

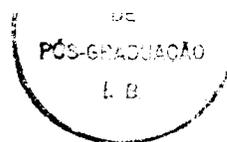
BC/34960

IB/81302

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

Departamento de Genética e Evolução



Paulo Eduardo Moretti

Estudo da Flora Bacteriana do Trato Alimentar de Insetos da família Tephritidae que Infestam Asteráceas

Tese apresentada ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
Depto. de Microbiologia e Imunologia - IB - UNICAMP

Co-orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini
Depto. de Genética e Evolução - IB - UNICAMP

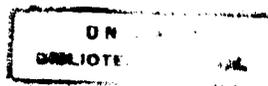
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Paulo Eduardo Moretti e aprovada pela Comissão Julgadora.

30/06/98
[Handwritten signature]

Campinas, 1998

T/UNICAMP

M817_e



UNIDADE IB
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
M817e
V. 0
T.º 34960
PR.º 395/98
S.º 0 | X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 04/05/98
N.º CPD 2100160654

Antes de tudo, agradeço ao Criador do Universo e Causa Primeira de todas as coisas, pela Vida, pela Consciência e por mais esta oportunidade de Progresso.

Banca Examinadora

Titulares

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira - orientador
Prof. Livre Docente
Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho
Prof. Titular
Departamento de Bioquímica - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas

Profª. Dra. Sílvia Maria Frigo
Profª. Dra. Adjunto IV (aposentada)
Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina

Profª. Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles
Profª. Dra. Associado I
Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Marcelo Brocchi
Pós-Doutorado
Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas

Suplentes

Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias
Prof. Livre Docente
Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Tadeu Elisbão
Prof. Dr. Titular IV
Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina.

Ficha Catalográfica preparada pela Biblioteca Central da UNICAMP

M817e	<p>Moretti, Paulo Eduardo.</p> <p>Estudo da flora bacteriana do trato alimentar de insetos da família Tephritidae que infestam asteráceas / Paulo Eduardo Moretti. Campinas, SP: [s.n.], 1998.</p> <p>Orientadores: Wanderley Dias da Silveira, Vera Nisaka Solferini.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Bactéria. 2. Enterobactéria - Identificação. 3. Genética. 4. Diptera. 5. Simbiose. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Solferini, Vera Nisaka. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título</p>
-------	---

Homenagem e Dedicatória

Aos meus pais Elza e Arnaldo, e à minha esposa Fátima, agradeço o constante apoio recebido no transcorrer deste trabalho. Agradeço, especialmente, seu incentivo, confiança e sua presença em todos os momentos. A eles dedico este trabalho.

Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Microbiologia e Imunologia e de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, com subvenção do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Abreviações utilizadas

°C: graus centígrados

Depto.: Departamento

IB: Instituto de Biologia

g: gramas ou aceleração da gravidade

Lab.: Laboratório

l: litro

M: molar

mg: micrograma

ml: microlitro

mM: micromoles

mA: miliamperes

ml: mililitro

N: normal

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
Barão Geraldo, Campinas, SP.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, às seguintes pessoas, que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho:

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, do Depto. de Microbiologia e Imunologia (IB-UNICAMP), pela orientação, amizade e dedicação a este trabalho.

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini, do Depto. de Genética e Evolução (IB-UNICAMP), pela orientação, auxílio e dedicação a este trabalho. Agradeço a doação de espécimes de tefritídios e o uso das dependências do Lab. de Biologia de Insetos do Depto. de Genética e Evolução.

Sr. Mestre Paulo Inácio de Knecht López de Prado, do Lab. de Interação Inseto-Planta do Depto. de Zoologia (IB-UNICAMP), pela colaboração, doação de inflorescências de asteráceas e identificação dos tefritídios adultos utilizados neste trabalho.

Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho, do Depto. de Bioquímica (IB-UNICAMP), por suas participações como membro da Pré-Banca, membro titular da Banca Examinadora e suplente da banca examinadora do Exame de Qualificação.

Profa. Dra. Sílvia Maria Frigo, professora aposentada do Depto. de Biologia Geral (CCB - Universidade Estadual de Londrina), por suas participações como membro da Pré-Banca e membro titular da Banca Examinadora.

Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles, do Departamento de Biologia Geral (CCB - Universidade Estadual de Londrina), por suas participações como membro da Pré-Banca e membro titular da Banca Examinadora.

Prof. Dr. Tadeu Elisbão, professor aposentado do Departamento de Biologia Geral (CCB - Universidade Estadual de Londrina), por sua participação como membro suplente da Banca Examinadora, pela revisão criteriosa do texto desta Tese, por suas sugestões e colaboração.

Profs. Dr. Cláudio Luiz Messias, do Depto. de Genética e Evolução (IB-UNICAMP), por suas participações como membro suplente da Banca Examinadora e membro titular da banca examinadora do Exame de Qualificação.

Profs. Dr. José Camillo Novello e Dr. Sérgio Marangoni, do Depto. de Bioquímica (IB-UNICAMP), pelas suas participações como membros titulares da banca examinadora do Exame de Qualificação e Profs. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Dra. Maricilda

Palandi de Mello, do Depto. de Genética e Evolução (IB-UNICAMP), pelas suas participações como membros suplentes da banca examinadora deste Exame.

Ao grupo do Projeto Biodiversidade de Fitófagos de Compostas (financiado pela FAPESP), coordenado pelo Prof. Dr. Thomas Lewinsohn, do Lab. de Interação Inseto-Planta do Depto. de Zoologia (IB-UNICAMP), pela doação de inflorescências de asteráceas e insetos.

Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, do Depto. de Microbiologia e Imunologia (IB-UNICAMP), pelo auxílio e orientação na identificação de amostras bacterianas.

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, do Depto. de Genética e Evolução (IB-UNICAMP), pela revisão criteriosa do texto desta Tese, por suas valiosas sugestões e colaboração.

Prof. Dr. Sérgio Russo Matioli do Depto. de Biologia (Instituto de Biociências - USP), pela revisão criteriosa do texto desta Tese, por suas valiosas sugestões e colaboração.

Profs. Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo e Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro pelas facilidades concedidas no uso das dependências do Depto. de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, para a realização deste trabalho.

Amigos do Lab. de Biologia Molecular Bacteriana, do Depto. de Microbiologia e Imunologia (IB-UNICAMP), Dra. Fabiana Fantinatti e Mestre Sérgio de Mendonça pela amizade e valiosa colaboração técnica em diversos experimentos realizados no transcorrer deste trabalho, bem como, pelo excelente relacionamento que tem marcado nossa convivência.

Amigos do Lab. de Biologia Molecular Bacteriana, do Depto. de Microbiologia e Imunologia (IB-UNICAMP), Alessandra Ferreira, Mestre Edmyr Rosa dos Reis, Dr. Marcelo Brocchi e Dra. Vanessa Sperandio, pela amizade, colaboração e pelo excelente relacionamento.

Professores do Depto. de Microbiologia e Imunologia (IB-UNICAMP), Dra. Clarisse Weis Arns, Dr. Domingos da Silva Leite, Dra. Lucila Costallat Ricci, Dra. Marlene Braide Serafim e Dr. Tomomasa Yano.

Professores do Depto. de Genética e Evolução (IB-UNICAMP), Dra. Cristine Haeckel e Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho.

Funcionários do Depto. de Genética e Evolução da UNICAMP, Teresinha Vieira A. de Pádua Chiodetto, Célia Aparecida Ribeiro Rosa Chiodetto e Herberth Luis dos Santos Moraes Silva, pela colaboração recebida.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Objetivos	1
1.2.	A família Tephritidae	1
1.3.	Relações Inseto-Hospedeiro	5
1.4.	O Sistema Digestivo	5
1.5.	Alimentação	7
1.6.	Bactérias Associadas a Tefritídios	9
1.6.1.	Bactérias associadas ao trato alimentar	9
1.6.2.	Transmissão de bactérias através de gerações de tefritídios	11
1.7.	A importância das bactérias associadas ao trato alimentar de tefritídios	12
1.7.1.	Bactérias como fonte de substâncias atrativas	12
1.7.2.	Simbiose	17
1.7.3.	Bactérias como fonte de alimento	22
2.	Material e Métodos	24
2.1.	Meios de cultura	24
2.1.1.	Meio mínimo (M9)	24
2.1.2.	Meio de aminoácidos	24
2.1.3.	Ágar de MacConkey	24
2.1.4.	LB	25
2.1.5.	LA e LA semi-sólido	25
2.1.6.	Meio para detecção de atividade amilolítica	25
2.1.7.	Meio para detecção de atividade celulolítica	25
2.2.	Soluções e tampões	26
2.2.1.	Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida	26
2.2.1.1.	Solução de acrilamida 30%:bis-acrilamida 2,7%	26
2.2.1.2.	Tampão de ressuspensão	26
2.2.1.3.	Tampão de corrida (tris-glicina)	26
2.2.2.	Soluções para revelação do gel de poliacrilamida	27
2.2.2.1.	Fixador	27
2.2.2.2.	Solução de nitrato de prata a 0,2%	27
2.2.2.3.	Solução de carbonato de sódio a 6%	27
2.2.2.4.	Solução “STOP”	28

2.3.	Obtenção de Tefritídios Adultos	28
2.3.1.	Coletas de inflorescências de asteráceas	28
2.3.2.	Manutenção e identificação dos tefritídios adultos	28
2.4.	Isolamento de Bactérias	28
2.4.1.	Enriquecimento de bactérias de <i>V. scorpoides</i>	28
2.4.2.	Isolamento de bactérias de órgãos do trato digestivo de tefritídios adultos	29
2.5.	Identificação das Amostras Bacterianas	29
2.5.1.	Seleção preliminar das amostras bacterianas	29
2.5.2.	Análise eletroforética de proteínas totais	30
2.5.2.1.	Extração de proteínas totais	30
2.5.2.2.	Preparo do gel de poliacrilamida	31
2.5.2.3.	Impregnação com prata	31
2.5.2.4.	Estabelecimento de grupos eletroforéticos	32
2.5.3.	Manutenção de culturas bacterianas	32
2.5.4.	Identificação das amostras bacterianas	32
2.6.	Amostras Bacterianas para Controle de Experimentos	33
2.7.	Detecção da Produção de Amilase e de Celulase	33
2.8.	Utilização de Diferentes Fontes de Carbono	34
3.	Resultados e Discussão	35
3.1.	Espécies de Tefritídios e Respectivos Hospedeiros	35
3.2.	Isolamento de Bactérias do Trato Digestivo	35
3.3.	Caracterização das Amostras Bacterianas	38
3.3.1.	Seleção preliminar das amostras	38
3.3.2.	Análise eletroforética de proteínas totais	38
3.3.3.	Identificação das amostras bacterianas	39
3.4.	Distribuição de gêneros bacterianos	41
3.4.1.	Em órgãos do trato alimentar	41
3.4.2.	Entre as diferentes espécies de tefritídios	44
3.4.3.	Em <i>V. scorpoides</i>	46
3.5.	Utilização de Diferentes Fontes de Carbono	47
3.6.	Grupos Eletroforéticos	49
3.7.	Identificação Bacteriana	51
3.8.	Simbiose	52
3.9.	Considerações Gerais	57

3.10.	Conclusões	61
4.	Resumo	64
5.	Summary	66
6.	Bibliografia	68

Índice de Tabelas

Tabela I	Amostras bacterianas para controle de experimentos	33
Tabela II	Procedência e resposta ao cultivo de bactérias presentes em órgãos do trato digestivo de tefritídios originados de 2 regiões geográficas distintas	37
Tabela III	Distribuição de amostras bacterianas em diferentes espécies de tefritídios	40
Tabela IV	Distribuição e frequências de ocorrência de bactérias em órgãos do trato digestivo das espécies de tefritídios investigadas	41
Tabela V	Utilização de diferentes fontes de carbono	49
Tabela VI	Grupos Eletroforéticos 1 a 3	50
Tabela VIII	Grupos Eletroforéticos 4 a 8	50

1. Introdução

1.1. Objetivos

A presença de bactérias no trato digestivo de insetos da família Tephritidae é reconhecida desde o início do século e foi detectada em praticamente todas as espécies de tefritídeos estudadas desde então. Vários autores consideram essas bactérias como simbiotes que estariam atuando como fontes de nutrientes ou como fontes de substâncias atrativas que poderiam ser importantes para o reconhecimento dos sítios de alimentação e acasalamento desses insetos.

Apesar de membros da família Enterobacteriaceae terem sido isolados com muita frequência dos órgãos digestivos de tefritídeos, a exata constituição da flora bacteriana desses insetos não está estabelecida e a importância de sua associação com esses insetos ainda não foi esclarecida.

A maioria dos estudos com o propósito de investigar a função da microflora do trato alimentar de tefritídeos foi realizada em espécies que atacam frutos de importância comercial. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de investigar a flora bacteriana do trato digestivo de oito espécies de tefritídeos pertencendo a quatro gêneros que infestam inflorescências de asteráceas (Asteraceae). O propósito deste estudo foi o de verificar que espécies bacterianas ocorrem no trato digestivo desses insetos, se a microflora é espécie-específica e se há alguma associação entre uma espécie de tefritídeo com uma flora particular.

1.2. A Família Tephritidae

A família Tephritidae (Diptera) apresenta distribuição mundial, sendo composta por espécies de insetos que habitam regiões temperadas (por exemplo, *Rhagoletis* spp) e as que habitam regiões mais quentes, como os climas mediterrâneo e tropical (por exemplo, *Dacus* spp, *Bactrocera* spp e *Anastrepha* spp). A diversidade de ambientes aos quais as espécies estão adaptadas é ampla, não havendo um determinante conhecido responsável pela abundância populacional desses insetos (Bateman, 1972).

A família Tephritidae inclui cerca de quatro mil espécies distribuídas em quinhentos gêneros, estando entre as maiores famílias da ordem Diptera e uma das mais importantes sob o ponto de vista econômico. Cerca de 35% das espécies atacam frutos carnosos, incluindo muitas frutas comerciais. As larvas de 40% das espécies desenvolvem-se em capítulos de asteráceas. A maioria das espécies remanescentes estão associadas a flores de

outras famílias. Muito poucas espécies de biologia conhecida são não-fitófagas (White & Elson-Harris, 1992).

Os membros adultos da família Tephritidae são insetos de tamanho médio a pequeno, de coloração corporal escura com bandas claras no abdômem e asas que apresentam manchas formando padrões complicados e atraentes. A vida dos adultos varia grandemente conforme a espécie, de menos de um mês até cerca de um ano. As fêmeas apresentam um aparelho ovipositor proeminente, longo e extensível. As espécies associadas a frutos ovipositam na polpa do fruto e aquelas associadas a flores ovipositam entre as partes da flor. Os insetos adultos são encontrados em flores ou na folhagem. Uma importante característica biológica da família Tephritidae é o parasitismo de tecidos vegetais. As larvas de muitas espécies desse grupo de insetos são importantes pragas agrícolas; alimentam-se e desenvolvem-se em matéria vegetal fresca, vivendo em frutos, capítulos de asteráceas ou formando galhas no hospedeiro (Borror *et al.*, 1989; White & Elson-Harris, 1992; Foote *et al.*, 1993).

A família Tephritidae é distribuída em quatro sub-famílias: Dacinae (*Bactrocera* e *Dacus*), Trypetinae (*Anastrepha*, *Ceratitis*, *Phylophila* e *Rhagoletis*), Tephritinae (*Acanthiophilus*, *Cerellia*, *Chaetorellia*, *Noeëta*, *Tephritis*, *Tomoplagia*, *Trupanea*, *Trypanea* e *Xanthaciura*) e Urophorinae (*Ensina* e *Urophora*) (Borror *et al.*, 1989; Girolami 1982; Daser & Brandl, 1992; Foote *et al.*, 1993). Na sub-família Tephritinae, *Trupanea* representa um dos maiores gêneros de tefritídeos com mais de duzentas espécies descritas. As espécies neotrópicas nunca passaram por revisão taxonômica (Foote *et al.*, 1993).

As espécies das sub-famílias Dacine e Trypetinae são primariamente associados a frutos carnosos; as espécies da sub-família Tephritinae são primariamente associadas a capítulos de asteráceas e outras estruturas vegetais; as espécies da sub-família Urophorinae formam galhas em capítulos de asteráceas (Borror *et al.*, 1989; White & Elson-Harris, 1992; Foote *et al.*, 1993).

As espécies que infestam frutos são altamente destrutivas e são responsáveis por grandes prejuízos econômicos em pomares de azeitona, cereja, goiaba, laranja, maçã, melão, mamão, pera, pêssego e de vários outros frutos.

Dentre as espécies de tefritídeos mais importantes do ponto de vista econômico, destacam-se as pragas da maçã, *Rhagoletis pomonella*; da cereja, *Rhagoletis cingulata* e *Rhagoletis fausta*; da uva, *Epochra canadensis*; do melão, *Bactrocera cucurbitae* e da azeitona, *Bactrocera oleae*. As espécies *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha obliqua* e

Anastrepha ludens são de particular importância devido à sua ampla distribuição geográfica e por infestarem muitos hospedeiros de importância econômica. A espécie *Ceratitidis capitata* é considerada a praga principal de frutas cítricas, explorando frutos do clima mediterrâneo além de ser amplamente disseminada em muitas áreas, particularmente em regiões tropicais. No Brasil, esta espécie infesta vinte e sete hospedeiros diferentes, representando, portanto, um problema sério para a indústria da fruticultura (Malavasi *et al.*, 1980).

Devido a sua notória importância econômica, vários grupos de pesquisadores vêm, desde longa data (Petri, 1904), dedicando-se ao estudo da biologia dos tefritídeos que infestam frutos e ao desenvolvimento de métodos de controle populacional (Steiner, 1952; Steiner *et al.* 1965a; Steiner *et al.*, 1965b; Prokopy *et al.*, 1993a; Maccollom *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1994; Headrick & Goeden, 1996; Sivinski *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1997).

A grande maioria da espécies da sub-família Tephritinae infesta capítulos de compostas. A maioria das espécies desta sub-família estão restritas a um gênero ou grupo de gêneros afins de asteráceas (Foote *et al.*, 1993; Lewinsohn & Prado, no prelo; Lewinsohn *et al.*, dados inéditos).

Muitos tefritídeos que infestam asteráceas induzem galhas em seus hospedeiros, incluindo as de raízes, caule e ramos, e galhas escondidas dentro dos capítulos. O gênero *Urophora* (quase cem espécies) compreende espécies formadoras de galhas em capítulos de asteráceas (White & Elson-Harris, 1992). Por exemplo, as galhas formadas por *Urophora cuspidata* são caracterizadas por áreas localmente lignificadas nas quais as larvas ficam inclusas (Daser & Brandl, 1992).

O estudo dos tefritídeos que infestam inflorescências de compostas apresenta importância tanto econômica quanto prática: algumas são pragas de plantas cultivadas e outras são usadas como controle biológico de compostas que representam pragas agrícolas.

Na Europa, flores de alface (*Lactuca sativa*) são atacadas por *Trupanea amoena* causando prejuízos econômicos quando a plantação é para produção de sementes e *Tephritis anicae* ataca planta medicinal arnica (*Arnica montana*). Um pouco de espécies de tefritídeos atacam asteráceas que são fontes menores de látex: *Ensina sonchi*, *Paroxyna producta* e *Trupanea stellata*. Flores ornamentais como o Crisântemo, são atacadas na Inglaterra e na Coreia por *Campiglossa hirayamae* e *Campiglossa misela*, respectivamente. Na África do Sul *Craspedoxantha marginalis* ataca Dális (*Dahlia* sp) e Zínias (*Zinnia elegans*) (White & Elson-Harris, 1992).

Existem várias espécies benéficas de tefritídeos associados a asteráceas que têm sido utilizadas como agentes de controle biológico de plantas da família Asteraceae que são ervas daninhas importantes. Na Europa, *Tephritis dilacerata* ataca capítulos de *Sonchus arvensis*; *Terillia virens* e *Terillia uncinata* atacam *Centaurea maculosa* e *Cirsium solstitialis*. A maioria das espécies de *Urophora* atacam capítulos de cardos, muitos dos quais são pragas: *Urophora affinis* e *Urophora quadrifasciata* atacam *Centaurea diffusa* e *C. maculosa*, que são pragas sérias no oeste da América do Norte; *Urophora cardui* ataca o cardo canadense *Cirsium arvense*. Na Europa *U. cardui* ataca *S. arvensis*, *U. cuspidata* ataca *Centaurea scabiosa*, *Urophora jaceana* ataca *Centaurea jacea*, *Urophora solstitialis* ataca *Carduus nutans* e *Urophora stylata* ataca *Cirsium vulgare* (White & Elson-Harris, 1992).

No Brasil, desde 1986, T.M. Lewinsohn e colaboradores têm estudado a ecologia das associações das espécies nativas de tefritídeos a capítulos de asteráceas. Não há registros de tefritídeos associados a compostas que tenham importância econômica no país (Lewinsohn, 1988; Lewinsohn, 1991; Prado & Lewinsohn, 1994; Lewinsohn *et al.*, 1998).

Como exemplo de ciclo vital dos tefritídeos que infestam frutos, pode-se citar aquele de *R. pomonella*. Adultos desta espécie são encontrados em pomares de maçã nos meses de verão. A fêmea perfura a superfície da maçã com seu aparelho ovipositor e deposita um ou mais ovos em cada fruta. As larvas perfuram e penetram na polpa, crescendo até cerca de seis milímetros de comprimento. Após a queda da maçã, as larvas penetram por cerca de três centímetros no solo, onde passam o inverno e a primavera, na forma de pupa. Os adultos emergem na primavera. Estes têm cerca de seis milímetros de comprimento e apresentam coloração corporal escura com bandas claras no abdômen e asas com padrões escuros.

As fêmeas dos tefritídeos que infestam asteráceas ovipõem nos capítulos, no interior dos quais as larvas se desenvolvem, consumindo flores, frutos, óvulos e seiva (Borror *et al.*, 1989). Por exemplo, adultos da espécie *T. conura* ovipositam no verão. Suas larvas emergem como adultos após passar a fase de pupa nos capítulos (Romstöck, 1987 *apud* Daser & Brandl, 1992). Esses tefritídeos completam o desenvolvimento do ovo para o imago (forma sexualmente adulta) em quatro a seis semanas (Shorthouse, 1980 *apud* Daser & Brandl, 1992). Tipicamente, todos os formadores de galhas hibernam no interior das galhas na forma de larvas do último instar (Borror *et al.*, 1989; Foote *et al.*, 1993).

1.3. Relações Inseto-Hospedeiro

A maioria das espécies de tefritídeos está restrita a famílias, gêneros e até mesmo espécies de hospedeiros. A planta hospedeira não é apenas o sítio de alimentação para as larvas, pois é reconhecido que desempenhe um papel mais significativo, fornecendo aos adultos um sítio de agregação, abrigo, alimentação e de acasalamento (Bush, 1969; Boller & Prokopy, 1976; Grewal & Kapoor, 1984; Lewinsohn, 1988; Lewinsohn, 1991; Prado & Lewinsohn, 1994; Lewinsohn *et al.*, 1998).

Drew (1987) propôs que o acasalamento restrito a um hospedeiro particular apresenta vantagens significativas para as espécies de tefritídeos, tais como: (1) a maximização do sucesso reprodutivo, principalmente em temporadas de baixa densidade populacional; (2) a manutenção da demanda energética do inseto no sentido de que a fêmea possa desenvolver óvulos férteis após ter encontrado o sítio de oviposição; (3) a manutenção do reservatório genético da população e (4) e no processo de especiação.

Segundo esse autor, se indivíduos de ambos os sexos não se encontram na planta hospedeira, estes não são capazes de reconhecer seus parceiros co-específicos. Desta forma, a busca de parceiros tem muito em comum com a busca de alimento e os sítios de encontro de parceiros co-específicos encontram-se em áreas de recursos valiosos para as fêmeas. Em tais áreas, as fêmeas se agregam para alimentar-se, para produção de ovos e oviposição. A detecção do hospedeiro é de importância vital para o processo da corte, acasalamento, oviposição e alimentação larval. Os processos pelos quais o inseto adulto detecta seu hospedeiro não são bem conhecidos e requerem estudos mais aprofundados. Estímulos químicos e visuais estão envolvidos no processo. Os estímulos químicos no hospedeiro provavelmente funcionam como atrativos e fixadores, enquanto que os estímulos visuais são provavelmente atrativos.

