

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Helena Sanches Marcon

**Identificação da bactéria endossimbionte *Wolbachia*
em populações de moscas-das-frutas do complexo
Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae)**

Dissertação de Mestrado

2009

HELENA SANCHES MARCON

**Identificação da bactéria endossimbionte *Wolbachia*
em populações de moscas-das-frutas do complexo
Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae)**

Orientador: Prof. Dr. Celso Luis Marino

Dissertação de Mestrado
apresentada no Curso de Pós-
graduação em Ciências Biológicas –
área de concentração Genética
para obtenção do título de Mestre.

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Marcon, Helena Sanches.

Identificação da bactéria endossimbionte *Wolbachia* em populações de moscas-das-frutas do complexo *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae) / Helena Sanches Marcon. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientador: Celso Luis Marino

Assunto CAPES: 21303002

1. Mosca-das-frutas 2. Bactéria

CDD 595.7

Palavras-chave: *Anastrepha*; Gene *wsp*; Linhagens; Sensibilidade; Transfe-
rência horizontal; *Wolbachia*

Dedico esse trabalho a antecessora de Deus,
Nossa Senhora Aparecida, pelos momentos de oração,
que fizeram do meu mestrado um período de aprendizado
pessoal e profissional, trazendo um final cheio de luz.

Agradecimentos

A Deus, pela minha saúde, pelas oportunidades, pela felicidade desta vida e pelos momentos de aprendizado. Pela minha amada família e meu querido amor. Tenho tudo o que preciso!

Aos meus pais, Claudionor e Inês, que encheram minha vida de amor e apoio incondicionais. Pelo ombro "mãe-amigo", tão necessário nos muitos momentos de dúvidas e desesperos. Pelo "paitrocínio", que ajuda a "engordar" a bolsa. Além de tudo, pela compreensão da minha ausência, por permanecer tempos sem voltar para casa, para que o mestrado pudesse caminhar da melhor maneira possível. Amo vocês!

Ao meu irmão, Marcelo, pelas conversas curtas ou longas, que passaram a ser mais maduras, mas sem deixar que as coisas de crianças se afastassem de nós, hoje somos mais que tudo "irmãos-amigos".

Ao meu amor, William, pelos tantos momentos de descobertas, que sempre afirmo nos fizeram crescer (e muito!). Por você me completar e possibilitar com que possa sonhar. Por ser meu cúmplice, desde ficar em casa vendo novela até nossas conversas filosóficas sobre a ciência e a vida. Eu te amo!

Ao Zigui e a Jinnie, pela felicidade ao me verem chegando em casa para passar o final de semana, e especialmente a Nina, por encher a minha casa de alegria, além da fidelidade incondicional.

Ao meu orientador, Celso, por apostar em minha capacidade e me dar a liberdade para crescer e me desenvolver intelectualmente. Pela sua amizade e conselhos nestes cinco anos de convivência no laboratório.

A minha "amiga-vizinha", Cíntia, pelas risadas nos momentos mais felizes e por me socorrer nos dias mais terríveis, obrigada amiga, nossa amizade não irá se perder.

A amiga que de longe sempre esteve pronta a ajudar e apoiar, eterna Di.

Aos amigos do Laboratório CAGEN: Vir, Tânia, Júlio, Vanussa, Jú, Suzan, Léo, Andréia, Aletéia, Toladinha, Maurício e Bruno (nossa que laboratório!), pelo aprendizado tanto de convivência quanto de ensinamentos.

Em especial a Vir, que me ajudou muito em vários momentos, e pela compreensão do meu jeito de ser, as vezes complicado.

E também a Suzana, quem sempre esteve pronta a me escutar e que nos descobrimos amigas, obrigada!

Ao Laboratório BIOGEM, a todos presentes hoje: Jú, Rodrigo, Ed, Alessandra e Carol, e aos que passaram e deixaram seus ensinamentos em tantos momentos, Bonsai e Akemi.

Ao pessoal da academia, as professoras Fernanda, Iris, Paula, Andréia e o professor Zuel e colegas, pelos momentos de descontração desfrutados junto com vocês.

A Jan pelas conversas e risadas durante todo este tempo.

A minha professora de Inglês Cris, pela *conversation*, e pelo *help* em tantos momentos, obrigada!

Aos amigos da turma XXXVIII que aqui não caberiam, com os quais deixei de conviver, mas que dos meus pensamentos nunca sairão.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Genética da UNESP de Botucatu, em especial Aline e Zé, obrigada pela atenção e convivência.

Aos professores do Departamento de Genética da UNESP de Botucatu, obrigada pela atenção nos momentos solicitados.

A prof^a. Claudia, por estar sempre disponível a oferecer seu laboratório para realização das nossas análises, em especial a sua aluna Dani pela atenção e ajuda.

Ao prof. Claudio e prof. Nei, obrigada pela atenção.

Ao pessoal da Pós-graduação, Lú, Herivaldo, Marina Helena e Serginho, que sempre estiveram disponíveis para tirar as dúvidas e prontos para ajudar a solucioná-las.

A Prof^a. Denise Selivon e ao Prof. André Perondini, obrigada pelo auxílio e por oferecer seu laboratório para realização de algumas análises.

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho e minha formação profissional, obrigada!

A todos os mestres que passaram por minha vida e semearam em mim o gosto pelo estudo. Espero um dia corresponder à dedicação de vocês!

A vida com seus degraus, que destes muitos trazem respostas em uma forma difícil de entender, e mesmo que não tenhamos a mínima idéia do que tenha pela frente, seguimos com o desejo de que cada degrau a ser conquistado seja pela curiosidade para a elevação e passagem de espírito, somada pela idéia da conquista. O que nos torna buscadores de conhecimento insaciável e prisioneiros da ilusão da felicidade. De alguma forma levados para um degrau do merecimento, procurando algo dentro de nós.

Helena S. Marcon

“Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

(William Shaskespeare)

Resumo

Wolbachia é uma bactéria endossimbionte comumente encontrada nos tecidos reprodutores de invertebrados, sendo herdada vertical e horizontalmente. Esta bactéria é desencadeadora de inúmeras alterações reprodutivas, dentre elas a incompatibilidade citoplasmática. Bactéria *Wolbachia* apresenta oito diferentes tipos de genoma, identificados de A a H. Dentre os hospedeiros da *Wolbachia* estão as moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*, que são um importante inseto-praga causador de inúmeras perdas na fruticultura de vários países na América. Neste estudo, foram utilizados os primers 16S rDNA, *ftsZ* e *wsp* na detecção da *Wolbachia* e identificação do supergrupo em três populações de *Anastrepha* do complexo *fraterculus*, de diferentes regiões do estado de São Paulo. Em todas as amostras de moscas foi detectada a presença da *Wolbachia* do supergrupo A, através da utilização dos primers 16S rDNA e *wsp*, visto que o *ftsZ* apresentou baixa sensibilidade na detecção desta bactéria em *Anastrepha*. Comparações das sequências do gene *wsp* dos 62 indivíduos no *Genbank* possibilitaram a identificação de duas linhagens de *Wolbachia*, uma pertencente a *Anastrepha* sp. 2 (*wAsp2B*) e a outra ao nematóide *Brugia pahangi* (Bp-1-1001). Com isso, sugere-se a ocorrência de transferência horizontal da linhagem Bp-1-1001 em *Anastrepha* através das vespas parasitas de dípteros. A partir de comparações entre as sequências geradas com o gene *wsp*, observou-se a ocorrência de quatro diferentes sequências pertencentes a novas linhagens de *Wolbachia*, denominadas *wAsc*, *wAnc*, *wBjc* e *wBsp*. Essas linhagens estão distribuídas nas diferentes populações de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*.

Palavras chave: *Wolbachia*, gene *wsp*, sensibilidade, linhagens, *Anastrepha*, transferência horizontal.

Abstract

Wolbachia is an endosymbiotic bacterium commonly found in reproductive tissue of invertebrates, being vertically and horizontally inherited. This bacterium causes innumerable reproductive alterations, among them cytoplasmic incompatibility. *Wolbachia* have eight different types of genome, designated from A to H. Among *Wolbachia* hosts there are the fruit flies of the genus *Anastrepha*. These arthropods are important pest insects that cause many losses in fruit production of many countries of America. In this work, we used the primers 16S rDNA, *ftsZ* and *wsp* to detect *Wolbachia* and to identify the supergroups of three *Anastrepha* populations from different regions of São Paulo state, Brazil. In all fruit fly samples, it was detected the presence of *Wolbachia* of the A supergroup, through the use of primers 16S rDNA and *wsp*, since *ftsZ* has low sensitivity in detecting this bacterium in *Anastrepha*. Comparisons of the *wsp* gene sequences of 62 samples in GeneBank, allowed the identification of two *Wolbachia* lineages, one relating to *Anastrepha* sp. 2 (*wAsp2B*) and other in *Brugia pahangi* nematode (Bp-1-1001). Therefore it is proposed the occurrence of horizontal transference of *Wolbachia* lineage Bp-1-1001 into *Anastrepha* through the dipterous parasite wasps. The comparisons among the *wsp* gene sequences showed the occurrence of four different sequences, possibly belonging to the new lineages of *Wolbachia*, which were named *wAsc*, *wAnc*, *wBjc* and *wBsp*. These lineages are distributed in different fruit flies of populations of the *Anastrepha* genus.

Key words: *Wolbachia*, *wsp* gene, sensitivity, lineages, *Anastrepha*, horizontal transference

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Eletromicrografia de diferentes estágios de desenvolvimento gonadal de <i>Anastrepha</i> .	26
Figura 2. Diferentes fases do desenvolvimento das moscas-das-frutas <i>Anastrepha fraterculus</i> .	37
Figura 3. Mapa do Estado de São Paulo com as localidades de coleta dos frutos.	44
Figura 4. Quantificação em gel de agarose a 0,8%.	55
Figura 5. Gel de agarose 1% com os <i>primers</i> 16S rDNA A e B com população de Jacareí.	56
Figura 6. Gel de agarose 1% com os <i>primers</i> 16S rDNA A e B com população de Caraguatatuba.	57
Figura 7. Gel de agarose 1% com os <i>primers</i> 16S rDNA A com indivíduos da população de Serra Negra.	57
Figura 8. Gel de agarose 1% com o <i>primer</i> <i>wsp</i> A com indivíduos da população de Jacareí.	58
Figura 9. Gel de agarose 1% com o <i>primer</i> <i>wsp</i> A com indivíduos da população de Caraguatatuba.	58
Figura 10: Gel de agarose 1% com o <i>primer</i> <i>ftsZ</i> A com indivíduos da população de Jacareí.	59
Figura 11. Porcentagem de detecção da bactéria <i>Wolbachia</i> nas espécies de moscas-das-frutas utilizando os <i>primers</i> 16S rDNA, <i>wsp</i> e os diferentes protocolos utilizados com o <i>primer</i> <i>ftsZ</i> .	60

Figura 12. Gel de agarose 1% com indivíduos da população de Jacareí utilizando o protocolo VI I com o <i>primer ftsZ</i> .	62
Figura 13. Identificação dos supergrupos A e B com conjuntos de <i>primer</i> 16S rDNA A e B, <i>wsp</i> A e B e <i>ftsZ</i> A e B.	63
Figura 14. Gel de agarose 1% com a população de Serra Negra com o <i>primer wsp</i> A e B.	64
Figura 15. Linhagens de <i>Wolbachia</i> detectadas nas populações de <i>Anastrepha</i> .	67
Figura 16. Árvore obtida a partir do método NJ, baseada no gene <i>wsp</i> , demonstrando a distância entre as <i>Wolbachia</i> da população de Jacareí.	68
Figura 17. Árvore obtida a partir do método NJ, baseada no gene <i>wsp</i> , demonstrando a distância entre as <i>Wolbachia</i> da população de Serra Negra.	69
Figura 18. Árvore obtida a partir do método NJ, baseada no gene <i>wsp</i> , demonstrando a distância entre as <i>Wolbachia</i> da população de Caraguatatuba.	71
Figura 19. Árvore obtida a partir do método NJ, baseada no gene <i>wsp</i> , demonstrando a distância entre as populações de moscas contendo <i>Wolbachia</i> .	74
Figura 20. Diversidade de nucleotídeos (Pi) conforme as posições dos nucleotídeos nas diferentes linhagens de <i>Wolbachia</i> .	78

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Espécies de moscas-das-frutas, total de amostras em cada população, plantas hospedeiras e locais de coleta no estado de São de Paulo.	45
Tabela 2. Sequências dos conjuntos de <i>primers</i> utilizados.	48
Tabela 3. Quantificação de DNA mensurada em espectrofotômetro.	56
Tabela 4. Alterações no protocolo de PCR com o <i>primer ftsZ</i> , identificados por I a VIII.	61
Tabela 5. Porcentagem de detecção da <i>Wolbachia</i> com as alterações feitas nos protocolos utilizando o <i>primer ftsZ</i> , indicados de I a VIII.	61
Tabela 6. Indivíduos que tiveram similaridade com outro sequência que não o gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> .	67
Tabela 7. Linhagens de <i>Wolbachia</i> detectadas nas diferentes populações de <i>Anastrepha</i> .	66
Tabela 8. Valores de diferenciação genética calculados através do programa DnaSP Ver.5.00.05.	72
Tabela 9: Taxa diversidade de nucleotídeos (Pi) das sequências do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> ao se comparar as diferentes populações de moscas-das-frutas.	75
Tabela 10: Média dos valores de diferenciação genética calculados através do programa DnaSP Ver.5.00.05.	76
Tabela 11: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem <i>wAsc</i> .	76

Tabela 12: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem <i>wAnc</i> .	77
Tabela 13: Posições de sítios variáveis nas linhagens de <i>Wolbachia</i> conforme as HVRs propostas por Baldo et al., 2005.	78
Tabela 14: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem <i>wBsp</i> .	80
Tabela 15: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem <i>wBjc</i> .	82

SUMÁRIO

	Página
Resumo	
<i>Abstract</i>	
Lista de Ilustrações	
Lista de Tabelas	
1. Introdução.....	20
2. Revisão Bibliográfica	24
2.1. A bactéria endossimbionte <i>Wolbachia</i>	25
2.1.1. As Interações da <i>Wolbachia</i> com seus Hospedeiros.....	27
2.1.2. A Transmissão da <i>Wolbachia</i>	31
2.1.2.1 A Transferência Horizontal da <i>Wolbachia</i>	32
2.1.3. A Transferência de Material Genética: <i>Wolbachia</i> vs. Hospedeiro.....	33
2.1.4. Análises de populações de Hospedeiros relacionadas a presença da <i>Wolbachia</i>	35
2.2. A relação <i>Wolbachia</i> e moscas-das-frutas do gênero <i>Anastrepha</i>	36
2.2.1. As moscas-das-frutas do gênero <i>Anastrepha</i>	36
2.2.2. A interação entre <i>Wolbachia</i> e <i>Anastrepha</i>	38
3. Objetivos	41
3.1. Geral.....	42
3.2. Específicos.....	42
4. Material e Métodos	43

4.1. Coleta das moscas do gênero <i>Anastrepha</i>	44
4.2. Obtenção do DNA genômico a partir do abdômen de <i>Anastrepha</i> e Quantificação do DNA	46
4.2.1. Extração de DNA das moscas.....	46
4.2.2. Quantificação do DNA obtido.....	47
4.3. Reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e <i>primers</i> empregados para a detecção da <i>Wolbachia</i>	48
4.4. Purificação da reação de PCR, excisão e purificação de fragmento de gel de agarose.....	50
4.4.1. Purificação da reação de PCR.....	51
4.4.2. Excisão e purificação de fragmento de gel de agarose.....	51
4.5. Método de Clonagem.....	51
4.6. Sequenciamento.....	52
4.7. Análise das sequências.....	52
4.7.1. Análises de variações das sequências.....	52
5. Resultados	54
5.1. A Quantificação do DNA extraído das moscas.....	55
5.2. Detecção da <i>Wolbachia</i> e Sensibilidade dos <i>primers</i>	56
5.2.1. <i>Primer</i> 16S rDNA.....	56
5.2.2. <i>Primer</i> <i>wsp</i>	58
5.2.3. <i>Primer</i> <i>ftsZ</i>	59
5.2.3.1. Alterações nas reações de PCR com o <i>primer</i> <i>ftsZ</i> ..	59

5.3. Análise das populações de <i>Anastrepha</i> quanto aos supergrupos.....	63
5.4. Análises das sequências.....	64
5.4.1. Amplificação de sequências não relacionadas ao gene <i>wsp</i>	65
5.4.2. Análises das diferentes populações de <i>Anastrepha</i> quanto as linhagens de <i>Wolbachia</i> detectadas.....	65
5.5. Análises das sequências da <i>Wolbachia</i> encontradas com relação as populações de mosca-das-frutas do gênero <i>Anastrepha</i>	67
5.5.1. Análises Intrapopulacionais.....	68
5.5.2. Análises Interpopulacionais.....	72
5.5.3. Análises das Sequências conforme a linhagem de <i>Wolbachia</i>	75
5.5.3.1 Análises da Linhagem de <i>Wolbachia</i> caracterizada como <i>Wolbachia</i> de <i>A. sp. 2 (wAsp2B)</i>	75
5.5.3.2 Análises da Linhagem de <i>Wolbachia</i> caracterizada como de <i>B. pahangi (Bp-1-1001)</i>	79
6. Discussão	85
7. Conclusões	94
8. Referências Bibliográficas	96

1. Introdução

Bactérias do gênero *Wolbachia* são endossimbiontes obrigatórios pertencentes a família Rickettsiaceae. Seu primeiro relato foi feito nas células do tecido reprodutivo do mosquito *Culex pipiens* (Hertig e Wolbach, 1924). Atualmente, se conhece sua ampla distribuição entre os invertebrados, sendo encontradas em 65% das espécies de insetos (Hilgenboecker et al., 2008), além de isópodos (Rousset et al., 1992), crustáceos (Cordaux et al., 2001) e nematóides (Sironi et al., 1995).

Wolbachia foi dividida em oito supergrupos designados de A a H (Werren et al., 1995b; Lo et al., 2002; Bordenstein e Rosengaus 2005, Lo et al., 2007), baseados nos marcadores 16S rDNA (gene ribossomal) (O'Neill et al., 1992), *ftsZ*, (gene do ciclo celular da bactéria) (Holden et al., 1993) e o *wsp*, (gene de proteína de superfície de membrana) (Zhou et al., 1998).

Inúmeros estudos são realizados com esta bactéria devido as alterações reprodutivas que esta pode causar em seus hospedeiros, como a incompatibilidade citoplasmática (IC) (O'Neill, 1990), a indução de paternogênese (Stouthamer, 1990) e a feminização e morte de machos (Rousset et al., 1992).

A transferência da *Wolbachia* ocorre verticalmente, via maternal, pelo citoplasma dos ovos (Jiggins et al., 2002), e também por transferência paterna, que é pouco frequente (Turelli et al., 1992; Turelli e Hoffmann, 1995). Além disso, pode ocorrer a transferência horizontal, onde a transmissão da bactéria é realizada entre organismos de espécies diferentes, este mecanismo é utilizado para se explicar o quanto *Wolbachia* é amplamente encontrada em diferentes invertebrados.

O uso da *Wolbachia* em programas de controle biológico de seus hospedeiros tem sido muito mencionado nos últimos tempos (Zabalou et al., 2004; Bourtzis, 2008). A utilização desta bactéria constitui em se reduzir a população

dos insetos, sendo o mecanismo baseado na liberação de machos infectados com diferentes linhagens da bactéria, ou mesmo machos com uma única linhagem, na presença de populações não infectadas. Isto resultaria na redução ou eliminação dos machos na progênie, ocorrendo um desvio da proporção sexual na prole (Zabalou et al., 2004).

Entre os hospedeiros da *Wolbachia* estão as moscas-das-frutas, que são classificadas como insetos praga por causarem grandes prejuízos a fruticultura mundial. Estas moscas utilizam os frutos durante o seu ciclo biológico, isto ocasiona o amadurecimento precoce dos mesmos (Salles, 2000).

Nas moscas-das-frutas da família Tephritidae foi detectada a presença da *Wolbachia* em várias espécies de *Anastrepha* (Werren et al., 1995a, Selivon et al., 2002; Mascarenhas, 2007; Coscrato, 2006; et al., 2009), também em *Ceratitidis capitata* (Lincoln et al., 2005), e algumas espécies de *Bactrocera* (Kittayapong et al., 2000; Jamnongluk et al., 2002; Sun et al., 2004; Liu et al., 2006) e em *Rhagoletis cerasae* (Riegler e Stauffer, 2002).

Selivon e colaboradores (1996) identificaram no vitelo e nas células polares dos embriões de *Anastrepha* sp. 2 uma expressiva quantidade de bactérias endossimbiontes. Posteriormente, observaram a redução na eclosão de larvas e desvios na proporção sexual na progênie das moscas, este fato foi relacionado ao fenômeno da IC devido a possível infecção pela *Wolbachia* (Selivon et al., 1999). Análises posteriores, detectaram a presença da *Wolbachia* em *Anastrepha* sp. 2 com a utilização do *primer ftsZ* (Selivon et al., 2002), e além disso já foi demonstrado que o fenômeno da IC realmente ocorre nestas moscas (Ribeiro, 2009).

Estudos realizados com populações de *Bactrocera dorsalis* de diferentes locais da China detectaram a infecção pelos supergrupos A e B de *Wolbachia*, os quais possuíam sequências referentes a três linhagens da bactéria.

