
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**UM PASSO A FRENTE NO CONHECIMENTO DO
GENOMA DA MOSCA PRAGA DROSOPHILA SUZUKII: IDENTIFICAÇÃO DE NOVO E
CITOGENÔMICA COMPARATIVA DE DNAs SATÉLITES EM DROSOPHILA SUZUKII**

RHAVENNA THAIS ALVES GOMES DA SILVA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**UM PASSO A FRENTE NO CONHECIMENTO DO
GENOMA DA MOSCA PRAGA DROSOPHILA SUZUKII: IDENTIFICAÇÃO DE NOVO E
CITOGENÔMICA COMPARATIVA DE DNAs SATÉLITES EM DROSOPHILA SUZUKII**

RHAVENNA THAIS ALVES GOMES DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia)

S586p

Silva, Rhavenna Thais Alves Gomes da

Um passo a frente no conhecimento do genoma da mosca praga
Drosophila suzukii : Identificação de novo e citogenômica
comparativa de DNAs satélites em *Drosophila suzukii* / Rhavenna
Thais Alves Gomes da Silva. -- Rio Claro, 2022

63 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

1. Citogenética Animal. 2. DNA repetitivo. 3. FISH. 4. Espécie
praga. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UM PASSO A FRENTE NO CONHECIMENTO DO GENOMA DA MOSCA PRAGA DROSOPHILA SUZUKII (DROSHOPHILIDAE) PELA ANÁLISE CITOGENÔMICA DE REPETIÇÕES EM TANDEM

AUTORA: RHAVENNA THAIS ALVES GOMES DA SILVA

ORIENTADOR: DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas, área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DIOGO CAVALCANTI CABRAL DE MELLO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Diogo Cavalcanti
Cabral de
Mello:059618894
32

Assinado de forma digital
por Diogo Cavalcanti
Cabral de
Mello:05961889432
Dados: 2022.12.19
13:32:25 +01'00'

Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. LEONARDO GOMES DE LIMA (Participação Virtual)
Stowers Institute for Medical Research

Rio Claro, 04 de outubro de 2022

Título alterado para: "UM PASSO A FRENTE NO CONHECIMENTO DO GENOMA DA MOSCA PRAGA DROSOPHILA SUZUKII: Identificação de novo e citogenômica comparativa de DNAs satélites em Drosophila suzuki"

Dedico este trabalho a todos que
jamais deixaram de acreditar em
mim, especialmente minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio na minha decisão de fazer o mestrado em outro estado, sei que não foi fácil, principalmente pra minha mãe e irmã. Ainda assim, sempre me incentivaram e continuam me incentivando a seguir meus sonhos, especialmente os relacionados a minha profissão. Obrigada por tudo, essa é mais uma conquista nossa.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Diogo, primeiramente por ter me aberto as portas de seu laboratório e por ter me concedido esta possibilidade. Segundamente pela orientação que varia entre o exigente e empático na mesma medida, em perfeito equilíbrio. Obrigada pela recepção e pela orientação que certamente me ajudou e continua ajudando bastante na minha evolução como pesquisadora, mas também, obrigada pelos momentos de descontração fora da Universidade. Obrigada por ser um bom líder, pois em momentos de desespero e perdas você achou alternativas e soluções, demonstrando tranquilidade e por consequência, me tranquilizando. Muito obrigada Diogo.

À Prof^a. Dr^a. Vilma por ter me apresentado ao Prof. Dr. Diogo e por ter sido uma conexão inicial entre mim e ele que me permitiu estar aqui hoje.

Agradeço as meninas do laboratório, Ana Beatriz, Ana Elisa e Vanessa. Primeiramente pelo apoio técnico que contribuiu de alguma forma para o desenvolvimento desse projeto e para evolução do meu conhecimento científico. Nesse ponto gostaria de agradecer mais precisamente a Ana Beatriz que me acompanhou mais de perto no desenvolvimento do projeto, me auxiliou na parte técnica e compartilha comigo os amores e dores de trabalhamos com o mesmo grupo de animal. Segundamente, obrigada pelo acolhimento e pelos momentos compartilhados com todas quer sejam os momentos tomando café e rindo sobre qualquer coisa ou na mesa de um bar comendo batata frita com litrão. Nossa boa convivência ameniza o cansaço do dia-a-dia e sou muito grata por me dá tão bem com vocês, afinal, gambá cheira gambá.

Obrigada ao Emiliano por ter me auxiliado inicialmente na parte de bioinformática.

Agradeço também as pessoas que conheci em Rio Claro e com as quais compartilhei bons momentos e bela risadas, Gerson, Tatiane, Bernardo, Diogo M, Luiz e Roque.

Agradeço à minha amiga Crislaine, uma amizade fruto da graduação, mas que se estende até hoje. Obrigada por compartilhar comigo de todos os momentos do mestrado, tenham sido eles bons ou ruins e pelo apoio em momentos de desespero. Eu daqui e você de lá caminhamos juntas, mesmo em programas, universidades e estados distintos, em busca de nossos objetivos que certamente iremos alcançar.

À minha prima e amiga Nayara por todos os momentos. Obrigada por ter sido meu ponto de conexão com minha vida em Pernambuco. Sua presença constante fez minha saudade ser menor e facilitou muito minha mudança. Obrigada por tudo.

Ao meu amigo Jefferson por sempre ouvir meus desabaços e me fazer sorrir mesmo em momentos de desespero. Os momentos compartilhados com você tornaram algumas situações mais leves devido ao seu humor e piadas, você sabe me entreter como ninguém, muito obrigada.

Ao meu querido Diego por ter compartilhado a vida comigo e nesse tempo ter sido meu maior apoio até mesmo quando nem entendia a dimensão do problema e não sabia o que falar, mas sua presença sempre bastou. Mesmo à distância, você ainda se faz muito presente e todo o apoio que tenho vindo de você me faz continuar e seguir em frente sem olhar pra trás. Obrigada por todo apoio nas minhas decisões, por ouvir meus desabaços, por ser a pessoa com a qual compartilho sonhos, alegrias, tristezas e dramas. Obrigada por se fazer presente em minha vida mesmo a mais 2.500 Km de distância e por ser, na maioria das vezes, a pessoa que mais me tranquiliza.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse ao fim dessa jornada. Foram anos turbulentos e isso não há como negar. Mas felizmente com o apoio das

peessoas mencionadas aqui e também das não citadas, consegui superar as dificuldades encontradas no caminho e chegar ao fim dessa jornada. Muito obrigada a todos!

Agradeço ao Frederico Heckmann e Larine de Paiva Mendonça da ESALQ (USP-PIRACICABA), por nos ter disponibilizado espécimes de *Drosophila suzukii*.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia celular, molecular e microbiologia) e a Universidade Estadual Paulista (UNESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"E nessa de recalculer a rota (...), é hora de caminhar.
Ainda que as dificuldades do cotidiano nos assolem,
esse danado tem tudo pra ser fantástico!"

Autor desconhecido, 2017

RESUMO

A mosca *Drosophila suzukii* é uma espécie praga com grande importância econômica devido a sua distribuição mundial e ao seu hábito de oviposição que lhe permite atacar uma grande variedade de frutos. No contexto de DNA repetitivo e da contribuição e importância dessas repetições na evolução e compreensão da constituição genômica das espécies, os estudos voltados a essa fração de DNA em *D. suzukii* são escassos e restritos à descrição de alguns elementos transponíveis. Com o objetivo de aumentar as informações sobre a organização cromossômica e genômica de *D. suzukii* com foco na fração do DNA repetido em tandem, caracterizamos os cromossomos de *D. suzukii* através da análise convencional e bandeamentos cromossômicos. Identificamos DNAs satélites (DNAsat) através das ferramentas RepeatExplorer2 e TAREAN com dados de sequenciamento e utilizamos a Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) para caracterizar a distribuição de sequências repetidas em tandem (microssatélites, DNAs satélites, DNA ribossomal 18S e histona H4). Nossos resultados demonstram uma amplificação de heterocromatina no cromossomo II de *D. suzukii* e revelam uma heterocromatina enriquecida em microssatélites e conteúdo A+T sugerindo que microssatélites podem estar desempenhando um papel na expansão de heterocromatina nessa espécie, exceto no cromossomo Y. Nossos dados utilizando microssatélites e DNAsat demonstram que o cromossomo Y em *D. suzukii* deve ser constituído majoritariamente por sequências derivadas de elementos transponíveis. No total, foram identificados 15 DNAs satélites que representam cerca de 7.27% do genoma da espécie. A análise desses DNAs satélites revelou que outros elementos de DNA repetitivos como as famílias multigênicas e elementos transponíveis estão envolvidos na origem de DNAs satélites em *D. suzukii* e reforçou a conservação de DNAs satélites dentro do gênero *Drosophila*, como o DNAsat 1.688. A distribuição cromossômica de DNAsat, evidenciada por FISH, foi bastante variável tanto na heterocromatina e eucromatina, assim como nas diferentes regiões cromossômicas e no número de cromossomos. Esses dados fornecem a primeira descrição mais detalhada do genoma de *D. suzukii* e demonstram uma evolução genômica bastante heterogênea para essa espécie envolvendo repetições em tandem.

Palavras-chave: DNA satélite. DNA repetitivo. Hibridização *In Situ* Fluorescente. Microssatélite

ABSTRACT

The fly *Drosophila suzukii* is a pest species with great economic importance due to its worldwide distribution and its oviposition habit that allows the attack of a wide variety of fruits. Concerning repetitive DNAs their distribution and importance in the evolution and understanding of the genomic constitution of species, studies focused on this DNA fraction in *D. suzukii* are scarce and restricted to the description of some transposable elements. Here, we aimed to increase information about the chromosomal and genomic organization of *D. suzukii*, focused on DNA repeated in tandem, we characterized the chromosomes through conventional analysis and chromosomal banding. We identified satellite DNAs (satDNA) through the RepeatExplorer2 and TAREN tools using sequencing data, and we used Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) to characterize the distribution of tandem repeated sequences (microsatellites, satellite DNAs, 18S ribosomal DNA, and H4 histone). Our results demonstrate an amplification of heterochromatin on chromosome II of *D. suzukii* and reveals a heterochromatin enriched in microsatellites and A+T content, suggesting that microsatellites may be playing a role in the expansion of heterochromatin in this species, except for the Y chromosome. Our data using microsatellites and satDNA indicate that the Y chromosome in *D. suzukii* must consist mostly of sequences derived from transposable elements. This study identified 15 satellites which represent about 7.27% of the species genome. Satellites analysis revealed that other repetitive DNA elements such as multigene families and transposable elements are involved in the origin of satellites in *D. suzukii* and reinforced the conservation of satellite DNAs within the *Drosophila* genus, such as satDNA 1688. The chromosomal distribution of DNAsat, evidenced by FISH was quite variable both in heterochromatin and euchromatin, as well as in the different chromosomal regions and in the number of chromosomes. These data provide the first more detailed description of the *D. suzukii* genome and demonstrate a very heterogeneous genomic evolution for this species concerning tandem repeats.

Key-words: Satellite DNA. Repetitive DNA. Fluorescent *In Situ* Hybridization. Microsatellite

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DNA REPETITIVO	11
1.2 DNA SATÉLITE	12
1.2.1 Origem de DNAs satélites	14
1.2.2 A hipótese da biblioteca	15
1.2.3 Evolução em concerto	15
1.2.4 Satélites funcionais	16
1.2.5 DNAsat no gênero <i>Drosophila</i>	17
1.3 DROSOPHILA SUZUKII	19
1.3.1 <i>Drosophila suzukii</i> uma espécie invasora praga	20
1.3.2 Informações citogenéticas e genômicas de <i>Drosophila suzukii</i>	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PREPARAÇÃO CROMOSSÔMICA	26
3.2 COLORAÇÃO CONVENCIONAL E BANDEAMENTOS CROMOSSÔMICOS	26
3.3 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA GENÔMICO	27
3.4 IDENTIFICAÇÃO COMPUTACIONAL DE DNA SATÉLITE	27
3.5 CONSTRUÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES	28
3.6 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH)	29
4. RESULTADOS	30
4.1 DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA DE <i>Drosophila suzukii</i>	30
4.2 MAPEAMENTO MICROSSATÉLITES	31
4.3 CARACTERIZAÇÃO COMPUTACIONAL E CROMOSSÔMICA DE DNA SATELITE	33
5. DISCUSSÃO	38
5.1 OS CROMOSSOMOS DE <i>D. suzukii</i> SÃO CARACTERIZADOS PELA EXTENSA QUANTIDADE DE HETEROCROMATINA DE COMPLEXA COMPOSIÇÃO	38
5.2 A BAIXA INFLUÊNCIA DOS DNAsat NA EXPANSÃO DO GENOMA DE <i>D.</i> <i>suzukii</i> E A HOMOLOGIA COM OUTROS ELEMENTOS REPETITIVOS	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	50
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DNA REPETITIVO

A maior parte dos genomas de eucariotos é constituído por DNA repetitivo, entretanto, embora esta fração seja muito representativa, suas funções e padrões evolutivos não são completamente compreendidos, sendo a maioria das vezes os estudos meramente descritivos da presença dessas repetições. Algumas funções já foram relacionadas aos DNAs repetitivos como seu papel na estabilidade cromossômica, formação da heterocromatina, segregação cromossômica e regulação de genes (BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015; LOWER *et al.*, 2019). Destaca-se também, a consequência do ponto de vista evolutivo que esta fração do genoma pode ter, evitando processos de hibridização, mesmo em espécies próximas, pela diferença na composição dos DNAs repetitivos (JAGANNATHAN; YAMASHITA, 2021). Estas sequências repetitivas quando localizadas nos cromossomos com aplicação da Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), mostram sua distribuição e evolução, auxiliando na compreensão da estrutura, organização e evolução dos genomas. Do ponto de vista de análise restrita aos dados de sequenciamento genômico, o entendimento da organização e montagem destas repetições é muito desafiador por razões técnicas, portanto, tornam-se negligenciadas na maioria dos genomas montados atualmente. Sendo assim, o uso das ferramentas cromossômicas aliadas aos dados genômicos têm se mostrado eficazes no fechamento desta lacuna, permitindo melhor entendimento da organização dos DNAs repetitivos nos genomas eucariotos (MARTINS *et al.*, 2011; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015; LOWER *et al.*, 2019).

