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

**Uma abordagem filogeográfica da espécie invasora *Drosophila
suzukii* (Diptera: Drosophilidae) no Brasil**

Petra Ferronato Gomes de Abreu

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

**Piracicaba
2018**

Petra Ferronato Gomes de Abreu
Licenciada em Ciências Biológicas

Uma abordagem fitogeográfica da espécie invasora *Drosophila suzukii*
(Diptera: Drosophilidae) no Brasil

Orientador:
Prof. Dr. **ALBERTO SOARES CORRÊA**

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

Piracicaba
2018

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

Abreu, Petra Ferronato Gomes de

Uma abordagem filogeográfica da espécie invasora *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) no Brasil / Petra Ferronato Gomes de Abreu. - Piracicaba, 2018.

50 p.

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

1. *Drosophila* da asa manchada 2. Espécie invasora 3. Rotas de invasão 4. Demografia I. Título

Dedico

A todos os produtores rurais que junto à academia possibilitam a produção de conhecimento para um manejo apropriado dos nossos sistemas agrícolas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa pela orientação, dedicação e aprendizado. Por ser um orientador presente, paciente e incentivador. Por elaborar com calma e de forma horizontal, apesar da ansiedade, a realização desse trabalho. Agradeço também pela amizade e suporte dado nesses dois anos.

Ao núcleo familiar pelo suporte, carinho e amor. Pelo incentivo na caminhada profissional e por acreditar na direção que sigo. Pela força nesses dois difíceis anos, ainda que, encarando duas perdas devastadoras, ficamos unidos e nos apoiamos. Por poder contar com vocês e por serem sinceros e verdadeiros comigo sempre.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Artropodes (ESALQ/USP) pelos ensinamentos de molecular concedidos. Em especial, Dayana Sousa, pela grande amizade e por ser minha “fiel escudeira”. Laura Pantoja e Cleane Souza pela amizade, incentivo, paciência, conversas e risadas. Ana Luiza Wock, Patrícia, Victoria e Beatriz pela amizade, ajuda nos experimentos e carinho.

Aos amigos de Piracicaba, Fernanda, Karen, Taciana, Marcela, Camila, Lucas, Nara, Felipe e Emanulle pela companhia, apoio, risadas e amizade.

A toda grande família de Campinas, que me recordavam dos princípios, lutas e sonhos que me fizeram chegar até aqui. Que me acolheram e me escutaram quando preciso sempre mostrando alternativas nos caminhos. Pelo infinito amor e alegria. Em especial, Caio Melo por todos os momentos de carinho, de incentivo, questionamento e reflexão.

A toda grande família de São Paulo, pelos anos de alegria e amizade, por saberem lidar comigo como ninguém e me conduzirem a superação dos momentos difíceis. Por me ajudarem da forma mais carinhosa e sincera a seguir em frente.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela dedicação e aos serviços prestados.

A Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Pós-Graduação em Entomologia e ao corpo docente pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pelos conhecimentos adquiridos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito desta jornada o meu sincero agradecimento.

Muito Obrigada.

*“O homem não sabe mais que os outros animais;
sabe menos.*

Eles sabem o que precisam saber.

Nós não”.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. ESPÉCIES INVASORAS	11
2.2. GENÉTICA DE POPULAÇÕES	12
2.3. FILOGEOGRAFIA E ESTUDOS DEMOGRÁFICOS.....	14
2.4. MARCADORES MITOCONDRIAIS	15
2.5. MORFOLOGIA DE <i>DROSOPHILA SUZUKII</i>	16
2.6. BIOECOLOGIA DE <i>D. SUZUKII</i>	18
2.7. DANOS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DE <i>D. SUZUKII</i>	19
2.8. INVASÃO E ORIGEM DE <i>D. SUZUKII</i>	21
2.9. OBJETIVO GERAL.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	25
3.2. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>COI</i> E SEQUENCIAMENTO	25
3.3. ANÁLISE DE DIVERSIDADE, DEMOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL	26
3.4. INFERÊNCIAS GENEALÓGICAS	27
4. RESULTADOS	29
4.1. ANÁLISE DE DIVERSIDADE, DEMOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL	29
4.2. INFERÊNCIAS GENEALÓGICAS	34
5. DISCUSSÃO	37
5.1. ANÁLISE DE DIVERSIDADE, DEMOGRAFIA E ESTRUTURA POPULACIONAL	37
5.2. INFERÊNCIAS GENEALÓGICAS	38
5.3. PREOCUPAÇÕES FITOSSANITÁRIAS.....	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	49

RESUMO

Uma abordagem filogeográfica para a invasão de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) no Brasil

As invasões biológicas tem alcançado ampla disseminação devido a ações antrópicas em todo o planeta. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), é uma espécie invasora global que vem promovendo grandes danos às culturas agrícolas. Nativa do Sudeste Asiático, *D. suzukii* recentemente (ano de 2013) invadiu e se dispersou pela América do Sul. Aqui, utilizamos uma abordagem filogeográfica baseada no fragmento do gene COI para explorar a dinâmica de invasão das populações de *D. suzukii* no Brasil. Identificamos cinco haplotipos e uma diversidade genética moderada nas populações brasileiras, que estão em expansão demográfica e espacial. A AMOVA indicou uma alta estrutura genética entre as populações, o que é parcialmente explicado pela sua origem morfoclimática e história de invasão. *D. suzukii* expandiu do sul para o sudeste do Brasil, auxiliado pelo transporte de frutas mediado por humanos de região para região. O compartilhamento de haplótipos entre as regiões brasileiras e outras regiões invadidas do mundo sugere um único evento de invasão de *D. suzukii* no Brasil, originário de áreas previamente invadidas (como América do Norte e Europa). A rápida dispersão geográfica e a grande variedade de frutas atacadas por *D. suzukii* requerem implementação imediata de estratégias de controle (legais e fitossanitárias) para gerenciar esta praga no Brasil.

Palavras-chave: *Drosophila* de asa manchada; Espécie invasora; Rotas de invasão; Demografia

ABSTRACT

A phylogeographic approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) invasion in Brazil

Biological invasions have reached large parts of the globe, due to human actions across the planet. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) is a globally invasive species, always associated with enormous and costly damage to agricultural crops. Native to Southeast Asia, *D. suzukii* recently (i.e. 2013) invaded and is dispersing through South America. Here, we used a phylogeographic approach based on the COI gene fragment to explore the invasion dynamics of *D. suzukii* populations in Brazil. We identified five haplotypes and moderate genetic diversity in Brazilian populations, which are undergoing demographic and spatial expansion. The AMOVA indicated a high genetic structure among the populations, which is partially explained by their morphoclimatic origin and invasion history. *D. suzukii* expanded from southern to southeastern Brazil, aided by human-mediated transport of fruits from region to region. The sharing of haplotypes among Brazilian and other invaded regions of the world suggests a single invasion event of *D. suzukii* in Brazil, originating from previously invaded areas (e.g., North America and Europe). The rapid geographic dispersal and wide variety of fruits attacked by *D. suzukii* require immediate implementation of control strategies (legal and phytosanitary) to manage this pest in Brazil.

Keywords: Spotted wing drosophila; Invasive pest; Invasion routes; Demography

1. INTRODUÇÃO

Os impactos causados por invasões biológicas nas comunidades e nos ecossistemas são complexos (Simberloff 2013). As espécies invasoras podem alterar o meio ambiente, representando uma séria ameaça para a biodiversidade nativa, bem como uma possível causadora de danos à agricultura, silvicultura, pesca e saúde humana (Mack et al., 2000; Lee 2002; Paini et al 2016). Relatos recentes das espécies *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) na América do Sul e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) na África exemplificam os impactos negativos de insetos invasores em sistemas agrícolas (Tay et al., 2013; Goergen et al., 2016; Day et al 2017, Durigan et al., 2017).

O aumento da ocorrência de pragas invasoras na agricultura nos últimos anos é frequentemente relacionado à ampliação de atividades do comércio mundial (Paini et al., 2016). Normalmente, o conhecimento sobre as rotas de introdução de pragas provém de dados históricos e observacionais sendo esses muitas vezes escassos, incompletos ou mesmo enganosos. Neste contexto, a genética de população fornece ferramentas úteis para reconstruir rotas de introdução, integrando a estrutura populacional em modelos genealógicos e demográficos (Beheregaray 2008; Estout e Guillemaud 2010). Os estudos de diversidade intraespecífica utilizando marcadores moleculares permitem avaliar a estrutura da população, o fluxo de genes e a expansão / retração da população, que são pistas valiosas para a compreensão do processo de invasão de uma espécie em um novo habitat (Lombaert et al., 2014; Wei et al., 2015; Cao et al., 2017).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares, as sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) são historicamente utilizadas em estudos filogenéticos e populacionais de animais (Avice 2009). Esses marcadores têm características genéticas singulares, ou seja, alta taxa de mutação, baixa taxa de recombinação, herança materna e organização genética simples, permitindo identificar linhagens genéticas ao longo do tempo e do espaço (Brown et al., 1982; Avice et al., 1987 Smith Smith e 2002). O gene mitocondrial Subunidade I do I do citocromo e Oxidase (COI) é amplamente utilizado para estudos de genética das populações de insetos (Yang et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Correa et al., 2017), incluindo uma peste agrícola invasiva recente e importante , *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) (Carvajal 2010, Calabria et al., 2012, Choi et al.,

2017, Lavrinienko et al., 2017), que permite uma compilação profunda da relação genealógica entre *D. Suzukii* em diferentes regiões do mundo.

Registrado inicialmente no Japão, *D. suzukii* é originária da Ásia e se espalhou rapidamente pelo mundo, sendo reportada na Europa, América do Norte e Central, sempre associado a graves danos econômicos aos sistemas agrícolas (Kanzawa, 1939; Calabria et al. 2012; Cini et al., 2012; Hauser et al. 2009; Asplen et al., 2015). A partir de 2013, esta mosca foi detectada no Brasil (primeiro no sul e mais tarde nas regiões sudeste), Argentina, Chile e Uruguai. A chegada à América do Sul desta mosca, que ataca tanto espécies de plantas exóticas cultivadas quanto de espécies nativas, é alarmante (Deprá et al., 2014; González et al., 2014; Medina-muñoz et al., 2015; Andreazza et al., 2016, 2017a). Diferentemente de outros drosofilídeos que atacam principalmente frutas podres ou danificadas, *D. suzukii* ataca frutos maduros em sua maioria de pele macia, como bagas e cerejas, causando perdas econômicas por danos físicos diretos, além de proporcionar condições para infecções secundárias por outros insetos ou agentes patogênicos (Mitsui et al., 2006; Walsh et al., 2011; Loriatti et al., 2017). Portanto, decifra suas rotas e dinâmicas de invasão em uma região recentemente invadida é essencial para orientar os esforços dos pesquisadores para mitigar os danos econômicos na agricultura (Cini et al., 2014).