As análises subsequentes demonstraram a ocorrência de isolamento reprodutivo relacionada a presença da *Wolbachia* (Sun et al., 2007). Em diferentes espécies de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* detectou-se somente a infecção com o supergrupo A (Mascarenhas, 2007; Coscrato et al., 2009), e Coscrato e colaboradores (2009) encontraram diferentes linhagens de *Wolbachia* através de análises de um único indivíduo de cada região estudada utilizando-se o *primer wsp*. Este fato pode sugerir que as diferentes linhagens de bactéria se comportam de forma variável conforme o organismo que infectam. Desta forma se faz necessário uma avaliação dentro das populações de *Anastrepha* para entender como ocorre a distribuição da bactéria *Wolbachia* quanto aos diferentes supergrupos e linhagens. A partir destes resultados será possível investigar o efeito que estas linhagens da bactéria têm sobre a biologia da *Anastrepha*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A bactéria endossimbionte *Wolbachia*

Os endossimbiontes são organismos que vivem em simbiose no interior do corpo ou das células de um ser vivo. As relações simbióticas são definidas como uma mistura entre o mutualismo (benéfica), o comensalismo (neutra) e o parasitismo (prejudicial) (Werren et al., 2008). As bactérias estão entre os endossimbiontes obrigatórios de diversos eucariotos, sendo que esta interação estabeleceu-se a milhões de anos (Moran e Wernegreen, 2000).

A bactéria *Wolbachia* (figura 1) é classificada como um membro do grupo “secundário” dos simbiotes por ser intracelular obrigatória e estabelecer relações de mutualismo e parasitismo com seus hospedeiros (Siozios et al., 2008). Além disso, apresentam a peculiaridade de não sobreviver fora das células dos invertebrados. Contudo, foi observada sua sobrevivência nas células de mosquitos mortos (Fallon, 2008), e a sua resistência durante uma semana a temperatura ambiente após a retirada das células do hospedeiro (Rasgon et al., 2006).

Hertig e Wolbach (1924) foram os primeiros a detectar *Wolbachia* em ovários do mosquito *Culex pipiens*. Sua caracterização como organismo ocorreu muitas décadas depois como pertencente ao filo das Proteobactérias, classe das Alphaproteobactérias, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae.

Os estudos realizados atualmente com a utilizam técnicas moleculares para seu diagnóstico, distinguindo os supergrupos infectantes, além das linhagens existentes. As análises a partir destes estudos em muitos dos casos auxiliam nas questões sobre alterações reprodutivas, evolucionárias, de variabilidade, entre outras.

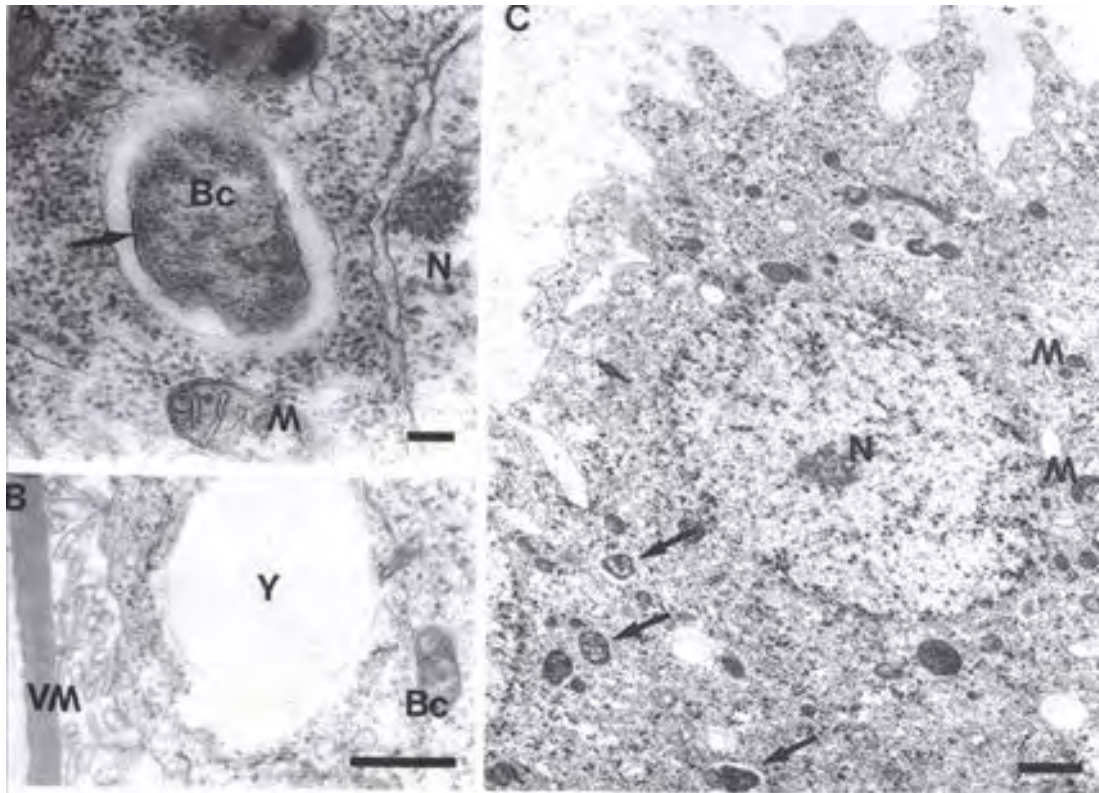


Figura 1: Eletromicrografia de diferentes estágios de desenvolvimento gonadal de *Anastrepha*. **(A)** Bactéria (Bc) localizada em uma vesícula no citoplasma do hospedeiro; **(B)** Bactéria no pólo posterior do ovo, após a formação da célula; **(C)** Pólo posterior celular contendo inúmeras bactérias. Escala em bar 0,1 μ m; N: núcleo; M: mitocôndria; Vm: membrana vesicular; Y: centro nuclear. (Selivon et al., 2002).

A utilização de oligonucleotídeos para a detecção da *Wolbachia* deu início aos trabalhos realizados com biologia molecular. Inicialmente, foi utilizado o gene ribossomal 16S rDNA (O'Neill et al., 1992), que continua sendo empregado devido a sua alta sensibilidade na detecção da bactéria. Contudo, não é indicado como único meio para a distinção dos supergrupos A e B da *Wolbachia*, pois apresenta baixa divergência nas sequências, havendo indícios de que estes supergrupos tenham provavelmente se separado a 50 milhões de anos (Werren et al., 1995a, 1997). Com isso, este *primer* não auxiliava nas análises evolutivas e de alteração reprodutivas acometidas pela presença da *Wolbachia*, somente no seu diagnóstico.

Outro *primer* empregado nos estudos com *Wolbachia* é o *ftsZ*, que foi caracterizado a partir de um gene do ciclo celular da bactéria (Holden et al., 1993). Este gene foi amplamente difundido por Werren (1995a, b). No entanto, apresenta baixa sensibilidade na detecção de *Wolbachia* (Werren e Windsor 2000; Jeyaprakash e Hoy, 2000, 2002; Hong et al., 2002, Coscrato, 2006).

Braig e colaboradores (1998) a partir da caracterização de uma proteína específica de superfície de membrana de *Wolbachia* confeccionaram o oligonucleotídeo *wsp*. Este *primer* é altamente variável e vem sendo utilizado em análises populacionais e filogenéticas da bactéria (Sun et al., 2007; Coscrato et al., 2009). Estudos recentes caracterizam o *wsp*, demonstrando que este oligonucleotídeo apresenta quatro regiões hipervariáveis (HVRs) que se organizaram a partir de eventos combinatórios (Baldo et al., 2005).

A combinação do uso dos *primers* mencionados, possibilitou que *Wolbachia* fosse dividida em oito supergrupos taxonômicos classificados de A a H. Os supergrupos A e B são comumente detectados em insetos (Werren et al., 1995a), enquanto os supergrupos C e D são encontrados em nematóides (Lo et al., 2002), o supergrupo E é característico de colembolas, assim como G somente foi detectado em aranhas australianas (Rowley et al., 2004) e o H em cupins (Bordenstein e Rosengaus, 2005). O supergrupo F é encontrado em nematóides, e recentemente foi detectado em artrópodes (Baldo et al., 2006b; Panaram e Marshall, 2007).

2.1.1. As Interações da *Wolbachia* com seus Hospedeiros

Nas últimas décadas a bactéria *Wolbachia* foi amplamente encontrada infectando diferentes espécies de invertebrados, com maior número de relatos entre os artrópodes como os insetos (Werren et al., 1995b, Stouthamer et al., 1999; Jeyaprakash e Hoy, 2000), os aracnídeos (Breeuwer e Jacobs, 1996), os

crustáceos (Cordaux et al., 2001; Gotoh, et al., 2003) e os isópodes. Além disso, são encontradas em nematóides (Bandi et al., 1998, 2001).

Análises estatísticas recentes confirmam a extensa distribuição desta bactéria entre os invertebrados, estimando encontrá-la em 65 % das espécies de insetos (Hilgenboecker et al., 2008), o que reafirma estudos que propunham sua infecção de 20 a 70 % dos insetos (Jeyaprakash e Hoy, 2000).

As interações entre a bactéria e seu hospedeiro causam alterações reprodutivas, tais como: A incompatibilidade citoplasmática (IC), que é um dos tipos de alteração reprodutiva melhor caracterizada (O' Neill et al., 1992; Rousset et al., 1992), e é comumente observada em moscas, vespas e mosquitos (Werren et al., 2008). A IC acontece a partir da incompatibilidade dos gametas masculino e feminino, levando a morte do zigoto, em espécies diplóides, ou aumento do número de machos na prole, em haplodiplóides (Stouthamer, 1999). Além disso, a incompatibilidade pode ocorrer nos cruzamentos de populações, espécies e linhagens evolutivamente próximas, podendo ser unidirecional (cruzamento compatível sendo o recíproco incompatível) ou bidirecional (cruzamentos recíprocos incompatíveis). Em decorrência deste mecanismo a prole terá um elevado número de fêmeas com *Wolbachia*, o que provavelmente resultará em proles infectadas que disseminarão ainda mais a bactéria.

Outro mecanismo estudado é a indução a partenogênese (IP) (Stouthamer, 1990), que é menos comum que a IC. A IP ocorre através de ovos haplóides que se convertem em uma geração de fêmeas diplóides (Stouthamer, 1999).

Algumas das alterações reprodutivas apresentam mecanismos pouco conhecido, como a feminização dos machos (Hiroki et al., 2002; Negri et al., 2008), acredita-se que esta ocorra a partir de machos sendo geneticamente convertidos em fêmeas (Stouthamer, 1999), e a morte de machos (Rousset, 1992).

Mesmo não se conhecendo completamente todos os mecanismos das alterações reprodutivas ocasionadas pela presença da *Wolbachia*, acredita-se que estas ocorram durante o desenvolvimento embrionário do hospedeiro. Há um consenso que no mecanismo da IC exista alguma "modificação" (sistema *mod*) no esperma dos machos infectados, sendo estes marcados, e o desenvolvimento de embriões normais somente ocorre se o ovo materno ao ser fecundado também esteja infectado, para que se consiga "recuperar" (sistema *rescue*) os cromossomos paternos, viabilizando o processo reprodutivo (Bourtzis e O'Neill, 1998).

Poinsot e colaboradores (2003) propõem três modelos bioquímicos que tentam traduzir o mecanismo adequado para estes fatores de "modificação" e "resgate" que determinam a IC. Tais modelos são designados como: (i) hipótese "chave-fechadura"; (ii) hipótese "titulação-restituição"; (iii) hipótese "câmera lenta". Porém, os mesmos pesquisadores concluem que o modelo de "chave-fechadura" é o mais parcimonioso, no entanto, os outros não são descartados, mas seriam necessários mais dados para a compreensão. A hipótese da "chave-fechadura" consiste em se ter uma função *mod* (modificação) representada por uma "fechadura" na bactéria, a qual se ligará ao cromossomo paterno. Com isso, a formação do zigoto somente ocorrerá se os ovos estiverem infectados com a bactéria, visto que estas apresentariam a "chave" para remoção da "fechadura" (recuperação).

Além da possível atuação nos gametas dos hospedeiros da *Wolbachia*, foi observada sua íntima relação com os microtúbulos do fuso mitótico através de análises citológicas durante a divisão mitótica de *Drosophila*. Este fato possibilitou explicar sua distribuição nas regiões dos pólos das células durante a mitose. No mesmo estudo foi sugerido, que após a divisão a bactéria seria capaz de se distribuir pelo citoplasma vindo a construir domínios no interior da célula (Callaini et al., 1994; Kose e Karr, 1999). Em outras análises observou-se a

distribuição da *Wolbachia* em embriões, visualizando uma maior concentração da bactéria no pólo posterior, sendo que nesta região ocorre a formação das células germinativas, o que permitiria a transmissão vertical da bactéria a prole do hospedeiro (Hadfield e Axton, 1999; Selivon et al., 2002).

As alterações reprodutivas desencadeadas pela presença da *Wolbachia* têm sido consideradas como uma estratégia da bactéria, sendo referida como um parasitismo reprodutivo. Além desta relação simbiótica, o mutualismo tem sido apresentado como uma segunda forma de interação da *Wolbachia* com alguns de seus hospedeiros (Werren et al., 2008). Entretanto, Bordenstein e colaboradores (2009), concluíram em recente estudo que estes evolucionários relacionamentos mantidos entre a bactéria e seus hospedeiros não poderão ser realmente solucionados até que um número maior de caracterizações taxonômicas da *Wolbachia* sejam realizadas.

As análises feitas por Bordenstein et al. (2009) indicam a presença da relação de mutualismo entre quatro linhagens diferentes da *Wolbachia* e nematóides hospedeiros. Neste mesmo trabalho, os invertebrados apresentaram aumento da fertilidade e da viabilidade reprodutiva com a presença da bactéria, sendo que em nematóides é amplamente difundida a questão que a presença da *Wolbachia* garante normal desenvolvimento e fertilidade. Estas demonstrações tiveram início a partir de estudos com tratamentos para controlar os invertebrados patogênicos, os quais observaram que os antibióticos utilizados agiam sobre a bactéria e não atacavam o nematóide, como era esperado. A *Wolbachia*, portanto, passou a ser encarada como a mediadora nos tratamentos contra estes parasitas patogênicos (Taylor et al., 2005). Em humanos o uso do antibiótico doxycycline causou redução maior que 95% da bactéria, demonstrado através das análises com microfilárias existentes no sangue, este fato foi acompanhado do crônico declínio da infecção com o nematóide (Hoerauf et al., 2003a).

Wolbachias encontradas em alguns insetos têm sido descritas como as prováveis manipuladoras do processo de apoptose celular no sistema reprodutor feminino, sua presença garante o desenvolvimento de ovos, que transmitirão o endossimbionte a próxima geração (Werren et al., 2008). Tal fato pôde ser demonstrado com estudos realizados com vespas, primeiramente *Wolbachia* foi removida com a ação de antibióticos e se observou a incapacidade de produção do oócito (Dedeine et al., 2001). Posteriormente, Pannebakker et al. (2007) detectou que a maturação do oócito nas mesmas vespas somente ocorre com a presença da bactéria, pois ao ser retirada resultava na morte da célula por apoptose. Zchori-fein e colaboradores (2006) encontraram semelhante manipulação no processo de oogênese em besouros ao eliminar *Wolbachia*. É de extrema importância ressaltar que insetos não infectados com esta bactéria apresentam normal processo de embriogênese.

2.1.2. A Transmissão da *Wolbachia*

A forma como a *Wolbachia* é herdada apresenta peculiaridades de indivíduo para indivíduo (Huigens et al., 2000). Comumente sua transmissão ocorre de forma vertical através do citoplasma dos ovos maternos infectados (Werren, 1997), o que é análogo a herança mitocondrial herdada. Frydman e colaboradores (2006) demonstraram que *Wolbachia* ao ser introduzida *in vitro* na cavidade abdominal de fêmeas de *Drosophila* estariam se concentrando preferencialmente nas SSCN (*Somatic Stem Cell Niche*), e que a bactéria estaria migrando através de três diferentes tecidos da mosca, até alcançar o ovário, estabelecendo-se 15 dias após a infecção. *Wolbachia* possivelmente prefere estas células por garantirem a sua transmissão vertical. Porém, este mecanismo não explica a sua ampla distribuição entre os invertebrados (Jeyaprakash e Hoy,

2000; Werren e Windsor 2000). A partir disto sugere-se a existência de transferência horizontal da *Wolbachia* entre diferentes gêneros.

2.1.2.1. A Transferência Horizontal da *Wolbachia*

A transferência horizontal passou a ser descrita a partir de comparações entre as filogenias da bactéria e do hospedeiro, em que se observava incongruência entre os resultados, pois era esperado uma homologia nestas análises (O' Neill et al., 1992; Stouthamer et al., 1993; Werren et al., 1995b; Vavre et al., 1999; Baldo et al., 2006b).

Recentemente Baldo et al. (2008) indicaram que o movimento da *Wolbachia* dentro de aranhas do gênero *Agelenopsis* reflete o seu padrão de interação com outros hospedeiros, parasitas e predadores, vindo a aumentar a chance de ocorrência da transferência horizontal. Os autores detectaram neste aracnídeo a presença de transferência horizontal entre espécies do mesmo gênero. Em estudo realizado por Jiggins et al., (2002) demonstram que algumas linhagens de *Wolbachia* são comumente encontradas em espécies de hospedeiros intimamente relacionados, este padrão é explicado através de uma consequente especiação do invertebrado, sendo que a *Wolbachia* acompanhou este processo evolutivo estabelecendo-se nestas espécies. Dados semelhantes foram observados por Breeuwer e Werren (1990) em que identificaram a presença de incompatibilidade de vespas do gênero *Nasonia* que vivem em simpatria, e estudos subsequentes realizados por Bordenstein e colaboradores (2001), com o cruzamento de vespas *Nasonia* de espécies relacionados simpátricas observaram a geração de prole com indivíduos híbridos não férteis, pode-se então demonstrar a ocorrência de isolamento reprodutivo pós-zigótico devido a presença da *Wolbachia*, causadora da IC nestes insetos.

Raychoudhury et al. (2009) descreveram uma variedade de linhagens de *Wolbachia* que infectam vespas do gênero *Nasonia*. Neste estudo foi observada a transferência da bactéria entre gêneros diferentes de insetos, sendo adquiridas de moscas varejeiras, de *Muscidifurax uniraptor* (outra espécie de vespa) e de *Drosophila* sp. A transferência entre espécies relacionadas também foi detectada em populações de *Ephestia kuehniella* e seu parasitóide do gênero *Trichogramma* (Meer et al., 1999). Os parasitóides são um potencial meio de se transferir *Wolbachia*, como observado por Kondo et al. (2002), que detectaram a transferência da bactéria entre besouro e moscas-das-frutas mediada pelo vetor (parasitóide).

A transmissão entre clados geneticamente diferentes foi observada no Panaram e Marshall, (2007), ao detectar a presença do supergrupo F de *Wolbachia*, característico de nematóide, em insetos ortópteros, sendo o modo de aquisição ainda desconhecido. Porém, os autores sugerem que esta transferência tenha acontecido recentemente, quando houve a divergência entre os grupos de artrópodes e nematóides, o que foi também observado por Casiraghi et al. (2005). Além disso, atualmente, é proposto que a transmissão horizontal da *Wolbachia* entre artrópodes e nematóides venha ocorrendo a cerca de 100 milhões de anos (Lo et al., 2002; Casiraghi et al., 2004).

2.1.3. A transferência de Material Genético: *Wolbachia* vs. Hospedeiro

A caracterização dos genomas de duas linhagens de *Wolbachia* encontradas nos invertebrados *Drosophila melanogaster* e *Brugia malayi*, indicaram como este estava organizado (Wu et al., 2004; Foster et al., 2005). A linhagem wMel da *Wolbachia* identificada em *D. melanogaster*, apresentou ampla quantidade de elementos repetitivos e móveis, observados com maior frequência

nos supergrupos A e B de bactéria (Wu et al., 2004; Bordenstein e Reznikoff, 2005). A presença dos transposons nesta bactéria são um dos meios pelo qual se pode ter maior variabilidade de linhagens da *Wolbachia*.

Os transposons são conhecidos como “genes saltadores” ou elementos transponíveis, estes são sequências de DNA que se movem pelo genoma, e são encontrados em diferentes posições de uma única célula, o que é denominado transposição.

McClintock (1950) foi a pioneira na observação da presença de transposons no genoma de milho, atualmente já se sabe que 50 % do genoma deste cereal é constituído por elementos transponíveis. Em humanos há dados de mais de um milhão de cópias de um mesmo elemento e mais de 100.000 de um segundo tipo (Smit e Riggs, 1996; Kazazian e Moran, 1998 apud Kidwell e Lisch, 2001). A primeira detecção de transposons em moscas-das-frutas foi realizada em *Drosophila melanogaster*, em que encontraram sequências similares as de milho e a de nematóides (Jacobson et al., 1986).

Estudos realizados em invertebrados, tais como besouros, encontraram em seu DNA fragmentos do genoma da *Wolbachia* (Kondo et al., 2002). Hotopp e colaboradores (2007), também detectaram em quatro espécies de insetos e quatro nematóides a inserção de fragmentos de praticamente todo o genoma da bactéria (maior 1 megabase), e outros menores (menor 500 pares de base). Além da transferência de fragmentos de DNA da *Wolbachia* para os invertebrados, o mecanismo inverso também é relatado (Masui et al., 1999).

Werren e colaboradores (2008) sugerem que as inserções dos fragmentos de DNA da *Wolbachia* no hospedeiro podem resultar em novas funções aos genes. Além disso, indicam que aquisição destes novos genes

ocasionaria um rearranjo do cromossomo do invertebrado, resultando em mecanismos de isolamento reprodutivo.

