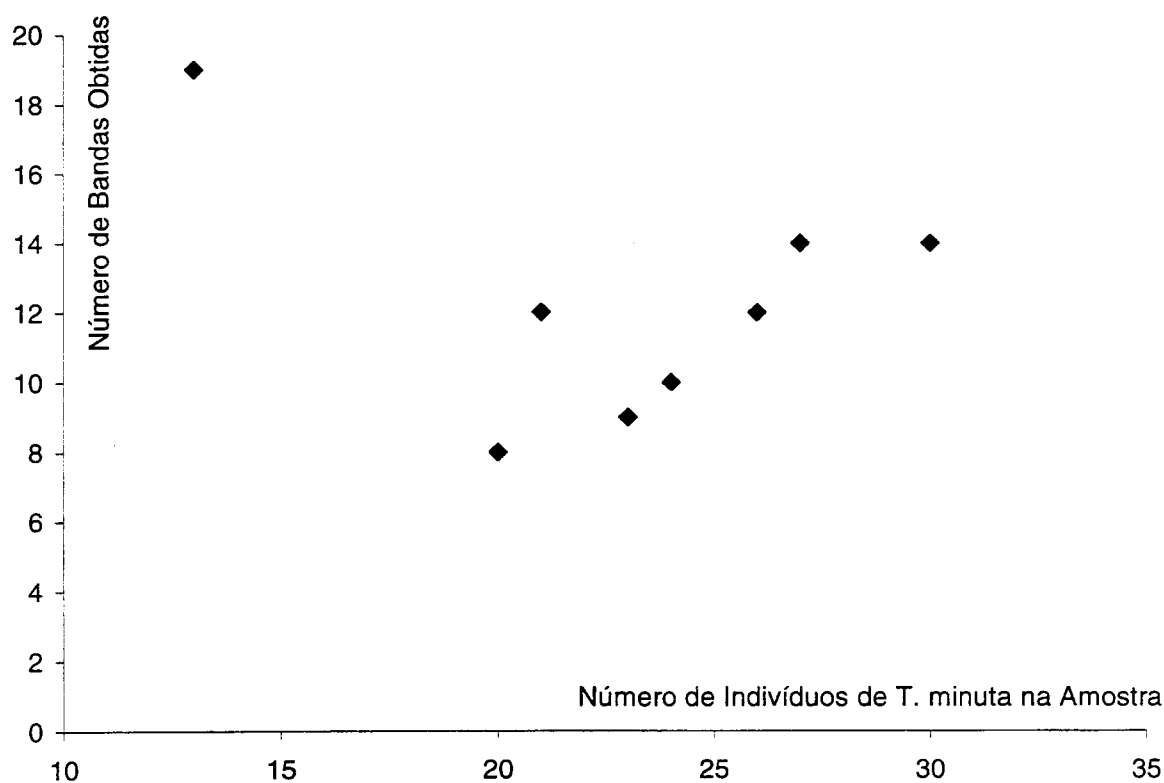


Figura 3.1.1 Relação crescente entre o número de indivíduos de *T. minuta* utilizados em cada amostra e o número de bandas obtido nela. A amostra no canto superior esquerdo é J.Eg I, a única a violar a relação observada.

A relação observada entre o número de bandas produzidas pela amostra e o tamanho desta sugere a possibilidade teórica de construir um modelo matemático que determine a abundância relativa de um ribotipo com base na

freqüência de amostras em que ela foi amplificada de forma que, quanto maior a freqüência da banda, maior a abundância do ribotipo correspondente. Este modelo forneceria estimativas de abundância das linhagens que permitiriam estudar a diversidade, e não apenas a riqueza, da microbiota de *T. minuta*. Infelizmente não é simples produzir um modelo deste tipo, principalmente porque existem muitos outros fatores que interferem na amplificação, como o número de cópias do gene no ribotipo ou as próprias condições de reação (Wintzingerode *et al.* 1997, Suzuki & Giovannoni 1996, Farrelly *et al.* 1995). Além disso, este modelo teria que partir do pressuposto que todas os ribotipos encontrados estão presentes com a mesma abundância em todas as amostras, o que é um péssimo pressuposto para um estudo sobre diversidade. Por estas razões será mantida a idéia inicial de estudar apenas a riqueza, e não a diversidade, da microbiota de *T. minuta*, mesmo havendo razões para crer que existem diferenças significativas na abundância relativa dos ribotipos encontrados em cada amostra.

A figura 3.1.2 mostra a freqüência de aparecimento de cada uma das bandas. Por este gráfico pode-se perceber que as bandas 1, 7, 16 e 23 estão presentes em todas as amostras e devem, de acordo com as conclusões acima, corresponder aos ribotipos mais abundantes na microbiota de *T. minuta* (o fato da banda 1 não aparecer em Ita I não é inteiramente significativo, pois a leitura desta banda foi uma das mais complicadas, devido à sua localização logo no início do gel). Estas quatro bandas (1, 7, 16 e 23) estão presentes também em *Cecidocharis sp.* e, portanto, os ribotipos correspondentes devem ser abundantes também nesta espécie, o que sugere a existência de alguma similaridade funcional entre as microbiotas bacterianas destas duas espécies. Uma possível

explicação para esta similaridade aponta para o hospedeiro (no caso *V. polianthes*) como elemento importante na determinação desta microbiota, seja por impor aos insetos determinadas necessidades que só seriam supridas por um conjunto específico de bactérias ou por ser o próprio hospedeiro o fornecedor destas bactérias mais abundantes para as duas espécies de endófagos. Para testar esta hipótese seria necessário estudar a microbiota de alguma espécie de tefritídeo que ocorresse em mais de uma planta hospedeira, a fim de verificar se existem diferenças entre as microbiotas de amostras colhidas em hospedeiros distintos, o que não foi realizado neste trabalho.

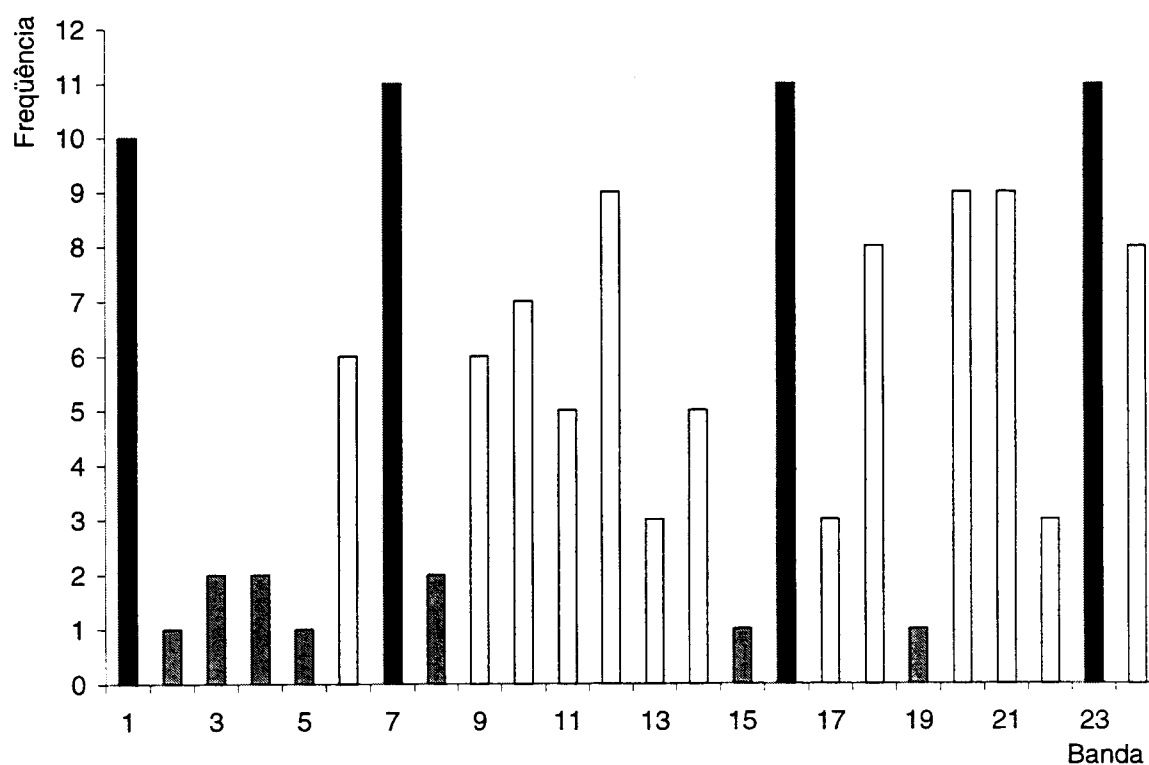


Figura 3.1.2 Frequência de aparecimento de cada uma das bandas. As bandas marcadas em preto são as mais frequentes, e as hachuradas são as mais raras.

A figura 3.1.2 mostra também a existência de sete ribotipos raros (presentes em apenas uma ou duas amostras), que são a 2, 3, 4, 5, 8, 15 e 19.

Estes poderiam, em princípio, ser considerados como diagnósticos de certas amostras, o que revelaria subdivisões na microbiota de *T. minuta*. No entanto, a relação crescente entre a frequência das bandas e o tamanho das amostras aponta para uma explicação alternativa, segundo a qual os ribotipos raros seriam aquelas menos abundantes na microbiota, que teriam sido amplificadas apenas nas amostras com mais moscas. Uma observação atenta da tabela 3.1.1 de fato aponta nesta direção, com as bandas raras aparecendo preferencialmente nas amostras maiores exceto no que diz respeito a amostra J.Eg I que, mesmo sendo a menor delas, apenas 13 indivíduos, mostrou o maior número de bandas (19) e também o maior número de bandas raras (4, sendo 2 bandas únicas). Este comportamento anômalo de J.Eg I pode ser explicado por uma amplificação ou extração de qualidades acima da média nesta amostra, ou ainda pelo fato dela ser realmente mais rica (ou seus ribotipos mais abundantes) que as demais. Infelizmente, não é possível discernir entre estas duas hipóteses com base apenas nos resultados obtidos neste trabalho.

A comparação entre géis de uma mesma faixa de desnaturantes (figura 3.1.3) mostrou que a metodologia empregada possui pouca reprodutibilidade, tendo sido difícil comparar os padrões de bandas obtidos a partir de diferentes amplificações da mesma amostra. De modo geral, apenas as bandas mais freqüentes puderam ser percebidas em todos os géis de uma mesma faixa de desnaturante, o que conduziu a uma leitura conservadora destes, a fim de evitar que uma mesma banda fosse considerada como duas por aparecer em posições diferentes em dois géis de uma mesma faixa, levando a uma superestimativa da riqueza real. Estes problemas de reprodutibilidade podem ser devidos tanto ao

DGGE quanto ao próprio PCR que, ao contrário das suposições levantadas na introdução, parece não ser capaz de amplificar sistematicamente os ribotipos mais raros. Como as bandas mais freqüentes são em geral perceptíveis nas várias réplicas dos géis, parece razoável afirmar que as diferenças entre os géis de uma mesma faixa se devem ao fato de que os ribotipos mais raros foram amplificados apenas em algumas das diferentes reações de PCR utilizadas nas repetições dos géis.