Utilizamos uma abordagem filogeográfica baseada nas sequências do fragmento do gene COI para explorar a dinâmica de invasão das populações de *D. suzukii* no Brasil. Nossos objetivos específicos foram (a) avaliar a diversidade genética e os parâmetros demográficos das populações de *D. suzukii* no Brasil; (b) avaliar a estrutura genética e as rotas de dispersão no país; e (c) determinar a semelhança genética entre as populações brasileiras e outras populações mundiais, definindo possíveis rotas de invasão de *D. suzukii* no Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Espécies Invasoras

Espécies invasoras são definidas por se estabelecerem em um ambiente novo no qual se proliferam, se espalham e persistem no ambiente (sensu Elton 1958). Devido ao crescimento e globalização do comércio, vivemos hoje a maior transição de organismos entre continentes da história (di Castri 1989, Paini et al. 2016). As espécies invasoras se tornaram uma grande questão ecológica sobre tudo em relação às alterações ao meio ambiente quando perpetuam sua colonização (Vitousek 1990). Nesse contexto, aparecem ainda alguns paradoxos: como organismos exóticos que não estão inicialmente adaptados ao novo ambiente são capazes de se estabelecer e prosperar superando, muitas vezes, espécies nativas presumivelmente adaptadas localmente? Em alguns casos, as espécies invasoras escapam dos seus predadores e parasitas nativos ao colonizarem novas áreas. Além disso, as ações antrópicas dentro dos sistemas agrários e pecuários muitas vezes se torna um facilitador para nutrir as populações exóticas antes delas se tornarem perpetuas e incontroláveis (Mack et al 2000, Estoup et al 2016).

Das espécies que chegam a um novo ambiente apenas algumas se tornam invasoras. São definidas as invasoras aquelas que passam pela fase de lag, ou seja, uma rápida fase exponencial até que as espécies atinjam os limites de uma nova faixa e sua taxa de crescimento populacional flua (Mack et al 1985). As consequências da introdução de uma nova espécie em um ecossistema são variadas, entre elas pode ocorrer à importação de doenças e patógenos, assim como a competição, predação e hibridização de organismos sob a fauna, levando em alguns casos a extinção de espécies nativas. No caso de invasão de plantas exóticas os fatores se agravam devido às mudanças na biota como ciclagem de nutrientes, hidrologia e fluxo energético na cadeia trófica levando a alteração dos papéis das espécies nativas nas comunidades, perturbando os processos evolutivos e causando mudanças radicais nessas populações (Rhymer e Simberloff 1996).

Os processos evolutivos que permitem a ocorrência de invasões biológicas são basicamente dois: os estrangulamentos demográficos e a adição genética. O estrangulamento demográfico corresponde à redução do tamanho da população

em relação à população fonte, o que potencialmente também reduz a variação genética (Dlugosch e Parker 2008; Peischl e Excoffier 2015). Característico do efeito fundador, pequenas colônias no processo de expansão da população reduzem sua variação genética devido a processos de deriva genética e de consanguinidade entre os indivíduos que compõem a população, restringindo o sucesso da invasão (Uller e Leimu 2011). Naturalmente, o destino de muitas espécies que têm sua população reduzida resulta no risco de extinção, porém um conjunto diversificado de mecanismos permite que as populações de gargalos superem as consequências deletérias da baixa variação genética e se adaptem aos seus novos ambientes (Uller e Leimu 2011). A mistura genética corresponde a múltiplos eventos de introdução de populações nativas ou invasivas geneticamente diferenciadas que podem amortecer a redução da diversidade genética nas populações introduzidas (Kolbe et al. 2004; Rius et al. 2012).

Na agricultura os danos gerados por espécies invasoras acarretam diretamente no aumento do valor dos produtos finais devido ao acréscimo de insumos para controle e contenção da praga. Por fim, as invasões biológicas influenciam não somente os recursos agrícolas, mas também florestais, pesqueiros, afetando diretamente nos serviços ecossistêmicos e em alguns casos até na saúde humana.

O fracasso em abordar a questão das invasões bióticas pode resultar em graves consequências globais visto que em escalas atuais, as invasões bióticas juntamente com as alterações atmosféricas e oceânicas impulsionadas pelo homem são os principais agentes da mudança global. O descaso em seu controle, ainda que imprevisível, irão influenciar essas outras forças de maneira profunda (Mack et al 2000).

2.2. Genética de populações

Genética de populações é o estudo da dinâmica dos genes nas populações, tratando de princípios genéticos que resultam nas mudanças evolutivas das espécies ao longo do tempo. População nesse contexto é definida por um grupo de organismo da mesma espécie vivendo em uma área geográfica restrita, no mesmo período de tempo, e que compartilham o mesmo conjunto gênico através de cruzamentos aleatórios. Tendo como padrão indivíduos de reprodução sexuada é

esperado que ambos possuam genótipos diferentes para alguns locos. Dessa forma a variabilidade genética se refere a simples variação de alelos de um mesmo gene em um indivíduo (diploide) ou entre indivíduos de uma mesma espécie. A diversidade é contabilizada pela quantidade total de alelos existente dentro ou entre populações e/ou espécies (Freeland 2005).

Com exceção dos casos de espécies com distribuição limitadas, raras ou ameaçadas, todas as espécies já estudadas revelam algum nível de diferenciação genética entre as populações, consideramos assim que as espécies não constituem uma população única e panmítica (acasalamento totalmente ao acaso) (Freeland 2005; Avise 2000). Populações separadas biologicamente, geograficamente ou geneticamente permitem que forças diferentes atuem sobre cada população tornando as distintas. Os processos que atuam na divergência ou convergência genética das populações são a deriva genética, seleção natural e fluxo gênico (Behura 2006).

Se baseando na premissa de que somente o acaso altera as frequências alélicas, a deriva genética conta também com a interferência de outros processos que geram variação genética como mutação, recombinação, migração e seleção. Porém o principal fator da variabilidade é a mutação, já que reflete em uma mudança direta na sequência nucleotídica e conseqüentemente levando a alteração das frequências alélicas, algumas vezes refletindo também no fenótipo dos indivíduos. Os outros processos então conectados a mutação, visto que a recombinação une em um cromossomo mutações que ocorrem em genes distintos e a migração permite a mistura e fluxo das mutações. A seleção natural irá atuar na fixação ou deleção de alelos na população quando a mutação se encontrar em gene sobre seleção. Na ausência de pressão de seleção os alelos sofrem fixação ou eliminação e detrimento aleatório da deriva genética (Loxdale 2010).

A correlação entre a diversidade genética e a chance de adaptação a novas pressões seletivas é positiva em diversos casos, mostrando que a diversidade genética é o substrato para evolução das espécies, além disso, estudos genéticos quantitativos demonstraram que níveis altos de variância genética contribuem para adaptação a novos ambientes (Badyaev e Martin 2000). A colonização de novos ambientes está estritamente relacionada com a dispersão da espécie juntamente com a complexa interação de fatores abióticos e bióticos (Peterson et al. 1999). Há duas abordagens principais para estudos de dispersão e estrutura geográfica:

métodos diretos (observações reais dos movimentos de indivíduos) e indiretos (dados genéticos para inferir movimentos). No entanto, métodos diretos são muitas vezes deficientes na estimativa de fluxo gênico (Slatkin 1987). Diante disso, a obtenção de dados sobre eventos genéticos que estão relacionados à estruturação de populações, tem sido realizada principalmente por meio de marcadores moleculares (Roderick 1996).

2.3. Filogeografia e Estudos Demográficos

A filogeografia é definida como campo da ciência que estuda os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas dentro das espécies, interagindo com conhecimentos da genética molecular, genética de populações, filogenética, demografia e geográfica histórica visando à investigação de padrões de demografia como migrações, colonizações, re-colonizações e isolamento (Avise et al. 1987; Avise 2000).

Para isso, modelos e cálculos foram desenvolvidos a fim de compreender os mecanismos que geram a variabilidade genética, estrutura populacional e explicam a história demográfica. A estrutura populacional é medida normalmente pelo índice de fixação (F), sendo uma estimativa de diferenciação genética entre subpopulações medindo grau de isolamento e endocruzamento das subpopulações. O F_{st} é a medida mais inclusiva da subdivisão populacional que compara diferenciação entre populações em relação a variação intrapopulacional (Wright, 1950). No entanto, esse parâmetro possui limitações e contradições, como por exemplo, o fato de que o F_{st} não distingue entre casos em que ocorreu alta migração entre populações com um longo tempo de divergência daquelas com história comum recente em que não houve fluxo gênico. Para isso outros modelos análogos ao F_{ST} são utilizados como, por exemplo, a análise hierárquica da variância molecular AMOVA que avalia a diversidade na estrutura genética populacional levando em conta os tamanhos desiguais de amostras.

Atribuídos à demografia os testes de desvios de neutralidade aparecem como ferramentas para avaliar expansão das populações, sendo os mais utilizados o teste D de Tajima e F_s de Fu. O teste D de Tajima baseado no modelo de alelos infinitos, onde os valores positivos indicam mistura recente entre duas populações

diferentes (existência de gargalo populacional recente ou alguma forma de seleção balanceadora) e valores negativos são resultantes de uma expansão recente (Tajima 1989). O teste de F de F_u de aderência a coalescência neutra se baseia nas árvores de coalescência para verificar o padrão de polimorfismo é consistente com o modelo neutro de sítios infinitos em equilíbrio dinâmico, onde valores positivos indicam seleção balanceada, subdivisão populacional ou efeito gargalo e valores negativos indicam seleção direcional recente, seleção de alelos ligeiramente deletérios, expansão populacional ou efeito carona. Além dos testes de neutralidades citados os testes de Rag e SSD são atribuídos para validar os testes de F de F_u e D de Tajima confirmando caso a população esteja em expansão ou não.

Os resultados das análise descritas se mostram mais assertivas e fieis dependendo do marcador molecular e do organismo modelo utilizado. Na área de genética de população as sequências de regiões do mtDNA como o COI e $COII$ são ideais em estudos fitogeográficos de insetos devido alto grau de polimorfismo e rápida evolução. São fragmentos de gene muito informativos para reconstrução da filogenia intraespecífica, sendo possível inferir a história evolutiva no tempo e espaço (Templeton 2004). Mudanças no tamanho da população podem deixar traços reconhecíveis nos padrões de variabilidade genética, possibilitando, a distribuição do número de diferenças entre pares de sequências em uma amostra, pode conter informações sobre a história da população (Rogers e Harpending 1992).

2.4. Marcadores Mitocondriais

Marcadores de DNA são cada vez mais empregados nas diversas áreas da biologia, incluindo estudos de filogenética, evolução, ecologia, genômica populacional, dinâmica populacional e identificação (Roderick et al. 2012). O uso de marcadores moleculares baseados na técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR) permite a amplificação de DNA a partir de pequenas quantidades de tecido, possibilitando a purificação, manipulação, clonagem, sequenciamento, em estudos de filogenia, ecologia e estrutura geográfica de populações (Roderick 1996).