Existem diferentes classes de DNA repetitivo, e essas repetições estão organizadas em:

- 1) sequências majoritariamente dispersas, como os elementos transponíveis (TEs); e 2) sequências repetidas em tandem, como o microssatélite, minissatélite, DNA satélite (DNAsat)

e as famílias multigênicas: por exemplo, os genes que codificam o DNA ribossomal (DNAr) e genes para histonas (MARTINS *et al.*, 2011).

Os elementos transponíveis se diferenciam entre si pela sua capacidade de locomoção no genoma. Os TEs são classificados de acordo com seu mecanismo de inserção no genoma em transposons, que se movem e amplificam a partir de moléculas de DNA e retrotransposons que se movimentam utilizando um intermediário de RNA, via transcrição reversa (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; WOLFGANG, 1994; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015; PAÇO; FREITAS; VIEIRA-DA-SILVA, 2019).

Os genes que codificam o DNAr possuem uma estrutura bastante conservada que consiste em duas famílias multigênicas: o DNAr 45S e 5S. O DNAr 45S está organizado em: 5,8S, 18S, e 26/28S, cada unidade de repetição contém uma sequência de codificação para cada um desses RNAr, juntamente com as regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) e externas (ETS) e um espaçador intergênico (IGS). O 5S é a menor classe do DNA ribossômico, é composto por uma unidade conservada, separadas por espaçadores não transcritos que podem variar em tamanho (NTS). As unidades DNAr 45S e 5S podem estar em um único ou múltiplos sítios dentro do genoma (APPELS *et al.*, 1980; SUMNER, 2003; CABRERO; CAMACHO, 2008; MARTINS *et al.*, 2011).

Os genes codificadores para histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) também estão organizados em clusters arranjados em tandem, intercalados uns com os outros com sequências espaçadoras não codificantes, porém algumas espécies podem apresentar alguns desses genes espaçados pelo genoma (SUMNER, 2003; NEI; ROONEY, 2005).

1.2 DNA SATÉLITE

A heterocromatina é um constituinte fundamental dos genomas eucariotos, envolvida em funções que auxiliam na manutenção da estabilidade genômica, como seu papel no processo

de segregação cromossômica, silenciamento da expressão de genes e reparo de erros no DNA. O principal tipo de sequência de DNA constituinte da heterocromatina, são repetições abundantes em tandem, conhecido como DNA satélite (DNAsat) (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015). Essas sequências são encontradas principalmente em regiões pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos, embora possam ocorrer com certa frequência nas regiões intersticiais dos cromossomos (WEILER; WAKIMOTO, 1995; GARRIDO-RAMOS, 2017).

Tradicionalmente, as diferentes classes de DNAsat são classificadas baseada no tamanho de sua unidade de repetição, em microssatélites (1-6pb) minissatélites (10-100pb) e DNAsat (>100pb). Entretanto, também podem ser classificadas baseada no comprimento do arranjo que pode chegar a milhões de nucleotídeos (RICHARD; KERREST; DUJON, 2008; GARRIDO-RAMOS, 2017; MARTINS *et al.*, 2011; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016). Portanto, não existe tamanho universalmente aceito para os limites de cada classe, mas os números em geral são concordantes (BENNETT, 2000). Classicamente, os microssatélites são utilizados como marcadores genéticos por serem codominantes e normalmente estarem distribuídos pela eucromatina, ao passo que os DNAsat apresentam alta variabilidade e são tipicamente localizados nas regiões de heterocromatina dos cromossomos, como as regiões teloméricas e pericentroméricas (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; WOLFGANG, 1994; BENNETT, 2000; GARRIDO-RAMOS, 2017)

Com o surgimento de novas metodologias utilizadas para estudo de DNAsat, os termos utilizados para essa classe de DNA repetitivo foram reavaliados. Assim, devido à similaridade de todas essas classes de DNAsat em níveis genômicos, citológicos e na sua forma de disseminação, Ruiz-Ruano *et al.*, (2016), propuseram o termo “satelitoma” para agrupar todo o conjunto de DNAsat presentes em um genoma.

1.2.1 Origem de DNAs satélites

A hipótese de origem das repetições de DNAsat, proposta por (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016), prediz que um novo satélite se origina em três etapas: origem, disseminação e amplificação.

1) ocorre uma duplicação “de novo” de qualquer sequência genômica com 2 pb ou mais. Esta amplificação pode ocorrer por alguns mecanismos como a ação conjunta de mutação e *crossing-over* desigual e deslizamento de uma fita de DNA durante a replicação e/ou pela reinserção de cópias de DNA extracromossômico, replicadas através da amplificação por círculo rolante.

2) A nova repetição é disseminada por todo o genoma e o/os mecanismo(s) por qual ocorre permanecem desconhecidos, mas elementos transponíveis e reinserção de sequências replicadas de intermediários de DNA extracromossômicos são possíveis explicações. Os minissatélites e microsatélites podem originar-se nesta segunda etapa, pois baseado nesse modelo, repetições em tandem curtas (< 15pb) surgem em qualquer lugar do genoma e podem originar repetições mais longas por duplicações e divergências. Além disso, há uma provável diferença nos mecanismos envolvidos na origem de repetições curtas e repetições longas, ou satélites simples e complexos, pois mutação e *crossing-over* são mecanismos que parecem estar envolvidos na origem das menores repetições ao passo que deslizamento de uma fita de DNA durante a replicação e/ou reinserção de cópias de DNA extracromossômico provavelmente são responsáveis pela origem das repetições maiores.

3) Posteriormente à disseminação, pode ocorrer uma amplificação em qualquer repetição em larga escala e essa repetição pode torna-se mais longa e agrupada, através de vários ciclos de duplicação e divergência, tornando-se um satélite visível por FISH.

Algumas classes de DNA repetitivo estão relacionadas com a origem de DNAs satélites. Por exemplo, DNAs satélites que se originaram de famílias multigênicas, como o DNAr 45S e

5S através da duplicação da região intergênica ou da região transcrita, seguida por uma amplificação diferencial (STUPAR *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2012; JO *et al.*, 2009; VITTORAZZI *et al.*, 2011). Existem também elementos transponíveis relacionados à origem de DNAsat (e microssatélites) derivados de suas regiões internas ou terminais, mas também são encontrados pertencendo à estrutura dos TEs. Além do mais, TEs também estão associados à realocação dessas repetições no genoma (WILDER; HOLLOCHER, 2001; AHMED; LIANG, 2012; MEŠTROVIĆ *et al.*, 2015; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; BELYAYEV *et al.*, 2020).

1.2.2 A hipótese da biblioteca

Os DNAs satélites encontrados no genoma de diferentes espécies podem estar relacionados em sua origem, isso é explicado através da hipótese da biblioteca. De acordo com essa hipótese, espécies relacionadas devem compartilhar um conjunto de DNAsat, presentes no ancestral comum, mas que podem ser amplificados diferencialmente entre as espécies. Essa amplificação diferencial gera diferenças quantitativas entre as espécies. Assim, um DNAsat pode se tornar abundante e exceder o mínimo para ser detectável através da FISH em uma espécie, e o satélite correspondente estar em baixa cópia nos genomas das espécies irmãs. O DNAsat em baixa abundância pode não ser detectável através da FISH, pois pode estar abaixo do mínimo necessário para isso, mas podem ser detectados na análise genômica utilizando ferramentas de bioinformática para identificação de repetições em tandem, como o RepeatExplorer/TAREAN (FRY; SALSER 1977; MESTROVIĆ *et al.*, 1998; RUIZ-RUANO *et al.*, 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017).

1.2.3 Evolução em concerto

Alguns modelos explicam a evolução de DNAsat e o padrão predominante é a evolução em concerto. A evolução em concerto presume que diferentes repetições de uma família de

DNAsat não seguem uma evolução independente. Ao contrário do esperado, considerando a ausência de pressões seletivas, as variantes de um DNAsat apresentam alto grau de similaridade dentro da espécie e diferente entre espécies, seguindo esse padrão em concerto. Isso acontece, pois, apesar de possíveis alterações na estrutura desses monômeros de forma independente, ocorre sua homogeneização. De forma que as cópias dentro de uma espécie são mais homogêneas do que quando comparadas entre espécies (PLOHL; MEŠTROVIĆ; MRAVINAC, 2012; GARRIDO-RAMOS, 2015). Essa homogeneidade ocorre através de mecanismos como o *crossing-over* desigual, transposição ou conversão gênica. Posteriormente essas novas variantes são expandidas e fixadas em uma população através da reprodução sexuada (DOVER, 1982; 2002).

Alguns fatores podem afetar a homogeneização destas sequências e a evolução do DNAsat pode não ocorrer pela evolução em concerto, como por exemplo, localização e tamanho das sequências. A homogeneização que leva a evolução em concerto ocorre preferencialmente em monômeros mais longos e em sua região central. Assim, repetições curtas e localizadas na extremidade do conjunto podem escapar da homogeneização. Ainda com relação à localização, sequências localizadas em cromossomos que não possuem homólogo, por exemplo, o cromossomo Y em espécies heterogaméticas, também pode levar a diferenciação de satélites específicos. Fluxo gênico é outro fator que leva ao aumento da variação destas sequências dentro da espécie, assim como restrições funcionais que podem também influenciar a evolução do DNAsat (revisado por GARRIDO-RAMOS, 2017).

1.2.4 Satélites funcionais

Algumas famílias de DNAsat mantêm algumas regiões altamente conservadas ou o tamanho de seus monômeros, dentro de uma espécie e/ou entre espécies (PALOMEQUE; LORITE, 2008). Assim, foi sugerido que um passo essencial para evolução de alguns satélites pode ser a aquisição de uma função biológica preservada pela seleção natural por longos

períodos evolutivos (FRY; SALSER, 1977). As repetições de DNAsat associados a algumas funções, por exemplo, satélites associados a funções centroméricas e satélites associados a aptidão do organismo dentro de uma espécie ou entre espécies, são preservados pela seleção (WU; TRUE; JOHNSON, 1989; THAKUR; PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Porém, alguns satélites sem função aparente, também são conservados entre diferentes espécies, portanto, ainda não há conhecimento se a preservação desse DNAsat é ao acaso ou por fatores seletivos. (CAMACHO *et al.*, 2021). Algumas funções biológicas foram associadas aos DNAsat e algumas teorias predizem que essas repetições atuam em processos neutros, seleção, na determinação de padrões de variação de sequência em regiões repetitivas, segregação e proteção cromossômica e organização do genoma (THAKUR; PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021; LOWER *et al.*, 2019).

1.2.5 DNAsat no gênero *Drosophila*

Desde o descobrimento do DNAsat espécies de *Drosophila* têm sido utilizadas como modelo para abordar vários aspectos da biologia dessas repetições, como sua origem, organização, variação, evolução e função (SILVA *et al.*, 2019). Pelo menos três funções biológicas parecem estar relacionadas a essas repetições nesse gênero: 1) função do centrômero, 2) silenciamento da cromatina/formação de heterocromatina e 3) modulação da cromatina e regulação positiva global de genes ligados ao cromossomo X (KUHN, 2015).

Estimou-se que o DNAsat ocupa mais de 30% do genoma de várias espécies de *Drosophila* (LIMA; HANLON; GERTON, 2020), como por exemplo *Drosophila albomicans* com 38.8%. Porém, foi observado em *Drosophila simulans* que apenas 4,53% de seu genoma é composto por DNAsat e em *Drosophila arizona* menos de 0,55%. Demonstrando que a variação no conteúdo de DNAsat é específico para cada linhagem do gênero e tende a ser maior em espécies do subgênero *Drosophila*, sugerindo que em algumas espécies, outros tipos de

repetições contribuem mais para variação do tamanho do genoma e conteúdo de heterocromatina. O tamanho do genoma das espécies desse gênero varia de 130 Mb em *Drosophila mojavensis* a 333 Mb em *Drosophila virilis* (BOSCO *et al.*, 2007, PARIS *et al.*, 2020; GREGORY; JOHNSTON, 2008). As variações observadas no tamanho genômico das espécies desse gênero é influenciada por aumento ou diminuição de diferentes classes de DNA repetitivo, como a expansão de DNAsat em *Drosophila grimshawi* ou de TEs em *Drosophila subpulchrella* (WEI *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2021; LIMA; RUIZ-RUANO, 2022).

Apesar da evolução do sequenciamento e do surgimento de novas ferramentas para a identificação de DNAs satélites, poucas espécies do gênero possuem sua fração do DNAsat conhecidas. A maioria desses estudos sobre DNAsat foram realizados em *D. melanogaster* e em espécies intimamente relacionadas. Por exemplo, *D. virilis*, *D. americana*, *D. buzzatii*, *D. seriema*, *D. mojavensis*, *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. sechellia* (JAGANNATHAN *et al.*, 2017; LIMA; SVARTMAN; KUHN, 2017; SILVA *et al.*, 2019; LIMA; HANLON; GERTON, 2020). Recentemente, outras 37 espécies do gênero tiveram sua fração de DNAsat analisadas (LIMA; RUIZ-RUANO, 2022), com foco em outros grupos além do *melanogaster*. Ainda assim, esses números são poucos quando comparados à quantidade de espécies (mais de 1.600) que representam esse grupo.

Os estudos focados no DNAsat em *Drosophila* deram luz sobre a evolução dessas sequências repetitivas no genoma do gênero. Variações entre espécies e dentro de populações de uma espécie demonstram que a evolução de DNAsat é bastante heterogênea dentro deste grupo e ocorrem rapidamente (JAGANNATHAN *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2014; 2018; BRACEWELL *et al.*, 2019). Por exemplo, espécies intimamente relacionadas podem apresentar variações no conteúdo de DNAsat, como em *D. miranda* que possui um satélite de 99 pb localizado na região centromérica mas que não está presente na sua espécie irmã *D. pseudoobscura* (BRACEWELL *et al.*, 2019). E três espécies do subgrupo *simulans*, (*D.*

simulans, *D. mauritiana*, e *D. sechellia*) que também são intimamente relacionadas e apresentam grandes diferenças no conteúdo de DNAsat (JAGANNATHAN *et al.*, 2017). Como mencionado, variações populacionais também são observadas e o processo que impulsiona essas diferenças entre as populações pode ser a deriva ou seleção natural. Por exemplo, diferenças observadas entre diferentes linhagens de *D. melanogaster*, onde a população dos países baixos além de ter uma maior abundância de DNAsat quando comparado a uma população da África, também possui a maior variabilidade observada entre as linhagens. Essa variação pode ser indicativa de ausência de pressão seletiva dentro dessa população (WEI *et al.*, 2014). Outro exemplo de variação interespecífica foi observado em duas linhagens de *D. americana*, que apresentaram diferenças em proporções dos satélites mesmo sendo sequenciadas utilizando a mesma plataforma de sequenciamento (SILVA *et al.*, 2019).