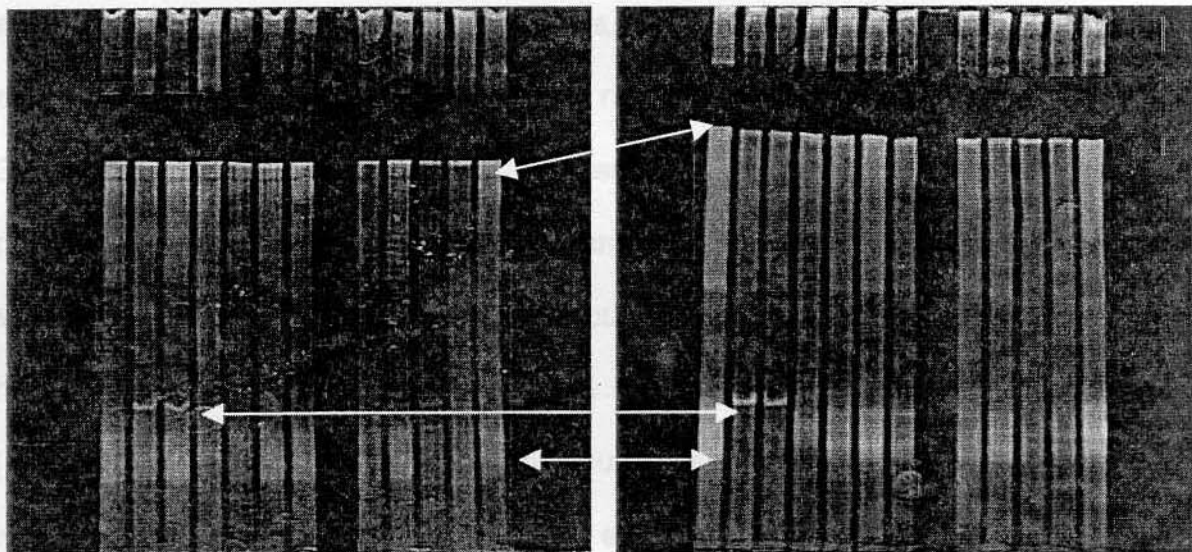


Figura 3.1.3 Imagens negativas de dois géis feitos com amplificações diferentes das mesmas amostras na faixa de 45% a 55% de desnaturante. A ordem das amostras é a mesma nos dois géis (Itat I, Ita II, Ita II B, Ati I, Ati II, Ati II B, Jund I, Jund II, Ceci I, Ita I, Japi I e J.Eg I). Apenas os padrões mais gerais (como as bandas ligadas por linhas) se repetem entre eles, tornando difícil a sua comparação.

Uma maneira de evitar tanto o problema de reprodutibilidade descrito acima quanto a dependência entre o tamanho da amostra e o número de bandas, obtendo assim uma representação mais precisa da comunidade em estudo mesmo na ausência de grandes amostras, seria realizar várias amplificações da mesma amostra e depois misturá-las antes da corrida eletroforética no DGGE. Desta forma, mesmo os ribotipos mais raros, que amplificam apenas em algumas

das reações, estariam presentes no gel, e seria evitado o problema de relacionar as bandas equivalentes em vários géis. Esta mistura de PCRs poderia também ser aplicada em vários géis, a fim de avaliar apenas a reprodutibilidade do DGGE em si.

3.2 RIQUEZA DE RIBOTIPOS DA MICROBIOTA DE *T. minuta*.

O estimador de riqueza ideal é aquele capaz de produzir uma estimativa exata (sem vieses) e que, de preferência, se aproxime rapidamente deste valor, estimando a riqueza com um pequeno número de amostras (Gotelli & Cowell, 2001). Graficamente este objetivo pode ser verificado pela produção de uma curva de riqueza estimada que cresça rapidamente, atingindo em seguida um valor assintótico. Infelizmente, a maioria das curvas de riqueza obtidas neste trabalho não chegou a produzir uma assíntota e, das que o fizeram, apenas uma (MMMeans) conseguiu fazê-lo com poucas amostras. As curvas de riqueza estimadas são mostradas nas figuras 3.2.1 e 3.2.2.

As curvas obtidas por estimadores não paramétricos mostradas na figura 3.2.1 (Bootstrap, Jackknife de 1ª e 2ª ordem e ICE) não forneceram boas estimativas de riqueza pois, no geral, se limitam a acompanhar a curva de acumulação de espécies sem atingir um valor realmente assintótico, produzindo estimativas que são funções aproximadamente lineares desta curva. Este padrão foi encontrado por Melo (*com. pess.*) para estes mesmos estimadores de riqueza em uma revisão dos dados de seis outros trabalhos sobre o assunto. A estimativa de ICE mostrou ainda um início decrescente, acompanhando as demais apenas

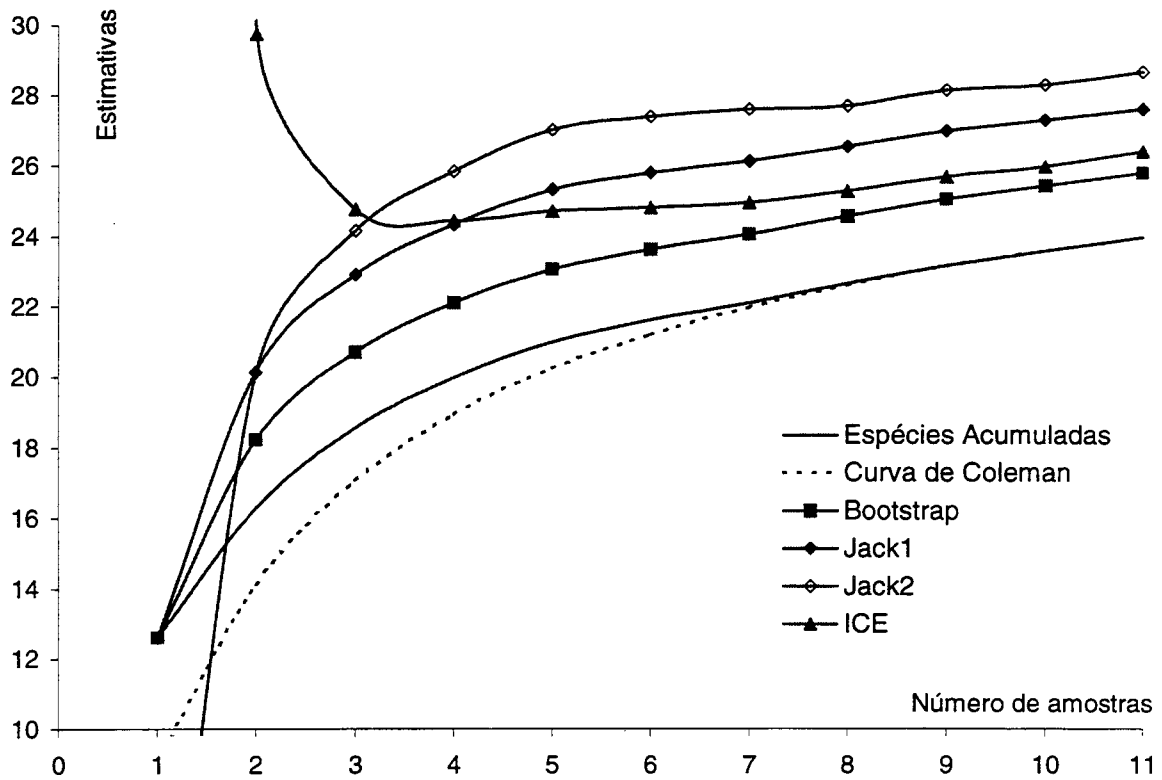


Figura 3.2.1 Curvas de riqueza estimada por Bootstrap, Jackknife de 1ª e 2ª ordem e ICE.

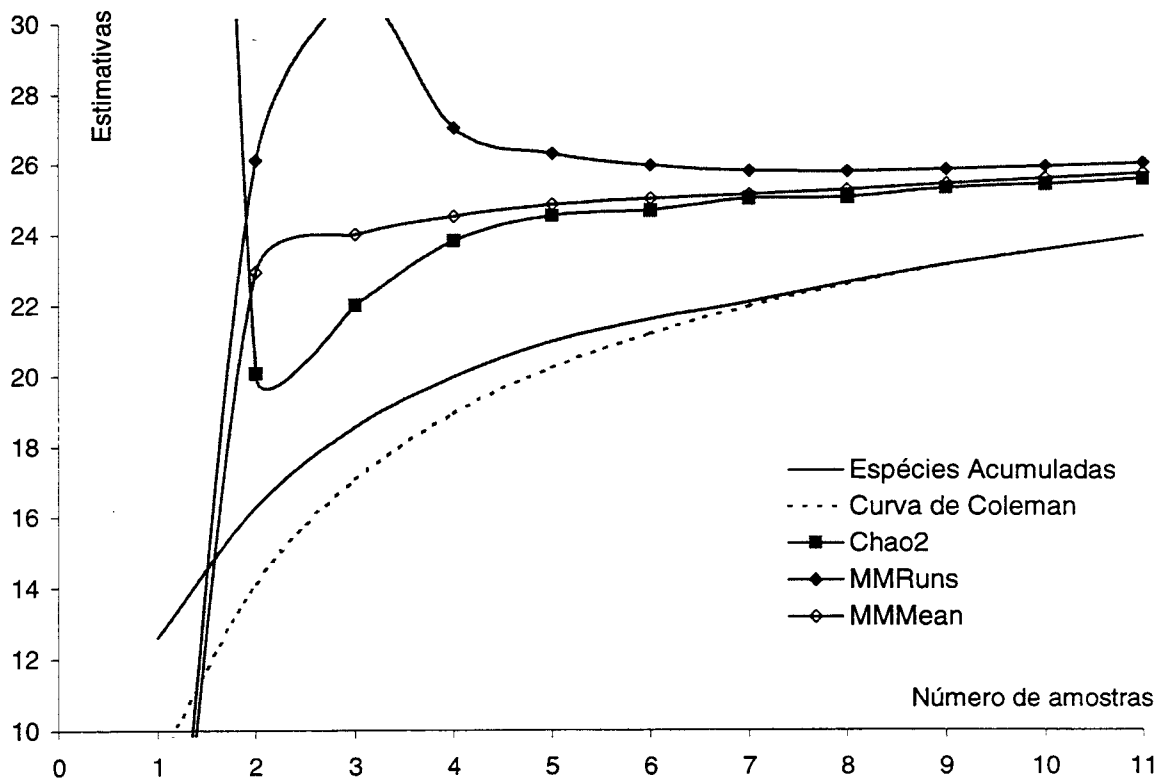


Figura 3.2.2 Curvas de riqueza estimada por Chao 2 e Michaelis Menten (MMMeans e MMRuns).

na sua porção final. Esta estimativa depende da definição de espécie rara (aquelas presentes em poucas amostras) adotada e, em geral, é recomendado (Cowell 1997) que sejam consideradas raras as espécies presentes em dez ou menos amostras. Embora neste trabalho só tenham sido utilizadas onze amostras, decidiu-se mesmo assim seguir a recomendação de Cowell (1997). Esta definição, embora pouco lógica dentro do contexto deste trabalho, foi a que produziu a melhor curva de ICE, bem como de Chao 2, que também depende da definição adotada de "espécie rara". A relação entre a definição de espécie "rara" e o comportamento destes dois estimadores será melhor detalhada durante a discussão de Chao 2.

Todas as estimativas de riqueza citadas acima têm como pressuposto que o número de espécies raras diminui à medida que um número maior de espécies é amostrado de forma que, no momento em que as espécies raras se tornam escassas, o estimador pode convergir para um valor final. No entanto este pressuposto parece não ser verdadeiro para a maioria dos levantamentos de espécies realizados (Melo, *com. pess.*), o que pode ser observado neste trabalho pela figura 3.2.3, que demonstra claramente que o número de espécies raras se estabiliza após a acumulação de umas poucas amostras, especialmente no que diz respeito aos ribotipos presentes em apenas duas amostras. A violação deste pressuposto fundamental aos estimadores não paramétricos pelos dados obtidos neste trabalho aparentemente é a responsável pelo seu comportamento não assintótico, e explica porque eles não produziram curvas ideais. Deve-se ressaltar que este fato não desqualifica os estimadores em si.

