Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Viabilidade ecológica na troca de plantas hospedeiras e metagenômica de
endossimbiontes em *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

Isabelle Bueno Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Isabelle Bueno Silva
Bacharela e Licenciada em Ciências biológicas

Viabilidade ecológica na troca de plantas hospedeiras e metagenômica de
endossimbiontes em *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **WESLEY AUGUSTO CONDE GODOY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Isabelle Bueno

Viabilidade ecológica na troca de plantas hospedeiras e metagenômica de endossimbiontes em *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) / Isabelle Bueno Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

63 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mosca da Asa-manchada 2. Troca de hospedeiro 3. Simbiontes 4. Modelagem conjunta de dados longitudinais e de tempo até o evento I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico a minha avó *in memoriam* que sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por mais uma etapa concluída, aos meus pais que sempre estiveram do meu lado me apoiando nas minhas escolhas, aos meus amigos do ministério APF que também estiveram sempre na torcida. Agradeço meu namorado Renan que me acompanhou principalmente nesse último ano, sempre me apoiando e me dando força nesta reta final. Agradeço aos meus amigos e colegas que tive a oportunidade de conhecer durante esse período, os quais pude compartilhar experiências, o que foi muito enriquecedor para meu desenvolvimento profissional e também pessoal.

Agradeço a todos os docentes os quais tive privilégio de ter aulas, de aprender não somente entomologia, mas também a nos prepararmos para o meio acadêmico-científico. Quero agradecer também a todos os funcionários do laboratório e do departamento que de alguma maneira me auxiliaram.

Agradeço à Carol que me ajudou no início com o projeto; ao Rafa, que teve toda a paciência para me auxiliar mesmo de longe; ao Lucas por todas as enriquecedoras discussões e os conselhos que foram muito importantes para mim. Também agradeço aos demais colegas de laboratório, com os quais tive inúmeros momentos de discussões, troca de ideias e experiências. Aos estagiários que colaboraram diretamente comigo, o Sidnei, Andressa, Bárbara, Paula, e outros que trabalharam conosco no laboratório, vocês foram essenciais. Agradeço a Isabella, que além de amiga de longa data, se tornou ainda mais especial durante esse tempo, estando do meu lado nos momentos de altos e baixos.

Agradeço aos professores Alberto, Eugênio (UFV), Daniel (UFPEL) e ao Felipe (UFV) por me auxiliarem no início, concedendo os insetos de suas colônias para começarmos as nossas criações. Agradeço a todos os produtores que nos auxiliaram com frutos para o experimento, ao Ricardo que contribuiu muito com as framboesas, à Fernanda que me auxiliou com os morangos.

Gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador, o professor Wesley, que sempre me ensinou muito com suas sábias discussões, conselhos, e com certeza será um professor que eu levarei como referência. Agradeço também o professor Fernando e toda sua equipe, que permitiu com que eu fizesse parte de meu mestrado em seu laboratório, foi uma experiência incrível. Sou muito grata a todos do Lab de interações de insetos que me ajudaram durante esse período, sempre com muita paciência e dando muita força para mim.

A todos aqueles que de alguma maneira me auxiliaram durante esse período de mestrado que não citei diretamente aqui, muito obrigada, todos foram colaboradores para meu crescimento pessoal e profissional.

Por fim, agradeço a agência de fomento CNPq pela concessão da bolsa, ao programa de pós graduação de Entomologia, ao Departamento de Entomologia e Acarologia, à ESALQ/USP por essa oportunidade ímpar.

EPÍGRAFE

*Poderia ter escrito todos os textos e artigos mais incríveis do mundo,
Poderia almejar ser a mais dedicada que já se viu,
Poderia ser a entomóloga que mais soubesse de todos os insetos e suas interações,
Mas eu escolhi ser simplesmente aquela que busca a cada dia se superar,
Em ser melhor do que ontem sem desconsiderar as experiências passadas,
Em aprender com os inúmeros erros,
A reconhecer que pode realizar metamorfoses incontáveis,
Saber da importância das colaborações para seu crescimento,
E o mais importante, buscar fazer tudo com amor.
E isso é o que me moveu até aqui, desde a escolha do meu curso de graduação até os caminhos que aqui se
findaram.
Que seja o fim de mais um ciclo, incrível, enriquecedor, que me propulsione a alcançar os demais sonhos que
tenho,
E que me motive a continuar sendo, simplesmente, uma mulher, bióloga, cientista, que aprende e até ensina,
E o mais importante, que continue fazendo tudo com muito amor.*

Isabelle Bueno Silva

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTAS DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. <i>Drosophila suzukii</i> e impactos econômicos causados	17
2.2. Nutrição de insetos.....	18
2.3. Insetos e simbioses.....	19
3. OBJETIVO	21
3.1. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Experimentos com troca de frutos hospedeiros	23
4.2. Análise dos macronutrientes metabolizados	25
4.3. Extração de nutrientes assimilados	26
4.4. Quantificação dos nutrientes.....	27
4.5. Análise estatística.....	28
4.6. Análise da microbiota	29
5. RESULTADOS	33
5.1. Dados de fecundidade.....	33
5.2. Período de oviposição.....	34
5.3. Proporção de prole viável	35
5.4. Modelo conjunto fecundidade x tempo de sobrevivência	35
5.5. Macronutrientes metabolizados	36
5.6. Diversidade da microbiota.....	37
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51

RESUMO

Viabilidade ecológica na troca de plantas hospedeiras e metagenômica de endossimbiontes em *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae)

O interesse de compreender comportamento de insetos envolvidos em processos de invasão biológica, sobretudo em relação a seus hospedeiros tem aumentado em razão da relevância do assunto para introdução de pragas exóticas em novas áreas. Dentre as espécies de drosofilídeos, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), de origem asiática, tornou-se praga em diversos países por atacar pequenos frutos de tegumento fino, já que dispõe de ovipositor adaptado para essa ação. Por ser inseto polífago, vários estudos têm investigado preferência, atratividade, e atributos que levam a destacar os potenciais hospedeiros da espécie. Apesar de estudos já desenvolvidos, ainda não havia sido verificado se a viabilidade ecológica dessa espécie poderia ser influenciada em condições de troca de frutos hospedeiros. Assim, no presente estudo foram avaliadas variáveis biológicas como fecundidade e período de oviposição, associados ao tempo de sobrevivência quando submetidos à troca de frutos hospedeiros, em particular de framboesa para o morango, bem como os fisiológicos, como a concentração de nutrientes em indivíduos de *D. suzukii*. Analisou-se também a microbiota associada aos indivíduos utilizados no experimento de troca de frutos, através de metagenômica. Os resultados encontrados indicam que a fecundidade foi significativamente maior na framboesa do que no morango, e entre as gerações que estavam no morango. O período de oviposição foi maior para os insetos que continuaram na framboesa, e a proporção de prole viável foi maior no morango. Além disso, foi visto que a quantidade de ovos está associada ao tempo de sobrevivência no fruto. Os resultados sobre a metagenômica mostraram que apesar de não haver diferença significativa em relação à comunidade de simbiontes nos diferentes tratamentos, ambas as populações e as gerações tiveram alta diversidade e equitabilidade. As populações do sul e sudeste diferem quanto a presença de *Wolbachia*, indicando que o simbionte está presente apenas nos indivíduos do sudeste.

Palavras-chave: Mosca da Asa-manchada; Troca de hospedeiro; Simbiontes; Modelagem conjunta de dados longitudinais e de tempo até o evento

ABSTRACT

**Ecological viability in host shift and metagenomics of endosymbionts in
Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)**

Understanding the behaviour of insects in a biological invasion context, mainly in relation to their hosts, has become very important, because of the multitude of effects in the community that arise from the introduction of exotic pests in new areas. Within the species of drosophilids, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), became a pest in several countries, attacking small fruits and berries. As it is considered polyphagous, many studies have investigated the preference, attractiveness, and attributes of potential hosts. Thus far, no study has verified if the ecological viability was driven by fruit-host shift. In the present study, we analyse fecundity and oviposition period jointly with survival times of *D. suzukii* when submitted to fruit shift, in particular from raspberry to strawberry. We also study the effects on physiological attributes, such as the concentration of nutrients in individuals of *D. suzukii*. It was also analyzed the microbiota associated to these individuals that were used in the host shift experiment, through metagenomics. Our results showed that fecundity was significantly higher in raspberry than in strawberry. The oviposition period was higher for insects that continued in the raspberry, and the proportion of viable offspring was higher in the strawberry. Furthermore, we found that the number of eggs is related to the survival time in the fruit. No significant difference was observed in the macronutrient concentration, indicating that changes in host do not affect this physiological aspect. The metagenomic data showed that although there is no significant difference in relation to the symbiont community in the different treatments, both populations and generations had high diversity and equitability. The Southeast population has *Wolbachia* symbiont, differing from the south population.

Keywords: Spotted wing *Drosophila*; Host shift; Symbionts; Joint modelling of longitudinal and time-until-event data

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Distribuição de *Drosophila suzukii* pelo mundo. a- região de origem; B- primeiro registro de invasão no hawaii em 1980 (kaneshiro, 1983) ; c- ocorrência em 2008 na europa e américa do norte (BOLDA; GOODHUE; ZALOM, 2010; CALABRIA ET AL., 2012); D- Ocorrência no Canadá em 2009 (SENASICA, 2013); E- Ocorrência no México em 2011 (CINI; IORATTI; ANFORA, 2012); F- Primeiro registro de ocorrência no Brasil em 2013 (DEPRÁ ET AL, 2014); G- Ocorrência na Argentina e no Uruguai em 2014 (CHICÓN; GARRIDO; LAGO, 2015; LUCIA MARY; GONI, 2015); H- Ocorrência no Chile em 2015 (MEDINA-MÑOZ ET AL., 2015); I- Destaque para as ocorrências no Brasil desde o primeiro registro, abrangendo outros estados (PAULA ET AL., 2014; VILELA; MORI, 2014; ZANUNCIO-JUNIOR ET AL., 2018; SILVA; DA SILVA; GODOY, 2018)..... 15
- FIGURA 2.** Recipientes com as réplicas contendo os casais de *D. suzukii* da população sul separado de acordo com os frutos hospedeiros, framboesa e morango. 24
- FIGURA 3.** Réplicas contendo os frutos com os imaturos da geração F2 de *D. suzukii* da população sul para aqueles que continuaram no mesmo fruto, framboesa, e para aqueles que trocaram da framboesa para o morango. 24
- FIGURA 4.** Esquema do experimento realizado. na população sul (à esquerda) a geração parental foi iniciada com framboesa e a partir da geração F1 realizou-se duas trocas em que parte dos adultos foi colocada no morango e enquanto a outra permaneceu na framboesa, na geração F1 e F2. na população sudeste (à direita) a geração parental foi iniciada com o morango, mas não foi obtida prole suficiente para realizar a troca de fruto. 25
- FIGURA 5.** Para a extração dos macronutrientes, adultos de *D. suzukii* foram individualizados em triplicata, de ambas as populações. na população sudeste (a) foram separados os adultos da geração F1 que se encontravam no morango. já na população sul (b) foram separados adultos da geração F1, F2 e F3 que estavam na framboesa, além de adultos da geração F3 que se encontravam no morango. 26
- FIGURA 6.** Esquema da preparação das amostras para a quantificação dos macronutrientes totais, proteína, carboidrato, glicogênio e lipídeo, a partir de um único adulto de *D. suzukii*. 27
- FIGURA 7.** Fecundidade diária média por fêmeas e por dia, considerando as réplicas, nas gerações F1 (A e B) e F2 (C e D). 34
- FIGURA 8.** Curva de rarefação da diversidade de microbiota dos indivíduos de *D. suzukii*. * MOR= morango, PAR= parentais, AD= adulto, LV= larva, FB=framboesa. 37
- FIGURA 9.** Proporção de simbiontes (OTUs) presentes em indivíduos das duas populações (SD= sudeste) da geração parental (“PAR”) de *D. suzukii*..... 39
- FIGURA 10.** Diferença da proporção média encontrada apenas para a bactéria do gênero *Wolbachia*, entre os indivíduos da geração parental do sudeste comparado aos da população sul. 39
- FIGURA 11.** Proporção de bactérias presentes em indivíduos da geração F3 da população sul de acordo com os hospedeiros que se encontravam (FB-FB= permaneceu na framboesa; FB-MOR= houve a troca da framboesa para o morango). 1- larva (FB-FB); 2-adulto (FB-FB); 3- larva (FB-MOR); 4-adulto (FB-MOR). 40
- FIGURA 12.** Análise de coordenadas principais dos indivíduos da população sudeste e os da população sul. 42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Tratamentos utilizados para a extração de dna de acordo com a geração e população de <i>D. suzukii</i> e seus respectivos códigos.	29
TABELA 2. Fecundidade média e erro padrão, considerando os dados obtidos das réplicas, de acordo com o número de fêmeas entre os tratamentos e gerações.	33
TABELA 3. Tempo médio e erro padrão de postura entre as duas gerações e tratamento, considerando as réplicas.	35
TABELA 4. Média e erro padrão da proporção de prole viável das duas gerações e dos dois tratamentos, considerando os dados das réplicas.	35
TABELA 5. Modelo conjunto ajustado aos dados de oviposição e o tempo de sobrevivência.	36
TABELA 6. Concentração médias $\pm$ erro padrão de macronutrientes dos indivíduos das populações sul e sudeste, considerando as réplicas.	36
TABELA 7. Concentração médias $\pm$ erro padrão de macronutrientes das gerações F1, F2 e F3 da população sul e os respectivos frutos hospedeiros, considerando as réplicas.	37
TABELA 8. Média e erro padrão dos índices da diversidade alfa (shannon e uniformidade) nos diferentes tratamentos.	41