Marcadores moleculares baseados no genoma mitocondrial são os mais utilizados em estudos de filogeografia (Avice 2000). Isto se deve ao fato de algumas vantagens que o material genético desta organela possui: fácil isolamento e amplificação; é haploide; é transmitido exclusivamente através do óvulo materno; não apresenta regiões repetitivas; não apresenta recombinação nem rearranjos genéticos permanecendo inalterado até que ocorra uma mutação possibilitando assim que linhagens individuais possam ser traçadas ao longo do tempo e do espaço (Freeland 2005; Roderick, 1996). No entanto, o mtDNA evolui rapidamente, devido elevada taxa de mutações (20 vezes mais que o de DNA nuclear) (Simon et al. 1994) e apesar de ser uma técnica simples e gerar uma grande quantidade de dados de alta qualidade, precisão e confiabilidade exige o processo de sequenciamento que apresenta custos elevados em comparação a outros marcadores moleculares (Hartl e Clark 2010).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares disponíveis, sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido utilizados em estudos populacionais de diversos grupos de insetos (Avice et al. 2000; Behura 2006; Behere et al. 2007). Estudos de variabilidade intraespecífica devem ser realizados baseados em regiões do genoma mitocondrial e/ou nuclear que apresentem alto nível de polimorfismo (Ramalho et al. 2012). Os genes mitocondriais Citocromo oxidase subunidades I foram utilizados para diversos estudos de genética populacional em *D. suzukii* em outros países (Calabria et al. 2012; Carvajal 2010; Choi et al. 2017; Lavrineienko et al. 2016).

2.5. Morfologia de *Drosophila suzukii*

Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) popularmente conhecida comumente como drosófila-da-asa-manchada, mosca-da-cereja ou mosca-do-vinagre, compõe a família Drosophilidae (Díptera) grupo no qual possui mais de 4.000 espécies, onde cerca de 1.500 são pertencentes do gênero *Drosophila*. Estudos com o gênero *Drosophila* foram bem explorados devido aos avanços na genética onde muito se utilizou como organismo-modelo a espécie *Drosophila melanogaster* Meigen 1830 (Diptera: Drosophilidae) (Powell 1997). Juntamente com as pesquisas em genéticas, informações sobre o comportamento dos drosofilídeos também

foram observados associando seus ataques sempre a frutos apodrecidos ou danificados, apenas duas espécies fogem a regra por atacarem frutos saudáveis sendo elas *Drosophila pulchrella* e *D. suzukii* (Sasaki e Sato, 1995).

A drosófila-da-asa-manchada, possui cerca de 2 a 3 mm de comprimento, olhos vermelhos, 3 ocelos, antenas com aristas ramificadas, tórax castanho claro ou amarelo e listras pretas no abdômen. O dimorfismo sexual é dado nos machos por uma linha de cerdas no primeiro e segundo segmento tarsal do primeiro par de pernas conhecidas como pente tarsal e por possuírem uma pequena mancha escura no ápice das asas presente apenas nos machos adultos que originou seu nome popular nos Estados Unidos e também. Nas fêmeas é encontrado um ovipositor duplamente serreado, estreito, com uma série de dentes esclerotizados, que permite a inserção do mesmo dentro dos frutos, diferindo da maioria das fêmeas do gênero *Drosophila* onde o ovipositor é mais frágil e sem dentes esclerotizados (Hauser 2011; Walsh et al. 2011; Anfora et al. 2012; Cini et al. 2012).

Duas características únicas desse inseto que o tornam particularmente onerosa é a propensão para ataques em frutos maduros e o ovopositor serrilhado proeminente da fêmea que após a inserção causa danos físicos ao fruto hospedeiro abrindo possíveis portas para infecções secundárias por outros insetos e patógenos como fungos e bactérias (Mitsui et al. 2006; Walsh et al. 2011; Loriatti et al. 2017).

Seus ovos medem aproximadamente 0,6 x 0,2 mm de comprimento e são de coloração esbranquiçada. Vão ficando translúcidos conforme o tempo passa sendo possível visualizar a larva antes da eclosão. Possuem dois filamentos na porção terminal de uma das extremidades, com função relacionada à respiração, podendo assim auxiliar na identificação de *D. suzukii*, uma vez que existem várias espécies que apresentam quatro ou mais filamentos respiratórios nos ovos (Hauser 2011; Walsh et al. 2011).

As larvas recém-eclodidas são de coloração branco leitosa e transparentes. Em geral, apresentam 3 instares larvais, sendo as larvas de último instar com aproximadamente 4 x 9 mm (Walsh et al. 2011; Daff 2013). As pupas possuem coloração amarela-acinzentada e consistência macia no início, com o passar do tempo se tornam marrom, endurecem apresentando 2 prolongamentos em uma das faces terminais, resquício dos filamentos respiratórios das larvas (Daff 2013).

Nos adultos, as manchas escuras nas asas dos machos começam a se desenvolver 10 horas após a emergência, porém tornam-se visíveis somente após 2 dias (Walsh et al. 2011).

2.6. Bioecologia de *D. suzukii*

Drosophila suzukii, como maioria dos drosofilídeos, apresenta uma alta fecundidade. A maturidade sexual das fêmeas é alcançada em 1 ou 2 dias quando em condições favoráveis de umidade e temperatura, sendo o tempo máximo registrado de 13 dias. As fêmeas começam a ovipositar a partir do segundo dia após a emergência, podendo depositar até três ovos por fruto. Cada fêmea deposita de 7-16 ovos por dia em média, sendo capaz de ovipositar até 600 ovos durante todo seu ciclo de vida (em média 400 ovos). A oviposição máxima registrada para essa espécie foi de 160 ovos em apenas um dia, em cerejeira (Daff 2013).

As fêmeas preferem frutos em estágio de amadurecimento mais avançado, em comparação a frutos verdes (Lee et al. 2011). A deposição de ovos é aleatória, ou seja, não forma massa de ovos dentro dos frutos, comportamento frequentemente observado em outros drosofilídeos (Mitsui et al., 2006).

As larvas eclodem 2h às 72h após a oviposição e chegam ao último instar em 3 a 13 dias. A pupa ocorre geralmente dentro do fruto, podendo eventualmente ocorrer no solo, e o seu período varia de 3 a 15 dias (Daff 2013). O ciclo da *D. suzukii* varia entre 8 a 18 dias entre a oviposição e a emergência sendo essa variação intermediada na maioria das vezes pela temperatura. A longevidade média é de 21 a 66 dias (Cini et al. 2012; Daff 2013).

O melhor desempenho reprodutivo de *D. suzukii* registrado foi em temperaturas entre 20 °C a 25 °C e as melhores temperaturas para oviposição variam entre 10°C e 32°C, sendo que temperaturas que excedem essa faixa prejudicam a postura. Para os machos a exposição a temperaturas superiores a 30 °C apresentaram diminuição na fertilidade (Kinjo et al. 2014). Outros parâmetros, como período embrionário, larval e pupal também são afetados negativamente em função de altas temperaturas (Anfora et al. 2012).

Os drosofilídeos não suportam baixas temperaturas dificultando a dispersão para áreas com altas latitudes (Dalton et al. 2011). Porém foi registrado que *D. suzukii* sob temperaturas inferiores a 5 °C, pode apresentar comportamento de diapausa, ou seja, os indivíduos recém-emergidos não amadurecem sexualmente e entram em diapausa. O mesmo ocorre com adultos sexualmente maduros, sendo que estes voltam à atividade assim que a temperatura se torne adequada novamente. Em épocas frias, as fêmeas podem ovipositar centenas de ovos antes de entrar em diapausa, e podem depositar ovos por até 200 dias. Os ovos, larvas e pupas não são capazes de tolerar grandes períodos de frio intenso. O processo de diapausa desses insetos ainda não é muito claro, uma vez que não existem informações se esse processo é fisiológico ou mediado através de adaptação ambiental. Porém, acredita-se que essa capacidade tende a se desenvolver ainda mais, através de processos de migração para áreas com elevadas altitudes, aclimatização e busca por abrigo em locais de refúgios naturais ou proporcionadas pela ação humana (Anfora et al. 2012; Daff 2013).

Esse inseto apresenta grande tolerância à variação de temperaturas, havendo registro de linhagens resistentes a verões intensos, como os da Espanha, e invernos severos, como os registrados nas montanhas do Japão e regiões dos Alpes (Anfora 2012). Prefere umidades elevadas, fato que explica a ausência de relatos de danos causados em culturas de clima seco no Mediterrâneo Europeu (Hauser et al. 2009).

2.7. Danos e Importância Econômica de *D. suzukii*

Drosophila suzukii são aptas a se desenvolverem em uma grande gama de hospedeiros tanto cultivados como selvagens conhecidos como frutos de pele fina. As espécies de hospedeiros comprometidos são Rosaceae – *Fragaria Ananassa* (morango), *Rubus idaeus* (framboesa), *Rubus Fruticosus*, *Rubus laciniatus*, *Rubus armeniacus* e outras espécies de *Rubus* e híbridos da amora, *Rubus ursinus* (amora), *Prunus avium* (cereja doce), *Prunus armeniaca* (damasco), *Prunus persica* (pêssego), *Prunus domestica* (ameixa), *Eriobotrya japonica* (nêspera); Ericaceae – Espécies do gênero *Vaccinium* e híbridos do grupo dos mirtilos; Grossulariaceae - Espécies do gênero *Ribes* incluindo as groselhas cultivadas; Moraceae - *Ficus*

carica (figo), *Morus* spp. (amora); Rhamnaceae - *Rhamnus alpina* ssp. Fallax, *Rhamnus frangula* (espinheiro cervical); Cornaceae - *Cornus* spp. (Dogwood); Actinidiaceae - *Actinidia arguta* (kiwi robusto); Ebenaceae - *Diospyros kaki* (caqui); Myrtaceae – *Eugenia Uniflora* (cereja do suriname); Rutaceae - *Murraya paniculata* (jasmim de laranja); Myricaceae - *Myrica rubra* (chinês Bayberry); Caprifoliaceae - *Lonicera* spp. (madressilva); Elaeagnaceae - *Elaeagnus* spp. ; Adoxaceae - *Sambucus nigra* (ancião negro); Vitaceae - *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* Apesar da variedade de hospedeiros a preferencia de seus ataques são em frutos vermelhos (Kanzawa 1939; Lee et al. 2011; Seljak 2011; Walsh et al. 2011).

Os danos primários causados pelas fêmeas de *D. suzukii* são dado pela perfuração da superfície da fruta para depositar os ovos, e, posteriormente, pelas larvas, que se alimentam da polpa das frutas gerando seu possível colapso após alguns dias da postura. Danos secundários surgem ao longo do tempo mediados por patógenos como fungos e bactérias, que se desenvolvem a partir dos orifícios de oviposição. Além disso, o orifício atrai outras espécies que se desenvolvem em frutas danificadas, como outras drosófilas e os nitidulídeos (Coleoptera, Nitidulidae). Estimar os custos ocasionados em função do ataque de *D. suzukii* se torna complexo devido à dificuldade de mensurar danos diretos e indiretos. Os frutos infestados apresentando danos como orifícios e podridões são impedidos de se comercializar (Goodhue et al. 2011).