Apesar da manutenção de DNAsat em um tempo evolutivo longo ser raro dentro de *Drosophila* algumas espécies compartilham satélites específicos, altamente conservados. Por exemplo, a família de DNAsat 1.688 e o microssatélite DODECA que apesar de conservados apresentam variações em sua localização, proporções genômicas e em suas sequências dentro das espécies (FERREE; PRASAD, 2012; JAGANNATHAN *et al.*, 2017; LIMA; HANLON; GERTON 2020).

1.3 DROSOPHILA SUZUKII

O gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) com cerca de 1.600 espécies, é um dos sistemas modelos mais importantes na biologia e a maior parte das espécies desse gênero que estão associadas a humanos são consideradas incômodas domésticas ou de fermentação, mas raramente pragas economicamente importantes (CHIU *et al.*, 2013; ASPLEN *et al.*, 2015; O'GRADY; DESALLE, 2018). Entretanto, dentro do grupo destaca-se *Drosophila suzukii*, que

junto com *Drosophila biarmipes* e *Drosophila subpulchrella* constituem o subgrupo *suzukii*, pertencente ao subgênero *Sophophora*. A provável origem geográfica dessa espécie é o sul da Ásia (WALSH *et al.*, 2011; ROTA-STABELLI *et al.*, 2013) que possui registros datados desde 1916 no Japão (KANZAWA, 1935 apud WALSH *et al.*, 2011).

Drosophila suzukii comumente conhecida como mosca da asa manchada (SWD), devido a uma mancha escura na asa dianteira dos machos (Fig. 1A) (O'GRADY; DESALLE, 2018), se diferencia das demais espécies do mesmo gênero devido a seu hábito de oviposição que se dá em frutos saudáveis/em maturação. A casca dos frutos é penetrada pelo ovipositor serrilhado da fêmea (Fig. 1B), enquanto a maior parte das outras espécies do gênero, como *D. melanogaster* possui preferência por frutos muito maduros ou estragados (ASPLEN *et al.*, 2015).

1.3.1 *Drosophila suzukii* uma espécie invasora praga

O formato do ovipositor garante uma vantagem evolutiva a *D. suzukii*, pois lhe permite penetrar a pele relativamente mais dura de frutos imaturos e depositar seus ovos. Sendo assim, os danos são gerados aos frutos, pois 1) as larvas se alimentam das polpas dos frutos (ROTA-STABELLI *et al.*, 2013) e 2) a entrada de microrganismos é favorecida pelas feridas no exterior dos frutos, facilitando sua deterioração (IORIATTI *et al.*, 2015). Portanto, essa espécie possui grande potencial de promover danos/perdas na safra antes mesmo da colheita, diminuir a qualidade do fruto e consequentemente seu valor comercial. Isto gera custos econômicos devido às perdas de produção, aumento de mão de obra e custos para monitoramento e gerenciamento. Além de ser considerada uma ameaça potencial à biodiversidade e ecologia das áreas invadidas, por afetar o nicho de outras espécies nativas (LE *et al.*, 2011; ROTA-STABELLI *et al.*, 2013).

A partir de sua origem na Ásia houve expansão de *D. suzukii* para os demais continentes. Na América do Norte o primeiro registro ocorreu em 2008, na Europa em 2009 (LE *et al.*, 2011)

e na África em 2013 (EPPO, 2019). Na América do Sul, a presença de *D. suzukii* foi confirmada em 2014 (DEPRÁ *et al.*, 2014), alcançando assim, uma distribuição global (EPPO, 2020). No Brasil, os primeiros registros foram nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, seguida por uma rápida expansão para outros estados do Sul e Sudeste, como Paraná (GEISLER *et al.*, 2015), Espírito Santo (ZANUNCIO *et al.*, 2018), Minas Gerais (ANDREAZZA *et al.*, 2016), Rio de Janeiro (BITNER-MATHÉ; VICTORINO; FARIA, 2014), São Paulo (VILELA; MORE *et al.*, 2014) e no Distrito Federal na região Centro-Oeste do país (MAIA, 2019). Além desses estados com presença confirmada, existe um risco de que *D. suzukii* também atinja o Nordeste brasileiro (FERRONATO *et al.*, 2019). Essa rápida expansão de *D. suzukii* provavelmente foi de forma passiva mediada pelo comércio de frutas através de humanos; ou de forma ativa, devido ao seu modo de dispersão que permite seu rápido deslocamento de uma região para outra (ROTA-STABELLI *et al.*, 2013; FERRONATO *et al.*, 2019).

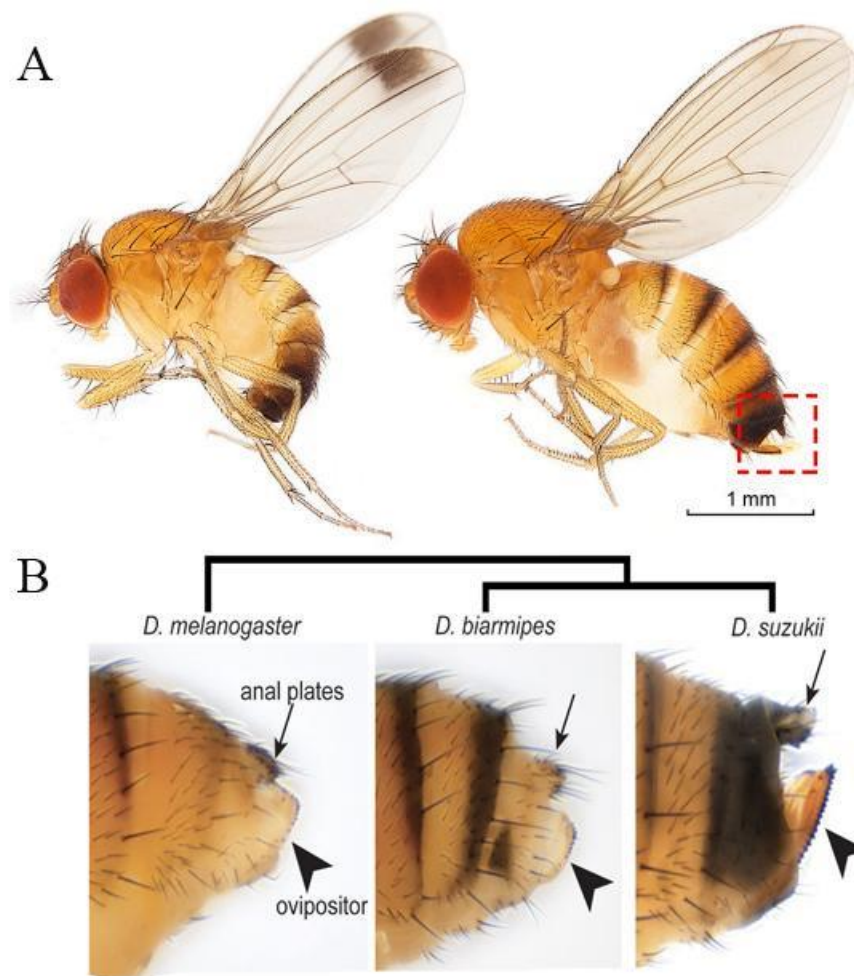


Figura 1. *Drosophila suzukii*. Macho à esquerda, fêmea à direita. O quadrado indica o ovipositor (A). Formatos de ovipositor em algumas espécies de *Drosophila* e sua relação filogenética (B). Adaptado de McEvey (2017) e Green, J.E *et al.*, (2019).

Drosophila suzukii ataca uma alta variedade de frutos e possui preferência por aqueles que apresentam tegumento fino, como cerejas, pêssegos, ameixas, caquis e uvas, mas já foi registrado oviposição em frutos com casca mais resistentes, como maçãs e laranjas (WALSH *et al.*, 2011; BELLAMY; SISTERTSON; WALSE, 2013; SOUZA *et al.*, 2020). No Brasil, também foi relatada oviposição em espécies nativas como pitanga e goiaba e em espécies exóticas como amora preta, mirtilo e morango (WOLLMANN *et al.*, 2020).

Diferente da disseminação de *D. melanogaster* que tem pouca consequência, a distribuição de *D. suzukii* é uma grande preocupação, pois pode implicar em perdas econômicas que podem ser acentuadas nas regiões sul e sudeste do Brasil. Essas regiões são responsáveis por boa parte da produção de frutas, possuindo as maiores porcentagens de áreas plantadas e valor de produção. Alguns dos fatores que favorecem a expansão de *D. suzukii* são adaptações climáticas, alto rendimento de reprodução, ausência de espécies predadoras e competidoras pelas frutas frescas, além da alta diversidade de frutos disponíveis para essa espécie e resistência a fitossanitários. Portanto, essa espécie praga pode implicar em grandes perdas econômicas para economia regional e do país (FACHINELLO *et al.*, 2011; CHIU *et al.*, 2013; ROTA-STABELLI, 2013; OMETTO *et al.*, 2013, ASPLEN *et al.* 2015; ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI&FRUTI, 2021).

1.3.2 Informações citogenéticas e genômicas de *Drosophila suzukii*

Levando em consideração a importância como praga de *D. suzukii*, suas informações genômicas e citogenéticas são escassas e estão resumidas a descrição do número cromossômico ($2n= 8, XX/XY$) (DENG *et al.*, 2007), descrição do mapa dos cromossomos politênicos (DROSOPOULOU *et al.*, 2019), e montagem parcial genômica com ênfase na anotação gênica (CHIU *et al.*, 2013; PARIS *et al.*, 2020). No contexto de DNA repetitivo e da contribuição e importância desta fração na evolução e compreensão da organização genômica das espécies, os estudos voltados ao conhecimento dessas sequências no genoma de *D. suzukii* são focados nos elementos transponíveis, apenas com a descrição da porcentagem desta classe de elementos no genoma da espécie. *Drosophila suzukii* apresenta uma das maiores porcentagens de TEs dentro do gênero (~47%) associados a um dos maiores genomas (~270 Mb) (MÉREL *et al.*, 2021; SESSEGOLO; BURLET; HAUDRY, 2016; PARIS *et al.*, 2020). Porém, nada se conhece sobre a fração de DNA satélite nesta espécie. Portanto, os dados deste trabalho fornecem informações

significativas sobre uma fração repetitiva até então não estudada no genoma de *D. suzukii*, aumentando a compreensão sobre sua organização genômica, além de contribuir com entendimento da evolução desta classe de DNAs repetitivos em *Drosophila*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os cromossomos e a fração repetitiva em tandem do genoma da mosca praga *Drosophila suzukii* por análises genômicas e cromossômicas, visando entender o cariótipo da espécie e o padrão de organização e evolução destas repetições, auxiliando no entendimento de sua organização genômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a estrutura geral do cariótipo de *Drosophila suzukii* e identificar possíveis polimorfismos através das técnicas de coloração convencional, bandeamentos cromossômicos clássicos (bandeamento C e coloração com fluorocromos base específicos) e mapeamento por FISH de microssatélites, DNAr 18S e Histona H4.
- Compreender os padrões de organização e evolução de DNAs satélites no genoma de *Drosophila suzukii* através do sequenciamento genômico para prospecção e caracterização molecular dessas repetições e caracterização cromossômica através da FISH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E PREPARAÇÃO CROMOSSÔMICA

Espécimes de *Drosophila suzukii* foram obtidos na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP - Piracicaba/São Paulo, Brasil) e cultivadas no Laboratório de Citogenética Animal (UNESP - Rio Claro/São Paulo, Brasil) em incubadora BOD com fotoperíodo (Solab-224/300) a 20°C. As preparações cromossômicas foram realizadas baseadas no protocolo de Larracunte; Ferree (2015). Os gânglios cerebrais do terceiro ínstar larval de indivíduos machos foram dissecados em 1 × PBS, movido a KCl (75mM) para tratamento hipotônico por 10min e fixados em solução de Carnoy modificada (3:1, etanol absoluto: ácido acético). Em seguida, os gânglios cerebrais foram transferidos para 10 µL de ácido acético (50%) e gentilmente espalhados em chapa quente a 40°C. As preparações foram desidratadas em série etílica: 70% (2 min), 85% (30 seg), 100% (30 seg) e estocadas em freezer -20 °C.

3.2 COLORAÇÃO CONVENCIONAL E BANDEAMENTOS CROMOSSÔMICOS

As lâminas foram coradas com DAPI (4'',6-Diamidine-2''-phenylindole) e montadas com VECTASHIELD (Vector, Burlingame, CA, USA) para análise convencional. O bandejamento C foi baseado na metodologia de Sumner (1972). As preparações cromossômicas foram imersas em Ba(OH)₂ 5% a 60°C por 1 min, lavadas com água e rapidamente imersas em HCl 0,1 N temperatura ambiente, depois foram tratadas com 2 × SSC a 60 °C (1min). O material foi corado com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato durante 5 min. Para o bandejamento com Fluorocromo bases específicos, o material primeiro foi corado com cromomicina A3 (CMA₃) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) (0,5 mg/mL) por 60 min, posteriormente com DAPI (2 µg/mL) por

30 min. As lâminas foram montadas com meio de montagem composto por tampão McIlvaine pH = 7,0, glicerol (50%) e MgCl₂ (50 mM).

3.3 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico de 20 indivíduos machos de *Drosophila suzukii* foi extraído e utilizado para sequenciamento. A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit “Wizard® Genomic DNA Purification” (Promega), seguindo o protocolo do fabricante, com algumas modificações. Após a Nuclei Lysis Solution, foi adicionado 10 µL de Proteinase K (20 mg/mL) a 60°C por 30 min. Posteriormente, foi adicionado 200 µL Protein Precipitation Solution, incubado em gelo (5min) e centrifugado (4min). Em seguida, houve a transferência do sobrenadante para 600 µL de isopropanol e centrifugado. O sobrenadante foi removido, 600 µL de álcool 70% foi adicionado e o material foi centrifugado (5 min). Após a reidratação com 20 µL de água Milli-Q, foi adicionado 0,4 µL de RNase a 37°C por 30min. O sequenciamento genômico foi realizado pela Novogene (HK) Co., Ltd. (Hong Kong, China) utilizando a plataforma Illumina Hiseq 4000 para gerar reads pareados com 150pb.