1.4. O Sistema Digestivo

O sistema digestivo dos tefritídeos é composto, basicamente, por um túbulo que se estende da boca ao ânus, composto pelo esôfago, divertículo esofágico, papo e intestino, embora existam diferenças anatômicas entre espécies pertencentes às várias sub-famílias (Girolami, 1973; Solferini, 1990). Como exemplo, será brevemente descrito o modelo geral dos tratos digestivos de adultos e larvas de tefritídeos, segundo (Girolami, 1973).

No adulto, o tubo digestivo compreende três regiões: os intestinos anterior, médio e posterior. O intestino anterior compreende o esôfago com um apêndice cefálico bulboso (o bulbo ou divertículo esofágico) e um anexo abdominal do tubo digestivo (o papo) ligado a

este por um duto. A porção torácica do intestino médio é retilínea e a abdominal é enovelada. O intestino médio termina na inserção dos túbulos de Malpighi, onde tem início o intestino posterior, um túbulo menos enovelado, do qual fazem parte as glândulas retais.

Na larva, o sistema digestivo apresenta uma anatomia bem mais simples, sendo constituído por um túbulo dividido em três regiões: os intestinos anterior, médio e posterior. A extremidade anterior do intestino médio apresenta quatro pequenos cecos gástricos, aos quais sucede um túbulo retilíneo seguido por uma porção enovelada até o início do intestino posterior de onde saem os túbulos de Malpighi. O intestino posterior segue aproximadamente retilíneo até o ânus.

Solferini (1990) analisando o percurso do alimento através do trato digestivo de adultos de *A. fraterculus*, observou que uma porção do material ingerido passa pelo divertículo esofágico e chega ao papo através do seu duto. Esses insetos ingerem o alimento até a saturação do papo. Cerca de três horas após o início da alimentação, o alimento percorreu todo o tubo digestivo aparecendo as primeiras gotas fecais.

Em adultos de *A. fraterculus*, existe uma região ácida na porção mediana do intestino médio que limita duas outras, onde há ocorrência de bactérias: a região anterior, representada principalmente pelo divertículo esofágico e a região terminal do tubo digestivo. Solferini (1990) argumenta que, embora essas regiões do trato digestivo sejam provavelmente colonizadas pelas mesmas amostras bacterianas, as duas populações têm funções distintas. A população da porção anterior é relacionada com a alimentação e a da porção posterior, com a inoculação dos ovos, o que leva à infecção das larvas por bactérias. Estas, desempenharão um papel importante na alimentação das larvas e no posterior desenvolvimento das formas adultas, como será visto mais adiante. Essa região pode estar relacionada a mecanismos de digestão bacteriana.

O divertículo esofágico foi descrito por Petri (1909) em *B. oleae*. A presença dessa estrutura parece ser característica da família Tephritidae, apresentando variações morfológicas em diferentes espécies (Girolami, 1973). A função exata do divertículo esofágico não está esclarecida e parece não haver indicações de que participe ativamente dos processos digestivos dos tefritídios (Rattner & Stoffolano, 1982; Rattner & Stoffolano, 1984).

Petri (1909) admitiu que a função do divertículo esofágico é a de manutenção de bactérias simbiotes em *B. oleae*. A hipótese de que este órgão tenha a função de abrigar bactérias (Rattner & Stoffolano, 1982; Rattner & Stoffolano, 1984) é controversa pois, a presença de bactérias no divertículo esofágico não é absolutamente regular (Lüthy *et al.*, 1983; Lloyd *et al.*, 1986).

1.5. Alimentação

A alimentação básica dos tefritídeos adultos na natureza não está estabelecida mas, de toda forma, deve suprir os requerimentos necessários para a alta produção e a viabilidade dos ovos (sucesso reprodutivo) e garantir o desenvolvimento normal de larvas e adultos.

As larvas desses insetos alimentam-se dos tecidos vegetais que infestam, sejam frutos ou inflorescências. A adequação nutricional dos tecidos vegetais é incerta. Os tecidos de frutos são pobres em proteína e há evidências de que bactérias fornecem nutrientes essenciais (Fletche, 1987 *apud* White & Elson-Harris, 1992).

Por exemplo, os tecidos de azeitonas frescas são inadequados ao desenvolvimento e sobrevivência de larvas de *B. oleae*, na ausência de bactérias associadas ao trato digestivo de larvas e adultos dessa espécie (Haggen, 1966). Supõe-se que a ação bacteriana seja responsável pela hidrólise das proteínas dos frutos, o que permitiria sua utilização pelas larvas, além do fornecimento de nutrientes suplementares (Fytizas & Tzanakakis, 1966a; Haggen, 1966; Tzanakakis & Lambrou, 1975; Tzanakakis *et al.*, 1975; Tzanakakis & Stavrinides, 1973).

Haggen (1966), considera que larvas de tefritídeos, quando na infestação de um fruto, ingiram e depois reingiram material de tecidos que foram expostos à ação de sua flora bacteriana intestinal, a qual poderia produzir compostos nutricionais suplementares.

Por outro lado, as larvas de *R. pomonella* parecem não depender da ação prévia de simbiossiontes para a exploração dos tecidos da maçã, como fonte de alimento (Howard, 1989).

A nutrição no estágio larval pode influenciar a sobrevivência e a fecundidade da forma adulta. Larvas alimentando-se de tecidos de frutos de seus hospedeiros naturais apresentam maior longevidade e fecundidade do que quando utilizam outros tipos de frutos como substrato para sua alimentação (Bateman, 1972).

Todos os adultos requerem uma fonte de carboidratos e suprimento de água para sua sobrevivência. A maioria das espécies requer uma variedade de nutrientes adicionais, incluindo-se aminoácidos para assegurar a maturidade sexual.

Tefritídeos adultos têm sido observados alimentando-se de uma grande variedade de produtos naturais, incluindo sucos e tecidos de frutos injuriados ou em decomposição, seiva de plantas, néctar de flores e fezes de pássaros (Hendrichs & Hendrichs, 1990). Adultos de muitas espécies dispõem grande parte de tempo vagando na superfície de frutos e de folhas, continuamente protraindo e retraindo suas probóscides, aparentemente alimentando-se, mas a fonte precisa de alimento não foi satisfatoriamente identificada (Bateman, 1972).

Outros autores (Neilson & Wood, 1966; Boush *et al.*, 1969) sugerem que a principal fonte de proteínas são os exudatos vegetais ou de insetos. Drew *et al.* (1983) sugerem que os nutrientes provenientes de bactérias simbiotes ou de bactérias ingeridas pelo inseto durante a sua alimentação, suprem a falta de nutrientes essenciais ausentes na alimentação de origem vegetal. Haggren (1966) e Miyasaki *et al.* (1968) sugerem que bactérias associadas a *B. oleae* e *R. pomonella* são responsáveis pela hidrólise das proteínas dos frutos explorados por essas espécies. Excrementos de animais, notadamente os de aves, podem ser fontes de proteína de origem bacteriana, como foi sugerido por outros autores (Hendrichs & Hendrichs, 1990; Hendrichs *et al.*, 1993; Prokopy *et al.*, 1993a; Prokopy *et al.*, 1993b).

Dietas quimicamente definidas foram desenvolvidas para *R. pomonella*. Adultos alimentados com misturas de aminoácidos, vitaminas, sacarose e água apresentaram maior longevidade e maior taxa de oviposição que aqueles alimentados com dietas não definidas (Neilson, 1965).

Alimentação experimental com exudatos de insetos, complementados com pólen, comprovou ser eficiente para a sobrevivência e reprodução de *B. oleae* (Tsiropoulos, 1977). Este autor demonstrou que a dieta ideal para essa espécie deve conter carboidratos, aminoácidos, colesterol e vitaminas.

Exudatos de afídios são fontes importantes de alimento para os tefritídios na natureza (Buchner, 1965; Neilson & Wood, 1966), mas os aminoácidos triptofano e cisteína ou estão ausentes ou estão presentes em baixas concentrações em exudatos de muitas espécies de homópteros (Craig, 1960). Possivelmente, estas fontes de alimentos não representam dietas completas (Bateman, 1972). Para os tefritídios, fontes adequadas de proteínas são essenciais para assegurar o amadurecimento do aparelho reprodutor da fêmea (Drew & Lloyd, 1987), enquanto que a quantidade de alimento disponível é um dos determinantes mais importantes para sua abundância populacional (Bateman, 1972).

Vários autores sugeriram que microrganismos poderiam estar envolvidos na produção de nutrientes essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento dos tefritídios. Uma bactéria identificada como *Phytomonas (Pseudomonas) melophthora*, associada à *R. pomonella* (Allen, 1931; Allen & Riker, 1932; Allen *et al.*, 1934, *apud* Howard *et al.*, 1985) é capaz de sintetizar metionina e cisteína, dois aminoácidos essenciais, não encontrados em maçãs (Miyasaki *et al.*, 1968). De fato, bactérias simbiotes são comumente encontradas em insetos cuja dieta não é balanceada devido à falta de vitaminas ou aminoácidos, como no caso de insetos sugadores de seiva vegetal mas, sua presença não é co-

num em insetos que se alimentam de sementes, frutas imaturas e folhas (Girolami, 1982). A família Tephritidae apresenta uma situação complexa. Os insetos pertencentes às sub-famílias Dacinae e Trypetinae alimentam-se de frutos ou folhas (gênero *Phylophila*) e os membros das sub-famílias Tephritinae e Urophorinae alimentam-se em inflorescências de asteráceas (Borror *et al.*, 1989; Girolami, 1982; Foote *et al.*, 1993). Girolami (1982) refere-se a sementes imaturas e capítulos de asteráceas como materiais nutricionalmente completos e a frutas como menos balanceadas. Segundo ele, como larvas de tefritídeos que infestam frutos não se alimentam de sementes, pode-se supor, nesse caso, a existência de simbioses associados às larvas.

1.6. Bactérias Associadas a Tefritídeos

1.6.1. Bactérias associadas ao trato alimentar

A presença de bactérias no trato alimentar de tefritídeos foi relatada pela primeira vez por Petri (1904) em estudos realizados no parasita da azeitona, *B. oleae*. Esse autor observou modificações no intestino médio (cecos) das larvas de *B. oleae* e que foram interpretadas como estruturas destinadas à acomodação de bactérias específicas. Posteriormente, vários autores demonstraram a ampla ocorrência de bactérias no trato digestivo de muitas espécies de tefritídeos, tanto em larvas como em adultos, embora ainda não se tenha determinado o seu papel exato no metabolismo desses insetos (Allen, 1931; Allen & Riker, 1932; Allen *et al.*, 1934, *apud* Howard *et al.*, 1985; Haggen, 1966; Boush *et al.*, 1972; Girolami 1986). A presença dessas bactérias também ocorre na superfície externa do corpo dos mesmos, em condições naturais (Bateman, 1972).

A flora bacteriana associada ao trato digestivo dos tefritídeos é bastante diversa, com grande número de gêneros e ocupando sítios onde simbioses deveriam ser encontrados, como o divertículo esofágico, o papo e o intestino. Apesar de muitas dessas bactérias não terem sido identificadas, membros da família Enterobacteriaceae ocorrem amplamente na flora bacteriana de espécies de tefritídeos que infestam frutos ou asteráceas. Bactérias como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia* spp, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus* spp, *Providencia* spp, *Serratia* spp (Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990; Jang & Nishigima, 1990), *Shigella dysenteriae* e *Yersinia* sp (Solferini, 1990), parecem ser integrantes comuns da flora bacteriana de tefritídeos que infestam frutos. Neste grupo de insetos, as bactérias *K. oxytoca*, *Klebsiella ozaenae* e *E. cloacae* foram as espécies mais frequentemente isoladas (Drew *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1985; Drew & Lloyd, 1987; Solferini, 1990). A bactéria *K. oxytoca* mostra-se como a

espécie predominante, tendo sido encontrada em *R. pomonella* (Dean & Chapman, 1973; Rossiter *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1985; Howard & Bush, 1989), *Bactrocera* spp (Lloyd *et al.*, 1986) e em *Anastrepha* sp (Solferini, 1990). Menos frequentemente têm sido relatadas as espécies *Alcaligenes* sp, *Cedecea* sp, *Kluyvera* sp, *Moraxella nonliquefasciens* e *Pseudomonas mendocina*, além de bactérias Gram-positivas como *Bacillus liqueniformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Kurtia* sp, *Micrococcus roseus* e *Staphylococcus* sp (Stamopoulos & Tzanakakis, 1988).

Lloyd *et al.* (1986) isolaram e identificaram as bactérias associadas ao sistema digestivo de quatro espécies de *Bactrocera* e às suas plantas hospedeiras. Geralmente, as bactérias presentes no trato alimentar dos insetos eram, também, isoladas na superfície de frutos por eles infestados. A maioria dessas bactérias pertencia à família Enterobacteriaceae; as espécies predominantemente isoladas foram *K. oxytoca*, *E. cloacae* e *Erwinia herbicola*.

Drew & Lloyd (1987) trabalhando com uma linhagem selvagem e uma de laboratório de *Bactrocera tryoni* observaram que ambas eram portadoras de bactérias dos mesmos tipos encontrados por Lloyd *et al.* (1986).

Drew & Lloyd (1987), suplementando a dieta de *B. tryoni* com uma linhagem mutante de *K. oxytoca* resistente aos antimicrobianos rifampicina e estreptomicina, verificaram que essa bactéria era recuperada em grande número do papo e do intestino de todos os indivíduos ensaiados, em até treze dias após o início da dieta. O fato indica que o trato alimentar dessa espécie de tefritídeo oferece excelentes condições para o estabelecimento de populações bacterianas.

Daser & Brandl (1992) relataram o isolamento de bactérias do gênero *Enterobacter* presente de modo aparentemente particular nos órgãos digestivos de indivíduos adultos de *Rhagoletis alternata* (que infesta frutos de *Rosa canina*) coletados de quatro diferentes habitats. Em duas espécies de *Urophora*, esses autores verificaram a presença dos gêneros *Enterobacter* e *Erwinia* associados de modo aparentemente específico com os tratos digestivos de adultos de *U. cuspidata* e *U. solstitialis*, respectivamente.

A origem precisa das bactérias associadas a tefritídeos é incerta e esses microrganismos disseminam-se nos hospedeiros em consequência dos processos de regurgitação e reingestão do conteúdo do trato digestivo durante a alimentação (Drew & Lloyd, 1987).

1.6.2. Transmissão de bactérias através de gerações de tefritídios

Petri (1904; 1909; 1910) observou que a parede dorsal do reto da fêmea adulta de *B. oleae* apresenta uma complexa série de projeções ou “criptas retais” onde ocorre a presença de bactérias. Os ovos descendo pelo oviduto são pressionados contra as aberturas das criptas sendo contaminados com bactérias imediatamente antes de serem depositados no hospedeiro. As bactérias penetram nos ovos pela micrópila e multiplicam-se nas larvas em desenvolvimento, localizando-se posteriormente, nos cecos do intestino médio das larvas, ainda em estado embrionário (Mazzini & Vitta, 1981). As bactérias iniciam a infecção do adulto a partir do divertículo esofágico de onde disseminam-se pelo canal alimentar do adulto e colonizam as criptas retais para recomeçar o ciclo. Este não é um modelo padrão para todos os tefritídios, existindo diferenças no desenvolvimento de adaptações para manutenção e transmissão de bactérias entre espécies das sub-famílias Trypetinae, Tephritinae e Dacinae (Hellmuth, 1956 *apud* Daser & Brandl, 1992). Adultos de *Bactrocera dorsalis* e de *B. cucurbitae* não apresentam as criptas retais, mas possuem um divertículo esofágico e uma abertura longitudinal entre o reto e a vagina, o que, provavelmente, facilita a transmissão de bactérias (Bateman, 1972).

A transmissão das bactérias entre gerações de tefritídios foi demonstrada em *A. ludens* por Rubio & McFadden (1966). Posteriormente, Drew & Lloyd (1987) demonstraram, experimentalmente, que uma linhagem mutante de *K. oxytoca* resistente a antimicrobianos, quando acrescentada à alimentação de *B. tryoni*, estabelecia-se no seu trato alimentar e distribuía-se em suas estruturas bucais. Essa bactéria podia ser recuperada da superfície de frutos infestados por esse inseto, bem como de sítios de oviposição, resultando na sua predominância em frutos injuriados por suas larvas. A dispersão da bactéria era causada pela constante ingestão e regurgitação do conteúdo do trato alimentar.

(Daser & Brandl, 1992) verificaram que larvas de *T. dilacerata* e larvas de cinco espécies do gênero *Urophora* (*U. cardui*, *U. cuspidata*, *U. jaceana*, *U. solstitialis* e *U. stylata*) não abrigavam bactérias no trato digestivo e que indivíduos adultos dessas espécies, coletados no campo, continham bactérias no trato intestinal. Esses autores consideraram que as bactérias eram adquiridas pelos insetos adultos através da alimentação (ou de forma casual) e que, nestas espécies, a transmissão de bactérias de uma geração para a outra, durante o processo da oviposição, seria improvável.

1.7. A Importância das Bactérias Associadas ao Trato Alimentar de Tefritídeos

A maioria dos estudiosos vêem muitas das associações entre insetos e microrganismos como sendo uma relação mutualística. Tem sido proposto que as bactérias contribuam para a dieta dos tefritídeos, fornecendo-lhes nutrientes essenciais (Miyasaki *et al.*, 1968; Tzanakakis & Lambrou, 1975; Tzanakakis *et al.*, 1975; Tzanakakis & Stavrínides, 1973; Lambrou & Tzanakakis, 1978; Tsiropoulos, 1981; Courtice & Drew, 1983; Drew *et al.*, 1983) ou auxiliando na digestão de compostos vegetais indigeríveis pelo inseto, produzindo enzimas pectinolíticas (Howard *et al.*, 1985). Esses microrganismos poderiam, ainda, estar atuando na degradação de pesticidas, detoxificando a alimentação dos tefritídeos (Boush & Matsumara, 1967).

1.7.1. Bactérias como fonte de substâncias atrativas

Existem evidências de que “odores bacterianos” são fontes importantes de atrativos para tefritídeos. A atratividade exercida por tais odores (compostos voláteis originados da ação da bactéria sobre os tecidos do hospedeiro ou do seu próprio metabolismo) foi observada por vários autores (Bateman & Morton, 1981; Drew *et al.*, 1983; Drew, 1987).

Estudos de laboratório realizados por Drew *et al.* (1983) com duas espécies de *Bactrocera* (*B. cacuminatus* e *B. tryoni*) observaram que bactérias isoladas dos tratamentos digestivos de insetos de ambas as espécies, quando em processo de alimentação, lhes são altamente atrativas.

Um ensaio de campo realizado por Drew & Lloyd (1987) revelou que um hospedeiro de *B. tryoni* (nectarina) tornava-se muito mais atrativo para essa espécie de tefritídeo após onze dias a partir do início da infestação por um pequeno número inicial de indivíduos. Os primeiros grupos de insetos a ocuparem a planta hospedeira poderiam ter sido atraídos por estímulos visuais e olfativos. Contudo, o grande influxo desses insetos após a chegada dos primeiros grupos e o subsequente aumento de sua população sugeria que, de algum modo, a planta hospedeira havia se tornado mais atrativa. A comparação das populações bacterianas presentes nas superfícies dos frutos antes e depois da infestação revelou que após o período de tempo inicial, toda a população bacteriana original da superfície dos frutos fora substituída pelas bactérias associadas à *B. tryoni* (as bactérias associadas ao tefritídeo não foram isoladas da superfície dos frutos antes da infestação). Esses autores sugerem que o comportamento alimentar característico dos tefritídeos (regurgitação e reingestão do conteúdo do trato digestivo) tenha disseminado as bactérias associadas ao seu trato alimentar, pela superfície dos frutos. O estabelecimento dessa nova população bacteriana teria servido

como uma forte fonte de estímulo atrativo adicional. Os mesmos autores observaram que o aumento da atratividade coincidia com um aumento considerável da nova população bacteriana na superfície dos frutos. As espécies bacterianas associadas a esses insetos eram, predominantemente, *K. oxytoca*, *E. cloacae* e *E. herbicola*. A presença dessas bactérias pode significar um enriquecimento da dieta de tefritídios que se alimentam na superfície dos frutos.

Drew & Lloyd (1987) sugerem que odores provenientes das populações bacterianas introduzidas nos frutos hospedeiros pelos próprios tefritídios, durante a infestação, estariam atuando como fontes de atração. Estes autores não determinaram se tais odores se originavam do próprio metabolismo bacteriano ou dos tecidos dos frutos infestados, como resultado da ação bacteriana.

O fato pode significar que componentes derivados de odores bacterianos possam servir como estímulo para alimentação e oviposição. Note-se que a população bacteriana que parece ter atuado como fonte de atração foi introduzida no hospedeiro pelos próprios insetos. Drew & Lloyd (1987) sugerem que possa haver mecanismos tanto de atração como de marcação do hospedeiro específico, mediado por bactérias associadas ao trato alimentar de tefritídios. Esses autores argumentam que tais mecanismos desempenhariam um papel vital no comportamento desses insetos, embora outros fatores de reconhecimento específico devam estar envolvidos. Argumentam, ainda, que o fato desses insetos permanecerem sobre as folhas de seus hospedeiros por, pelo menos, três semanas após a queda total dos frutos, indica que há algum estímulo atrativo além da simples visualização do fruto. As populações bacterianas associadas ao trato digestivo de tefritídios podem ser importantes fontes de alimento para adultos e possivelmente também atuam como estímulo de atração.

No mesmo estudo, Drew & Lloyd (1987) observaram que as folhas do hospedeiro infestado não apresentavam números significativos daquelas bactérias associadas aos tefritídios, mesmo após todos os frutos terem caído e esses insetos ainda permanecessem nas árvores. Essa constatação contraria a sugestão de Courtice & Drew (1983) de que as bactérias presentes nas folhas das plantas hospedeiras são importantes fontes de alimento para tefritídios adultos. Contudo, Maccollom *et al.* (1992) verificaram que amostras bacterianas isoladas de folhas de macieiras desencadeavam forte atratividade para *R. pomonella* adulta em laboratório. Uma bactéria similar a *E. agglomerans* ou substâncias voláteis por ela produzidas são atrativas para *R. pomonella* quando em busca por alimento em ambiente natural pois, a captura desses insetos aumenta significativamente quando os microrganismos estão presentes em armadilhas contendo compostos voláteis de maçã.

Existem fortes evidências de que o tipo de dieta à qual o tefritídio esteve anteriormente submetido (seja em condições naturais ou de laboratório), influi fortemente sobre a atratividade bacteriana. A privação de proteínas parece ser um componente importante na atratividade, principalmente para as fêmeas em processo de desenvolvimento sexual.

Jang & Nishigima (1990) estudando a atratividade de culturas de bactérias isoladas do trato digestivo de *B. dorsalis* observaram que a atratividade desses tefritídios a culturas ou a células bacterianas lavadas era praticamente a mesma de um atrativo proteínico sintético (hidrolisado de proteínas) denominado de PIB7. A atratividade a culturas bacterianas era maior na ausência do que na presença do PIB7. A atratividade de bactérias não-lavadas não era maior do que a do meio de cultura fermentado. A atratividade de bactérias mostrou-se maior para as fêmeas do que para os machos e a idade dos insetos pareceu não influenciar.

Prokopy *et al.* (1991) observaram que fêmeas imaturas de *B. tryoni* privadas de proteína desde a eclosão, tinham uma atratividade muito maior do que fêmeas maduras com a mesma idade e alimentadas com proteína, por bactérias contidas em frascos colocados em plantas hospedeiras. Através de uma série de observações, esses autores concluíram que as primeiras fêmeas de *B. tryoni* a chegar ao fruto do hospedeiro e disseminar bactérias no fruto deveriam ser sexualmente maduras e teriam, anteriormente, adquirido proteínas em outra parte. O odor bacteriano quando associado ao fruto hospedeiro atrai fêmeas com carência de proteínas mas não fêmeas que previamente se alimentaram com esse tipo de nutriente.

Robacker (1991) verificou que a privação de proteína ou de açúcar aumentava a preferência pelos dois nutrientes e que o constante acesso a ambos, diminuía a preferência por eles. Esse autor observou que a carência de proteína aumenta grandemente a atratividade de tefritídios por bactérias.