Os danos diretos estão ligados à perda de produtividade e qualidade dos frutos, enquanto os danos indiretos estão relacionados ao aumento no custo de produção, mão de obra, equipamento e produtos para controle e monitoramento (Lee et al. 2011). Na região do Nordeste da Itália onde se produz em larga escala pequenas frutas, foi registrado em uma propriedade de 400 ha perdas de cerca de 500 mil euros em 2010, e aproximadamente três milhões de euros, na safra seguinte por conta de ataques de *D. suzukii*. Estudos levantados nos Estados Unidos indicaram que as perdas anuais em cinco culturas (amoreira, cerejeira, framboeseira, mirtilheiro e morangueiro) chegaram a mais de 500 milhões de dólares, em apenas três Estados (Califórnia, Oregon e Washington). As perdas podem ser ainda maiores em áreas com predomínio de monocultura (Walsh et al. 2011; Anfora 2012). Em áreas onde não houve controle ou que a presença de *D. suzukii* foi negligenciada, a perda direta chegou a 80% da produtividade (Lee et al. 2011).

2.8. Invasão e Origem de *D. suzukii*

Atualmente *D. suzukii* vem emergindo como uma ameaça global (Fig. 1) devido tanto à sua rápida expansão quanto ao impacto econômico das populações colonizadas (Adrion et al. 2014).

Figura 1. Distribuição global de *D. suzukii*.

Fonte: <https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>

O primeiro relato descrito sobre *D. suzukii* foi dado no Japão em 1916 em cultivos de cereja (Kanzawa 1936). Com o passar dos anos outros relatos sobre a incidência da mosca surgiram pelos países asiáticos como no leste da China (Peng 1937), Taiwan (Lin et al. 1977), norte da Índia (Parshad e Dugga, 1965), Coreia do Norte e do Sul (Chung 1955; Kang e Moon 1968), Tailândia (Okada 1976), Myanmar (Toda 1991), oeste da Rússia (Sidorenko 1992) e no Paquistão (Amin ud Din et al. 2005).

Na América do Norte a primeira introdução de *D. suzukii* foi durante a década de 80 no Havaí (Kaneshiro 1983). Em 2008 a incidência das moscas foi registrada na Califórnia se espalhando pelas regiões da costa leste dos EUA e na Florida (Walsh et al. 2011). Apenas um ano depois foi registrada sua presença no Canada (Steck et al. 2009) e no México essa espécie foi registrada pela Organização de Proteção de Plantas da América do Norte (NAPPO) em 2011.

Na Europa o primeiro relato de registrado da mosca foi no sul da Espanha em 2008 (Calabria et al. 2012), invadindo rapidamente regiões da Itália (Grassi et al. 2009), França (Mandrin et al. 2010), Suíça (Baroffio e Fisher 2011), Eslovênia (Seljak 2011), Áustria (Lethmayer 2011), Alemanha (Vogt et al. 2012) e Ucrânia (Lavrinenko 2016).

Na América Central e do Sul a presença de indivíduos da espécie *D. suzukii* foram inicialmente mencionadas por Ashburner et al (2005) e encontradas em coleções em 1997 na Costa Rica e em 1998 no Equador (Ashburner et al 2005, Calabria et al 2012). Porém, os primeiros registros a documentar essa espécie em cultivos ocorreram em 2013 no sul do Brasil (Deprá et al. 2014) e na costa do Chile próximo ao porto de Valparaíso que importa frutas da Ásia (Medina-Muñoz et al. 2015). Um ano depois, infestações de *D. suzukii* foram registrados no Uruguai e em 2015 na Argentina (Cichón et al. 2015; González et al. 2015; Santadino et al. 2015). Hoje já temos relatos no Brasil que *D. suzukii* alcançou e colonizou a região sudeste central do país (Andreazza 2017).

Atualmente pesquisas globais com marcadores genéticos aplicados a *D. suzukii* foram realizadas compreendendo as estruturas populacionais, diversidade genéticas e rotas de invasão a fim de traçar novas estratégias para conter e prevenir essa invasão biológica, já que a maior parte do nosso conhecimento sobre as rotas introdutórias de espécies invasoras provem de dados históricos e observacionais, que geralmente são escassos, incompletos, podendo até serem enganosos. Neste contexto, a genética de população provou ser uma abordagem útil para a reconstrução das rotas de introdução, destacando a complexidade e a natureza muitas vezes contra-intuitiva da história verdadeira (Estoup e Guillemaud 2010)

Porém em âmbito nacional essa pesquisa é escassa já que o inseto foi recém-introduzida (cinco anos) sendo assim esse o primeiro trabalho a levantar dados genéticos sobre a *D. suzukii*. Desta forma, estudos nas áreas que registram a presença da drosófila-da-asa-manchada são de grande urgência, pois informações sobre a dispersão e os padrões comportamentais da praga entre diferentes ambientes de cultivo, por meio da detecção e estimativa da frequência de alelos, servem como base para o desenvolvimento e implementação de estratégias efetivas no manejo integrado de pragas (Martinelli et al. 2006; Arias et al. 2011; Behere et al. 2013).

Identificar futuros invasores e tomar as decisões certas para prevenir a dispersão e colonização envolve um enorme desafio para a conservação e para o comércio internacional. As consequências causadas por espécies invasoras muitas vezes são profundas e, portanto, esforços para evitar a oportunidade de invasão, a erradicação ou controle desses organismos são indispensáveis (Mack et al 2000).

No caso da invasão de *D. suzukii* os indivíduos que colonizaram o Brasil vieram de áreas previamente invadidas do mundo. As populações invasoras sofreram eventos de mistura genética que favoreceram a adaptação de *D. suzukii* a novas áreas (Adrion et al. 2014; Fraimout et al. 2017). Relatos de tentativas frustradas de controle desses insetos em áreas invadidas resultaram em surtos populacionais, já que essa espécie possui ampla polifagia, rápida adaptação e alto potencial reprodutiva (Asplen et al. 2015). Assim, a limitação do fluxo de genes de *D. suzukii* entre regiões e / ou novos eventos de reintrodução pode prolongar a eficácia de estratégias de controle, por exemplo, reduzindo as fontes de genes para resistência a inseticidas (Cini et al. 2014, Andreazza et al. 2017a).

Nos últimos cinco anos encontramos uma rápida expansão das populações de *D. suzukii* que atravessaram o sul do país até o sudeste. Esta alta taxa de dispersão está associada ao comércio de frutas mediado por humanos e à vasta gama de hospedeiros em que *D. suzukii* pode ocupar, permitindo colonizar rapidamente o sul e o sudeste do Brasil (Andreazza et al. 2017a). Portanto, se as barreiras fitossanitárias não são implementadas, o risco de que *D. suzukii* alcance o Nordeste brasileiro, uma importante área de produção de frutas, é real. Uma vez que as populações brasileiras de *D. suzukii* originaram da América do Norte e da Europa, a história de sucessos e falhas de estratégias de controle, bem como métodos recém-testados em ambas as regiões, como a técnica de insetos estéril (Nikolouli et al 2017) ou o uso de inseticidas alternativos / botânicos (Andreazza et al. 2017c; Bernardi et al. 2017), poderiam ser adotados com sucesso, aumentando a eficiência do controle dessa praga invasiva em novas áreas.

2.9. Objetivo Geral

A fim de explorar a dinâmica de invasão das populações de *D. suzukii* no Brasil foi utilizada uma abordagem filogeográfica, baseada nas sequências de fragmentos

dos gene COI. Com esses dados avaliamos a diversidade genética, os parâmetros demográficos das populações coletadas no Brasil, a estrutura genética e as possíveis rotas de dispersão no país. Além disso, comparando a semelhança genética entre as populações brasileiras e mundiais, explorando as possíveis rotas de invasão de *D. sukii* no Brasil.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras e Extração de DNA

Amostras de *D. suzukii* foram coletadas em doze locais em seis hospedeiros diferentes ao longo de 2016 e 2017 (Tabela 1). As moscas foram armazenadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL em etanol a 99%. O DNA genômico foi extraído de 91 indivíduos de *D. suzukii* usando o corpo todo do inseto, de acordo com o protocolo proposto por Clarck et al. (2001), que é baseado na lise celular por CTAB e na remoção de proteína com proteinase K e lavagem com clorofórmio.

Tabela 1. Local de amostragem de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), código das amostras, respectivos hospedeiros e coordenadas geográficas.

Local (Cidade, Estado)	Código	Hospedeiro	Longitude (S)	Latitude (O)
Pelotas, RS	RSPE	Pitanga	31°40'42"	52°32'32"
Capão Leão, RS	RSCL	Goiaba	31°49'27"	52°26'35"
Turuçu, RS	RSTU	Morango	31°26'15"	52°11'15"
Arroio do Padre, RS	RSAP	Morango	31°25'40"	52°22'36"
Ipê, RS	RSIP	Amora	28°45'58"	51°16'11"
Bento Gonçalves, RS	RSBG	Uva	29°00'55"	51°32'55"
São Joaquim, SC	SCSJ	Mirtilo	28°16'29"	49°56'16"
Juiz de Fora, MG	MGJF	Morango	21°45'05"	43°22'24"
Eralia, MG	MGEV	Morango	20°50'32"	42°40'32"
Repouso, MG	MGRE	Morango	22°28'16"	46°08'42"
Domingos Martins, ES	ESDM	Morango	20°15'15"	40°59'27"
Santa Maria de Jetibá, ES	ESSM	Morango	20°09'39"	40°55'09"

3.2. Amplificação do gene COI e Sequenciamento

Fragmento do gene COI mitocondrial foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers universais LCO1490 e HCO2198 (Folmer et al., 1994). Realizamos a PCR em um total de 25 µL contendo 2 µL de gDNA, 13,7 µL de água Milli-Q, 2,5 µL de tampão (10x), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP (2,5 mM), 2 µL de cada *primer* (5 pm) e 0,3 µL de Taq (5 U / µL). As condições de amplificação de PCR utilizadas foram 95°C durante 3 min seguidos

de 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 54°C durante 40 s, 72°C durante 2 min e para extensão final 72°C durante 10 min. Avaliamos a amplificação positiva por eletroforese em géis de agarose a 1,5% (p / v) corados com SYBR Safe (Life Technologies). Para o sequenciamento, purificamos 10 µL do produto de PCR com 1 µL da seguinte mistura: 0,33 µL de Exonuclease I, 0,33 µL de Fitatase Alcalina Termostática FastAP e 0,34 µL de água Milli-Q. As condições utilizadas no termociclador consistiram de 37°C durante 30 min, seguidas de 80°C durante 15 min. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ, da Universidade de São Paulo para o sequenciamento de Sanger.