2.1.4. Análises de populações de Hospedeiro relacionadas a presença da *Wolbachia*

O início dos estudos com o gene *wsp* de *Wolbachia* foi marcado por demonstrar que invertebrados hospedeiros de um mesmo gênero, mas de espécies diferentes apresentavam grande similaridade nas sequências da proteína analisada. Contudo, algumas regiões possuíam grande variabilidade, com isso desde o princípio já se enunciava que esta variabilidade refletia a diferença entre os supergrupos, e que representava a adaptação e especiação dos hospedeiros devido a íntima relação com esta bactéria intracelular (Braig et al., 1998).

A partir da diferenciação dos supergrupos de *Wolbachia* foi possível detalhar a sua diversidade. Tagami e Miura (2004) realizaram análises em populações (do Japão), de borboleta da ordem *Lepidoptera*, e observaram distribuição congruente entre os supergrupos A e B da *Wolbachia*, os quais apresentavam sequências completamente idênticas. Outros estudos não encontram semelhantes resultados, detectando maior variabilidade entre as linhagens de *Wolbachia* detectadas (Braig et al., 1998; Jeyaprakash e Hoy, 2000).

Behbahani e colaboradores (2005) ao estudarem uma espécie de mosquito de duas ilhas na Polinésia Francesa (ilhas Moorea e Fiji), detectaram a presença de *Wolbachia* do supergrupo A, mas com linhagens diferentes. Os pesquisadores sugerem que este fato ocorreu, pois uma das espécies divergiu

mais recentemente do que as outras linhagens deste hospedeiro.

Em moscas da família Tephritidae foi realizado um trabalho com cinco populações de locais diferentes na China buscando relações com a distribuição da *Wolbachia*. Um dos grupos não estava infectado, porém os que apresentaram a bactéria foram divididos em quatro grupos distintos, conforme análises das sequências do gene *wsp*. As sequências apresentaram taxas de divergência maior que 23% a menores que 1%. Estes dados foram semelhantes aos obtidos com o gene mitocondrial COI. A partir disto, os pesquisadores propuseram que a dispersão da *Wolbachia* não ocorreu nos tempos atuais e concluem que houve coevolução entre a bactéria e a mosca da espécie *Bactrocera dorsalis* (Sun et al., 2007).

Os trabalhos realizados através das comparações entre as populações de hospedeiro e a infecção com a *Wolbachia* possibilitaram compreender o período que os invertebrados vem sendo infectado e se houve alguma influência na sua evolução devido as alterações causadas pela presença da bactéria.

2.2. A relação *Wolbachia* e moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*

2.2.1. As moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*

Uma grande parte das espécies de moscas-das-frutas é classificada como insetos praga por atacarem frutos de valor comercial. O ciclo de vida destas moscas (figura 2 A) é iniciado com o acasalamento, seguida por ovoposição em frutos (figura 2 B), eclosão, e desenvolvimento das larvas que irão se alimentar do fruto (figura 2 C), o qual cairá ao solo e a mosca passa pela etapa de ecdise pupal, após acontece uma metamorfose, e a saída das moscas adultas (Salles, 2000).

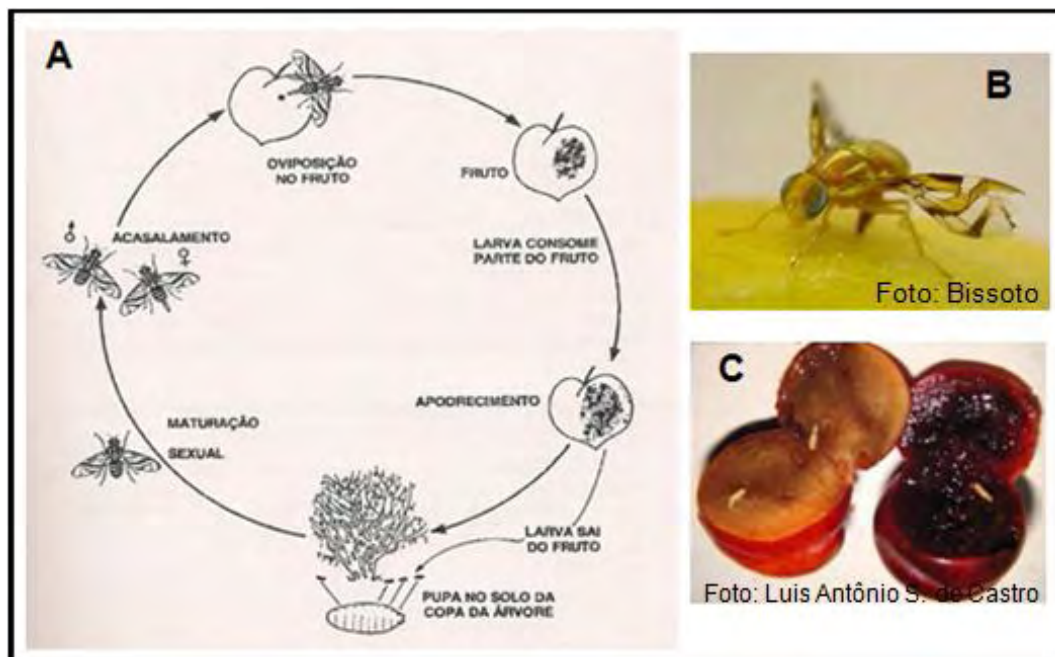


Figura 2: Diferentes fases do desenvolvimento de *Anastrepha fraterculus*. **(A)** Ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Salles, 2000); **(B)** *Anastrepha fraterculus* durante ovoposição (www.jardineiro.net/br/artigos/bichinho_goiaba.php); **(C)** Ameixas atacada por larvas de *Anastrepha fraterculus* (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ameixa/CultivodaAmeixeira>).

O gênero *Anastrepha* é endêmico da América e existem cerca de 200 espécies descritas neste continente, sendo que no Brasil é encontrada em 99 localidades (Zucchi, 2007 apud Ribeiro, 2009). Uma das espécies que apresenta maior destaque na América do Sul é a *Anastrepha fraterculus sensu lato* (moscas-das-frutas Sul Americana) (figura 2B). Estas moscas são encontradas em mais de 90 espécies de frutos, (Malavasi et al., 2000).

A espécie *A. fraterculus* foi dividida através de análises cromossômicas e morfométricas, inicialmente em duas novas espécies *A. sp. 1 aff. fraterculus* e *A. sp. 2 aff. fraterculus*, referidas como *A. sp. 1* e *A. sp. 2* (Selivon, 1996; 2005 apud Ribeiro 2009). Posteriormente, foram descritas duas outras novas espécies, sendo *A. sp. 3 aff. fraterculus* encontrada no litoral e nas regiões sul e sudeste do Brasil, e *A. sp. 4 aff. fraterculus* foi caracterizada em Guayaquil, no Equador (Selivon, 2004a e b apud Ribeiro, 2009).

Análises moleculares utilizando o DNA ribossomal de três espécies de moscas do complexo *fraterculus* brasileiras (*A. sp. 1*, *A. sp. 2* e *A. sp. 3*), que *A. sp. 1* possui maior similaridade com *A. sp. 2* do que ambas com *A. sp. 3* (Prezotto, 2008 apud Ribeiro 2009). Em *A. sp. 1* e *A. sp. 2* detectou-se um mecanismo de isolamento reprodutivo pós-zigótico, que pode ser causado por uma alteração reprodutiva, a IC. Além disso, em estudos morfológicos da *A. fraterculus* se observou inúmeras semelhanças entre *A. sp. 1* e *A. sp. 2*, isto pode estar relacionado ao isolamento reprodutivo, que levaria a uma especiação (Selivon et al., 2002).

O combate as moscas das frutas pela fruticultura ocorre conforme as exigências dos países importadores, especialmente com relação à presença de resíduos agrotóxicos. O uso de agrotóxicos deve ser feito sob cuidados especiais, procurando-se evitar sempre que possível. Os programas de manejo de pragas têm incentivado vários métodos e táticas de controle, como os métodos culturais, uso de atrativos, resistência varietal, e principalmente o controle biológico (Carvalho et al., 2000).

O controle biológico das moscas-das-frutas tem sido proposto por meio de diversos organismos como vírus, bactérias, fungos, nematóides, predadores e parasitóides (Carvalho et al., 2000). *Wolbachia*, tem sido estudada como um meio de controle biológico para os seus hospedeiros, por manipular a reprodução destes, o que acabaria por controlar a prole (Bourtzis, 1998; Zabalou et al., 2004).

2.2.2. A interação entre *Wolbachia* e *Anastrepha*

A *Wolbachia* foi descrita em um grande número de espécies de *Anastrepha* (Werren et al., 1995; Selivon et al., 2002; Mascarenhas, 2007; Coscrato et al, 2009) e também em outros gêneros de moscas-das-frutas como

Bactrocera (Kittayapong et al., 2000; Jamnongluk et al., 2002; Sun et al., 2007), *Rhagoletis* (Riegler e Staufer, 2002) e *Ceratitis capitata* (Rocha et al., 2005).

A primeira suposição de presença da *Wolbachia* em moscas-das-frutas em território nacional foi feita por Selivon e colaboradores (1999) em espécies de *A. sp. 2*, em que detectou-se redução na eclosão de larvas e desvios na proporção sexual da progênie adulta, sendo que estas alterações poderiam estar relacionadas a populações de bactéria que haviam sido observadas em estudos anteriores (Selivon et al., 1996). A partir destas observações foi proposta uma possível alteração no padrão reprodutivo classificada como IC, o que foi associada a presença da *Wolbachia* como causadora desta alteração reprodutiva. A infecção pela *Wolbachia* em *Anastrepha* foi confirmada com o auxílio do gene *ftsZ* e técnicas de eletromicrografia eletrônica (figura 1) por Selivon e colaboradores (2002).

A IC tem sido demonstrada como um meio de alteração reprodutiva em diferentes tipos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*, como *R. cerasi* e *C. capitata* (Riegler e Staufer, 2002; Zabalou et al., 2004). Recentemente em um estudo com o cruzamento de *A. sp. 1* e *A. obliqua* comprovou-se a ocorrência da IC nas moscas do gênero *Anastrepha* (Ribeiro, 2009). Tais resultados elevam a perspectiva de ter ocorrido especiação das moscas do complexo *fraterculus* devido à presença da *Wolbachia*.

As linhagens de *Wolbachia* encontradas em diferentes gêneros de moscas-das-frutas são em muitos dos casos semelhantes à bactéria encontradas em outros tephritídeos, o que indica uma transferência horizontal entre táxons que divergiram de uma mesma família, tais como moscas que se estabeleceram em uma mesma planta, sendo que ao ocupar o mesmo ambiente há maiores chances de ocorrer a transferência da bactéria (Kittayapong et al., 2000). Outro fato observado foi em populações de *Bactrocera dorsalis* da China, em que se detectou similaridade com supergrupos de *Wolbachia* da Tailândia das mesmas

espécies de moscas, o que sugere uma transferência do endossimbionte entre estes organismos (Sun et al., 2007). Em diferentes espécies de *Anastrepha* Coscrato e colaboradores (2009) detectaram linhagens de *Wolbachia* que apresentaram relações filogenéticas com o tipo *wMel* de *D. melanogaster*. Portanto, há uma grande variedade de linhagens de *Wolbachia* infectando as espécies de moscas-das-frutas (Kittayapong et al., 2000).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Detectar a presença da bactéria *Wolbachia* dentro de populações de três espécies de *Anastrepha*, coletadas de diversas regiões do Estado de São Paulo, através do uso de marcadores moleculares como o gene *wsp*, *ftsZ* e 16S rDNA da *Wolbachia*.

3.2. Objetivos Específicos

- Detecção da presença da *Wolbachia* em populações de três espécies de *Anastrepha* do estado de São Paulo.
- Caracterizar as linhagens de *Wolbachia* quanto aos supergrupos A e B por meio do uso dos marcadores moleculares.
- Análise das sequências obtidas de *Wolbachia* nas diferentes populações de moscas do complexo *fraterculus*, utilizando os parâmetros de diversidade haplótípica, diversidade nucleotídica (Π), entre outros que poderão ser apresentados.

4. Material e Métodos

4.1. Coleta das moscas do gênero *Anastrepha*

Os exemplares de moscas do complexo *fraterculus* foram obtidos através de frutos coletados em campo pelos pesquisadores do Laboratório de Biologia Evolutiva e do desenvolvimento de Insetos do Instituto de Biociências (IB), da Universidade de São Paulo (USP).

As coletas foram realizadas em três diferentes regiões do estado de São Paulo, (figura 3). No total, foram trabalhados com 74 indivíduos distribuídos em três populações de diferentes espécies de *Anastrepha* (tabela 1).

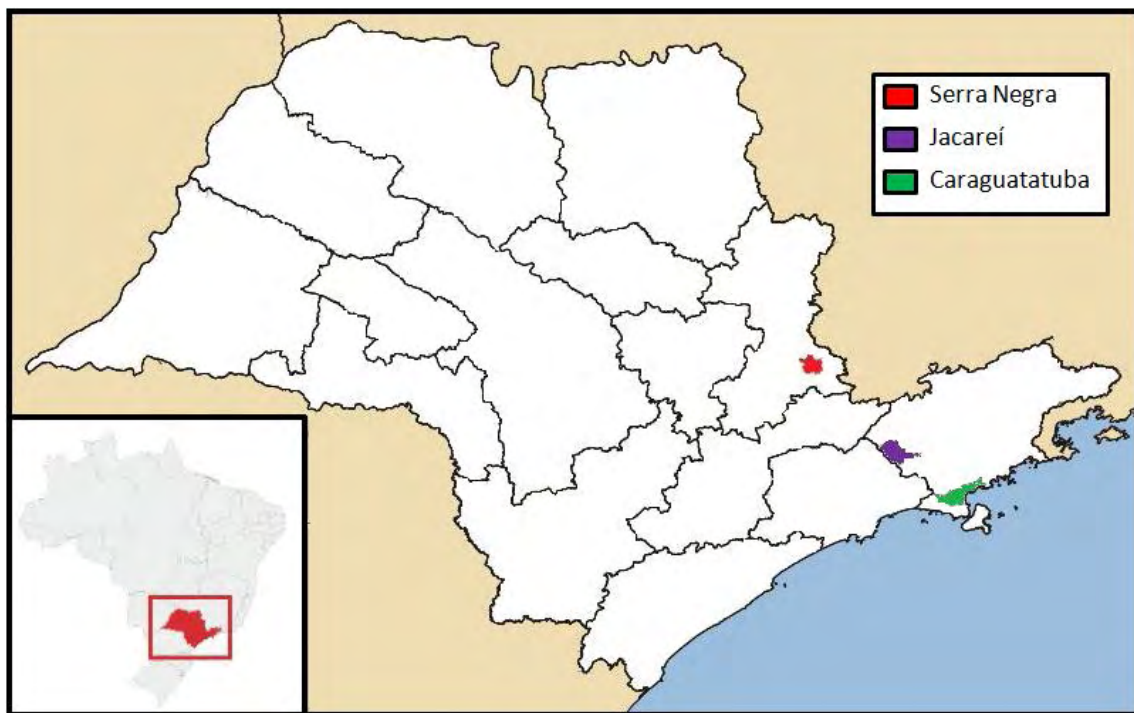


Figura 3: Mapa do Estado de São Paulo com as localidades de coleta dos frutos.

Tabela 1: Espécies de moscas-das-frutas, total de amostras em cada população, plantas hospedeiras, locais de coleta e posição geográfica no estado de São de Paulo.

Táxon	Espécie	N. de Indivíduos	Planta hospedeira	Local Coleta	Posição Geográfica
	<i>A. sp. 1 aff. fraterculus</i>	11	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	Jacareí	23° 17´S; 46° 01´W
<i>fraterculus</i>	<i>A. sp. 1 aff. fraterculus</i>	19	Goiaba (<i>Psidium guajava</i>)	Serra Negra	22° 35´S; 46° 50´W
	<i>A. sp.2 aff. fraterculus</i>	21	Chapéu-do-sol (<i>Terminalia catappa</i>)	Caraguatatuba	23° 39S; 45° 25´W
	<i>A. sp. 3 aff. fraterculus</i>	24	Chapéu-do-sol (<i>Terminalia catappa</i>)		

N.: Número

As coletas dos frutos contendo os ovos de moscas-das-frutas, e a estocagem foram feitas segundo o procedimento estabelecido por Selivon (1996).

Os frutos infestados (tabela 1) foram coletados e armazenados em caixas com vermiculita e encaminhados para o laboratório de Biologia Evolutiva e do desenvolvimento de Insetos-IB-USP/SP, onde ocorreu o desenvolvimento das larvas até a fase de pupas. Posteriormente, a vermiculita das caixas foi peneirada, obtendo-se as pupas, que foram acondicionadas em caixas de acrílico apropriadas, para emergência e manutenção das moscas adultas.

As moscas foram identificadas de acordo com a espécie, sendo selecionadas e armazenadas em álcool a concentração de 70% e a temperatura de -20°C.

As amostras foram enviadas para o laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular, do Departamento de Genética, do Instituto de Biociências da UNESP do Campus de Botucatu. Esses materiais foram acondicionados em freezer a -20°C para posterior extração do DNA.

4.2. Obtenção do DNA genômico a partir do abdômen de *Anastrepha* e Quantificação do DNA

4.2.1. Extração de DNA das moscas

O DNA foi extraído do abdômen dos adultos das moscas-das-frutas, descritas na tabela 1, utilizando o método descrito por Jowett (1986) com algumas modificações.

As moscas que estavam conservadas em álcool a uma concentração de 70% foram lavadas em água miliQ autoclavada para a retirada de resíduos que poderiam atrapalhar a extração.

Posteriormente, os abdômenes das moscas foram excisados com o auxílio de uma lâmina e transferidos para tubos de centrifuga de 1,5ml autoclavados.

Em cada tubo contendo o abdômen foi adicionado 200 µl de solução de homogeneização [Tris-HCl 1 mM (pH = 7,5), NaCl 60 mM e EDTA 50 mM], sendo macerados com o auxílio de pistilos (Eppendorff), até que todo material pôde ser visivelmente dissolvido e diluído nas soluções. Após, se adicionou 200 µl de solução de lise [SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3 mM (pH = 9,0), EDTA 0,1 mM e sacarose 5%], em seguida adicionou-se 5 µl de proteinase K (Life Technologies), numa concentração final de 100 µg/ml. Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por uma hora a 65°C em banho-maria com agitação.

Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo por 5 min (minutos), adicionou-se 120 µl de acetato de potássio 8 M (gelado) e voltaram para o gelo por uma hora. Após, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, a uma temperatura 4°C, por um período 10 min. As amostras foram retiradas da centrífuga com devido cuidado para que as diferentes fases no tubo permanecessem separadas. O sobrenadante foi transferido para outro

microtubo, e em seguida dois volumes de etanol 100% foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados levemente e descansados por 5 min. Após, as amostras foram centrifugadas por 5 min, a 25°C e 14000 rpm, em seguida retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi mantido.

O *pellet* foi lavado por duas vezes com etanol a 70% e centrifugado a 14000 rpm por 2 min a 25°C. Posteriormente, o etanol foi retirado e os microtubos invertidos para a secagem do *pellet* de DNA, sendo levados para o *Speed Vacuum*.

O DNA obtido foi diluído em 30 µl de água miliQ autoclavada e adicionado o volume de 4 µl RNase (10 mg/ml). Em seguida, o DNA foi incubado a 37°C em um intervalo 30 a 60 min e armazenado em freezer a - 20°C.

4.2.2. Quantificação do DNA obtido

O DNA foi quantificado utilizando-se dois métodos. O primeiro procedimento de quantificação foi realizado em gel de agarose a 0,8% com Tris-Borato-EDTA (TBE) 1 X e corado com brometo de etídio, utilizando-se 1 µl de DNA e 3 µl de tampão de carregamento (4 g de sacarose, 0,01 g de azul de bromofenol e 10 ml de TE). Este DNA foi comparado com padrões de peso molecular conhecido (Lambda DNA, Invitrogen). A visualização foi feita com o sistema de fotodocumentação digital *Eagle Eye II* (Stratagene).

O segundo método de quantificação foi realizado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) obtendo-se a concentração do DNA em ng/µl (tabela 2), além de mensurar a qualidade do DNA por meio de comparações de valores de absorbância e grau de pureza.

4.3. Reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e *primers* empregados para a detecção da *Wolbachia*

Para detecção da presença da *Wolbachia* e tipagem dos supergrupos, utilizaram-se três conjuntos de *primers*. Os oligonucleotídeos confeccionados referiam-se aos supergrupos A e B de *Wolbachia*, visto que são comumente encontrados em insetos. Assim foi usado o gene *ftsZ* A e B (responsável pelo ciclo celular da bactéria) descrito por Holden et al. (1993), o 16S A e B rDNA (gene ribossomal) (O'Neill et al., 1992) e o *wsp* A e B (gene que codifica uma proteína de superfície da membrana externa da bactéria *Wolbachia*) (Braig et al., 1998) (tabela 2).

Tabela 2: Sequências dos conjuntos de *primers* utilizados.