Robacker & Garcia (1993) verificaram que odores bacterianos não eram atrativos para adultos de *A. ludens* recém-emergidos. Para os espécimes alimentados com açúcar mas privados de proteína, a atração ao odor bacteriano começava com um dia de idade, atingia um máximo por volta dos sete dias e declinava à medida em que o inseto envelhecia. Geralmente o odor bacteriano era atrativo para os espécimes alimentados com açúcar e não-atrativo para aqueles privados de açúcar. O odor foi mais atrativo para os insetos alimentados com açúcar e privados de proteína. O odor foi altamente atrativo para os insetos alimentados com os dois nutrientes juntos. Esses autores observaram que espécimes irradiados com raios gama eram 20% menos responsivos ao odor bacteriano do que os não irradiados.

Maccollom *et al.* (1994) verificaram, em ensaios de campo, que culturas de *E. agglomerans* (isoladas de *R. pomonella* adulta) lavadas, ressuspendidas em água destilada e colocadas em armadilhas, apresentavam índices de captura significativamente maiores que armadilhas contendo células lavadas provenientes de culturas de laboratório ou sulfato de amônia. Maçãs tratadas no campo com mistura de rifampicina e estreptomicina tinham redução significativa de injúria das frutas, indicando que a bactéria poderiam suprir alguma necessidade nutricional ou biológica.

Prokopy *et al.* (1993b) compararam diferenças de atratividade entre diferentes fontes e condições de excrementos de animais domésticos e silvestres para *C. capitata*, tanto em linhagens de laboratório quanto selvagens. Os autores verificaram que excrementos de aves domésticas e silvestres eram significativamente mais atrativos que o PIB7, amplamente utilizado para atração e controle de *C. capitata*. Excrementos de cavalos, cabras e porcos eram significativamente menos atrativos. Foram observadas diferenças em relação aos excrementos testados em diferentes tempos após a sua deposição ou em condições de estocagem. Os melhores níveis de atratividade foram encontrados em excrementos de aves coletados um dia após a deposição, quando comparados com os resultados de excrementos frescos ou estocados a frio. Esses autores sugerem que diferenças na atratividade entre os diferentes tipos de excrementos podem ser atribuídas a diferenças nos sistemas de excreção de nitrogênio, às dietas dos animais dos quais os excrementos foram coletados e às diferenças na composição e qualidade das bactérias neles encontradas. O fato de excrementos com um dia de deposição serem mais atrativos do que excrementos frescos, mais velhos ou estocados a frio, é uma indicação de que a multiplicação inicial da população bacteriana associada, aumenta a atratividade desses excrementos para os tefritídeos.

Prokopy *et al.* (1993a) verificaram que excrementos de pássaros apresentam forte atratividade a *R. pomonella* em condições experimentais e semi-experimentais. Excrementos tratados com antibióticos eram significativamente menos atrativos que excrementos não tratados. Estes resultados, juntamente com os anteriormente obtidos por Prokopy *et al.* (1993b) são evidências de que bactérias podem estar envolvidas na geração de compostos voláteis atrativos.

Existem evidências de que bactérias pertencentes a outros grupos que não a família Enterobacteriaceae podem mediar a atração a tefritídeos.

Robacker *et al.* (1991) relataram pela primeira vez que uma amostra de *Staphylococcus* (similar a *Staphylococcus aureus*), isolada do aparelho bucal de uma linhagem de laboratório de *A. ludens* era altamente atrativa para machos e fêmeas alimentados com açúcar e privados

de proteína. Quatro linhagens de *Staphylococcus* provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) eram tão atrativos para *A. ludens* quanto a amostra original isolada do inseto.

Robacker & Moreno (1995) sugeriram que *A. ludens* poderia ser atraída por culturas de *S. aureus* por terem carência de proteínas. Esses autores demonstraram que a atração ao odor bacteriano era atenuada por uma dieta relativamente completa contendo açúcar, proteína, gordura, vitaminas e sais minerais, quando comparado com uma contendo somente açúcar. Da mesma forma, uma outra dieta contendo caseína hidrolisada e açúcar, na qual a porcentagem de proteínas era igual à da dieta completa, atenuou a atração no mesmo grau ocasionado pela dieta completa. Além do mais, esses autores constataram que a atração ao odor bacteriano diminuía à medida em que a porcentagem de proteína aumentava, em uma dieta contendo caseína hidrolisada e açúcar. Esses resultados suportam a hipótese de que adultos de *A. ludens* são atraídos pelo odor de culturas de *Staphylococcus* e, possivelmente, pelo odor de culturas de outros grupos de bactérias, em grande parte devido à busca por proteínas.

Martinez *et al.* (1994) relataram, pela primeira vez, que duas linhagens de *Bacillus thuringiensis* (sorovares *finitimus* e *kurstaki*) eram atrativos para *A. ludens*. Em estudos de campo, metabólitos originários da fermentação bacteriana eram tão atrativos para o adulto quanto sedimentos de *Torula*. Os mesmos autores verificaram que amostras bacterianas de espécies comumente isoladas de *A. ludens* mas, obtidas da ATCC, foram atrativas para esse inseto quando em cultura. Sobrenadantes autoclavados provenientes de culturas dos estoques da ATCC foram significativamente mais atrativos que a própria cultura ou sobrenadantes filtrados. Este fato pode significar que produtos secundários do metabolismo bacteriano poderiam estar envolvidos na atratividade. Contudo, a atratividade de *B. thuringiensis* a tefritídeos não representa nenhuma vantagem uma vez que essa bactéria é potencialmente tóxica aos tefritídeos (Martinez *et al.*, 1997).

Vários autores realizaram estudos com a finalidade de se determinar quais os compostos químicos envolvidos na atração bacteriana a tefritídeos, bem como, a sua origem.

Drew (1987) verificou que um componente da emissão bacteriana (2-butanona), atraía *B. tryoni* mas não *B. cacuminatus*. Machos sexualmente maduros e fêmeas imaturas de *B. tryoni* respondiam à 2-butanona e a odores bacterianos em ensaios de campo. Em laboratório, fêmeas alimentadas com glicose requeriam proteína hidrolisada para produção de ovos mas, os machos eram férteis com ou sem proteínas. Esses requerimentos nutricionais distintos e o fato de que machos e fêmeas apresentavam coloração de papo diferenciada e variadas po-

pulações bacterianas associadas, indicavam que cada sexo se alimentava em substratos diferentes. Conseqüentemente, os fortes atrativos bacterianos no hospedeiro, podem ser atrativos alimentares para fêmeas e sexuais para os machos. Propõe-se que a 2-butanona seja um estimulante para a corte na natureza, atraindo os machos maduros até os sítios de alimentação e oviposição das fêmeas que se encontram em processo de desenvolvimento sexual.

Wakabayashi & Cunningham (1991) descreveram uma mistura de quatro compostos químicos (amônia, ácido linolênico, putrescina e pirrolidina), produtos da degradação bacteriana de aminoácidos e gorduras, que eram atrativos para linhagens de laboratório de *B. cucurbitae* em armadilhas colocadas em pomares de goiaba e macadamia. Esses autores verificaram que o ácido linolênico era o mais importante. Putrescina (1,4-diaminobutano) e fenetilamina são os possíveis produtos da degradação de arginina, glutamina e fenilalanina, respectivamente. Pirrolidina é o produto da descarboxilação da prolina. O ácido linolênico e outros ácidos graxos poli-insaturados são provavelmente essenciais para Diptera (Stanley-Samuelson, 1983, *apud* Wakabayashi & Cunningham, 1991). Anteriormente, fora observado por outros autores que o ácido linolênico e o metilsuccinato eram os compostos atrativos de “peppergrass” para tefritídeos (Keiser *et al.*, 1975, *apud* Wakabayashi & Cunningham, 1991). A etanolamina é o produto da descarboxilação da serina. Ácido graxos e seus ésteres têm sido encontrados associados a feromônios sexuais nos machos de *B. cucurbitae* (Baker *et al.*, 1982). A amônia já havia sido, anteriormente, proposta como forte atrativo para tefritídeos (Bateman & Morton, 1981).

Posteriormente, Robacker & Warfield (1993) relataram que uma mistura de bicarbonato de amônia, metilamina e putrescina são fortes atrativos tanto para machos como para fêmeas de *A. ludens*, privadas de proteína. Nestes estudos, os diferentes autores observaram que cada componente, quando testado isoladamente, tem pouco efeito sobre esses insetos.

1.7.2. Simbiose

Simbiose, uma associação entre indivíduos de espécies diferentes, é um tipo de interação amplamente distribuído entre insetos e microrganismos. (Buchner, 1965; Breznak, 1982; Breznak & Brune, 1994; Baumann *et al.*, 1995; Baumann & Moran, 1997; Werren, 1997).

Relações mutualísticas com microrganismos são comuns em grupos de insetos que se alimentam primariamente de tecidos ou sucos vegetais ou com alimento contendo muita celulose ou lignina. Possivelmente, concentrações relativamente baixas de proteínas e outros compostos essenciais em tecidos vegetais, tornem imprescindíveis fontes adicionais de

nutrientes. Microrganismos tão diversos como leveduras, protozoários e bactérias têm sido descritos como simbiontes nestes casos (Buchner, 1965; Breznak, 1982; Baumann *et al.*, 1995; Baumann & Moran, 1997; Werren, 1997).

Diversos estudos foram realizados com o propósito de se verificar se existe um relacionamento obrigatório entre os tefritídeos e suas bactérias associadas. A maioria das espécies cuja associação com microrganismos foi estudada apresentou evidências de tal fenômeno em algum estágio de seu ciclo vital. Contudo, simbiose no sentido de uma relação obrigatória e mutuamente benéfica não foi, ainda, conclusivamente demonstrada.

O conceito de simbiose não tem sido claramente definido nos estudos relativos à associação de bactérias com tefritídeos. O termo “simbiose” parece ser empregado com um sentido amplo, referindo-se a qualquer bactéria associada com qualquer espécie de tefritídeo. Portanto, qualquer referência a “simbiontes”, neste texto, deve ser entendida desta forma.

A importância dos simbiontes para os seus hospedeiros é sugerida pelas adaptações anatômicas que evoluíram para assegurar a sobrevivência intra-corpórea e a transmissão de microrganismos de geração a geração. Dessas, uma das mais elaboradas é a verificada em fêmeas adultas de *B. oleae*, descritas por Petri (1904; 1909; 1910).

Estudos realizados em insetos das sub-famílias Trypetinae, Tephritinae e Dacinae mostraram evidências de níveis crescentes de desenvolvimento de órgãos para o abrigo de simbiontes, sendo os mais primitivos encontrados em Trypetinae e os mais desenvolvidos em Dacinae (Hellmuth, 1956 *apud* Daser & Brandl, 1992).

Outros estudos revelaram que larvas de *B. dorsalis* e *B. cucurbitae* não apresentam órgãos “simbióticos” óbvios e que os adultos dessas espécies não apresentam as criptas retais, que aparecem muito elaboradas em *B. oleae* (Bateman, 1972).

Os tefritídeos apresentam órgãos especializados (divertículo esofágico, papo e intestino) que garantem a manutenção das bactérias tanto em larvas como em adultos, sendo um indício da importância desses microrganismos na vida desses insetos (Girolami 1973). Foi proposto que o divertículo esofágico atue como um órgão de manutenção de bactérias (Petri, 1909; Rattner & Stoffolano, 1982; Rattner & Stoffolano, 1984).

Embora as bactérias associadas a tefritídeos sejam há muito consideradas como simbiontes (Petri, 1910; Hellmuth, 1956 *apud* Daser & Brandl, 1992; Haggen, 1966; Miyasaki *et al.*, 1968; Girolami, 1982; Lüthy *et al.*, 1983), um relacionamento mutualístico obrigatório é questionado por vários autores (Drew *et al.*, 1983; Rossiter *et al.*, 1983; Tsiropoulos, 1983; Fitt & O'Brien, 1985; Howard *et al.*, 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990).

A maioria das espécies europeias de tefritídeos pertencentes às sub-famílias Trypetinae e Tephritinae apresentam associação com *Pseudomonas mutabilis* (Hellmuth, 1956 *apud* Daser & Brandl, 1992). Essa bactéria parece ser altamente especializada para a existência nos seus hospedeiros, uma vez que não pode ser cultivada *in vitro*.

No divertículo esofágico de *B. oleae* foi relatada a presença de uma única espécie bacteriana identificada como *Pseudomonas savastanoi*, tendo-se-lhe sugerido o papel de simbiote específico (Petri, 1904; Haggen, 1966). Haggen (1966) observou que a presença dessa bactéria parecia essencial para o desenvolvimento de larvas de *B. oleae* em azeitonas.

A bactéria *P. savastanoi* aparece amplamente distribuída externamente aos seus hospedeiros e constitui-se em uma importante praga agrícola de azeitonas (Hellmuth, 1956 *apud* Daser & Brandl, 1992; Buchner, 1965; Haggen, 1966). *P. savastanoi* não depende da associação com *B. oleae* para sua existência, podendo ser isolada de azeitonas infectadas em regiões onde essa espécie de tefritídeo não ocorre (Haggen, 1966).

Lüthy *et al.* (1983) também observaram a presença de uma única espécie bacteriana no divertículo esofágico de *B. oleae* mas verificaram que esta apresentava características biológicas distintas das apresentadas por *P. savastanoi* descrita por Haggen (1966). O fato de ser a única espécie bacteriana detectada em *B. oleae* levou esses autores a sugerirem um possível papel de simbiote para essa bactéria.

Posteriormente, Stamopoulos & Tzanakakis (1988) analisando a flora bacteriana do divertículo esofágico de *B. oleae*, isolaram diversas espécies bacterianas Gram-negativas como *P. mendocina*, *M. nonliquefasciens*, *Alcaligenes* sp, *E. cloacae* e Gram-positivas (a grande maioria) como, *Kurtia* sp, *Staphylococcus* sp, *M. roseus*, *B. pumilis*, *B. liqueniformis* e *B. subtilis*. Nenhuma espécie bacteriana estava estritamente fixada ou consistentemente presente no divertículo esofágico, sugerindo que a flora bacteriana associada a *B. oleae* depende de fatores ambientais e pode ser usada como fonte de nutrientes para esses insetos, a parte de uma possível relação mutualística específica.

Fitt & O'Brien (1985), analisando a flora bacteriana de quatro espécies do gênero *Bactrocera* (*B. cacuminatus*, *B. jarvisi*, *B. neohumeralis* e *B. tryoni*), observaram que o número de espécies bacterianas isoladas variava de acordo com a espécie dentro do gênero. Nestas espécies, a maioria das bactérias pertenciam à família Enterobacteriaceae, havendo grande similaridade entre as espécies de bactérias presentes nesses insetos. Não foi encontrado nenhum indício de que alguma espécie bacteriana mantivesse uma relação simbiótica obrigatória com qualquer das espécies de tefritídeo analisadas. Esses autores encontraram indícios de que as bactérias são importantes como fonte de nutrientes.

Lloyd *et al.* (1986) estudando populações bacterianas associadas a quatro espécies de Dacinae (*B. tryoni* e *B. neohumeralis*, provenientes de goiaba e pêssigo; *B. cacuminatus*, do tabaco e *B. musae*, da banana) e provenientes dos órgãos do trato alimentar desses insetos, superfícies dos hospedeiros, sítios de oviposição e de tecidos de frutos infestados por larvas, verificaram que a maioria das espécies identificadas pertenciam à família Enterobacteriaceae. As espécies predominantes foram: *K. oxytoca*, *E. herbicola* e *E. cloacae*. As espécies menos frequentes foram: *Serratia* spp, *C. freundii*, *Proteus* spp, *Providencia rettgeri* e *E. coli*. Esses autores não encontraram nenhum caso de uma bactéria consistentemente associada com qualquer das espécie investigadas. As bactérias mais frequentemente isoladas do trato alimentar foram também, encontradas em grande número nas superfícies dos frutos e em áreas injuriadas destes.

Howard & Bush (1989), estudando os efeitos da eliminação e reinfecção experimental com *K. oxytoca* isolada de *Rhagoletis suavis* e *R. pomonella* observaram que a ausência da bactéria não afetava positiva ou negativamente os parâmetros estudados. Sugeriram que larvas de *Rhagoletis* não dependiam da flora bacteriana para fornecer nutrientes essenciais ou para detoxificar compostos secundários das plantas.

As populações bacterianas associadas ao trato alimentar dos tefritídeos parecem, em alguns casos, ser essenciais para o desenvolvimento normal, sobrevivência e sucesso reprodutivo de várias espécies desses insetos.

Vários autores (Allen, 1931; Allen & Riker, 1932; Allen *et al.*, 1934, *apud* Howard *et al.*, 1985) demonstraram que a bactéria *P. melophthora* estava associada com vários estágios vitais de *R. pomonella* e era a causa da podridão em maçãs. Além disso, sua presença parecia necessária para a sobrevivência e o desenvolvimento larval. Estudos posteriores demonstraram que essa bactéria é capaz de degradar seis pesticidas (Boush & Matsumara, 1967) e de sintetizar metionina e cisteína, aminoácidos não encontrados em maçãs (Miyasaki *et al.*, 1968). No primeiro caso, as bactérias auxiliariam na detoxificação da dieta natural desses insetos e, no segundo, embora não se conheça os aminoácidos essenciais para *R. pomonella*, é possível que a bactéria possa fornecê-los às larvas. Por outro lado, Howard (1989) apresenta evidências de que as larvas de *R. pomonella* não dependem de simbioses para a utilização dos tecidos de maçã. A bactéria *P. melophthora* é, a exemplo de *P. savastanoi*, amplamente distribuída no ambiente.

Evidências da importância das bactérias associadas ao trato digestivo dos tefritídeos foram obtidas mediante a aplicação tópica de estreptomicina no fruto hospedeiro e em dietas de laboratório.

A adição de estreptomicina em dietas de adultos de *B. oleae* eliminou o simbiote associado (*P. savastanoi*) e não provocou nenhum efeito deletério aos insetos mas, por outro lado, impediu o desenvolvimento larval em azeitonas. A inibição das larvas pelo antimicrobiano foi descartada, uma vez que, estas sobreviviam normalmente em meio sintético suplementado com hidrolisado de proteínas (Haggen, 1966). A utilização dos tecidos da azeitona só era possível na presença do simbiote, que seria responsável tanto pela hidrólise da proteína do fruto como pela síntese dos aminoácidos metionina e treonina (Fytizas & Tzanakakis, 1966a; Haggen, 1966; Tzanakakis & Lambrou, 1975; Tzanakakis *et al.*, 1975; Tzanakakis & Stavrinides, 1973). O tratamento da geração parental de *B. oleae* (larvas ou adultos) com estreptomicina também apresentou um efeito inibitório no desenvolvimento larval (Lambrou & Tzanakakis, 1978).

Fytizas & Tzanakakis (1966b) sugeriram que a dependência das larvas de *B. oleae* em relação a *P. savastanoi* poderia ser utilizada como um método de controle populacional: os simbioses seriam eliminados pela estreptomicina e as larvas apossimbióticas morreriam logo após emergirem dos ovos.

Em estudos similares, Tsiropoulos (1981) observou que a eliminação da flora bacteriana de adultos de *Rhagoletis completa*, pela adição de antibióticos à dieta, afetava adversamente a sobrevivência e a reprodução e que essa microflora fornecia vitaminas e aminoácidos ao hospedeiro.

Tanto *P. savastanoi* quanto *P. mutabilis* são capazes de degradar proteínas e sintetizar ácido aspártico e leucina (Hellmuth, 1956 *apud* Daser & Brandl, 1992).

Girolami & Cavalloro (1972) relataram a presença de bactérias (visualizadas ao microscópio) no divertículo esofágico de *B. oleae*, as quais não puderam ser cultivadas *in vitro*.

Girolami (1986) considera que a simbiose possa estar ligada a mais de uma espécie bacteriana em diferentes espécimes ou populações da mesma espécie de tefritídio. Segundo esse autor, a possibilidade de que diferentes bactérias possam ocupar órgãos específicos da mesma espécie de tefritídio, torna questionável um conceito restrito de simbiose. A existência de simbiose em *B. tryoni* foi questionada por Drew *et al.* (1983) e todas as bactérias encontradas foram consideradas como originárias da alimentação.

Em várias espécies de tefritídios que infestam frutos, bactérias são encontradas em várias partes do trato digestivo, principalmente no divertículo esofágico (Girolami & Cavalloro, 1972; Girolami, 1973; Lüthy *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990).

Em tefritídios que infestam asteráceas (sub-famílias Tephritinae e Urophorinae) não foi relatada a presença de bactérias no divertículo esofágico mas, estas podem ser encontradas no epitélio do intestino médio (Stammer, 1929 *apud* Girolami, 1982; Girolami, 1982). Em insetos pertencentes às espécies *U. solstitialis*, *U. quadrifasciata*, *E. sonchi* e *Opicheta pupilliata* não foi detectada a presença de simbioses (Girolami, 1973; Girolami, 1982).

1.7.3. Bactérias como fonte de alimento

As bactérias associadas ao trato digestivo de tefritídios - notadamente aquelas pertencentes à família Enterobacteriaceae - parecem ser importante fonte de alimento para as formas adultas, desempenhando um papel significativo na sua biologia (Drew & Lloyd, 1987).

Drew (1988) analisando frutos de tabaco (*Solanum mauritianum*), infestados e não infestados com *B. cacuminatus*, revelou que os primeiros tinham cerca de duas vezes mais proteína e aminoácidos essenciais, quando comparados com frutos não infestados. Esse autor sugere que o crescimento bacteriano nos frutos infestados e a reação do hospedeiro à infestação são as causas do aumento da quantidade de proteínas disponíveis nesses frutos, o que poderia representar aumento de alimento à disposição dos insetos.

A análise do conteúdo do papo de *R. pomonella* por Dean & Chapman (1973), indicou que indivíduos coletados no campo haviam ingerido bactérias.

Estudos realizados por Drew *et al.* (1983) em *B. cacuminatus* e *B. tryoni* forneceram evidências de que bactérias ingeridas durante os processos de alimentação provêm uma dieta completa, satisfazendo os requerimentos nutricionais para a reprodução normal, pelo menos, em condições de laboratório. Essas bactérias ocorriam em grandes quantidades no trato alimentar nesses insetos mas, estavam ausentes ou rarefeitas nas fezes, sugerindo que os microrganismos poderiam estar sendo digeridos. Esses autores verificaram que dietas de laboratório suplementadas com aquelas bactérias, afetavam positivamente o desenvolvimento e maturação de ovários e óvulos, incrementando, significativamente, as taxas de oviposição e a longevidade dos insetos analisados, quando comparadas com as de indivíduos alimentados com dietas não-suplementadas ou suplementadas com uma amostra de *Pseudomonas fluorescem*, microrganismo não presente na flora bacteriana daquelas espécies de *Bactrocera*. A taxa de oviposição aumentava quando os tefritídios eram alimentados com *P. fluorescem*. Mas, o incremento da oviposição era ainda maior quando a dieta era suplementada com bactérias isoladas da flora bacteriana desses insetos. Além do mais, o aumento da taxa de oviposição foi significativamente maior quando essas bactérias e *P. fluorescem* foram adi-

cionadas juntas à alimentação. A bactéria *P. fluorescem* foi recuperada no trato alimentar dos espécimes analisados. Esses resultados demonstraram que as bactérias variam em seu valor nutricional e que diferentes bactérias, quando juntas, podem ter um efeito sinérgico em direção a benefícios biológicos. Uma correlação geral foi observada, por esses autores, entre bactérias isoladas do corpo de tefritídeos e da superfície do sítio alimentar. Esses mesmos autores apresentaram evidências de que as bactérias associadas ao trato alimentar de *B. tryoni* foram simplesmente ingeridas, ao invés de serem habitantes simbióticos do trato alimentar. O ambiente do papo de *B. tryoni* é ácido, com valores de pH variando de 3,0 a 3,5. Muitas bactérias são incapazes de crescer em ambientes com valores de pH inferiores a cinco. A diversidade de bactérias isoladas do trato alimentar desse inseto não indica uma flora bacteriana restrita que se esperaria desenvolvendo-se em meio ácido. Um teste feito com bactérias isoladas do papo de *B. tryoni* revelou que nenhuma delas cresceu na faixa de pH entre 3,0 e 3,5.

Courtice & Drew (1983) sugeriram que a disponibilidade de alimentos em forma de bactérias na superfície das folhas da planta hospedeira governaria a densidade populacional de tefritídeos e que precipitação pluviométrica e temperatura desempenhariam papéis secundários no fenômeno. Contudo, outros autores obtiveram evidências de que as folhas da planta hospedeira pareciam não ser importantes como sítio de alimentação para esses insetos (Drew & Lloyd, 1987; Hendrichs *et al.*, 1993).