1. INTRODUÇÃO

A movimentação de espécies entre diferentes áreas tem sido desde há muito tempo relatada como evento importante para sistemas biológicos, aumentando a variabilidade genética das populações e contribuindo assim com composição gênica capaz de exibir melhor desempenho no âmbito ecológico e evolutivo para populações biológicas (GARNAS et al., 2016). Contudo, em décadas mais recentes, incluindo as últimas do século passado, o aumento da conectividade em escalas, incluindo a continental, tem favorecido o rápido estabelecimento de espécies exóticas em múltiplas regiões do planeta, muitas vezes com graves consequências para sistemas naturais, bem como para os sistemas agrícolas (GUILLEMAUD et al., 2011).

A invasão biológica merece destaque tanto por conta da crescente tendência geral de múltiplas invasões ocorrerem também em múltiplas escalas (GARNAS et al., 2016), quanto devido às consequências ecológicas do impacto sobre a fauna nativa, com implicações para mudanças no ecossistema (KENIS et al., 2009; SIMBERLOFF et al., 2013). Além disso, tanto espécies introduzidas como espécies locais impactadas por invasões podem estar associadas a cultivos agrícolas, trazendo grande preocupação no que diz respeito ao impacto econômico da introdução, principalmente quando a população da espécie exótica não encontra, *a priori*, fatores limitantes, crescendo de forma superior ao padrão de crescimento local, podendo até mesmo atingir o *status* de praga (GUILLEMAUD et al., 2011; WILLIAMSON; FITTER, 1996).

Processos de invasão biológica são usualmente investigados seguindo pressupostos alinhados com etapas inerentes de um evento de invasão, como postulado por Blackburn et al (2011). Sob essa perspectiva, há diversas barreiras para uma espécie se estabelecer em um novo ambiente. Dentre elas, as condições abióticas e bióticas do novo local, a capacidade da população sobreviver frente às novas circunstâncias e de se reproduzirem com sucesso, podendo até se espalhar de forma a aumentar a distribuição, são frequentemente reconhecidas como significativas.

No que diz respeito à capacidade de sobrevivência, é preciso destacar a importância do recurso alimentar necessário para que o inseto alcance a homeostase nutricional, como discutido por Chapman (1998) no capítulo sobre nutrição de insetos. Sabendo que organismos interagem com plantas por conta da oviposição e alimentação e que, esse recurso é imprescindível para que a espécie sobreviva e persista ao longo do tempo, a disponibilidade tanto temporal quanto espacial de plantas hospedeiras, é sem dúvida, fator relevante para a

dispersão de espécies e, em especial, para organismos recém introduzidos na nova área (DA SILVA DÖGE; OLIVEIRA; TIDON, 2015).

Compreender esse processo, principalmente em se tratando de adaptação e estabelecimento de espécies não-nativas é de suma importância para questões associadas ao manejo de pragas. Por isso, a abordagem ecológica em insetos é essencial para compreender a relação de insetos-alvo com o ambiente, bem como os outros organismos do ecossistema, auxiliando inclusive na acurácia das estratégias de controle (PALLADINO, 1990).

Uma recente abordagem que tem auxiliado na compreensão da relação do inseto com o ambiente é também a presença dos microrganismos, comumente atuando como simbioses. Já existem claras evidências de que a simbiose pode influenciar positivamente a adaptação do hospedeiro em ambientes modificados (SU; ZHOW & ZHANG, 2013). Isso se deve ao fato de que os microrganismos associados podem fornecer nutrientes essenciais, que o hospedeiro nem sempre encontra no ambiente, gerando um efeito compensador ao inseto (DOUGLAS, 2009; SU; ZHOW & ZHANG, 2013). Além disso, o simbiote pode também auxiliar o hospedeiro melhorando a eficiência do sistema imune, com resultados importantes para o desempenho da população (CHAPMAN, 1998; PARACER; AHMADJIAN, 2000).

Esse tipo de relação pode também ter implicações positivas na evolução entre as espécies envolvidas, já que o hospedeiro associado ao simbiote pode ser beneficiado pela relação simbiótica por diversos aspectos, nutricionais, defesa, detoxificação de substâncias, tornando-se melhor adaptado ao local em que se encontra (SHAPIRA, 2016). O benefício obtido pela ação simbiótica tem servido como base para pressupor que a participação dos microrganismos no processo de adaptação seja devido a alteração do *fitness* do hospedeiro, principalmente os facultativos, os quais são adquiridos no ambiente (FELDHAAR, 2011). Em relação à influência da interação simbiótica em espécies hospedeiras, em especial no cenário de pragas de frutíferas, pouco se sabe sobre a atuação de simbioses específicos sobre essas pragas invasoras capazes de trocar de hospedeiros por conta da natureza polífaga que exibem, como já evidenciado em espécies recentemente introduzidas no Brasil.

Dentre as pragas de frutíferas, poucas espécies de importância econômica pertencem à família Drosophilidae. No entanto, duas espécies de drosofilídeos merecem destaque, a “mosca-do-figo”, *Zaprionus indianus* (Gupta, 1970) que ataca cultivos de figo-roxo (*Ficus carica*) através da oviposição das fêmeas no ostíolo do figo, infestando-o e impedindo assim o consumo humano (RAGA, 2002) e *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931). *Drosophila suzukii*, também conhecida como “mosca da asa manchada”, é um inseto de origem asiática que foi visto pela primeira vez no Brasil em 2013 (DEPRÁ et al., 2014), passando a receber o

status de praga principalmente no sul do país, onde se reportaram ataques em cultivos de morangos (SANTOS, 2014), além de outros frutos de “casca fina” e até feijoa (SOUZA et al., 2017).

Em razão das características peculiares de sua distribuição quase cosmopolita, particularmente na Europa e Américas (Figura 1), compreender o sucesso adaptativo da espécie em ambientes heterogêneos é essencial para o estabelecimento de programas de manejo de *D. suzukii* no Brasil. O seu hábito altamente polífago certamente potencializa seu sucesso, porém, existem importantes lacunas para entender de fato o mecanismo dessa relação com novos hospedeiros. Assim, esse estudo visa melhor entender como a espécie responde à troca de hospedeiros em condições laboratoriais e ainda busca avaliar se indivíduos que já se encontram relativamente estáveis em regiões com condições ambientais aparentemente favoráveis no Brasil, em especial sul e sudeste, respondem da mesma forma a essa troca.

Figura 1. Distribuição de *Drosophila suzukii* pelo mundo. A- Região de origem; B- Primeiro registro de invasão no Hawaii em 1980 (KANESHIRO, 1983) ; C- Ocorrência em 2008 na Europa e América do Norte (BOLDA; GOODHUE; ZALOM, 2010; CALABRIA et al., 2012); D- Ocorrência no Canadá em 2009 (SENASICA, 2013); E- Ocorrência no México em 2011 (CINI; IORATTI; ANFORA, 2012); F- Primeiro registro de ocorrência no Brasil em 2013 (DEPRÁ et al, 2014); G- Ocorrência na Argentina e no Uruguai em 2014 (CHICÓN; GARRIDO; LAGO, 2015; LUCIA MARY; GOÑI, 2015); H- Ocorrência no Chile em 2015 (MEDINA-MÑOZ et al., 2015); I- Destaque para as ocorrências no Brasil desde o primeiro registro, abrangendo outros estados (PAULA et al., 2014; VILELA; MORI, 2014; ZANUNCIO-JUNIOR et al., 2018; SILVA; DA SILVA; GODOY, 2018).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Drosophila suzukii* e impactos econômicos causados

Drosophila suzukii pertence à ordem Diptera, família Drosophilidae, subgênero *Sophophora* e grupo *melanogaster* e subgrupo *suzukii*, o qual possui outras espécies, principalmente da Ásia (HAUSER, 2011). Os machos de *D. suzukii* possuem asas manchadas e pentes nos segmentos tarsais e as fêmeas possuem ovipositor de maior tamanho quando comparado a outras espécies do mesmo gênero, além de ser serrilhado e esclerotizado. Essa característica morfológica das fêmeas parece ser uma derivação evolutiva importante que permite com que se associem a hospedeiros ainda em estágio de amadurecimento (ATALLAH et al, 2014). O comportamento de associação com frutos não maduros não é muito comum em espécies de *Drosophila*, pois a maioria dos drosofilídeos estão associados a frutos já em decomposição, além de associarem-se com leveduras e bactérias (GORDON, 1942).

Com isso, é pertinente observar a que hospedeiros *D. suzukii* pode estar relacionada, e que danos podem ser causados. Segundo dados da Organização Europeia e Mediterrânea para a Proteção das Plantas- EPPO (2011) a lista de hospedeiros chega a 42 espécies e como algumas delas são importantes para a produção agrícola, a mosca-da-asa-manchada está na categoria de praga quarentenária A2 em alguns países. No hemisfério norte essa espécie já foi encontrada em plantações de morango, damasco, cereja, pêra, nectarina, kiwi, figo, amora, mirtilo, caqui, ameixa, framboesa, e ainda em frutos danificados como maçã e até laranja (WALSH et al., 2011). Mesmo nos locais em que não é espécie nativa, já foram reportados danos econômicos de até 80%, segundo os dados de Walsh e colaboradores (2011), para os EUA. Perdas de 80% já foram registradas em cultivos de morango, na França e de 30-40%, na Itália, em cultivares de frutas de “casca fina” como framboesas e *blueberries* (LEE et al., 2011).

No Brasil, a espécie foi observada em cultivos de morango (SANTOS, 2014), pitanga, araçá (MÜLLER; NAVA, 2014), maçã (SIVORI et al., 2016), kiwi (SILVEIRA et al., 2015), cereja, ameixa-amarela e pêssego (GEISLER et al., 2015), além de registros de ocorrência dessa espécie em fragmentos de mata nativa (DEPRÁ et al., 2014; SILVA; DA SILVA; GODOY, 2018). Apesar de não se ter registros de perdas significativas nas produções nos cultivos em que foi encontrada, o quadro de impactos econômicos em outros países torna preocupante a presença do inseto, já que o Brasil é o terceiro país do *ranking* mundial de

produtores de frutos, chegando a produzir recentemente quase 44 milhões de toneladas de frutas, com 836 mil toneladas exportadas, segundo dados da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil- CNA (2017).

2.2. Nutrição de insetos

A ingestão e assimilação de nutrientes é crucial para a manutenção do metabolismo dos insetos, sendo os compostos adquiridos, diretamente dos alimentos, ou a partir de associação com microrganismos. A quantidade e proporção de cada macronutriente e íons necessários ao desenvolvimento dos insetos varia para cada espécie, em função dos hábitos alimentares (DADD, 1985; CHAPMAN, 1998). Para atingir estado nutricional satisfatório para cada fase do desenvolvimento, bem como para a realização das respostas fisiológicas e comportamentais da vida do inseto (CHAPMAN, 1998), a disponibilidade de alimentos, além da percepção dos itens alimentares é imprescindível.