Primer	Sequência	Referência
<i>ftsZ</i> A F	5' CTC AAG CAC TAG AAA AGT CG 3'	Holden et al., 1993
<i>ftsZ</i> A R	5' TTA GCT CCT TCG CTT ACC TG 3'	Holden et al., 1993
<i>ftsZ</i> B F	5' CCG ATG CTC AAG CGT TAG AG 3'	Holden et al., 1993
<i>ftsZ</i> B R	5' CCA CTT AAC TCT TTC GTT TG 3'	Holden et al., 1993
16S A rDNA F	5' TTC GGC CGG GTT TCA CAC AG 3'	O'Neill et al., 1992
16S A rDNA R	5' TAA GGG ATT AGC TTA GCC TC 3'	O'Neill et al., 1992
16S B rDNA F	5' TTC GGC CGG ATT TTA CAC AA 3'	O'Neill et al., 1992
16S B rDNA R	5' TAG GGA TTA GCT TAG GCT TG 3'	O'Neill et al., 1992
<i>wsp</i> 136 A F	5' TGA AAT TTT ACC TCT TTT C 3'	Braig et al., 1998
<i>wsp</i> 691 A R	5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3'	Braig et al., 1998
<i>wsp</i> 81 B F	5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAA C 3'	Braig et al., 1998
<i>wsp</i> 522 B R	5' ACC AGC TTT TGC TTG ATA 3'	Braig et al., 1998

F: *forward*; R: *reverse*

Para o conjunto de *primers wsp* a reação consistiu de amostras na concentração de 50 ng, 2 μ l de tampão 10 X (Invitrogen), 1,0 μ l de $MgCl_2$ (50 μ M), 0,4 μ l de uma mistura de nucleotídeos (10 μ M de cada), 0,5 μ l de primer *forward* (F) (20 μ M), 0,5 μ l de primer *reverse* (R) (20 μ M), 0,5 μ l da DNA Taq polimerase (5 U/ μ l) (Invitrogen), água destilada ou deionizada autoclavada para o volume final de 20 μ l. Os ciclos de amplificação foram: um ciclo de 1 min a 94°C, 1

min a 58°C, 2 min a 72°C, 35 ciclos de 15 s (segundos) a 94°C, 1 min a 58°C, 2 min a 72°C e um ciclo de 15s a 94°C, 1 min a 58°C, 7 min a 72°C.

O outro oligonucleotídeo empregado foi o *ftsZ*, a reação de PCR empregada consistiu de amostras de DNA na concentração de 50 ng, 2 µl de tampão 10 X (Invitrogen), 0,6 µl de MgCl₂ (50 µM), 0,4 µl de uma mistura de nucleotídeos (10 µM de cada), 0,5 µl de *primer F* a 10 µM, 0,5 µl de *primer R* a 10µM, 0,5 µl de *DNA Taq polimerase* (Invitrogen) (5 U/µl), água destilada ou deionizada autoclavada adicionada para um volume final de 20 µl. A amplificação para este *primer* ocorreu com uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, um ciclo de 1 min a 58°C e 2 min a 72°C, 38 ciclos de 15 s a 94°C, 1 min a 58°C e 2 min a 72°C, e outro ciclo de 15 s a 94°C, 1 min a 58°C, com uma extensão final de 7 min a 72°C.

Para o *primer 16S rDNA*, a reação consistiu em amostras de DNA na concentração de 50 ng, 2,5 µl de tampão 10X (Invitrogen), 0,75 µl de MgCl₂ (50µM), 0,5 µl de mistura de nucleotídeos (10mM de cada), 0,35 µl de *primer F* (20µM), 0,35 µl de *primer R* (20 µM), 0,25 µl de *DNA Taq polimerase* (Invitrogen) (5 U/µl), água destilada ou deionizada autoclavada para um volume final de 25 µl. O programa de amplificação consiste em uma desnaturação inicial de 2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, com extensão de 3 min a 72°C.

Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese, na corrente constante de 110 mA, por aproximadamente duas horas. Em cada canaleta do gel foram adicionados 5 µl de cada amostra, juntamente com de 3 µl de TC, em um gel de agarose 1%, com tampão Tris-Borato EDTA (TBE 1X). O gel foi corado com brometo de etídio 1%. A visualização foi feita com o sistema de fotodocumentação digital *Eagle Eye II* (Stratagene). Os fragmentos observados tiveram tamanho de 1043-1055 pb (pares de base) para o *primer ftsZ A*, 259 pb para o 16S A rDNA e em torno de 600 bp para o *wsp A*.

4.4. Purificação da reação de PCR, excisão e purificação de fragmento de gel de agarose

4.4.1. Purificação da reação de PCR

As purificações das reações de PCR foram realizadas com o *primer wsp* quando se visualizou um único fragmento no gel de agarose com tamanho em torno de 600 bp. Para esta purificação foi utilizada 2 μ l da enzima Exosap (GE) e 8 μ l da reação de PCR. Posteriormente, foram levados ao banho maria a 37°C por 33 min, e após este período a outro banho maria a 85°C por 15 min. Após a purificação, as amostras foram avaliadas quanto a sua concentração em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000).

4.4.2. Excisão e purificação de fragmento de gel de agarose

Ao se visualizar e detectar a presença de mais um fragmento, quando houve inespecificidade da reação, foi realizado a excisão da banda do gel e transferida para tubos de 1,5 ml. Após, foram submetidas a purificação com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* da *Amersham Pharmacia Biotech*, de acordo com a metodologia do fabricante.

4.5. Método de Clonagem

Para realização da clonagem o DNA foi ligado ao vetor pGEM-T (Promega) utilizando-se diferentes volumes DNA conforme a sua concentração. Adicionou-se 1,0 μ l da enzima T₄ ligase, 3,5 μ l tampão e 0,5 μ l do vetor para o volume final de 7,0 μ l. Estes valores foram otimizados a partir do protocolo original fornecido pelo fabricante, sendo mantida a 16°C por 16 horas.

Após este período, os 7,0 µl da ligação foram adicionados em 50 µl de células competentes DH5- α de *Escherichia coli*, preparadas no próprio laboratório e transformadas após choque térmico. Posteriormente, adicionou-se volume de 600 µl de meio CG (*Circle Grow*/Bio 101, Inc.) as amostras foram transformadas, e colocadas em um agitador a 37°C por uma hora.

As amostras que cresceram foram plaqueadas em meio CG contendo ágar, ampicilina (50 mg/ml) e os marcadores X-GAL e IPTG. Após este procedimento, foram estocadas em estufa a 37°C *overnight*. No outro dia, as colônias brancas, que se esperou conter o *insert*, foram selecionadas com ponteiros estéreis, mergulhadas em um *mix*, previamente preparado com o *primer* M13 F e M13 R, e riscadas em outra placa com CG e ágar para produção de colônias permanentes.

A reação de PCR com o primer M13 foi otimizada utilizando-se 2,5 µl de tampão 10 X (Invitrogen), 1,25 µl de MgCl₂ (50 µM), 1,25 µl de mistura de nucleotídeos (10 mM de cada), 1,25 µl de *primer* F (20 µM), 1,25 µl de *primer* R (20 µM), 0,10 µl de DNA *Taq* polimerase (5 U/µl) e água destilada ou deionizada autoclavada para o volume final de 25 µl. O programa de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 55°C e 1 min a 72°C, com extensão de 5 min a 72°C.

A confirmação da presença do *insert* foi realizada através de visualização em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR que continham o fragmento de DNA de interesse amplificaram bandas com tamanho em torno de 600 bp para *wsp A* mais uma região do plasmídeo, em torno de 280 bp.

Posteriormente a reações de PCR positivas foram purificados utilizando a enzima Exosap (GE). Em seguida as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000).

4.6. Sequenciamento

Duas reações foram realizadas, uma para o *primer* F e outra o *primer* R, com um volume de DNA na concentração de 100 ng/ μ l de acordo com o tamanho do fragmento. Adicionou-se 1,0 μ l de Tampão de Sequenciamento (Tris-HCl 1M pH 9.0 e MgCl₂ 50mM), 2,0 μ l *Big Dye* e 1,00 μ l de *primer* (5 pmol/ μ l), água destilada ou deionizada autoclavada para o volume final de 10 μ l.

O programa de amplificação consistiu em desnaturação inicial de 1 min a 96°C, 35 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C e 4 min a 60°C, permanecendo a 10°C.

As seqüências foram obtidas a partir do sequenciador automático modelo 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.7. Análise das seqüências

Os consensos dos *reads* de cada clone foram montados através dos programas phred Phrap/consed versão (ver.) 14.0 (Gordon et al., 1998). Após, foram retirados os fragmentos do vetor das seqüências com o auxílio da ferramenta *vecscreen* encontrada no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e foram inseridas na ferramenta "*blastn*" (Altschul et al., 1990) do NCBI para se buscar homologia com *Wolbachia*.

4.7.1. Análises de variações das seqüências

Com a confirmação da presença da *Wolbachia*, as seqüências foram alinhadas no programa ClustaX ver. 1.81 para PC (Thompson et al., 1997) e quando necessário foi realizada a formatação manual no programa BIOEDIT (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), com o auxílio do programa Chromas 1.45

(1996-1998, Connor McCarthy) (<http://www.technelysium.com.au/chromas.hlp>).

Em seguida as análises de distância genética intra e interpopulacionais foram determinadas através do modelo de Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980) em que se excluíram os alinhamentos em *gap*. As matrizes de distância foram calculadas para a construção de dendograma com o algoritmo Neighbor-joining (NJ) (Saitou e Nei, 1986), realizando análises de *bootstrap* com 10000 réplicas através do *software* MEGA ver. 4.0.2 (Kumar et al., 2008).

Com o *software* DnaSP ver. 5.00.05 (Librado e Rozas, 2009) foram feitas análises de número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (H_d), a diversidade de nucleotídeos dentro e entre as populações (P_i), e por fim a taxa de diversidade de nucleotídeos conforme as substituições sinónimas (SS).

5. Resultados

5.1. A Quantificação do DNA extraído das moscas-das-frutas

Dois métodos de quantificação de DNA foram utilizados após a extração do DNA dos exemplares de *Anastrepha*. Um desses realizado em gel de agarose 0,8%, contudo, os valores obtidos não foram confiáveis, pois se basearam na visualização e comparação com padrões de peso molecular conhecido (figura 4).

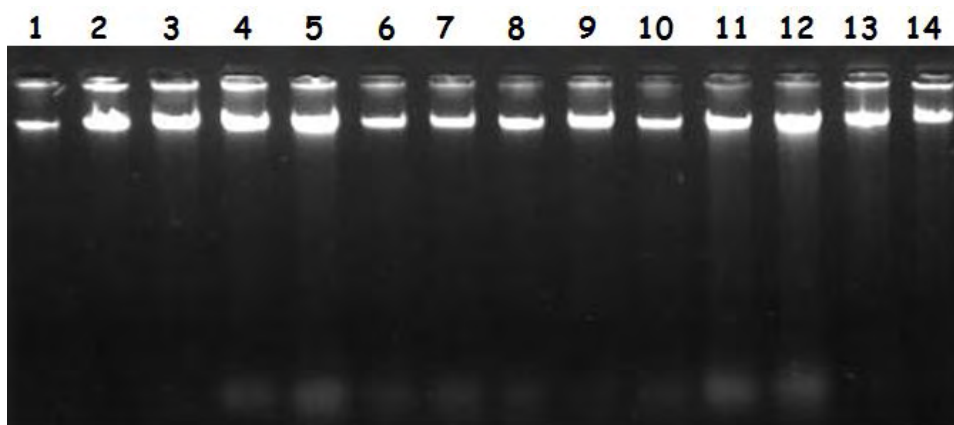


Figura 4: Quantificação em gel de agarose a 0,8%. 1,2 e 3: marcadores com peso molecular de 50, 100 e 150 ng/ μ l, respectivamente; 4 a 14: DNA de *Wolbachia* extraída de *A. sp. 1*.

A análise realizada através do espectrofotômetro apresentou valores precisos, além de fornecer dados sobre a qualidade do DNA. As amostras que apresentaram valor de absorvância próximo a dois foram utilizadas nas reações de PCR, pois este é o grau indicado para uma boa qualidade do DNA. As médias dos valores de concentração de DNA e absorvância das amostras de cada região estudada podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 3: Quantificação do DNA de *Anastrepha* spp. mensurada em espectrofotômetro com média das concentrações de DNA e dos valores da relação 260/280, de acordo com a região estudada.

População	Amostras	Concentração DNA (ng/ul)	Relação 260/280
Jacareí	A. sp. 1	559,66	2,05
Serra Negra	A. sp. 1	578,82	1,88
Caraguatatuba	A. sp. 2	317,23	1,70
	A. sp. 3	673,92	1,94

5.2. Detecção da *Wolbachia* e Sensibilidade dos *primers*

Os testes realizados com os *primers* 16S rDNA, *wsp* e *ftsZ* são apresentados a seguir:

5.2.1. *Primer* 16S rDNA

As amostras das três regiões estudadas foram testadas com o *primer* 16S rDNA, onde se detectou a presença da bactéria *Wolbachia* gerando fragmentos em torno de 259 bp (figuras 5, 6 e 7).

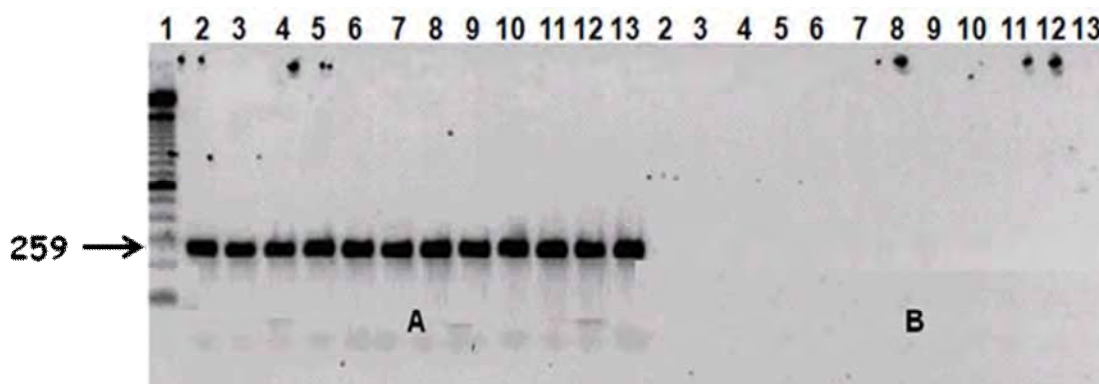


Figura 5: Gel de agarose 1% com indivíduos da população de Jacareí. (A) *Primer* 16S A rDNA. (B) *Primer* 16S B rDNA. 1: *Ladder* 100bp; 2 a 13: indivíduos A. sp. 1.

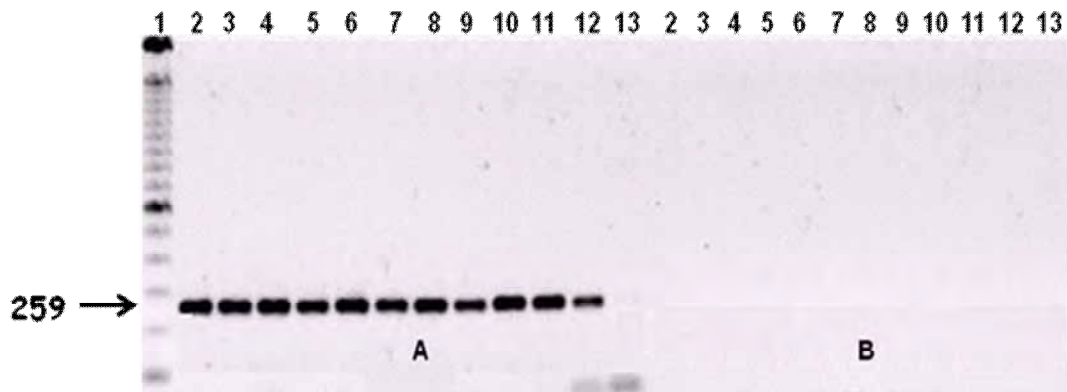


Figura 6: Gel de agarose 1% com indivíduos da população de Caraguatatuba. (A) *Primer 16S A rDNA*. (B) *Primer 16S B rDNA*. 1: *Ladder 100bp*; 2 a 5: indivíduos *A. sp.2*, 6 a 10: indivíduos *A. sp.3*; 12: Controle positivo com o *primer 16SA* e *B rDNA*; 13: Controle negativo.

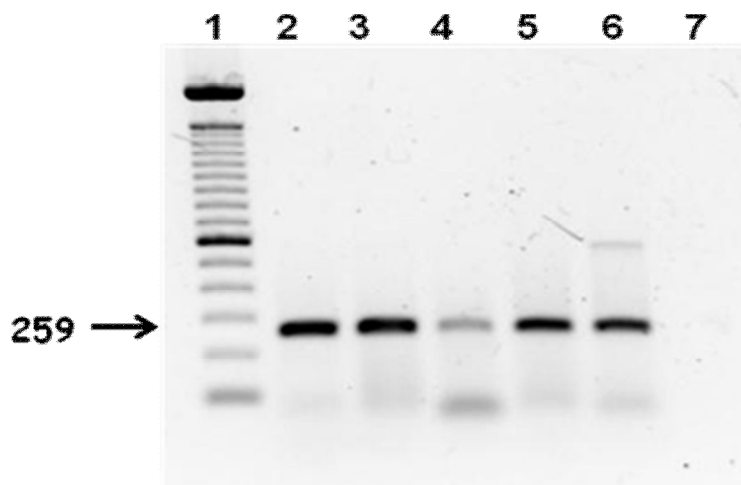


Figura 7: Gel de agarose 1% com o *primer 16S A rDNA* com os indivíduos da população de Serra Negra. 1: *Ladder 100bp*; 2 a 6: indivíduos *A. sp.1*; 7: Controle negativo.

5.2.2. *Primer wsp*

Com a utilização do oligonucleotídeo *wsp* também foram detectadas a presença da *Wolbachia* nas 74 amostras (figuras 8 e 9), assim como observado com o *primer* 16S rDNA.

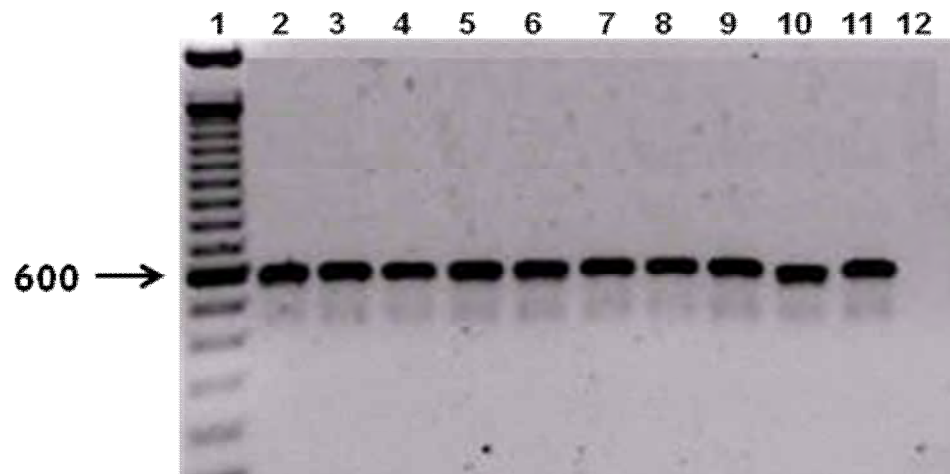


Figura 8: Gel de agarose 1% com o *primer wsp A* com indivíduos da população de Jacareí. 1: *Ladder* 100bp; 2 a 11: indivíduos *A. sp.1*, 12: Controle negativo.

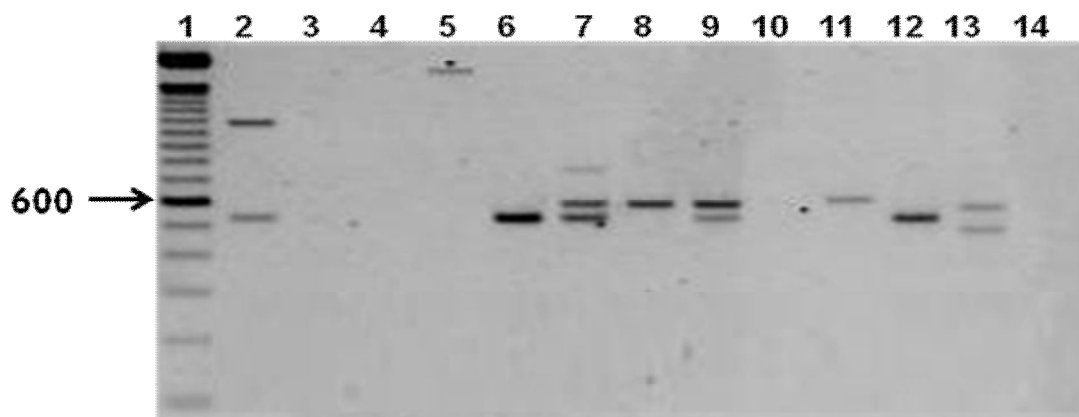


Figura 9: Gel de agarose 1% com o *primer wsp A* com indivíduos da população de Caraguatatuba; 1: *Ladder* 100bp; 2 a 5: indivíduos *A. sp.2*; 6 a 13: indivíduos *A. sp.3*; 14: Controle negativo.

5.2.3. *Primer ftsZ*

As primeiras amostras a serem testadas com o *primer ftsZ* foram da população de Jacareí da espécie *A. sp. 1* (figura 10).