A importância das bactérias para as larvas de tefritídeos parece ser a mesma que para os insetos adultos. Courtice & Drew (1983) relatam que no processo da oviposição, os microrganismos são introduzidos no fruto, causando a sua deterioração. Subsequentemente, as larvas se alimentam nas partes deterioradas e não em partes sadias do fruto, provavelmente ingerindo bactérias aí presentes. As numerosas bactérias encontradas no canal alimentar das larvas são nutricionalmente importantes para os adultos.

Hendrichs *et al.* (1993) verificaram, em condições experimentais e semi-experimentais, que a longevidade de *R. pomonella* dependia de carboidratos presentes em exudatos secos na superfície da folhagem do hospedeiro. O desenvolvimento dos ovos não era suportado pelo alimento presente na superfície da folhagem e nem por preparações de bactérias presentes nas superfícies das folhas. Esses autores verificaram que excrementos de aves e exudatos de afídios contribuíam para moderar a fecundidade desse tefritídeo. A fecundidade foi maior quando os insetos foram alimentados com uma fonte protéica, como o extrato de leveduras. Excrementos de aves podem ser uma valiosa fonte de proteína de origem bacteriana, como foi sugerido por outros autores (Prokopy *et al.*, 1993a; Prokopy *et al.*, 1993b).

2. Material e Métodos

2.1. Meios de Cultura

Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C (1 atmosfera de pressão) durante 20 minutos. Sempre que necessário, o pH dos meios de cultura foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 1 N.

2.1.1. Meio Mínimo (M9)

Solução de sais, 10 vezes concentrada:

Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	128 g
Fosfato de potássio monobásico	30 g
Cloreto de sódio	5 g
Cloreto de amônio	10 g
Água destilada	1000 ml

A solução de sais foi autoclavada e armazenada a 4°C. Após o preparo, a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C. Para o preparo de meio mínimo sólido foi utilizado como base ágar Difco a 1,5% autoclavado e resfriado até aproximadamente 45°C. A seguir, foram adicionados ao ágar, sob condições assépticas, uma quantidade adequada da solução de sais para uma diluição final de 10⁻¹. Como fontes de carbono foram utilizados, separadamente, os açúcares: glicose, galactose, sacarose, manose ou arabinose em concentrações finais de 0,4%. O meio foi distribuído em placas de Petri, em volumes de aproximadamente 20 ml.

O meio M9 foi preparado como descrito em Sambrook *et al.* (1989).

2.1.2. Meio de aminoácidos

Caseína hidrolisada	0,05 g
Solução de sais M9, 10 vezes concentrada	5,00 ml
Água destilada q.s.p.	50,00 ml

2.1.3. Ágar de MacConkey

O meio Ágar de MacConkey utilizado foi da marca Difco e preparado de acordo com as especificações do fabricante.

2.1.4. LB

Peptona ou Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	10 g
Água destilada	1000 ml

Após o preparo, o pH foi ajustado para 7,2 e o meio foi distribuído em tubos de ensaio, em volumes de 4 ml, autoclavado e armazenado à temperatura ambiente. O meio LB foi preparado como descrito em Sambrook *et al.* (1989).

2.1.5. LA e LA semi-sólido

Para o preparo dos meios LA e LA semi-sólido foram adicionados ao meio LB, 15 g/l de ágar e 7 g/l de ágar, respectivamente.

2.1.6. Meio para detecção de atividade amilolítica

O meio para detecção de atividade amilolítica foi o meio LA-amido (Destefano, 1994). O meio LA foi autoclavado e resfriado a aproximadamente 45°C. A seguir, foi adicionada ao meio, sob condições assépticas, uma quantidade adequada de uma solução de amido solúvel (Sigma) a 20%, para uma concentração final de 0,2%.

2.1.7. Meio para detecção de atividade celulolítica

Glicerol	5 g
Carboximetilcelulose	5 g
Extrato de levedura	1 g
Ágar	15 g
Meio M9 q.s.p.	1000 ml

O meio foi preparado como descrito em Destefano (1994).

2.2. Soluções e Tampões

2.2.1. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

2.2.1.1. Solução de acrilamida 30%:bis-acrilamida 2,7%

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	2,7 g
Água deionizada q.s.p.	100 ml

A solução foi preparada de acordo com Hoefler (1991) e mantida a 4°C.

2.2.1.2. Tampão de ressuspensão

Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%	4,0 ml
Glicerol	2,0 ml
β -Mercaptoetanol	1,0 ml
Bromofenol blue	0,01 g
Água deionizada q.s.p.	10,0 ml

A solução foi preparada segundo Sambrook *et al.* (1989) e armazenada a 4°C.

2.2.1.3. Tampão de corrida (tris-glicina)

Trizma base	12,0 g
Glicina	57,6 g
SDS 10%	40,0 ml
Água destilada q.s.p.	4000,0 ml

A solução foi preparada como descrito em Sambrook *et al.* (1989) e mantida à temperatura ambiente.

2.2.2. Soluções para revelação do gel de poliacrilamida

2.2.2.1. Fixador

Metanol	500,0 ml
Ácido acético	120,0 ml
Formaldeído a 37%	0,5 ml
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

A solução foi preparada como descrito em Blum *et al.* (1987) e mantida à temperatura ambiente.

2.2.2.2. Solução de nitrato de prata a 0,2%

Nitrato de prata	0,2 g
Formaldeído a 37%	75,0 µl
Água destilada	100,0 ml

A solução foi preparada, no momento do uso, como descrito em Blum *et al.* (1987), e mantida à temperatura ambiente.

2.2.2.3. Solução de carbonato de sódio a 6%

Carbonato de sódio anidro	6 g
Solução de tiosulfato de sódio a 0,02%	2 ml
Formaldeído a 37%	50 µl
Água destilada	100 ml

A solução foi preparada, no momento do uso, como descrito em Blum *et al.* (1987), e mantida à temperatura ambiente.

2.2.2.4. Solução "STOP"

Metanol	500,0 ml
Ácido acético	120,0 ml
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

A solução foi preparada como descrito em Blum *et al.* (1987). Após o preparo, esta foi mantida à temperatura ambiente.

2.3. Obtenção de Tefritídeos Adultos

2.3.1. Coletas de inflorescências de asteráceas

Inflorescências de asteráceas foram coletadas em duas diferentes localidades sob condições climáticas distintas. Duas coletas foram realizadas na Cadeia do Espinhaço, Estado de Minas Gerais, entre os municípios de Ouro Branco, Santana do Riacho, Diamantina, Joaquim Felício (Serra do Cabral) e Grão Mogol, sendo a primeira efetuada em junho de 1994 e a outra em fevereiro de 1995. Uma única coleta aconteceu na Serra do Japi, município de Jundiá, Estado de São Paulo, em janeiro de 1995.

As plantas foram apanhadas por membros do Lab. de Biologia de Insetos do Depto. de Genética e Evolução - IB - UNICAMP e pelo grupo do Projeto Biodiversidade de Fitófagos de Compostas do Lab. de Interação Inseto-Planta do Depto. de Zoologia - IB- UNICAMP.

Após a coleta, os capítulos foram acomodados em recipientes plásticos transparentes até a emergência de tefritídeos adultos.

2.3.2. Manutenção e identificação dos tefritídeos adultos

Após a emergência, os insetos que foram identificados como pertencentes à família Tephritidae foram separados de acordo com a espécie e mantidos com alimentação e água, em recipientes de plástico transparente.

2.4. Isolamento de Bactérias

2.4.1. Enriquecimento de bactérias de *V. scorpioides*

Com o propósito de se comparar as populações bacterianas presentes nas superfícies de folhas e inflorescências de *V. scorpioides* proveniente da Serra do Japi com aquelas presentes em tefritídeos emergidos de inflorescências dessa planta, secções de folhas e flores foram

transferidas, separadamente, para tubos contendo 4 ml de meio LB, para o isolamento de bactérias presentes em suas superfícies. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por cerca de 18 horas. A obtenção de colônias isoladas das bactérias presentes nessas culturas, sua estocagem e identificação foram feitos como descrito nos itens 2.5.1. a 2.5.4.

2.4.2. Isolamento de bactérias de órgãos do trato digestivo de tefritídeos adultos

Com a finalidade de se remover órgãos do trato digestivo de tefritídeos adultos, os espécimes foram anestesiados com éter e, em seguida, procedeu-se à assepsia externa com soluções de hipoclorito de sódio e de etanol 70%. De cada inseto foram retirados o divertículo esofágico, o papo e o intestino. Após a remoção, os órgãos foram introduzidos, separadamente, em tubos de ensaio contendo meio LB, esmagados contra a parede do tubo e inoculados no meio. Após o inóculo, os tubos foram incubados a 30°C por cerca de 24 horas. Desta forma, obteve-se culturas bacterianas originárias de cada diferente órgão de cada inseto dissecado.

A obtenção de colônias isoladas das bactérias presentes nessas culturas, sua estocagem e identificação foram feitos como descrito nos itens 2.5.1. a 2.5.4.

2.5. Identificação das Amostras Bacterianas

A identificação das amostras bacterianas isoladas como descrito nos itens 2.4.1. e 2.4.2 compreendeu três etapas: (1) a seleção preliminar das amostras de acordo com morfologia de colônia, efeito da temperatura sobre o crescimento e capacidade de utilização de lactose; (2) ensaios de eletroforese de proteínas totais das amostras selecionadas, visando seu agrupamento de acordo com seus perfis eletroforéticos (“grupos eletroforéticos”) e (3) a identificação bioquímica de amostras correspondentes a cada grupo eletroforético.

Os dois primeiros procedimentos foram realizados com o propósito de se diminuir o número total de amostras bacterianas a serem identificadas de acordo com o seu comportamento bioquímico. Os ensaios de eletroforese tiveram, também, o propósito de verificar a possibilidade da existência de correlações entre a variabilidade genética dentro de uma mesma espécie bacteriana com uma determinada espécie de tefritídeo e/ou hospedeiro.

2.5.1. Seleção preliminar das amostras bacterianas

A partir de cada cultura bacteriana, obtida como descrito nos itens 2.4.1 e 2.4.2., foram feitos inóculos por estrias em placas de Petri contendo meio LA, para a obtenção de colônias

isoladas. As placas foram incubadas a 30°C por cerca de 18 horas. Após esse período, colônias isoladas crescendo em cada placa foram coletadas aleatoriamente, com auxílio de palitos esterilizados, e transferidas de modo ordenado para placas de Petri contendo meio LA ou meio ágar de MacConkey, de maneira a se obter três réplicas de cada colônia, sendo duas em meio LA e uma em meio MacConkey. Em cada placa foram transferidas até 50 amostras. As placas contendo meio LA, foram incubadas, separadamente, a 30°C e a 37°C. As placas contendo meio ágar de MacConkey foram incubadas a 30°C. Após um período de cerca de 18 horas, procedeu-se à leitura dos resultados.

Um total de mil colônias bacterianas foram isoladas e agrupadas segundo as características mencionadas. As placas contendo meio LA e incubadas a 30°C foram, posteriormente, mantidas a 4°C para a manutenção provisória das amostras bacterianas.

2.5.2. Análise eletroforética de proteínas totais

Com a finalidade de se estabelecer a existência de diferentes “grupos eletroforéticos” dentre as amostras bacterianas selecionadas como descrito no item 2.5.1., procedeu-se à análise eletroforética de proteínas totais de pelo menos dois representantes de cada grupo de amostras. Foi analisado um total de cem amostras bacterianas.

2.5.2.1. Extração de proteínas totais

Os ensaios de extração de proteínas totais foram feitos de acordo com metodologia descrita em Sambrook *et al.* (1989). As amostras bacterianas utilizadas nestes ensaios foram cultivadas em meio LB a 30°C por cerca de 18 horas. As culturas foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga, a 12.000 g, por 30 segundos. Os sedimentos foram lavados em 500 µl de tampão Tris-HCl 50 µM (pH 7,5), gelado, a 12.000 g por 30 segundos e ressuspensos em 100 µl de água deionizada, seguindo-se adição de 100 µl de tampão de ressuspensão (item 2.2.1.2.). A seguir, as amostras foram aquecidas em banho-maria, a 100° C, por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram homogenizadas em vortex (“shearing”) e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram recuperados em novos tubos de microcentrífuga e o material armazenado a -20°C para análise em eletroforese de gel de poliacrilamida.

2.5.2.2. Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado segundo Laemmli (1970) e Hoefler (1991), utilizando-se um aparato de eletroforese vertical. O gel foi preparado em duas fases: uma, inferior, o gel de separação, preparado na concentração de 12,5%, e outra, superior, o gel de empacotamento, preparado na concentração de 4,0%. O preparo de ambas as fases foi feito misturando-se os reagentes, sob agitação, na ordem descrita no esquema abaixo:

	gel de separação	gel de empacotamento
Solução de acrilamida 30%:bis-acrilamida 2,7 %	25,0 ml	2,66 ml
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	15,0 ml	-----
Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-----	5,00 ml
Solução de SDS 10%	600,0 µl	200,00 µl
Água deionizada	19,1 ml	2,20 ml
Solução de persulfato de amônio 10%	300,0 µl	100,00 µl
Temed	20,0 µl	10,00 µl

Após a mistura dos reagentes para o gel de separação, a solução foi vertida no interior do aparato de eletroforese. A solução para o gel de empacotamento foi preparada e adicionada ao aparato após polimerização do gel de separação.

Após a gelificação da matriz de poliacrilamida, procedeu-se à aplicação das amostras. Em cada gel foram aplicadas dez amostras. O aparato foi, em seguida, submerso em uma cuba de eletroforese vertical, contendo tampão Tris-Glicina, ligada à corrente elétrica de forma a permitir a migração das cadeias polipeptídicas em direção ao ânodo.

O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com a metodologia descrita em Laemmli (1970) e Hoefler (1991). Via de regra, a corrida eletroforética foi realizada durante a noite, aplicando-se uma corrente elétrica de 15 mA.

2.5.2.3. Impregnação com prata

Ao término da corrida eletroforética, procedeu-se à revelação o gel pelo método da impregnação com prata, segundo Blum *et al.* (1987). Os géis de empacotamento e separação foram separados, sendo o primeiro, descartado. O gel de separação foi mantido em uma cuba contendo 100 ml de fixador, por 1 hora, em repouso, à temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi descartado e o gel submetido a sucessivas lavagens com diferentes

soluções: (1) três lavagens em solução de etanol a 50%, sob agitação, por 20 minutos; (2) uma lavagem com solução de tiosulfato de sódio a 0,02%, com agitação, durante 1 minuto; (3) três lavagens com água deionizada, com agitação, por 20 segundos; (4) uma lavagem em solução de nitrato de prata a 0,2%, sob agitação, durante 20 minutos e (5) duas lavagens do gel com água deionizada, com agitação, por 20 segundos. Após cada procedimento, descartava-se a solução utilizada.

A revelação do gel foi feita com uma solução de carbonato sódio 6%, com agitação, até o aparecimento de bandas de polipeptídeos, descartando-se, em seguida, o revelador. A seguir, o gel foi lavado duas vezes com água deionizada, com agitação, por 20 segundos (descartando-se a água utilizada). Após esse procedimento, o gel foi imerso em solução “STOP” durante 10 minutos e, em seguida, conservado em solução de etanol a 50%.

2.5.2.4. Estabelecimento de grupos eletroforéticos

Diferentes grupos eletroforéticos foram estabelecidos reunindo amostras bacterianas apresentando perfis eletroforéticos de proteínas totais idênticos. Um perfil protéico era considerado idêntico a um outro quando ambos apresentavam todas as bandas protéicas em número e posições idênticas.

2.5.3. Manutenção de culturas bacterianas

As amostras selecionadas como representantes das populações bacterianas estudadas foram mantidas em estoques feitos de acordo com Sambrook *et al.* (1989). No preparo de tubos para estoques de culturas bacterianas, foi utilizado o meio LA semi-sólido. O meio, após o preparo, foi fundido e distribuído em volumes de 5 ml, em tubos de vidro com tampas rosqueadas guarnecidas com batoques de borracha. Os tubos foram autoclavados e, em seguida, mantidos em posição vertical até a solidificação do meio. Nestes tubos foram inoculados 100 µl de uma cultura bacteriana crescida em meio LB. Os tubos foram fechados deixando-se as tampas levemente afrouxadas para permitir a aeração da cultura e incubados a 30°C por cerca de 18 horas. Após esse período, os tubos foram firmemente fechados e mantidos à temperatura ambiente.

2.5.4. Identificação das amostras bacterianas

A identificação das amostras bacterianas selecionadas de acordo com seus perfis eletroforéticos de proteínas totais, foi realizada utilizando-se o teste bioquímico “Pessoa e

Silva” (Pessoa, 1972). Os testes foram conduzidos de acordo com as determinações do fabricante.

Para controle dos testes, foi utilizada a amostra de *E. coli* 362 que apresenta comportamento bioquímico típico de *E. coli* selvagem (Tabela I).

2.6. Amostras Bacterianas para Controle de Experimentos

As amostras bacterianas utilizadas para controle de experimentos encontram-se listadas na Tabela I.

Tabela I. Amostras Bacterianas para Controle de Experimentos		
Amostra	Características Relevantes	Referência
<i>Escherichia coli</i> BV55	Selvagem	Moretti (1992)
<i>Escherichia coli</i> 362	Selvagem, Ap ^R	Fantinatti (1992)
<i>Escherichia coli</i> K-12 C600	<i>lac</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>thr</i> , Nal ^R	Appleyard (1954)
<i>Xanthomonas campestris</i> CA110	Amy ⁺ , Cel ⁺	Destefano (1994)
Amy ⁺ : produção de amilase ; Cel ⁺ : produção de celulase Ap ^R : resistência a ampicilina; Nal ^R : resistência ao ácido nalidíxico <i>lac</i> : incapacidade de utilização de lactose como fonte de carbono <i>leu</i> , <i>thi</i> e <i>thr</i> : auxotrofias para a síntese dos aminoácidos leucina, tirosina e treonina, respectivamente		

2.7. Detecção da Produção de Amilase e de Celulase

As amostras bacterianas a serem ensaiadas quanto à produção de amilase e celulase extracelulares foram cultivadas em meio LB, a 30°C por 18 horas. Após esse período, essas amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB-amido ou meio de celulose. As placas foram incubadas a 30°C por 18 horas. Após o crescimento das colônias procedeu-se à revelação das atividades amilolítica e celulolítica. As superfícies das placas contendo meio LB-amido foram cobertas com uma solução de iodeto de potássio a 0,2% enquanto que as superfícies daquelas contendo meio de celulose foram cobertas com uma solução de Vermelho do Congo a 0,1%. A formação de um halo transparente ao redor de uma colônia revelava seu fenótipo amilolítico ou celulolítico.

Como controles positivo e negativo foram utilizadas as amostras de *X. campestris* CA110 e *E. coli* C600, respectivamente. O meio LA foi empregado para o controle da viabilidade das amostras ensaiadas.

2.8. Utilização de Diferentes Fontes de Carbono

Com o propósito de se estabelecer a capacidade da utilização de diferentes fontes de carbono por parte das amostras bacterianas estudadas, estas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio mínimo (M9) suplementado com diferentes fontes de carbono.

As amostras ensaiadas foram cultivadas em meio LB, a 30°C, por cerca de 18 horas. Aliquotas de 500 µl de cada cultura foram transferidas, separadamente, para tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 12.000 g por 1 minuto. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados por duas vezes, nas mesmas condições de centrifugação, em 1 ml de solução salina 0,15 M esterilizada. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em 500 µl de solução de sais de meio M9 e 50 µl de cada suspensão foram transferidos, separadamente, para tubos contendo 4 ml de solução de sais de meio M9. Os tubos foram incubados por cerca de 4 horas a 30°C. Esse procedimento foi feito com a finalidade de minimizar o endógeno das células bacterianas. Após esse período, as culturas foram lavadas por duas vezes (12.000 g/ 1 minuto) em solução de sais de meio M9 e semeadas em placas de Petri contendo meio mínimo (M9) isento de açúcar e placas contendo meio M9 suplementado, separadamente, com cinco diferentes tipos de açúcares: glicose, galactose, sacarose, manose ou arabinose (item 2.1.1.). Placas contendo caseína hidrolisada foram utilizadas para averiguação da capacidade da utilização de aminoácidos, como única fonte de carbono (item 2.1.2.). As placas foram incubadas por cerca de 72 horas a 30°C. A cada 24 horas procedia-se à leitura dos resultados.

Para o controle da preparação dos meios de cultura empregados neste ensaio foram utilizadas as amostras de *E. coli* BV55 e *E. coli* C600, respectivamente (Tabela I). O meio LA foi empregado para o controle da viabilidade das amostras ensaiadas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Espécies de Tefritídeos Investigadas e Respective Hospedeiros

Os tefritídeos utilizados neste estudo pertenciam à sub-família Tephritinae e foram identificadas as seguintes espécies: *Tetreuaresta* sp. nov. A (dois indivíduos), *Tomoplagia* sp. nov. 7 (cinco indivíduos), *Tomoplagia reimoseri* (oito indivíduos), *Tomoplagia incompleta* (cinco indivíduos), *Tomoplagia pseudopenicilata* (cinco indivíduos), *Tomoplagia costalimai* (um indivíduo), *Trupanea* sp (oito indivíduos) e *Xanthaciura biocellata* (três indivíduos), totalizando trinta e sete indivíduos.

Os insetos foram identificados nos níveis de gênero e espécie pelo Sr. Mestre Paulo Inácio de Knecht López de Prado do Lab. de Interação Inseto-Planta do Depto. de Zoologia (IB-UNICAMP). Os testemunhos dos insetos estão em poder do grupo do Projeto Biodiversidade de Fitófagos de Compostas coordenado pelo Prof. Dr. Thomas Lewinsohn do Lab. de Interação Inseto-Planta do Depto. de Zoologia (IB-UNICAMP) e serão depositados no Museu de História Natural da UNICAMP.

Os espécimes do gênero *Trupanea* (Foote *et al.*, 1993) utilizados neste estudo pertencem a espécies não descritas. *Tetreuaresta* sp. nov. A, *Tomoplagia* sp. nov. 7, representam novas espécies a serem descritas (fato confirmado pelo Dr. Allen Norrbom, especialista do grupo para tefritídeos neotrópicos do “United States Museum of Natural History” (P.I.K.L. Prado, comunicação pessoal).

Os tefritídeos emergiram de diferentes espécies de plantas hospedeiras, todas pertencentes à família Asteraceae: *Chromolaena decumbens*, *Echinocryne schwenkiaefolia*, *Lychnophora candelabrum*, *Lychnophora pohlii*, *Lychnophora villosissima*, *Proteopsis argentea*, *Trichogonia villosa*, *Trixis vauthieri*, *Vernonanthura mariana* e *Vernonia scorpioides*. Com exceção de plantas de *V. scorpioides*, apanhadas na Serra do Japi, todas as outras foram coletadas na Cadeia do Espinhaço. Essas plantas foram identificadas nos níveis de família, gênero e espécie pelos Profs. Dr. Hermógenes Freitas Leitão Filho e Dr. João Semir, do Depto. de Botânica (IB-UNICAMP).

Trabalhos sobre as espécies brasileiras de tefritídeos que infestam asteráceas foram realizados por Lewinsohn (1991), Prado & Lewinsohn (1994) e Lewinsohn *et al.* (1998).

3.2. Isolamento de Bactérias do Trato Digestivo

Os resultados dos ensaios de isolamento de bactérias dos órgãos digestivos dos tefritídeos investigados revelaram que a presença de bactérias nesses órgãos não é regular. Em quinze

(40,5%) dos trinta e sete espécimes, não foram isoladas bactérias de nenhum dos órgãos do trato alimentar. Este fato foi observado em todas as espécies analisadas, com exceção da espécie *X. biocellata*, representada por três indivíduos, todos apresentando bactérias em pelo menos um dos órgãos digestivos. Dentre os vinte e dois espécimes dos quais bactérias foram isoladas, apenas dois indivíduos de espécies diferentes (*Tomoplagia* sp. nov. 7 e *Trupanea* sp) apresentaram bactérias em todos os órgãos do trato alimentar.