3.4 IDENTIFICAÇÃO COMPUTACIONAL DE DNA SATÉLITE

A identificação de DNAsat foi realizada utilizando as ferramentas TAREAN e RepeatExplorer2 (NOVÁK *et al.* 2017; NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2020) disponíveis na plataforma Galaxy/RepeatExplorer. Iniciamos essa análise rodando o genoma sequenciado no TAREAN, seguindo as configurações padrão. Posteriormente, utilizamos os satélites putativos identificados pelo TAREAN para análise comparativa com os resultados do RepeatExplorer 2, com as mesmas configurações utilizadas no TAREAN. Em seguida, análise da organização em tandem dos possíveis DNAsat identificados pelo TAREAN e pelo RepeatExplorer 2 foram realizadas através de seus cotings, utilizando o gráfico dotplot, ferramenta disponível no

software Geneious v4.8.5 (DRUMMOND *et al.* 2009). Consideramos para análises posteriores todos os DNAsat putativos identificados simultaneamente no TAREAN e RepeatExplorer2 e apenas no TAREAN ou RepeatExplorer2. Essas sequências foram comparadas a sequências depositadas no Rebase e GenBank para verificar alguma identificação pré-existente para estas repetições.

A abundância e divergência de cada satélite foram calculadas pelo RepeatMasker (SMIT *et al.* 2013). A divergência genética entre as sequências foi estimada considerando o modelo de Kimura 2-parameter (SMIT *et al.* 2013, RUIZ-RUANO *et al.* 2016). A abundância genômica foi calculada pela divisão do número de nucleotídeos de cada DNAsat pelo tamanho total da biblioteca. Posteriormente, os satélites foram organizados em ordem decrescente de abundância e nomeados seguindo o proposto por (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016).

3.5 CONSTRUÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

Primers foram desenhados utilizando o software Genious (4.8.5), com as sequências consenso de alguns DNAs satélites identificados no genoma de *D. sukikii* para posterior amplificação por PCR. Em alguns casos, o consenso dos DNAs satélites foram utilizados para desenhar oligonucleotídeos marcados com Biotina-14-dATP durante sua síntese, essas sequências foram utilizadas como sondas na hibridização. Para amplificação da Histona H4 foram utilizados primers descritos anteriormente (Tabela S1).

O DNA genômico dos machos foi utilizado para amplificação por PCR e foi utilizado: 100 ng/μL de DNA, 2 mM de primer Forward e Reverse, 10 × PCR Rxn Buffer, 0.2 mM MgCl₂, 0.16 mM dNTPs, 1 U de DNA polimerase Taq Platinum (Invitrogen, San Diego, CA, USA). A reação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguido de 30 ciclos a 95°C (30seg), 55°C (30seg) e 72°C (80seg) e uma extensão final a 72°C por 5 min. As bandas referentes aos monômeros de DNAsat foram manualmente isoladas do gel de agarose 1% e 0,5

μL desta solução foi utilizada para uma reamplificação. Posteriormente, os produtos da PCR foram novamente confirmados em gel de agarose 1%. As sequências amplificadas para serem utilizadas como sondas foram marcadas com Digoxigenina-11-dUTP (Roche) ou Biotina-14-dATP (Invitrogen) por Nick translation e foram utilizadas na Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH).

3.6 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A FISH foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cabral-de-Mello; Marec (2021). Como sondas foram utilizados os DNAs satélites identificados em *Drosophila suzukii*. Sondas das sequências conservadas, histona H4 e DNAr 18S obtidas de *Drosophila melanogaster* e *Diatraea saccharalis*, respectivamente. Para o DNAr 5S foi utilizado um oligonucleotídeo marcado com Biotina-14-dATP durante sua síntese. Além disso, foram utilizados os microssatélites: (A)₃₀, (C)₃₀, (CGG)₁₀, (TAA)₁₀, (GATA)₈, (GACA)₄, (AAGAG)₄, (GTTTT)₄, (GTAAAGA)₄ e DODECA (CCCGTACTGGT)₃ já marcados com Biotina-14-dATP durante sua síntese (Sigma, St. Louis, MO, USA). As sondas marcadas com digoxigenin-11-dUTP (Roche) e Biotina 14-dATP (Invitrogen) foram detectadas com anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) e Alexafluor-488, respectivamente. As lâminas foram coradas e montadas com DAPI/VECTASHIELD. As imagens foram capturadas utilizando o fotomicroscópio Olympus BX61 acoplado a uma câmera DP70, e o brilho e contraste foram ajustados no Adobe Photoshop CS5.

4. RESULTADOS

4.1 DESCRIÇÃO CROMOSSÔMICA DE *Drosophila suzukii*

Como já descrito (DENG *et al.*, 2007; DROSOPOLU *et al.*, 2019), *Drosophila suzukii* possui o cariótipo $2n=8$, XX(fêmea)/XY(macho) que consiste em três pares de cromossomos autossomos: dois metacêntricos (pares II e III) e um par muito pequeno como um ponto (par IV), cromossomo dot (Fig. 2a-b). Os cromossomos sexuais, designados como primeiro par, são heteromórficos e o sítio de DNAr 18S está localizado neste par (Fig. 2f). O X é acrocêntrico e o Y também acrocêntrico possui forma de bastão. O cromossomo Y é completamente heterocromático, embora apresente leve variação na intensidade das bandas, no cromossomo X esses blocos de heterocromatina estão restritos a região pericentromérica (Fig. 2c).

Cerca de $\frac{2}{3}$ da região proximal do cromossomo II de ambos os braços cromossômicos é constituída por heterocromatina. No cromossomo III a heterocromatina está restrita a região pericentromérica, embora seja um bloco grande. O cromossomo quatro é inteiramente eucromático. Alguns blocos de heterocromatina coincidem com regiões ricas em A+T no cromossomo II, visualizados pelo destaque com DAPI (Fig. 2d). Não foram observadas regiões ricas em G+C (Fig. 2e).

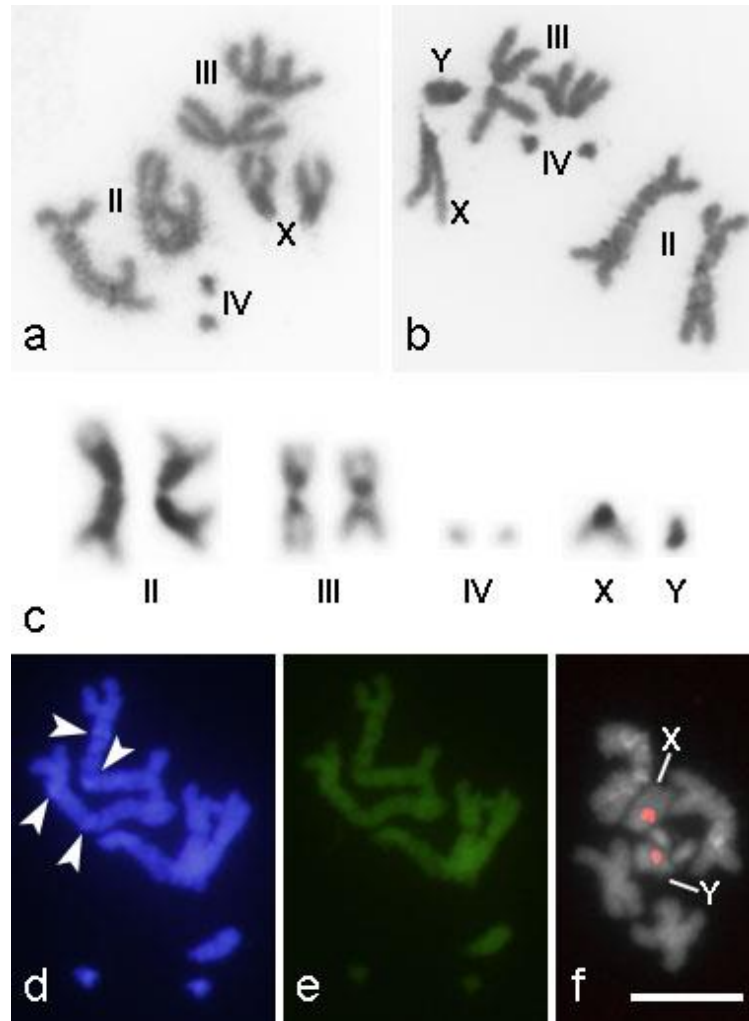


Figura 2. Características gerais do cariótipo de *Drosophila suzukii*. Coloração convencional dos cromossomos mitóticos obtidos de fêmea (a) e macho (b). Cariótipo evidenciando a distribuição de heterocromatina pelo bandejamento C (c). Bandejamento com fluorocromos base específicos utilizando DAPI (d) e CMA₃ (e). Em (d) as cabeças de setas indicam regiões positivas para DAPI. (f) Localização por FISH do DNAr 18S. Barra = 10 µm

4.2 MAPEAMENTO MICROSSATÉLITES

Embora possua alguma variação, a maior parte dos microssatélites (AAGAG)₄, (GTTTT)₄, (TAA)₁₀ (CGG)₁₀, (GATA)₈, (GTAAAGA)₄, (GACA)₄ e DODECA foram mapeados em regiões cromossômicas que correspondem majoritariamente a heterocromatina (Fig. 3), principalmente nos cromossomos II, III e X. Não foram observados sinais na hibridização para os microssatélites (A)₃₀, (C)₃₀, e (AATAT)₄ (dados não mostrados). O

microsatélite (AAGAG)_n apresentou bandas apenas no cromossomo II (Fig. 3a), enquanto os demais microsatélites além das bandas do cromossomo II apresentaram bandas pericentroméricas no cromossomo III e uma banda intersticial na eucromatina do cromossomo X (Fig. 3b-h). O cromossomo Y apesar de ser heterocromático apresentou apenas um pequeno sinal para o microsatélite (GACA)₄ (Fig. 3h).

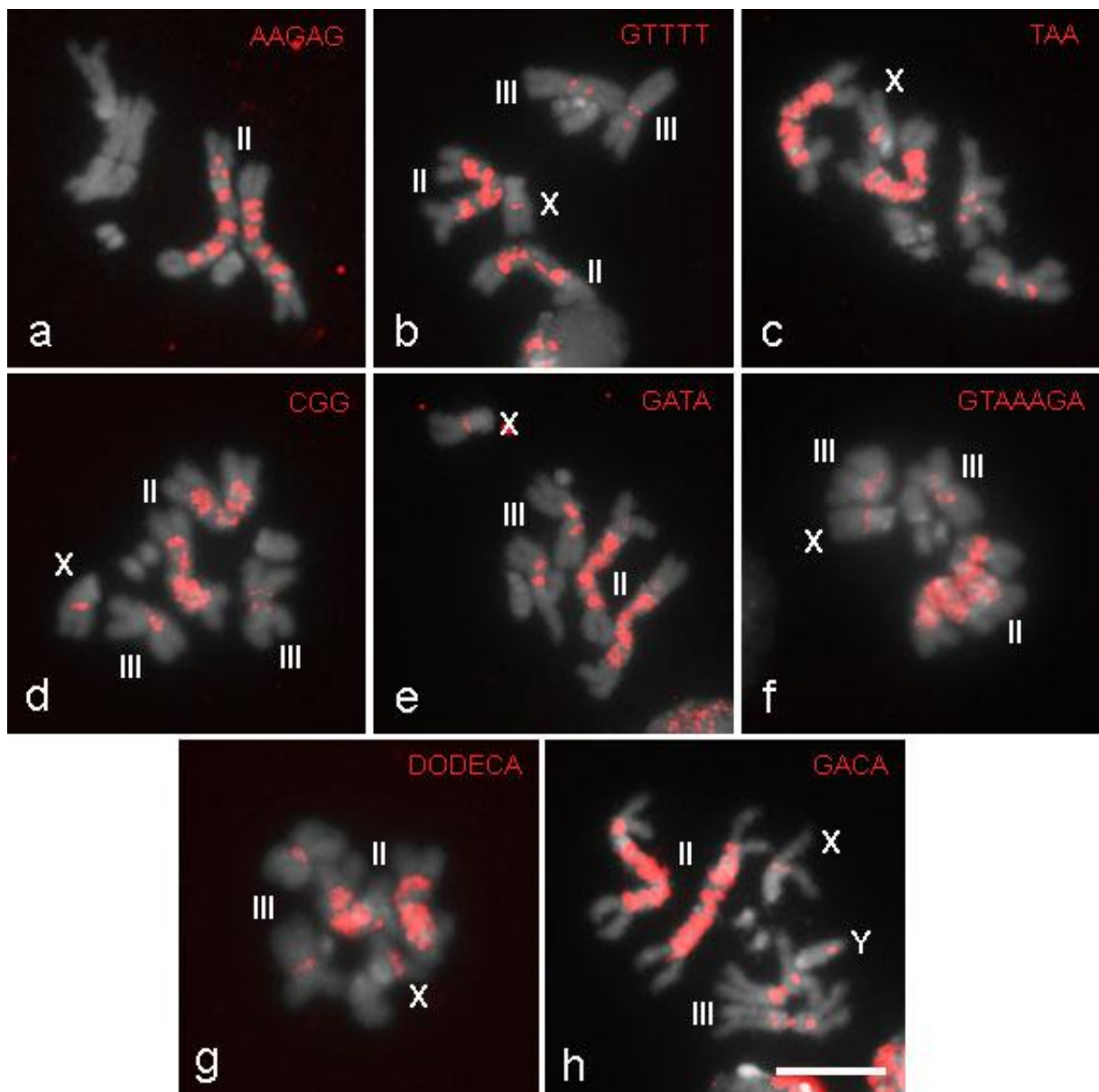


Figura 3. Mapeamento por FISH de microsatélites nos cromossomos mitóticos obtidos do gânglio cerebral de machos de *Drosophila suzukii*. Os microsatélites utilizados e cromossomos com sinais estão indicados diretamente nas imagens. Os sinais foram pseudocoloridos em vermelho. Barra = 10 μ m.