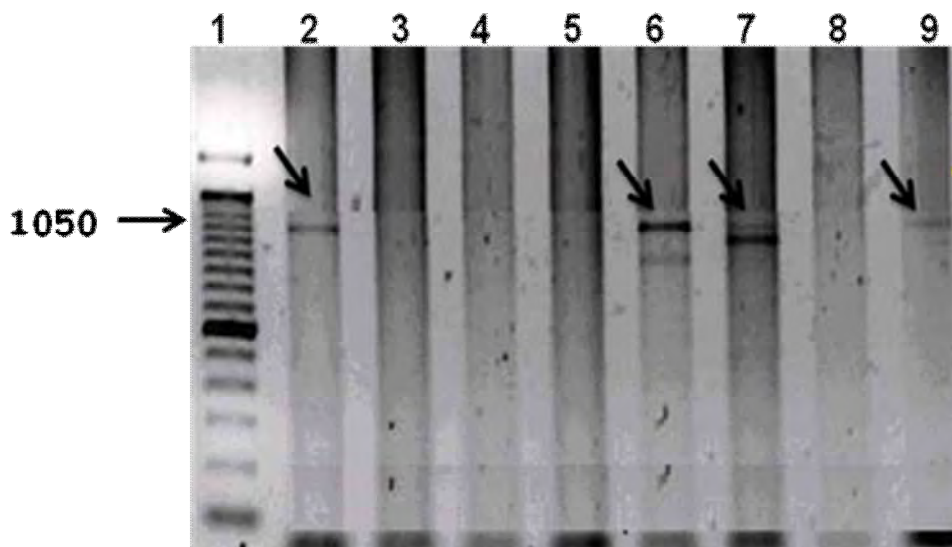


Figura 10: Gel de agarose 1% com o *primer ftsZ* A com indivíduos da população de Jacareí. 1: *Ladder* 100bp; 2 a 9: indivíduos *A. sp.1*. Setas indicam a presença de fragmento.

Os testes posteriores realizados com o *primer ftsZ* passaram por diversas alterações nos protocolos de PCR, e serão apresentadas a seguir:

5.2.3.1. Alterações nas reações de PCR com o *primer ftsZ*

O *primer ftsZ* é amplamente estudado em *Wolbachia*, e devido a sua baixa sensibilidade na detecção da bactéria em *Anastrepha*, neste trabalho procurou-se otimizar o protocolo de PCR, fazendo alterações nas concentrações de DNA, $MgCl_2$, dNTPs, *primers*, DNA *Taq polimerase* e qualidade do DNA utilizado, na tentativa de redução dos falsos negativos.

As mudanças realizadas na reação de PCR com o primer *ftsZ* são apresentadas na tabela 4. Inicialmente alterou-se o volume de DNA, utilizando diferentes valores a partir dos 5 μ l (50ng/ μ l) empregados anteriormente. No entanto, foi detectada *Wolbachia* em 27% das amostras da população de Jacareí com um volume de 3 μ l de DNA (50ng/ μ l) (tabela 5). Com a obtenção destes resultados adotou-se o volume de 3 μ l (50ng/ μ l) nas reações em seguida propostas.

Os protocolos de II a VIII (tabela 4) não permitiram a detecção de *Wolbachia* (figura 11), demonstrando a ineficiência destas alterações.

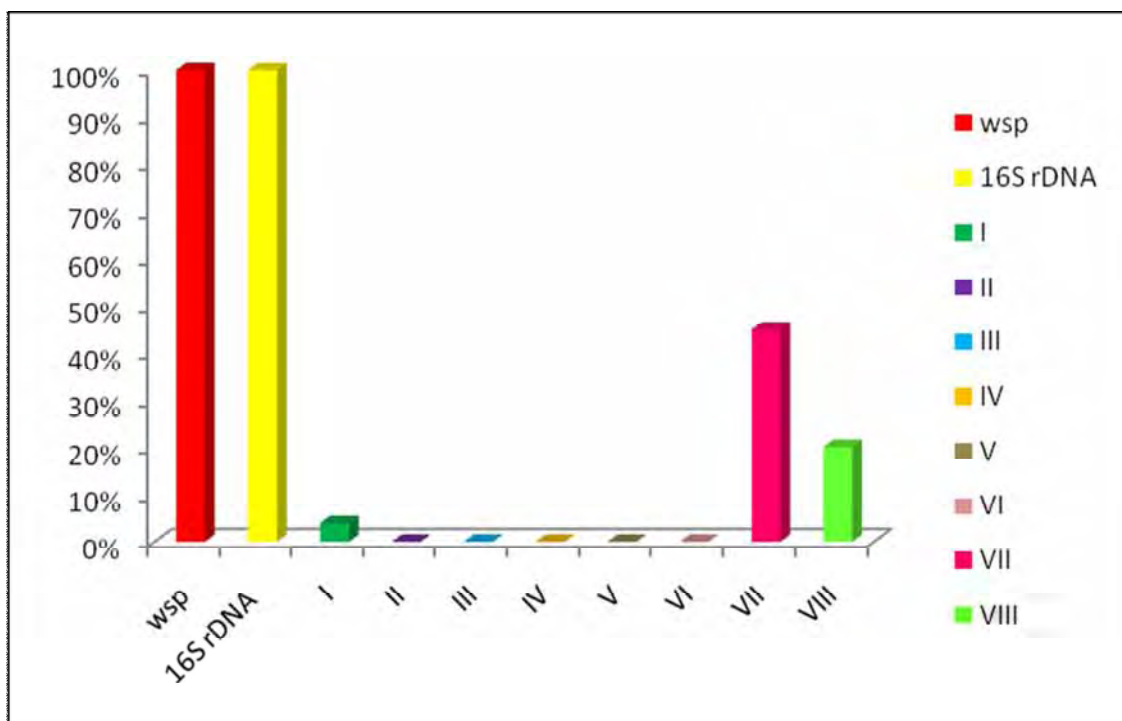


Figura 11: Porcentagem de detecção da bactéria *Wolbachia* nas espécies de moscas-das-frutas utilizando os *primers* 16S rDNA, *wsp* e os diferentes protocolos utilizados com o primer *ftsZ* (indicados de I a VIII).

Tabela 4: Alterações no protocolo de PCR com o *primer ftsZ*, identificados por I a VIII.

Reação de PCR	Reagentes	Concentração	Volume (μ l)
I	DNA	50 ng/ μ l	3,00
II	MgCl ₂	50 mM	0,50
	DNA	50 ng/ μ l	3,00
III	<i>Primer F</i>	8 μ M	0,50
	<i>Primer R</i>	8 μ M	0,50
	DNA	50 ng/ μ l	3,00
IV	MgCl ₂	50 mM	0,50
	<i>Primer F</i>	8 μ M	0,50
	<i>Primer R</i>	8 μ M	0,50
	DNA	50 ng/ μ l	3,00
V	DNTP	10 mM	0,50
	MgCl ₂	50 mM	0,50
	DNA	50 ng/ μ l	3,00
VI	DNTP	10 mM	0,50
	MgCl ₂	50 mM	0,50
	<i>Primer F</i>	8 μ M	0,50
	<i>Primer R</i>	8 μ M	0,50
	DNA	50 ng/ μ l	3,00
VII	DNA <i>Taq</i> polimerase	1 unidade	0,25
	DNA	50 ng/ μ l	3,00
VIII	DNA fresco	50ng/ μ l	5,00

Tabela 5: Porcentagem de detecção da *Wolbachia* com as alterações feitas nos protocolos utilizando o *primer ftsZ*, indicados de I a VIII.

Protocolos	Populações			Total
	Jacarei	Serra Negra	Caraguatatuba	
I	27%	-	-	4%
II	-	-	-	-
III	-	-	-	-
IV	-	-	-	-
V	-	-	-	-
VI	-	-	-	-
VII	63,33%	42,10%	42,50%	44,90%
VIII	-	55%	n	20,16%

(-): 100% de ausência de fragmento; (n): amostras não testadas com protocolo.

Com a modificação do volume da enzima DNA *Taq polimerase* e do número de ciclos da reação de PCR, de 35 para 40 (para aumentar o número de fragmentos de DNA gerados), diagnosticou-se *Wolbachia* em 44,90% das amostras (tabela 5 e figura 11). Porém, este protocolo, ao ser utilizado com os mesmos indivíduos em reações diferentes não apresentou repetição de resultados (figura 12A e B).

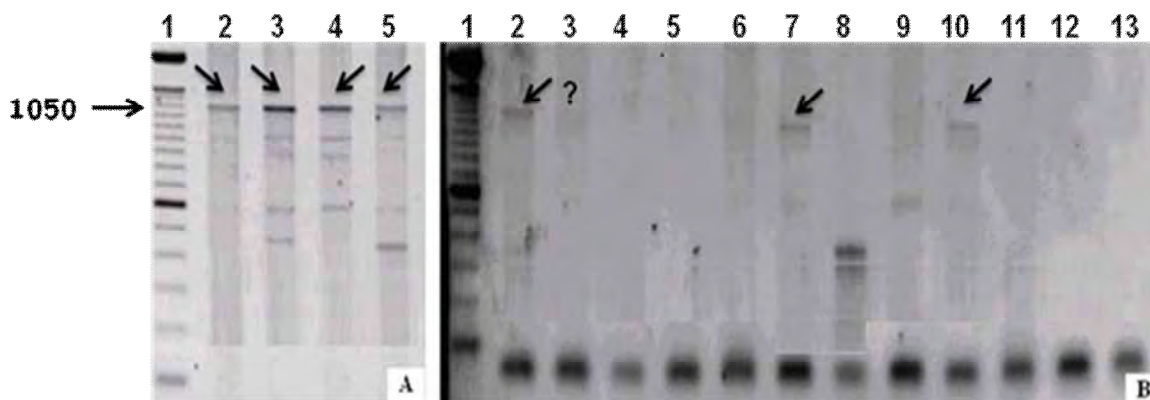


Figura 12: Gel de agarose 1% com exemplares de *A. sp. 1* da população de Jacareí utilizando o protocolo VI com o *primer ftsZ*. **(A)** 2 a 5: *A. sp.1*; **(B)** 2 a 13: *A. sp.1*; interrogação (?): baixa repetibilidade dos dados, com ausência de fragmento que era observado na figura A, no mesmo indivíduo. 1: *Ladder* 100bp; Setas: presença de fragmento.

A qualidade do DNA foi testada com material fresco, utilizado um dia após a extração, com as amostras de Jacareí e Serra Negra (tabela 4). Nas reações anteriores estava-se empregando DNA armazenado por um período maior que sete dias a uma temperatura de -20°C , o que poderia prejudicar a qualidade deste DNA. Um total de 20,16% de presença da *Wolbachia* foi observado na reação de PCR com o *primer ftsZ* nas amostras de DNA fresco (tabela 5).

5.3. Análise das populações de *Anastrepha* quanto aos supergrupos

A três populações de moscas-das-frutas apresentaram infecção com *Wolbachia* como observado anteriormente. Além disso, foram analisadas quanto ao supergrupo A e B da bactéria com conjuntos de *primers* *wsp* A e B, 16S A e B rDNA e *ftsZ* A e B.

Na figura 13, observa-se que os *primers* 16S A e B rDNA e os *primers* *ftsZ* A e B detectaram somente infecção com o supergrupo A. Porém, o *primer* *wsp* indicou também a presença do supergrupo B de *Wolbachia* (Figura 14B), mas estes dados não foram considerados, pois o oligonucleotídeo *wsp* apresenta reação cruzada, isto é o marcador *wsp* B apresenta região homologa ao do *wsp* A. Somente se consideraria estes resultados se os outros *primers* empregados também detectassem o mesmo tipo de supergrupo nas amostras estudadas.

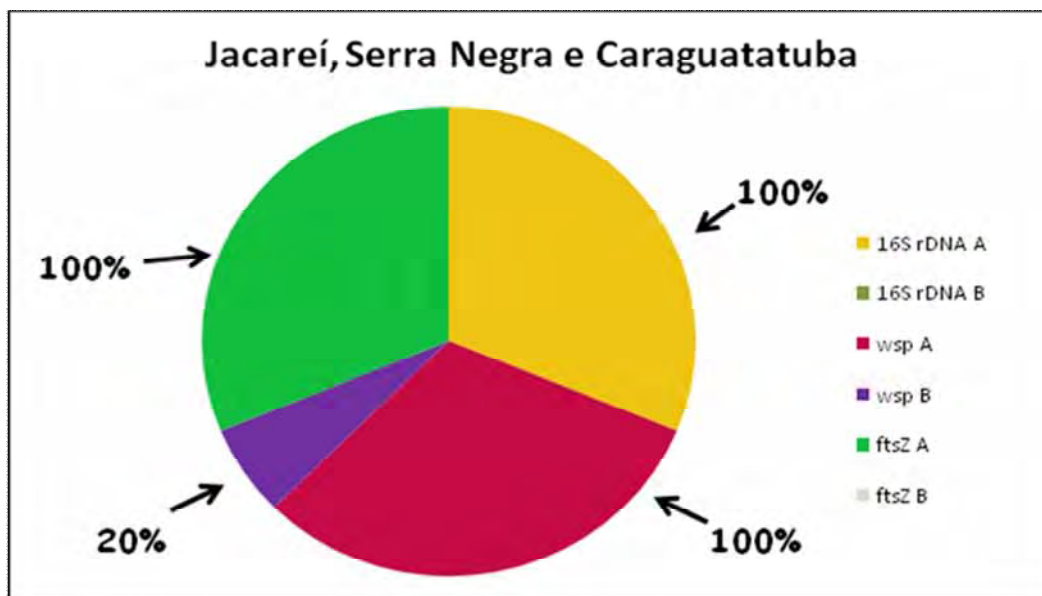


Figura 13: Identificação dos supergrupos A e B de *Wolbachia* com conjuntos de *primers* 16S A e B rDNA, *wsp* A e B e *ftsZ* A e B, nas *Anastrepha* spp. populações estudadas.

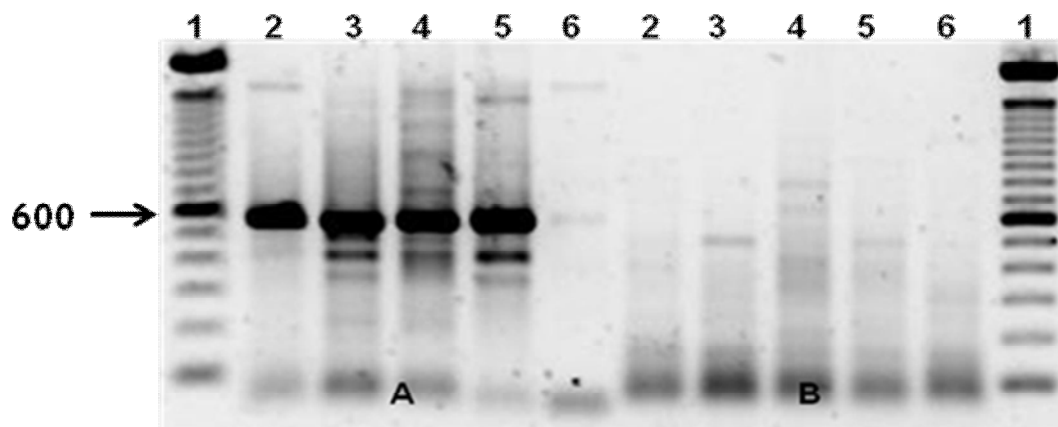


Figura 14: Gel de agarose 1% com a população de *A. sp. 1* de Serra Negra. **(A)** *primer wsp A*. **(B)** *primer wsp B*. 1: *Ladder* 100bp; 2 a 6: indivíduos *A. sp.1*.

5.4. Análises das sequências

Os fragmentos gerados com a utilização do *primer wsp A* nas 74 amostras de *Anastrepha* foram clonados, sequenciados e submetidos ao *GeneBank*, o que permitiu confirmar a correspondência destes fragmentos como sendo de *Wolbachia*. Além disso, estes resultados foram utilizados para avaliar os polimorfismos das diferentes sequências de DNA amplificadas nas populações estudadas.

Seis sequências apresentaram baixa homologia com o genoma da *Wolbachia* devido o cromatograma ter apresentado uma grande quantidade de picos sobrepostos, dificultando a análise dos dados. Estes resultados persistiram mesmo após diferentes alterações nos protocolos de PCR, clonagem e sequenciamento.

5.4.1. Amplificação de sequências não relacionadas ao gene *wsp*

Os fragmentos gerados com o *primer wsp* das 68 amostras foram comparados no banco de dados NCBI, e observou-se que seis destas sequências não foram homologas ao gene *wsp*.

Das seis sequências, três obtidas de indivíduos da população Jacareí e duas da população de Caraguatatuba das moscas da espécie *A. sp. 3*, apresentaram similaridade com sequências de transposon tipo *mariner* de *Bactrocera tryoni*, acesso AF349132. Uma amostra da população Caraguatatuba (*A. sp. 2*) teve similaridade com sequência de transposon tipo *mariner* em *Ceratitis rosa*, com acesso AY426626 (tabela 6).

Tabela 6: Indivíduos que tiveram similaridade com outra sequência que não o gene *wsp* de *Wolbachia*.

População	Espécie	N. ind.	Supergrupo*	Similaridade	Acesso
Jacareí	<i>A. sp. 1</i>	3	A	Transposon <i>mariner</i> de <i>Bactrocera tryoni</i>	AF349132
Caraguatatuba	<i>A. sp. 2</i>	1	A	Transposon <i>mariner</i> de <i>Ceratitis rosa</i>	AY426626
	<i>A. sp. 3</i>	2	A	Transposon <i>mariner</i> de <i>Bactrocera tryoni</i>	AF349132

N.: número, ind.: indivíduos, *: Referente a análises realizadas via PCR.

5.4.2. Análise das diferentes populações de *Anastrepha* quanto as linhagens de *Wolbachia* detectadas

Na tabela 7 estão representadas as diferentes linhagens de *Wolbachia* encontrada nas populações estudadas.

Tabela 7: Linhagens de *Wolbachia* detectadas nas diferentes populações de *Anastrepha*.

População	Espécie	Linhagem	ACESSO	Similaridade	Total
Jacareí	A. sp. 1	<i>B. pahangi</i> (Bp-1-1001)	AY527208.1	96%	100%
Serra Negra	A. sp. 1	<i>B. pahangi</i> (Bp-1-1001)	AY527208.1	96%	21,05%
		A. sp. 2 (<i>wAsp2B</i>)	EU116316.1	99%	78,95%
Caraguatatuba	A. sp. 2,	<i>B. pahangi</i> (Bp-1-1001)	AY527208.1	96%	61,1%
	A. sp. 3	A. sp. 2 (<i>wAsp2B</i>)	EU116316.1	98%	38,9%

De 10 indivíduos, sete (70%) das sequências geradas a partir das bactérias encontradas nas moscas da população de Jacareí, apresentaram similaridade com uma única linhagem da bactéria presente no hospedeiro nematóide *Brugia pahangi* (Bp-1-1001) (tabela 7 e figura 15), e 30% apresentaram altos valores de similaridade com elementos transponíveis

A população de Serra Negra apresentou duas diferentes linhagens de *Wolbachia* (tabela 7). Destas, 78,95% apresentaram similaridade de 99% com *Wolbachia* encontradas em *Anastrepha* sp. 2 (*wAsp2B*), e 21,05% apresentaram similaridade de 96% com *Wolbachia* de *Brugia pahangi* (Bp-1-1001).

A população de Caraguatatuba apresentou duas linhagens de *Wolbachia*, uma pertencente a *Brugia pahangi* (Bp-1-1001) e outra a A. sp. 2 (*wAsp2B*), com valores de similaridade 96% e 98%, respectivamente (tabela 7).

As amostras estudadas apresentaram maior grau de infecção com a linhagem de *Wolbachia* Bp-1-1001, e 46% das amostras apresentaram linhagem de *Wolbachia wAsp2B* (figura 15).

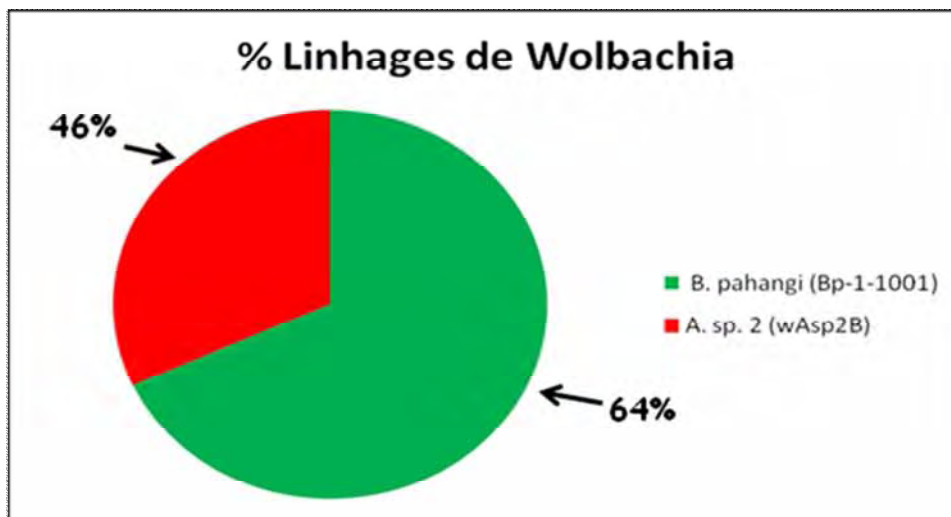


Figura 15: Linhagens de *Wolbachia* detectadas nas populações de *Anastrepha*.

5.5. Análises das sequências das *Wolbachia* encontradas nas Populações de mosca-das-frutas do gênero *Anastrepha*

Os dados apresentados foram realizados com 62 amostras, uma vez que foram excluídas 12 amostras referentes as sequências de baixa qualidade para análise, e sequências que apresentaram homologia com transposon.

As análises de distância genética foram realizadas no *software* MEGA ver. 4.0.2 utilizando como parâmetro o algoritmo de Kimura (Kimura 2-parâmetros), que considera a ocorrência de transições e transversões, dando pesos diferentes para estas duas modificações. Para a construção dos dendograma foi utilizado o método de NJ.

O *software* DnaSP ver. 5.00.05 foi utilizado para se estimar o número de haplótipos encontrados (h), diversidade haplotípica (Hd), a taxa de diversidade de nucleotídeos (Pi) e a diversidade de nucleotídeos de acordo com as substituições sinônimas (SS) através das análises inter e intrapopulacionais demonstradas a seguir.