O fato da presença de bactérias associadas a uma determinada estrutura do trato digestivo de tefritídeos não ser regular já foi relatado em espécies que infestam frutos (Drew *et al.*, 1983; Lüthy *et al.*, 1983) e em espécies que infestam asteráceas (Girolami, 1973; Girolami, 1982; Daser & Brandl, 1992). Estes últimos autores, trabalhando com o isolamento e identificação de bactérias do trato digestivo de oito espécies de tefritídeos, verificaram que larvas de cinco espécies do gênero *Urophora* (*U. cardui*, *U. cuspidata*, *U. jaceana*, *U. solstitialis* e *U. stylata*) e de *T. dilacerata* não abrigavam bactérias nos seus órgãos digestivos.

Os resultados referentes ao isolamento de bactérias encontram-se na Tabela II. Esta tabela apresenta os indivíduos analisados, suas espécies, hospedeiros dos quais emergiram, origem geográfica, época da coleta e ocorrência de bactérias nos diferentes órgãos do trato digestivo.

Tabela II. Procedência e Resposta ao Cultivo de Bactérias Presentes em Órgãos do Trato Digestivo de Tefritídeos Originados de 2 Regiões Geográficas Distintas

Indivíduos investigados	Planta Hospedeira	Origem	Condição climática	Órgão			
				D	P	I	
E1-1	<i>T. reimoseri</i>	Vernoniinae [*]	Cadeia do Espinhaço	inverno	+	+	-
E1-2	<i>T. reimoseri</i>	Vernoniinae [*]	Cadeia do Espinhaço	inverno	+	+	-
E1-3	<i>T. reimoseri</i>	Vernoniinae [*]	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	-
E2-1	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	-	+
E2-2	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	+
E2-3	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	-
E2-4	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	-	-
E2-5	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	-
E2-6	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	-
E2-7	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	+	-	-
E2-8	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	+
E2-9	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	+	+
E2-10	<i>T. costalimai</i>	<i>T. vauthieri</i>	Cadeia do Espinhaço	inverno	-	-	-
E3-1	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	Serra do Japi	verão	-	+	-
E3-2	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	Serra do Japi	verão	-	-	-
E3-3	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	Serra do Japi	verão	-	-	-
E3-4	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	Serra do Japi	verão	-	-	-
E3-5	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	Serra do Japi	verão	-	-	-
E4-1	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	+	-
E4-2	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-3	<i>Tetreuaresta</i> sp. nov. A	<i>P. argentea</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	+	-
E4-4	<i>Tetreuaresta</i> sp. nov. A	<i>P. argentea</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-5	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-6	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	+	-
E4-7	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-8	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. candelabrum</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-9	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-10	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. pohlii</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	+	-	-
E4-11	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	+	+	+
E4-12	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E4-13	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E5-1	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	+	-	+
E5-2	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	-	-
E5-3	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	+	+	+
E5-4	<i>X. biocellata</i>	<i>C. decumbens</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	+	+
E5-5	<i>X. biocellata</i>	<i>T. villosa</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	+	-	+
E5-6	<i>X. biocellata</i>	<i>T. villosa</i>	Cadeia do Espinhaço	verão	-	+	-

*: sub-tribo Vernoniinae (tribo Vernoniaceae), provavelmente *Vernonanthura* sp

D: divertículo esofágico; P: papo; I: intestino

+: crescimento bacteriano após cultivo em meio LB, a 30°C, por cerca de 24 horas

-: ausência de crescimento bacteriano após cultivo nas condições supra-citadas.

3.3. Caracterização das Amostras Bacterianas

3.3.1. Seleção preliminar das amostras

A seleção preliminar das bactérias isoladas do trato digestivo dos insetos analisados revelou, em primeira instância, a presença de dois grupos principais de bactérias. Um deles, composto somente por bacilos Gram-negativos que apresentavam crescimento a 37°C e o outro, integrado por bacilos Gram-positivos e Gram-negativos, com crescimento a 30°C e inibição do crescimento à temperatura de 37°C.

Nos tefritídeos originários da Cadeia do Espinhaço, o grupo predominante foi o das bactérias que apresentavam crescimento a 37°C, encontradas em 73% dos insetos que emergiram de hospedeiros coletados no inverno e em 87,5% daqueles apanhados no verão. Nos insetos que emergiram de plantas provenientes da Serra do Japi (apanhadas no verão), todas as amostras bacterianas obtidas cresciam a 37°C.

Quanto à morfologia, foram visualizadas colônias de coloração âmbar, esbranquiçadas e amareladas.

Todas as amostras isoladas apresentaram fenótipo negativo em relação à utilização da lactose (Tabela V).

Seleção em função da temperatura de crescimento e morfologia das colônias foi utilizada unicamente como uma primeira abordagem para a triagem de diferentes grupos bacterianos.

Esse método foi empregado Drew *et al.* (1983) em um estudo da flora bacteriana associada a *B. cacuminatus* e a *B. tryoni*. Esses autores consideraram que bactérias com características visivelmente diferentes representariam espécies distintas. Contudo, temperatura de crescimento e morfologia de colônia são parâmetros muito limitados para a caracterização segura de espécies bacterianas.

3.3.2. Análise eletroforética de proteínas totais

Do total de cem amostras bacterianas ensaiadas quanto ao perfil eletroforético de proteínas totais, aquelas apresentando perfís aparentemente idênticos foram reunidas em um grupo denominado de “grupo eletroforético” (item 2.5.2.). Essas amostras foram supostamente consideradas como pertencentes à mesma espécie ou grupo bacteriano. Foram estabelecidos oito grupos eletroforéticos. Diferentes grupos apresentavam distintos padrões eletroforéticos, hipoteticamente representando oito diferentes espécies ou grupos bacterianos. O número de amostras dentro de cada grupo foi variável, totalizando vinte amostras bacterianas (Tabelas VI e VII).

3.3.3. Identificação das amostras bacterianas

Vinte amostras bacterianas pertencentes aos oito grupos eletroforéticos e oito outras escolhidas aleatoriamente dentre as utilizadas nos ensaios de eletroforese (item 2.5.2.), foram identificadas de acordo com seu comportamento bioquímico (item 2.5.4). Os resultados dos ensaios de identificação bacteriana e a distribuição de gêneros bacterianos nos diferentes espécimes de tefritídios encontra-se na Tabela III. A tabela designa o inseto, seu hospedeiro, hábitat, época da coleta e o órgão do trato digestivo do qual a amostra bacteriana foi isolada.

A identificação revelou a presença de três grupos bacterianos distribuídos sem padrão definido entre as diferentes espécies de tefritídios investigadas: (1) bactérias da família Enterobacteriaceae (*Alcaligenes* sp, *Proteus* sp, *Serratia* sp e *Providencia* sp); (2) bactérias anaeróbicas facultativas e (3) bactérias aeróbicas estritas, estes dois últimos grupos compostos por microrganismos não identificáveis pela metodologia utilizada.

Houve clara predominância dos membros da família Enterobacteriaceae sobre outros grupos de bactérias, observando-se uma significativa prevalência do gênero *Serratia*.

Outros autores, estudando a flora bacteriana associada a tefritídios que infestam frutos relataram a predominância de Enterobacteriaceae, sendo que bactérias pertencentes a outros grupos permaneceram não identificados (Drew *et al.*, 1983; Fitt & O'Brien, 1985; Howard *et al.*, 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Drew & Lloyd, 1987; Howard & Bush, 1989; Solferini, 1990; Jang & Nishigima, 1990; Daser & Brandl, 1992).

O amplo isolamento de membros da família Enterobacteriaceae pode não refletir uma predominância desse grupo de bactérias na microbiota do trato alimentar dos tefritídios mas, sim, um efeito das metodologias empregadas para o isolamento e identificação de bactérias. Uma discussão desta situação encontra-se no item 3.7.

Tabela III. Distribuição de Amostras Bacterianas em Diferentes Espécies de Tefritídeos							
Indivíduos analisados	Planta Hospedeira	Origem	Condição climática	Órgão	Identificação / Amostra		
E1-1	<i>T. reimoseri</i>	Vernoniinae [†]	C. E.	inverno	DP	<i>Serratia</i> sp	1101
E1-2	<i>T. reimoseri</i>	Vernoniinae [†]	C. E.	inverno	DP	<i>Alcaligenes</i> sp	1107
E1-3	<i>T. reimoseri</i>	Vernoniinae [†]	C. E.	inverno	P	<i>Serratia</i> sp ²	1112
E2-1	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	C. E.	inverno	I	AENI	2105
E2-2	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	C. E.	inverno	IP	AENI ¹	2115
E2-3	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	C. E.	inverno	P	<i>Serratia</i> sp ²	2121
E2-3	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	C. E.	inverno	P	AENI ¹	2126
E2-5	<i>T. incompleta</i>	<i>E. schwenkiaefolia</i>	C. E.	inverno	P	<i>Serratia</i> sp ²	2133
E2-6	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	C. E.	inverno	P	<i>Serratia</i> sp ²	2143
E2-7	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	C. E.	inverno	D	AENI	2202
E2-8	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	C. E.	inverno	I	<i>Serratia</i> sp ²	2222
E2-9	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	C. E.	inverno	I	<i>Serratia</i> sp ²	2243
E2-9	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	C. E.	inverno	P	AENI	2303
E2-9	<i>Trupanea</i> sp	<i>T. vauthieri</i>	C. E.	inverno	P	<i>Serratia</i> sp	2305
E3-1	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	S. J.	verão	P	<i>Serratia</i> sp	3105
E3-1	<i>T. pseudopenicilata</i>	<i>V. scorpioides</i>	S. J.	verão	P	<i>Serratia</i> sp	3107
E4-1	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	C. E.	verão	P	<i>Providencia</i> sp	4102
E4-3	<i>Tetreuaresta</i> sp. nov. A	<i>P. argentea</i>	C. E.	verão	P	AENI	4112
E4-6	<i>T. reimoseri</i>	<i>V. mariana</i>	C. E.	verão	P	<i>Providencia</i> sp	4122
E4-10	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. pohlii</i>	C. E.	verão	D	NI	4132
E4-11	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	D	<i>Serratia</i> sp	4142
E4-11	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	P	<i>Serratia</i> sp	4202
E4-11	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	I	<i>Serratia</i> sp	4212
E5-1	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	D	NI	5102
E5-1	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	D	AENI	5104
E5-1	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	D	AENI	5105
E5-1	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	I	<i>Pseudomonas</i> ³	5118
E5-1	<i>Trupanea</i> sp	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	I	<i>Pseudomonas</i> ³	5307
E5-3	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	C. E.	verão	D	<i>Serratia</i> sp	5125
E5-3	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	C. E.	verão	D	<i>Proteus</i> sp	6109
E5-3	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	C. E.	verão	P	<i>Serratia</i> sp	5132
E5-3	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	C. E.	verão	I	<i>Serratia</i> sp	5143
E5-3	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	<i>L. villosissima</i>	C. E.	verão	I	<i>Proteus</i> sp	6130
E5-4	<i>X. biocellata</i>	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	P	<i>Serratia</i> sp	5212
E5-4	<i>X. biocellata</i>	<i>C. decumbens</i>	C. E.	verão	P	<i>Serratia</i> sp	6132
E5-5	<i>X. biocellata</i>	<i>T. villosa</i>	C. E.	verão	D	<i>Serratia</i> sp	5232
E5-6	<i>X. biocellata</i>	<i>T. villosa</i>	C. E.	verão	P	NI	5250

C.E.: Cadeia do Espinhaço; S.J.: Serra do Japi
D: divertículo esofágico; P: papo; I: intestino; DP: divertículo esofágico e papo; IP: intestino e papo
AENI: bactéria aeróbica estrita, não identificável pela metodologia utilizada
NI: amostra não identificável pela metodologia utilizada; ²: amostra identificada tentativamente
¹: amostra com perfil eletroforético idêntico à amostra 2105
²: amostra com perfil eletroforético idêntico às amostras 1101 e 2305
³: sub-tribo Vernoniinae (tribo Vernoniaceae), provavelmente *Vernonanthura* sp

3.4. Distribuição de Gêneros Bacterianos

3.4.1. Em órgãos do trato alimentar

A Tabela IV apresenta a distribuição e as frequências de ocorrência de gêneros bacterianos nos órgãos do trato alimentar de cada espécie de tefritídio investigada.

Tabela IV. Distribuição e Frequências de Ocorrência de Bactérias em Órgãos do Trato Digestivo das Espécies de Tefritídios Investigadas												
Tefritídios investigados	N	Divertículo esofágico			Papo			Intestino			Total	
		f	%	bactéria	f	%	bactéria	f	%	bactéria	f	%
<i>Trupanea</i> sp.	8	3/8	37,5	<i>Serratia</i> AENI NI	4/8	50,0	<i>Serratia</i>	4/8	50,0	<i>Serratia</i> <i>Pseudomonas</i>	6/8	75,0
<i>T. reimoseri</i>	8	2/8	25,0	<i>Alcaligenes</i> <i>Serratia</i>	5/8	62,5	<i>Alcaligenes</i> <i>Providencia</i> <i>Serratia</i>	0/8	0	-	5/8	62,5
<i>T. incompleta</i>	5	0/5	0	-	3/5	60,0	-	2/5	40,0	AENI	4/5	80,0
<i>T. pseudopenicilata</i>	5	0/5	0	-	1/5	20,0	<i>Serratia</i>	0/5	0	-	1/5	20,0
<i>Tomoplagia</i> sp.nov. 7	5	2/5	40,0	NI <i>Proteus</i> <i>Serratia</i>	1/5	20,0	<i>Serratia</i>	1/5	20,0	<i>Proteus</i> <i>Serratia</i>	2/5	40,0
<i>Tetreuaresta</i> sp.nov. A	2	0/2	0	-	1/2	50,0	AENI	0/2	0	-	1/2	50,0
<i>X. biocellata</i>	3	1/3	33,3	<i>Serratia</i>	2/3	66,6	NI <i>Serratia</i>	2/3	66,6	NI	3/3	100,0
<i>T. costalimai</i>	1	0/1	0	-	0/1	0	-	0/1	0	-	0/1	0
Total de indivíduos	37	8/37	21,6		17/37	45,9		9/37	24,3		22/37	59,5
N: número de indivíduos f: frequência da ocorrência de bactérias												

Considerando o conjunto das espécies de insetos investigadas neste trabalho, o papo foi o órgão mais regular, em relação ao divertículo esofágico e ao intestino, quanto à presença de bactérias (Tabelas III e IV), com exceção da espécie *Tomoplagia* sp. nov. 7, na qual o papo e o intestino estão em segundo lugar na ordem de presença de bactérias. O gênero bacteriano predominante foi *Serratia*, ocorrendo em todos os espécimes nos quais o papo apresentou bactérias.

O simples fato do papo ter sido o órgão mais regular quanto à presença de bactérias não implica que este órgão apresente o ambiente mais favorável para o estabelecimento de microrganismos. Por exemplo, Drew *et al.* (1983) relataram que em *B. tryoni*, o ambiente do

papo é adverso ao crescimento bacteriano por ser altamente ácido. Como não foram feitas medidas de pH do conteúdo dos papos dos insetos investigados, a situação encontrada pode ter duas explicações: é possível que, (1) nestes casos em particular, o papo ofereça melhores condições para a multiplicação bacteriana, uma vez que parece ser um órgão de armazenamento do alimento a ser digerido no intestino médio (Solferini, 1990) ou (2) o ambiente dos papos pode, a exemplo de *B. tryoni*, ser adverso ao estabelecimento de microrganismos e as bactérias isoladas destes órgãos estavam presentes de forma transitória, juntamente com o material ingerido.

O divertículo esofágico e o intestino foram os órgãos mais irregulares quanto à presença de bactérias, que correspondeu a 21,6% e 24,3% do total dos insetos analisados, respectivamente. A exemplo do papo, o gênero bacteriano predominantemente isolado destes órgãos foi *Serratia* (Tabelas III e IV).

Rattner & Stoffolano (1982; 1984) estudando a estrutura do divertículo esofágico de *R. pomonella* sugeriram que este órgão tem a função de alojar bactérias em tefritídeos, porém outros autores verificaram a ausência de bactérias em divertículos esofágicos em *U. solstitialis*, *U. quadrifasciata*, *E. sonchi* e *O. pupillata* (Girolami, 1973; Girolami, 1982) e em *B. oleae* (Lüthy *et al.*, 1983). Estes últimos autores, estudando a flora bacteriana associada ao divertículo esofágico de *B. oleae*, observaram a ausência de bactérias em vários desses órgãos. Esses autores verificaram que os divertículos esofágicos de adultos jovens, coletados no campo, de poucos dias de idade e mantidos sem alimentação eram, predominantemente, livres de bactérias ou estas estavam presentes em pequeno número. Quando alimentados, os insetos desenvolviam uma flora bacteriana no divertículo esofágico. É possível que este seja o caso de alguns dos espécimes analisados neste trabalho, uma vez que todos eram adultos jovens, de poucos dias de vida e tivessem recebido alimentação.

Tanto a presença como a ausência de bactérias nos insetos investigados e a distribuição de grupos bacterianos nos órgãos digestivos dos indivíduos dos quais bactérias foram isoladas, não apresentaram nenhuma correlação com a espécie do inseto, habitat, espécie do hospedeiro e estação de sua coleta (Tabelas II, III e IV).

A causa da irregularidade da presença de bactérias entre tefritídeos adultos da mesma espécie não está esclarecida, mas duas supostas situações poderiam estar envolvidas:

1) as bactérias presentes no trato digestivo dos tefritídeos adultos investigados teriam sido adquiridas pela alimentação. Como as formas adultas estiveram em contato direto com seus hospedeiros por um curto período de tempo após a emergência (itens 2.3.1. e 2.3.2.) não teria havido tempo para que alguns adultos se contaminassem com bactérias presentes na

superfície de seus hospedeiros através da alimentação. Por esse motivo, não teria havido o estabelecimento de uma flora bacteriana no trato alimentar de alguns insetos adultos. Neste caso, a ausência de bactérias em determinados indivíduos seria um efeito do procedimento experimental.

Segundo esta hipótese, não estaria ocorrendo a transmissão de bactérias do trato alimentar de fêmeas adultas para a progênie, pela contaminação dos ovos no processo da oviposição. Se tal fato fosse confirmado, poder-se-ia supor que o desenvolvimento larval seria independente da presença de bactérias simbiotes nas espécies de tefritídeos investigadas, vivendo em condições naturais.

2) as bactérias do trato digestivo dos tefritídeos adultos investigados seriam transmitidas pelas fêmeas via oviposição. Neste segundo caso, ou não estaria ocorrendo a transmissão uniforme de bactérias das fêmeas para a progênie, ou as bactérias presentes nos órgãos digestivos das larvas não estariam sendo transmitidas às formas adultas de modo regular.

Embora a transmissão de bactérias do trato digestivo de fêmeas adultas para a progênie via oviposição tenha sido demonstrada em *A. ludens* (Rubio & McFadden, 1966) e em *B. oleae* (Mazzini & Vitta, 1981), a origem precisa das bactérias associadas a tefritídeos é incerta. Esses microrganismos provavelmente disseminam-se nos hospedeiros em consequência do comportamento de regurgitação e reingestão do conteúdo do trato digestivo durante a alimentação, como foi observado por Drew & Lloyd (1987) em um experimento de campo com *B. tryoni*. Esses mesmos autores, demonstraram experimentalmente que uma linhagem mutante de *K. oxytoca* resistente a antimicrobianos, quando acrescentada à alimentação de *B. tryoni*, estabelecia-se no seu trato alimentar e distribuía-se em suas estruturas bucais. Essa bactéria podia ser recuperada da superfície de frutos infestados por esse inseto, bem como de sítios de oviposição, resultando na sua predominância em frutos injuriados por suas larvas. A dispersão da bactéria era causada pela constante ingestão e regurgitação do conteúdo do trato alimentar.

A transmissão de bactérias da fêmea para as larvas não parece ser uma regra geral entre os tefritídeos. Daser & Brandl (1992) relataram a ausência de bactérias nos tratos digestivos de larvas de *T. dilacerata* e de cinco espécies de *Urophora* enquanto que indivíduos adultos dessas espécies, coletados no campo, continham bactérias no trato intestinal. Segundo esses autores, as bactérias seriam adquiridas pelas formas adultas através da alimentação ou mesmo de forma casual e que, nestas espécies, seria improvável uma contínua transmissão de bactérias entre gerações, via oviposição.

Dos vinte e dois insetos que apresentaram bactérias em seus órgãos do trato alimentar apenas dois (9%) as apresentaram em todos os seus órgãos digestivos. Dentre os vinte restantes, oito indivíduos apresentaram bactérias em dois dos órgãos digestivos e doze em apenas um desses órgãos. Não foi observado nenhum padrão de distribuição de bactérias entre os órgãos digestivos que sugerisse uma progressão da colonização desses órgãos a partir do divertículo esofágico em direção ao intestino. Essa situação também se mostrou independente da espécie do inseto, hábitat, espécie do hospedeiro e estação de sua coleta (Tabela III). As razões para esses fatos permanecem obscuras e é possível que representem um artefato das condições de isolamento (item 3.7.).

É necessário cautela com qualquer inferência que se faça a respeito das situações encontradas, uma vez que, existe a possibilidade de que o trato digestivo dos tefritídeos investigados contenha bactérias de crescimento lento, com requerimentos nutricionais específicos, anaeróbicas estritas ou não cultiváveis em meios de laboratório, de tal forma que tais microrganismos tenham permanecido indetectados devido às limitações dos métodos para o isolamento e identificação de bactérias empregados neste trabalho.

3.4.2. Entre as diferentes espécies de tefritídeos

Serratia foi o gênero bacteriano predominantemente isolado dos órgãos digestivos dos insetos investigados. Este gênero estava distribuído de forma inespecífica em cinco das espécies de tefritídeos: *Tomoplagia* sp. nov. 7, *T. biocellata*, *T. pseudopenicilata*, *T. reimoseri* e *Trupanea* sp (Tabelas III e IV).

Nas espécies de tefritídeos nas quais *Serratia* não foi encontrada, o número de indivíduos apresentando bactérias foi muito pequeno: de *T. costalimai*, espécie representada por um único espécime, nenhuma bactéria foi isolada; de *Tetreuaresta* sp. nov. A, representada por dois indivíduos, apenas um deles apresentou bactérias e dos cinco espécimes de *T. incompleta*, bactérias foram isoladas de apenas dois indivíduos (Tabelas III e IV). O fato impede qualquer inferência quanto a uma associação específica com algum grupo bacteriano. Além do mais, nesses casos, as bactérias isoladas não puderam ser identificadas através da metodologia utilizada.

Não foi observada nenhuma especificidade de *Serratia* ou de qualquer outro gênero bacteriano na associação com qualquer das espécies de tefritídeos que viesse a caracterizar uma relação simbiótica particular.

A distribuição dos diferentes grupos bacterianos foi inespecífica, tanto entre indivíduos de uma mesma espécie, quanto entre as distintas espécies de tefritídeos. Não observada

nenhuma correlação com a espécie do inseto, hábitat, espécie do hospedeiro e estação de sua coleta (Tabelas III e IV). Nos órgãos do trato digestivo dos insetos analisados, frequentemente mais de um gênero bacteriano estava presente.

A predominância de *Serratia* sp pode representar influência ambiental uma vez que este gênero se distribuiu nas diferentes espécies de tefritídeos coletados no mesmo habitat em diferentes épocas do ano (Cadeia do Espinhaço, inverno e verão). O fato de *Serratia* sp ter sido a única bactéria isolada de um único espécime de *T. pseudopenicilata*, dentre cinco provenientes da Serra do Japi, não é suficiente para associá-la especificamente a essa espécie de tefritídeo, devido ao reduzido número de insetos analisados.

Similaridade de espécies bacterianas em diferentes órgãos do trato digestivo, bem como entre diferentes espécies de tefritídeos foi relatada por Drew *et al.* (1983).

Vários autores relataram a presença de bactérias da família Enterobacteriaceae (e outras não identificadas) no trato alimentar de diversas espécies de tefritídeos que infestam frutos ou asteráceas. Eles concordam que aparentemente não existem associações que caracterizem relações simbióticas específicas com qualquer espécie de tefritídeo estudado (Drew *et al.*, 1983; Rossiter *et al.*, 1983; Tsiropoulos, 1983; Fitt & O'Brien, 1985; Howard *et al.*, 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990; Daser & Brandl, 1992).

Em tefritídeos que infestam frutos, a bactéria *K. oxytoca* parece ser a espécie predominante, tendo sido encontrada em *Anastrepha* sp (Solferini, 1990), *Bactrocera* spp (Lloyd *et al.*, 1986) e em *R. pomonella* (Dean & Chapman, 1973; Rossiter *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1985; Howard & Bush, 1989). A presença regular de *K. ozaenae* e *E. cloacae*, dentre outras foi relatada por vários autores (Drew *et al.*, 1983; Solferini, 1990). O fato de *K. oxytoca* distribuir-se entre diferentes espécies de tefritídeos, torna improvável que desempenhe o papel de simbiote específico.