Com o intuito de verificar a importância da proporção necessária de macronutrientes no desenvolvimento e aspectos do ciclo de vida, estudos têm sido feitos abordando geometria nutricional, mostrando que longevidade, fecundidade, e escolha de oviposição podem ser alterados de acordo com a proporção de proteína e carboidrato ingeridos (SIMPSON; RAUBENHEIMER, 2011; BRUCE et al., 2013; LEE et al., 2008; MATAVELLI et al., 2015).

A opção dos insetos por fontes alimentares que contenham essas características nutricionais está relacionada com atração ou repulsão. No caso de *Drosophila*, as características do fruto que influenciam a escolha podem ser cor, estágio de amadurecimento, pH, forma, compostos químicos voláteis, tamanho, dureza da casca, além da disponibilidade espaço-temporal dos recursos (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005). Paralelamente, os mecanismos sensoriais utilizados para reconhecer esses atributos são principalmente o olfato, através dos sensilos da antena ou as funções mecanogustativas, através dos tarsos, ou do contato do abdome com o substrato (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005). A partir do reconhecimento, são desencadeadas respostas fisiológicas, capazes de regular o comportamento de escolha do alimento, que pode ser alterado dependendo das condições nutricionais, como já observado em *Drosophila* (POOL; SCOTT, 2014).

O comportamento de oviposição em diversos tipos de frutos hospedeiros, caracteriza *D. suzukii* como altamente polífaga (LEE et al., 2011b), aumentando o interesse em

compreender melhor a relação inseto-hospedeiro, principalmente em novos ambientes. Diversos estudos têm investigado características dos frutos associadas à escolha de oviposição por fêmeas dessa espécie (BURRACK et al., 2013; KINJO et al., 2013; POYET et al., 2015; SILVA-SOARES et al., 2017) e relacionadas com a fisiologia da atratividade (ABRAHAM et al., 2015; WONG et al., 2018). Apesar da abrangência de frutos hospedeiros analisados, nenhum estudo avaliou o impacto da troca de frutos sobre variáveis biológicas de *D. suzukii*, bem como os aspectos nutricionais ou fisiológicos possivelmente relacionados ao impacto causada pelo impacto.

2.3. Insetos e simbioses

Existem insetos que necessitam do auxílio de microrganismos simbioses para assimilar e sintetizar nutrientes essenciais. Há casos também em que as condições alimentares são subótimas e, assim, os simbioses poderiam contribuir indiretamente com o processo nutricional de insetos (DOUGLAS, 2009). A relação simbiótica consiste da interação de dois indivíduos de espécies diferentes, em que o simbiote pode fornecer benefícios para quem o hospeda em troca de proteção e alimento; podendo ser obrigatória ou facultativa, e adquirida via transmissão vertical (herança materna) ou horizontal (através do ambiente) (PARACER; AHMADJIAN, 2000; ISHIKAWA, 2003). Os principais microrganismos que interagem em simbiose com os insetos são bactérias, leveduras, fungos e alguns protozoários, e podem ser encontrados em células específicas do hospedeiro, em espaços intercelulares e até mesmo no lúmen intestinal (ISHIKAWA, 2003).

A interação simbiótica pode ser benéfica para reprodução, defesa contra patógenos e também na adaptação do inseto-hospedeiro ao ambiente (PARACER; AHMADJIAN, 2000; SU; ZHOU; ZHANG, 2013; FELDHAAR, 2011). As influências dos microrganismos sobre o hospedeiro podem ser causadas por um único tipo de bactéria (SHIN et al., 2011) ou até mesmo por uma comunidade de microrganismos (SOMMER; NEWELL, 2018).

O papel dos simbioses nos insetos, principalmente os obrigatórios, se expressa pela degradação de moléculas não degradadas naturalmente pelo hospedeiro, e detoxificação de substâncias aleloquímicas liberadas pelas plantas hospedeiras (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005; DOUGLAS, 2009). Um exemplo da atuação de simbioses na degradação de um composto de defesa da planta é o caso da praga que ataca maçã, *Rhagoletis*

pomonella em que a bactéria simbiote *Enterobacter agglomerans* degrada o composto, fornecendo assim proteína ao inseto-hospedeiro (LAUZON; POTTER; PROKOPY, 2003).

Ishikawa (2003) propõe que a diversidade de fontes alimentares utilizadas pelos insetos pode ser explicada pela simbiose. No caso de insetos especialistas, mais restritos a determinadas plantas hospedeiras, têm presença de simbiontes obrigatória, como por exemplo, afídeos e a bactéria *Buchnera* (DOUGLAS, 1998).

Pode-se considerar que a simbiose pode influenciar diferentes aspectos ecológicos do inseto (FELDHAAR, 2011). Há evidências de que a interação simbiótica pode levar à adaptação do hospedeiro a um novo ambiente como mencionado anteriormente para algumas espécies de afídeos (HENRY et al., 2013). O conceito de “hologenoma”, considerando microrganismo e hospedeiro, fundamenta a interpretação sobre a associação entre aquisição horizontal de bactérias e aumento da variabilidade genética, com consequências positivas ou não para o *fitness* do hospedeiro (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011; SHAPIRA, 2016).

Em *D. suzukii* a microbiota intestinal de populações coletadas no campo já foi caracterizada (CHANDLER et al., 2014), além de já se saber que há alteração na microbiota intestinal em indivíduos dessa espécie que se encontram em regiões não-nativas (MARTINEZ-SAÑUDO et al., 2017). Apesar de ter sido relatada a atuação dos simbiontes na nutrição desse inseto (BING et al., 2018), não há estudos em que relacione a adaptação de *D. suzukii* à presença de simbiontes, quando submetidos à troca de frutos hospedeiros.

3. OBJETIVO

Verificar se a troca de plantas hospedeiras afeta a viabilidade da espécie *Drosophila suzukii* em escala ecológica, e se há alteração da comunidade de endossimbiontes.

3.1. Objetivos específicos

- Comparar dados biológicos ao longo de duas gerações de indivíduos de *D. suzukii* que trocaram de hospedeiros, e que não foram submetidos à troca.
- Investigar possíveis diferenças no metabolismo nutricional de indivíduos que se alimentaram em hospedeiros diferentes.
- Comparar microrganismos simbiossiontes de imaturos e adultos no tocante à diversidade e abundância, considerando a troca de frutos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimentos com troca de frutos hospedeiros

Tanto as populações de *Drosophila suzukii* do sudeste quanto às do sul foram obtidas de criações laboratoriais iniciadas a partir de colônias mantidas em laboratório, da Universidade Federal de Pelotas e da Universidade Federal de Viçosa, com criação experimental advinda de insetos previamente coletados em cada uma das regiões. Os indivíduos utilizados para o experimento foram mantidos em gaiolas (30 x 21 x 17 cm), acondicionadas em câmaras climáticas (fitotron ®) à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 14-10h. Aos insetos eram oferecidas framboesas frescas, cultivadas sem a aplicação de inseticida para a obtenção da geração F1. Os frutos com os ovos eram retirados e incubados nas mesmas condições até serem obtidos os adultos.

A escolha dos frutos foi baseada na ocorrência dessa espécie nesses hospedeiros nas respectivas regiões. Apesar de no sul também haver registro de *D. suzukii* em morangos, em recente estudo foram coletados mais indivíduos em framboesas do que em outros frutos de tegumento fino, levando a escolha desse hospedeiro para a população do sul (KLESENER et al., 2018)

Com os indivíduos que emergiram da framboesa foi instalado um experimento em os insetos foram colocados em framboesa e em morango, 5 réplicas de 10 casais cada (Figura 2). Os adultos da geração seguinte, F2, foram colocados em morango e framboesa, com 3 réplicas, contendo 5 indivíduos, 3 fêmeas para 2 machos. Os frutos foram substituídos diariamente, e colocados em outro recipiente (Figura 3), mantidos às mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo. Foi registrada a quantidade de ovos e mortalidade diária dos adultos, ao longo de duas gerações. Esse experimento foi repetido, porém com 5 réplicas na geração F2 (Figura 4).

Figura 2. Recipientes com as réplicas contendo os casais de *D. suzukii* da população sul separado de acordo com os frutos hospedeiros, framboesa e morango.

Figura 3. Réplicas contendo os frutos com os imaturos da geração F2 de *D. suzukii* da população sul para aqueles que continuaram no mesmo fruto, framboesa, e para aqueles que trocaram da framboesa para o morango.

Figura 4. Esquema do experimento realizado. Na população sul (à esquerda) a geração parental foi iniciada com framboesa e a partir da geração F1 realizou-se duas trocas em que parte dos adultos foi colocada no morango e enquanto a outra permaneceu na framboesa, na geração F1 e F2. Na população sudeste (à direita) a geração parental foi iniciada com o morango, mas não foi obtida prole suficiente para realizar a troca de fruto.

4.2. Análise dos macronutrientes metabolizados

Os adultos utilizados para a análise foram das duas populações:

- População sudeste (alimentada com morango), geração F1;
- População sul (alimentada com framboesa), geração F2 (que permaneceram na framboesa) e adultos F3 que passaram pela troca de frutos hospedeiros.

Individualizaram-se adultos das duas populações/gerações, colocados em frascos contendo álcool puro (Figura 5), em triplicata.

Figura 5. Para a extração dos macronutrientes, adultos de *D. suzukii* foram individualizados em triplicata, de ambas as populações. Na população sudeste (A) foram separados os adultos da geração F1 que se encontravam no morango. Já na população sul (B) foram separados adultos da geração F1, F2 e F3 que estavam na framboesa, além de adultos da geração F3 que se encontravam no morango.

4.3. Extração de nutrientes assimilados

A partir das separações das amostras, pesaram-se os indivíduos e foi feito o procedimento de obtenção dos nutrientes proteína, carboidrato, glicogênio e lipídeos totais de cada uma, seguindo o protocolo de Lorenz (2003) (Figura 6).

Figura 6. Esquema da preparação das amostras para a quantificação dos macronutrientes totais, proteína, carboidrato, glicogênio e lipídeo, a partir de um único adulto de *D. suzukii*.

4.4. Quantificação dos nutrientes

A partir das alíquotas contendo solução com cada macronutriente individualmente, foi possível quantificá-los utilizando Espectrofotômetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotech).

- Para **proteína**, foram utilizados 300 μL de reagente coomassie (Coomassie Plus Protein, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL.), e 10 μL de cada amostra, em triplicata. Além disso, foram preparadas as diluições para cinco curvas, utilizando albumina como padrão (concentração de 0 $\mu\text{g/mL}$ a 2000 $\mu\text{g/mL}$) segundo o protocolo do fabricante do reagente. A absorbância utilizada foi 595 nm.
- Para **carboidrato** e **glicogênio**, utilizou-se como reagente o Anthrone (ROE, 1955). Para as alíquotas de carboidrato, preparou-se uma solução de 50 μL de cada amostra individualmente, 100 μL de ácido sulfúrico e 200 μL de Anthrone. Já para as alíquotas de glicogênio, preparou-se a solução com 25 μL de amostra, 50 μL de ácido sulfúrico e 100 μL de Anthrone.

Em microplacas Epoch, foi colocado 100 μL de cada amostra já preparada (em triplicata), bem como as soluções das cinco curvas utilizando glicose como padrão (concentração de 0 mg/L a 100 mg/L). A Absorbância utilizada foi de 620 nm.

- Já para **lipídeos** foi preparada uma solução contendo 100 μL do reagente vanilina, 30 μL de ácido sulfúrico e 10 μL das amostras, individualmente. Dessa solução, colocou-se 100 μL de cada amostra na microplaca Epoch, em triplicata, assim como para a solução das cinco curvas (concentração de 0 mg/dL a 2,500 mg/dL), cujo padrão utilizado foi óleo vegetal comercial. A absorbância utilizada foi de 525 nm (VAN HANDEL, 1985).

A partir das medições das absorbâncias das curvas-padrão (com concentração já conhecidas), foi possível verificar as concentrações de cada amostra.