3.3. Análise de diversidade, demografia e estrutura populacional

Todas as sequencias foram editadas para 525 pb, alinhadas usando o programa Sequencher 4.0.1 (Gene Codes Corp. Ann Arbor, MI, USA) e depositadas no GenBank (MG816016 – MG816106). As análises de diversidade, demografia e estrutura de população foram avaliadas para cada população e para grupos de população de acordo com sua origem geográfica, zona morfoclimática e provável história de invasão nas regiões brasileiras, sendo Grupo 1 referente a região dos Pampas no extremo sul do Brasil (RSPE, RSCL, RSTU, RSAP); Grupo 2 referente a região de Floresta de Araucária, também no sul do Brasil (RSIP, RSBG, SCSJ); e Grupo 3 referente a região de Floresta Atlântica no Sudeste do Brasil (MGJF, MGEV, MGRE, ESDM, ESSM) (Ab'Saber 1972; Andreazza et al. 2017).

O número de haplótipos, diversidade de haplótipos (h) e diversidade nucleotídica (π) foram obtidas utilizando o programa DNAsp v5 (Librato e Rozas 2009). Os testes de neutralidade Fu's F_s e Tajima's D juntamente com as análises de distribuição de diferenças de nucleotídeos pareados (Mismatch), foram realizados utilizando o programa Arlequin version 3.5 (Excoffier e Lischer 2010) para investigar sinais de expansão ou retração populacional desta espécie. A significância foi determinada utilizando amostras aleatórias em 1000 simulações de coalescência. Com base nas recomendações do Arlequin, os valores estatísticos das Fu's F_s foram considerados significativos ao nível de 5% somente quando o valor de P foi inferior a 0,02. As análises da variância molecular (AMOVA) e a

diferenciação genética (em par F_{st}) foram realizadas no Arlequin v.3.5 com bootstrapping paramétrico de 1000 repetições (Excoffier e Lischer 2010).

3.4. Inferências Genealógicas

A definição de haplótipos e as relações genealógicas entre os haplótipos do gene COI brasileiros foram baseadas em uma rede do método de união mediana, a qual foi estabelecida utilizando o programa PopArt (Population Analysis with Reticulate Trees) (Leigh e Bryant 2015).

Trezentas e trinta e seis sequências de fragmentos do gene COI de *D. suzukii* foram retiradas do Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), fornecendo assim, 35 sequências da Europa, 58 da América do Norte e 243 da Ásia (Material Suplementar 1). Estas 336 sequências foram adicionadas a 91 sequências do Brasil, alinhadas no MEGA4 (Tamura et al. 2007) e editadas para 516 pb. Então, todas as sequências foram analisadas no programa DNAsp v.5 afim de calcular o número de haplótipos. Os 92 haplótipos gerados foram submetidos a análise filogenética Bayesiana para identificar as relações entre os haplótipos e suas distribuições geográficas (material suplementar S1). O melhor modelo de substituição de evolução utilizado foi GTR+I, previamente selecionado usando MRMODELTEST v2.3 (Nylander 2004). As análises filogenéticas bayesianas foram realizadas em MRBAYES v3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck 2003), usando duas corridas simultâneas de 15 milhões de gerações cada, com uma corrente fria e três cadeias aquecidas em cada corrida. No final das corridas, os primeiros 25% das árvores foram descartados como amostras de queimação. A árvore de consenso das duas corridas independentes foi obtida com probabilidades posteriores > 0,50. O fragmento do gene COI de *Drosophila immigrans* Sturtevant (Wheeler, 1981) (Diptera: Drosophilidae), coletado em MGRE, foi sequenciado e utilizado como o grupo externo das análises filogenéticas.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de diversidade, demografia e estrutura populacional

Identificamos sete sítios polimórficos e cinco haplótipos entre 91 indivíduos brasileiros de *D. sukii*. Os sete sítios polimórficos são mutações sinônimas, que também descartam a presença de paralogos nucleares de origem mitocondrial (numts) (Lopez et al., 1994). O conteúdo de A / T foi maior que o conteúdo de C / G (C = 15,42%, G = 16,76%, T = 38,47%, A = 29,33%) na região do gene COI sequenciada.

Encontramos diversidade de haplótipos ($h = 0.760$) e diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0051$, variando de 0,0030 a 0,0059) moderados nas populações de *D. sukii* (Tabela 2), indicando uma variação relativamente pequena na diversidade. Quando as populações foram analisadas em grupos, o Grupo G1 apresentou a maior diversidade de haplótipos ($h = 0,772$) e G2 apresentou a maior diversidade de nucleotídeos ($\pi = 0,0051$). G3 mostrou o maior haplótipo ($h = 0,669$) e a diversidade de nucleotídeos ($\pi = 0,0036$) (Tabela 2).

Tabela 2. Medidas de diversidade genética de 12 populações de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) do Brasil com base no gene mitocondrial COI.

Local Código	Tamanho amostral (<i>N</i>)	Número de haplótipos (<i>H</i>)	Haplótipos (<i>n</i>)*	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
G1	34	5	H1(13); H2(7); H3(4); H4(3); H5(7)	0.770	0.0048
RSPE	7	3	H1(4); H2; H5(2)	0.667	0.0038
RSCL	9	3	H1(2); H2(4); H5(3)	0.722	0.0036
RSTU	9	3	H1(2); H3(4); H4(3)	0.722	0.0040
RSAP	9	3	H1(5); H2(2); H5(2)	0.667	0.0032
G2	26	5	H1(6); H2(4); H3(13); H4; H5(2)	0.692	0.0051
RSIP	10	3	H1; H2; H3(8)	0.378	0.0030
RSBG	7	4	H1(2); H2(3); H3; H5	0.810	0.0045
SCSJ	9	4	H1(3); H3(4); H4; H5	0.750	0.0059
G3	31	3	H1(13); H2(7); H5(11)	0.669	0.0036
MGJF	5	3	H1(2); H2; H5(2)	0.800	0.0045
MGEV	8	3	H1(3); H2; H5(4)	0.679	0.0042
MGRE	2	2	H2; H5	1.000	0.0057
ESDM	13	3	H1(5); H2(4); H5(4)	0.718	0.0036
ESSM	3	1	H1(3)	-	-
Brasil	91	5	H1(32); H2(18); H3(17); H4(4); H5(20)	0.760	0.0051

(n)* = frequência do haplótipo

O teste D de Tajima mostrou valores não significativos para todas as populações, o que é consistente com a hipótese nula de DNA com evolução neutra (Tajima 1989). Valores significativos e negativos no teste de Fu's F_s sugeriram que as populações estão se expandindo, com exceção de MGRE ($F_s = 1,09$; $P = 0,44$) (Tabela 3). O teste de Fu's F_s é mais efetivo para indicar eventos de expansão populacional do que o Tajima's D (Fu 1997). A distribuição mismatch concordou com os resultados da Fu's F_s , sugerindo que essas populações brasileiras estão sofrendo uma expansão demográfica e espacial (Tabela 3). Quando as populações foram agrupadas por zonas morfoclimáticas e histórico de invasão, também encontramos evidências de expansão demográfica e espacial. O índice T (tau) revelou que as idades das populações são semelhantes nos locais amostrados, o que confirma uma rápida expansão demográfica e espacial no Brasil.

Tabela 3. Estatística do teste de neutralidade e análise de distribuição mismatch para populações de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) do Brasil com base no gene mitocondrial COI.

Local código	Tamanho amostral	Tajima's D	Fs' Fu (valor P)	τ (SD)	SSD (valor P)	Rag (valor P)
G1	34	1.40 (0.92)	-26.58*	4.9 (0.26 – 8.42)	0.064 (0.01)	0.14 (0.14)
RSPE	7	1.07 (0.86)	-5.74*	4.86 (0 – 6.45)	0.11 (0.25)	0.29 (0.3)
RSCL	9	1.15 (0.85)	-9.16*	3.99 (0.29 – 29)	0.07 (0.22)	0.21 (0.33)
RSTU	9	0.62 (0.74)	-8.59*	5.95 (0.67 – 32.95)	0.08 (0.24)	0.19 (0.39)
RSAP	9	0.69 (0.75)	-9.65*	4.85 (0.33 – 43.28)	0.06 (0.34)	0.19 (0.49)
G2	26	1.46 (0.94)	-26.48*	5.62 (0.04 – 9.0)	0.1 (0.07)	0.19 (0.03)
RSIP	10	-0.32 (0.39)	-11.85*	3.00 (0.45 – 3.0)	0.10 (0.11)	0.42 (0.42)
RSBG	7	-0.86 (0.25)	-5.14*	4.84 (0.95 – 29.83)	0.05 (0.45)	0.14 (0.7)
SCSJ	9	0.92 (0.82)	-6.76*	5.61 (1.93 – 9.5)	0.15 (0)	0.32 (0.06)
G3	31	2.34 (0.99)	-27.11*	4.70 (0– 9.47)	0.09 (0.2)	0.28 (0.11)
MGJF	5	1.64 (0.97)	-2.67*	4.30 (0.75 - 6.51)	0.09 (0.2)	0.28 (0.45)
MGEV	8	2.0 (0.99)	-6.75*	4.70 (0 – 6.67)	0.13 (0.09)	0.34 (0.12)
MGRE	2	-	1.09 (0.44)	-	-	-
ESDM	13	1.60 (0.94)	-16.63*	4.42 (0.11 – 6.75)	0.05 (0.27)	0.17 (0.35)
ESSM	3	-	-	-	-	-
Brasil	91	2.25 (0.98)	-26.70*	5.14 (0.76 - 8.92)	0.06 (0.05)	12 (0.8)

*Significância $P \leq 0.01$

A AMOVA detectou alta diferenciação genética entre as populações ($\Theta_{ST} = 0,248$; $P < 0.01$) (Tabela 4). No entanto, quando as populações foram agrupadas por origem morfoclimática, a estrutura genética foi apenas parcialmente explicada ($\Theta_{CT} = 0,117$; $P = 0,10$) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) para a estrutura genética das populações de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) do Brasil com base no gene mitocondrial COI.

Fonte de variação	<i>g.l.</i>	Componentes de variância	Variação percentual	Índices de fixação (valor p)
Entre populações	11	0.339	24.81	$\Phi_{ST} = 0.248$ (p=0.00)
Dentro das populações	79	1.030	75.19	
Total	90	1.369		
Entre grupos	2	0.165	11.72	$\Phi_{CT} = 0.117$ (p=0.10)
Entre as populações dentro dos grupos	9	0.218	15.44	$\Phi_{SC} = 0.175$ (p=0.00)
Dentro das populações	79	1.030	72.84	$\Phi_{ST} = 0.271$ (p=0.00)
Total	90	1.438		

O índice F_{st} par-a-par foi negativo (inf) ou não significativo para a maioria das populações (Tabela 5). Portanto, entre as populações analisadas, o fluxo de genes é em sua maioria irrestrito. Entre as populações que mostraram um valor significativo, RSIP apresentou diferenciação genética significativa em relação às outras populações com exceção das populações de RSTU e SCSJ (Tabela 5).