4.3 CARACTERIZAÇÃO COMPUTACIONAL E CROMOSSÔMICA DE DNA SATELITE

A análise combinada do RepeatExplorer2 e TAREN permitiu a identificação de 15 DNAsat no genoma de *D. suzukii* que constituem cerca de 7,27% do genoma da espécie. O satélite mais abundante (DsuzSat01-403) representa 2,4% e junto com o segundo mais abundante (DsuzSat02-188) com abundância de 1,79%, representam mais da metade (4,18%) da fração de DNAsat em *D. suzukii*. O satélite menos abundante (DsuzSat15-418) representa 0,01% do genoma. O tamanho dos monômeros variou de 8 pb a 6.571 pb e a divergência de 0,27% a 12,66%. A maioria das sequências foram enriquecidas em A+T (47,10% - 73,0%) (Tabela 1 e Fig. S1).

Tabela 1. Características gerais de DNAsat identificados no genoma de *D. suzukii* utilizando o Repeat Explorer2 e TAREAN

satDNA	Tamanho (bp)	A+T	Abundância	Divergência
DsuzSat01	403	53,8%	2,396%	7.92%
DsuzSat02	188	68,1%	1,796%	6.15%
DsuzSat03	2946	56,0%	0,724%	8.80%
DsuzSat04	419	70,2%	0,563%	6.09%
DsuzSat05	8	50,0%	0,443%	3.89%
DsuzSat06	6571	47,65%	0,397%	10.67%
DsuzSat07	5174	57,1%	0,338%	0.27%
DsuzSat08	163	69,9%	0,321%	9.65%
DsuzSat09	198	63,6%	0,104%	12.66%
DsuzSat10	159	73,0%	0,070%	10.15%
DsuzSat11	206	68,0%	0,045%	9.86%
DsuzSat12	901	62,6%	0,033%	1.09%
DsuzSat13	132	61,4%	0,018%	12.22%
DsuzSat14	570	56,8%	0,014%	3.54%
DsuzSat15	418	59,1%	0,012%	0.34%

A pesquisa no Repbase e GenBank revelou que alguns satélites identificados apresentam homologia com outras repetições encontradas em *Drosophila*, incluindo *D. suzukii* (Tabela S2). DsuzSat07-5174 e DsuzSat15-418 apresentaram similaridade com a família

multigênica de Histonas e DNAr 5S, respectivamente. O DsuzSat15-418 apresentou alta similaridade com a região transcrita do DNAr 5S (em torno de 99,3%), de várias espécies de *Drosophila*. Para compreender melhor a relação entre essas sequências do ponto de vista cromossômico, hibridizamos uma sonda da região transcrita e conservada do DNAr 5S em *D. suzukii*. Na FISH, essa repetição demonstrou-se dispersa com sinais fracos por todo os cromossomos com intensidade semelhante, exceto nos cromossomos dot (Fig. 4a), e não foi possível definir o sítio do DNAr 5S. No entanto, a mesma sonda em *Drosophila melanogaster* mapeou apenas um sinal proximal no cromossomo II (Fig. 4b), região esperada para posição deste cluster por dados genômicos, confirmando que o DNAr 5S em *D. suzukii* se espalhou formando longos arranjos em tandem. Portanto, é possível que o DNAr 5S esteja envolvido na origem do DsuzSat15-418 e esse satélite ainda possui a sequência de codificação do DNAr 5S.

O DsuzSat07-5174 também apresentou similaridade com as regiões transcritas para cada unidade do cluster de genes de histonas. Inicialmente, amplificamos a histona H4 em *D. suzukii* e na hibridização, essa sonda também se mostrou dispersa por todo o genoma, exceto nos cromossomos dot (Fig 4c). Entretanto, a mesma sonda marcou exclusivamente a região proximal do cromossomo II em *Drosophila melanogaster* (Fig. 4d), isso nos dá suporte de que os sinais observados utilizando a sonda de *D. suzukii* é gerado pela presença de sequências da histona H4. A hibridização de uma sonda heteróloga da histona H4 (de *D. melanogaster*) em *D. suzukii* apresentou uma única marcação distal no cromossomo II (Fig. 4c), indicando que esta é a única localização para o locus de histona H4. Entretanto, não houve uma sobreposição da histona H4 com DsuzSat07-5174. Esses dados indicam que existe um único sítio para histona H4 em *D. suzukii* e que possivelmente a histona também está envolvida na origem de um satélite nessa espécie. Porém, diferente do observado para DsuzSat15-418, onde não conseguimos diferenciar o sítio DNAr 5S, aqui, a marcação de um único locus de histona H4 utilizando uma

sonda heteróloga, demonstra que a histona H4 é independente do DsuzSat07-5174 em *D. suzukii*.

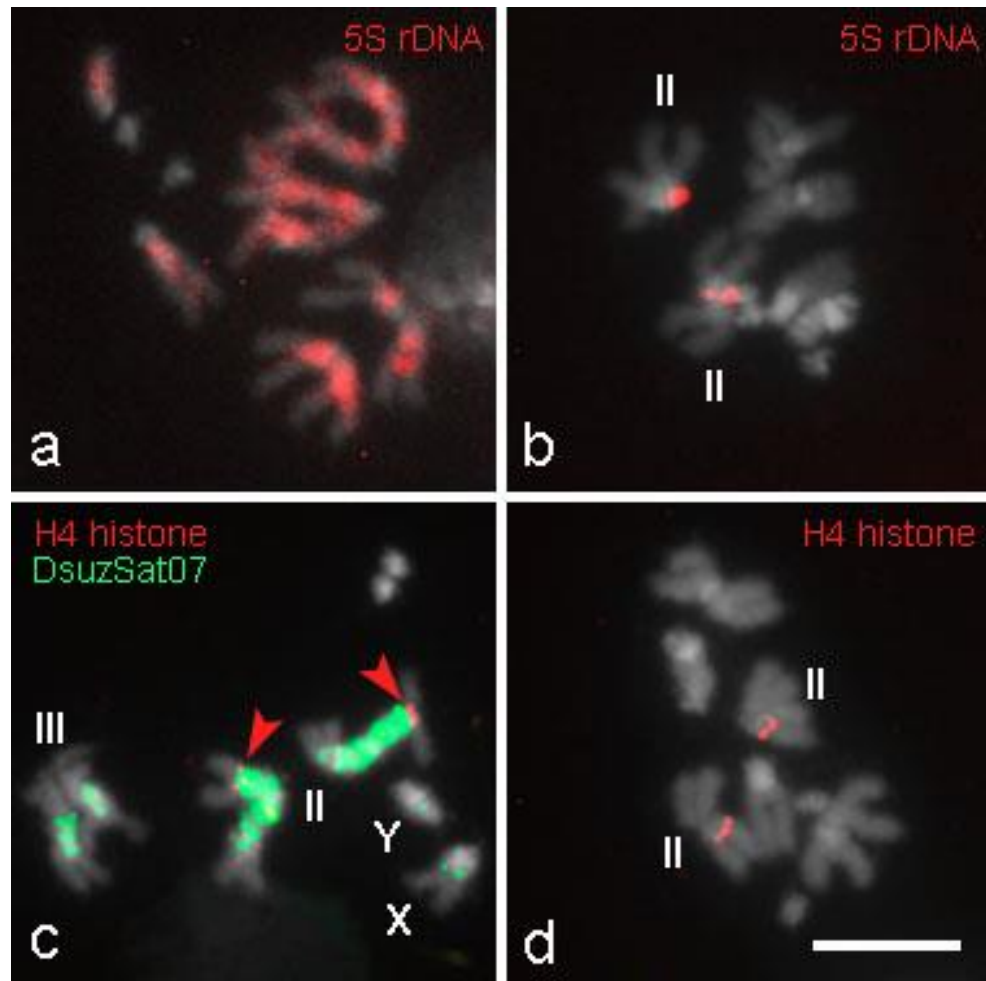


Figura 4. Mapeamento por FISH utilizando sequências repetidas em tandem nos cromossomos mitóticos de *Drosophila suzukii* (a,c) e *Drosophila melanogaster* (b,d). Hibridização do DNAr 5S (a,b). Em (a), observe a dispersão do DNAr 5S por todos os cromossomos, exceto o cromossomo dot, em (b), a presença de uma única marcação proximal no cromossomo II. Hibridização da histona H4 (vermelho) (c,d). Em (c), um sinal distal indicado pelas cabeça de setas vermelhas, em (d) uma marcação proximal no par II. DNA satélite (verde) disperso em quase todos os cromossomos (c). Barra = 10 μ m.

Alguns satélites identificados aqui apresentaram similaridade com elementos transponíveis, DsuzSat01-403, DsuzSat03-2946, DsuzSat06-6571 e DsuzSat08-163. Para verificar se os satélites identificados estão organizados em tandem e são originados de TEs, analisamos os cotings maiores para cada uma dessas repetições através do dotplot e pelos

gráficos gerados no TAREAN e RepeatExplorer2. Confirmamos a organização em tandem para esses satélites, exceto para DsuzSat06-6571, devido ao tamanho do monômero e limitações técnicas (Fig. S2). Isso sugere que alguns satélites identificados em *D. sukii* podem ser originados de elementos transponíveis. Do ponto de vista cromossômico estes DNAsat apresentaram algumas diferenças. O DsuzSat01-403 apresentou enriquecimento na região intersticial do cromossomo Y, com a formação de um bloco com um grande sinal (Fig. 5a); o DsuzSat03-2946 (Fig. 5c) e o DsuzSat08-163 (Fig. 5e) estão espalhados principalmente na maioria da eucromatina de todos os cromossomos; e o DsuzSat06-6571 apresentou pequenos clusters no cromossomo II (Fig. 5d).

DsuzSat09-198 e DsuzSat11-206 apresentaram homologia com o satélite 1.688. Ambos estão localizados na região intersticial do cromossomo III, DsuzSat11-206 apresenta um grande bloco nesse cromossomo (Fig. 5h) e DsuzSat09-198 (Fig. 5f) apresenta uma marcação adicional na região intersticial do cromossomo X. Satélites que não apresentam homologia considerável com outras repetições, são cromossomos específicos, exceto DsuzSat02-188 e DsuzSat10-159 que estão localizados na região centromérica dos cromossomos II, III e X (Fig. 5b,g). DsuzSat10-159 também está localizado na região centromérica do cromossomo Y e também no cromossomo dot, embora não seja possível definir a localização exata neste último (Fig. 5g). DsuzSat12-901 (Fig. 5i), DsuzSat13-132 (Fig. 5e) e DsuzSat14-570 (Fig. 5j) estão localizados na região terminal do cromossomo II, X e III, respectivamente.

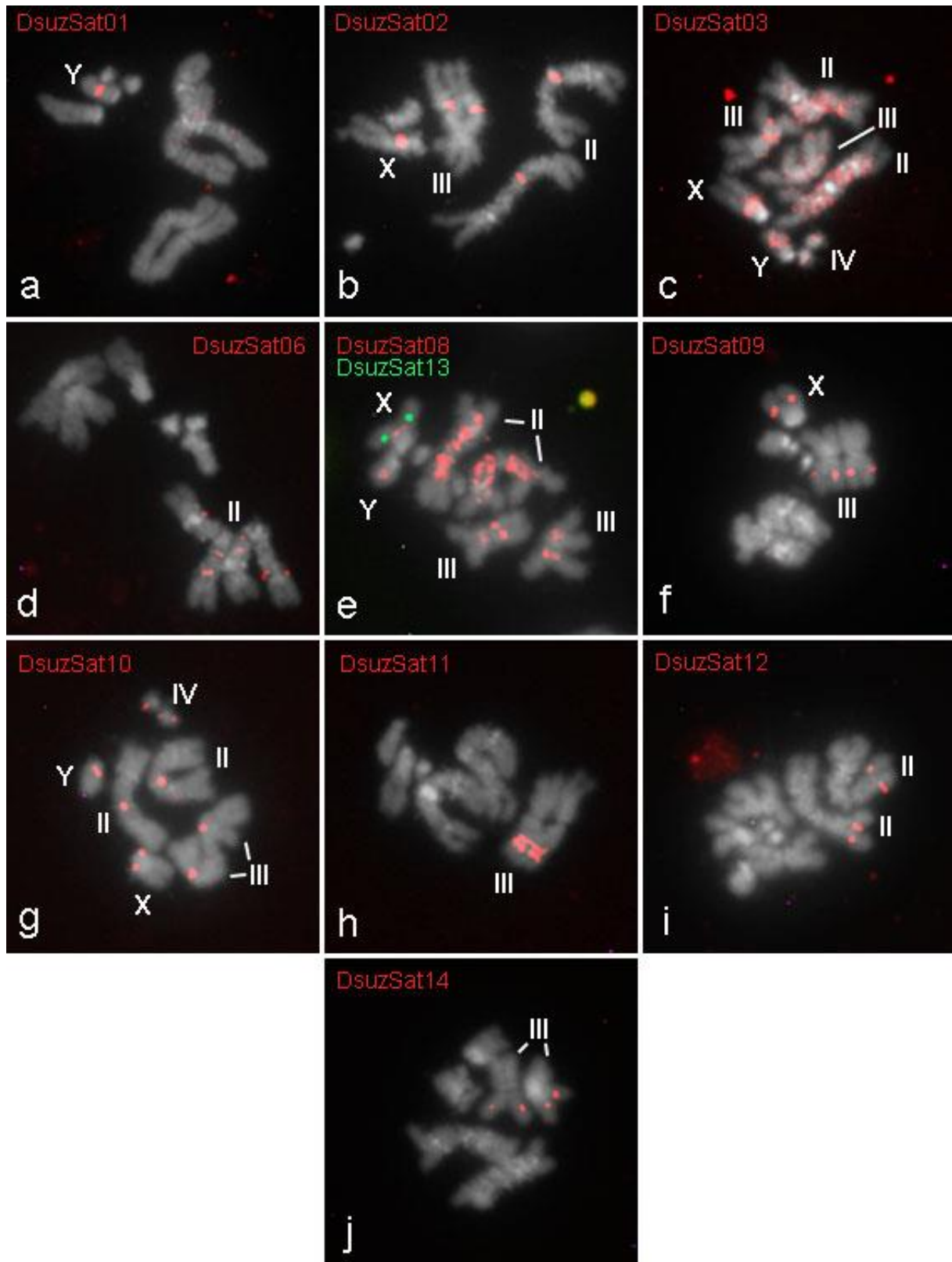


Figura 5. Mapeamento por FISH em cromossomos mitóticos obtidos de gânglios cerebrais de machos de onze dos DNAs satélites identificados no genoma de *D. sukii*. Os DNAsat mapeados estão indicados nas imagens. Barra = 10 μm.