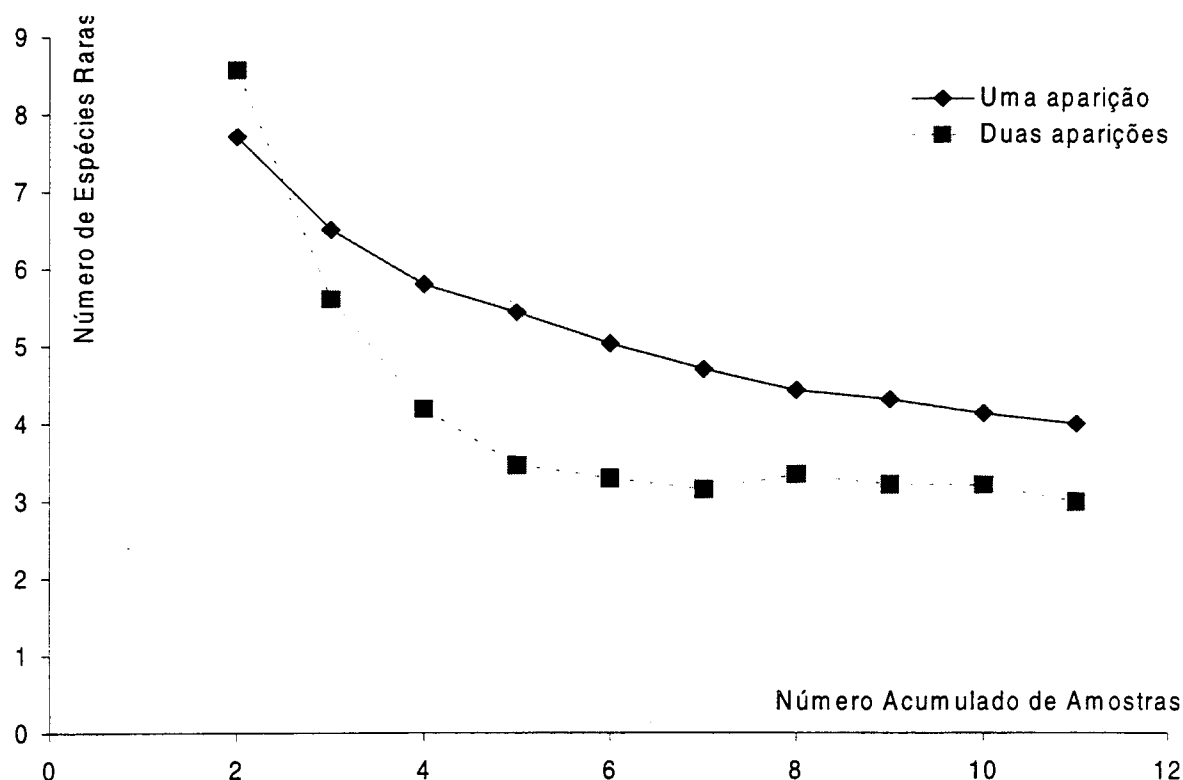


Figura 3.2.3. Número acumulado de espécies raras nas amostras. Foram consideradas como raras as espécies que aparecem em apenas uma ou duas amostras.

As estimativas de riqueza que mais se aproximaram do comportamento assintótico esperado de um bom estimador foram a de Chao 2 e as de Michaelis-Menton (MMMeans e MMRuns). Estas estimativas, mostradas na figura 3.2.2, não apresentaram a relação linear com a curva de acumulação de espécies mostrada pelos estimadores discutidos acima, tendo produzido assíntotas bastante pronunciadas pelo menos em suas porções finais. Embora tenham produzido estimativas de riqueza semelhantes, elas apresentaram comportamentos bem diferentes entre si e das curvas da figura 3.2.1, e por esta razão serão discutidas separadamente.

A curva da estimativa de Chao 2 não apresentou o comportamento que se espera de um bom estimador de riqueza na sua porção inicial, tendo apresentado

valores iniciais muito altos e decrescentes, seguidos por um período de instabilidade. Esta instabilidade é explicada pelo mesmo fator da instabilidade observada na estimativa de ICE, ou seja, a definição de "espécies raras" como aquelas presentes dez amostras num trabalho que possui apenas onze. A figura 3.2.4 mostra o efeito da mudança na definição de "espécie rara" sobre estes dois estimadores. Como pode ser visto, para ICE o aumento no valor de corte aumenta sensivelmente a estabilidade da curva, enquanto que para Chao 2 a relação entre estas duas grandezas não é tão clara. Para qualquer um dos dois estimadores, no entanto, as melhores curvas foram obtidas com o valor de corte de 10 amostras, conforme recomendado por Cowell (1997), o que explica a manutenção deste valor neste trabalho.

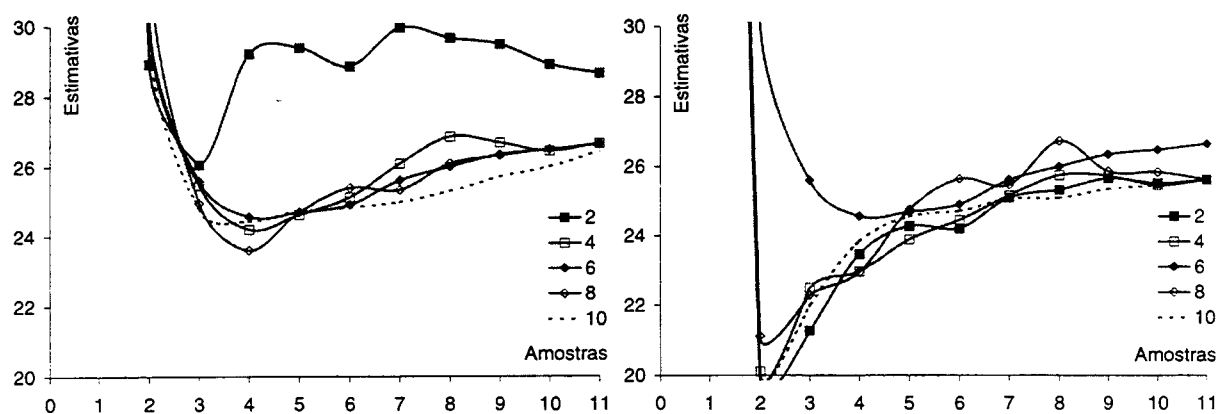


Figura 3.2.4 Efeito da mudança nos valores de corte sobre os estimadores de riqueza ICE (esquerda) e Chao 2 (direita).

As curvas de Michaelis Menten foram as que mais se aproximaram do comportamento esperado de um bom estimador, especialmente no que diz respeito a MMMeans, como já era esperado (ver seção 2.4.2). Esta curva apresentou um rápido crescimento inicial, mostrando tendência à estabilização já partir da segunda amostra. A curva MMRuns produziu um pico inicial, mostrando

tendência à estabilização só a partir da quarta amostra, mas mesmo assim produziu uma assíntota bastante estável a partir daí. A maior estabilidade de MMMeans já era esperada, uma vez que esta estimativa calcula a assíntota apenas uma vez para cada ponto, usando a curva de acumulação média de espécies obtida após a aleatorização das amostras, enquanto MMRuns produz estimativas para cada um dos pontos em cada uma das aleatorizações, calculando posteriormente uma média geral para cada ponto. Por esta razão MMRuns é sujeita a oscilações devido à ordem de entrada das amostras na análise, algo que não ocorre com MMMeans.

Nem as curvas de Michaelis-Menten e nem a curva de Chao 2 produziram uma assíntota perfeita, pois todas elas ainda mostram alguma tendência de crescimento na sua porção final. Mesmo assim elas podem ser consideradas como estimadores bastante aceitáveis da riqueza da microbiota de *T. minuta*, especialmente devido ao pequeno número de amostras disponível para o estudo. A tabela 3.2.1 mostra as estimativas de riqueza obtidas por estas três curvas e, de forma geral, todas elas apontam para uma riqueza esperada de aproximadamente 26 ribotipos, o que é um valor muito maior do que o obtido até o momento para a microbiota de qualquer outra espécie de tefritídeo, considerando-se é claro que cada ribotipo corresponde a uma linhagem no sentido tradicional do termo, comparável a uma linhagem obtida por cultivo. Daser & Brandl (1992), por exemplo, precisaram avaliar oito espécies de três gêneros de tefritídeos (*Rhagoletis*, *Tephritis* e *Urophora*) para encontrarem 24 linhagens bacterianas. Da mesma forma, Moretti (1998) encontrou apenas 20 linhagens, mesmo tendo estudado oito espécies de quatro gêneros (*Tomoplagia*, *Tetreuaresta*, *Trupanea* e

Xanthaciura) de tefritídeos endófagos de Asteráceas brasileiras. Esta riqueza excepcional não deve, no entanto, ser encarada como uma peculiaridade de *T. minuta*, e sim como evidência de que as metodologias usadas até o momento em estudos sobre as microbiotas dos tefritídeos não esclareceram inteiramente a riqueza, e nem a composição.

Tabela 3.2.1 Estimativas de riqueza obtidas ($\pm$ desvio padrão quando disponível).

Método	MMRuns	MMMean	Chao 2
Estimativa	26,08	25,78	25,63 $\pm$ 3,49

Outro fato interessante sobre esta estimativa de riqueza de 26 ribotipos é que ela se encontra apenas um pouco acima da riqueza observada (24 ribotipos) o que atesta que o trabalho conseguiu detectar praticamente toda a riqueza possível pela metodologia empregada. Se existem outros ribotipos que realmente não foram percebidas em nenhuma das amostras elas devem ser muito mais raras do que os vinte e quatro detectados, ou oferecerem outros tipos de impedimento a detecção por esta metodologia, como por exemplo seqüências refratárias à amplificação.

3.3 VARIABILIDADE DE LINHAGENS ENTRE AS AMOSTRAS.

Embora tenham sido encontradas evidências de que boa parte das variações entre as amostras de *T. minuta* podem ser explicadas como fruto das diferenças nos tamanhos destas, as análises de variabilidade ainda são importantes por duas razões:

1. A relação crescente entre o tamanho da amostra e a quantidade de linhagens obtida pode ser apenas uma das fontes de diferenças entre as amostras. Outros padrões de variabilidade que sejam encontrados podem ser frutos de outros fenômenos.
2. A análise de variabilidade das amostras pode ajudar a estabelecer relações entre a microbiota de *T. minuta* e a de *Cecidocharis sp.*

Para avaliar estas possibilidades foram realizadas as análises de similaridade, agrupamento ("cluster") e ordenação (MDS), mostradas nas sub-seções que se seguem.

3.3.1 ANÁLISES DE SIMILARIDADE

As matrizes de similaridade entre as amostras são apresentadas na tabela 3.3.1.1 e as correlações entre elas na tabela 3.3.1.2. Nenhuma destas correlações pode ser considerada como alta, especialmente porque as matrizes não são totalmente independentes. Em particular a correlação entre Simple Matching (SM) e Russel & Rao (RR) foi bastante baixa, o que é uma evidência de que estes dois índices estão medindo aspectos realmente diferentes da similaridade entre as amostras. Estas diferenças podem ser atribuídas ao fato de se considerar ou não as ausências compartilhadas entre duas amostras (as duplas ausências) como elementos de similaridade, uma vez que está é a única diferença entre SM e RR.

Tabela 3.3.1.1 Similaridades observadas entre as 12 amostras (11 de *T. minuta* e 1 de *Cecidocharis*) utilizadas.