4.5. Análise estatística

Para o número total de ovos e a proporção da viabilidade ovo-adulto foi ajustado o modelo quase-binomial (DEMÉTRIO et al., 2014), incluindo os efeitos de experimento, tratamento, gerações e da interação entre geração e tratamento, no preditor linear. Testes F foram feitos para avaliar a significância dos efeitos e comparações múltiplas foram feitas obtendo-se os intervalos de confiança de 95% para os preditores lineares. A qualidade do ajuste foi avaliada usando gráficos meio-normais com envelope de simulação. (MORAL et al, 2017). Quando não houve interação, foram analisadas as médias marginais dos dados.

Utilizou-se um modelo conjunto do número de ovos ao longo do tempo com os tempos de sobrevivência, através do modelo conjunto para os resultados longitudinais (oviposição) e resultados até o evento (tempo de sobrevivência) (RIZOPOULOS, 2010). Para a parte longitudinal do modelo, os dados de contagem foram transformados em log e foram incluídos os efeitos de experimento, geração, tratamento e tempo. Também foram incluídas as interações duas-a-duas entre tratamento, geração e tempo, e a interação tripla entre esses fatores no preditor linear, como efeitos fixos. Um intercepto aleatório por fêmea também foi considerado, dado que os números de ovos postos pela mesma fêmea são correlacionados ao longo do tempo. O modelo de análise de sobrevivência utilizado foi o de riscos proporcionais de Cox, incluindo os efeitos de experimento, tratamento, geração e a interação entre tratamento e geração no preditor linear. Foram feitos testes de razão de Verossimilhança (LR) para verificar a significância dos efeitos fixos para ambas as partes do modelo e testes de Wald para avaliar a significância do parâmetro de associação.

Os dados de leituras de macronutrientes metabolizados foram analisados por meio de modelos lineares incluindo o efeito de tratamento no preditor linear. A significância do efeito foi avaliada por meio de teste F.

4.6. Análise da microbiota

4.6.1. Extração do material genético

Foi feita extração total de DNA genômico de larvas e também de adultos (3 indivíduos por alíquota) de *D. suzukii* de todos os tratamentos (tabela 4) e em triplicata, seguindo o protocolo de extração de DNA com fenol-clorofórmio sugerido pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific ®), realizadas no laboratório de Interação de Insetos da ESALQ/USP.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para a extração de DNA de acordo com a geração e população de *D. suzukii* e seus respectivos códigos.

Tratamentos	Código
Adultos do pré-teste população sudeste (parentais)	PAR SD (MOR)
Adultos do pré-teste população sul (parentais)	PAR SUL(FB)
Adultos F1 da população sudeste	Ad. F1 SD (MOR)
Adultos F1 da população (sul)	Ad. F1 SUL(FB)
Larvas F2 da população sul do grupo que não trocou de fruto(framboesa)	F2 SUL(FB)
Adultos F2 da população sul do grupo que não trocou de fruto (framboesa)	Ad. F2 SUL(FB/FB)
Larvas F3 da população sul do grupo que não trocou de fruto(framboesa)	F3 SUL(FB/FB)
Larvas F3 da população dos que foram submetidos à troca (morango)	F3 SUL(FB/MOR)
Adultos F3 da população sul tanto do grupo que não trocou de fruto(framboesa)	Ad. F3 SUL(FB/FB)
Adultos F3 da população sul tanto do grupo que foram submetidos à troca (morango)	Ad. F3 SUL(FB/MOR)

Para a realização de reações de amplificação (PCR), foi padronizada a quantidade de DNA para 100 ng/μl, diluídos em água livre de nuclease. Utilizou-se iniciadores universais

para bactérias, 16S da região V3/V4 da citocromo oxidase- COI (*Reverse*: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC , e *Forward*:

TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) a fim de se fazer a amplificação de cópias de material genético dos microrganismos presentes.

O volume final das reações foi de 25 µL, contendo 1,0 µL de gDNA, 5µL de 5x PCRBIO Hifi Buffer, 0,25 µL de Taq PCRBIO Hifi Polymerase, 1,0 µL dos iniciadores *Forward* e *Reverse*. Programaram-se as reações a 94°C por 2 minutos (único ciclo), depois 32 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto e 30 segundos, e por fim 1 ciclo a 68°C por 10 minutos. Para confirmação dos produtos de amplificação foi feito um gel de agarose a 1,5% (0.5 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1mM EDTA, pH 8,2), em voltagem de 100 V. Após isso, as amostras da reação de amplificação foram sequenciadas em plataforma Illumina MiSeq, no laboratório de biotecnologia animal da ESALQ/USP.

4.6.2. Análises de diversidade dos simbiosites

As sequências foram analisadas no programa Qiime v.2, utilizando o tutorial “*moving pictures*”. Primeiramente, foi feito um filtro de qualidade, com seleção de leituras. Leituras com qualidade inferior a 20 foram desconsideradas e as amostras foram trimadas, com eliminação subsequente das seis últimas bases à esquerda. As sequências então foram comparadas e alinhadas ao banco de dados SILVA, e com 97% de similaridade foram consideradas as unidades taxonômicas (OTUs) que poderiam estar presentes nos insetos e seus respectivos níveis taxonômicos.

A partir das leituras das OTUs nos diferentes tratamentos, foram feitas análises de diversidade alfa, que incluíram a riqueza, através da contagem de unidades taxonômicas de cada amostra e o índice de Shannon (H), medida que prevê de qual espécie pertenceria um indivíduo retirado de uma amostragem aleatória que representa a população. Também foi medida a uniformidade da diversidade, através do *evenness* ou Uniformidade de Pielou (J'), que é obtido a partir dos valores encontrados no índice de Shannon. A partir dos dados de uniformidade, é possível saber se há dominância de espécies ou se estão presentes uniformemente. Os valores obtidos nesses índices foram comparados par-a-par através do teste estatístico não-paramérico Kruskal-Wallis.

Para comparar a diversidade entre os tratamentos, foi feita análise de diversidade beta, através da distância métrica UniFrac (não-ponderada), em que a distância filogenética da microbiota é levada em consideração; com a utilização do teste estatístico PERMANOVA foi feita uma comparação par-a-par dos tratamentos; e visualizadas através das análises de coordenadas principais (PCoA) pela extensão XLStat. A utilização de PCoA permite uma visualização do quanto as amostras podem estar próximas entre si, de forma descritiva, através da utilização de matriz de distância euclidiana.

Para a representação gráfica da diversidade da microbiota, consideraram-se os grupos presentes em pelo menos duas das três réplicas, que tiveram mais do que 100 leituras. Foram feitas proporções de acordo com as OTUs que foram consideradas, e foram agrupadas no grupo “outros” aqueles que tiveram menos que 5%.

As análises estatísticas para comparar grupos específicos de bactérias entre as amostras, foram feitas utilizando o software Stamp (PARKS et al, 2014).

5. RESULTADOS

Apenas a partir a população sul foi possível obter o número de adultos suficientes para separar os casais para os grupos controle e experimental, na geração F2. Ou seja, os dados da geração F2 são apenas para os indivíduos da população sul que foram submetidos ao experimento de troca de frutos. Os dados biológicos observados indicaram um impacto causado pela troca de fruto hospedeiro para a população sul, nas condições em que o experimento foi conduzido.

5.1. Dados de fecundidade

A análise do modelo ajustado para os dados de oviposição nos tratamentos e ao longo das gerações mostrou efeito significativo da interação entre geração e tratamento ($F_{1,31} = 11,05$, $p = 0,0023$) (Figura 7). Dessa forma o número de ovos depositados pelas fêmeas diferiu entre as duas gerações dos indivíduos que se encontravam no morango. Em relação aos indivíduos da geração F2 que trocaram de fruto hospedeiro, houve diferença na fecundidade total (Tabela 2).

Tabela 2. Fecundidade média e erro padrão, considerando os dados obtidos das réplicas, de acordo com o número de fêmeas entre os tratamentos e gerações.

Geração	Framboesa	Morango
F1	67,95 $\pm$ 7,70 aA	0,20 $\pm$ 0,15 bB
F2	50,40 $\pm$ 6,44 aA	12,98 $\pm$ 11,03 aB

Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas nas linhas; letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas nas colunas.

Figura 7. Fecundidade diária média por fêmeas e por dia, considerando as réplicas, nas gerações F1 (A e B) e F2 (C e D).

5.2. Período de oviposição

No modelo de riscos proporcionais de Cox ajustado aos dados de dias de posturas, foi considerado o número de ovos depositados por dia, indicando que não houve efeito significativo da interação entre tratamento e geração no preditor linear ($LR = 0,54$, $p = 0,4606$). O teste global para proporcionalidade de risco sugere boa acuracidade de ajuste do modelo aos dados ($X^2 = 3,16$, d.f. = 4, $p = 0,5316$). Dessa forma, analisando as médias marginais (Geração: $LR = 0,10$, d.f. = 1, $p = 0,7473$, e Tratamento: $LR = 31,77$, d.f. = 1, $p < 0,0001$), observou-se que o período médio de postura não diferiu entre as gerações, mas sim entre tratamentos, mostrando que as fêmeas passaram mais tempo ovipositando na framboesa do que no morango (Tabela 3).

Tabela 3. Tempo médio e erro padrão de postura entre as duas gerações e tratamento, considerando as réplicas.

Geração	Média $\pm$ erro padrão	Tratamento	Média $\pm$ erro padrão
F1	15,20 $\pm$ 2,86 a	Framboesa	27,56 $\pm$ 2,69 a
F2	17,90 $\pm$ 3,94 a	Morango	5,17 $\pm$ 1,20 b

Adultos da geração F2 submetidos à troca de framboesa por morango exibiram menor período de oposição que a população não submetida à troca (Tabela 3) (Figura 7, C e D).

5.3. Proporção de prole viável

Não foi observado efeito significativo de interação entre geração e tratamento para a proporção da prole que chegou à fase adulta ($F_{1,18} = 0,07$, $p = 0,8004$), mas sim o efeito somente do tratamento ($F_{1,19} = 6,88$, $p = 0,0172$), e geração ($F_{1,20} = 25,77$, $p < 0,0001$). Assim considerando as médias marginais, foi observada diferença entre gerações (F1 e F2) e tratamentos (Tabela 4). Mesmo quando a oviposição na framboesa foi maior que no morango (Tabela 1), a prole que estava no morango teve maior viabilidade. Além disso, a diferença entre tratamentos encontrada na geração F2 (Tabela 4) indica que a troca de hospedeiros impacta também a proporção da prole.

Tabela 4. Média e erro padrão da proporção de prole viável das duas gerações e dos dois tratamentos, considerando os dados das réplicas.

Geração	Média $\pm$ erro padrão	Tratamento	Média $\pm$ erro padrão
F1	16,91 $\pm$ 5,14 b	Framboesa	21,60 $\pm$ 3,49 b
F2	32,10 $\pm$ 5,88 a	Morango	33,47 $\pm$ 14,69 a

Letras diferentes indicam diferenças (Intervalo de confiança de 95%)

5.4. Modelo conjunto fecundidade x tempo de sobrevivência

Ao verificar se a quantidade de ovos teria relação com o tempo de sobrevivência, o modelo conjunto que foi ajustado indicou na parte longitudinal (Tabela 5) que o comportamento de decaimento do número de ovos depositados ao longo do tempo não diferiu entre tratamentos, bem como para as gerações (Tabela 5).

Tabela 5. Modelo conjunto ajustado aos dados de oviposição e o tempo de sobrevivência.

Parte longitudinal:	Parte da sobrevivência:
Interação duas-a-duas com o tempo, e interação três-a-três LR = 5,37, d.f. = 3, p = 0,1468	Interação entre geração e tratamento: LR = 0,17, d.f. = 1, p = 0,6777
Interação entre geração e tratamento: LR = 6,53, d.f. = 1, p = 0,0106	Principal efeito da geração: LR = 1,04, d.f. = 1, p = 0,3073
Efeito do tempo: estimativa = -0,0197 (0,0043), Teste de Wald p < 0,0001	Principal efeito do tratamento: LR = 6,82, d.f. = 1, p = 0,0090

LR= Razão de verossimilhança.

O parâmetro de associação indicou que a fecundidade no tempo para insetos na framboesa foi maior na primeira geração do que na segunda, com resultado inverso encontrado para os que estavam no morango.

Altos valores de fecundidade mostraram-se associados com maior tempo de sobrevivência no fruto, dada a associação negativa dos parâmetros analisados (parâmetro de associação = -0,5608 (0,1476), Wald test p = 0,0001).