5.5.1. Análises Intrapopulacionais

Com as comparações realizadas entre as sequências da *Wolbachia* encontradas nas populações de *Anastrepha*, pode-se observar como estavam distribuídos as linhagens de *Wolbachia* em cada população.

A população de Jacareí teve média dos valores de distância de 0, 298 (figura 16), e o indivíduo JAsp1-4 apresentou menor similaridade com as sequências desta população.

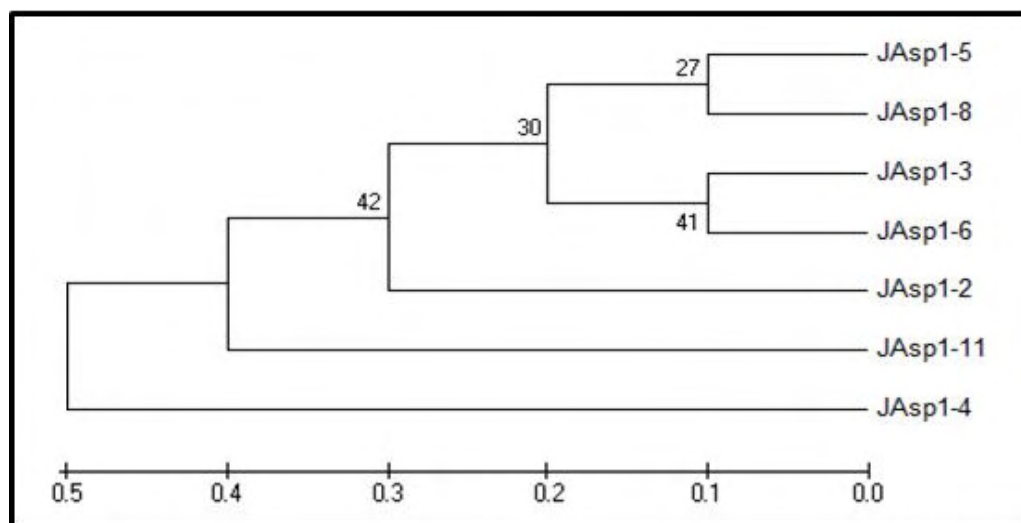


Figura 16: Árvore obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 10000 repetições, baseada no gene *wsp*, demonstrando a distância entre as *Wolbachia* da população de Jacareí (A. sp. 1-2, 3, 4, 5, 6, 8 e 11). Os valores de *bootstrap* são indicados antes de cada nó.

A população de Serra Negra já havia sido diagnosticada com as duas linhagens de *Wolbachia*. As análises com o método de Kimura detectaram altos valores de distância (média de 0, 895), visto que as sequências são distintas entre si. Na figura 17 pode-se observar a formação de dois grupos, um no ramo inferior com quatro indivíduos infectados com a linhagem de *Wolbachia* de nematóide (Bp-1-1001) (identificados como "Bru"), e outro no ramo superior com a linhagem de *Wolbachia* de A. sp. 2 (*wAsp2B*) (indicados por "Mos").

Ao analisar a subpopulação “Bru” foi encontrado altos valores de distância relacionados ao indivíduo Asp1-10, os outros indivíduos apresentaram alta similaridade de 99%. Já no subgrupo “Mos” houve homologia das sequências de 50,5%, isto se deve ao fato da formação de dois grupos, um no ramo superior com similaridade de 99,3% e distância média de 0,007, e outro no ramo inferior com similaridade de 99,7% e distância média de 0,003 (figura 17).

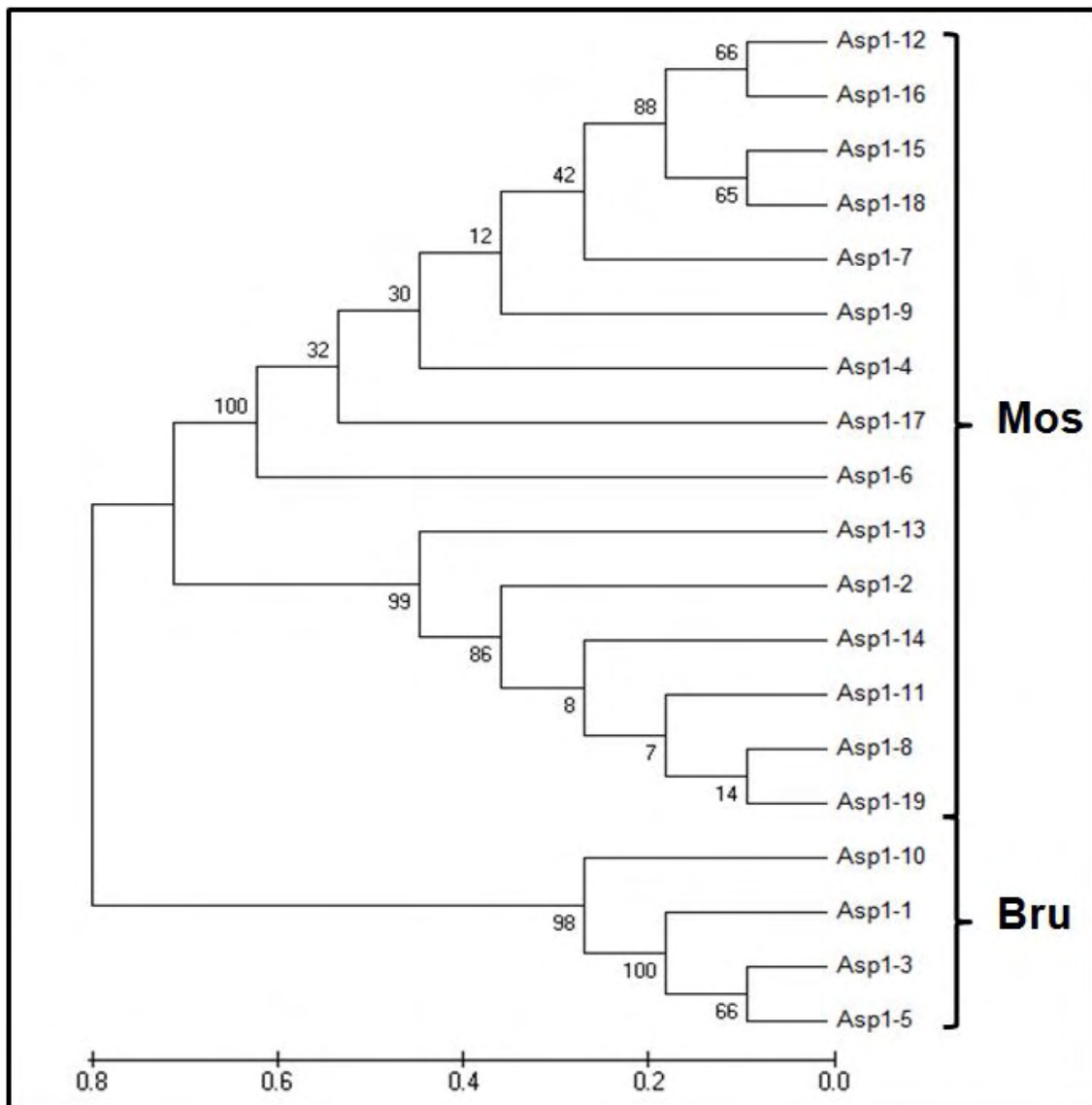


Figura 17: Árvore obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 10000 repetições, baseada no gene *wsp*, demonstrando a distância entre as *Wolbachia* da população de Serra Negra (A. sp. 1- 1 a 19). “Mos”: grupo ramos superior; “Bru”: grupo ramo inferior. Os valores de *bootstrap* são indicados antes de cada nó.

Na figura 18 observa-se que na população de Caraguatatuba formaram-se dois grupos distintos. Um no ramo superior, em que se observou íntima relação entre os indivíduos infectados com linhagem de *Wolbachia* de nematóide (Bp-1-1001) (indicado como "Nem"), e no ramo inferior há um grupo formado com as sequências das *Wolbachia* com a linhagem de *A. sp.2* (*wAsp2B*) (indicados como "Fly").

Na subpopulação "Nem" a similaridade das sequências foi de 63,2%, com distância entre a linhagem de *Wolbachia* encontrada de 0,368, estes valores estão relacionados as ramificações observadas na figura 18, que se formaram devido a diferença entre as sequências das linhagens de *Wolbachia* de nematóide. Os indivíduos do ramo superior apresentaram distância média de 0,014, com similaridade de 98,6%, e na outra bifurcação a similaridade foi de 98,4% com distância média de 0,016.

Na subpopulação "Fly" a similaridade foi de 72%, com distância média de 0,280, e do mesmo modo que a subpopulação "Nem", foram observadas ramificações conforme o tipo de sequência encontrada na linhagem *Wolbachia* referente a mosca (*wAsp2B*). Entre os indivíduos Asp3-18 e 19 houve similaridade de 99%, com distância média de 0,010, já no ramo inferior a similaridade teve valores correspondentes a 100%.

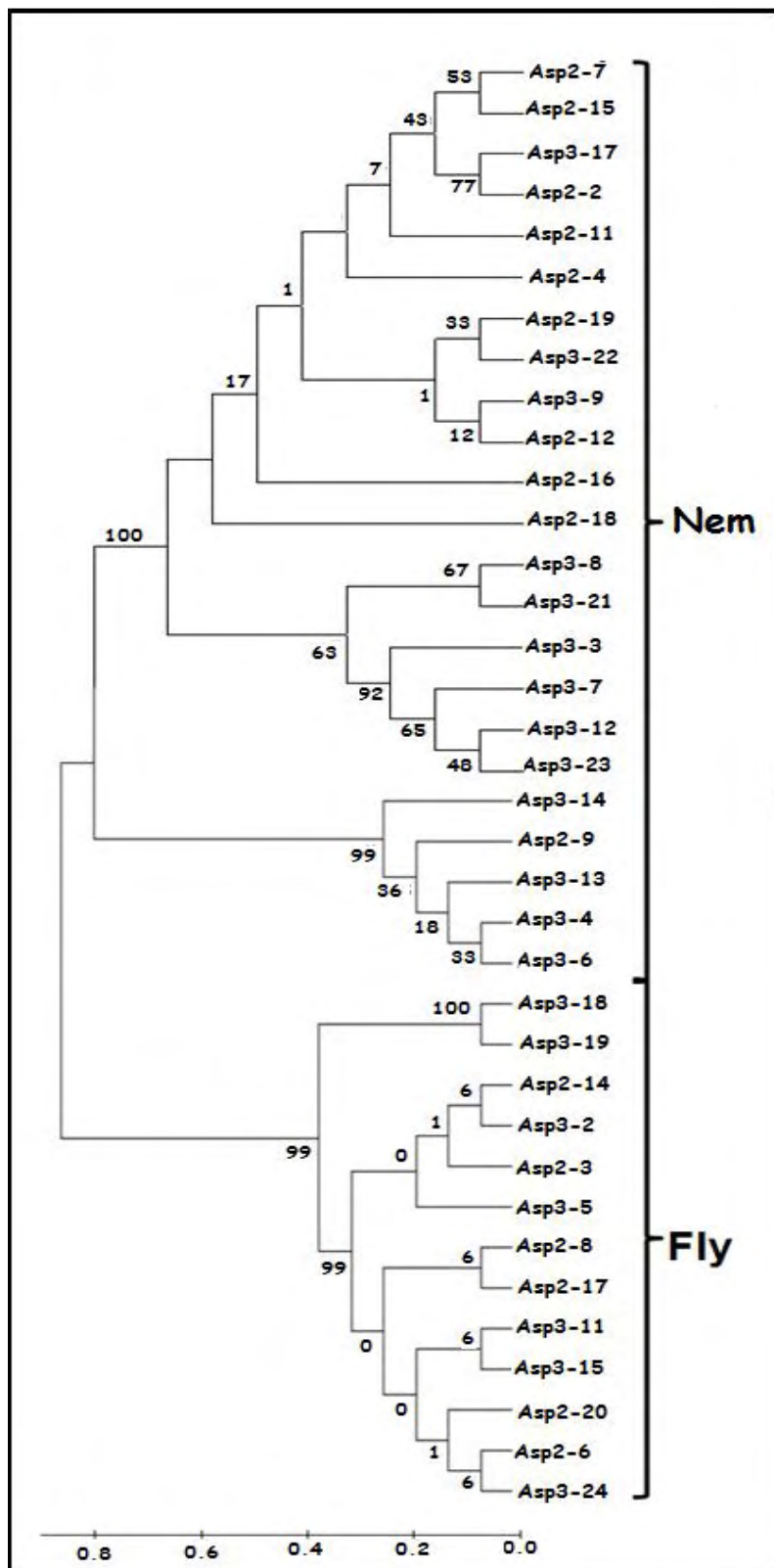


Figura 18: Árvore obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 10000 repetições, baseada no gene *wsp*, demonstrando a distância entre as *Wolbachia* da população de Caraguatatuba (*A. sp. 2* e *A. sp. 3*). "Nem": grupo do ramo superior; "Fly": grupo do ramo inferior. Os valores de *bootstrap* são indicados antes de cada nó.

Através das análises intrapopulacionais, observou-se que as populações de Serra Negra e Caraguatatuba apresentaram altos níveis de diversidade de nucleotídeos (Pi) e de substituições sinônimas (SS) entre as sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* analisadas (tabela 8). Cada uma destas populações é constituída por duas linhagens diferentes de *Wolbachia* (*wAsp2B* e *Bp-1-1001*), o que aumenta sua diferença conforme Pi e SS. Ao avaliar suas subpopulações houve destaque de uma em cada população, a “Mos” e a “Nem”.

Os valores de Pi e de SS observados foram semelhantes, com exceção da população de Serra Negra e de Caraguatatuba, devido as diferentes linhagens de *Wolbachia* existentes nestas populações (tabela 8). Estes valores serão melhores explorados ao se analisar os diferentes padrões de sequências referentes as linhagens de *Wolbachia* encontradas.

Tabela 8: Valores de diferenciação genética calculados através do programa DnaSP Ver.5.00.05.

	Jacaré	Serra Negra	“Bru”	“Mos”	Caraguatatuba	“Nem”	“Fly”
Diversidade de nucleotídeos (Pi)	0,165	0,418	0,278	0,281	0,413	0,203	0,153
Diversidade de nucleotídeos(Pi) conforme SS	0,168	0,464	0,291	0,330	0,450	0,207	0,179

5.5.2. Análises Interpopulacionais

As análises a seguir foram realizadas através de comparações das populações estudadas.

A partir da comparação das sequências de *Wolbachia* das populações, foi construído um dendograma representado na figura 19, e formaram-se dois grupos distintos com altos valores de distância entre estes. Estes grupos organizaram-se conforme a linhagem da *Wolbachia*, um observado no ramo

superior, constituído somente por moscas que apresentaram a mesma linhagem de *Wolbachia* Bp-1-1001 (nematóide) (indicado por "Bgi"). O segundo grupo, no ramo inferior (indicado por "Asp"), foi composto por linhagens de *Wolbachia* pertencentes *A. sp. 2* (wAsp2B). As médias das distâncias dentro dos grupos "Bgi" e "Asp" foram de 0,348 e 0,493 respectivamente.

Além disso, observou-se que toda a população de Jacareí está agrupada em "Bgi", juntamente com as outras linhagens de *Wolbachia* referente a *B. pahangi* (Bp-1-1001) das populações de Serra Negra e Caraguatatuba. Com isso, o grupo "Asp" foi constituído pelas populações de Serra Negra e Caraguatatuba.

O subgrupo "Bgi" formou dois ramos, o inferior teve 98,5% de similaridade; o indivíduo Asp3-13 apresentou as maiores distâncias de 0,014 a 0,019. A bifurcação superior apresentou distância média de 0,014, com similaridade de 98,6%. Portanto, ao se subdividir o grupo "Bgi" e analisá-lo conforme as divisões observadas a similaridade foi maior que a apresentada no grupo maior, que foi de 65,2%.

A similaridade observada no grupo "Asp" foi de 50,8%, e também houve distribuição em dois grupos como em "Bgi" (figura 19). No ramo inferior a similaridade foi de 99,4%, sendo que os indivíduos reunidos na parte superior deste agrupamento foram idênticos entre si, assim como os indivíduos Asp1-2, 8, 11, 14 e 19. Dentro deste mesmo subgrupo, o indivíduo Asp1-13 apresentou os maiores valores de distâncias médias de 0,003 a 0,014 comparado com os outros indivíduos.

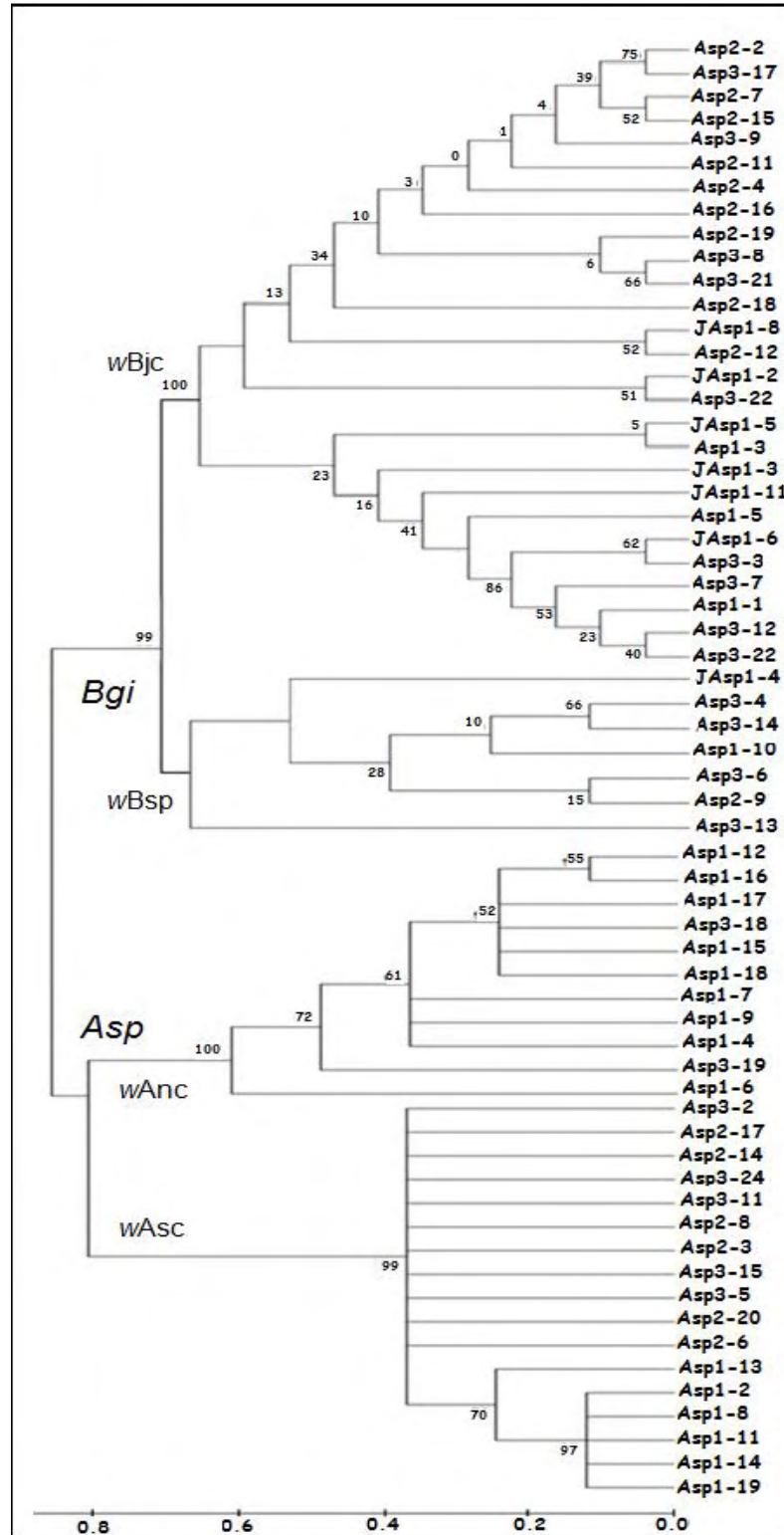


Figura 19: Árvore obtida a partir do método NJ com *bootstrap* de 10000 repetições, baseada no gene *wsp*, demonstrando a distância entre as populações de moscas contendo *Wolbachia*. Jacareí: JAsp1; Serra Negra: Asp1; Caraguatatuba: Asp2 e Asp 3; “Asp”: subgrupo superior; “Bgi”: subgrupo inferior, *wBjc*, *wBsp*, *wAnc* e *wAsc*: agrupamentos que deram origem as novas linhagens. Os valores de *bootstrap* são indicados antes de cada nó.

Na tabela 9 estão indicadas as taxas de diversidade de nucleotídeos (Pi) das sequências do gene *wsp* de *Wolbachia*, ao se comparar as populações estudadas. Os valores de Pi entre Jacaréi e Caraguatatuba foram menores comparando-se Jacaréi e Caraguatatuba a Serra Negra, demonstrando as sequências mais similares.

Tabela 9: Taxa diversidade de nucleotídeos (Pi) das sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* ao se comparar as diferentes populações de moscas-das-frutas.