Em *R. alternata*, a bactéria predominante parece ser *Enterobacter* sp, não tendo *K. oxytoca* sido detectada nessa espécie de tefritídeo (Daser & Brandl, 1992).

Em espécies européias de tefritídeos que infestam asteráceas, Daser & Brandl (1992) relatam a predominância de bactérias do grupo *Enterobacter* em indivíduos pertencentes a espécie *U. cuspidata* e a predominância de bactérias do grupo *Erwinia* em insetos da espécie *U. solstitialis*. Como essas duas espécies de *Urophora* foram coletadas no mesmo sítio, os dados sugerem uma possível especificidade da flora bacteriana. O fato de *Enterobacter* e *Erwinia* serem gêneros comuns em superfícies de plantas (Drew & Lloyd, 1989) sugere a possibilidade destas bactérias serem adquiridas pela alimentação.

No presente estudo, não foram detectadas, nos insetos examinados, bactérias pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* ou *Erwinia*.

O isolamento dos gêneros *Serratia*, *Proteus* e *Providencia* parece ser pouco frequente em tefritídeos que infestam frutos (Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990) e em tefritídeos que infestam asteráceas tais espécies não foram detectadas anteriormente (Daser & Brandl, 1992).

Serratia sp foi a bactéria mais frequentemente isolada neste trabalho. Contudo, o fato dessa bactéria distribuir-se em cinco das diferentes espécies de tefritídeos estudadas, torna improvável que desempenhe o papel de simbiote específico. É mais provável que represente a bactéria mais facilmente detectável pelos métodos bacteriológicos empregados. Se nas condições ambientais do trato alimentar dos insetos investigados *Serratia* é a enterobactéria predominante é um fato não esclarecido.

3.4.3. Em *V. scorpioides*

Os cultivos de bactérias de folhas e flores de *V. scorpioides*, provenientes da Serra do Japi revelaram a presença de dois grupos principais de bactérias, compostos por amostras apresentando reações positivas e negativas com relação à utilização de lactose. Através da análise dos perfis eletroforéticos de proteínas totais de amostras coletadas aleatoriamente dentre esses dois grupos, foram reconhecidos pelo menos três padrões eletroforéticos distintos. Estes, apresentaram perfis protéicos completamente diferentes daqueles das amostras bacterianas isoladas de órgãos do trato digestivo de tefritídeos, cujos perfis de proteínas totais foram determinados. Os resultados da identificação bioquímica revelaram a presença de *Enterobacter* (provavelmente *E. cloacae*), de uma bactéria relacionada ao grupo *Enterobacter* e de uma espécie bacteriana que poderia ser uma amostra de *E. coli* agasogênica e com fenótipo negativo com relação à utilização de lactose e positivo para produção de amilase (Tabela V).

Bactérias pertencentes ao grupo *Enterobacter* são amplamente disseminadas no solo e no filoplano (Drew & Lloyd, 1987).

Dos cinco tefritídeos (identificados como *T. pseudopenicilata*) que emergiram dessa planta, apenas um apresentou bactérias associadas ao seu trato alimentar e somente ao nível de papo (Tabela II). Os quatro outros, ou não apresentavam bactérias associadas ao seu sistema digestivo, ou seriam portadoras de bactérias não detectáveis através dos métodos bacteriológicos utilizados (anaeróbicas estritas ou não-cultiváveis), ou ainda, bactérias não teriam sido detectadas por um artefato das condições de isolamento (item 3.7.). As bactérias isoladas foram identificadas como *Serratia* sp (Tabela IV).

Devido ao não isolamento de bactérias dos outros quatro espécimes de *T. pseudopenicilata*, não é possível qualquer comparação com os resultados obtidos com as culturas de bactérias de *V. scorpioides*. Se as bactérias provenientes dessa planta fossem de espécies diferentes daquelas isoladas dos espécimes de *T. pseudopenicilata*, poder-se-ia supor que os sítios de oviposição desses insetos não corresponderiam aos seus sítios de alimentação e, que as bactérias associadas à superfície do hospedeiro não se estabelecem no trato digestivo das larvas. Estas abrigariam apenas as espécies bacterianas eventualmente introduzidas pelo inseto parental no ato da oviposição. Contudo, não foram obtidos dados suficientes que amparem tais suposições.

3.5. Utilização de Diferentes Fontes de Carbono

Os resultados dos ensaios para a detecção da utilização de diferentes fontes de carbono e das atividades de amilase e celulase (Tabela V), revelaram que a grande maioria das amostras bacterianas testadas utilizam os açúcares simples mais comuns e também aminoácidos como fonte de carbono. Nenhuma das amostras isoladas de tefritídeos apresentou fenótipo positivo para fermentação de lactose. As únicas que apresentaram esta característica foram as isoladas de *V. scorpioides* e identificadas como *Enterobacter* sp.

Das dezesseis amostras bacterianas, provenientes dos tefritídeos estudados, utilizadas neste ensaio, apenas quatro expressaram o caráter amilolítico: *Alcaligenes* sp, *Providencia* sp, uma amostra identificada presumidamente como *Pseudomonas* sp e uma amostra aeróbica estrita não identificada; esta última, juntamente com outra bactéria não identificada apresentaram fenótipo positivo para digestão de celulose (Tabela V).

Esses resultados sugerem que a grande maioria das bactérias isoladas dos órgãos digestivos dos tefritídeos investigados não apresenta nenhuma vantagem especial para os seus hospedeiros em relação à digestão de compostos vegetais mais complexos como amido e celulose. Por outro lado, pode haver outras bactérias, não detectáveis com a metodologia bacteriológica empregada, ou, ainda, outros tipos de microrganismos envolvidos na degradação de tais compostos. Enquanto não forem aplicadas metodologias mais sofisticadas, este fato permanecerá indeterminado.

A digestão de, pelo menos parte, da celulose ingerida, seria vantajosa em termos nutricionais mas, não foram encontrados relatos da presença de microrganismos com alta atividade celulolítica em tefritídeos. O fato de apenas duas amostras bacterianas terem apresentado fenótipo positivo para a produção de celulase não parece ser significativo por várias razões: (1) não se sabe se, no ambiente do trato digestivo desses insetos, estas amostras

expressam esse caráter; (2) se o expressam, a que nível e rendimento o fazem ?; (3) é ignorado se estas bactérias estão presentes em pequeno número ou se, na realidade, são mais difíceis de serem detectadas e (4) pode-se discutir se a digestão de celulose é realmente importante para o inseto.

Thayer (1978) relatou que uma linhagem da bactéria *Serratia marcescens*, isolada do trato digestivo do termita *Reticulitermes hesperus*, produzia quantidades moderadas de carboximetilcelulase, digerindo lentamente geis de carboximetilcelulose. Contudo, nenhuma das amostras de *Serratia* sp isoladas neste estudo apresentaram fenótipo positivo para a degradação de celulose. Neste caso, ou as amostras de *Serratia* sp ensaiadas quanto a essa propriedade realmente não produzem enzimas celulolíticas ou as condições experimentais não favoreceram a detecção da expressão dessas enzimas.

Ainda não está determinado se a degradação de polímeros vegetais complexos como amido, celulose e pectinas, por parte de bactérias associadas a tefritídios, representa vantagens potencialmente importantes para esses insetos.

Devido ao fato de *K. oxytoca* ser a bactéria predominantemente associada a *Rhagoletis* (Dean & Chapman, 1973; Rossiter *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1985), Howard *et al.* (1985) estudaram a capacidade de amostras de *K. oxytoca*, associadas a *Rhagoletis*, de produzir enzimas pectolíticas. Nesse estudo, os autores verificaram a existência de amostras positivas e negativas quanto à expressão de atividade pectolítica. A observação de que mais de 25% das insetos estudados, incluindo todas as larvas de *R. pomonella*, eram portadoras de *K. oxytoca* negativa, sugere que a atividade pectolítica mediada por bactéria não é crítica para a sobrevivência de *Rhagoletis*.

Tabela V. Utilização de Diferentes Fontes de Carbono

Amostra bacteriana	Origem	LA	M9	aa	gli	lac	sac	gal	man	ara	ami	cel
1101	<i>Serratia</i> sp	<i>T. reimoseri</i>	+	R	+	+	-	+	R	R	-	-
2305	<i>Serratia</i> sp	<i>Trupanea</i> sp	+	R	+	+	-	+	+	-	-	-
3105	<i>Serratia</i> sp	<i>T. pseudopenicilata</i>	+	-	+	+	-	+	R	+	R	-
4142	<i>Serratia</i> sp	<i>Trupanea</i> sp	+	R	+	+	-	+	R	+	-	-
6132	<i>Serratia</i> sp	<i>Trupanea</i> sp	+	-	+	+	-	+	R	+	R	-
1107	<i>Alcaligenes</i> sp	<i>T. reimoseri</i>	+	R	+	+	-	+	R	R	R	+
4102	<i>Providencia</i> sp	<i>Trupanea</i> sp	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5118	<i>Pseudomonas</i> ?	<i>Trupanea</i> sp	+	R	+	+	-	R	R	R	R	+
5307	<i>Pseudomonas</i> ?	<i>Trupanea</i> sp	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2105	AENI	<i>T. incompleta</i>	+	-	+	R	-	R	R	-	-	-
2202	AENI	<i>Trupanea</i> sp	+	R	+	R	-	R	R	-	-	-
2203	AENI	<i>Trupanea</i> sp	+	R	+	+	-	R	R	-	-	-
4112	AENI	<i>Tetreuaresta</i> sp. nov. 1	+	-	+	+	-	+	-	R	-	-
5104	AENI	<i>Trupanea</i> sp	+	-	+	+	-	+	R	+	-	-
5105	AENI	<i>Trupanea</i> sp	+	-	+	-	-	+	+	+	R	+
4132	NI	<i>Tomoplagia</i> sp. nov. 7	+	R	+	+	-	+	-	+	-	-
510	NI	<i>Trupanea</i> sp	+	-	+	+	-	+	R	+	-	+
Ve1	<i>Enterobacter</i> sp*	<i>V. scorpioides</i>	+	-	+	+	+	-	R	R	R	-
Ve2	<i>Enterobacter</i> sp	<i>V. scorpioides</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Ve3	<i>E. coli</i> ?	<i>V. scorpioides</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	R	+
<i>E. coli</i> BV55	Controle		+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> C600	Controle		+	-	+	R	-	-	-	-	-	-
<i>X. campestris</i> CA110	Controle		N	N	N	N	N	N	N	N	N	+

+: crescimento; -: ausência de crescimento; R: crescimento residual; N: não testado
 LA: meio LA; M9: meio mínimo (M9) isento de fonte de carbono
 aa: meio M9 com aminoácidos (caseína hidrolisada) como única fonte de carbono
 gli: glicose; lac: lactose; sac: sacarose; gal: galactose
 man: manose; ara: arabinose; ami: amido; cel: celulose
 NI: bactéria não identificável pela metodologia utilizada
 AENI: bactéria acróbica estrita, não identificável pela metodologia utilizada
 *: provavelmente *Enterobacter cloacae*
 ?: amostra bacteriana identificada tentativamente; amostras controle: Tabela I

3.6. Grupos Eletroforéticos

A identificação das amostras bacterianas (item 2.5.4.), selecionadas de acordo com seus perfis eletroforéticos de proteínas totais (item 2.5.2.), revelou que, algumas amostras com perfis protéicos aparentemente idênticos - hipoteticamente da mesma espécie - pertenciam a gêneros diferentes. (Tabelas VI e VII). As razões para esse problema estão provavelmente ligadas a limitações da metodologia empregada.

O “percentual de acerto” variou de 50% a 100% dentre os oito grupos eletroforéticos estabelecidos pela aplicação da metodologia (Tabelas VI e VII). Estes resultados demonstram

que esta metodologia não é plenamente eficaz, mas pode ser considerada aceitável se um grande número inicial de bactérias tenham que ser selecionadas para posterior identificação.

Devido ao fato de várias amostras bacterianas não terem sido satisfatoriamente identificadas, a análise da variabilidade genética entre amostras bacterianas da mesma espécie ficou restrita ao gênero *Serratia*. Esse gênero apresentou quatro perfis eletroforéticos distintos (Tabelas VI e VII). Não foi observada nenhuma correlação entre algum grupo eletroforético de *Serratia* com alguma espécie de inseto ou de hospedeiro. Amostras de *Serratia* sp com perfis eletroforéticos idênticos distribuíam-se de modo inespecífico entre diferentes espécies de tefritídeos ou hospedeiros. Um caso interessante é o das amostras de *Serratia* sp 1101 e *Serratia* sp 3105 ambas apresentando perfis de proteínas totais idênticos (Tabela VI) e com distintas origens geográficas, Cadeia do Espinhaço e Serra do Japí, respectivamente. Essas amostras foram isoladas de insetos de espécies diferentes (*T. reimoseri* e *T. pseudopenicilata*, respectivamente) que emergiram de hospedeiros coletos em um intervalo de tempo de cerca de seis meses, porém pertencendo a gêneros relacionados (Tabela III). Uma vez que essa metodologia apresentou uma limitação em termos de especificidade, as amostras de *Serratia* não terem sido identificadas ao nível de espécie e de apenas um indivíduo de cada uma dessas espécies ter apresentado essas amostras, a análise desta situação fica prejudicada. Se mais insetos pertencendo ao mesmo gênero, associados a hospedeiros relacionados mas vivendo em habitats distantes, abrigassem em suas microfloras, bactérias geneticamente muito próximas, poder-se-ia supor que tais espécies de insetos teriam desenvolvido adaptações favorecendo associações com determinadas espécies bacterianas, tornando suas microfloras, específicas, em certa extensão.

Tabela VI. Grupos Eletroforéticos 1 a 3

Grupo 1				Grupo 2		Grupo 3			
<i>Serratia</i> (1101)	<i>Serratia</i> (2305)	<i>Serratia</i> (3105)	<i>Serratia</i> (4202)	<i>Alcaligenes</i> (1107)	AE NI (2303)	<i>Providencia</i> (4102)	AE NI (2202)	NI (5102)	NI (4132)

Tabela VII. Grupos Eletroforéticos 5 a 8

Grupo 4			Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7		Grupo 8		
AE NI (2105)	<i>Pseudomonas</i> (5118)	<i>Pseudomonas</i> (5307)	<i>Serratia</i> (5143)	AE NI (4112)	<i>Serratia</i> (6132)	<i>Proteus</i> (6109)	<i>Serratia</i> (5125)	<i>Serratia</i> (5232)	<i>Serratia</i> (4142)

3.7. Identificação Bacteriana

Os métodos bacteriológicos empregados neste estudo, para o isolamento e identificação de bactérias, restringem a amplitude de detecção desses microrganismos. Tais métodos são limitados, basicamente, por três motivos: (1) o isolamento se limita à detecção de organismos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos; (2) a metodologia de identificação restringe-se a bactérias do grupo Enterobacteriaceae e (3) a metodologia não gera dados que permitam a quantificação da presença dos diferentes grupos bacterianos na comunidade.

A utilização dessas metodologias não permite a detecção, isolamento e identificação de bactérias anaeróbicas estritas e de bactérias não-cultiváveis em meios de laboratório. Por exemplo, Girolami & Cavalloro (1972) relataram a presença de bactérias (visualizadas ao microscópio) no divertículo esofágico de *B. oleae*, as quais não puderam ser cultivadas *in vitro*. Portanto, a associação de outros tipos de microrganismos aos órgãos do trato alimentar dos espécimes analisados deve ser considerada.

Métodos bacteriológicos para identificação de Enterobacteriaceae foram utilizados por outros autores no estudo da composição da microflora do trato alimentar de tefritídios (Howard 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990; Daser & Brandl, 1992). Portanto, o extensivo isolamento de membros da família Enterobacteriaceae pode não refletir uma predominância desse grupo de bactérias na microbiota do trato alimentar dos tefritídios mas, um efeito da metodologia. A predominância do gênero *Serratia*, no conjunto dos tefritídios investigados neste trabalho, pode tanto refletir uma maior adaptação desse grupo bacteriano ao ambiente dos órgãos digestivos desses insetos, como significar que essa bactéria se adapte melhor às condições de cultivo, superando outros competidores. A mesma situação pode estar ocorrendo com aquelas bactérias mais frequentemente isoladas do trato alimentar de tefritídios em outros estudos.

O isolamento preferencial de membros da família Enterobacteriaceae pode realmente ser um artefato dos métodos bacteriológicos utilizados neste e em estudos de outros autores. Existe a possibilidade de outros grupos bacterianos estejam envolvidos em relacionamentos simbióticos com tefritídios. Isto, porém, não significa, que Enterobacteriaceae não sejam importantes como simbiontes. É mesmo possível que tais bactérias desempenhem funções importantes ou que estejam presentes em maiores quantidades em relação a outros grupos bacterianos.

3.8. Simbiose

O termo simbiose refere-se à convivência entre dois organismos de espécies diferentes, em relações que variam de mutuamente benéficas (mutualismo), neutras (comensalismo) ao caso da relação ser deletéria a um dos parceiros, em benefício do outro (antagonismo). Para excluir os muitos tipos de relações parasíticas conhecidas na natureza, o termo é frequentemente restrito a associações que são mutuamente vantajosas para os parceiros (Margulis, 1971).

Considera-se como endossimbiose, a associação entre dois organismos de espécies diferentes, na qual um deles, o “hospedeiro”, abriga o outro, o “simbionte”, no interior de seu corpo. Este termo tem sido empregado indistintamente para as associações nas quais o simbionte se aloja em estruturas específicas do organismo do hospedeiro e naquelas em que o simbionte invade e estabelece-se no interior das células de determinados tecidos do hospedeiro.

Na endossimbiose haveria benefícios tanto para o hospedeiro quanto para o simbionte. Segundo (Buchner, 1965) o hospedeiro apresentaria estruturas que seriam adaptações para a manutenção de simbioses, os quais seriam beneficiados com a disponibilidade de um ambiente para seu abrigo, proteção e nutrição.

As bactérias associadas aos tefritídeos que infestam frutas foram, desde o início do século, consideradas como endossimbiontes (Petri, 1909; Haggren, 1966; Miyasaki, 1968; Girolami, 1982; Lüthy *et al.*, 1983; Girolami, 1986).

As relações simbióticas entre tefritídeos e bactérias seriam interações mutualísticas nas quais as bactérias seriam necessárias para a vida do inseto. A presença de bactérias em sítios de oviposição, em larvas em desenvolvimento e em insetos adultos, sugere a existência de uma associação entre os tefritídeos e suas bactérias.

Quando se comparam os resultados dos estudos sobre a associação de bactérias ao trato alimentar dos tefritídeos que infestam frutas e aqueles isoladas deste trabalho, em nenhum momento se observam associações que caracterizem relações simbióticas específicas com qualquer espécie particular de tefritídeo estudada. Dentre as espécies bacterianas identificadas em tefritídeos que infestam frutas, destaca-se *K. oxytoca*, frequentemente isolada de diferentes espécies desse grupo de tefritídeos (Dean & Chapman, 1973; Rossiter *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Howard & Bush, 1989; Solferini, 1990). Portanto, é improvável que *K. oxytoca* desempenhe o papel de simbionte específico.

As bactérias isoladas do trato intestinal de indivíduos adultos de *U. cuspidata* e *U. solstitialis*, coletados no campo, foram identificadas como pertencentes aos grupos

Enterobacter e *Erwinia*, respectivamente (Daser & Brandl, 1992). Enquanto a flora bacteriana intestinal parecia ser bastante uniforme em cada espécie, houve diferenças entre espécies, embora ambas fossem coletadas nos mesmos sítios e no mesmo período do ano, procurando-se assim excluir influências ambientais. Esses autores sugerem que, não sendo seus resultados artefatos das condições de isolamento, ou *U. cuspidata* e *U. solstitialis* estabeleceram condições ambientais em partes do trato digestivo que são seletivas para certos grupos de bactérias, ou então, as bactérias que vivem no filoplano de *C. nutans* (*U. solstitialis*) e *C. scabiosa* (*U. cuspidata*) são diferentes.

O fato de *Serratia*, ao invés de *K. oxytoca*, *Enterobacter* sp ou *Erwinia* sp, ser a bactéria predominantemente isolada dos tefritídios investigados neste estudo, pode significar hábitos alimentares diferentes, distintos sítios de alimentação ou, ainda, influência do habitat. A presença de distintas espécies bacterianas em diferentes grupos de tefritídios, talvez reflita uma situação de melhor adaptação às condições ambientais do trato alimentar de uma determinada espécie ou grupo de insetos.

De modo geral, e em relação ao tipo de bactérias que tem sido isoladas e identificadas neste estudo e em trabalhos de outros autores, os tefritídios parecem apresentar microfloras similares, constituídas principalmente de enterobactérias pertencentes a espécies amplamente disseminadas no solo, em superfícies de plantas e em excrementos de animais (Drew & Lloyd, 1987; Hendrichs & Hendrichs, 1990; Hendrichs *et al.*, 1993; Prokopy *et al.*, 1993a; Prokopy *et al.*, 1993b). O fato se deve, muito provavelmente, ao hábitos alimentares desses insetos.

Embora vários estudos questionem a existência de um relacionamento simbiótico obrigatório entre tefritídios e as espécies bacterianas identificadas (Drew *et al.*, 1983; Rossiter *et al.*, 1983; Tsiropoulos, 1983; Fitt & O'Brien, 1985; Howard *et al.*, 1985; Lloyd *et al.*, 1986; Solferini, 1990), existe a possibilidade de que o trato digestivo dos tefritídios contenha outras espécies bacterianas com requerimentos nutricionais mais específicos, bactérias anaeróbicas estritas ou microrganismos não-cultiváveis, de tal forma que permaneceram indetectados, dadas a metodologias microbiológicas empregadas. Tais organismos, se presentes, poderiam estar envolvidos em funções importantes para o inseto hospedeiro (Girolami & Cavallo, 1972; Lloyd *et al.* 1986; Daser & Brandl, 1992).

Apesar da diversidade de espécies constituindo a flora bacteriana dos tefritídios, o ponto de vista simbiótico foi defendido por vários autores. Essas bactérias pareciam, senão indispensáveis, pelo menos importantes, como fontes adicionais de nutrientes essenciais (especialmente aminoácidos) para a sobrevivência e o amadurecimento sexual de fêmeas, e

consequentemente, para o sucesso reprodutivo, com óbvia importância evolucionária (Fytizas e Tzanakakis, 1966a; Haggen, 1966; Miyasaki *et al.*, 1968; Tzanakakis & Stavrinides, 1973; Tzanakakis & Lambrou, 1975; Tzanakakis *et al.*, 1975; Tsiropoulos, 1977; Lambrou & Tzanakakis, 1978; Tsiropoulos, 1981; Courtice & Drew, 1983; Drew *et al.*, 1983; Drew & Lloyd, 1987; Jang & Nishigima, 1990; Prokopy *et al.*, 1991; Robacker, 1991).

A existência de simbiose em *B. tryoni* foi questionada por Drew *et al.* (1983) e todas as bactérias foram consideradas originárias da alimentação. As bactérias da família Enterobacteriaceae, bem como de outros grupos podem ser adquiridas pelos tefritídios em outras fontes como, por exemplo, excrementos de animais (Hendrichs *et al.*, 1993; Prokopy *et al.*, 1993a; Prokopy *et al.*, 1993b).

Um outro fato que sugere a existência de relações simbióticas para as bactérias associadas a tefritídios foi o observado por Drew & Lloyd (1987) de que os frutos do hospedeiro natural de *B. tryoni* só passavam a apresentar bactérias do tipo associado a essa espécie após sua infestação, o que significaria que os insetos traziam consigo suas próprias bactérias.

Vários autores observaram que as larvas de algumas espécies de tefritídios que infestam frutos não desenvolvem no fruto hospedeiro na ausência de seus simbiossiontes, que nestes casos poderiam ser mutualistas obrigatórios (Fytizas & Tzanakakis, 1966a; Haggen, 1966; Tzanakakis & Stavrinides, 1973). Supõe-se que a ação bacteriana seja responsável pela hidrólise das proteínas dos frutos, o que permitiria sua utilização pelas larvas, além do fornecimento de nutrientes suplementares (Fytizas & Tzanakakis, 1966a; Haggen, 1966; Tzanakakis & Lambrou, 1975; Tzanakakis *et al.*, 1975; Tzanakakis & Stavrinides, 1973).