	Itat I	Ita I	Ita II	Ita II B	Ati I	Ati II	Ati II B	Jund I	Jund II	Japi I	Jeg I	Ceci I
Simple Matching (SM)												
Itat I	1,000											
Ita I	0,583	1,000										
Ita II	0,667	0,583	1,000									
Ita II B	0,583	0,583	0,917	1,000								
Ati I	0,750	0,750	0,750	0,750	1,000							
Ati II	0,583	0,750	0,583	0,583	0,833	1,000						
Ati II B	0,500	0,750	0,583	0,583	0,750	0,917	1,000					
Jund I	0,500	0,667	0,500	0,500	0,750	0,917	0,917	1,000				
Jund II	0,583	0,667	0,667	0,583	0,750	0,917	0,833	0,833	1,000			
Japi I	0,708	0,875	0,625	0,625	0,792	0,708	0,708	0,625	0,625	1,000		
Jeg I	0,542	0,542	0,458	0,458	0,708	0,708	0,708	0,792	0,625	0,500	1,000	
Ceci I	0,625	0,708	0,792	0,708	0,708	0,625	0,625	0,542	0,708	0,750	0,417	1,000
Jacard (JA)												
Itat I	1,000											
Ita I	0,375	1,000										
Ita II	0,500	0,286	1,000									
Ita II B	0,444	0,333	0,833	1,000								
Ati I	0,625	0,538	0,571	0,600	1,000							
Ati II	0,444	0,538	0,375	0,412	0,714	1,000						
Ati II B	0,368	0,538	0,375	0,412	0,600	0,846	1,000					
Jund I	0,400	0,467	0,333	0,368	0,625	0,857	0,857	1,000				
Jund II	0,444	0,429	0,467	0,412	0,600	0,846	0,714	0,733	1,000			
Japi I	0,533	0,700	0,357	0,400	0,615	0,500	0,500	0,438	0,400	1,000		
Jeg I	0,500	0,421	0,381	0,409	0,632	0,632	0,632	0,737	0,550	0,400	1,000	
Ceci I	0,438	0,417	0,583	0,500	0,500	0,400	0,400	0,353	0,500	0,500	0,333	1,000
Russel & Rao (RR)												
Itat I	0,583											
Ita I	0,250	0,333										
Ita II	0,333	0,167	0,417									
Ita II B	0,333	0,208	0,417	0,500								
Ati I	0,417	0,292	0,333	0,375	0,500							
Ati II	0,333	0,292	0,250	0,292	0,417	0,500						
Ati II B	0,292	0,292	0,250	0,292	0,375	0,458	0,500					
Jund I	0,333	0,292	0,250	0,292	0,417	0,500	0,500	0,583				
Jund II	0,333	0,250	0,292	0,292	0,375	0,458	0,417	0,458	0,500			
Japi I	0,333	0,292	0,208	0,250	0,333	0,292	0,292	0,292	0,250	0,375		
Jeg I	0,458	0,333	0,333	0,375	0,500	0,500	0,500	0,583	0,458	0,333	0,792	
Ceci I	0,292	0,208	0,292	0,292	0,292	0,250	0,250	0,250	0,292	0,250	0,292	0,375

Tabela 3.3.1.2 Correlações entre as matrizes de similaridades observadas entre as 10 amostras utilizadas.

Coeficiente	Simple Matching (SM)	Jacard (JA)	Russel & Rao (RR)
Simple Matching	1,000		
Jaccard	0,882	1,000	
Russel & Rao	0,430	0,781	1,000

O uso de três índices de similaridade conceitualmente distintos foi necessário porque ainda não existem critérios simples para a escolha e interpretação deles, sendo que um dos pontos que ainda permanecem obscuros a este respeito é justamente o significado das duplas ausências como elementos de similaridade. Os três índices utilizados neste trabalho foram escolhidos de forma a refletir as três maneiras de empregar as duplas ausências. Assim temos SM, que considera as ausências duplas como indicadores de similaridade, enquanto JA ignora completamente as ausências duplas e RR as considera apenas no denominador, produzindo um índice de similaridade que não assume necessariamente seu valor máximo para duas amostras idênticas³.

De forma geral os índices que consideram as ausências duplas como indicadores de similaridade (com SM) têm sido evitados por se considerar mais provável que um erro na metodologia produza uma ausência do que uma presença. Desta forma as duplas ausências seriam uma informação menos confiável do que as duplas presenças, e seu uso levaria a superestimativas da similaridade entre amostra. Neste trabalho os problemas de ausência de bandas devido a falhas metodológicas parecem ser particularmente preocupantes, pois o número de linhagens presentes em cada amostra se mostrou proporcional ao

³ Este índice só assumirá o valor máximo de 1 quando as duas amostras, além de idênticas, apresentarem todas as espécies presentes na amostragem total.

tamanho desta, o que parece se dever a ausência de amplificação das linhagens menos abundantes das amostras com poucas moscas. Por outro lado existe uma considerável confiança de que as bandas observadas são reais, e não artefatos, pois elas foram removidas dos géis e reamplificadas com sucesso em todas as tentativas. Sendo assim decidiu-se descartar o índice de Simple Matching como medida de similaridade, mantendo apenas os índices RR e JA, que consideram como fator de similaridade entre duas amostras apenas as linhagens presentes em ambas, evitando assim que a similaridade entre as amostras seja superestimada devido as limitações do PCR. Outro motivo que permite descartar SM sem maiores perdas de informação é que este índice está razoavelmente correlacionado com JA, de forma que a informação sobre similaridade fornecida por ambos é aproximadamente a mesma.

As correlações entre distância geográfica e as medidas de similaridade entre as 11 amostras de *T. minuta* foram pequenas, mas significativas (tabela 3.3.1.3, figura 3.3.1.1). As correlações de -0,43 e -0,48 observadas para as similaridades de Jaccard e Russel & Rao respectivamente correspondem a 18,5 e 23% de variabilidade devida a correlação linear entre a similaridade a distância geográfica. Embora tais valores sejam pequenos em termos absolutos, eles são uma fonte considerável de variação que não pode ser simplesmente desprezada, ainda mais por poder ser associada a uma variável estudada (a distância entre amostras).

O resultado obtido na correlação entre a distância geográfica e a similaridade entre as amostras sugere que a microbiota de *T. minuta* não é apenas efeito de sua dieta ou de outros fatores de importância na biologia da espécie,

existindo também um fator relacionado com a distribuição da espécie e, possivelmente, com a história desta distribuição. Uma correlação maior sugeriria que a microbiota desta espécie seria fruto apenas de características locais e/ou históricas, enquanto correlações próximas de zero sugeririam que a microbiota estaria fortemente determinada por um contexto biológico. De qualquer forma a existência deste padrão de correlação não exclui a existência de outros padrões de ordenação ou agrupamento entre as amostras, possibilidades que serão sondadas nas próximas seções.

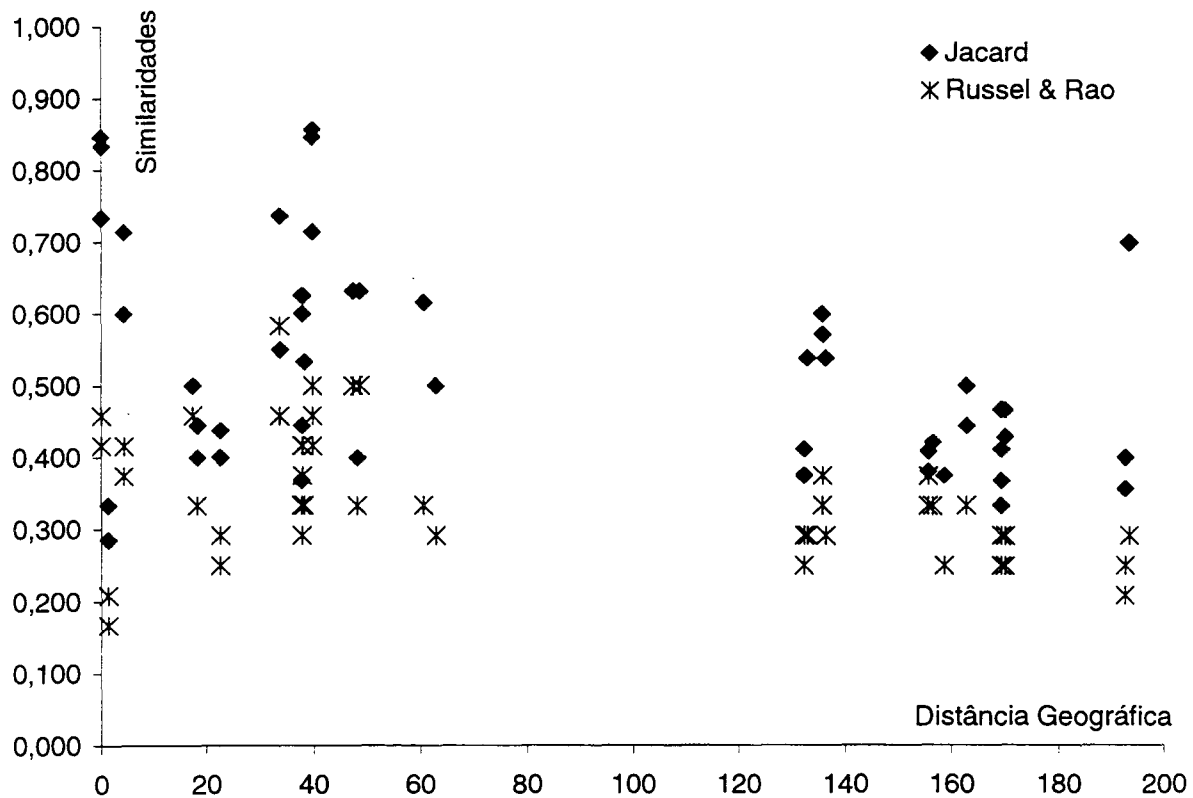


Figura 3.3.1.1 Correlação entre a distância geográfica e similaridade entre as amostras

Tabela 3.3.1.3 Correlações (r_M) entre as matrizes de similaridades observadas entre as 9 amostras de *T minuta* e as distâncias geográficas entre elas.

Coeficiente	Jacard	Russel & Rao
Distância Geográfica	$r_M = -0,43$ $z = 0,018$	$r_M = -0,48$ $z = 0,008$

3.3.2 ANÁLISE DE CLUSTER.

A figura 3.3.2.1 mostra os quatro dendrogramas obtidos por análise de cluster, juntamente com as respectivas correlações cofenéticas. Nota-se que as correlações obtidas são baixas, ainda mais se considerando que as matrizes de similaridade originais e cofenéticas não são independentes, o que por si só já garante alguma correlação entre elas. Nota-se ainda que as correlações cofenéticas mais altas foram obtidas com a similaridade JA, enquanto as menores foram obtidas com RR. Este padrão não pode, no entanto, ser considerado necessariamente um indicador da superioridade de JA como medida de similaridade para estas amostras, pois significa apenas que a matriz de JA sofre