5. DISCUSSÃO

5.1 OS CROMOSSOMOS DE *D. suzukii* SÃO CARACTERIZADOS PELA EXTENSA QUANTIDADE DE HETEROCROMATINA DE COMPLEXA COMPOSIÇÃO

O bandeamento C, juntamente com o mapeamento de microssatélites e DNAsat revelam enriquecimento de heterocromatina com complexa composição nos cromossomos de *D. suzukii*. Os microssatélites localizados principalmente nas regiões heterocromáticas nessa espécie demonstram que essas sequências se sobrepõem entre si e sugere que microssatélites são intercalados, revelando uma heterocromatina de complexa composição nestes cromossomos. Esses dados demonstram que a heterocromatina em *D. suzukii* é enriquecida em microssatélites, padrão bastante divergente do observado em outros grupos de insetos, como Othoptera e Hymenoptera, onde os microssatélites são predominantemente localizados na eucromatina (MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2014; PALACIOS-GIMENEZ, CABRAL-DE-MELLO 2015; PICOLLI *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2022). Porém, no gênero *Drosophila* a presença de microssatélites em regiões heterocromáticas é comum. Por exemplo, *D. melanogaster* e *D. simulans* possuem um acúmulo de microssatélites nos cromossomos dot e Y, cromossomos marcadamente heterocromáticos (FERRE; PRASAD 2011; AULARD *et al.*, 2004). Em *Drosophila*, regiões heterocromáticas geralmente possuem um maior conteúdo A+T e essa tendência também foi observada em *D. suzukii* (GALL; CHOEN; POLAN, 1971; BOSCO *et al.*, 2007). Ao todo, esses dados sugerem uma possível similaridade no conteúdo que compõe a heterocromatina nesse gênero, no acúmulo de microssatélites na heterocromatina, entretanto outras espécies devem ser estudadas.

A associação entre microssatélites e heterocromatina foi observada especialmente no cromossomo II de *D. suzukii*. O padrão de bandas heterocromáticas ocupando 2/3 deste par é diferente do observado em outras espécies do gênero como *D. melanogaster*, *D. mauritiana* e *D. yakuba*, nestas espécies a heterocromatina nesse cromossomo está restrita às regiões

pericentroméricas (LEMEUNIER; DUTRILLAUX; ASHBURNER 1978; GARCIA; BASSO DA SILVA; VALENTE 2000; VILELA; GONÍ, 2015; AULARD *et al.*, 2004). O aumento e distribuição de heterocromatina juntamente com a co-localização de microssatélites sugerem que os microssatélites podem estar desempenhando um papel na expansão de heterocromatina em *D. suzukii*. Considerando a alta porcentagem de TEs no genoma de *D. suzukii* e a relação entre microssatélites e TEs, já que muitos TEs podem ser ricos em microssatélites (MESSIER; LI; STEWART, 1996; WILDER; HOLLOCHER 2001; LI *et al.* 2002), é possível que esses elementos estejam atuando na expansão dos microssatélites nessa espécie, assim como observado em outros grupos de insetos (TROCHEZ-SOLARTE *et al.*, 2019; WILDER; HOLLOCHER_2001).

Embora os microssatélites estejam localizados em regiões heterocromáticas em *D. suzukii* e o cromossomo Y seja totalmente heterocromático, esse cromossomo apresenta poucos e pequenos sinais de microssatélites. Isto evidencia diferenciação da heterocromatina no cromossomo Y em relação aos outros cromossomos. Outras espécies de *Drosophila*, como *D. melanogaster* e *D. simulans* também apresentam diferenças entre os sexos, porém nessas espécies os microssatélites são mais enriquecidos no Y. Portanto, é possível que alguns microssatélites não mapeados e/ou não identificados constituam a heterocromatina desse cromossomo. Alternativamente, o principal constituinte da heterocromatina do cromossomo Y em *D. suzukii* pode ser outra classe de DNA repetitivo, mais precisamente elementos transponíveis, como foi observado para *D. mauritiana* devido ao acúmulo dessas repetições no Y (BERLOCO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010; JAGANNATHAN *et al.*, 2017). Aqui, embora não tenhamos mapeado diretamente elementos transponíveis, o DNAsat DsuzSat01-403 que é derivado de um elemento de transposição foi enriquecido no cromossomo Y, reforçando nossa hipótese.

A ausência de marcação do (AATAT)₄ em *D. suzukii* e sua presença em múltiplos cromossomos em espécies do subgrupo *Melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia*) pode ser uma consequência deste microssatélite estar abaixo do limiar de detecção e/ou da distância filogenética entre *D. suzukii* e essas espécies (SANTOS *et al.*, 2010; JAGANNATHAN *et al.*, 2017; FERREE; PRASAD; 2012). Também foi observada conservação para alguns dos microssatélites, com pequenas divergências, por exemplo, o microssatélite DODECA. Ao contrário do observado nas espécies que também possuem sítios deste microssatélite no cromossomo II, como *D. simulans* e *D. mauritiana*, em *D. suzukii* não está restrito a uma região do par II e sim espalhado ao longo de toda heterocromatina deste cromossomo. No par III, as marcações foram igualmente restritas à região pericentromérica como observado nas outras espécies (FERREE; PRASAD; 2012; JAGANNATHAN *et al.*, 2017).

Microssatélite como o GACA também apresenta variações quando comparados a *D. melanogaster*. GACA em *D. melanogaster* apresenta grandes blocos nos cromossomos II e Y e uma pequena marcação no cromossomo III. Em *D. suzukii* este microssatélite marcou toda região heterocromática do cromossomo II, cromossomo III e um sinal intersticial no cromossomo X e Y. Juntos, esses dados demonstram que embora existam variações em termos de abundância e localização, claramente visíveis por FISH, existe um certo grau de similaridade na distribuição de microssatélites entre as espécies, sugerindo uma reorganização genômica para o gênero *Drosophila* relativa a sequências em tandem simples. Mas também certa conservação para algumas repetições, relacionadas as relações filogenéticas das espécies. Outro exemplo de conservação observada dentro do gênero é referente a localização dos sítios de DNAr 18S nos cromossomos sexuais (BRIANTI *et al.*, 2009).

Além dos microssatélites, como esperado, observamos alguns DNAsat na heterocromatina de *D. suzukii*, entretanto estes foram muito mais variáveis em distribuição,

demonstrando reorganização desta fração genômica nessa espécie. Ocorreram DNAsat distribuídos em todos os cromossomos em múltiplas regiões ou em bandas específicas, formando bandas em poucos cromossomos ou exclusivos de apenas um cromossomo. Comparados com os microssatélites, os DNAsat apresentaram-se muito mais localizados em regiões específicas e somente DsuzSat03-2946 e DsuzSat08-163 estão efetivamente dispersos.

De fato, visualmente a heterocromatina de *D. suzukii* foi menos enriquecida em DNAsat quando comparada com microssatélites, exceto para o DNAsat DsusSat07-5174 que forma blocos com sinais densos. Nossos dados de FISH demonstram também que houve um maior acúmulo de DNAsat em cromossomos autossomos e no sexual X e poucos no cromossomo Y, que apresentou sinais somente dos DNAsat DsuzSat01-403, DsuzSat08-163 e DsuzSat10-159. Assim como observado em *D. suzukii*, diversos padrões de organização de DNAs satélites são observados nos cromossomos das espécies de *Drosophila*. Embora possam ocorrer em diferentes regiões cromossômicas, os DNAs satélites nessas espécies estão majoritariamente correlacionados a regiões de heterocromatina: regiões pericentromérica dos cromossomos autossomos e cromossomo sexual X, o cromossomo heterocromático Y e no cromossomo dot nas espécies que apresentam esse cromossomo heterocromático (LOSADA; VILLASANTE, 1995; GUTKNECHT, SPERLICH, BACHMANN, 1995; KUHN *et al.*, 2007; KUHN *et al.*, 2008 LIMA; RUIZ-RUANO, 2022). Embora *D. suzukii* possua DNAs satélites localizados nessas regiões cromossômicas (exceto o cromossomo Y, como discutido acima), é evidente que essas repetições estão pouco associadas a heterocromatina expandida nessa espécie. Portanto, esse conjunto de dados apoia nossa hipótese de que os microssatélites podem estar desempenhando um papel na expansão de heterocromatina em *D. suzukii* e que possivelmente os elementos de transposição estão atuando na expansão dos microssatélites nessa espécie.

DsuzSat02-188 está localizado na região centromérica dos dois maiores pares de autossomos e cromossomo X. Em algumas espécies de animais, é comum um dos satélites mais

abundantes estar localizado nas regiões pericentroméricas da maior parte dos cromossomos, apontando para uma função centromérica para esses satélites que podem divergir muito mesmo em espécies filogeneticamente relacionadas (PLOHL *et al.*, 2014; LIMA; SVARTMAN; KUHN, 2017; TALBERT; KASINATHAN; HENIKOFF, 2018; SILVA *et al.*, 2019). Alguns exemplos de satélites mais abundantes ocupando a região centromérica dos cromossomos são observados em *D. buzzatti* e *D. mojavensis*. Aqui, identificamos também o DsuzSat10-159 localizado na região centromérica de todos os cromossomos, apesar de não podermos definir a localização exata no cromossomo dot devido ao seu tamanho. Um exemplo de centrômeros enriquecidos de forma simultânea com diferentes DNAs satélites também foi observado em *D. seriema*, entretanto, diferente do observado aqui, essa espécie possui uma alternância entre os três satélites mais abundantes (LIMA; SVARTMAN; KUHN, 2017). Juntos, o DsuzSat02-188 e DsuzSat10-159 estão localizados nos centrômeros de todos os cromossomos. Apesar dos DNAs satélites mais abundantes serem bem representativos nos centrômeros dos cromossomos, aqui, observamos que o satélite associado ao centrômero em *D. suzukii* não é exclusivamente o mais abundante, indicando que os centrômeros em *D. suzukii* são de complexa composição. Além disso, esses dados demonstram que a composição dos centrômeros não varia exclusivamente entre espécies, mas também dentro de um mesmo conjunto cromossômico.

Além dos DNAsat heterocromáticos, observamos diversos sinais ocupando a eucromatina, como o DsuzSat13-132, DsuzSat09-198 no cromossomo X; DsuzSat09-198, DsuzSat11-206 e DsuzSat14-570 no cromossomo III; e DsuzSat12-901 no cromossomo II. Nestes dois últimos cromossomos, os sinais estão aparentemente na borda da heterocromatina. Apesar de DNAs satélites serem comumente associados a regiões de heterocromatina, essas repetições também ocorrem em regiões eucromáticas (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; WOLFGANG, 1994; KUHN *et al.*, 2012; SPROUL *et al.*, 2020). Espécies de *Drosophila* possuem alguns representantes de DNAs satélites descritos presentes na eucromatina, por

exemplo, o DnaSat2-171 presente na região telomérica do cromossomo III em *D. nasuta*; DalbSat4-186 e DalbSat5-269 localizados próximos a heterocromatina no cromossomo X e DalbSat2-171 nas regiões subteloméricas do cromossomo III e X em *D. albomicans* (LIMA; RUIZ-RUANO, 2022). Outros exemplos de DNAs satélites presentes em eucromatina envolvem os satélites 1.688 e responder (Rsp), que possuem algumas de suas cópias localizadas próximas a genes, possuem atividade transcricional e apresentam uma evolução dinâmica comparável aos DNAs satélites localizados na heterocromatina (LOSADA; VILLASANTE, 1995; KHUN *et al.*, 2012; LARRACUENTE, 2014; USAKIN *et al.*, 2007; SPROUL *et al.*, 2020). DNA satélites localizados na eucromatina foram associados a diferentes funções em *Drosophila*, como a modulação da cromatina e regulação positiva global de genes ligados ao cromossomo X, determinação do sexo, compensação de dosagem e silenciamento da cromatina/formação de heterocromatina (JOSHI; MELLER, 2017; KUHN, 2015). Considerando todos os DNAs satélites dentro de um genoma, é provável que pelo menos alguns estejam associados a funções biológicas com papel relevante na dinâmica do genoma (KUHN, 2015). Portanto, é possível que os satélites identificados e localizados na eucromatina dos cromossomos de *D. suzukii* estejam associados a funções biológicas, especialmente no cromossomo III e X.

5.2 A BAIXA INFLUÊNCIA DOS DNAsat NA EXPANSÃO DO GENOMA DE *D. suzukii* E A HOMOLOGIA COM OUTROS ELEMENTOS REPETITIVOS

Espécies de *Drosophila* apresentam grande variação no conteúdo de DNAsat e, como esperado pela hipótese da biblioteca, essas variações tendem a ser menores em espécies filogeneticamente relacionadas, entretanto, o conteúdo de DNAsat observado no genoma de *D. suzukii* (7.27%) é mais semelhante ao observado em *D. melanogaster* (6.6%) quando comparada a sua espécie irmã *D. biarmipes* (1.27%). Isto demonstra que apesar de serem mais

semelhantes dentro do subgênero, o conteúdo de DNAsat é específico para cada linhagem, indicando que ampliações independentes de DNAsat ocorrem nas distintas linhagens. *Drosophila suzukii* tem o segundo maior tamanho genômico até então estimado para o gênero *Drosophila*, menor apenas que o genoma de *D. virilis* (333 Mb, GREGORY; JOHNSTON 2008). De acordo com Paris *et al.* (2020) a expansão do repeatoma foi responsável pelo aumento de pelo menos metade do tamanho do genoma de *D. suzukii* (aumento de cerca de 100 Mb). A proporção de DNAsat no genoma de *D. suzukii* representa uma baixa porcentagem de seu genoma frente a outras sequências, portanto, DNAs satélites têm pouca influência no tamanho do genoma da espécie, indicando que os TEs foram os principais responsáveis pelo aumento do tamanho genômico da espécie. Em *D. suzukii* os TEs representam cerca de 47% do genoma (MÉREL *et al.* 2021). Algumas outras espécies de *Drosophila*, especialmente as do subgênero *Sophophora* apresentam um tamanho genômico correlacionado positivamente com elementos transponíveis, por exemplo *D. subpulchrella* espécie irmã de *D. suzukii* (WEI *et al.*, 2018; LIMA; HANLON; GERTON 2020; KIM *et al.*, 2021; MÉREL *et al.*, 2021; LIMA; RUIZ-RUANO, 2022).