5.5. Macronutrientes metabolizados

Entre os adultos da geração F1, não houve diferença significativa entre as populações, para todos os macronutrientes, lipídeos ($F_{1,4} = 0,01$, p-valor= 0,91), proteínas ($F_{1,4} = 0,001$, p-valor= 0,981), carboidrato ($F_{1,4} = 0,72$, p-valor= 0,444), e glicogênio ($F_{1,4} = 0,01$, p-valor= 0,923) (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração médias $\pm$ erro padrão de macronutrientes dos indivíduos das populações sul e sudeste, considerando as réplicas.

Em relação somente a população sul, não houve diferença na concentração dos macronutrientes lipídeos ($F_{3,8} = 1,11$, p = 0,4010), proteínas ($F_{3,8} = 2,32$, p = 0,1520), carboidrato ($F_{3,8} = 0,19$, p = 0,8950) e o glicogênio ($F_{3,8} = 0,51$, p = 0,6880), presentes nos indivíduos das gerações F1, F2 e F3 em framboesa e morango (Tabela 7).

População/ geração/	Lipídeo ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Carboidrato ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Glicogênio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Sudeste- Adultos F1	10,420 $\pm$ 0,032	0,1326 $\pm$ 0,0049	0,0153 $\pm$ 0,0019	0,0335 $\pm$ 0,0036
Sul- Adultos F1	10,433 $\pm$ 0,107	0,1324 $\pm$ 0,0064	0,0213 $\pm$ 0,0066	0,0319 $\pm$ 0,0148

Tabela 7. Concentração médias $\pm$ erro padrão de macronutrientes das gerações F1, F2 e F3 da população sul e os respectivos frutos hospedeiros, considerando as réplicas.

Geração/Hospedeiro	Lípídeo ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Carboidrato ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Glicogênio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
F1- <i>Framboesa</i>	10,4337 $\pm$ 0,1075 a	0,1324 $\pm$ 0,0064 a	0,02 $\pm$ 0,0066 a	0,0319 $\pm$ 0,0148 a
F2- <i>Framboesa</i>	10,3678 $\pm$ 0,0756 a	0,1252 $\pm$ 0,0061 a	0,019 $\pm$ 0,0002 a	0,0378 $\pm$ 0,0074 a
F3- <i>Framboesa</i>	10,2691 $\pm$ 0,0563 a	0,1153 $\pm$ 0,0049 a	0,018 $\pm$ 0,0014 a	0,0490 $\pm$ 0,0123 a
F3- <i>Morango</i>	10,4265 $\pm$ 0,0399 a	0,1373 $\pm$ 0,0074 a	0,021 $\pm$ 0,0019 a	0,0302 $\pm$ 0,0117 a

5.6. Diversidade da microbiota

Com a curva de rarefação, foi possível verificar que a quantidade obtida de leitura no sequenciamento demonstra que a amostragem foi adequada, pois a curva tende a saturação assintótica (Figura 8).

Figura 8. Curva de rarefação da diversidade de microbiota dos indivíduos de *D. suzukii*. * Mor= morango, Par= parentais, Ad= adulto, Lv= Larva, Fb=Framboesa.

Em relação à quantidade de OTUs encontradas na população do sudeste na geração parental obteve-se total médio de 13.496 leituras e o maior número observado de leituras

ocorreu para Anaplasmataceae (47,47%), Methylobacteriaceae (11,16%) e Acetobacteraceae (11,15%). Para a geração F1, os adultos tiveram contagem total média de 7.706 leituras, e as principais famílias encontradas foram Acetobacteraceae (39,20%) e Anaplasmataceae (14,45%).

Para a população do sul, a geração parental teve total médio de 16.705 leituras, e as famílias com o maior número médio de leituras foram Acetobacteraceae (38,10%) e Methylobacteriaceae (36,65%). Na geração F1, os adultos desta população tiveram total médio de 17.754 leituras, sendo as famílias Methylobacteriaceae (55,50%) e Sphingomonadaceae (15,95%) os que apresentaram maior número médio de leituras. Na geração F2, os imaturos tiveram uma contagem total média de 18.072 leituras e as principais famílias encontradas foram Sphingomonadaceae (27,63%), Methylobacteriaceae (25,63%) e Acetobacteraceae (9,90%). Os adultos dessa geração tiveram um total médio de 25.446 leituras, a família com maior proporção foi Methylobacteriaceae (70,90%), seguido de Sphingomonadaceae (7,07%).

Na geração F3, da população sul, os imaturos que permaneceram na framboesa tiveram um total médio de 15.538 de leituras, sendo as famílias em que se observou maior número médio de leituras foram Sphingomonadaceae (25,39%), Acetobacteraceae (18,10%), Methylobacteriaceae (16,10%). Os adultos desta geração tiveram um total médio de 20.595 leituras, das quais as famílias Methylobacteriaceae (17,09%) e Sphingomonadaceae (16,13%) apresentaram os maiores números médios de leituras. Em relação aos insetos que foram submetidos à troca da framboesa para o morango na geração F3, os imaturos tiveram um total médio de 9.873,67 leituras, das quais a família Acetobacteraceae (54,89%) teve a maior predominância. Nos adultos emergidos, foram contabilizados um total médio de 19.882 de leituras, e as famílias em que se observou maior número médio de leituras foram Sphingomonadaceae (32,24%) e Methylobacteriaceae (18,49%).

Em todos os tratamentos mencionados nos parágrafos anteriores, as famílias de simbioses que tiveram maiores proporções, são pertencentes ao filo Proteobacteria, apesar de representantes dos filos Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, e outros presentes em proporções muito inferiores (ANEXO A).

Para melhor representar a diversidade, levou-se em consideração somente as leituras que constavam em pelo menos duas das repetições para cada tratamento, e apenas as OTUs que tinham mais que 100 leituras. Ao serem feitas as proporções, agrupou-se em “outros” as OTUs que eram presentes menos do que 5%. Quando verificada a microbiota entre as populações sul e sudeste (Figura 9), a unidade taxonômica que difere entre ambas as

populações é *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) que representa 47,56% da comunidade total dos indivíduos do sudeste, e não foi encontrada em indivíduos da população sul (Figura 10). As outras OTUs são compartilhadas entre as populações, divergindo apenas em proporção, os quais os de menor proporção foi agrupado em “outros”.

Figura 9. Proporção de simbios (OTUs) presentes em indivíduos das duas populações (SD= Sudeste) da geração parental (“Par”) de *D. suzukii*.

Figura 10. Diferença da proporção média encontrada apenas para a bactéria do gênero *Wolbachia*, entre os indivíduos da geração parental do sudeste comparado aos da população sul.

Em relação à comparação da diversidade de simbios dos indivíduos da população sul da geração F3 que foram submetidos à troca da framboesa para morango e os que continuaram na framboesa (Figura 11), nota-se que os indivíduos *D. suzukii* que

permaneceram na framboesa diferiram em apenas três OTUs que foram exclusivas das larvas (“Acetobacteraceae_ind”, “Corynebacteriaceae_Lawsonella” e “Moraxellaceae_Acinetobacter”) e duas OTUs encontradas somente nos adultos (“Flavobacteriaceae_ind” e “Rhizobiaceae_Rhizobium”). Já nos indivíduos que foram colocados no morango, apesar da exclusividade e predominância de “Acetobacteraceae_ind” (94,53%) em larvas em relação aos adultos, as OTUs agrupadas em “outros” ocorrem também nos demais indivíduos, mesmo que em baixas proporções. Os adultos que foram para o morango possuem OTUs semelhantes aos dos adultos que permaneceram na framboesa, com exceção da “Oxalobacteraceae_ind”.

Figura 11. Proporção de bactérias presentes em indivíduos da geração F3 da população sul de acordo com os hospedeiros que se encontravam (Fb-Fb= permaneceu na framboesa; Fb-Mor= houve a troca da framboesa para o morango). 1- Larva (Fb-Fb); 2-Adulto (Fb-Fb); 3- Larva (Fb-Mor); 4-Adulto (Fb-Mor).

A análise de diversidade alfa mostrou alta diversidade entre as amostras (Tabela 8), os valores de Uniformidade de Pielou (J') mostraram que há grande número de OTUs que são dominantes (Tabela 8). O teste estatístico de Kruskal-Wallis mostrou que não há diferença entre os valores dos índices calculados entre os tratamentos (p- valor >0.005) (Anexo B).

Tabela 8. Média e erro padrão dos índices da diversidade alfa (Shannon e uniformidade) nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Índice de Shannon (H)	Uniformidade de Pielou (J')
Sudeste- Parentais	5,030 $\pm$ 0,336	0,894 $\pm$ 0,037
Sudeste- Adultos F1	5,181 $\pm$ 0,137	0,921 $\pm$ 0,01
Sul- Parentais	4,797 $\pm$ 0,245	0,872 $\pm$ 0,003
Sul- Adultos F1	4,925 $\pm$ 0,344	0,882 $\pm$ 0,023
Sul- Larvas F2	5,426 $\pm$ 0,216	0,939 $\pm$ 0,012
Sul- Adultos F2	4,478 $\pm$ 0,312	0,866 $\pm$ 0,014
Sul- Larvas (NT*) F3	5,720 $\pm$ 0,075	0,955 $\pm$ 0,007
Sul- Adultos (NT*) F3	5,935 $\pm$ 0,199	0,896 $\pm$ 0,026
Sul- Larvas (T*) F3	5,090 $\pm$ 0,390	0,925 $\pm$ 0,011
Sul- Adultos (T*) F3	5,486 $\pm$ 0,257	0,923 $\pm$ 0,011

NT*= Indivíduos que não trocaram de fruto.

T*= Indivíduos que foram submetidos à troca da framboesa para morango

Em relação à diversidade beta, pela análise de coordenadas principais foi possível ver um agrupamento das duas gerações da população sudeste, e no mesmo quadrante estão amostras da geração parental da população sul e larvas da geração F3 em que foram submetidos à troca da framboesa para o morango (Figura 11). As comunidades de simbioses de indivíduos da geração F3 que permaneceram na framboesa, estão agrupadas no mesmo quadrante junto com adultos da geração F3 que foram submetidos à troca. Em outro quadrante ficaram agrupados os adultos da geração F1 e larvas e adultos da geração F2 da população sul (Figura 11). Por fim, através do índice de Unifrac (não ponderado) foi possível verificar que ao se considerar as relações filogenéticas das OTUs encontradas, não há diferença entre os tratamentos (PERMANOVA, p-valores > 0,005) (ANEXO C).

Figura 12. Análise de coordenadas principais dos indivíduos da população sudeste e as da população sul.

6. DISCUSSÃO

O intuito desse estudo foi elucidar possíveis impactos que a troca de hospedeiro pode causar na viabilidade da espécie *Drosophila suzukii* em condições laboratoriais. Com os resultados obtidos pode-se discutir como foi a resposta dessa espécie desde à geração parental, até duas progênes subsequentes, levando em consideração as duas populações de regiões distintas.

Observando os resultados das duas populações do pré-teste só foi possível realizar o experimento de troca com as populações do sul, alimentadas com framboesa, já que houve alta mortalidade dos adultos associada à baixa fecundidade da população sudeste, alimentadas com morango. Esse resultado pode estar associado a diversos fatores. O primeiro deles é que o morango possui quantidades de macronutrientes diferentes da framboesa segundo dados da USDA (2018), o que pode influenciar o comportamento de alimentação e oviposição da mosca, como já esclarecido para *D. suzukii* (SILVA-SOARES et al., 2017).

Além da qualidade do fruto, outro fator importante que pode interferir na efetividade da escolha do hospedeiro para alimentação e oviposição é a alteração do período de amadurecimento das variedades do fruto (KINJO et al., 2013; LEE et al., 2011b) e o próprio estado fisiológico dos insetos que influencia a atratividade a odores (WONG et al., 2018). Em estudos anteriores já foi observado que há maior atratividade da framboesa em relação ao morango (ABRAHAM et al., 2015), e que em condições laboratoriais as fêmeas de *D. suzukii* ovipositam mais em framboesa do que em outros frutos, como mirtilo, amora-preta e morango (BURRACK et al., 2013).