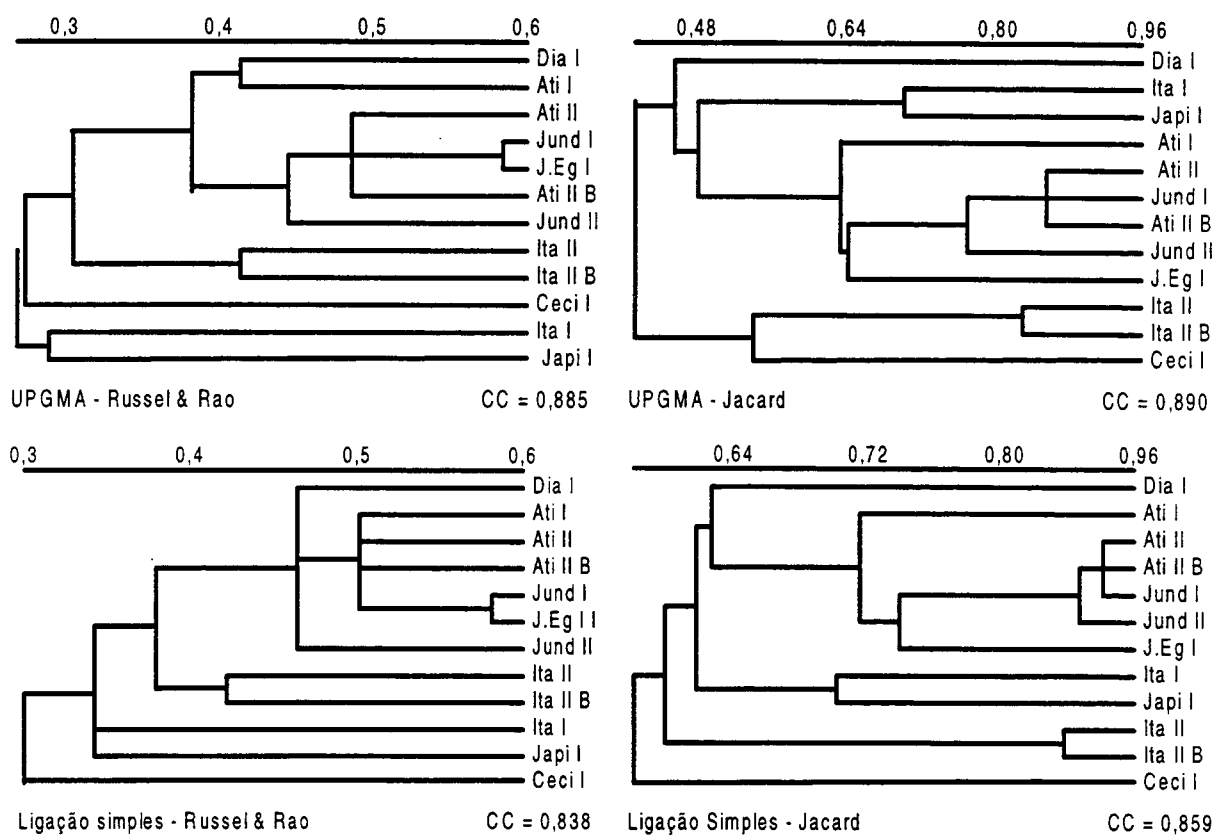


Figura 3.3.2.1 Dendrogramas obtidos. Os algoritmos de grupamento e os coeficientes de similaridade de cada dendrograma estão indicados na fugira, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação.

menos distorções ao ser transformada num dendrograma. Outro fato perceptível nas análises de cluster é que as correlações cofenéticas obtidas por UPGMA são um pouco maiores do que aquelas obtidas por Ligação Simples para as mesmas similaridades. Este padrão já era esperado devido a característica mostrada pela Ligação Simples de contrair as relações de agrupamento entre as amostras, levando a formação de grandes clusters nos quais as amostras encontram-se ligadas num nível de semelhança maior do que a mostrada na matriz de similaridade original.

A inspeção visual dos dendrogramas mostra poucos grupos se repetindo entre eles, sendo que um dos únicos padrões um pouco mais consistentes é o posicionamento da amostra de *Cecidocharis sp.* nos ramos mais externos dos dendrogramas obtidos por Ligação Simples. Como este método preserva as similaridades entre as amostras isto é uma evidência de que a amostra de *Cecidocharis* é a que tem menos semelhança com as demais, o que chama a atenção para um possível componente espécie-específico na microbiota das duas espécies. A tabela 3.3.2.1 mostra a soma das similaridades de cada amostra, que pode ser considerada como uma medida da similaridade global entre ela e todas as demais. Nesta tabela, pode-se observar que a amostra de *Cecidocharis sp.* é a que apresenta a menor soma de similaridades para qualquer um dos dois índices utilizados, vindo daí a separação entre ela e as outras observada nos dendrogramas obtidos por Ligação Simples. Este afastamento entre as duas espécies estudadas parece ser um padrão bastante bem estabelecido, e irá se repetir nas análises de ordenação por MDS, onde seu possível significado será melhor discutido.

Um outro padrão consistente é a ligação entre as amostras Ita II e Ita II B nos quatro dendrogramas, o que é uma evidência a favor da capacidade da metodologia de perceber padrões quando eles existem, já que estas amostras foram obtidas da mesma coleta e, portanto, espera-se que sejam realmente mais semelhantes entre si do que com as demais amostras. Vale destacar também que a ligação entre estas duas amostras se manteve apesar da posição relativa entre elas e as demais ser diferente em cada um dos dendrogramas. As amostras Ati II e Ati II B, que também foram obtidas de uma mesma coleta, também aparecem juntas em todos os dendrogramas, mas formando politomias com outras amostras (em geral Jund I e J.Eg I).

Tabela 3.3.2.1 Soma das similaridades de cada amostra às demais, para os dois índices utilizados.

Amostra	Jacard	Russel & Rao
Itat I	5,073	4,863
Ita I	5,031	3,437
Ita II	5,061	3,826
Ita II B	5,091	4,402
Ati I	6,599	5,093
Ati II	6,543	5,029
Ati II B	6,221	4,903
Jund I	6,168	5,320
Jund II	6,074	4,862
Japi I	5,333	3,871
Jeg I	5,622	6,247
Ceci I	4,914	3,702

Uma terceira observação é a de que as amostras de São Paulo (Ati I, Ati II, Ati II B, Jund I, Jund II, Japi I e Jeg I) tenderam a formar um grupo coeso, com exceção da amostra coletada na Serra do Japi (Japi I). Nos dendrogramas formados a partir da distância de Russel & Rao este grupo "paulista" também incluiu a amostra obtida em Diamantina. Já a amostra Japi I agrupou, em todos os

dendrogramas, com a amostra Ita I. Uma possível explicação para este agrupamento pode ser encontrada no fato de que Ita II e Japi I são as amostras de *T. minuta* com o menor tamanho, e também com a menor quantidade de linhagens detectadas.

A despeito dos padrões encontrados acima, a informação mais importante fornecida pela análise conjunta dos quatro dendrogramas é justamente a inexistência de grupos bem demarcados (o agrupamento das amostras paulistas é bem pouco destacado das demais amostras) e consistentes entre os quatro dendrogramas. Esta é uma evidência de que a microbiota do aparelho digestivo de *T. minuta* tem um grande componente comum para toda a espécie, como já havia sido levantado na análise do padrão de bandas. Além disso, também é importante a menor similaridade total entre a amostra de *Cecidocharis* e as amostras de *T. minuta* (medida como soma das similaridades na tabela 3.3.2.1), que sugere que aquela espécie possa ter uma microbiota própria, sendo um indício da existência de um componente espécie-específico na determinação da microbiota dos tefritídeos endófagos de compostas.

3.3.3 NONMETRIC MULTIDIMENSIONAL SCALING (MDS).

A busca de um padrão de variabilidade na microbiota de *T. minuta* foi completada com a análise de ordenação em espaço reduzida por nonmetric multidimensional scaling (MDS), a fim de sondar a existência de outros padrões que não sejam "clusters" ou correlações com a distância geográfica.

Ordenações em espaços reduzidos são utilizadas para distribuir, em um número pequeno de dimensões (o espaço reduzido), amostras para as quais são

conhecidos valores de muitas variáveis, de forma que as relações de posicionamento relativo entre as amostras sejam preservadas e, principalmente, esclarecidas. A forma mais conhecida de ordenação em espaços reduzidos é a análise de componentes principais, que é útil quando, para cada amostra, foram medidas muitas variáveis contínuas. O MDS por outro lado é uma forma de ordenação adequada para situações onde são conhecidas as distâncias entre as amostras. Com esta técnica é possível ordenar as amostras (ou indivíduos, se for o caso) em qualquer número de dimensões que se deseje, de forma que as distâncias monotônicas entre as amostras plotadas nestas dimensões reproduzam o mais fielmente possível as distâncias originais entre elas. A distorção imposta às distâncias originais durante a ordenação é medida pela estatística conhecida por "stress", que nada mais é do que a média das diferenças entre distâncias originais e no espaço reduzido. O MDS é implementado de forma iterativa, visando minimizar o "stress" até um valor aceitável (em geral menor de 0,1, sendo que 0 corresponde a uma reprodução perfeita das distâncias no espaço reduzido e 1 corresponde a ausência completa de correlação entre as distâncias originais e reduzidas).

Neste trabalho as doze amostras (onze de *T. minuta* e uma de *Cecidocharis sp.*) estão originalmente descritas em 24 dimensões binárias (as 24 linhagens, que podem estar presentes ou ausentes em cada uma das amostras). Por meio do MDS estas amostras foram descritas em apenas duas ou três dimensões. Estes números de dimensões são utilizados a fim de que os resultados possam ser apresentados graficamente, facilitando sua interpretação. Deve-se resaltar, no entanto, que quanto menor o número de dimensões utilizadas maior é o valor final

do "stress" e, portanto, maior é a distorção imposta à matriz de distâncias originais durante a ordenação.

A figura 3.3.3.1 mostra os valores de "stress" contra a dimensionalidade para cada uma das quatro soluções calculadas para as matrizes de distância de Jaccard e Russel & Rao. Pode-se notar que os valores de "stress" da matriz de Jaccard foram menores ou iguais aos da matriz de Russel & Rao, exceto para as soluções com duas dimensões, nas quais a situação se inverteu. Todos os valores de "stress" foram menores do que 0,1, conforme o recomendado por Kruskal & Wish (1978), exceto para a solução de duas dimensões baseada na matriz de Jaccard.

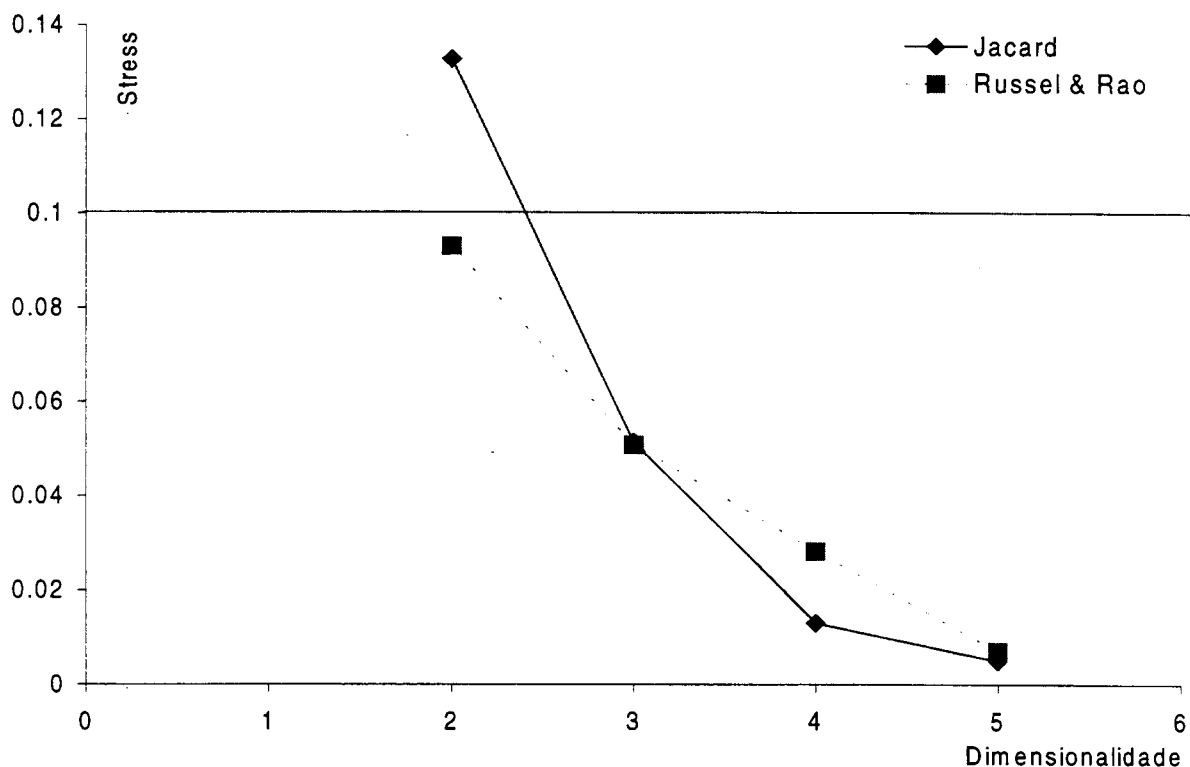


Figura 3.3.3.1 Valores de stress para cada dimensionalidade para as duas medidas de distância utilizadas. a linha horizontal pontilhada é o valor de corte de 0,1 proposto por Kruskal & Wish (1978).