	Jacaréi	"Bru"	"Mos"	"Nem"	"Fly"	Serra Negra	Caraguatatuba
Jacaréi	-	0,187	0,448	0,190	0,397	0,462	0,389
Bru	0,187	-	0,418	0,204	0,352	-	0,403
Mos	0,448	0,418	-	0,442	0,272	-	0,456
Nem	0,190	0,204	0,442	-	0,413	0,431	-
Fly	0,397	0,352	0,272	0,413	-	0,358	-

5.5.3. Análises das Sequências conforme a linhagem de *Wolbachia*

Ao comparar as duas linhagens de *Wolbachia* das três populações de *Anastrepha* foi observado um total de 42 haplótipos com altas taxas de diversidade haplotípica (tabela 4). Estas linhagens de *Wolbachia* encontradas apresentaram dois tipos de sequências para cada uma, o que gerou altas taxas de diversidade, e a partir disso, foram realizadas análises conforme o tipo de sequência.

5.5.3.1. Análises da Linhagem de *Wolbachia* caracterizada como *Wolbachia* de *A. sp. 2* (*wAsp2B*)

Dois tipos de sequências foram encontrados na linhagem de *Wolbachia* caracterizada como de *A. sp. 2* (*wAsp2B*), as quais foram denominadas *wAsc* e *wAnc*.

A linhagem *wAsc* foi correspondente aos indivíduos encontrados no ramo inferior do grupo “Asp”, e *wAnc* a ramificação superior do grupo “Asp” (figura 19). Ambas as linhagens apresentaram grande similaridade das suas sequências ao serem avaliados separadamente, conforme já observado.

Ao observar uma frequência relativa maior que 1,00% de uma sequência com diferentes mutações, pode-se considerar diferentes haplótipos nas linhagens de *Wolbachia* encontradas.

Um total de três haplótipos foram encontrados na linhagem *wAsc*, e baixo valor P_i (tabela 10). Além disso, foram identificadas duas substituições sinônimas (SS) e seis substituições não sinônimas (NSS) (tabela 11), sendo que os indivíduos que possuíram maior número de mutações foram Asp1-2, 8, 11, 14, 19, pertencentes população de Jacareí.

Tabela 10: Média dos valores de diversidade genética calculados através do programa DnaSP Ver.5.00.05.

	<i>wAsc</i>	<i>wAnc</i>	<i>wBsp</i>	<i>wBjc</i>
Nºde haplótipos (h)	3	8	7	25
Diversidade Haplótipica (Hd)	0,522	0,945	1	0,994
Diversidade de nucleotídeos (Pi)	0,006	0,007	0,014	0,013
Diversidade de Nucleotídeos (Pi) conforme SS	0,008	0,012	0,025	0,017

Tabela 11: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem *wAsc*.

Haplótipos										Total de Indivíduos	FR*
1	A	C	A	G	A	T	G	A		11	64,7%
2	G	T	G	A	C	A	A	T		5	29,4%
3	.	T	G		1	5,9%
Posição dos sítios variáveis	55	165	255	281	286	292	296	316			

*FR: Frequência relativa dos haplótipos observados na linhagem indicada.

A linhagem *wAnc* apresentou oito tipos de haplótipos e valor de Pi semelhante a *wAsc* (tabela 10), gerando um total de quatro SS e oito NSS (tabela 12), e os indivíduos que apresentaram maior número de substituições foram Asp1-12 e 16.

Tabela 12: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem *wAnc*.

Haplótipos												Total de Indivíduos	FR*
1	A	A	A	C	T	T	T	C	T	A	T	1	9%
2	G	C	T	A	G	C	1	9%
3	.	T	C	T	C	1	9%
4	G	.	C	T	A	.	C	2	18,3%
5	A	C	T	A	.	C	2	18,3%
6	C	T	A	G	C	1	9%
7	G	C	1	9%
8	C	2	18,3%
Posição dos sítios variáveis	153	167	202	203	218	263	282	283	290	516	523		

*FR: Frequência relativa dos haplótipos observados na linhagem indicada.

Na tabela 13 podem ser observadas a quantidade de posições de sítios variáveis comparando-as as regiões hipervariáveis (HVRs), propostas por Baldo et al. (2005) nas linhagens *wAsc* e *wAnc*. Somente a linhagem *wAnc* apresentou maior similaridade entre as suas posições de sítios variáveis e as HVRs (figura 20B), e três mutações não se encontravam nas regiões analisadas (263, 282 e 283), assim como em *wAsc* (255, 281 e 286).

Tabela 13: Posições de sítios variáveis nas linhagens de *Wolbachia* conforme as HVRs propostas por Baldo et al. (2005).

HVRs	N. de posições de sítios variáveis nas Linhagens <i>Wolbachia</i>			
	wAsc	wAnc	wBjc	wBsp
HVR I (0 - 90 bp)	1	-	12	4
HVR II (150 - 225 bp)	1	5	11	6
HVR III (300 - 375 bp)	3	1	9	5
HVR IV (450 - 540 bp)	-	2	12	11

HVRs: Regiões hipervariáveis; N.: número

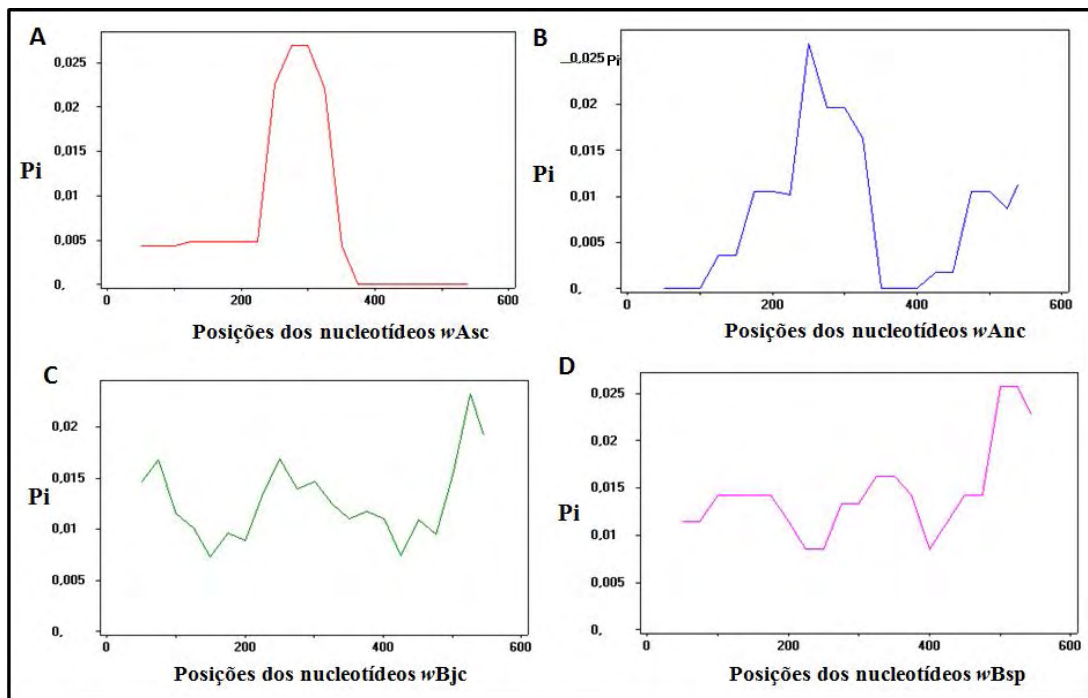


Figura 20: Diversidade de nucleotídeos (Pi) conforme as posições dos nucleotídeos nas diferentes linhagens de *Wolbachia*. **(A)** Pi conforme posição dos nucleotídeos em wAsc. **(B)** Pi conforme posição dos nucleotídeos em wAnc. **(C)** Pi conforme posição dos nucleotídeos em wBjc. **(D)** Pi conforme posição dos nucleotídeos em wBsp.

5.5.3.2. Análises da Linhagem de *Wolbachia* caracterizada como de *B. pahangi* (Bp-1-1001)

As sequências referentes ao gene *wsp* homólogas a linhagem de *Wolbachia* encontrada no nematóide *B. pahangi* (Bp-1-1001) apresentaram dois tipos de sequências diferentes, e foram denominadas *wBsp* e *wBjc*.

A linhagem *wBsp* representa os indivíduos da ramificação inferior do grupo de "Bgi", e *wBjc* os indivíduos do ramo superior do grupo "Bgi" (figura 19). Estas linhagens foram analisadas separadamente anteriormente e apresentaram grande similaridade nas suas sequências.

Observou-se 25 haplótipos em *wBjc* e sete em *wBsp*, porém os valores de Π foram semelhantes entre as duas linhagens (tabela 10). Em *wBsp* observou-se 22 NSS e sete SS representadas no tabela 14, conforme distribuição nos respectivos haplótipos. Já em *wBjc* apresentou 23 SS e grande número de NSS (tabela 15).

As análises comparativas das posições de sítios variáveis das linhagens de *Wolbachia wBsp* e *wBjc* e as HVRs, apresentaram maior quantidade de mutações (tabela 13 e figura 20C e D). Três mutações da linhagem *wBsp* (247, 398 e 421) e 21 mutações da linhagem *wBjc* (111, 116, 134, 241, 252, 254, 260, 264, 266, 271, 273, 276, 278, 281, 391, 395, 397, 404, 405, 411, 428), não se encontraram nas regiões hipervariáveis analisadas.

Tabela 14: Posições de sítios polimórficos e total de indivíduos com estes polimorfismos na linhagem wBsp.

	Haplótipos							Total de Indivíduos	FR*
	G	T	T	C	A	G	A		
1	14,3%
2	.	.	C	14,3%
3	C	.	G	14,3%
4	.	C	.	T	14,3%
5	T	.	.	.	C	.	.	.	14,3%
6	G	14,3%
7	G	.	14,3%
Posição dos sítios variáveis	486	494	512	537	539	544	547	552	561

*FR: Frequência relativa dos haplótipos observados na linhagem indicada.

Continuação

6. Discussão

Este trabalho detectou a infecção por *Wolbachia* em todas as amostras de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*. Resultados semelhantes foram observados com diferentes espécies de *Anastrepha* procedentes de diversas regiões do Brasil por Coscrato et al. (2009). No trabalho de Mascarenhas (2007) foram observadas também altas taxas de infecção por *Wolbachia* em moscas do gênero *Anastrepha*, representando 83% dos insetos avaliados. Werren et al. (1995b) demonstraram que dentre oito ordens estudadas, os dípteros estão entre os grupos com maior grau de infecção com *Wolbachia*.

Kittayapong et al. (2000), ao detectarem um menor número de moscas-das-frutas infectadas por *Wolbachia* sugerem alguns fatores que podem estar influenciando esta baixa infecção. Estes fatores podem ser explicados pela transferência vertical, que pode não estar ocorrendo eficientemente, pela ocorrência de combate natural a bactéria, queda na adaptação dos indivíduos com *Wolbachia* comparada aos não infectados, e migração por longas distâncias do hospedeiro que não colaboram com a manutenção da bactéria no organismo.

A identificação da *Wolbachia* foi realizada através dos *primers* 16S rDNA, *ftsZ* e *wsp* para se diagnosticar esta bactéria de forma precisa quanto a sua presença nas *Anastrepha*. Os oligonucleotídeos 16S rDNA e *wsp* tem sido demonstrados como os mais sensíveis na detecção da *Wolbachia* em moscas-das-frutas (Kittayapong et al, 2000; Jamnongluk et al, 2002; Riegler e Staufer 2002; Sun et al, 2004; Rocha et al, 2005; Coscrato, 2006), diferentemente do *primer* *ftsZ*, que apresentou problemas de baixa sensibilidade, gerando falsos negativos (Werren e Windsor, 2000; Jeyaprakash e Hoy, 2000; Hong et al, 2002).

Inicialmente, o *primer* *ftsZ* foi descrito por Werren e colaboradores (1995a e b), como um marcador para ser utilizado nos estudos de transferência horizontal, para esclarecer as possíveis alterações reprodutivas que poderiam ser causadas pela presença da *Wolbachia*, permitindo assim, classificar a que

supergrupo a bactéria pertence sem haver necessidade da combinação de *primers*. A utilização deste *primer* nas três populações de moscas-das-frutas não foi eficiente na detecção da *Wolbachia*, mesmo ao otimizar os protocolos de PCR a partir de algumas sugestões observadas.

Jeyaprakash e Hoy (2000) trabalhando com diversas espécies de artrópodes propuseram que o DNA presente na reação interferiria na atividade da DNA *Taq polimerase*, criando falsos negativos. Porém, ao se realizar alterações conforme protocolo VII, um valor de 44,90% das amostras de moscas-das-frutas foram detectadas com *Wolbachia*, e esta alteração apresentou uma baixa repetição dos dados ao se utilizar a mesma amostra com igual protocolo. Werren e Windsor (2000), e Cheng et al. (2000) sugeriram que a baixa qualidade de DNA seria um dos problemas para o anelamento do *primer ftsZ*, contudo ao se utilizar DNA fresco, somente 20,16% das amostras foram detectadas com *Wolbachia*, diferentemente do observado ao utilizar o mesmo DNA com os genes 16S rDNA e *wsp*.

A partir dos resultados observados com as alterações nos protocolos de extração e amplificação de DNA para utilização do *primer ftsZ*, fica evidente sua baixa eficiência em anelar nas regiões descritas, ocorrendo a necessidade de redesenhá-lo para que possa ser utilizado na avaliação da presença da *Wolbachia* em *Anastrepha*.

A caracterização dos supergrupos da bactéria *Wolbachia* encontrada nas diferentes populações de *Anastrepha* com diferentes conjuntos de *primers* utilizados, detectou a infecção em todas as moscas estudadas pelo supergrupo A. Esta grande frequência de bactéria do supergrupo A está de acordo com estudos realizados em *Anastrepha* por Coscrato et al. (2009) e Mascarenhas (2007), além do que já têm sido relatado em diferentes artrópodes (Werren et al., 1995a; West et al., 1998; Shoemaker et al., 2002).

Com a utilização do *primer wsp B*, foram identificados alguns indivíduos pertencentes ao supergrupo B da *Wolbachia*, porém com a utilização dos *primers* 16S B rDNA e *ftsZ B* não foi detectado nenhum indivíduo pertencente a este supergrupo. Os fragmentos gerados a partir do oligonucleotídeo *wsp B* possuem uma região homologa ao gene *wsp A*, levando a uma reação cruzada. Kittayapong e colaboradores (2000) relataram o mesmo mecanismo de reação cruzada ao empregar o gene *wsp B* em mosquitos da Tailândia, pela homologia de sua sequência com linhagens de *Wolbachia* detectadas pertencentes ao supergrupo A.

Para se estudar a diversidade entre as *Wolbachia* encontradas nas populações de *Anastrepha* se faz necessário a utilização de marcadores os mais variáveis possíveis. Com isso, somente o *primer wsp* foi empregado nestas análises, visto que é caracterizado como o mais variável para os estudos de diversidade da bactéria (Braig et al., 1998; Sun et al., 2007).

Neste trabalho, também foram detectados segmentos de gene relacionados a elementos transponíveis e, Braig et al. (1998), ao descreverem o gene *wsp*, demonstraram que este amplifica uma proteína de membrana externa, que é exclusivo da bactéria *Wolbachia*. Isto corrobora com o trabalho de Wu et al. (2004) que ao caracterizarem a linhagem *wMel* de *Wolbachia* encontrada em *Drosophila melanogaster*, demonstraram altas taxas de elementos repetitivos e móveis no genoma, o que tem sido frequentemente relacionado ao supergrupos A e B de bactéria (Bordenstein e Reznikoff, 2005).

Com a detecção dos transposons do tipo *mariner* nas linhagens de *Wolbachia* que infectaram as moscas das espécies *A. sp. 1*, *A. sp. 2* e *A. sp. 3*, das populações de Jacareí e Caraguatatuba, pode-se sugerir que há troca de fragmentos de DNA entre a *Wolbachia* e os insetos. O primeiro relato de caso similar foi observado por Masui et al. (1999), ao diagnosticarem em uma linhagem de *Wolbachia* a presença de sequência inserida na região do gene *groEL*, com

isso, esta bactéria passou a ser considerada um meio de transferência dos elementos transponíveis.

Em 46% das amostras infectadas pela linhagem de *Wolbachia* caracterizada como linhagem de *A. sp. 2* (*wAsp2B* - EU116316.1), apresentaram 9,3% de transmissão vertical da bactéria entre as moscas da espécie *A. sp. 2* (Caraguatatuba-SP). Ao identificar esta linhagem da *Wolbachia* nas outras espécies de moscas, sugere-se a ocorrência de transferência horizontal, o que pode ser explicado por estes organismos ocuparem o mesmo habitat, apresentando também o mesmo local de alimentação e ovoposição, como proposto por Selivon (2003).

A maior taxa de infecção da *Wolbachia* nas populações de *Anastrepha* foi relacionada a linhagem da bactéria caracterizada como pertencente ao nematóide *Brugia pahangi* (Bp-1-1001 - AY527208.1). A ocorrência desta linhagem de *Wolbachia* pode ter ocorrido através da transferência horizontal entre táxons distintos, devido às interações com outros hospedeiros, parasitas (vetores) e predadores (Baldo et al., 2008). Este é o primeiro relato de linhagens de *Wolbachia* de nematóide em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*.

A ocorrência desta linhagem de *Wolbachia* nas *Anastrepha* pode estar ocorrendo por meio de vespas das famílias Braconidae, Figitidae (Eucolinae) e Pteromalidae que são parasitas principalmente das larvas de Coleoptera, Diptera, e Lepidoptera (Canal e Zuchi, 2000; Guimarães et al., 2000 apud Mascarenhas, 2007). Em trabalho realizado com vespas da família Braconidae em território brasileiro por Mascarenhas (2007), detectou-se que 83% destas estavam infectadas por *Wolbachia*.

Estes parasitóides apresentam hábito de vida que os tornam candidatos a vetores de linhagens de *Wolbachia* na transmissão entre táxons (Werren et al., 1995b). A contaminação do parasitóide ocorreria ao ingerirem

tecido do hospedeiro contaminado, ou pela transmissão das bactérias contidas nos ovos dos parasitóides ao serem depositados junto aos ovos do hospedeiro (West et al., 1998; Courdaux et al., 2001).

Outros estudos já indicaram através de análises filogenéticas similaridades entre as *Wolbachia* encontradas em alguns nematóides patogênicos e artrópodes, e sugeriram que seria um evento recente de transferência horizontal entre táxons diferentes (Hoerauf et al.; 1999). Em trabalhos recentes foi observada a expansão do supergrupo F, que até então era caracterizado como de nematóides, mas foi encontrado em diferentes artrópodes (Casiraghi et al, 2005; Panaram e Marshall, 2007).

Nas avaliações realizadas sobre a diversidade das seqüências das linhagens de *Wolbachia* encontradas em cada população de *Anastrepha*, observaram-se baixos valores de distância dentro da população de Jacaréí (16,5%), visto que esta população somente apresentou uma única linhagem de *Wolbachia*, além dos transposons identificados. Contudo, as populações de moscas de Serra Negra e Caraguatatuba apresentaram duas linhagens diferentes de *Wolbachia*, com maior grau de diversidade (maior que 40%). Estas populações foram subdivididas conforme as linhagens de *Wolbachia*, e apresentaram valores de divergência nas seqüências de 15% a 28%. Sun et al. (2007) ao avaliar as linhagens de *Wolbachia* em populações de moscas do gênero *Bactrocera*, encontraram linhagens da bactéria diferentes para cada população, e observaram divergência de nucleotídeos com valores maior que 23% e menor que 1%, conforme a população analisada, e indicaram a existência de uma linhagem para cada população.

Ao comparar todas as seqüências das diferentes linhagens de *Wolbachia*, encontradas nas populações de *Anastrepha* (figura 20), dois grupos foram formados em ramos diferentes do dendrograma, distribuídos conforme a

linhagem de *Wolbachia* identificada. Similarmente, no trabalho de Michel-Salzat et al. (2001), ao compararem as relações do hospedeiro com a bactéria, observaram que os grupos de *Wolbachia* não estão intimamente relacionados a um hospedeiro de uma dada população.

Além destes dados, as análises do dendrograma da figura 20, indicaram a formação em cada ramo ("Bgi" e "Asp") de duas bifurcações que corresponderam ao agrupamento de indivíduos com um mesmo do tipo de sequência, apresentando altas taxas de similaridade, maior que 98%. Assim, foram identificadas quatro novas linhagens da *Wolbachia*, denominadas *wAsc* e *wAnc*, *wBsp* e *wBjc*. Semelhantemente, Michel-Salzat et al. (2001) ao comparar *Wolbachia* de diferentes populações do crustáceo *Porcellionides*, encontraram graus de divergência de 0,3% a 20,6%, a partir destes dados, identificaram quatro diferentes sequências correspondentes a três populações. Do mesmo modo, Riegler e Stauffer (2002), detectaram duas diferentes sequências a partir de uma mesma linhagem de *Wolbachia* identificada em *Rhagoletis cerasi*.

As diferentes linhagens de *Wolbachia* identificadas neste trabalho apresentaram graus de diversidade de nucleotídeos (Pi) de 6% a 14%. A linhagem *wAsc* foi a mais similar de todas entre si, possuindo oito posições com mutações, e a linhagem *wBjc* apresentou 73 posições com variações de nucleotídeos, e estes dados corresponderam a 3 e 25 tipos de haplótipos diferentes para cada linhagem, respectivamente.

As linhagens com maior número de haplótipos (*wBjc* e *wBsp*) apresentaram regiões hipervariáveis semelhantes as propostas por Baldo et al. (2005). Estes pesquisadores caracterizaram o gene *wsp* como sendo um mosaico, identificando quatro regiões hipervariáveis (HVRs). As HVRs apresentam modificações que sugerem ser favoráveis a seleção natural, porém não se conhece como ocorre este mecanismo, apesar de demonstrarem que pode estar

envolvido na resposta imune contra a *Wolbachia*. A partir disso, pode-se sugerir que algumas das linhagens encontradas neste estudo estão sendo favorecidas por mecanismos fisiológicos ainda desconhecidos em seus hospedeiros.