DNAs satélites que compartilham sequências com o DNAr 5S e Histona foram observados, evidenciando que o DsuzSat07-5174 e DsuzSat15-418 foram originados a partir de uma duplicação em múltipla escala destas famílias multigênicas. A presença de DNAs satélites derivados do DNAr já foi observada (JO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2006; VITTORAZZI *et al.*, 2011). Uma das características do DNAr é sua conservação mesmo em espécies filogeneticamente distantes, devido a sua funcionalidade, e para o DNAr 5S essa conservação é conferida para a região gênica de 120 pb. A região adjacente aos genes, denominadas IGS, pode variar em tamanho mesmo em espécies próximas e possuem uma maior mutabilidade devido a menor pressão seletiva (LONG; DAWID 1980). A pesquisa em banco de dados demonstra que o DsuzSat15-418 possui maior similaridade com a região transcrita do

DNAr 5S e os dados de FISH demonstram que essa sequência está dispersa por todo genoma com sinais fracos. Esses dados sugerem que a origem do DsuzSat15-418 ocorreu envolvendo a região codificante do DNAr através de uma duplicação e translocação para múltiplas regiões do genoma. A rápida divergência e evolução esperada para os DNAsat, em contraste com a alta similaridade com a região transcrita do DNAr 5S que encontramos, sugerem que o processo que levou a origem do DsuzSat15-418 pode ser recente, ou ao menos, algumas cópias similares ao DNAr 5S original foram conservadas, já em arranjo de satélites espalhados no genoma. Situação similar ao observado para o DsuzSat15-418 foi observada para o DsuzSat07-5174, que provavelmente se originou a partir do cluster de genes de histona, sendo este o primeiro caso relatado de origem de um DNAsat a partir desta família gênica. A diferença em relação ao DNAr 5S é que no caso das histonas o DsuzSat07-5174 se amplificou muito mais eficientemente e ocupa locais independentes do possível cluster funcional do gene, como demonstrado por FISH.

Além das similaridades com as famílias multigênicas, outros DNAsat em *D. suzukii* apresentaram homologia com elementos de transposição. DsuzSat01-403 e DsuzSat08-163 apresentam similaridade com elementos transponíveis pertencentes à mesma família, *Helitron-2N2_DSuz* e *Helitron-1N1_DSuz*, respectivamente. Trabalhos anteriores demonstram que elementos transponíveis além de possuírem a capacidade de transposição de suas sequências também estão envolvidos na origem de DNAs satélites, incluindo espécies de *Drosophila* (HEINEKKIEN *et al.*, 1995; AHMED; LIANG 2012; DIAS *et al.*, 2015). Alguns satélites derivados de TEs fazem parte da estrutura interna ou terminal dessas repetições que posteriormente sofreram uma amplificação e formaram repetições em tandem (MEŠTROVIĆ *et al.*, 2015). DsuzSat01-403 é o satélite mais abundante em *D. suzukii* e já foi relatado em outras espécies do gênero (*D. elegans* e *D. virilis*) que as repetições em tandem mais abundantes são partes de um DINE-1 pertencente à família *Helitron* de TEs (YANG; BARBASH, 2008;

DIAS *et al.*, 2015). *Helitrons* possuem um grupo abundante de elementos denominados DINEs que estão presentes em várias espécies de *Drosophila* (YANG; BARBASH, 2008; WEI *et al.*, 2022). Dias *et al.* (2015), relataram a origem de um DNAsat a partir de um subconjunto de DINE denominado DINE-TR1 em três espécies de *Drosophila*. Este satélite expandiu-se pelo menos duas vezes de forma independente em duas linhagens, uma no ancestral comum entre *D. virilis* e *D. americana* e outra na linhagem de *D. biarmipes* formando matrizes em tandem nessas espécies sugerindo que DINEs estão frequentemente envolvidos na origem de DNAs satélites em *Drosophila*. Além disso, os autores também identificaram a presença de DINE-TR1, baseado em análises genômicas, em outras espécies como *D. suzukii* sem a formação dessas matrizes.

Os dados de hibridização *in situ* de Dias *et al.* (2015) demonstram que o DINE-TR1 está localizado em todos os cromossomos e ocupa grande parte do cromossomo Y em *D. virilis* e *D. americana*. Neste trabalho, descrevemos um satélite abundante originado de um *Helitron* (DsuzSat01-403) disperso por todo complemento cromossômico de *D. suzukii* mas que forma um grande bloco no cromossomo Y. Acredita-se que elementos transponíveis e suas sequências derivadas têm papel na evolução de cromossomos sexuais, incluindo a heterocromatinização e degeneração do Y (LI *et al.*, 2016). Portanto, nossos dados de FISH utilizando microssatélites e DNAs satélites demonstram que o cromossomo Y em *D. suzukii* pode ser constituído majoritariamente por sequências derivadas de elementos transponíveis. Assim, os elementos transponíveis podem ser responsáveis pela evolução do cromossomo Y nessa espécie. Além disso, reforçam que elementos da família *Helitron* são potenciais alvo para origem de DNAsat em *Drosophila*.

Identificamos dois DNAs satélites com tamanho acima do comum, o DsuzSat03-2946 e DsuzSat06-6571. Confirmamos a organização em tandem do DsuzSat03-2946 através do dotplot mas não do DsuzSat06-6571 devido ao tamanho do monômero e limitações técnicas,

entretanto, aqui consideramos DNAs satélites todas as repetições identificadas pelo Repeat Explorer 2 e TAREAN. DsuzSat03-2946 e DsuzSat06-6571 apresentam similaridade com TEs de RNA, ou retrotransposons *Bel* e *Gypsy*, respectivamente. Sugerindo que DsuzSat03-2946 e DsuzSat06-6571 são derivados dessas repetições, seguindo a tendência geral, que satélites maiores que 500 pb geralmente são derivados de retroelementos (MEŠTROVIĆ *et al.*, 2015). Os satélites identificados aqui que apresentaram similaridade com elementos transponíveis, (DsuzSat01-403, DsuzSat03-2946, DsuzSat06-6571 e DsuzSat08-163) apresentaram-se dispersos por todo o genoma, sem formar grandes blocos detectáveis (exceto o DsuzSat01-403 no cromossomo Y), demonstrando que mesmo organizadas em tandem, essas repetições encontram-se dispersas no genoma e em alguns casos, por exemplo o DsuzSat01-403 formam clusters detectáveis.

Finalmente, os DsuzSat09-198 e DsuzSat11-206 corresponderam ao DNAsat 1.688. Recentemente, uma nova variante de ~190pb do DNAsat 1.688 foi identificada no genoma de 11 espécies de *Drosophila* (LIMA; HANLON; GERTON 2020), os autores também identificaram duas variantes de 198pb e 350 pb no genoma de *D. suzukii*. A variante 198pb possui uma estrutura diferente quando comparada às outras espécies, devido a uma exclusão de uma região conservada, denominada motif 2 e sua sequência adjacente. Aqui, identificamos o DsuzSat09-198 que além de apresentar o mesmo tamanho de monômero, também possui a mesma distribuição cromossômica, na região distal do cromossomo III e cromossomo X, demonstrando que esses dados estão de acordo com o observado anteriormente. DsuzSat11-206 também apresentou homologia com o DNAsat 1.688, entretanto, diferente do DsuzSat09-198, este satélite está restrito a região distal do cromossomo III. As variantes 360pb e ~190 possuem variações consideráveis em seus monômeros. Portanto, é possível que o DsuzSat11-206 seja uma variante da família de satélite 1.688 específica do cromossomo III, assim como foi observado em *D. melanogaster*, onde as variantes 353pb e 356pb dessa família de DNAsat

estão restritas ao autossomo III e a variante 260pb ao cromossomo II. Dados de trabalhos anteriores sugerem que a variante 360pb é a principal da família de DNAsat 1.688 que deu origem as demais variantes, por exemplo a 260pb e ~190pb e demonstram que as variantes derivadas se originaram da principal localizada no cromossomo X, enquanto as demais estão localizadas nos cromossomos autossomos (ABAD *et al.*, 2000; LIMA; HANLON; GERTON 2020).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho fornece a primeira descrição cromossômica detalhada da espécie praga *Drosophila suzukii* com ênfase nos elementos repetitivos em tandem. A distribuição de heterocromatina sugere que eventos de amplificação parecem ter atuado eficientemente nesse genoma. A distribuição cromossômica de microssatélites e DNAs satélites difere entre os cromossomos, entre os autossomos, entre os sexuais e entre os autossomos e sexuais. No geral, esse conjunto de dados demonstra uma diversificação deste genoma que pode desempenhar um papel fundamental na evolução cromossômica da espécie e talvez em seu processo adaptativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AHMED, M.; LIANG, P. Transposable elements are a significant contributor to tandem repeats in the human genome. **Comparative and Functional Genomics**. V. 2012:947089. 2012
- ALMEIDA, C.; FONSÊCA, A.; DOS SANTOS, K. G.; MOSIOLEK, M.; PEDROSA HARAND, A. Contrasting evolution of a satellite DNA and its ancestral IGS rDNA in *Phaseolus* (Fabaceae). **Genome**. V. 55: 683-689. 2012
- ANDREAZZA, F. et al. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Arrives at Minas Gerais State, a Main Strawberry Production Region in Brazil. **Florida Entomological Society**. V. 99(4): 796-798. 2016
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI&FRUTI. 2021. Anuário Brasileiro de Horti&Fruti 2021. Disponível em: https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2021/04/HORTIFRUTI_2021.pdf acessado em: 26/04/2022
- APPELS, R. et al. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNA's in cereals. **Chromosoma**. V. 78: 293-31. 1980
- ASPLEN, M. K. et al. Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. **Journal of Pest Science**. V. 88: 469-494. 2015
- BARBASH, D.A.; YANG, HSIAO-PEI. Abundant and species-specific DINE-1 transposable elements in 12 *Drosophila* genomes. **Genome Biology**. V. 9(2): R39. 2008
- BAYES, J.J.; MALIK, H.S. Altered heterochromatin binding by a hybrid sterility protein in *Drosophila* sibling species. **Science**. V. 326: 1538-1541. 2009
- BELLAMY, D. E.; SISTERTON, M. S; WALSE, S. S. Quantifying Host Potentials: Indexing Postharvest Fresh Fruits for Spotted Wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. **Plos One**. V.8: 4. 2013
- BELYAYEV, A. et al. Transposons and satellite DNA: on the origin of the major satellite DNA family in the *Chenopodium* genome. **Mobile**. V.11: 20. 2020

BENNETT, P. Demystified Microsatellites. **Molecular Pathology**. V. 53:177-183. 2000

BISCOTTI, M. A; OLMO, E; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**. V. 23: 415-420. 2015

BITNER-MATHÉ, B. C; VICTORINO, J; FARIA, F. S. *Drosophila suzukii* has been found in tropical Atlantic Rainforest in southeastern Brazil. **Drosophila Information Service**. V. 97. 2014

BOSCO, G.; CAMPBELL, P.; LEIVA-NETO, J.T.; MARKOW, T.A. Analysis of *Drosophila* species genome size and satellite DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. **Genetics**. V. 177(3):1277-1290. 2007

BRACEWELL, R. et al. Dynamic turnover of centromeres drives karyotype evolution in *Drosophila*. **eLife**. 8:e49002. 2019

BRIANTI, M. T. et al. Comparative Analysis of the Chromosomal Positions of rDNA Genes in Species of the tripunctata Radiation of *Drosophila*. **Cytogenetic and Genome Research**. V.125: 149-157. 2009

CABRAL-DE-MELLO, D.C., MAREC, F. Universal fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Mol Genet Genomics** 296, 513–526 2021

CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. **Chromosome Research**. V. 16(4): 595-607. 2008

CAMACHO, J. P. et al. On the contingent nature of satellite DNA evolution. **bioRxiv**. p. 2021.2007.2001.450629, 2021

CHARLESWORTH, B; SNIEGOWSKI, P. WOLFGANG, S. The Evolution dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. V. 371. 1994

CHIU, J. C. et al. Genome of *Drosophila suzukii*, the Spotted Wing *Drosophila*. **Genes Genomes Genetics**. V. 3. 201. 2013

DENG, Q.; ZENG, Q.; QIAN, Y.; LI, C.; YANG, Y. Research on the karyotype and evolution of *Drosophila melanogaster* species group. **J Genet Genomics**. V. 34:196–2132007. 2007

DEPRÁ, M. et al. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. **Journal of Pest Science**. V. 87:379-383. 2014

DIAS, G.B. et al. Helitrons shaping the genomic architecture of *Drosophila*: Enrichment of DINE-TR1 in α - and β -heterochromatin, satellite DNA emergence, and piRNA expression. **Chromosome Res**. V. 23, 597-613. 2015

DOVER, G. Molecular drive. **Trends in Genetics**. V. 18, 587-589. 2002

DOVER, G. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. **Nature**. V. 299, 111-117. 1982

DROSOPOULOU, E. et al. The chromosomes of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): detailed photographic polytene chromosomal maps and in situ hybridization data. **Molecular Genetics and Genomics**. V. 294:1535-1546. 2019

DRUMMOND, A. et al. (2009) Geneious v4.8. Available from: <http://geneious.com>
European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Disponível em: <
<https://gd.eppo.int/reporting/article-6457> > Acesso em: 21/10/2020

FACHINELLO, J. C. et al. Situation and perspectives of temperate fruit crops in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. Especial: 109-120. 2011

FERREE P. M; PRASAD, S. How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. **Genet Res Int**. 2012;2012:430136. doi: 10.1155/2012/430136

FERRONATO, P. et al. A Phylogeographic Approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Invasion in Brazil. **Journal of Economic Entomology**. V. 12: 425- 433. 2019

FRY, K.; SALSER, W. Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**. V.12(4):1069–1084. 1977