As correlações entre as distâncias originais e as distâncias obtidas nas ordenações em duas e três dimensões foram, de forma geral, elevadas (tabela 3.3.3.1). Estas correlações altas são um bom indicativo da qualidade da ordenação, tanto mais porque o MDS não tem como objetivo principal preservar as relações de distância, e sim as de ordem, entre as amostras (devido ao uso da distância monotônica) e, desta forma, pode introduzir distorções nas distâncias entre elas. É de se notar inclusive que estas correlações foram um pouco maiores do que aquelas obtidas para as correlações cofenéticas das medidas de similaridade correspondentes (tabela 3.3.2.1).

Tabela 3.3.3.1 Correlações (r_M) entre as matrizes de similaridade original e as matrizes de distância obtidas por MDS.

Coeficiente	Jacard	Russel & Rao
MDS 3 Dimensões	$r_M = -0,9685$, $p = 0,000$	$r_M = -0,9173$, $p = 0,000$
MDS 2 Dimensões	$r_M = -0,8771$, $p = 0,000$	$r_M = -0,8970$, $p = 0,000$

Tabela 3.3.3.2 Coordenadas de cada amostra para quatro ordenações obtidas (uma em duas dimensões e outra em três para cada um dos índices de similaridade usados).

	Jacard					Russel & Rao				
	3 dimensões			2 Dimensões		3 dimensões			2 Dimensões	
Amostras	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 1	Dim 2	Dim 1	Dim 2	Dim 3	Dim 1	Dim 2
Itat I	0,476	0,266	-1,028	0,658	0,240	0,516	0,600	-0,456	0,432	0,508
Ita I	-0,517	1,077	0,143	-0,901	0,923	-1,640	0,022	0,149	-1,654	0,044
Ita li	1,156	-0,450	0,142	1,284	-0,377	1,404	-0,339	0,018	1,357	-0,488
Ita li B	0,939	-0,733	-0,016	1,170	-0,530	0,850	-0,170	-0,621	0,866	-0,518
Ati I	0,140	-0,013	-0,141	0,092	-0,001	-0,044	0,251	-0,173	0,033	0,137
Ati li	-0,632	-0,223	0,097	-0,576	-0,226	-0,330	-0,531	0,009	-0,563	-0,164
Ati li B	-0,696	-0,099	0,381	-0,806	-0,122	-0,454	-0,485	-0,231	-0,568	-0,508
Jund I	-0,872	-0,334	0,005	-0,970	-0,364	-0,352	-0,363	0,212	-0,401	-0,314
Jund li	-0,419	-0,498	0,442	-0,211	-0,492	0,029	-0,463	0,462	-0,015	-0,639
Japi I	0,176	1,027	-0,152	-0,208	1,063	-0,729	0,967	-0,231	-0,625	1,136
Jeg I	-0,647	-0,498	-0,560	-0,541	-0,923	-0,070	-0,147	-0,065	-0,114	-0,105
Ceci I	0,896	0,479	0,685	1,008	0,808	0,821	0,659	0,928	1,253	0,912

A tabela 3.3.3.2 mostra as coordenadas das 12 amostras nas ordenações em duas e três dimensões. Um fato interessante a respeito das relações entre as

amostras pode ser notado quando se considera a soma das coordenadas de cada uma das amostras, seja para a ordenação em duas ou em três dimensões (tabela 3.3.3.3). Para qualquer dimensionalidade ou distância a amostra de *Cecidocharis sp.* mostrou um valor para esta soma que é muito maior que o de qualquer outra amostra, o que fornece uma forte evidência da diferença entre a microbiota desta espécie e a de *T. minuta*. A interpretação deste resultado em termos do padrão de bandas original é bastante complexa, uma vez que as dimensões usadas na ordenação por MDS são completamente arbitrárias, mas de qualquer forma esta observação reforça as diferenças entre microbiotas bacteriana das duas espécies que já haviam sido encontradas na análise de cluster, e aponta novamente para a existência de um componente espécie-específico na determinação destas microbiotas. Os diagramas de ordenação em 3 dimensões (figura 3.3.3.3) mostram esta separação claramente, evidenciando ainda que, para qualquer das medidas de distância, a dimensão 3 oferece uma maior separação entre *Cecidocharis sp.* e *T. minuta*.

Tabela 3.3.3.3 Somatório das coordenadas de cada amostra para as quatro ordenações obtidas.

Amostras	Jacard		Russel & Rao	
	3 dimensões	2 Dimensões	3 dimensões	2 Dimensões
Itat I	-0,286	0,898	0,660	0,940
Ita I	0,703	0,023	-1,470	-1,610
Ita li	0,848	0,907	1,083	0,868
Ita li B	0,190	0,640	0,059	0,348
Ati I	-0,014	0,091	0,034	0,171
Ati li	-0,758	-0,802	-0,852	-0,727
Ati li B	-0,414	-0,928	-1,171	-1,076
Jund I	-1,200	-1,334	-0,502	-0,716
Jund li	-0,476	-0,702	0,028	-0,654
Japi I	1,051	0,855	0,006	0,511
Jeg I	-1,705	-1,464	-0,282	-0,219
Ceci I	2,061	1,816	2,408	2,165

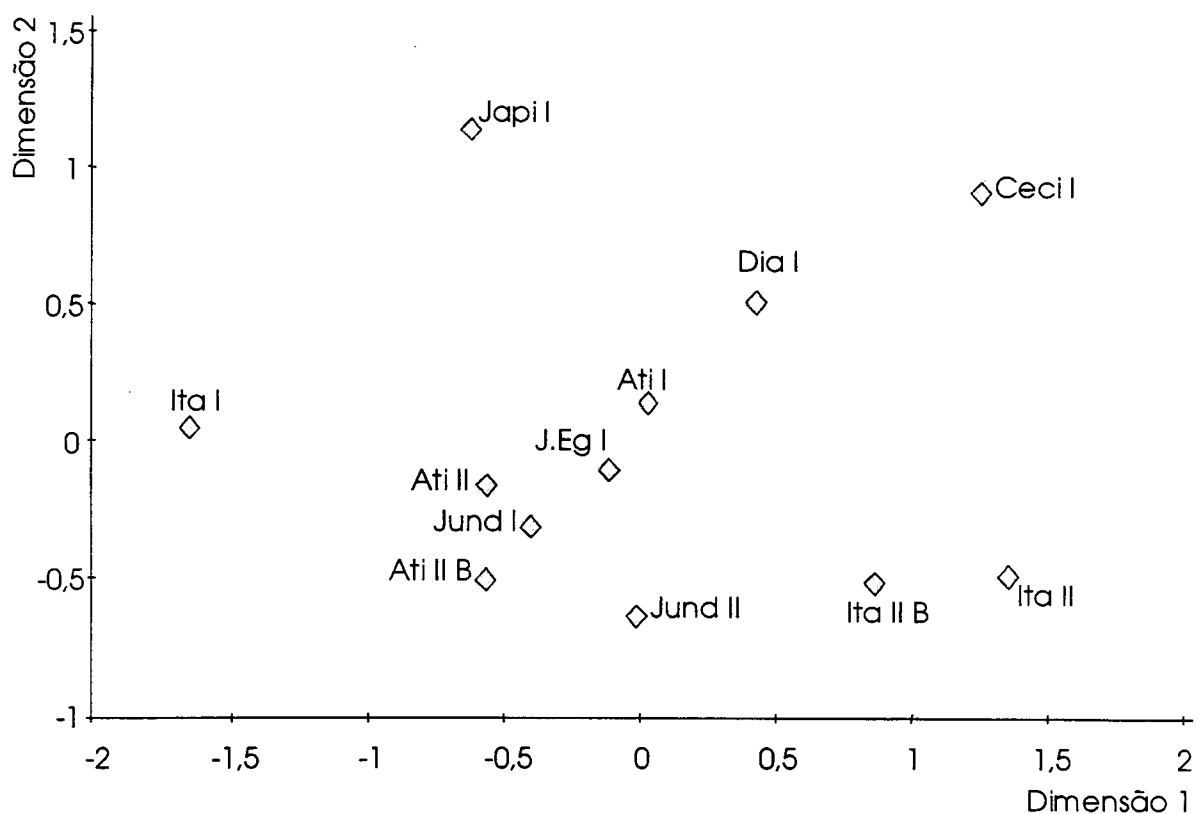
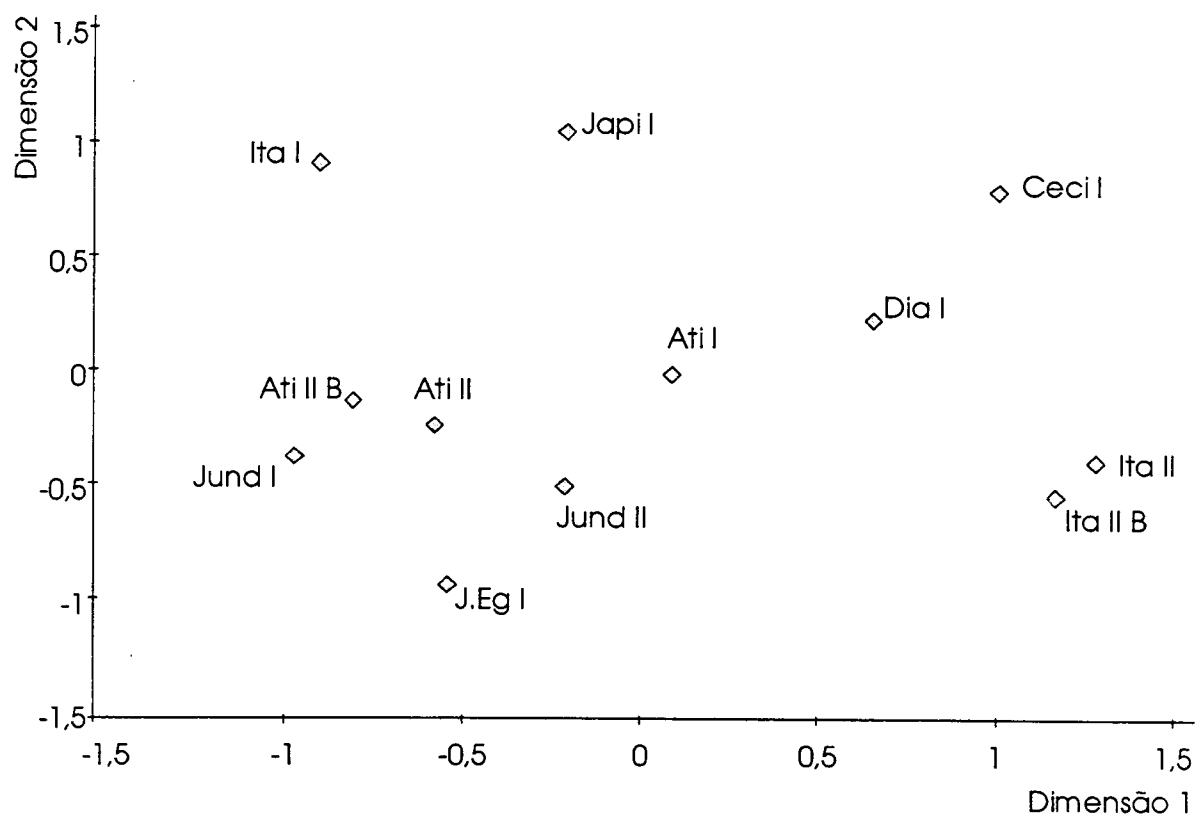


Figura 3.3.3.2 Diagramas de ordenação em 2 dimensões para as distâncias de Jacard (em cima) e Russel & Rao (em baixo).