Uma vez que a verificação da qualidade do hospedeiro pelos insetos pode ser além das características do fruto (POYET et al., 2015), como por exemplo a regulação interna conduzida por neuromoduladores, o comportamento de escolha do hospedeiro pode variar de acordo com as características nutricionais, no caso das moscas do gênero *Drosophila* (CHOW; FRYE, 2009; POOL; SCOTT, 2014). Após a escolha do hospedeiro e alimentação, há a metabolização e assimilação dos nutrientes no período pós-prandial, para que se efetive o desenvolvimento fisiológico. Acerca disso, esperava-se que os dados de concentrações dos nutrientes pudessem trazer possível explicação para a diferença encontrada na fecundidade associada à mortalidade entre as populações, já que em condições subótimas nutricionais os indivíduos podem ter respostas fisiológicas que resultam na alteração do tempo de vida (TATAR; POST; YU, 2014). Entretanto, como não houve diferença na concentração de macronutrientes presentes nos indivíduos das diferentes populações, pode-se presumir que

mesmo que haja diferença na qualidade do hospedeiro, a quantidade ingerida pode auxiliar na compensação nutricional necessária para o inseto, de certa forma corroborando os resultados obtidos com *Drosophila melanogaster* (CARVALHO; KAPAHI; BENZER, 2005).

Em relação somente à população sul, condição em que foi verificado o impacto da troca de framboesa para o morango, os resultados sugerem que de fato a troca interfere sobre os três parâmetros avaliados, fecundidade total, período de oviposição e viabilidade ovo-adulto. A nutrição pode influenciar os insetos de diferentes formas, interferindo em mecanismos fisiológicos, como regulação hormonal (KOYAMA; MENDES; MIRTH, 2013; KOYAMA; MIRTH, 2018), ou mesmo em processos comportamentais, incluindo forrageio e migração, como revisado por Raubenheimer e Simpson (2018). Além da interferência individual, a qualidade nutricional do alimento pode influenciar também o comportamento populacional já que agregação, forrageio e migrações coletivas podem ser processos motivados pela nutrição (LIHOREAU et al., 2018).

Dessa forma, a qualidade do fruto parece ser fator influente na escolha para oviposição, e, conseqüentemente para o *fitness* da prole (MATAVELLI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; SILVA-SOARES et al., 2017; YOUNG; BUCKIEWICZ; LONG, 2018). Para espécies do gênero *Drosophila* o efeito da mudança da alimentação na fase larval se faz notório na fase adulta, com reflexos diretos sobre parâmetros biométricos, pigmentação dos olhos e também no tempo de desenvolvimento (BEADLE; TATUM; CLANCY, 1938; BURGER et al., 2007; KOYAMA; MIRTH, 2018). O presente estudo não foi delineado para considerar chance de escolha das fêmeas. As diferenças nos resultados biológicos entre as gerações podem estar relacionadas com as condições nutricionais vivenciadas na geração anterior. Estudos prévios indicam que a qualidade da fonte nutricional de adultos de *Drosophila melanogaster* influencia o *fitness* da prole, com evidências de mudança em valores de parâmetros biométricos e demográficos (MATZKIN et al., 2013). Populações submetidas a maiores concentrações de proteína em relação ao carboidrato exibem maior quantidade de ovos depositados por adultos da geração subsequente (MATZKIN et al., 2013). O maior número de ovos de *D. suzukii* encontrado na geração F2 do que na F1 em insetos alimentados com morango, pode ser reflexo da condição vivenciada pelos progenitores que permaneceram na framboesa por duas gerações antes da troca do fruto.

No tocante à qualidade do fruto hospedeiro, há aspectos que dever ser discutidos, como a quantidade de nutrientes necessária para garantir o sucesso no desenvolvimento do inseto. Os organismos necessitam geralmente de uma proporção mínima nutricional, principalmente de proteína e carboidrato, para garantir tanto o sucesso das atividades

metabólicas, quanto para assegurar melhor condição para a progênie (DADD, 1985; CHAPMAN, 1998). Há estudos que utilizam a interação entre o balanço nutricional e o ambiente, através do conceito de Geometria Nutricional. Neles são feitas dietas artificiais variando proporções de proteína e carboidrato (P:C), visando avaliar o ponto ótimo para o desenvolvimento dos organismos (SIMPSON; RAUBENHEIMER, 2011).

Em *Drosophila* as proporções (P:C) estão estreitamente relacionadas com o tempo de desenvolvimento (LEE et al., 2008; MATAVELLI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015). Portanto, quanto mais distante do balanço ótimo de nutrientes o alimento estiver, mais tempo o inseto levará para concluir seu desenvolvimento. A alteração dessas proporções nutricionais, mesmo que avaliadas de forma indireta, como no caso do presente estudo, auxilia na compreensão dos efeitos que possam ocorrer sobre a viabilidade biológica e ecológica da espécie.

Diferenças foram observadas na proporção de viabilidade de ovo a adulto, entre insetos submetidos e não submetidos à troca de fruto. Os indivíduos que se encontravam no morango, mesmo apresentando fecundidade menor, e menor período de oviposição, tiveram maior proporção de viabilidade da prole. Em condições adversas no ambiente, pode haver alterações nos custos de reprodução dos indivíduos a fim de se compensar um *fitness* prejudicado, resultando nos chamados *trade-offs* (STEARNS, 1989). Na maioria dos casos é verificada a relação entre quantidade e tamanho da prole para essa compensação. Já as estratégias que relacionam quantidade de ovos com a viabilidade foram estudadas somente em se tratando de escolha de parceiros sexuais (GOWATY et al., 2007). Nestes casos, para *Drosophila pseudoobscura* o acasalamento com parceiros não preferidos, resultavam em descendentes em menor quantidade e viabilidade (GOWATY et al., 2007). Para *D. suzukii* não há relatos de estratégias de compensação envolvendo a quantidade de prole e viabilidade, em condições que houve mudança no fruto, sendo um aspecto para ser melhor investigado.

Com a troca de hospedeiros, esperava-se que o impacto negativo fosse explicado pela concentração de macronutrientes presentes nos indivíduos. Entretanto, os resultados das análises nutricionais mostraram inexistência de diferença significativa na quantidade de carboidrato, lipídeo, proteína e glicogênio em indivíduos de ambas as gerações e tratamentos. Fatores associados a esse tipo de resultado não são ainda conhecidos. Dentre as hipóteses capazes de dar suporte aos resultados encontrados poderia ser destacada a diversidade da microbiota associada a esses insetos, uma vez que bactérias simbiotes podem auxiliar na assimilação dos nutrientes de seus insetos-hospedeiros (DOUGLAS, 2009; SHIN et al., 2011; SU; ZHOU; ZHANG, 2013; SOMMER; NEWELL, 2018), o que provavelmente deve ocorrer

de forma particularizada em diferentes espécies ou populações. Ainda que os insetos consigam ingerir quantidade ótima de nutrientes, a assimilação dos componentes nutricionais pode depender diretamente da ação da microbiota. Assim, o desenvolvimento de insetos polípagos, pode estar sujeito a ação simultânea de diferentes fatores, incluindo ação endossimbiótica, como já demonstrado para *Drosophila melanogaster* (SHIN et al., 2011). A diversidade dos simbiossios pode também estar associada às condições do ambiente, podendo ser alterada de acordo com a fonte alimentar do hospedeiro (OBADIA et al., 2018; YUN et al., 2014; GUIDOLIN; CÔNSULI, 2017). No presente estudo, no entanto, não foi possível verificar diferença entre indivíduos que se alimentaram de framboesa quanto para aqueles que se alimentaram de morango.

Embora a interação com a microbiota pode estar associada à sobrevivência do inseto em diferentes ambientes por causar efeitos na fisiologia do hospedeiro, como já reportado para essa espécie (BING et al 2018), não foi encontrada diferença significativa na diversidade de simbiossios em relação aos tratamentos investigados. Além disso, os resultados encontrados com os índices de diversidade foram maiores que os relatados anteriormente para *D. suzukii* (CHANDLER et al., 2014; MARTINEZ-SAÑUDO et al., 2017). A alta diversidade encontrada pode ser explicada pelo fato de que não foi feita a extração do material genético de simbiossios exclusivamente do trato digestivo como realizado por esses autores. Em relação à diversidade beta não ser distinta significativamente entre os tratamentos, o que também não corrobora os resultados para metagenômica dessa espécie, é possível sugerir uma estabilidade da comunidade de bactérias em condições de troca de hospedeiro, pelo menos em escala ecológica, ou seja entre duas gerações. Embora em alguns casos saiba-se que a microbiota pode ser alterada de acordo com a planta-hospedeira que o inseto se encontra (GUIDOLIN; CÔNSULI, 2017), não se sabe quantas gerações são necessárias para que ocorra totalmente a modificação da microbiota. Considerando o delinamento experimental utilizado no presente estudo, duas gerações não foram suficientes para que fosse possível observar essa modificação, ou ainda para confirmar que de fato se essa espécie for submetida à troca por mais gerações, a microbiota se mantém estável quanto à riqueza.

Quanto aos níveis taxonômicos da microbiota, os filos encontrados se assemelham aos dos microrganismos já evidenciados para *D. suzukii*, com predominância de Proteobacteria (CHANDLER et al., 2014; MARTINEZ-SAÑUDO et al., 2017). Em relação aos demais níveis taxonômicos, devido à alta diversidade encontrada entre a mesma amostra e entre os tratamentos, há semelhança entre as famílias de maiores proporções, já discutidas anteriormente para *D. suzukii*.

Quando verificados os resultados entre os estágios em que a microbiota foi investigada, foi confirmada estabilidade dos simbioss em relação à riqueza, o que leva à discussão dos modos de transmissão e aquisição da microbiota. As OTUs encontradas não são consideradas como simbioss obrigatórios para essa espécie, podendo assim ser microrganismos adquiridos no ambiente, sugerindo até uma transferência horizontal, com papel importante no hospedeiro dada às condições em que os insetos se encontram. A transmissão horizontal de simbioss importantes para aspectos ecológicos do hospedeiro foi verificada entre espécies próximas de afídeos (OLIVER et al., 2010), mas para drosofilídeos, em especial para *D. suzukii*, são necessários estudos que verifiquem o papel desses simbioss, associados aos modos de transmissão e aquisição.

Um resultado interessante encontrado foi a presença de *Wolbachia* em apenas indivíduos do sudeste, no entanto ainda não se sabe a quais linhagens pertencem para se assegurar do provável papel que esse microrganismo poderia estar exercendo nesses indivíduos. Em outras espécies de *Drosophila*, a presença de *Wolbachia* pode estar associada à defesa do inseto hospedeiro (TEIXEIRA; FERREIRA; ASHBURNER, 2008; HEDGES et al., 2008) e à incompatibilidade citoplasmática (BOURTZIS et al., 1996), porém para *D. suzukii* o fato pode estar relacionado a outros aspectos ainda não conhecidos. Apesar de haver compartilhamento de haplótipos e fluxo gênico entre as populações sul e sudeste de *D. suzukii* (FERRONATO et al., 2018), a aquisição dessa bactéria na população do sudeste pode sugerir que os indivíduos coletados nesta região talvez tenham origem diferente.

Já em relação aos resultados obtidos no modelo conjunto para *D. suzukii*, levando em conta o parâmetro de associação, parece que a quantidade de ovos está associada ao período de sobrevivência. Infelizmente ainda não há estudos prévios para confirmar esse tipo de relação. A abordagem de associação mais comum de ser encontrada na literatura correlaciona parâmetros biométricos ou biológicos com gradientes ambientais ou condições de estresse (DAVID et al., 2006; SHEARER et al., 2016; WOODS et al., 2002; YASSIN; DAVID; BITNER-MATHÉ, 2009). Nesses estudos a ênfase está em compreender a plasticidade fenotípica de uma espécie em clines, como é o caso de populações de *Zaprionus indianus*, detentoras de padrões de comprimento de asa e proporções de asa/tórax associados à latitude (DAVID et al., 2006).

No presente estudo não se teve o intuito de verificar padrões comportamentais de acordo com fruto-hospedeiro, em macro escala como no caso dos estudos supracitados. A abordagem utilizada foi meramente ecológica, não dispondo de delineamento para avaliar aspectos evolutivos. Entretanto, os resultados produzidos podem auxiliar na interpretação de

dados vinculados a estudos centrados na dinâmica do inseto em campo, quando se pretende avaliar o potencial de colonização de novos hospedeiros pela quantidade de ovos depositada.