Por outro lado, dados obtidos em outros estudos sugerem que tal condição não é generalizada. Howard (1989) apresenta evidências de que as larvas de *Rhagoletis* não dependem de simbiossiontes para a utilização dos tecidos da maçã. Daser & Brandl (1992) observaram que larvas de cinco espécies de *Urophora* não apresentam bactérias em seus órgãos digestivos. Este último caso sugere que as larvas desses insetos não só não dependem de fontes adicionais de nutrientes para assegurar seu desenvolvimento como a própria presença de bactérias seria indesejável, pois poderiam atacar os tecidos da galha destruindo o abrigo das larvas. A presença de bactérias em larvas de espécies formadoras de galhas poderia representar um condição não-adaptativa.

A presença ou ausência de bactérias em larvas de diferentes espécies de tefritídios parece estar relacionada ao seu estilo de vida e seriam adaptações que assegurariam seu desenvolvimento e sobrevivência.

A maioria dos estudiosos vêem muitas das associações entre insetos e microrganismos como sendo uma relação mutualística. O fato de que algumas espécies de microrganismos podem digerir compostos vegetais tais como a celulose, lignina (Breznak, 1982; Breznak & Brune, 1994) ou pectinas (von Riessen, 1976; Starr *et al.*, 1977) levou Howard *et al.* (1985) a testarem a capacidade de *K. oxytoca* (bactéria predominante em insetos do complexo *R. pomonella*) de degradar compostos pécnicos. Embora muitas linhagens de *K. oxytoca* associadas a *Rhagoletis* apresentassem o caráter pectolítico, esses autores encontraram evidências de que atividade pectolítica mediada por bactéria não é crítica para a sobrevivência de *Rhagoletis*.

Howard & Bush (1989) estudando os efeitos da eliminação e reinfecção experimental com *K. oxytoca* isolada de *R. suavis* e *R. pomonella* observaram que a ausência da bactéria não afetava positiva ou negativamente os componentes de adaptação estudados. Sugeriram que larvas de *Rhagoletis* não dependem da flora bacteriana para lhes fornecer nutrientes essenciais ou para detoxificar compostos secundários das plantas presentes em sua alimentação.

Por outro lado, vários autores apresentaram evidências de que, pelo menos sob condições experimentais, a eliminação da flora bacteriana afeta adversamente a sobrevivência e a reprodução de *B. oleae* (Tzanakakis & Lambrou, 1975; Tzanakakis *et al.*, 1975; Tzanakakis & Stavrinides, 1973; Lambrou & Tzanakakis, 1978) e de *R. completa* (Tsiropoulos, 1981). Outros autores, demonstraram que a bactéria *P. melophthora* (presente em *R. pomonella*) é capaz de degradar vários tipos de pesticidas (Boush & Matsumara, 1967) e de sintetizar metionina e cistina, dois aminoácidos não encontrados em maçãs (Miyasaki *et al.*, 1968). Esta bactéria contribuiria para a detoxificação da dieta natural e possivelmente forneceria aminoácidos para seu hospedeiro.

O termo simbiose não tem sido claramente definido nos estudos relativos a associação de bactérias com tefritídeos. Este termo parece ser empregado com um sentido amplo, referindo-se a qualquer bactéria comumente associada com qualquer espécie de tefritídeo. A mesmo tempo, parece haver uma preocupação geral na busca por uma espécie bacteriana particularmente associada com uma determinada espécie de tefritídeo. Tem-se procurado uma espécie bacteriana que possa ser reconhecida como simbiote específico e obrigatório, cuja presença seja essencial não somente para o desenvolvimento de larvas como para a sobrevivência e/ou o sucesso reprodutivo do inseto adulto.

Simbiose no sentido de uma relação obrigatória, estrita e mutuamente benéfica não foi ainda conclusivamente demonstrada. Até o presente momento não parece haver uma

conclusão definitiva quanto a alguma espécie bacteriana em particular ser um simbiote, uma vez que nenhuma espécie parece estar consistentemente associada com qualquer espécie de tefritídio.

Apesar de Daser & Brandl (1992) terem observado uma associação aparentemente uniforme e específica para as microfloras de *U. cuspidata* e de *U. solstitialis* deve-se ter em mente, contudo, que os métodos de isolamento e identificação de bactérias utilizados por esses e outros autores, restringem o espectro de bactérias que podem ser detectadas. A composição das comunidades microbianas em todos os casos estudados pode ser mais complexa do que a encontrada até o presente momento.

Girolami (1986) considera que a simbiose bactéria-tefritídio possa se dar com mais de uma espécie bacteriana em diferentes populações do mesmo inseto. Segundo esse autor, a possibilidade de que diferentes bactérias possam ocupar órgãos definidos da mesma espécie de tefritídio, torna questionável a busca por um simbiote específico. Neste caso, a simbiose bacteriana em tefritídios não seria espécie-específica. O papel de simbiote estaria sendo desempenhado por diversas espécies bacterianas com características comuns o suficiente para pertencerem a um grupo mais amplo, como, por exemplo, a família Enterobacteriaceae (Howard *et al*, 1985; Solferini, 1990).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a predominância de *Serratia* sp em cinco espécies de tefritídios analisados. Contudo, a presença não específica de outros gêneros bacterianos, nesses insetos, sugerem a existência de uma situação mais complexa.

A prevalência de espécies bacterianas particulares em espécies diferentes de membros da sub-família Tephritinae coletados em continentes diferentes pode ser uma indicação, ou de influência ambiental ou que diferentes espécies bacterianas encontram melhores condições de adaptação em determinadas espécies de tefritídios, como é o caso de *K. oxytoca* em algumas espécies de tefritídios que infestam frutos. Isto, contudo, não é, ainda, evidência do estabelecimento de relações específicas.

Solferini (1990) argumenta que a diversidade de espécies da flora bacteriana associada aos tefritídios que infestam frutas pode conferir maior versatilidade para a exploração de recursos alimentares. Esta versatilidade estaria muito mais relacionada a adultos do que a larvas, as quais são restritas ao substrato alimentar, ainda que em alguns casos estas sejam generalistas quanto aos tipos de frutos explorados. Os adultos, de maneira geral considerados generalistas, utilizam fontes alimentares distintas como pólen, exudatos de insetos, suco de frutas e excrementos (Tsiropoulos, 1977; Malavasi *et al*, 1983; Hendrichs *et al.*, 1993; Prokopy *et al.*, 1993a; Prokopy *et al.*, 1993b). Além de servirem como fonte de com-

plementação nutricional, as bactérias poderiam atuar como agentes tanto da digestão de compostos vegetais como celulose e lignina, como da detoxificação do substrato alimentar, daí a importância de uma flora bacteriana diversificada.

Os resultados de todos os estudos a respeito do papel das bactérias associadas a tefritídeos levam a crer que qualquer espécie ou grupo bacteriano pode desempenhar papéis importantes no metabolismo, desenvolvimento, comportamento e ecologia destes insetos. Um conceito restrito de simbiose, implicando a existência obrigatória de um simbiote específico não cabe neste contexto.

A possibilidade da existência de um simbiote específico e obrigatório - ainda não detectado - deve ser considerada.

3.9. Considerações Gerais

A associação de bactérias com insetos e outros animais em relações estáveis - “simbioses” - é, provavelmente, tão antiga quanto o advento da vida animal na Terra.

Estudos evolucionários sugerem que a bactéria *Buchnera aphidicola*, um simbiote intracelular obrigatório de afídios tornou-se associada a esses insetos há cerca de 250 milhões de anos (Baumann *et al.*, 1995). Cano & Borucki (1995) isolaram e cultivaram com sucesso esporos de bactérias do trato intestinal de abelhas fossilizadas em âmbar há cerca de quarenta milhões de anos. Esses autores identificaram a bactéria como *Bacillus sphericus*, que é encontrada em numerosas espécies atuais de abelhas (Gilliam, 1997).

Mais recentemente, Rhodes *et al.* (1998) isolaram e identificaram bactérias pertencendo a trinta e oito diferentes taxa de restos de material intestinal de um mastodonte de doze mil anos de idade. 41% desses isolados pertenciam à família Enterobacteriaceae.

As comunidades microbianas associadas ao sistema digestivo de animais são de extrema importância para sua sobrevivência.

O trato intestinal dos mamíferos contém uma das comunidades bacterianas mais densamente estruturadas encontradas na natureza. A microbiota do cólon humano está razoavelmente bem caracterizada sendo constituída por população complexa de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mais de 97% das quais são anaeróbios estritos. Membros da família Enterobacteriaceae constituem a minoria da população. Algumas das espécies bacterianas dominantes no cólon humano não puderam, ainda, serem cultivadas. A microflora é de importância vital por constituir um dos mecanismos de defesa contra a patogênese bacteriana, competindo com invasores potenciais por nutrientes e sítios de anexação. Esses microrganismos são também importantes para a digestão de alimentos e

fornecimento de nutrientes, como vitaminas e aminoácidos (Salyers, 1984; Madigan *et al.* 1996; Wilson & Blitchington, 1996).

As comunidades microbiológicas associadas ao trato digestivo dos animais ruminantes digerem celulose e outros polissacarídeos em compostos assimiláveis que são utilizados como fonte de energia por seus hospedeiros. Tais microrganismos são digeridos pelo animal e usados como fontes de aminoácidos e vitaminas (Krause & Russell, 1996; Madigan *et al.* 1996).

Em insetos, a importância da associação de bactérias com o trato digestivo pode ser exemplificada por aquelas dos cupins e abelhas.

Microrganismos associados ao trato digestivo das várias espécies de cupins são essenciais para a sobrevivência desses insetos por digerirem celulose e lignina (Breznak, 1982; Breznak & Brune, 1994).

Em *Apis mellifera*, os ovos, pupas e abelhas operárias ao emergirem como adultos são usualmente livres de bactérias. Os adultos adquirem uma microflora intestinal pelo intercâmbio de alimento com outros indivíduos na colônia e através do consumo de pólen. Os microrganismos da microflora desses insetos - notadamente *Bacillus* spp - são importantes para a conversão do pólen estocado em alimento para as abelhas operárias, bem como pela complementação e preservação do alimento sintetizando aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, enzimas e substâncias antimicrobianas, além de protegerem a saúde da colônia pela produção de antibióticos (Gilliam, 1997).

A situação das associações de bactérias com o trato alimentar dos tefritídeos não está ainda esclarecida. Dados os hábitos alimentares dos tefritídeos adultos na natureza, a ingestão de bactérias é inevitável. A menos que o inseto tenha desenvolvido mecanismos antibacterianos de amplo espectro, que vão desde completa ausência de condições ambientais para a reprodução e estabelecimento bacteriano ou até mesmo na produção de substâncias antimicrobianas, este fatalmente será contaminado e uma microflora poderá estabelecer-se. Dependendo das relações que esses insetos possam ter desenvolvido com seus microrganismos, as bactérias poderão, ou não, serem transmitidas às larvas, seja via contaminação do ovos ou do seu substrato alimentar no ato da oviposição. Possuam ou não, as larvas, bactérias associadas ao seu trato alimentar, a microflora será continuamente renovada com a alimentação do inseto adulto na natureza.

Embora não existam dados da antiguidade das relações dos tefritídeos e suas bactérias, pode-se inferir que são muito antigas, tendo-se por base as informações existentes para outros

insetos. Portanto, relações simbióticas devem mesmo existir entre esse grupo de insetos e bactérias. As condições exatas dessas relações porém, ainda não foram determinadas.

Os tefritídeos apresentam microfloras diversificadas e aparentemente não-específicas e, como foi discutido, vários grupos importantes de bactérias ainda não puderam ser detectados nesses insetos. Se esses microrganismos estão sendo adquiridos através da alimentação, a menos que as diferentes espécies de tefritídeos tenham estabelecido distintas condições químicas e físicas (receptores e diferentes condições de pH, por exemplo) nos seus tratos digestivos que selecionem que espécies bacterianas podem se estabelecer, a composição da microflora tenderá, pelo menos em certa extensão, a ser inespecífica. Neste caso, diferenças na composição da microflora poderão ser devidas aos fatores ecológicos aos quais diferentes espécies de insetos estejam sujeitas, como sazonalidade, hábitat, sítios de alimentação, fonte de alimento disponível no hábitat, tipo de hospedeiro, etc. Uma microflora diversificada está mais sujeita a alterações ambientais que um simbiote específico um papel determinado.

A composição da microflora do trato digestivo dos tefritídeos deve ser complexa e dinâmica, sendo difícil de precisar o papel de cada espécie bacteriana, isoladamente.

Segundo Sonea (1988) as bactérias vivem, na maioria dos casos, em comunidades heterogeneas, compostas de linhas metabólicas distintas que se sustentam umas às outras. Cada comunidade funcionaria como um único organismo, com uma divisão de trabalho extremamente eficiente. Vista sob este prisma, a microflora como um todo seria a entidade simbiote. Mais importante do que a ação de uma única espécie bacteriana, estaria o efeito integrado da comunidade microbiana no desenvolvimento, maturação sexual, sucesso reprodutivo e sobrevivência desses insetos. Os microrganismos poderiam sintetizar aminoácidos e vitaminas e fornece-los aos seus hospedeiros, digerir celulose e lignina, além de competir com possíveis patógenos por sítios de colonização e nutrientes. Os insetos, por sua vez, forneceriam abrigo, nutrição e condições físicas e químicas adequadas à multiplicação bacteriana.

A reunião de organismos procariotos em comunidades organizadas em ambientes tais como os de tratos digestivos, poderia ser importante sob o ponto de vista evolucionário, uma vez que tais ambientes favorecem o contato íntimo entre os membros da comunidade, potencialmente facilitando o intercâmbio de genes adaptativos. Além do mais, os insetos poderiam estar atuando como agentes de disseminação dos seus microrganismos na natureza e para outros animais.

Segundo (Matioli & Solferini, 1993), as interações entre tefritídeos, bactérias e hospedeiros são complexas e a influência de cada componente não é isolada. No ambiente

do trato alimentar de larvas de espécies associadas a frutos, as bactérias são abrigadas e protegidas de um ambiente inóspito (frutas imaturas) até que a fruta amadureça e o simbiote possa explorar a polpa. Além do mais, a microflora das larvas pode competir com patógenos invasores. Para os insetos adultos que são saprófitas generalistas a cerca de suas fontes de alimento e que requerem proteína para sua reprodução, os microrganismos seriam importantes na ampliação de seus recursos alimentares utilizando simbioses de modo similar aos ruminantes: como fontes de proteína e agentes detoxificadores. Ainda segundo esses autores, durante sua evolução, os tefritídeos poderiam ter mudado seus hábitos de saprófitas oportunistas para uma especialização em plantas hospedeiras, o que teria sido parcialmente dependente dos microrganismos que inicialmente eram sua principal fonte de alimento.

Atualmente novas técnicas de identificação de microrganismos estão disponíveis e que permitem o isolamento de uma ampla gama de bactérias, incluindo aquelas para as quais métodos de isolamento e cultivo em meios de laboratório ainda não foram desenvolvidos. Dentre estas destaca-se a combinação das técnicas da “polymerase chain reaction” (PCR) com as de sequenciamento de ácidos nucleicos. O método baseia-se na existência de seqüências altamente conservadas no RNA da subunidade menor dos ribossomos (RNAr 16S ou 18S) de todas as bactérias e seqüências intersticiais variáveis nessas moléculas que são espécie-específicas. A molécula de RNAr 16S é encontrada em todas as bactérias e tem se tornado um padrão universal tanto para a identificação como a para classificação bacteriana segundo relações filogenéticas. A amplificação, através da técnica de PCR, de seqüências de DNA complementares a seqüências variáveis do RNAr 16S de um microrganismo desconhecido, e sua comparação com seqüências variáveis do RNAr 16S de espécies conhecidas, fornece informação suficiente para identifica-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou coloca-lo em uma nova espécie. Uma sonda de hibridização fluorescente baseada na seqüência de DNA da região variável pode ser usada para visualizar a presença da bactéria no organismo estudado. Essas técnicas têm sido empregadas em estudos taxonômicos (Vandamme *et al.*, 1996; Balkwill *et al.*, 1997), em estudos sobre diversidade bacteriana (Rochelle *et al.*, 1992; von Wintzingerode *et al.*, 1997), estudos da composição das microbiotas do rúmen bovino (Krause & Russell, 1996) e do cólon humano (Wilson & Blitchington, 1996) e de identificação de bactérias de interesse clínico (Jousimies-Somer, H. 1997; La Scola & Raoult, 1998). Vários autores têm empregado estas abordagens moleculares para o estudo de caracterização de endossimbiontes de insetos (Aksoy *et al.*, 1995; Baumann *et al.* 1995; Ohkuma & Kudo, 1996; Werren, 1997) e de outros artrópodos (Noda *et al.* 1997).

O uso de técnicas moleculares seria uma abordagem nova e eficaz para a identificação das espécies bacterianas que compõem a comunidade microbiana associada aos órgãos digestivos de tefritídeos. Presentemente, contudo, tais técnicas fornecem pouca informação sobre a abundância de gêneros individuais devido a artefatos da amplificação. A determinação de que grupos bacterianos são mais abundantes na microflora dos tefritídeos requer o desenvolvimento de abordagens de segunda geração que gerem dados quantitativos.

Após uma identificação satisfatória dos microrganismos da microbiota dos trato digestivo de tefritídeos, uma segunda abordagem seria a administração de substâncias antimicrobianas para verificar que bactérias estariam sendo eliminadas, que efeitos a ausência de bactérias apresentaria em parâmetros como longevidade, maturidade, fecundidade e digestibilidade de alimentos. A quantificação de aminoácidos, vitaminas, carboidratos, lipídios e enzimas na presença e na ausência de simbioses poderia determinar sua importância na nutrição dos insetos. A pesquisa da produção de substâncias antibacterianas e antimicóticas forneceria dados sobre a competitividade de determinados componentes da microflora, bem como de um possível papel protetor em direção aos insetos.

A pesquisa das interações entre bactérias e tefritídeos também requerem estudos coordenados da biologia e ecologia tanto dos insetos, quanto de seus hospedeiros, além do conhecimento da ecologia dos habitats e interações com fontes de alimento e outros animais.

O estudo dos microrganismos envolvidos em associações simbióticas com insetos apresenta importância tanto acadêmica quanto prática, provendo maior conhecimento de que espécies de microrganismos são simbioses importantes para os insetos, outros animais e humanos, além de contribuir para o entendimento da dinâmica das populações no sentido evolucionário (Staley *et al.*, 1997). Portanto, o estudo da microbiota de insetos poderia servir como modelo para estudos de interações mais complexas. Um aspecto prático e de grande importância é o uso de bactérias simbioses transformadas geneticamente para expressar e liberar produtos transgênicos tóxicos nos tecidos de insetos vetores de parasitas patogênicos, eliminando o parasita sem matar o inseto, que pode ter uma função ecológica importante (Durvasula *et al.*, 1997). Esta abordagem representa, potencialmente, uma poderosa forma de controle biológico.

3.10. Conclusões

Os métodos bacteriológicos empregados para o isolamento e identificação de bactérias restringiram a gama de detecção de espécies bacterianas e não geraram dados quantitativos para se determinar que espécie bacteriana dentre as isoladas é a predominante.

Esses métodos conduziram ao isolamento preferencial de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas e apenas membros da família Enterobacteriaceae puderam ser identificados.

O grupo bacteriano predominante foi o da família Enterobacteriaceae e o gênero mais frequentemente isolado foi *Serratia*.

Não foi observado nenhum caso em que *Serratia* ou outro gênero bacteriano, dentre os identificados, estar estreita e consistentemente associado a alguma espécie de tefritídio.

A distribuição de grupos bacterianos nos órgãos digestivos dos indivíduos dos quais bactérias foram isoladas, não apresentaram nenhuma correlação com a espécie do inseto, hábitat, espécie do hospedeiro e estação de sua coleta.

A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com aqueles de estudos realizados com tefritídios pertencentes às sub-famílias Dacinae e Trypetinae, sugere que, as relações entre os membros da sub-família Tephritinae e as bactérias associadas ao seu trato alimentar, devem ser comparáveis àquelas das outras sub-famílias.

A predominância de membros da família Enterobacteriaceae neste e em estudos de outros autores sobre a composição da microflora dos tefritídios pode ser um efeito das metodologias bacteriológicas empregadas.

Apesar da predominância de uma determinada espécie bacteriana em algumas espécies de tefritídios, a presença inespecífica de vários grupos de bactérias sugere a existência de uma microflora diversificada, possivelmente mantendo interações complexas com seus hospedeiros.

As relações bactérias-tefritídios podem ser muito mais complexas do que as evidenciadas até o presente momento. Uma microflora diversificada sugere que a comunidade bacteriana como um todo seja a entidade simbiótica.

Pode haver uma situação de mutualismo onde as comunidades bacterianas associadas aos tefritídios podem estar relacionadas ao fornecimento de nutrientes essenciais, proteção contra a colonização do trato alimentar desses insetos por bactérias patogênicas, produção de substâncias atrativas, facultando a esses insetos uma ampla exploração de recursos.

Do ponto de vista microbiano, os insetos estariam fornecendo abrigo contra condições ambientais inóspitas como dessecação e ação da radiação ultra-violeta solar, bem como oferecendo nutrição e meio adequados para a propagação dos micróbios e sua disseminação através das fezes e comportamento alimentar dos insetos.

Por outro lado, existe a possibilidade de que a associação de bactérias aos insetos da sub-família Tephritinae seja fruto da ingestão de alimento contaminado sem representar qualquer

tipo de vantagem ou desvantagem adaptativa para o hospedeiro. As vantagens dessa associação seriam voltadas para as bactérias que se valeriam do ambiente do trato digestivo dos tefritídios para maior exploração de recursos nutricionais e conseqüente o aumento de sua população e disseminação em outros animais.

A composição da flora bacteriana dos insetos investigados permanece indeterminada. O estabelecimento da flora bacteriana dos tefritídios será o resultado da reunião de dados de trabalhos utilizando metodologias mais complexas de isolamento, triagem e identificação bacteriana.

A falta de simbiose obrigatória significaria que as bactérias não afetam a habilidade dos tefritídios em explorar diferentes hospedeiros.

A possibilidade da existência de um simbiote específico e obrigatório - ainda não detectado - deve ser considerada.

4. Resumo

A associação de bactérias com o trato digestivo de insetos da família *Tephritidae* é conhecida desde o início do século. Essas bactérias tem sido consideradas como simbioses e determinadas estruturas do sistema digestivo de larvas e adultos de tefritídeos foram interpretados, por vários autores, como sítios especializados para o alojamento de tais microrganismos.

Embora vários estudos tenham sido realizados, a exata constituição da microflora bacteriana dos tefritídeos, bem sua função biológica, não estão, ainda, esclarecidos. Nesses estudos, membros da família *Enterobacteriaceae* têm sido isolados com muita frequência.

Até o presente momento, não se detectou nenhuma espécie bacteriana em estreita e específica associação com uma espécie de tefritídeo. Por esse motivo, vários estudiosos questionaram a existência de um relacionamento mutualístico obrigatório entre os tefritídeos e suas bactérias.

Vários autores sugeriram uma função nutricional para essas bactérias, que atuam como fontes complementares de nutrientes essenciais, especialmente de aminoácidos. Mais recentemente, as bactérias associadas ao trato alimentar dos tefritídeos têm sido consideradas como fontes de substâncias atrativas, importantes para o reconhecimento de sítios de alimentação e acasalamento.

A maioria dos estudos com o propósito de investigar o papel da flora bacteriana do trato alimentar de tefritídeos foi realizada em espécies que atacam frutos de importância comercial. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de se investigar a flora bacteriana do trato alimentar de oito espécies de tefritídeos pertencendo a quatro gêneros que infestam inflorescências de asteráceas (*Asteraceae*). O propósito deste estudo foi o de verificar que espécies bacterianas ocorrem no trato digestivo desses insetos, se a microflora é espécie-específica e se há alguma associação entre uma espécie de tefritídeo com uma flora particular.

A identificação das amostras bacterianas isoladas de órgãos do trato alimentar desses insetos revelou que a microflora é diversificada com a presença de diferentes grupos bacterianos distribuídos de forma não-específica entre as distintas espécies de insetos investigadas. As bactérias mais frequentemente isoladas pertenciam à família *Enterobacteriaceae* e, dentre estas, o gênero predominante foi *Serratia*.