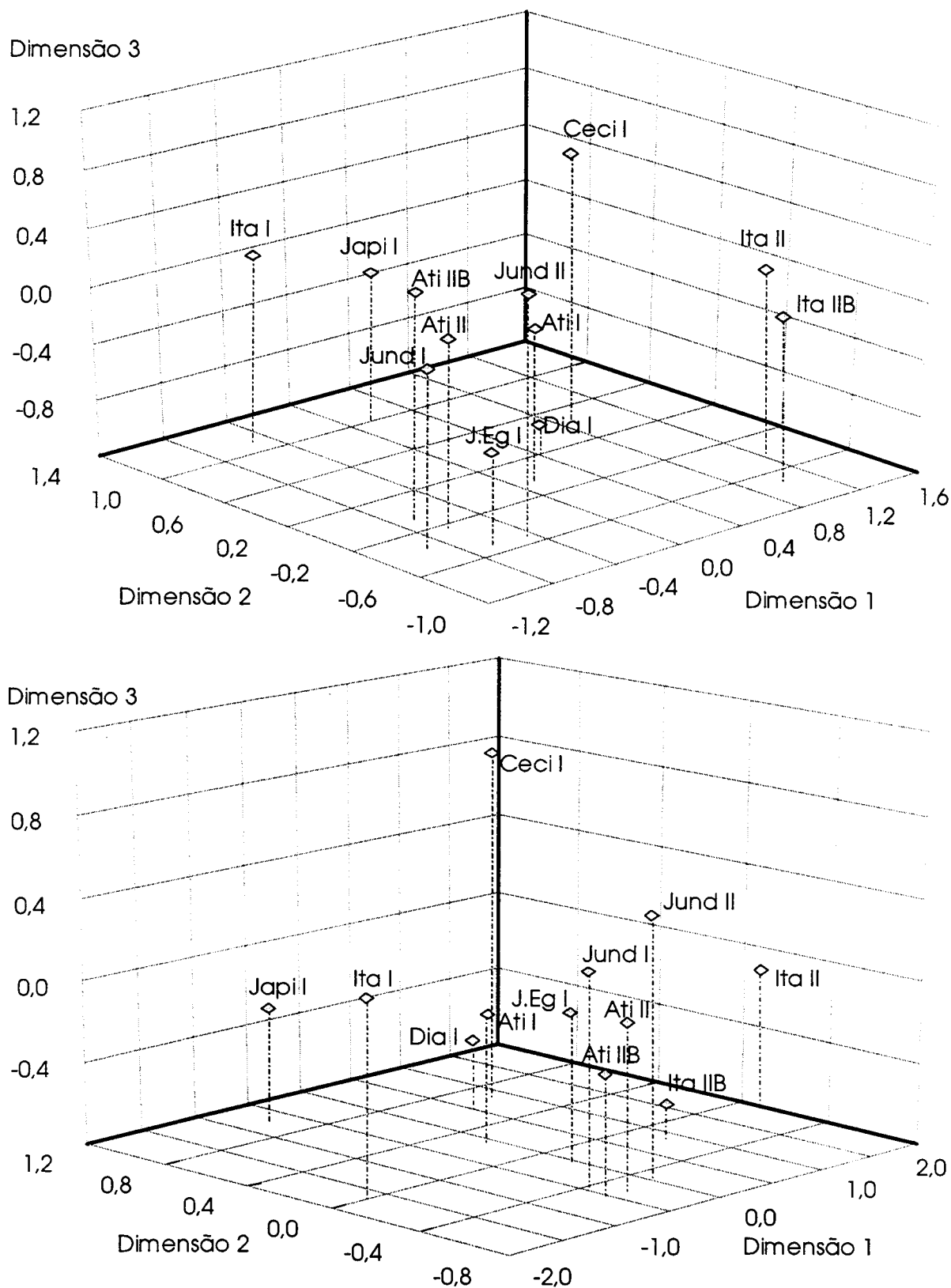


Figura 3.3.3.3 Diagramas de ordenação em 3 dimensões para as distâncias de Jaccard (em cima) e Russel & Rao (em baixo). As amostras de *Cecidocharis* sp. destacam-se da demais, especialmente na dimensão 3.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para um cenário no qual a microbiota do aparelho digestivo de *T. minuta* se mostra muito mais rica do que se supunha que fosse a microbiota dos tefritídeos em geral. Este resultado sugere que os métodos utilizados até o momento no estudo destas microbiotas não são capazes de avaliar plenamente a sua riqueza, como já foi observado em estudos sobre outras comunidades de microrganismos (Amann, 1995, Head *et al.*, 1998).

As análises de variabilidade entre as amostras de *T. minuta* não revelaram grandes diferenças entre elas, sendo que as linhagens supostas como mais abundantes estão presentes em todas as amostras. As pequenas diferenças percebidas podem ser explicadas principalmente como um efeito das diferenças no tamanho das amostras, que resultam na amplificação preferencial das linhagens mais abundantes nas amostras menores. O único padrão consistente foi a correlação pequena, mas significativa, correlação obtida entre as medidas de similaridade e a distância geográfica, que parece ser responsável por cerca de 20% da variabilidade observada. Por outro lado, foi encontrada uma diferença bem mais pronunciada entre a microbiota de *T. minuta* e a de *Cecidocharis sp.*, o que aponta para um componente espécie-específico na determinação desta. Esta diferença surge devido principalmente aos ribotipos menos presentes em *T. minuta*, pois os mais freqüentes (e supostamente mais abundantes) são compartilhados pelas duas espécies, e *Cecidocharis sp.* possui um único ribotipo raro. De forma geral podemos considerar que a microbiota de *T. minuta* é composta de um componente conservado em toda a espécie, formado por linhagens mais abundantes, e outro componente local, formado por linhagens

menos abundantes. O fato do componente conservado e mais abundante ser compartilhado com *Cecidocharis sp.* sugere que ele é o componente mais diretamente ligado a exploração do hospedeiro *V. polianthes*.

A partir das observações acima é possível postular um cenário no qual mudanças de hospedeiro para uma espécie de endófago dependeriam de mudanças na sua microbiota que a capacitassem a explorar este novo hospedeiro. Assim, espécies ocorrendo em um mesmo hospedeiro provavelmente teriam uma elevada semelhança funcional entre suas microbiotas, fruto não necessariamente de uma história evolutiva em comum e sim de necessidades comuns para a exploração deste hospedeiro. É claro que esta semelhança funcional não precisa necessariamente se traduzir em similaridade de linhagens, devido a possibilidade de linhagens bacterianas distintas realizarem as mesmas funções metabólicas para dois endófagos diferentes. No caso dos tefritídeos, este cenário é concordante com o caráter especialista mostrado pela maioria das espécies endófagas de compostas (Prado, 2000). Tradicionalmente, este caráter é explicado como fruto da necessidade de adaptações muito específicas por parte dos insetos no que diz respeito aos aspectos morfológicos, fisiológicos e fenológicos envolvidos na exploração do hospedeiro, o que impediria a exploração de um outro por meio das mesmas adaptações. Contudo, a luz das conclusões aqui obtidas, o papel da microbiota simbiote na determinação deste caráter especialista não pode ser negligenciado.

A metodologia de amplificação do rDNA total da comunidade e separação por dos fragmentos por DGGE empregada neste trabalho mostrou-se bastante adequada aos objetivos propostos, tendo sido capaz de revelar uma riqueza até

então insuspeita na microbiota de um tefritídeo, além dos padrões de organização desta riqueza. Seu maior problema foi a baixa reprodutibilidade, que dificultou a interpretação dos padrões de bandas obtidos. Mesmo assim ela deve ser considerada como uma ferramenta valiosa para um primeiro estágio de estudo desta microbiota, especialmente em virtude do seu baixo custo e da facilidade e rapidez com que permite a obtenção de uma boa quantidade de dados iniciais. Já para uma continuação dos estudos será necessário que a metodologia seja complementada por técnicas mais sensíveis como, por exemplo, a clonagem e seqüenciamento das bandas obtidas na primeira fase, que permitiriam a identificação das linhagens obtidas, próximo passo lógico em trabalhos desta natureza. Desta forma, espera-se que este trabalho sirva como base e início de um estudo mais sistemático da microbiota dos tefritídeos endófagos de compostas, bem como da validação da utilidade dos métodos moleculares nestes estudos.

4 APÊNDICES

4.1 COLETAS

Tabela 1 - Coletas de *Vernonanthura sp.* realizadas durante a realização deste trabalho pelo Laboratório de Diversidade Genética, DGE, IB, UNICAMP.

Amostra	Coletas utilizadas	Espécie	Local	Coordenadas	Data	Número de Indivíduos
Itat I	KSY 00/126	<i>T. minuta</i>	Itatiba, SP.	23 01 52 S 46 50 45 W	02/08/2000	30
Ita I	KSY 99/034 KSY 99/035	<i>T. minuta</i>	Itajubá, MG.	22 24 55 S 45 25 27 W 22 25 56 S 45 26 36 W	25/07/1999	20
Ita II	KSY 00/127	<i>T. minuta</i>	Itajubá, MG.	22 24 95 S 45 27 17 W	12/08/2000	24
Ita II B	KSY 00/127	<i>T. minuta</i>	Itajubá, MG.	22 24 95 S 45 27 17 W	12/08/2000	26
Ati I	KSY 00/132	<i>T. minuta</i>	Atibaia, SP.	23 08 85 S 46 30 54 W	22/08/2000	26
Ati II	KSY 00/133	<i>T. minuta</i>	Atibaia, SP.	23 07 13 S 46 29 67 W	22/08/2000	26
Ati II B	KSY 00/133	<i>T. minuta</i>	Atibaia, SP.	23 07 13 S 46 29 67 W	22/08/2000	21
Jund I	KSY 00/135	<i>T. minuta</i>	Jundiaí, SP.	23 11 11 S 46 53 03 W	06/09/2000	27
Jund II	KSY 00/137	<i>T. minuta</i>	Jundiaí, SP.	23 11 11 S 46 53 03 W	06/09/2000	26
Japi I	KSY 99/037 KSY 99/039 KSY 99/040	<i>T. minuta</i>	Serra do Japi, SP.	23 18 10 S 47 09 41 W 23 19 11 S 47 06 30 W 23 11 59 S 46 57 41 W	27/07/1999	23
J. Eg I.	KSY 99/047 KSY 99/049	<i>T. minuta</i>	Joaquim. Egídio, SP.	22 53 02 S 46 53 12 W	10/08/1999	13
Ceci I	Várias coletas	<i>Cecidocharis sp</i>	Vários locais		Várias datas	15

4.2 PROTOCOLOS

PROTOCOLO 1 - EXTRAÇÃO DE DNA

1. Macerar cuidadosamente o material em eppendorf de 500ml.
2. Centrifugar e descartar o sobrenadante.
3. Adicionar de 15 a 20ml de tampão para Lisozima, e ressuspender o precipitado.
4. Acrescentar 5ml de Lisozima 10mg/ml e incubar a 37°C por 2-3h.
5. Adicionar 14ml de SDS 10% e 2,5ml de Proteinase K 20mg/ml. Homogeneizar em vórtex e incubar à 65°C por 10min. Aproveitar a incubação para aquecer o CTAB/NaCl.
6. Adicionar 5ml de RNase A 4mg/ml e incubar por 15 min a 37°C.
7. Adicionar 12ml de NaCl 5M e a mesma quantidade de CTAB/NaCl pré-aquecido. Agitar no vórtex até a formação de um líquido de aspecto branco-leitoso e incubar à 65°C por 10min.
8. Adicionar 150ml de clorofórmio-álcool iso-amílico (24:1 vol/vol) e agitar no vórtex.
9. Centrifugar 12000g 5min.
10. Transferir o sobrenadante (a parte que contém o DNA) para outro tubo.
11. Precipitar com isopropanol -20°C (o quanto couber).
12. Incubar a -20°C por 30min.
13. Centrifugar 12000g 5min e descartar o sobrenadante.
14. Lavar com 100ml de etanol 70% a -20°C, centrifugar a 12000g por 5min e descartar o sobrenadante. Repetir o processo de lavagem descrito acima.
15. Deixar secar muito bem e ressuspender em TE pH8 ou água MilliQ (cerca de 25ml são o suficiente).