Tabela 5. Diferenciação genética entre as populações de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) do Brasil de acordo com a estimativa FST.

	RSPE	RSCL	RSTU	RSAP	RSIP	RSBG	SCSJ	MGJF	MGEV	MGRE	ESDM
RSPE											
RSCL	Inf										
RSTU	0.4477*	0.4452*									
RSAP	Inf	Inf	0.4719*								
RSIP	0.5704*	0.5562*	Inf	0.5881*							
RSBG	Inf	Inf	0.2881	Inf	0.4212*						
SCSJ	0.2199	0.2329*	Inf	0.2528*	0.0403	0.0746					
MGJF	Inf	Inf	0.4138*	Inf	0.5428*	Inf	0.1751				
MGEV	Inf	Inf	0.4459*	0.0158	0.5556*	0.0256	0.2338*	Inf			
MGRE	Inf	Inf	0.3807	Inf	0.5309*	Inf	0.0907	Inf	Inf		
ESDM	Inf	Inf	0.4553*	Inf	0.5611*	Inf	0.2512*	Inf	Inf	Inf	
ESSM	0.0454	0.2850	0.5703*	0.0278	0.6990*	0.1307	0.3207	0.2053	0.2970	0.5714	0.1683

* $p \leq 0.01$

4.2. Inferências Genealógicas

As relações genealógicas entre os cinco haplótipos amostrados indicaram uma divisão inicial em três haplogrupos, separados por um mínimo de quatro passos de mutação, com uma distância genética estimada de $D = 0.005-0.006$ entre três haplogrupos (Figura 2). H2 foi o haplótipo mais frequente encontrado no Brasil; é separado por um único passo de mutação de H4, que esta presente em todas as três zonas morfoclimáticas (Figura 2 e Tabela 2). O haplótipos H3 e H5 também são separados por um único passo de mutação. O haplótipo H5 foi encontrado nas três zonas morfoclimáticas, e o haplótipo H3 ocorreu na população proveniente dos Grupos G1 e G2. H1 mostrou alta frequência, mas foi restrito ao sul do Brasil (Grupos G1 e G2) (Figura 1 e Tabela 2)

Figura 2. Rede e distribuição geográfica de haplótipos com base em sequências de fragmentos de genes da subunidade I da citocromo oxidase (COI) para 91 indivíduos de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) em 12 populações.

A análise filogenética mostrou que os haplótipos foram divididos em dois clusters principais. O clado mais antigo traz o haplótipo H5, o qual é compartilhado entre populações do Brasil, Japão, China, Coreia, Canadá, Estados Unidos e Ucrânia. Sendo o único haplótipo compartilhado globalmente neste grupo, já que os outros são compartilhados apenas entre populações na região de origem, a Ásia.

O segundo e mais recente cluster (probabilidade posterior = 0,63) é dividido em dois subgrupos, dos quais o primeiro (probabilidade posterior = 0,86) abrange os haplótipos espalhados por todo o mundo.

O haplótipo H1 é compartilhado entre o Brasil, China, Coreia, Estados Unidos e Sérvia; o haplótipo H2 é compartilhado entre populações do Brasil, Japão, China, Coreia, Estados Unidos e Ucrânia; e haplótipo H3 é compartilhado entre o Brasil, Canada, Estados Unidos e Ucrânia (Figura 3 e Tabela Suplementar S1). Haplótipo H18 é compartilhado entre a Ásia, América do Norte e Europa, e o haplótipo H53 é compartilhado entre a Ásia e a América do Norte. Existem dois haplótipos específicos, um para a Europa (H92) e um para o Brasil (H4) (Figura 3). Os outros 84 haplótipos são únicos presentes na Ásia, região de origem de *D. sukutii*.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise de diversidade, demografia e estrutura populacional

Invasões biológicas muitas vezes envolvem uma redução do tamanho da população em relação à população fonte, que potencialmente também reduz a diversidade genética (Dlugosch e Parker 2008; Peischl e Excoffier 2015). Dos 91 indivíduos de *D. suzukii* sequenciados, apenas cinco haplótipos de COI foram encontrados, concordando com a menor diversidade populacional em uma área recentemente invadida em comparação com suas áreas nativas (Adrion et al., 2014; Asplen et al., 2015; Choi et al., 2017). Os valores de diversidade de haplótipos e de diversidade de nucleotídeos nas populações brasileiras são similares a outras áreas invadidas na Europa e América do Norte (Carvajal 2010, Calabria et al., 2012; Choi et al., 2017; Lavrinienko et al., 2017). As espécies que sofrem reduções populacionais aumentam a risco de extinção, o que constitui uma barreira efetiva à invasão de novas áreas. No entanto, os colonizadores de *D. suzukii* provavelmente retiveram alelos divergentes e adaptativos de suas fontes populacionais, que, associados à mistura genética populacionais entre populações invasoras, aumentaram seu potencial de adaptação em novos ambientes (Kolbe et al. 2004; Lombaert et al., 2011; Rius et al., 2012; Leite et al., 2017). Concordando com a rápida disseminação mundial de *D. suzukii* nos últimos 10 anos que apresentou uma ampla variedade de hospedeiros para alimentação, adaptação climática e falhas de controle, apesar da reduzida diversidade genética relatada nas áreas invadidas (Asplen et al., 2015).

O teste de neutralidade do Fu's F_s e distribuição Mismatch indicaram expansão demográfica e espacial para todas as populações de *D. suzukii*, com exceção da população de MGRE (possivelmente devido ao pequeno tamanho amostra desta população). A expansão populacional é esperada para uma população recém introduzida e, como *D. suzukii* chegou no sul do Brasil há cinco anos, novos eventos de colonização foram continuamente relatados em outras regiões (Deprá et al., 2014, Andreazza et al., 2017a). Do mesmo modo que outras regiões invadidas do mundo, essa rápida expansão espacial da população de *D. suzukii* no Brasil provavelmente é associada a ações antrópicas, promovida pelo comércio ativo de frutas frescas entre as regiões (Cini et al., 2014, Vilela e Mori, 2014) .

A AMOVA indicou uma alta estrutura genética entre as populações de *D. sukii* no Brasil, mostrando que as populações têm fluxo de genes limitado entre si. A estrutura genética de *D. sukii* não é explicada pela especificidade do hospedeiro, concordando com a ampla polifagia dessa espécie. No entanto, é parcialmente explicado pelo agrupamento, considerando a origem morfoclimática e a história de invasão nas regiões brasileiras. O índice de FST par-a-par revelou alta fixação de alelos entre as populações, o que também é parcialmente explicado pela origem morfoclimática e provável história de invasão de *D. sukii* no Brasil. No entanto, o FST paralelo também indica alto fluxo de genes entre populações de diferentes grupos e baixo fluxo de genes entre as populações do mesmo grupo (Tabela 5).

Este cenário é consistente com um efeito fundador nas populações brasileiras e uma rápida expansão através do comércio de frutas, fazendo com que a deriva genética seja a principal força evolutiva que direcionou a estrutura genética e a fixação do alelo (fluxo gênico) nessas populações (Adrion et al., 2014; Tait et al., 2017).

5.2. Inferências Genealógicas

Cinco haplótipos foram identificados nas populações de *D. sukii* do Brasil. Três haplótipos (H1, H2 e H5) apresentaram altas frequências e foram encontrados em todas as populações brasileiras. Os outros dois haplótipos (H3 e H4) foram restritos aos Grupos G1 e G2 no sul do Brasil. O menor valor de diversidade haplotípica e nucleotídica é oriundo das populações de *D. sukii* do Grupo G3 (sudeste do Brasil) em relação às populações dos Grupos G1 e G2, confirmam os dados históricos dos eventos de invasão e dispersão no país, onde *D. sukii* inicialmente invadiu a região sul e posteriormente dispersa para o sudeste do Brasil (Deprá et al., 2014, Andreazza et al., 2017).

Apesar do baixo número de haplótipos encontrados no Brasil, as relações genealógicas entre eles não correspondem a um padrão de rede da invasão recente, uma vez que os cinco haplótipos estão separados em três haplogrupos (Avice 2000). Esta é uma consequência da alta diversidade de haplótipos de *D. sukii* em sua região de origem, que favoreceu a introdução de haplótipos

divergentes em novas áreas. Como é confirmado na filogenia de haplótipo do gene COI global, já que apresenta um alto número de haplótipos originários da Ásia.

Comparando os cinco haplótipos brasileiros com o banco de dados mundial de haplótipos COI, descobrimos que três haplótipos (H1, H2 e H5) são compartilhados com outras populações em diferentes regiões da Ásia, Europa e América do Norte e que o haplótipo H3 é compartilhado com o Norte América e Europa. O haplótipo H4 é exclusivo do Brasil e sua baixa distribuição de frequência e distribuição espacial sugere um passo de mutação recente no gene COI. Historicamente, *D. suzukii* foi relatado pela primeira vez fora da Ásia no Havaí, na década de 1980 (Kaneshiro 1983), e posteriormente se espalhou para os Estados Unidos em 2008 e para o Canada em 2009 (Steck et al., 2009; Walsh et al., 2011). Na Europa, *D. suzukii* foi registrado pela primeira vez no sul de Espanha, em 2008, e invadiu rapidamente outros países da Europa (Seljak 2011; Lethmayer 2011; Calabria et al., 2012; Asplen et al., 2015; Lavrinienko et al., 2017). Posteriormente, em 2013, *D. suzukii* foi relatado na América do Sul (Deprá et al., 2014).

A rápida expansão espacial, pools genéticos similares na Europa e América do Norte e a alta frequência desses quatro haplótipos em todas as regiões invadidas do mundo sugerem um único evento de invasão (ou poucos) da Ásia para o mundo, com eventos subsequentes de invasão para explicar as misturas genéticas da população entre as populações de *D. suzukii* da Europa e dos Estados Unidos (Adrion et al., 2014; Fraimout et al., 2017). A partilha de haplótipos entre o Brasil, a Europa e a América do Norte e a falta de partilha de haplótipos exclusivos entre o Brasil e a Ásia indicam que as rotas de invasão para o Brasil não incluíram o continente asiático. Assim, a origem da rota de invasão de *D. suzukii* no Brasil é proveniente de um único evento de invasão de regiões anteriormente invadidas, a Europa e a América do Norte. Fraimout et al. (2017) sugeriram dois eventos de invasão distintos de *D. suzukii* para a Europa e para os Estados Unidos, com eventos de mistura genética subsequentes entre o sul da Europa e os Estados Unidos no norte da Europa e, finalmente, um evento de invasão dos Estados Unidos para o Brasil.