A presença de bactérias em órgãos do trato alimentar de diferentes espécies de tefritídeos sugere a existência de relações simbióticas. Não foi observada uma especificidade do gênero *Serratia* - ou de qualquer outro - na associação com uma espécie particular de tefritídeo que caracterize uma relação simbiótica específica.

As espécies de tefritídeos nas quais *Serratia* sp não foi isolada, foram representadas por um número reduzido de espécimes, o que impede inferências tanto em relação às outras espécies bacterianas como às outras espécies de insetos investigadas.

Em cerca de 40% dos insetos analisados, não foi detectada a presença de bactérias em nenhum dos órgãos do trato digestivo, pelos métodos bacteriológicos utilizados. Essa situação ocorre de modo inespecífico entre as diferentes espécies de insetos analisadas e sugere a possibilidade de as bactérias serem adquiridas através da alimentação.

As espécies bacterianas encontravam-se presentes de modo não específico nos diferentes órgãos do trato digestivo analisados e frequentemente mais de uma espécie bacteriana foi detectada em cada órgão. A distribuição das diferentes espécies bacterianas não mostrou qualquer ligação obrigatória a algumas das espécies de tefritídeos pesquisadas.

Outras bactérias, não identificadas através dos métodos bacteriológicos utilizados, podem estar envolvidas em relações consistentes e específicas com estas espécies de tefritídeos.

A composição e o papel exato da flora bacteriana nos insetos investigados permanece indeterminado. A microflora do trato digestivo dos tefritídeos deve ser complexa e dinâmica, sendo difícil de precisar o papel de cada espécie bacteriana, isoladamente.

Provavelmente, o importante seja o efeito global da microflora no desenvolvimento, reprodução e sobrevivência desses insetos. A microflora como um todo seria a entidade simbiote. Os microrganismos poderiam fornecer aminoácidos e vitaminas aos seus hospedeiros, digerir celulose e lignina, além de competir com possíveis patógenos por sítios de colonização e nutrientes. Os insetos, por sua vez, forneceriam abrigo, nutrição e condições ambientais adequadas à multiplicação bacteriana. Além do mais, os insetos poderiam estar atuando como agentes de disseminação dos seus microrganismos na natureza e para outros animais.

É possível que os microrganismos atuem na produção de substâncias atrativas facultando aos tefritídeos uma ampla exploração de recursos. A possibilidade de que a associação de bactérias aos insetos dessa sub-família seja apenas fortuita, fruto da simples ingestão de alimento contaminado não pode ser, ainda, completamente desprezada.

5. Summary

The association of bacteria to the digestive tract of flies belonging to Tephritidae family is known since the early 20th century. Such bacteria have been long considered as symbionts and particular structures of the digestive system of larva and adult flies were referred to as specialized sites for symbionts housing.

Although several studies have been done both the exact constitutions of the bacterial microflora of Tephritidae flies as well its biological role remains to be determined. In such studies Enterobacteriaceae family bacteria have been isolated very frequently.

Up to date, there appear not to be a definitive conclusion that some particular bacterial species plays the role of a specific symbiont since no such a species appears to be consistently associated with any tephritid species.

Several authors have suggested that these associated bacteria would play a nutritional role as a source of essential nutrients, particularly amino acids. Recently, the tephritid digestive tract associated bacteria have been considered as sources of attractant substances. Such attractants would be important in feeding and mating sites' recognition.

Most of studies with the purpose of investigating the role of the tephritid alimentary tract bacterial flora has been conducted on fly species that infest fruit of economical importance.

This work was carried out with the objective to investigate the digestive tract bacterial flora of eight species belonging to four genera of Tephritidae flies that infest Asteraceae flower heads.

The identification of the bacteria isolated from the digestive tract of these tephritid species revealed the presence of diverse bacterial groups associated in a nonspecific form among the different species of insects investigated. The bacteria most frequently isolated belonged to Enterobacteriaceae family, the predominant genus being *Serratia*.

The presence of bacteria within the tephritid gut organs suggests the existence of a symbiotic relationship. It was not recognized any specificity either of *Serratia* or any other bacterial group in the association with any of the tephritide species examined that could characterize a specific symbiotic relationship.

All bacterial species were present in a nonspecific mode in the different digestive tract organs analyzed. Frequently, more than one bacterial species was found associated to these organs. The distribution of different bacterial species was seen not to be restricted to any fly species, either.

The few cases where *Serratia* was not isolated were those in which fly species were represented by a few specimens so that no inference could be made.

No bacteria were isolated from any digestive tract organ in 40% of the flies investigated, by the bacteriological methods used. This situation was seen to occur in a nonspecific manner among the different tephritid species suggesting that the bacteria were acquired with food.

Other types of bacteria, such as the strict anaerobic ones and bacteria non-cultivable in laboratory media, may be involved in specific relationships with these tephritid species.

Both the constitution and the role of the digestive tract microflora of the flies investigated remains indetermined. The microflora may be complex and dynamic, what renders difficult to establish the role of each bacterial component alone. Probably, the microflora as a whole functions as the symbiotic entity. The microorganisms could provide their hosts with amino acids and vitamins, digest cellulose and lignin, and compete with invaders for colonization sites and nutrients. On the other hand, the insects would provide bacteria with shelter and environmental conditions that allow bacterial survival and multiplication.

It is possible that the associated bacteria act either by producing attractant compounds so that Tephritinae flies can explore a broader range of natural resources or they represent simple commensals. The possibility exists, however, that the associated bacteria are present in the alimentary tract of flies just for they have ingested contaminated food.

6. Bibliografia

- Appleyard, R.K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39: 440-452.
- Aksoy, S., Pourhosseini, A.A. & Chow, A. 1995. Mycetome endosymbionts of tsetse flies constitute a distinct lineage related to Enterobacteriaceae. *Insect. Mol. Biol.* 4: 15-22.
- Baker, R.; Herbert, R.H. & Lommer, R.A. 1982. Chemical components of the rectal gland secretions of male *Dacus cucurbitae*, the melon fly. *Experientia* 38: 232-233.
- Balkwill, D.L., Reeves, R.H., Drake, G.R., Reeves, J.Y., Crocker, F.H., King, M.B. & Boone, D.R. 1997. Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 201-216.
- Bateman, M.A. 1972. The ecology of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 17: 493-518.
- Bateman, M.A. & Morton, T.C. 1981. The importance of ammonia in proteinaceous attractants of fruit flies (family: Tephritidae). *Aust. J. Agric. Res* 32: 883-903.
- Bauer, G. 1986. Live-history strategy of *Rhagoletis alternata* (Diptera: Tephritidae), a fruit fly operating in a "non-interactive" system. *J. An. Ecol.* 55: 785-794.
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C.Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N.A. & Clark, M.A. 1995. Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 55-94.
- Baumann, P. & Moran, N.A. 1997. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72: 39-48.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA, and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boller, E.F. & Prokopy, R.J. 1976. Bionomics and management of *Rhagoletis*. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 223-246.
- Borror, D.J., Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. 1989. An introduction to the study of insects. 6nd ed., Harcourt Brace Jovanovich Coll. Push., USA
- Boush, G.M., Baerwald, R.J. & Miyazaki, S. 1969. Development of a chemically defined diet for adults of the apple maggot based on amino acid analysis of honeydew. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62: 19-21.

- Boush, G. M. & Matsumura, F. 1967. Insecticidal degradation by *Pseudomonas melophthora*, the bacterial symbiote of the apple maggot. J. Econ. Entomol. 60: 918-920.
- Boush, G.M., Saleh, S.M. & Baranosky, R.M. 1972. Bacteria associated with the caribbean fruit fly. Env. Entomol. 1: 30-33.
- Breznak, J.A. 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. Annu. Rev. Microbiol. 36: 323-343.
- Breznak, J.A. & Brune, A. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. Annu. Rev. Entomol. 32: 453-487.
- Bush, G.L. 1969. Mating behavior, host specificity, and the ecological significance of sibling species in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera:Tephritidae). Amer. Natur. 103: 669-672.
- Buchner, P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience Publishers. N.Y.
- Cano, R.J. & Borucki, M. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber. Science, 268; 1060-1064.
- Craig, R. 1960. The physiology of excretion in the insect. Annu. Rev. Entomol. 5: 53-68.
- Courtice, A.C. & Drew, R.A.I. 1984. Bacterial regulation of abundance of tropical fruit fly (Diptera: Tephritidae). Aust. Zool. 21: 251-268.
- Daser, U. & Brandl, R. 1992. Microbial gut floras of eight species of tephritids. Biol. J. Linnean Soc. 45: 155-165.
- Dean, R.W. & Chapman, P.J. 1973. Bionomics of the apple maggot in eastern New York. Search Agrict. Entomol. (Geneva): 3(10), 62 pp.
- Destefano, S. A. L. 1994. Isolamento e análise do clone pMV08 envolvido com a biossíntese do exopolissacarídeo de *Xanthomonas campestris*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.
- Drew, R.A.I. 1987. Behavioural strategies of fruit flies of the genus *Dacus* (Diptera: Tephritidae) significance in mating and host-plant relationships. Bull. Entomol. Res. 77: 83-91.

- Drew, R.A.I. 1988. Amino acid increase in fruit infested by fruit flies of the family Tephritidae. Zool. J. Linnean Soc. 93: 107-112.
- Drew, R.A.I., Courtice, 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. Relationships of fruit flies (Diptera: Tephritidae) and their bacteria to host plant. Ann. Entomol. Soc. Amer. 80: 629-636.
- Durvasula, R.V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R.B., Richards, F.F. & Beard, C.B. 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3274-3278.
- Fantinatti, F. 1992. Estudos biológicos e genéticos de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.
- Fitt, G.P. & O'Brien, R.W. 1985. Bacteria associated with four species of *Dacus* (Diptera:Tephritidae) and their role in the nutrition of the larvae. Oecologia 85: 447-454.
- Foot R.H., Blanc F.L. & Norrbom, A.L. 1993. Handbook of the fruit flies (Diptera, Tephritidae) of America north of Mexico. Cornell University, Press Ithaca
- Fytizas, E. & Tzanakakis, M.E. 1966a. Some effects of streptomycin when added to the adult food of *Dacus oleae* and their progeny. Ann. Entomol. Soc. Amer. 59: 269-273.
- Fytizas, E. & Tzanakakis, M.E. 1966b. Sur la possibilité d'une lutte contre le *Dacus oleae* par l'utilisation des antibiotiques. Meded. Rijksfac. Landbouwwtensch. Gent. 31: 782-789.
- Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiol. Lett. 155: 1-10.
- Girolami, V. 1973. Reperti morfo-istologici sulle batteriosimbiosi del *Dacus oleae* Gmelin e altri ditteri tripetid, in natura e negli allevamenti su substrati artificiale. REDEA 54: 269-294.
- Girolami, V. 1982. Fruit flies symbiosis and adult survival: general aspects. In: Cavalloro, R. (ed.). Fruit flies of economic importance. Balkemia, Rotherdam.
- Girolami, V. 1986. Mediterranean fruit flies associated-bacteria: transmission and larval survival. In: Mangel, M. *et al.* (eds) Pest Control: Operations and Systems Analysis in Fruit Flies Management. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 135-146.

- Girolami, V. & Cavalloro, R. 1972. Aspetti della simbiosi batterica di *Dacus oleae* Gmelin in natura e negli allevamenti di laboratorio. *Ann. Soc. Ent. Fr* 8: 561-571.
- Grewal, J.S. & Kapoor, V.C. 1984. Courtship and mating behaviour in the fruit fly *Dioxya sorocula* (Wied) (Diptera: Tephritidae) *Aust. J. Zool.* 32: 671-676.
- Haggen, K.S. 1966. Dependence of the olive fly, *Dacus oleae* larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. *Nature* 5021: 423-424.
- Headrick D.H. & Goeden, R.D. 1996. Issues concerning the eradication or establishment and biological control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in California. *Biol. Control.* 6: 412-421.
- Hendrichs, J & Hendrichs, M.A. 1990. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: location and diel pattern of feeding and other activities in fruiting and non-fruiting hosts and non-hosts. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 83: 632-641.
- Hendrichs, J., Lauzon, C.R., Cooley, S.S. & Prokopy, R.J. 1993. Contribution of natural food sources to adult longevity and fecundity of *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 86: 250-264.
- Hofer Scientific Struments. Hofer electrophoresis catalog and exercises (1990-1991). San Francisco, 1991.
- Howard, D.J. 1989. The symbiots of *Rhagoletis*. In: Robinson, A.S. & Hooper, G. (eds.) *Fruit flies, their biology, natural enemies and control.* Vol. 3A. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 121-130.
- Howard, D.J. & Bush, G.L. 1989. Influence of bacterial on larval survival and development in *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 82: 633-640.
- Howard, D.J., Bush, G.L. & Breznak, J.A. 1985. The evolutionary significance of bacteria associated with *Rhagoletis*. *Evolution* 39: 405-417.
- Jang, E.B. & Nishijima, K.A. 1990. Identification and attractancy of the bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Env. Entomol.* 19: 1726-1791.
- Jousimies-Somer, H. 1997. Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clin. Infect. Dis.* 25 Suppl 2: S78-S87.
- Krause, D.O. & Russell, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* 79:1467-1475.

- La Scola, B. & Raoult, D. 1998. Molecular identification of *Gemella* species from three patients with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 866-871.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- Lambrou, P.D. & Tzanakakis, M.E. 1978. Inhibition of larval growth of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) by streptomycin. II. Effect of treating the parents. *Env. Exp. Appl.* 23: 163-170.
- Lewinsohn, T.M. 1988. Composição e tamanho de faunas associadas a capítulos de Compostas. Tese de doutoramento, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- 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, G.W. & Benson, W.W. (eds.), *Plant-Animal Interactions*. John Wiley, New York: pp. 525-559
- Lewinsohn, T.M., Prado, P.I.K.L., Monteiro, A., Norrbom, A. & Macedo, A.C.C. 1998. A first characterization of Tephritid fauna from flowerheads in Brazil (em preparação).
- Lloyd, A.C.; Drew, R.A.I; Teakle, D.F. & Hayward, A.C. 1986. Bacteria associated with some *Dacus* species (Diptera: Tephritidae) and their host fruit in Queensland. *Aust. J. Biol. Sci.* 39: 631-638.
- Lüthy, P.; Studer, D.; Jaquet, F. & Yamvrias, T. 1983. Morphology and in vitro cultivation of the bacterial symbiote *Dacus oleae*. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 56: 67-72.
- Maccollom, E.B., Lauzon, C.R., Payne, E.B. & Currier, W.W. 1994. Apple maggot (Diptera: Tephritidae) trap enhancement with washed bacterial cells. *Env. Entomol.* 23: 354-359.
- Maccollom, E.B., Lauzon, C.R., Weires, R.W, Jr. & Rutkowski, A.A. 1992. Attraction of adult apple maggot (Diptera: Tephritidae) to microbial isolates. *J. Econ. Entomol.* 85: 83-87.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 1996. Microbial ecology. In: *Biology of microorganisms* (Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J., eds) 8th. ed. Prentice Hall, NJ, USA, pp. 534-607
- Malavasi, A.; Morgante, J.S. & Prokopy, R.J. 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and non-host trees. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 76: 286-292.

- Malavasi, A.; Morgante, J.S. & Zucchi, R.A. 1980. Biologia de “moscas-das-frutas” (Diptera-Tephritidae) I: Lista de hospedeiros e distribuição geográfica. Rev. Bras. Biol. 40: 9-16.
- Margulis, L. 1971. Symbiosis and evolution. Sci. Amer. 225: 48-57.
- Martinez, A.J., Robacker, D.C. & Garcia J.A. 1997. Toxicity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* subspecies darmstadiensis to adults of the Mexican fruit fly (diptera: (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. J. Econ. Entomol. 90: 130-134.
- Martinez, A.J., Robacker, D.C., Garcia, J.A. & Esau, K.L. 1994. Laboratory and field olfactory attraction of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to metabolites of bacterial species. Florida Entomologist 77:117-126.
- 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, pp. 145-150.
- Mazzini, M. & Vitta, G. 1981. Identificazione submicroscopica del meccanismo di trasmissione del batterio simbiote in *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera-Trypetidae). Redia 64: 277-301.
- Miyasaki, S., Boush, G.M. & Baerwald, R.J. 1968. Amino acid synthesis by *Pseudomonas melophthora*, bacterial symbiote of *Rhagoletis pomonella* (Diptera). J. Insect. Physiol. 14: 513-518.
- Moretti, P.E. 1992. Estudos biológicos e genéticos de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de bovino com diarreia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.
- Neilson, W.T.A. 1965. Culturing of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. J. Econ. Entomol. 58: 1056-1057.
- Neilson, W.T.A. & Wood, F.A. 1966. Natural source of food of the apple maggot. J. Econ. Entomol. 59: 997-998.
- Noda, H., Munderloh, U.G. & Kurtti, T.J. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3926-3932.
- Ohkuma, M. & Kudo, T. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 461-468.

- Pessoa, G.V.A. 1972. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de Enterobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz 32: 97-100.
- Petri, L. 1904. Sopra la particolare localizzazione di una colonia batterica nel tubo digerente della larva della mosca olearia. Atti Acad. Lincei (5), Cl. Sci. Fis., Mat. e Nat. 13: 560
- Petri, L. 1909. Ricerchi sopra i batteri intestinali della mosca olearia. Mem. Staz. Pat. Veg. (Roma): 1-129.
- Petri, L. 1910. Untersuchungen über die Darmbakterien der Olivenfliege. Zentralblatt für Bakteriologie II, 26:357-367.
- Prado, P.I.K.L. & Lewinsohn, T.M. 1994. Genus *Tomoplagia* (Diptera, Tephritidae) in the Serra do Cipó, MG, Brazil: host ranges and notes of taxonomic interest. Rev. Bras. Entomol. 38: 669-680.
- Prokopy, R.J., Cooley, S.S., Galarza, L., Bergweiler, C. & Lauzon, C.R. 1993a. Bird droppings compete with bait sprays for *Rhagoletis pomonella* (Walsh) flies (Diptera: Tephritidae). Canad. Entomol. 125: 413-422.
- Prokopy, R.J., Drew, R.A.I., Sabine, B.N.E., Lloyd, A.C. & Hamacek, E. 1991. Effect of physiological and experiential state of *Bactrocera tryoni* flies on intra-tree foraging behavior for food (bacteria) and host fruit. Oecologia 87: 394-400.
- Prokopy, R.J., Hsu, C.L. & Vargas, R.I. 1993b. Effect of source and condition of animal excrement on attractiveness to adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Env. Entomol. 22: 453-458.
- Rattner, S.S. & Stoffolano, J.G. 1982. Development of the oesophageal bulb of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae); morphological, histological, and histochemical study. Ann. Entomol. Soc. Amer. 75: 555-562.
- Rattner, S.S. & Stoffolano, J.G. 1984. Ultrastructural changes of the oesophageal bulb of the adult female apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 13: 191-208.
- Robacker, D.C. 1991. Specific hunger in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): Effects on attractiveness of proteinaceous bait on fruit-derived lures. Env. Entomol. 20: 1680-1686.

- Robacker, D.C., Garcia, J.A., Martinez, A.J. & Kaufman, M.G. 1991. Strain of *Staphylococcus* attractive to laboratory strain *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 84: 555-559.
- Robacker, D.C. & Moreno, D.S. 1995. Protein feeding attenuates attraction of Mexican fruit flies (Diptera:Tephritidae) to volatile bacterial metabolites. *Florida Entomologist* 78:62-69.
- Robacker, D.C. & Warfield, W.C. 1993. Attraction of both sexes of Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*, to a mixture of ammonia, methylamine and putrescine. *J. Chem. Ecol.* 19: 2999-3016.
- Rhodes, A.N., Urbance, J.W., Youga, H., Corlew-Newman, H., Reddy, C.A., Klug, M.J., Tiedje, J.M. & Fisher, D.C. 1998. Identification of bacterial isolates obtained from intestinal contents associated with 12,000-year-old mastodon remains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 651-658.
- Rochelle, P.A., Fry, J.C., Parkes, R.J. & Weightman, A.J. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 59-65.
- Rossiter, M.C., Howard, D.J. & Bush, G.L. 1983. Symbiotic bacteria of *Rhagoletis pomonella*. *Proc. CEB/IOBC Int. Symp. Athens*: 77-84.
- Rubio, R.E.P. & McFadden, M.W. 1966. Isolation and identification of bacteria in the digestive tract of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 59: 1015-1016.
- Salyers, A.A. & Whitt, D.D. 1994. In: *Bacterial pathogenesis: a molecular approach* (Salyers, A.A. & Whitt, D.D., eds.), ASM Press, Washington, USA, pp. 229-243.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., N.Y., Cold Spring Harbor Press.
- Sivinski, J.M., Calkins, C.O., Baranowski, R., Harris, D., Brambila, J., Diaz, J., Burns, R.E., Holler, T. & Dodson, G. 1996. Suppression of a caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*. *Biol. Control.* 6: 177-185.
- Solferini, V. N. 1990. Interações entre bactérias e *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P.

- Sonea S. 1988. A bacterial way of life. *Nature* 331: 216.
- Staley, J.T., Castenholz, R.W., Colwell, R.R., Holt, J.G., Kane, M.D., Pace, N.R., Salyers, A.A. & Tiedje, J.M. 1997. The microbial world: foundation of the biosphere. Report from The American Society of Microbiology based on an American Academy of Microbiology colloquium held January 19-21, 1996, Palm Coast, Florida.
- Stamopoulos, D.C. & Tzanakakis, N.M. 1988. Bacterial flora isolated from the esophageal bulb of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Gmelin). *Entomologia Hellenica* 6: 43-48.
- Starr, M.P., Chatterjee, A.K., Starr, P.B. & Buchanan, G.E. 1977. Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures. *J. Clin. Microbiol.* 6: 379-386.
- Steiner, L.F. 1952. Fruit fly control in Hawaii with poison bait sprays containing protein hydrolysates. *J. Econ. Entomol.* 45: 838-843.
- Steiner, L.F., Harris, E.J., Mitchell, W.C., Fujimoto, M.S. & Christenson, L.D. 1965a. Melon fly eradication by overflooding with sterile flies. *J. Econ. Entomol.* 58: 519-522.
- Steiner, L.F., Mitchell, W.C., Harris, E.J., Kozuma, T.T. & Fujimoto, M.S. 1965b. Oriental fruit fly eradication by male annihilation. *J. Econ. Entomol.* 58: 961-964.
- Thayer, D.W. 1978. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *J. Gen. Microbiol.* 106:13-18.
- Tsiropoulos, G.J. 1977. Survival and reproduction of *Dacus oleae* (Gmel.) fed on chemically defined diets. *Z. Ang. Ent.* 84: 192-197.
- Tsiropoulos, G.J. 1981. Effect of antibiotics incorporated into defined adult diets on survival and reproduction of the walnut husk fly, *Rhagoletis completa* Cress. (Diptera: Trypetidae). *Z. Ang. Ent.* 91: 100-106.
- Tsiropoulos, G.J. 1983. Microflora associated with wild and laboratory reared adult fruit flies, *Dacus oleae* (Gmel.). *Z. Ang. Ent.* 96: 337-340.
- Tzanakakis, M.E. & Lambrou, P.D. 1975. A preliminary field experiment on the inhibition of larval growth of *Dacus oleae* by streptomycin. *Env. Exp. Appl.* 18: 256-260.

- Tzanakakis, M.E.; Prophetou, P.A.; Savopoulou, M.C. & Kordelas, A.G. 1975. Inhibition of larvae growth of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) by streptomycin. I. effect of duration of olive fruit immersion, temperature, and chemical additives on inhibition; effective site of topical application on ovopositate olives. Ent. Exp. Appl. 18: 302-312.
- Tzanakakis, M.E. & Stavrinides, A.S. 1973. Inhibition of development of larvae of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), in olives fruits with streptomycin. Env. Exp. Appl. 16: 39-47.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60: 407-438.
- von Riessen, V.L. 1976. Pectinolytic indole-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 143-145.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U.B. & Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 213: 213-229.
- Wakabayashi, N. & Cunningham, R.T. 1991. Four-component synthetic food bait for attracting both sexes of the melon fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 84: 1672-1676.
- Werren, J.H. 1997. Biology of Wolbachia. Annu. Rev. Entomol. 42: 587-609.
- White, I.M. & Elson-Harris, M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Redwood Press, LTD. Melksham, UK.
- Wilson, K.H. & Blichington, R.B. 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2273-2278.