PROTOCOLO 2 - COMPOSIÇÃO E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE PCR

Composição das reações:

Componente	Vol/reação 25ul	Vol/reação 50ul
Tampão p/ PCR 10x	2,5ul	5,0ul
Mix dNTP 10mMol/l	0,5ul	1,0ul
"primers"	0,25ul	0,5ul
Taq 5U/ul	0,2ul	0,4ul
DNA	1,0ul ou 2,0ul	2,0ul ou 4,0ul
Água MilliQ	qsp 25ul	qsp 50ul

Condições das reações:

1 ciclo:

98°C, 1:30 mim.

10 ciclos:

96°C, 30 s,

60°C, 40 s (-1°C/ciclo),

72°C, 1:20 mim.

30 ciclos:

96°C, 30 s,

50°C, 40 s,

72°C, 1:20 mim.

PROTOCOLO 3 - DGGE

Solução estoque de Acrilamida/Bis 40% (37,5:1)

Componente	Quantidade
Acrilamida	389,3g
Bis-acrilamida	10,7g
Água destilada	qsp 1l

Soluções desnaturantes:

Componente	Solução Desnaturante 0%	Solução Desnaturante 80%
Acrilamida/Bis 40%	15mL	15mL
Tampão TAE 50X	2mL	2mL
Uréia	-	33,6g
Formamida deionizada	-	32mL
Água destilada	qsp 100ml	qsp 100ml

Deixar as soluções desnaturantes em repouso por 10 a 15 min, para desgaseificação. Filtrar utilizando membrana de 0,45 mm. Estocar a 4°C em garrafa escura por no máximo 1 mês.

Geralmente se empregam soluções estoques com 100% de desnaturante. No entanto estas soluções são difíceis de fazer, especialmente no que diz respeito a dificuldade de dissolver a uréia em concentrações tão altas. Por esta razão foram usados estoques de 80% apenas.

Persulfato de Amônio 10%

Componente	Quantidade
Persulfato de Amônio	0,1g
Água destilada	1ml

Estocar o persulfato de amônio a -20°C por cerca de 1 semana. Não se deve estocar esta solução por muito tempo, pois o persulfato oxida facilmente.

TAE 50X

Componente	Concentração
Trisma Base	2Mol/l
Ácido Acético Glacial	57,1ml/l
EDTA 0,5M pH 8,0	100ml/l

PROTOCOLO 4 - PURIFICAÇÃO DAS BANDAS OBTIDAS NO DGGE

1. Cortar a banda do gel, calcular seu volume aproximado (em geral 25mm³) e coloca-la num tubo eppendorf de 1ml contendo 2x o volume da banda de tampão de eluição.
2. Macerar cuidadosamente a banda
3. Manter por 5h em agitação, à temperatura de 37°C
4. Centrifugar por 1min a 12.000g
5. Transferir o sobrenadante (parte que contem o DNA) para um novo eppendorf, evitando levar junto fragmentos de acrilamida.
6. Adicionar a mesma quantidade de tampão de eluição à acrilamida restante, agitar no vórtex e centrifugar novamente nas mesmas condições.
7. Adicionar este sobrenadante ao anterior
8. Adicionar no mínimo dois volumes de etanol gelado ao sobrenadante (neste trabalho foi utilizado cerca de 1ml de etanol).
9. Incubar a -20°C por no mínimo 30 mim (neste trabalho utilizou-se incubação over-night).
10. Centrifugar a velocidade máxima por 15 mim.
11. Descartar o etanol.
12. Adicionar 200ul de TE e 30μl de acetato de sódio.
13. Precipitar novamente com etanol e incubar a -20°C por 1h
14. Centrifugar a velocidade máxima por 15 mim e descartar o sobrenadante.
15. Secar o "pellet" até que não restem vestígios de etanol.
16. Ressuspender o DNA em 25μl de etanol.

Tampão de eluição de bandas de géis de acrilamida:

Componente	Concentração
Acetato de amônio	0,5Mol/l
Acetato de magnésio	10 mMol/l
EDTA pH 8,0	1 mMol/l
SDS	0,1%

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R. I.; Ludwig, W.; & Schleifer, K. Z. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59: 143-169.
- Ampe, F. & Miambi, E. 2000. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. International Journal of Food Microbiology 60: 91-97.
- Batemam, M. A. 1972. The ecology of fruit flies. Annual Review of Entomology 17: 493-518.
- Borror, D. J.; Tripehorn, C. A. & Johnson, N. F. 1989. An Introduction to the Study of Insectes. 6ª ed., Harcourt Brace Jovanovich Coll. Push., USA.
- Boush, G. M. & Matsumura, F. 1967. Insecticidal degradation by *Pseudomona melophtora*, the bacterial symbiont of the apple Magot. Journal of Economic Entomology 60: 918-920.
- Boush, G. M.; Saleh, S. M. & Baranosky, R. M. 1972. Bacteria associated with the caribbean fruit fly. Environmental Ecology 1: 30-33.
- Cazemier, A. E.; Hackstein, J. P. H.; Op den Camp, H. J. M.; Rosenberg, J. & van der Griff, C. 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. Microbial Ecology 33: 189-197.
- Chao, A. & Lee, S. M. 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. Journal of American Statistic Association 87: 210-217.
- Colwell, R. K. 1997. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 6. User's Guide and application published at: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Daser, U. & Brandl, R. 1992. Microbial gut microbiota of eight species of Tephritids. Biological Journal of Linnean Society 40: 155-165.

- Douglas, A. E. 1998. Nutricional interactions in insect-microbial symbiosis: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual Review of Entomology 43: 17-38.
- Drew, R. A. I.; Coutice, A. C. & Teakle, D. S. 1983. Bacteria as a natural source of food for adult fruit flies (Diptera: Tephritidae). Oecologia 60: 279-284.
- Drew, R. A. I. & Lloyd, A. C. 1987. Relationship of fruit flies (diptera: tephritidae) and their bacteria to host plant. Annals of the Entomological Society of America 80: 629-636.
- Drew, R. A. I. & Lloyd, A. C. 1988. The role of Bacteria in the life cycle of Tephritid Fruit Flies.
- Farrelly, V.; Rainey, F. A. & Stackebrandt, E. 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Applied and environmental Microbiology 61: 2798-2801.
- Fischer, S. G. & Lerman, L., S. 1979. Length-independent separation of dna restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. Cell 16: 191-200.
- Girolami, V. 1986. Mediterranean Fruit Fly associated Bacteria: transmission and larval survival. In: Mangel, M. *et al.* (eds.) Pest Control: Operations and Analysis in Fruit Fly Management. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 135-146.
- Gotelli, N. J. & Colwell, R. K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. Ecology Letters 4: 379-391
- Head, I. M.; Saunders, J. R. & Pickup, R. W. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecology 35: 1-21.
- Headrick, D. H. & Goedem, R. D. 1998. The biology of nonfrugivorous Tephritid Fruit Flies. Annual Review of Entomology 43: 217-24.
- Howard, D. J.; Bush, G. L. & Breznak, J. A. 1985. The evolutionary significance of bacteria associated with *Rhagoletis*. Evolution 39: 405-417.

- Howard, D. J. & Bush, G. L. 1989. Influence of bacteria on larval survival and development in *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). Annals of the Entomological Society of America 82: 633-640.
- Jones, C. G. 1983. Microorganisms as mediators of plant resource exploitation by insect herbivores. In: Price, P. W.; Slobodchikoff, C. N. & Gand, W. S. (eds) A New Ecology: Novel Approaches to Interactive Systems, 53-99.
- Krebs, C. J. 1999. Ecological Methodology. Menlo Park, California.
- Legendre, P. & Legendre, L. 1998. Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Lewinsohn, T. M. 1991. Insects in flower heads of Asteraceae in Southeast Brazil: a case study on tropical species richness. In Price, P. W.; Lewinsohn, T. M.; Fernandes, W. & Benson, W. W. (eds) Plant-animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions John Wiley & Sons 525-559.
- Matioli, S. R. & Solferini, V. N. 1993. Studies of the complex interactions between *Anastrepha* fruit flies and microorganisms. In: Aluja, M. & Liedo, P. (eds) Fruit Flies, Biology and Management. Springer-Verlag New York, 145-150.
- Moretti, P. E. 1998. Estudo da microbiota do trato alimentar de insetos da família tephritidae que infestam asteráceas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Muyzer, G.; Wall, E. C. & Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied Environmental Microbiology 59: 695-700.
- Muyzer, G.; Hottenträger, S.; Teske, A. & Wawer, C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Molecular Microbial Ecology Manual 3.4.4.: 1-23 Kluwer Academic Publishers.
- Muyzer, G. 1998. Structure, function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach. In: Carvalho, G. R. (ed) Advances in Molecular Ecology. IOS Press, 87-117.

- Ohkuma, M. & Kudo, T. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Applied Environmental Microbiology 62: 461-468.
- Prado, P. I. K. L. 2000. Determinantes de ampla escala das associações entre insetos e plantas: Tefritídeos (Diptera) endófagos de capítulos de Asteraceae. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Petri, D. L. 1909. Ricerche sopra i batteri intestinali della mosca Olearia. Memorie della R. Stazione di Patologia Vegetale (Roma) 129 pp.
- Ratner, S. S. & Stoffolano, J. G. 1982. Development of the oesophageal bulb of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae); morphological, histological, and histochemical study. Annals of the Entomological Society of America 75: 555-562.
- Sheffield, V. C.; Cox, D. R.; Lerman, L. S. & Meyers, R. M. 1989. Attachment of a 40-base pair G+C rich sequence (GC clamp) to genomics DNA fragments by the polymerase chain reactions results in improved detection of single-base changes. Procedures of National Academy of Sciences USA 86: 232-236.
- Smith, E. P. & van Belle, G. 1984. Nonparametric estimation of species richness. Biometrics 40: 119-129.
- StatSoft, Inc. (1996). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoftinc.com, WEB: http://www.statsoftinc.com
- Suzuki, M. & Giovannoni, S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Applied and Environmental Microbiology 62: 625-630.
- White, I. M. & Elson-Harris, M. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. Redwood Press, LTD. Melksham, UK.
- Wintzingerode, F. v.; Göbel, U. B. & Stackebrand, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. Fems Microbiology Reviews 21: 213-229.