A relação ecológica entre as diversas espécies de drosofilídeos e suas mais variadas fontes de alimento tem sido sistematicamente estudada (BURUGA; OLEMBA, 1971), dada a importância dessas espécies no processo de amadurecimento de frutos. Entretanto, considerando as modificações na estrutura de oviposição de fêmeas de *D. suzukii* (ATALLAH et al., 2014), e a expressão de genes associados aos quimiorreceptores (CRAVA et al., 2016) a relação com a fonte alimentar, frutos hospedeiros em especial, ganhou maior relevância. Por conseguir perfurar o tegumento de frutos ainda sadios, *D. suzukii* passou a ter o *status* de praga, sendo a troca de frutos um aspecto altamente relevante para o contexto da fruticultura. Os resultados obtidos no presente estudo, assim, permitem compreender melhor a dinâmica de troca de hospedeiros em *D. suzukii*, em especial, para cenários em que há diferentes paisagens agrícolas com disponibilidade espaço-temporal de diferentes frutos hospedeiros.

7. CONCLUSÃO

Com esse estudo foi possível verificar que há diferença na relação inseto-hospedeiro entre populações de regiões distintas, especificamente sul e sudeste. Observou-se ainda alteração nos parâmetros biológicos como fecundidade, período de oviposição e viabilidade da prole. Os dados fisiológicos evidenciaram que não houve alteração na concentração de nutrientes assimilados quando em frutos diferentes, podendo estar relacionados a estratégias da espécie para manter a homeostase nutricional.

Ainda que as populações sul e sudeste tenham mostrado diferença quanto à presença de *Wolbachia*, os dados de metagnômica revelaram que há uma estabilidade da comunidade de bactérias presentes nos indivíduos de *D. suzukii* entre as populações e quando submetidos à troca de fruto hospedeiro. Para compreender como essa estruturação da comunidade pode interferir em aspectos ecológicos desse inseto são necessários outros estudos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. et al. Behavioral and Antennal Responses of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to Volatiles from Fruit Extracts. **Environmental Entomology**, v. 44, n. 2, p. 356–367, 2015.
- ATALLAH, J. et al. The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 1–9, 2014.
- BEADLE, G. W.; TATUM, E. L.; CLANCY, C. W. Food level in relation to rate of development and eye pigmentation in *Drosophila melanogaster*. **The Biological Bulletin**, v. 75, n. 3, p. 447–462, 1938.
- BING, X. et al. Nutrient-Dependent Impact of Microbes on *Drosophila suzukii* Development. **mBio**, v. 9, n. 2, p. 1–18, 2018.
- BLACKBURN, T. M. et al. A proposed unified framework for biological invasions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, n. 7, p. 333–339, 2011.
- BOLDA, M. P.; GOODHUE, R. E.; ZALOM, F. G. Spotted Wing Drosophila: Potential Economic Impact of a Newly Established Pest. **Agricultural and Resource Economics Update**, v. 13, n. 3, 2010.
- BOURTZIS, K. et al. Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. **Genetics**, v. 144, n. 3, p. 1063–73, 1996.
- BRUCE, K. D. et al. High carbohydrate-low protein consumption maximizes *Drosophila* lifespan. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 10, p. 1129–1135, 2013.
- BURGER, J. M. S. et al. The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. **Aging Cell**, v. 6, n. 1, p. 63–71, 2007.
- BURRACK, H. J. et al. Variation in selection and utilization of host crops in the field and laboratory by *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae), an invasive frugivore. **Pest Management Science**, v. 69, n. 10, p. 1173–1180, 2013.
- BURUGA, J. H.; OLEMBO, R. J. Plant Food Preferences of Some Sympatric Drosophilids of Tropical Africa. **Source: Biotropica**, v. 3, n. 2, p. 151–158, 1971.
- CALABRIA, G. et al. First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. **J. Appl. Entomol.**, v. 136, p. 139–147, 2012.
- CARVALHO, G. B.; KAPAHI, P.; BENZER, S. Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. **Nature Methods**, v. 2, n. 11, p. 813–815, 2005.
- CHAPMAN, R. F. **The insects- Structure and Function**. 4th. ed. Nova York: Cambridge University Press, 1998, p.69-93.

CHANDLER, J. A. et al. The bacterial communities of *Drosophila suzukii* collected from undamaged cherries. **Peer J**, p. 1–10, 2014.

CICHÓN, L.; GARRIDO, S.; LAGO, J. Primera detección de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1939) (Diptera: Drosophilidae) en frambuesas del Valle de Río Negro, Argentina. In: **IX Congreso Argentino de Entomología Posadas: libro de resúmenes. Universidad Nacional de Misiones**, Posadas. 2015.

CHOW, D. M.; FRYE, M. A. The neuro-ecology of resource localization in *Drosophila*. **Fly**, v. 3, n. 1, p. 50–61, 2009.

CINI, A.; IORIATTI, C.; ANFORA, G. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. **Bulletin of Insectology**, v. 65, n. 1, p. 149–160, 2012.

CRAVA, C. M. et al. Evolutionary Insights into Taste Perception of the Invasive Pest *Drosophila suzukii*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. December, p. 4185–4196, 2016.

CNA- **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**, 2017. Disponível em: <<http://www.cnabrazil.org.br/>> Acesso em 27/07/2017.

DA SILVA DÖGE, J.; DE OLIVEIRA, H. V.; TIDON, R. Rapid response to abiotic and biotic factors controls population growth of two invasive drosophilids (Diptera) in the Brazilian Savanna. **Biological invasions**, v. 17, n. 8, p. 2461–2474, 2015.

DADD, R.H. Nutrition: Organisms. In: **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. OXFORD: Pergomon Press, 1985, v. 4. cap. 8, p. 313–390.

DAVID, J. R. et al. Quantitative trait analysis and geographic variability of natural populations of *Zaprionus indianus*, a recent invader in Brazil. **Heredity**, v. 96, n. 1, p. 53–62, 2006.

DEMÉTRIO, C.G.B., HINDE, J., MORAL, R.A. Models for overdispersed data in Entomology. In: Ferreira, C.P., Godoy, W.A.C. (Eds.) **Ecological Modelling Applied to Entomology**, Springer, 2014

DEPRÁ, M. et al. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 3, p. 379–383, 2014.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and Their Symbiotic Bacteria *Buchnera*. **Annual Reviews in Entomology**, v. 43, p. 17–37, 1998.

DOUGLAS, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology. **Functional Ecology**, v. 23, n. 1, p. 38–47, 2009.

FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 5, p. 533–543, 2011.

FERRONATO, P. et al. A Phylogeographic Approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Invasion in Brazil. **Journal of economic entomology**, 2018.

GARNAS, J. R. et al. Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. **Biological Invasions**, v. 18, n. 4, p. 935–952, 2016.

GEISLER, F. C. S. et al. Primeiro registro de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) para o estado do paran, Brasil e de novos hospedeiros. **Revista de Cincias Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 429–436, 2015.

GORDON, C. Natural Breeding sites of *Drosophila obscura*. **Nature**, v. 149, 1942.

GOWATY, P. A. et al. The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. **PNAs**, v. 104, n. 38, p. 3–5, 2007.

GUIDOLIN, A. S.; CNSOLI, F. L. Symbiont Diversity of *Aphis* (Toxoptera) *citricidus* (Hemiptera: Aphididae) as Influenced by Host Plants. **Microbial Ecology**, v. 73, p. 1–10, 2017.

GUILLEMAUD, T. et al. Biological invasions in agricultural settings: Insights from evolutionary biology and population genetics. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 3, p. 237–246, 2011.

GUPTA, J.P. Description of a new species of Phorticella and *Zaprionus* (Drosophilidae) from ndia. **Proc. Indian Nat. Sci. Acad.**, v. 36, p. 62–70, 1970

HAUSER, M. A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera : Drosophilidae) in the continental United States , with remarks on their identification. **Pest Manag Sci**, v. 67, p. 1352–1357, 2011.

HEDGES, L. M. et al. *Wolbachia* and virus protection in insects. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 702, 2008.

HENRY, L. M. et al. Report Horizontally Transmitted Symbionts and Host Colonization of Ecological Niches. **CURBIO**, v. 23, n. 17, p. 1713–1717, 2013.

ISHIKAWA, H. Insect Symbiosis: An Introduction. In **Insect symbiosis**. BOURTZIS, K. & MILLER, T. A. CRC Press. v.1 cap. 1. p. 1–21, 2003.

KANESHIRO, K. Y. *Drosophila (Sophophora) suzukii* (Matsumura). In: **Proc Hawaiian Entomol Soc**. 1983. p. 179.

KENIS, M. et al. Ecological effects of invasive alien insects. **Biol Invasions (2009)**, v. 11, p. 21–45, 2009.

KINJO, H. et al. Oviposition efficacy of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on different cultivars of blueberry. **Journal of economic entomology**, v. 106, n. 4, p. 1767–71, 2013.

KOYAMA, T.; MENDES, C. C.; MIRTH, C. K. Mechanisms regulating nutrition-dependent developmental plasticity through organ-specific effects in insects. **Frontiers in physiology**, v. 4, 2013.

KOYAMA, T.; MIRTH, C. K. Unraveling the diversity of mechanisms through which nutrition regulates body size in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 25, 2018.

LAUZON, C. R.; POTTER, S. E.; PROKOPY, R. J. Degradation and detoxification of the dihydrochalcone phloridzin by *Enterobacter agglomerans*, a bacterium associated with the apple pest, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae). **Environmental Entomology**, v. 32, n. 5, p. 953–962, 2003.

LEE, J. C. et al. In Focus : Spotted wing drosophila , *Drosophila suzukii* , across perspectives. **PestManag Sci**, v. 67, p. 1349–1351, 2011a.

LEE, J. C. et al. The susceptibility of small fruits and cherries to the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1358–1367, 2011b.

LEE, K. P. et al. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2498–2503, 2008.

LIHOREAU, M. et al. Social nutrition : an emerging field in insect science. **Current opinion in insect science**, 2018.

LUCIA MARY, A.; GOÑI, B. *Drosophila suzukii* (Matsumura) found in Uruguay. **Dros. Inf. Serv. No Nature Communications**, v. 98, n. 10, p. 67–75, 2015.

MATAVELLI, C. et al. Differences in larval nutritional requirements and female oviposition preference reflect the order of fruit colonization of *Zaprionus indianus* and *Drosophila simulans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 82, 2015.

MARTINEZ-SAÑUDO, I. et al. Metagenomic analysis reveals changes of the *Drosophila suzukii* microbiota in the newly colonized regions. **Insect science**, v. 25, n. 5, p. 833–846, 2018.

MATSUMURA, S. **6000 illustrated insects of Japan-empire** (in Japanese). Tokohshoin, Tokyo, 1931, 1497 pp.

MATZKIN, L. M. et al. Preadult Parental Diet Affects Offspring Development and Metabolism in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–6, 2013.

MEDINA-MUÑOZ, M. C. et al. *Drosophila suzukii* arrived in Chile. **Dros. Inf. Serv.**, v. 98, n. 23, p. 136–137, 2015.

MORAL, R.A., HINDE, J., DEMÉTRIO, C.G.B. Half-normal plots and overdispersed models in R: the hnp package. **Journal of Statistical Software** v. 81, n. 10, p. 1–23, 2017.