5.3. Preocupações Fitossanitárias

O processo de invasão de *D. suzukii* no Brasil inclui indivíduos de áreas anteriormente invadidas do mundo. As populações invasivas passaram por eventos de mistura genética que favoreceram a adaptação de *D. suzukii* em novas áreas (Adrion et al. 2014; Fraimout et al., 2017). *Drosophila suzukii* apresenta ampla polifagia, adaptação rápida a novos habitats e relatos de falhas de controle que associadas ao alto potencial reprodutivo têm promovido surtos populacionais em áreas invadidas no mundo (Asplen et al., 2015). Assim, a limitação do fluxo de genes de *D. suzukii* entre regiões e / ou novos eventos de reintroduções pode prolongar a eficácia de estratégias de controle, reduzindo, por exemplo, as fontes de genes de resistência a inseticidas (Cini et al., 2014, Andreazza et al., 2017a).

Considerando a história de invasão de *D. suzukii* no Brasil relatada inicialmente no estado do Rio Grande do Sul em 2013 (Deprá et al. 2014) e o recente relatório de sua presença no estado do Espírito Santo em 2017, podemos estimar uma distância de dispersão média de 1,6 Km / dia de *D. suzukii* no Brasil. Essa alta taxa de dispersão está associada ao comércio de frutas mediadas e a ampla polifagia de *D. suzukii* permitiu a rápida colonização no sul e no sudeste do Brasil (Andreazza et al., 2017a). Com isso, sem a implementação de barreiras fitossanitárias, o risco de *D. suzukii* atingir o Nordeste brasileiro, uma importante área de produção de frutas, é real. Além disso, uma vez que as regiões de origem das populações brasileiras de *D. suzukii* são a América do Norte e a Europa, o sucesso histórico e as falhas de estratégias de controle, bem como métodos recém-testados, de ambas as regiões, como a técnica estéril esterilizada (Nikolouli et al 2017) ou o uso de inseticidas alternativos / botânicos (Andreazza et al. 2017c; Bernardi et al., 2017), poderia ser adotado com sucesso aumentando a eficiência de controle dessa praga invasiva em novas áreas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Identificar e adotar as decisões assertivas para prevenir a dispersão e colonização de futuros invasores é um enorme desafio para programas de conservação e para o comércio internacional de produtos agrícolas e ornamentais. As consequências causadas por espécies invasoras muitas vezes são profundas e, portanto, esforços para evitar a oportunidade de invasão, a erradicação ou controle desses organismos são indispensáveis (Mack et al 2000).

D. suzukii atualmente se apresenta como praga invasora global com características bioecológicas como a alta taxa de reprodução, capacidade de colonização de um grande número de hospedeiros e tolerância à variação de temperaturas que atuando juntamente com os processos evolutivos de mistura genética e demografia de invasão, culminaram no sucesso adaptativo dessa espécie em novas áreas (Anfora et al. 2012; Dlugosch e Parker 2008).

A recente invasão em território Brasileiro não foge a regra. Nos últimos cinco anos, uma rápida expansão das populações de *D. suzukii* atravessou o sul do país até o sudeste. Esta alta taxa de dispersão está associada ao comércio interno de frutas e a colonização da vasta gama de hospedeiros, permitindo a rápida dispersão do inseto pelo o sul e o sudeste, receando a chegada desta praga em territórios ainda não colonizados, como o Nordeste brasileiro que é uma região rica em produções frutíferas, potenciais hospedeiros de *D. suzukii*.

Sendo a origem das populações brasileiras provenientes da América do Norte e Europa, uma busca histórica de sucessos e falhas de estratégias em conter essa praga são informações cruciais para o manejo integrado de pragas (MIP). Recorrer além dos métodos tradicionais de controle, como aplicação de pesticidas, a métodos recém-testados como a técnica de insetos estéril (Nikolouli et al 2017) e inseticidas alternativos / botânicos (Andreazza et al. 2017; Bernardi et al., 2017) são alternativas que podem ser adotadas, aumentando a eficiência do controle dessa praga. Dessa forma, com intuito de minimizar e controlar os danos causados por esse inseto, é necessário à implementação de barreiras fitossanitárias que impeçam a dispersão e limite o fluxo de genes de *D. suzukii* evitando novos eventos de mistura genética entre as populações que poderão comprometer à eficácia de estratégias de controle (Cini et al., 2014, Andreazza et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- Andreazza F, Bernardi D, Botton M et al (2017b) *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in Peaches: is it a problem?. *Scientia Agricola* 74:489-491.
- Andreazza F, Bernardi D, Dos Santos RSS et al (2017) *Drosophila suzukii* in Southern Neotropical Region: current status and future perspectives. *Neotropical entomology* 46:591-605.
- Andreazza F, Bernardi D, Dos Santos RSS et al (2017a) *Drosophila suzukii* in Southern Neotropical Region: current status and future perspectives. *Neotropical Entomology* 46:591-605.
- Andreazza F, Haddi K, Oliveira EE et al (2016) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) arrives at Minas Gerais State, a main strawberry production region in Brazil. *Florida Entomologist* 99:796-798.
- Andreazza F, Vacacela AHE, Haddi K et al (2017c) Toxicity to and egg-laying avoidance of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) caused by an old alternative inorganic insecticide preparation. *Pest management science*
- Anfora G, Grassi A, Graiff M. et al (2012) *Drosophila suzukii*: a new invasive species threatening European fruit production. *EnviroChange*.
- Asplen MK, Anfora G, Biondi A et al (2015) Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *Journal of Pest Science* 88:469–494.
- Avice JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36:3-15.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM et al (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17:3754-3774.
- Bernardi D, Ribeiro L, Andreazza F et al (2017) Potential use of *Annona* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*. *Industrial Crops and Products* 110:30-35.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.004>

- Brown WM, Prager EM, Wang A et al (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18:225-239.
- Calabria G, Máca J, Bächli G et al (2012) First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied entomology* 136:139-147.
- Cao LJ, Wang ZH, Gong YJ et al (2017) Low genetic diversity but strong population structure reflects multiple introductions of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) into China followed by human-mediated spread. *Evolutionary Applications* 10:391-401.
- Carvajal JI (2010) Genetic diversity of *Drosophila suzukii* in San Diego. *Drosophila Information Service*, 93:67.
- Choi DS, Park JS, Kim MJ et al (2017) Geographic variation in the spotted-wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), based on mitochondrial DNA sequences. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal* 29:312-322.
- Cini A, Anfora G, Escudero-Colomar LA et al (2014). Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *Journal of Pest Science* 87:559-566.
- Cini A, Ioriatti C, Anfora G (2012) A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bull Insectol* 65:149–160
- Clark TL, Meinke LJ, Foster JE (2001) Molecular phylogeny of Diabrotica beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 10:303–314. .
- Corrêa AS, Vinson CC, Braga LS et al (2017) Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. *Bulletin of Entomological Research* 107:9-20.
- Day R, Abrahams P, Bateman M et al (2017). Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. *Outlooks on Pest Management* 28:196-201.
- Deprá M, Poppe JL, Schmitz HJ et al (2014) The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *Journal of Pest Science* 87:379–383.

- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17:431-449.
- Durigan MR, Corrêa AS, Pereira RM et al (2017) High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143:73-80.
- Estoup A, Guillemaud T (2010) Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology*, 19:4113-4130.
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567
- Folmer O, Black M, Hoeh W et al (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299
- Fraimout A, Debat V, Fellous S et al (2017). Deciphering the Routes of invasion of *Drosophila suzukii* by Means of ABC Random Forest. *Molecular Biology and Evolution* 34:980-996.
- Freeland JR (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Editorial Offices.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- Goergen G, Kumar PL., Sankung SB et al (2016) First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. *PloS one* 11:e0165632.
- González G, Lucía Mary AL, Scatoni B et al (2014) *Drosophila suzukii* (Arthropoda, Insecta, Diptera) en Uruguay. In: III Congreso Uruguayo de Zoología. Facultad de Ciencias, Montevideo pp 207.
- Hauser M, Gaimari S, Damus M (2009) *Drosophila suzukii* new to North America. <http://www.nadsdiptera.org/News/FlyTimes/issue43.pdf>
- Kaneshiro KY (1983) *Drosophila* (Sophophora) *suzukii* (Matsumura). In *Proc Hawaiian Entomol Soc* 24:179.
- Kanzawa T (1939) Studies on *Drosophila suzukii* Mats.-Kofu, Yamanashi Agricultural Experiment Station, pp 49. In: *Review of Applied Entomology* 29:622
- Kolbe JJ, Glor RE, Schettino LR et al (2004). Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431:177-181.

- Lavrinenko A, Kesäniemi J, Watts PC et al (2017) First record of the invasive pest *Drosophila suzukii* in Ukraine indicates multiple sources of invasion. *Journal of Pest Science* 90:421-429.
- Lee CE (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* 17:386-391.
- Leigh JW, Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110–1116.
- Leite NA, Correa AS, Michel AP et al (2017) Pan-American Similarities in Genetic Structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) With Implications for Hybridization. *Environmental Entomology* 46:1024-1034.
- Lethmayer C (2011) Gefährliche Fliegen für Äpfel & Co. *Bessers Obst* 12:4-5.
- Librado P, Rozas, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452 (2009).
- Lombaert E, Guillemaud T, Lundgren J et al (2014) Complementarity of statistical treatments to reconstruct worldwide routes of invasion: the case of the Asian ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology* 23:5979-5997.
- Lombaert E, Guillemaud T, Thomas CE et al (2011). Inferring the origin of populations introduced from a genetically structured native range by approximate Bayesian computation: case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular Ecology*, 20: 4654-4670.
- Lopez JV, Yuhki N, Masuda R et al (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* 39:174–190.
- Loriatti C, Guzzon R, Anfora G et al 2017 *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Contributes to the Development of Sour Rot in Grape. *Journal of Economic Entomology* 11:238-292.
- Mack RN, Simberloff D, Mark LW et al (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10:689-710.
- Malacrida AR, Gomulski LM, Bonizzoni M et al (2007) Globalization and fruit fly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica* 131:1-9.
- Medina-Muñoz MC, Lucero X, Severino C et al (2015). *Drosophila suzukii* arrived in Chile. *Drosoph Inf Serv*, 98:75.

- Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT (2006) Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology* 48:233-237.
- Nikolouli K, Colinet H, Renault D et al (2017) Sterile insect technique and Wolbachia symbiosis as potential tools for the control of the invasive species *Drosophila suzukii*. *Journal of Pest Science* 1:1-15.
- Nylander J. (2004). MrModeltest v25. Program distributed by the author.
- Oliveira MRC, Corrêa AS, de Souza GA et al (2013) Mesoamerican origin and pre- and post-Columbian expansions of the ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan insect pest of the common bean. *PloS one*, 8:e70039.
- Paini DR, Sheppard AW, Cook DC et al (2016) Global threat to agriculture from invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:7575-7579.
- Peischl S and Excoffier L (2015). Expansion load: recessive mutations and the role of standing genetic variation. *Molecular Ecology*, 24:2084-2094.
- Rius M, Turon X, Ordóñez V et al (2012) Tracking invasion histories in the sea: facing complex scenarios using multilocus data. *PLoS One* 7:e35815.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Seljak G (2011). Spotted wing drosophila-*Drosophila suzukii* (Matsumura). *SAD, Revija za Sadjarstvo, Vinogradništvo in Vinarstvo*, 22:3.
- Simberloff D (2013) Biological invasions: much progress plus several controversies. *Contributions to Science* 9:7-16.
- Smith JM, Smith NH (2002) Recombination in animal mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 19:2330-2332.
- Steck GJ, Dixon W, Dean D (2009) Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), a fruit pest new to North America. *Pest Alerts*.
- Tait G, Vezzulli S, Sassù F et al (2017) Genetic variability in Italian populations of *Drosophila suzukii*. *BMC Genetics* 18: 87.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

- Tamura K, Dudley J, Nei M et al (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tay WT, Soria MF, Walsh T et al (2013) A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS One* 8:e80134.
- Templeton AR (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13:789-809.
- Toda MJ (1991) *Drosophilidae* (Diptera) in Myanmar (Burma) VII. The *Drosophila melanogaster* species-group, excepting the *D. montium* species-subgroup. *Oriental Insects* 25:69-94.
- Uller T, Leimu R (2011) Founder events predict changes in genetic diversity during human-mediated range expansions. *Global Change Biology* 17: 3478-3485.
- Vilela CR, Mori L (2014) The invasive spotted-wing *Drosophila* (Diptera, *Drosophilidae*) has been found in the city of São Paulo (Brazil). *Revista Brasileira de Entomologia* 58:371–375.
- Vitousek, P. M. (1990). Biological invasions and ecosystem processes: towards an integration of population biology and ecosystem studies. In *Ecosystem Management* 1:183-191.
- Vogt H, Baufeld P, Gross J et al (2012) *Drosophila suzukii*: eine neue bedrohung für den Europäischen obst-und weinbau–bericht über eine internationale tagung in trient, 2, Dezember 2011. *Journal für Kulturpflanzen* 64:68-72.
- Walsh DB, Bolda MP, Goodhue RE et al (2011) *Drosophila suzukii* (Diptera: *Drosophilidae*): invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. *Journal of Integrated Pest Management*, 2:1-7.
- Wei SJ, Cao LJ, Gong YJ et al (2015) Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. *Molecular Ecology* 24:4094-4111.
- Wright S (1949) The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics* 15:323-354.
- Yang Y, Hou ZC, Qian YH et al (2012) Increasing the data size to accurately reconstruct the phylogenetic relationships between nine subgroups of the *Drosophila melanogaster* species group (*Drosophilidae*, Diptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:214-223.

APÊNDICE

Tabela S1. As informações de sequências adicionais (país, haplótipos, código de acesso GenBank e referência) para sequências COI de *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) coletadas anteriormente no Genbank. O número de haplótipo (n> 1) é entre parênteses.

País	Haplótipos (n)	Código de cesso GenBank	Referência
Brasil	H1(32); H2(18); H3(17); H4(4); H5(20)	RSTU2 RSTU5 RSAP1 RSAP3 RSAP4 RSAP6 RSAP7 RSCL4 RSCL7 RSIP8 RSPE4 RSPE5 RSPE6 RSPE7 RSBG6 RSBG7 SCSJ2 SCSJ3 SCSJ9 MGJF2 MGJF5 MGEV1 MGEV6 MGEV8 ESDM1 ESDM3 ESDM4 ESDM5 ESDM7 ESSM1 ESSM2 ESSM3 RSAP2 RSAP8 RSCL2 RSCL5 RSCL8 RSCL9 RSIP5 RSPE1 RSBG1 RSBG2 RSBG5 MGJF3 MGRE2 MGEV5 ESDM8 ESDM9 ESDM10 ESDM11 RSTU1 RSTU3 RSTU4 RSTU6 RSIP1 RSIP2 RSIP3 RSIP4 RSIP6 RSIP7 RSIP9 RSIP10 RSBG3 SCSJ1 SCSJ5 SCSJ6 SCSJ7 RSTU7 RSTU8 RSTU9 SCSJ8 RSAP5 RSAP9 RSCL1 RSCL3 RSCL6 RSPE2 RSPE3 RSBG4 SCSJ4 MGJF1 MGJF4 MGRE1 MGEV2 MGEV3 MGEV4 MGEV7 ESDM2 ESDM6 ESDM12 ESDM13	Nesse trabalho
Japão	H2(9); H5(4); H6; H7(2); H8(3); H9; H10; H11; H12; H13(3); H14; H15; H16; H17; H18; H19; H20; H21	AB824774 AB824773 AB824768 AB824758 AB824751 AB824749 AB824744 AB824742 AB824741 AB824769 AB824764 AB824759 AB824752 AB824772 AB824771 AB824755 AB824750 AB824747 AB824743 AB824767 AB824766 AB824765 AB824763 AB824762 AB824761 AB824753 AB824760 AB824757 AB824756 AB824754 AB824748 AB824746 AB824745 AB824740	Não publicado
Coreia	H1(3); H2(20); H5(5); H7(12); H8(13); H9; H10; H12; H14(6); H15(3); H17(2); H18(12); H26(2); H27(4); H32; H38(9); H42(2); H44; H51(3); H54; H55; H56(2); H57; H58; H59(2); H60; H61; H62; H63(2); H64; H65; H66; H67; H68; H69; H70; H71; H72; H73; H74; H75(2); H76; H77; H78; H79; H80; H81; H82; H83; H84; H85; H86; H87; H88; H89; H90; H91	KX468335 KX468285 KU588141 ¹ KX468424 KX468417 KX468390 KX468376 KX468371 KX468368 KX468366 KX468359 KX468352 KX468343 KX468329 KX468328 KX468324 KX468320 KX468315 KX468311 KX468310 KX468302 KX468298 KX468288 KX468423 KX468393 KX468316 KX468313 KX468293 KX468408 KX468383 KX468381 KX468377 KX468370 KX468356 KX468354 KX468341 KX468318 KX468304 KX468291 KX468290 KX468422 KX468419 KX468418 KX468415 KX468410 KX468398 KX468386 KX468367 KX468358 KX468353 KX468342 KX468334 KX468287 KX468413 KX468301 KX468325 KX468411 KX468409 KX468346 KX468344 KX468296 KX468283 KX468402 KX468388 KX468317 KX468357 KX468345 KX468400 KX468399 KX468392 KX468391 KX468380 KX468379 KX468374 KX468364 KX468347 KX468327 KX468319 KX468306 KX468332 KX468286 KX468349 KX468322 KX468309 KX468300 KX468363 KX468375 KX468373 KX468372 KX468369 KX468365 KX468362 KX468361 KX468351 KX468294 KX468339 KX468289 KX468420 KX468330 KX468312 KX468297 KX468421 KX468416 KX468414 KX468307 KX468412 KX468407 KX468406 KX468389 KX468405 KX468404 KX468403 KX468401 KX468331 KX468397 KX468396 KX468395 KX468394 KX468387 KX468385 KX468384 KX468382 KX468378 KX468360 KX468355 KX468350 KX468340 KX468348 KX468338 KX468337 KX468336 KX468333 KX468326 KX468323 KX468321 KX468314 KX468308 KX468305 KX468303 KX468299 KX468295 KX468292 KX468284	Choi et al. (2017); Kim et al. (2016) ¹
China	H1(2); H2(7); H5(4); H7(2);	KF312640 KJ833988 KX468433 ² KX468426 ² KF312639 KF312617 KF312608 KF312592 KJ833989 KF312635 KF312614	Choi et al. (2017) ² ;

	H8(4); H10; H14; H15; H17; H18; H22; H23; H24; H25; H26(2); H27; H28; H29; H30; H31; H32; H33; H34; H35; H36; H37; H38; H39; H40; H41; H42; H43; H44; H45; H46; H47; H48; H49; H50; H51; H52; H53	KF312610 KJ833991 KF312641 KF312599 KF312607 KF312596 KF312593 KF312591 KF312624 KF312605 KF312619 KF312620 KF312597 KX468436 ² KX468435 ² KX468434 ² KX468432 ² KX468431 ² KX468430 ² KX468429 ² KX468428 ² KX468427 ² KX468425 ² KF312638 KF312637 KF312636 KF312633 KF312621 KF312632 KF312631 KF312630 KF312629 KF312628 KF312627 KF312626 KF312625 KF312623 KF312622 KF312618 KF312616 KF312615 KF312613 KF312612 KF312611 KF312609 KF312606 KF312604 KF312603 KF312602 KF312601 KF312600 KF312598 KF312595 KF312594 KJ833990	Unpublished
EUA	H1(2); H2(2); H3(9); H5(14); H50; H53(4)	GQ365213 ³ HQ646998 ⁴ HQ646997 ⁴ KJ463777 ⁵ KX468450 ² KX468448 ² KX468442 ² KX468438 ² HQ646999 ⁴ KJ671586 ⁵ KJ671585 ⁵ KJ671584 ⁵ KJ671582 ⁵ KX468451 ² KX468449 ² KX468447 ² KX468445 ² KX468443 ² KX468441 ² KX468440 ² KX468437 ² HQ646996 ⁴ KJ671621 ⁵ KJ671620 ⁵ KJ671619 ⁵ KJ671618 ⁵ KJ671617 ⁵ KX468446 KX468444 KX468439 HQ646995 ⁴ KJ463781 ⁶	Não publicado ³ . Carvajal (2010) ⁴ , Dhami and Kumarasinghe (2014) ⁵ ; Choi et al. (2017); Kim et al. (2014) ⁶
Canada	H3(6); H5(16); H18(2); H53(2)	KX468472 KX468470 KX468469 KX468463 KX468461 KX468452 KX468476 KX468475 KX468473 KX468471 KX468468 KX468467 KX468466 KX468464 KX468462 KX468460 KX468459 KX468457 KX468456 KX468455 KX468454 KX468453 KX468474 KX468458 KX468477 KX468465	Choi et al. (2017)
Itália	H18(9); H92(4)	KJ671598 KJ671597 KJ671596 KJ671593 KJ671592 KJ671591 KJ671590 KJ671588 LN867072 ³ KJ671599 KJ671595 KJ671589 KJ671587	Dhami and Kumarasinghe (2014); Não publicado ³
Espanha	H18	HM636439	Calabria et al. (2012)
Portugal	H18	JX871354	Unpublished
Ucrânia	H2(3); H3(4); H5; H18	KX268724 KX268722 KX268721 KX268727 KX268726 KX268725 KX268723 KX268720 KX268719	Lavrinenko et al. (2016)
Sérvia	H1; H18	KX273434 KP233882	Tosevski et al. (2014)