7. Conclusões

- A amplificação dos fragmentos com os genes 16S rDNA e *wsp*, demonstrou a presença de *Wolbachia* em todas as moscas-das-frutas do complexo *fraterculus* das diferentes localidades do estado de São Paulo, sendo todas pertencentes ao supergrupo A.
- O *primer ftsZ* apresentou baixa sensibilidade na detecção de *Wolbachia* em *Anastrepha*. Com isso, sugere-se que sejam construídos novos *primers* a partir do *ftsZ* específicos para a detecção desta bactéria em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*.
- Os oligonucleotídeos mais adequados para a identificação da *Wolbachia* em moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* foram o 16S rDNA e o *wsp*.
- Através de análises comparativas no *GeneBank*, as sequências do gene *wsp* foram similares a duas linhagens de *Wolbachia*. Um total de 46% das linhagens de *Wolbachia* tiveram similaridade com a bactéria encontrada em *Anastrepha* sp. 2, e 54% com *Wolbachia* do nematóide *Brugia pahangi*. Estes dados são indicativos de ter ocorrido transferência horizontal da *Wolbachia* entre táxons distintos.
- As análises de distância genética realizadas entre as sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* nas populações de *Anastrepha* identificaram dois grupos distintos, com diversidade de nucleotídeos de 0, 445 entre eles. O primeiro grupo foi composto pelas *Wolbachias* encontradas em moscas e outro formado pelas bactérias caracterizadas como de nematóide.

- Quatro novas linhagens de *Wolbachia* foram identificadas, e as mesmas foram denominadas como *wAsc* e *wAnc*, *wBsp* e *wBjc*.
- As novas linhagens apresentam diferentes haplótipos, onde *wAsc* e *wAnc* com 3 e 8, respectivamente, e *wBsp* e *wBjc*, com 7 e 25, respectivamente.
- A partir de análises comparativas, pode-se identificar que as linhagens *wBsp* e *wBjc* apresentaram um maior grau de mutações nas regiões hipervariáveis.
- Uma possível troca de fragmentos de DNA entre a *Wolbachia* e o inseto foi constatada com a detecção de sequências similares a transposons do tipo *mariner*.

8. Referências Bibliográficas

ASTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* v. 215, p. 403-410, 1990.

BALDO, L.; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic Nature of the *Wolbachia* Surface Protein. *J. of Bact.* v. 187, n. 15, p. 5406-5418, 2005.

BALDO, L.; HOTOPP, J. C. D.; JOLLEY, K. A.; BORDENSTEIN, S. R.; BIBER, S. A.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H.; CHOUDHURY, R. R.; HAYASHI, C.; MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *App. and Env. Microb.* v. 72, p. 7098-7110, 2006b.

BALDO, L.; AYOUB, N. A.; HAYASHI, C. Y.; RUSSELL, J. A., STAHLHUT, J. K., WERREN, J. H. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Mol. Ecol.* v. 17, p. 557-569, 2008.

BANDI, C., ANDERSON, C.G.; GENCHI, C.; BLAXTER, M. L. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 265, p.2407-2413, 1998.

BANDI, C.; TREES, A. J. AND BRATTIG. N. W. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Vet. Parasitol.* v. 98, p. 215-238, 2001.

BEHBAHANI, A.; DUTTON, T. J.; DAVIES, N.; TOWNSON, H.; SINKINS, S. P. Population differentiation and *Wolbachia* phylogeny in mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. *Med. and Vet. Ent.* v. 19, p. 66-71, 2005.

BRAIG, H R.; ZHOU, W.; DOBSON, S L; O'NEILL S L. Cloning and Characterization of a Gene Encoding the Major Surface Protein of the Bacterial Endosymbiont *Wolbachia pipientis* . *Bacteriol.* v. 180, p. 2373-2378, 1998.

BREEUWER, J. A.J. e WERREN, J.H. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*. v. 346, p. 558-560, 1990

BREEUWER, J. A. J. e JACOBS, G. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. and App. Acar.* v. 20, p. 421-434, 1996.

BORDENSTEIN, S. R.; O'HARA, F. P.; WERREN, J. H. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature*, v. 409, p. 707-710, 2001.

BORDENSTEIN, S. e ROSENGAUS, R. B. Discovery of a Novel *Wolbachia* Supergroup in Isoptera. *Cur. Microb.* v. 51, p. 393-398, 2005.

BORDENSTEIN, S. R. e REZNIKOFF, W. S. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria. *Nat. Rev. Microb.* v. 3, p. 688-699, 2005.

BORDENSTEIN, S. R.; PARASKEVOPOULOS, C; HOTOPP, J. C. D.; SAPOUNTZIS, P. LO, N. BANDI, C.; TETTELIN, H.; WERREN, J. H.; BOURTZIS, K. Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say. *Mol. Biol. Evol.* v. 26, n. 1, p. 231-241, 2009.

BOURTZIS, K. e O'NEILL, S. *Wolbachia* Infections and Arthropod Reproduction Symbiotic Associations Involving Microorganisms. *BioScience*. v. 48, n.4, p. 287-293, 1998.

CALLAINI, G.; RIPARBELLI, M.G. AND DALLAI, R. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *J. Cell. Sci.* v. 107, p. 673-82, 1994.

CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle Biológico p. 113-117 em: "Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil Conhecimento Básico e Aplicado". Malavasi, A. e Zucchi, R. A. 2000. (ed.). Holos, Ribeirão Preto.

CASIRAGHI, M.; BAINB, O.; GUERREROC, R.; MARTINB, C.; POCACQUAA, V.; GARDNERD, S. L.; FRANCESCHIA, A.; BANDIA, C. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *Int. J. for Parasit.* v. 34, p. 191-203, 2004.

CASIRAGHI, M.; BORDENSTEIN, S. R.; BALDO, L.; LO,N.; BENI NATI ,T.; WERNEGREEN, J. J. ; WERREN, J. H.; BANDI, C. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology.* v. 151, p. 4015-4022, 2005.

CHENG, Q.; RUEL, T. D.; ZHOU, W.; MOLOO, S. K.; MAJIWA, P.; O' NEILL, S. L.; AKSOY, S. Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Med. and Vet. Ento.* v. 14, p. 44-50, 2000.

CORDAUX, R., A. MICHEL-SALZAT, AND D. BOUCHON. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J. Evol. Biol.* v. 14, p.237-243, 2001.

COSCRATO, V.E. Detecção e filogenia da bactéria endossimbionte *Wolbachia* em espécies de moscas-das-frutas dos gêneros *Anastrepha* e *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae). Tese de doutorado. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade do Estado de São Paulo, 144 f. 2006.

COSCRATO, V. E.; BRAZ, A. S. K.; PERONDI NI, A. L. P.; SELIVON, D.; MARINO, C. L. 2009. *Wolbachia* in *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Curr. Microbiol.* DOI 10.1007/s00284-009-9433-8.

DEDEINE, F.; VAVRE, F.; FLEURY, F.; LOPPIN, B.; HOCHBERG, M. E.; BOULÉTREAU, M. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 98, p.6247-6252, 2001.

FALLON, A. M. Cytological properties of an *Aedes albopictus* mosquito cell line infected with *Wolbachia* strain wAlbB. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* v. 44, p. 154-161, 2008.

FOSTER, J.; GANATRA, M.; KAMAL, I.; WARE, J.; MAKAROVA, K.; IVANOVA, N.; BHATTACHARYYA, A.; KAPATRAL, V.; KUMAR, S.; POSFAI, J.; VINCZE, T.; INGRAM, J.; MORAN, L.; LAPIDUS, A.; OMELCHENKO, M.; KYRPIDES, N.; GHEDIN, E.; WANG, S.; GOLTSMAN, E.; JOUKOV, V.; OSTROVSKAYA, O.; TSUKERMAN, K.; MAZUR, M.; COMB, D.; KOONIN, E.; SLATKO, B. The *Wolbachia* Genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont Evolution within a Human Pathogenic Nematode. *PLoS. Biol.* v. 3, n. 4, p. 599-614, 2005.

FRYDMAN, H. M.; LI, J.M.; ROBSON, D. N.; WIESCHAUS, E. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature.* v. 441, p. 509-512, 2006.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Gen. Res. Cold Sp. Har.* v.8, p.195-202, 1998.

GOTOH, T., H. NODA, AND X. Y. HONG. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity.* v. 91, p. 208-216, 2003.

HADFIELD, S. J. e AXTON, J. M. Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria. *Nature.* v. 402, p. 482, 1999.

HERTIG, M. e WOLBACH, S.B. Studies on rickettsia-like microorganism in insets. *J. of Med. Res.* v. 44, p. 329-374, 1924.

HILGENBOECKER, K.; HAMMERSTEIN, P.; SCHLATTMANN, P.; TELSCHOW, A.; WERREN, J. H. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett.* v. 281, p. 215-220. 2008.

HIROKI, M.; KATO, Y.; KAMITO, T.; MIURA, K. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften*. v.89, p. 167-170, 2002.

HOERAUF, A.; NISSEN-PÄHLE, K.; SCHMETZ, C.; HENKLE-DÜHRSEN, K.; BLAXTER, M. L.; BÜTTNER, D. W.; GALLIN, M. Y.; AL-QAOUD, K. M.; LUCIUS, R.; FLEISCHER, B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J. Clin. Invest.* v. 103, n. 1, p. 11-18, 1999.

HOERAUF, A.; MAND, S.; VOLKMANN, L.; BÜTTNER, M.; MARFODEBREKYEI, Y.; TAYLOR, M.; ADJEI, O.; BÜTTNER, D. W. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Micro. and Infec.* v. 5, p. 261-273, 2003a.

HOLDEN, P. R.; BROOKFIELD, J. F. Y.; JONES, P. Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol. and Gen.* v.240, p. 213-220, 1993.

HONG, X. Y.; GOTOH, T.; NODA, H. Sensitivity comparison of PCR primers for detecting *Wolbachia* in spider mites. *App. Ent. Zoo.* v.37, n. 3, p. 379-383, 2002.

HOTOPP, J. C. D.; CLARK, M. E.; OLIVEIRA, D. C. S. G.; FOSTER, J. M.; FISCHER, P.; TORRES, M. C. M.; GIEBEL, J. D.; KUMAR, N.; ISHMAEL, N.; WANG, S.; INGRAM, J.; NENE, R. V.; SHEPARD, J.; TOMKINS, J.; RICHARDS, S.; SPIRO, D. J.; GHEDIN, E.; SLATKO, B. E.; TETTELIN, H. AND WERREN, J. H. Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science*. v. 317, p. 1753-1756, 2007.

HUIGENS, M. E.; LUCK, R. F.; KLAASSEN, R. H. G.; MAAS, A.; TIMMERMANS, M.; STOUTHAMER, R. Infections parthenogenesis. *Nature*. v. 405, p. 178-179, 2000.

JACOBSON, J. W.; MEDHORA, M. M.; HARTL, D. L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *PNAS*. v. 83, p. 8684-8688, 1986.

JAMNONGLUK, W., KITTAYAPONG, P.; BAIMAI, V.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. *Curr. Microbiol.* v. 45, p. 255-26, 2002.

JEYAPRAKASH, A. e HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect. Mol. Biol.* v. 9, p. 393-405, 2000.

JIGGINS, F.M; HURST, G.D.; YANG, Z. Host-Symbiont Conflicts: Positive Selection on an Outer Membrane Protein of Parasitic but not Mutualistic Rickettsiaceae. *Mol. Biol. Evol.* v.19, p.1341-1349, 2002.

JOWETT, T. Preparation of Nucleic Acids. In: Roberts D. B. (Ed.) *Drosophila: a practical approach*. Oxford: Press, Oxford. p. 275- 286, 1986.

KIDWELL, M.G. e LISCH, D.R. Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*. v. 55, p. 1-24. 2001.

KITTAYAPONG, P.; MILNE, J. R.; TIGVATTANANONT, S.; BAIMAI, V. Distribution of the Reproduction-modifying Bacteria, *Wolbachia*, in Natural Populations of Tephritid Fruit Flies in Thailand. *Sci. Asia*. v.26, p. 93-103, 2000.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. of Mol. Evol.* v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KONDO, N.; NIKOH, N.; IJICHI, N.; SHIMADA, N.; FUKATSU, T. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *PNAS*. v. 99, p.14280-14285, 2002.

KOSE, H. E KARR, T. L. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. *Mech. Dev.* v.51, p. 275-288, 1995.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. in Bioinf. Ad.* p. 1-8, 2008

LIBRADO, P. e ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LINCOLN, S. R.; MASCARENHAS, R.O.; PERONDI NI, A. L.; SELIVON, D. Ocorrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitits capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neot. Entomol.* v. 34, p. 1013-1015, 2005.

LIU, R.; LI, Z. H.; SUN, X.; SHEN, Z. R. GAO, X. W. First discovery of *Wolbachia* infection of *Bactrocera* (*Zeugodacus*) *tau* (Walker) from China. *Chin. Bull Entomol.* v. 43, p. 368-370, 2006.

LO, N.; CASIRAGHI, M.; SALATI, E.; BAZZOCCHI, C.; BANDI, C. How Many *Wolbachia* Supergroups Exist? *Mol. Biol. Evol.* v. 19(3), p. 341-346, 2002.

LO, N.; PARASKEVOPOULOS, C.; BOURTZIS, K.; O'NEILL, S. L.; WERREN, J. H.; BORDENSTEIN, S. R.; BANDI, C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Inter. J. of Syst. and Evolut. Microb.* v. 57, p. 654-657, 2007.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. p. 93-98 em: "Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado". Malavasi, A. e Zucchi, R. A. 2000. (ed.). Holos, Ribeirão Preto.

MASCARENHAS, R. O. 2007. Endossimbionte *Wolbachia* em moscas-das-frustas do gênero *Anastrepha* (Thephritidae) e em vespas parasitoides (Braconidae) associadas. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

MASUI, S.; KAMODA, S.; SASAKI, T.; ISHIKAWA, H. The First Detection of the Insertion Sequence ISW1 in the Intracellular Reproductive Parasite *Wolbachia*. *Plasmid*. v. 42, p. 13-19, 1999.

MCCLINTOCK, B. The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *PNAS*. v. 36, p. 344-355, 1950.

MEER, M. M. M. V.; WITTEVELDT, J.; STOUTHAMER, R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Ins. Mol. Biol.* v. 8, n.3, p. 399-408, 1999.

MICHEL-SALZAT, A.; CORDAUX, R.; BOUCHON, D. *Wolbachia* diversity in the *Porcellionides pruinosus* complex of species (Crustacea: Oniscidea): evidence for host-dependent patterns of infection. *Heredity*. v. 87, p. 428-434, (2001)

MORAN, N. A. e WERNEGREN, J. J. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends. in Eco. & Evol.* v. 15, 321-326, 2000.

NEGRI, I., PELLECCIA, M., MAZZOGLIO, P. J., PATETTA, A., ALMA, A. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex determination system. *Proc. R. Soc. Lond. B* v. 273, p. 2409-2416, 2008.

O'NEILL, S.L. e KARR, T.L. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*. v. 348, p. 178-180, 1990.

O' NEIL, S. L.; GIORDANO, R.; COLBERT, A. M. E.; KARR, T. L.; ROBERTSON, H. M. 16S rDNA phylogenetic analysis of the bacterial

endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 89, p. 2699-2702, 1992.

PANARAM, K. e MARSHALL, J. L. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? *Genetica.* v. 130, p. 53-60, 2007.

PANNEBAKKER, B. A.; LOPPIN, B.; ELEMANS, C. P. H.; HUMBLOT, L.; VAVRE, F. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *PNAS.* v. 104, n.1, p. 213-215, 2007.

POINSOT, D. CHARLAT, S.; MERÇOT, H. On the mechanism of *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *BioEssays.* v. 25, p. 259-265, 2003.

RASGON, J. L.; CORNEL, A. J.; SCOTT, T. W. Evolutionary history of mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc. Biol. Sci.* v. 273, p. 1603-1611, 2006.

RAYCHOUDHURY, R.; BALDO, L.; OLIVEIRA, D. C. S. G.; WERREN, J. H. Modes of acquisition of *Wolbachia*: Horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution.* v. 63, n.1, p. 165-183, 2009

RIBEIRO, R. M. *Wolbachia* e Incompatibilidade Citoplasmática em *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus* e *A. obliqua* (Diptera: Tephritidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 52f, 2009.

RIEGLER, M. e STAUFFER, C. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European

Cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.* v. 11, p. 2425-2434, 2002.

ROCHA, L. S.; MASCARENHAS, R. O.; PERONDINI, A. L. P.; SELIVON, D. Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitidis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae). *Neot. Ent.* v.34, p. 1013-1015, 2005.

ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. *Wolbachia* endymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B.* v. 250, p. 91 – 98, 1992a.

ROUSSET, F.; VAUTRIN, D.; SOLIGNAC, M. Molecular identification of *Wolbachia*, the agente of cytoplasmatic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc. R. Soc. Lond. B.* v.247, p.163 -168. 1992b.

ROWLEY, S. M.; RAVEN, R. J.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia pipientis* in Australian Spiders. *Curr. Microb.* v. 49, p. 208-214, 2004.

SALLES, L. A. Biologia e Ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) p. 81-86 em: "Moscas-das-frutas de Importância Econômica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado". Malavasi, A. e Zucchi, R. A. 2000. (ed.). Holos, Ribeirão Preto.

SAITOU, N. e NEI, M. The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *J. Mol. Evol.* v. 24, p. 189-204, 1986.

SELIVON, D. Estudo sobre a diferenciação populacional em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tese de doutorado. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 137 f, 1996.

SELIVON, D., PERONDI NI , A.L.P. AND MORGANTE, J.S. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *A. fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Genet. Mol. Biol.* v. 22, p. 507-510, 1999.

SELIVON, D.; PERONDI NI , A. L. P.; RIBEIRO, A. F.; MARINO, C.L.; LIMA, M. M. A.; COSCRATO, V. E. *Wolbachia* endosymbiont in a species of *A. fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Invert. Reprod. and Develop.* v. 42, p.121-127, 2002.

SELIVON, D. Moscas-das-frutas (Tephritidae): Contribuição ao conhecimento de sua biologia. Tese (Livre - Docência) - Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 66f., 2003.

SHOEMAKER, D. D.; MACHADO, C. A.; MOLBO, D.; WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M.; HERRE, E. A. The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proc. R. Soc. Lond. B.* v. 269, p. 2257-2267, 2002.

SIRONI, M.; BANDI, C., SACCHI, L.; DI SACCO, B.; DAMIANI, G.; GENCHI, C. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 74, p.223-27, 1995.

SIOZIOS, S.; SAPOUNTZIS, P.; IOANNIDIS, P.; BOURTZIS, K. *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insc. Sci.* v.15, p. 89-100, 2008.

SMIT, A.F. e RIGGS, A.D. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 93, p. 1443-1448, 1996.

STOUTHAMER, R., LUCK, R.F.; HAMILTON, W. D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proc. of the Nat.* v. 87, p. 2424-2427, 1990.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; LUCK, R. F.; WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*. v. 361, p. 66-68, 1993.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.J.; HURST, G.D.D. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Rev. Microb.* v. 53, p. 71-102, 1999.

SUN, X.; LI, Z. H.; LIANG, G.Q.; CHEN, H.J.; CHEN, N.Z. Detection of *Wolbachia* in *Bactrocera (B.) dorsalis* (Hendel) of China. *Plant Quarant.* v. 18, p. 321-323, 2004.

SUN, X.; CUI, L. AND LI, Z. Diversity and Phylogeny of *Wolbachia* Infection *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) Populations from China. *Mol. Ecol. and Evolution.* v. 36, p.1283-1289, 2007.

TAGAMI, Y. e MIURA, K. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Ins. Mol. Biol.* v. 13, p. 359-364, 2004.

TAYLOR, M. J.; BANDI, C.; HOERAUF, A. *Wolbachia* Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. *Adv. in Paras.* v. 60, p. 246-284. 2005.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Ac. Res.* v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. AND MCKECHNIE, S. W. Dynamics of cytoplasmic and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics.* v. 132, p. 713-723, 1992.

TURELLI, M. e HOFFMANN, A. A. Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila simulans*: Dynamics and Parameter Estimates from Natural Populations. *Genetics.* v. 140, p. 1319-1338. 1995.

VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULTREAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid. *Mol. Biol. Evol.* v. 16, p. 1711-1723, 1999.

WERREN, J. H., D. WINDSOR, AND L. R. GUO. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v. 262, p. 197-204, 1995a.

WERREN, J. H.; ZHANG, W. AND GUO, L. R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 261, p.55-63, 1995b.

WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.* v. 42, p. 587-609, 1997.

WERREN, J. H. e WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v. 267, p. 1277-1285, 2000.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microb.* v.6, p.741-751, 2008.

WEST, S.A.; COOK, J. M.; WERREN, J. H.; GODFRAY, H. C . J. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol. Eco.* v. 7, p. 1457-1465, 1998.

WU, M.; SUN, L.V.; VAMATHEVAN, J.; RIEGLER, M.; DEBOY, R.; BROWNLIE, J.C.; MCGRAW, E.A. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLOS Biol.* v. 2, p. 327-341, 2004.

ZABALOU, S.; RIEGLER, M.; THEODORAKOPOULOU, M.; SAUFFER, C.; SAVAKIS, C.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *PNAS.* v. 101, n. 42, p. 15042-15045, 2004.

ZCHORI -FEIN, E.; BORAD, C.; HARARI , A. R. Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria. *Physio. Ento.* v. 31, p. 164-169, 2006.

ZHOU, W.; ROUSSET, F. AND O'NEILL, S.L. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B.* v. 265, p. 509-515, 1998.