MÜLLER, F. A.; NAVA, D. E. **Primeiro relato de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) em frutos de araçá e pitanga em municípios da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. XXV Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais...2014** Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1003107/1/resumo1750.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2017

- OBADIA, B. et al. Diet influences host – microbiota associations in *Drosophila*. **PNAs**, v. 115, n. 20, p. 4547–4548, 2018.
- OLIVER, K. M. et al. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 247–266, 2010.
- PALLADINO, P. Ecological Theory and Pest Control Practice: A Study of the Institutional and Conceptual Dimensions of a Scientific Debate. **Social Studies of Science**, v. 20, n. 2, p. 255–281, 1990.
- PARACER, S.; AHMADJIAN, V. **Symbiosis: an introduction to biological associations**. Oxford University Press, 2000.
- PAULA, M. A.; LOPES, P. H. S.; TIDON, R. First record of *Drosophila suzukii* in the Brazilian Savanna. **Drosophila Information Service**, v. 97, p. 113–115, 2014.
- POOL, A. H.; SCOTT, K. Feeding regulation in *Drosophila*. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 29, p. 57–63, 2014.
- POYET, M. et al. The wide potential trophic niche of the asiatic fruit fly *Drosophila suzukii*: The key of its invasion success in temperate Europe? **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015.
- RAGA, A. Mosca do figo. In: Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto biológico, 7, Indaiatuba. Anais. Campinas, p. 54-57, 2002.
- RAUBENHEIMER, D.; SIMPSON, S. J. Nutritional ecology and foraging theory. **Current Opinion in Insect Science**, v. 27, p. 1–8, 2018.
- RIZOPOULOS, D. JM: An R package for the joint modelling of longitudinal and time-to-event data. **Journal of Statistical Software** v. 35, n.9, p.1-33, 2010.
- RODRIGUES, M. A. et al. *Drosophila melanogaster* larvae make nutritional choices that minimize developmental time. **Journal of Insect Physiology**, v. 81, p. 69–80, 2015.
- ROE, J. H. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. **J. biol. Chem.**, v. 212, p. 335–343, 1955.
- ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. Symbiosis and development: The hologenome concept. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 56–66, 2011.
- SANTOS, R. S. S. DOS. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) atacando frutos de morangueiro no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 4005–4011, 2014.
- SENASICA. **Mosca del vinagre de alas manchadas *Drosophila suzukii* Matsumura**. Coyoacán, México: [s.n.].
- SHAPIRA, M. Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 31, n. 7, p. 539–549, 2016.

SHEARER, P. W. et al. Seasonal cues induce phenotypic plasticity of *Drosophila suzukii* to enhance winter survival. **BMC Ecology**, 2016.

SHIN, S. C. et al. *Drosophila* Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 670–4, 2011.

SCHOONHOVEN, L. M; VAN LOON, J. J.; DICKE, M. **Insect-plant biology**. 2nd. ed. Oxford University Press on Demand, 2005.

SILVA-SOARES, N. F. et al. Adaptation to new nutritional environments: larval performance, foraging decisions, and adult oviposition choices in *Drosophila suzukii*. **BMC Ecol**, v. 17, n. 21, 2017.

SILVA, I. B; DA SILVA, S. E.; GODOY, W. A. C., *Drosophila suzukii* occurrence in a native forest fragment in São Paulo state, Brazil. **Dros. Inf. Serv**, v. 101, 2018.

SILVEIRA, S. V. DA; et al. **Diagnóstico do Sistema de Produção do Quivi em Pomares de Farroupilha/RS: Principais Demandas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1025615/1/Doc93.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

SIMBERLOFF, D. et al. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 1, p. 58–66, 2013.

SIMPSON, S. J.; RAUBENHEIMER, D. The nature of nutrition: a unifying framework Review. **Australian Journal of Zoology**, v. 59, p. 350–368, 2011.

SIVORI, R. et al. **Ocorrência e Danos de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) em Pomar de Macieira**. Bento Gonçalves, RS: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1041133/1/ComunicadoTecnico180.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

SOMMER, A. J.; NEWELL, P. D. Metabolic Basis for Mutualism Between Gut Bacteria and Its Impact on Their Host *Drosophila melanogaster*. **Appl. Environ. Microbiol**, 2018.

SOUZA, G. K. et al. *Acca sellowiana* (Myrtaceae): a new alternative host for *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae) in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 1, p. 190–191, 2017.

STEARNS, A. S. C. Trade-Offs in Life-History Evolution. **British Ecological Society**, v. 3, n. 3, p. 259–268, 1989.

SU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Symbiont-mediated functions in insect hosts. **Communicative and Integrative Biology**, v. 6, n. 3, p. 1–7, 2013.

TATAR, M.; POST, S.; YU, K. Nutrient control of *Drosophila* longevity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 509–517, 2014.

TEIXEIRA, L.; FERREIRA, Á.; ASHBURNER, M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. 2753–2763, 2008.

THERNEAU, T.M., GRAMBSCH, P. **Modeling survival data: Extending the Cox model.** Springer, New York, 2000.

USDA- Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference - Raw Strawberries. Nutrient Data Laboratory. [Citação: 10 de dezembro de 2018.] [Online]

VAN HANDEL, E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 1, n. 3, p. 302–304, 1985.

VILELA, C. R.; MORI, L. The invasive spotted-wing *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) has been found in the city of São Paulo (Brazil). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 4, p. 371–375, 2014.

WALSH, D. B. et al. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 2, n. 1, 2011.

WILLIAMSON, M. H.; FITTER, A. The characters of successful invaders. **Biological Conservation**, v. 78, p. 163–170, 1996.

WONG, J. S. et al. Physiological status of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) affects their response to attractive odours. **Journal of Applied Entomology**, n. October 2017, p. 1–10, 2018.

WOODS, R. E. et al. Fluctuating asymmetry, fecundity and development time in *Drosophila*: Is there an association under optimal and stress conditions? **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 146–157, 2002.

YASSIN, A.; DAVID, J. R.; BITNER-MATHÉ, B. C. Phenotypic variability of natural populations of an invasive drosophilid, *Zaprionus indianus*, on different continents: Comparison of wild-living and laboratory-grown flies. **C. R. Biologies**, v. 332, p. 898–908, 2009.

YOUNG, Y.; BUCKIEWICZ, N.; LONG, T. A. F. Nutritional geometry and fitness consequences in *Drosophila suzukii*, the Spotted-Wing *Drosophila*. **Ecology and Evolution**, p. 1–10, 2018.

YUN, J. et al. Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat , Diet , Developmental Stage , and Phylogeny of Host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5254–5264, 2014.

ZANUNCIO-JUNIOR, A. J. S. et al. Spread of Two Invasive Flies (Diptera : Drosophilidae) Infesting Commercial Fruits in Southeastern Brazil Spread of two invasive flies (Diptera : Drosophilidae) infesting commercial fruits in southeastern Brazil. **Florida Entomologist**, v. 101, n. 3, p. 522–525, 2018.

ANEXOS

ANEXO A- Figura com *Heatmap* dos filos dos endossimbiontes presentes nas amostras de ambas as populações.

ANEXO B- Tabela com teste estatístico Kruskal-Wallis par-a-par para os índices de diversidade alfa.

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sudeste_Par (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_AdF2 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_Morango_AdF3 (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sudeste_AdF1 (n=3)	Sul_Par (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sudeste_Par (n=3)	Sul_AdF2 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sudeste_Par (n=3)	Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sudeste_Par (n=3)	Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sudeste_Par (n=3)	Sul_Morango_AdF3 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sudeste_Par (n=3)	Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sudeste_Par (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sudeste_Par (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sudeste_Par (n=3)	Sul_Par (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_Morango_AdF3 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_AdF2 (n=3)	Sul_Par (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	Sul_Morango_AdF3 (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	2,33	0,127	0,356
Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sul_Framboesa_AdF3 (n=3)	Sul_Par (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	Sul_Morango_AdF3 (n=3)	2,33	0,127	0,356
Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sul_Framboesa_Larva F3 (n=3)	Sul_Par (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_Morango_AdF3 (n=3)	Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sul_Morango_AdF3 (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sul_Morango_AdF3 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	1,19	0,275	0,459

Sul_Morango_AdF3 (n=3)	Sul_Par (n=3)	3,86	0,050	0,159
Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	Sul_AdF1 (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sul_Morango_Larva F3 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sul_Larva F2 (n=3)	Sul_Par (n=3)	0,43	0,513	0,624
Sul_AdF1 (n=3)	Sul_Larva F2 (n=3)	1,19	0,275	0,459
Sul_AdF1 (n=3)	Sul_Par (n=3)	0,05	0,827	0,827
Sul_Larva F2 (n=3)	Sul_Par (n=3)	3,86	0,050	0,159

ANEXO C- Tabela com teste estatístico PERMANOVA par-a-par para o índice diversidade beta Unifrac (não ponderado).

Group 1	Group 2	Sample size	Permutations	pseudo-F	p-value	q-value
Sudeste_AdF1	Sudeste_Parentais	6	999	1,1879	0,301	0,3661
Sudeste_AdF1	Sul_AdF2	6	999	1,9852	0,113	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_Framboesa_AdF3	6	999	2,2719	0,11	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_Framboesa_Larva F3	6	999	2,3676	0,115	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_Framboesa_AdF3	6	999	3,1039	0,103	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_Framboesa_Larva F3	6	999	1,6160	0,112	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_AdF1	6	999	1,9911	0,087	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_Larva F2	6	999	2,0652	0,084	0,2352
Sudeste_AdF1	Sul_Parentais	6	999	1,5087	0,207	0,2725
Sudeste_Parentais	Sul_AdF2	6	999	1,1032	0,205	0,2725
Sudeste_Parentais	Sul_Framboesa_AdF3	6	999	1,2711	0,209	0,2725
Sudeste_Parentais	Sul_Framboesa_Larva F3	6	999	1,6723	0,094	0,2352
Sudeste_Parentais	Sul_Morango_AdF3	6	999	1,5652	0,107	0,2352
Sudeste_Parentais	Sul_Morango_Larva F3	6	999	1,0123	0,479	0,5389
Sudeste_Parentais	Sul_AdF1	6	999	1,1067	0,213	0,2725
Sudeste_Parentais	Sul_Larva F2	6	999	1,5302	0,1	0,2352
Sudeste_Parentais	Sul_Parentais	6	999	1,0364	0,376	0,4453
Sul_AdF2	Sul_Framboesa_AdF3	6	999	1,3549	0,211	0,2725
Sul_AdF2	Sul_Framboesa_Larva F3	6	999	1,5392	0,13	0,2543
Sul_AdF2	Sul_Morango_AdF3	6	999	1,3179	0,213	0,2725
Sul_AdF2	Sul_Morango_Larva F3	6	999	1,2185	0,204	0,2725
Sul_AdF2	Sul_AdF1	6	999	1,3079	0,211	0,2725
Sul_AdF2	Sul_Larva F2	6	999	1,6446	0,089	0,2352
Sul_AdF2	Sul_Parentais	6	999	1,3498	0,189	0,2725
Sul_Framboesa_AdF3	Sul_Framboesa_Larva F3	6	999	2,0589	0,113	0,2352
Sul_Framboesa_AdF3	Sul_Morango_AdF3	6	999	1,2415	0,199	0,2725
Sul_Framboesa_AdF3	Sul_Morango_Larva F3	6	999	1,2639	0,181	0,2725
Sul_Framboesa_AdF3	Sul_AdF1	6	999	0,7620	0,709	0,7251
Sul_Framboesa_AdF3	Sul_Larva F2	6	999	2,1436	0,095	0,2352
Sul_Framboesa_AdF3	Sul_Parentais	6	999	0,9615	0,398	0,4592
Sul_Framboesa_Larva F3	Sul_Morango_AdF3	6	999	2,6040	0,101	0,2352
Sul_Framboesa_Larva F3	Sul_Morango_Larva F3	6	999	1,7657	0,097	0,2352
Sul_Framboesa_Larva	Sul_AdF1	6	999	2,1890	0,097	0,2352

F3						
Sul_Framboesa_Larva F3	Sul_Larva F2	6	999	0,6161	1	1,0000
Sul_Framboesa_Larva F3	Sul_Parentais	6	999	1,8041	0,106	0,2352
Sul_Morango_AdF3	Sul_Morango_Larva F3	6	999	1,7330	0,096	0,2352
Sul_Morango_AdF3	Sul_AdF1	6	999	1,4025	0,199	0,2725
Sul_Morango_AdF3	Sul_Larva F2	6	999	2,7603	0,107	0,2352
Sul_Morango_AdF3	Sul_Parentais	6	999	1,6988	0,094	0,2352
Sul_Morango_Larva F3	Sul_AdF1	6	999	1,0286	0,518	0,5685
Sul_Morango_Larva F3	Sul_Larva F2	6	999	1,4826	0,218	0,2725
Sul_Morango_Larva F3	Sul_Parentais	6	999	0,9173	0,615	0,6436
Sul_AdF1	Sul_Larva F2	6	999	2,0632	0,101	0,2352
Sul_AdF1	Sul_Parentais	6	999	0,8619	0,598	0,6407
Sul_Larva F2	Sul_Parentais	6	999	1,7289	0,091	0,2352