- GALL, E.H.C.; Polan, M.L Repetitive DNA sequences in *Drosophila*. **Cromossoma**. V. 33: 319-344. 1971
- GARCIA, R.N.; BASSO DA SILVA, L.; VALENTE, V.L.S. Banding techniques for *Drosophila willistoni* mitotic chromosomes. **Dros. Inf. Serv.** V.83: 191-194. 2000
- GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**. V. 146:153–170. 2015
- GARRIDO-RAMOS, M.A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**. V. 8: 230. 2017
- GEISLER, F.C.S. et al. Primeiro Registro de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) para o estado do Paraná, Brasil e de novos hospedeiros. **Revista de Ciências Ambientais**. V. 9:2. 2015
- GREEN, J.E et al. Evolution of Ovipositor Length in *Drosophila suzukii* Is Driven by Enhanced Cell Size Expansion and Anisotropic Tissue Reorganization. **Current Biology**. V. 29: (12):2075-2082. 2019
- GREGORY, T. R. JOHNSTON, J. S. Genome size diversity in the family Drosophilidae. **Heredity (Edinb)**. V. 101:228-238. 2008
- GUTKNECHT, J.; SPERLICH, D.; BACHMANN, L. A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma**. V. 103:539-544. 1995
- IORIATTI C. et al. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and its potential impact to wine grapes during harvest in two cool climate wine grape production regions. **J Econ Entomol**. V.108: 1148–1155. 2015
- JAGANNATHAN, M. et al. Comparative analysis of satellite DNA in the *Drosophila melanogaster* species complex. **Genes Genomes Genetics**. V. 7: 693-70. 2017
- JAGANNATHAN, M., YAMASHITA, Y.M. Defective Satellite DNA Clustering into Chromocenters Underlies Hybrid Incompatibility in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** V.38(11): 4977-4986. 2021

JO, S. H et al. Evolution of ribosomal DNA-derived satellite repeat in tomato genome. **BMC Plant Biol.** V. 9: 4. 2009

JONIKA, M; LO, J; BLACKMONN, H; Mode and Tempo of Microsatellite Evolution across 300 Million Years of Insect Evolution. **Genes.** V. 11: 945. 2020

JOSHI, S.S.; MELLER, V.H. Satellite repeats identify X chromatin for dosage compensation in *Drosophila melanogaster* males. **Curr Biol.** V. 27(10):1393–1402. 2017

KIM, B.Y. et al. 2021. Highly contiguous assemblies of 101 drosophilid genomes. *Elife.* v. 10:e66405 KUHN, G.C.S. Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. **Heredity.** V. 115: 1-2. 2015

KUHN G.C, et al. Sequence analysis, chromosomal distribution and long-range organization show that rapid turnover of new and old pBuM satellite DNA repeats leads to different patterns of variation in seven species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Chromosome Research.** V. 16: 307-324. 2008

KUHN G.C, et al. The 1.688 repetitive DNA of *Drosophila*: concerted evolution at different genomic scales and association with genes. **Mol Biol Evol.** V. 29 (1). 2012

KUHN G.C. et al. Low rates of homogenization of the DBC-150 satellite DNA family restricted to a single pair of microchromosomes in species from the *Drosophila buzzatii* cluster. **Chromosome Research.** V. 15: 457-469. 2007

KUHN, G.C.S. Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*.

LARRACUENTE, A.M. The organization and evolution of the Responder satellite in species of the *Drosophila melanogaster* group: dynamic evolution of a target of meiotic drive. **BMC Evolutionary Biology.** V. 14: 233. 2014

LARRACUENTE, A.M.; FERREE P. M. Simple Method for Fluorescence DNA In Situ Hybridization to Squashed Chromosomes. **Journal Vis Exp.** (95): 52288. 2015

- LEE, C. J. et al. In Focus: Spotted wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*, across perspectives. **Pest Management Science**. V. 67: 1349-1351. 2011
- LEMEUNIER, F.; DUTRILLAUX, B.; ASHBURNER, M. Relationships Within the *Melanogaster* Subgroup Species of the Genus *Drosophila* (Sophophora) III. The Mitotic Chromosomes and Quinacrine Fluorescent Patterns of the Polytene Chromosomes. **Chromosoma (Berl.)** V. 69:349-361. 1978
- LI, S.F et al. Repetitive sequences and epigenetic modification: inseparable partners play important roles in the evolution of plant sex chromosomes. **Planta**. V. 243:1083-95. 2016
- LI, Y.C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol Ecol**. V. 11: 2453–2465. 2002
- LIMA, G. L.; HANLON, S.L. GERTON, J.L. Origins and Evolutionary Patterns of the 1.688 Satellite DNA family in *Drosophila* Phylogeny. **Genes, Genomes, Genetics**. V.10(11):4129-4146. 2020
- LIMA, L.G.; RUIZ-RUANO, F.J. In-Depth Satellitome Analyses of 37 *Drosophila* Species Illuminate Repetitive DNA Evolution in the *Drosophila* Genus. **Genome Biology and Evolution**. V. 14:5. 2022
- LIMA, L.G; SVARTMAN, M. KUHN, G.C.S. Dissecting the Satellite DNA Landscape in Three Cactophilic *Drosophila* Sequenced Genomes. **Genes Genomes Genetics**. V. 7: 2831-2843. 2017
- LOHE, D.L.B. Identical satellite DNA sequences in sibling species of *Drosophila*. **Journal Mol Biol**. V. 194: 161-170.1987
- LÓOPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dyn**. V.7:1-28. 2012
- LOSADA, V. VILLASANTE, A. Autosomal location of a new subtype of 1.688 satellite DNA of *Drosophila melanogaster*. **Chromosome Research**. V. 4. 372-383
- LOWER, S. E. et al. Special Issue: Repetitive DNA Sequences. **Genes**. V. 10: 896. 2019

MARTINS, C. et al. Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes. **Advances in Genetics Research**. V. 4 (in press). 2011

MCEVEY, S. High resolution diagnostic images of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). 2017. figshare. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4644793.v1>

MÉREL, V. et al. The worldwide invasion of *drosophila suzukii* is accompanied by a large increase of transposable element load and a small number of putatively adaptive insertions. **Mol Biol Evol**. V. 38(10): 4252-4267. 2021

MESSIER, W; LI, S-H; STEWART. C-B. The birth of microsatellites. **Nature**. V. 381: 483. 1996

MESTROVIĆ, N. et al. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* experimental evidence for the “library” hypothesis. **Mol Biol Evol**. V. 15(8):1062–1068. 1998

MEŠTROVIĆ, N. et al. Structural and functional liaisons between transposable elements and satellite DNAs. **Chromosome Research**. V. 23: 583-596. 2015

MILANI, D; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **Plos One**. V. 9:e97956, 2014

NEI, M; ROONEY A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Ann Rev Genetics**. V. 39: 121-152. 2005

NOVÁK, P. et al. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Res**. V.45(12): e111. 2017

NOVÁK, P; NEUMANN, P; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nat Protoc**. 2020 Nov;15(11):3745-3776. doi: 10.1038/s41596-020-0400-y

OGRADY, P. M.; DESALLE, R. Phylogeny of the Genus *Drosophila*. **Genetics**. V. 209: 1-25. 2018

OMETTO, L. et al. Linking genomics and ecology to investigate the complex evolution of an invasive *Drosophila* pest. **Genome Biol Evol**. V. 5(4):745-757. 2013

- PAÇO, A; FREITAS, R; VIEIRA-DA-SILVA, A. Conversion of DNA Sequences: From a Transposable Element to a Tandem Repeat or to a Gene. **Genes**. V. 10: 1014. 2019
- PALACIOS-GIMENEZ, O. CTAVIO M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. **Molecular genetics and genomics**. V. 290:623-631.2015
- PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects - A review. **Heredity**. V. 100, 564–573. 2008
- PARIS, M. et al. Near-chromosome level genome assembly of the fruit pest *Drosophila suzukii* using longread sequencing. **Scientific Reports**. V. 10: 11227. 2020
- PICCOLI, M. C. A.; BARDELLA, V. B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. **Apidologie**. V. 49: 497–504.2018
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy Sciences**. V: 83: 2934-2938. 1986
- PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Genome Dynamics**. V. 7: 126–152. 2012
- RICHARD, GUY-FRANCK.; KERREST, A.; DUJON, B.** Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **V:72: 4**. 2008
- ROTA-STABELLI, O; ANFORA, G. *Drosophila suzukii*. **Current Biology**. V. 23 (1): 8-9. 2013
- RUIZ-RUANO, F.J. et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**. V:6: 28333. 2016
- SESSEGOLO, C.; BURLET, N.; HAUDRY, A. Strong phylogenetic inertia on genome size and transposable element content among 26 species of flies. **Biol. Lett.** 12, 20160407. 2016

SILVA, B.S.M.L. et al. De novo identification of satellite DNAs in the sequenced genomes of *Drosophila virilis* and *D. americana* using the RepeatExplorer and TAREAN pipelines. **Plos One**. V. 14(12). 2019

SMIT, A.F.A.; HUBLEY, R. GREEN, P. (1996–2004) RepeatMasker Open-3.0.
(<http://www.repeatmasker.org>)

SOUZA, M. T. et al. Physicochemical characteristics and superficial damage modulate persimmon infestation by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and *Zaprionus indianus*. *Environ. Entomol.* V. 49: 1290-1299. 2020

SPROUL, J.S. et al. Dynamic Evolution of Euchromatic Satellites on the X Chromosome in *Drosophila melanogaster* and the *simulans* Clade. **Mol Biol Evol.** V. 37(8): 2241-2256. 2020

STUPAR, R.M. et al. Highly Condensed Potato Pericentromeric Heterochromatin Contains rDNA-Related Tandem Repeats. **Genetics.** V. 162(3):1435-1444. 2002

SUMNER A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research.** V. 75: 304-306. 1972

SUMNER, A.T. Chromosome organization and function. London: Unwin Hyman. 2003

TALBERT, P.B.; KASINATHAN, S. HENIKOFF, S. Simple and Complex Centromeric Satellites in *Drosophila* Species. **Genetics.** V. 208(3):977-990. 2018

TEIXEIRA, G. A. et al. Multiple heterochromatin diversification events in the genome of fungus-farming ants: insights from repetitive sequences. **Chromosoma.** V.131: 59-75. 2022

THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences.** V. 22(9): 4309. 2021

TROCHEZ-SOLARTE et al. Role of microsatellites in genetic analysis of *Bombyx mori* silkworm: a review. **F1000Research.** V. 8:1424. 2019

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(4): 371-375. 2014

VILELA, C.R.; GONÍ, B. Is *Drosophila nasuta* Lamb (Diptera, Drosophilidae) currently reaching the status of a cosmopolitan species? **Revista Brasileira de Entomologia**. V. 59(4):346-350. 2015

VITTORAZZI et al. Satellite DNA Derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**. V.134(2):101-107.2011

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

WEI, K.H.C. et al. Correlated variation and population differentiation in satellite DNA abundance among lines of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. V. 111(52):18793–18798. 2014

WEI, K.H.C. et al. Variable rates of simple satellite gains across the *Drosophila* phylogeny. **Mol Biol Evol**. V. 35(4):925–941. 2018

WEILER, K.S.; WAKIMOTO, B.T. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. **Annu Rev Genet**. V. 29:577-605.1995

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile Elements and the Genesis of Microsatellites in Dipterans, **Molecular Biology and Evolution**. V.18 (3): 384–392. 2001

WILDER, J; HOLLOCHER, H. Mobile Elements and the Genesis of Microsatellites in Dipterans. **Molecular Biology and Evolution**. V. 18 (3): 384-392. 2001

WOLLMANN, J. et al. Infestation index of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in small fruit in southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**. V. 87: 1-9. 2020

WU, CHUNG-I.; TRUE, J.R.; JOHNSONS, N. Fitness reduction associated with the deletion of a satellite DNA array. **Nature**. V. 341-248-251. 1989

ZANUNCIO, J. S. et al. Spread of Two Invasive Flies (Diptera: Drosophilidae) Infesting Commercial Fruits in Southeastern Brazil. **Florida Entomological Society**. V: 101(3): 522-525. 2018

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Primers utilizados para amplificação e mapeamento por FISH de DNAs repetitivos em *Drosophila suzukii*

Nome da sequência	Primer	
	Forward	Reverse
DsuzSat01*	GTGCCACGCCCACTCTAACGCCATAACGCTTAAATCTGTCTACCGCCGGTAG GTGGCGCATTTTAATCTCGCTTTGCTGCTTGCATATCTCCATTTAGC	
DsuzSat02	AGGCCCATTTTCAGTAAACCTTCGC	AAGCCCATAACTTGGTCAAATGAACT
DsuzSat03	CGCCAGTGCACAGTGGGTCAA	TTCCATCAGCTGCGCGGCAA
DsuzSat04*	ATACATATATTTATATAAGTGAATCGTATGGATATGGCTTATAGGTATAAATAC CTATAAGGCATAATAATGTATAATATAATAAATATACATTAATAATAT	
DsuzSat05*	AGTCTGTCAGTCTGTCAGTCTGTCAGTCTGTCAGTCTGTCAGTCTGTC	
DsuzSat06	CGCTTGGTGCGGCTCATGGA	GCGATGGGCTGCTCGTCTCC
DsuzSat08	TTTTTAACATATAACCTCCTACGCTT G	TCATATTATTTTCCCACCAATTTTCCG
DsuzSat09	GTTTTGAGCAGCTTGCTACAAATGC T	GTCGGTCTTTTAGCTGTACGCCTT
DsuzSat10	ATTAAAATCCGTGCTAGATTAGCC	CCGTAGCTTAAACATGTTTAGGAA
DsuzSat11	TTTTTAATCACAGTTTCGCCAAATCA	TTTGCAAAAATAGATGACGCAAACC
DsuzSat12	ACCTCTAGGCTACTCAGGACTGTGA AA	ACCACCCGTGCTGAATGCCA
DsuzSat13	TTGATTGCGGTTGAGATTCCGAA	TTGGAATCATCACCTCAATCGCC
DsuzSat14	AGCCAAGTCCCCCATTGAGACA	ACCGATTCAACAATGGTGCTTGCG
DNAr 5S*	GCTGTAATTACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTAAGCAACGTCGGGCCCCGG TTAGTACTTGGATGGGTGACCGCCTGGGAACACCGGGTGCTGTTGG	
Histona H4	TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC	CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT

* Oligonucleotídeos já marcados com Biotina-14-dATP durante sua síntese

Figura S2: Dot plot dos maiores cotings de três DNAs satélites identificados no genoma de *D. suzukii*

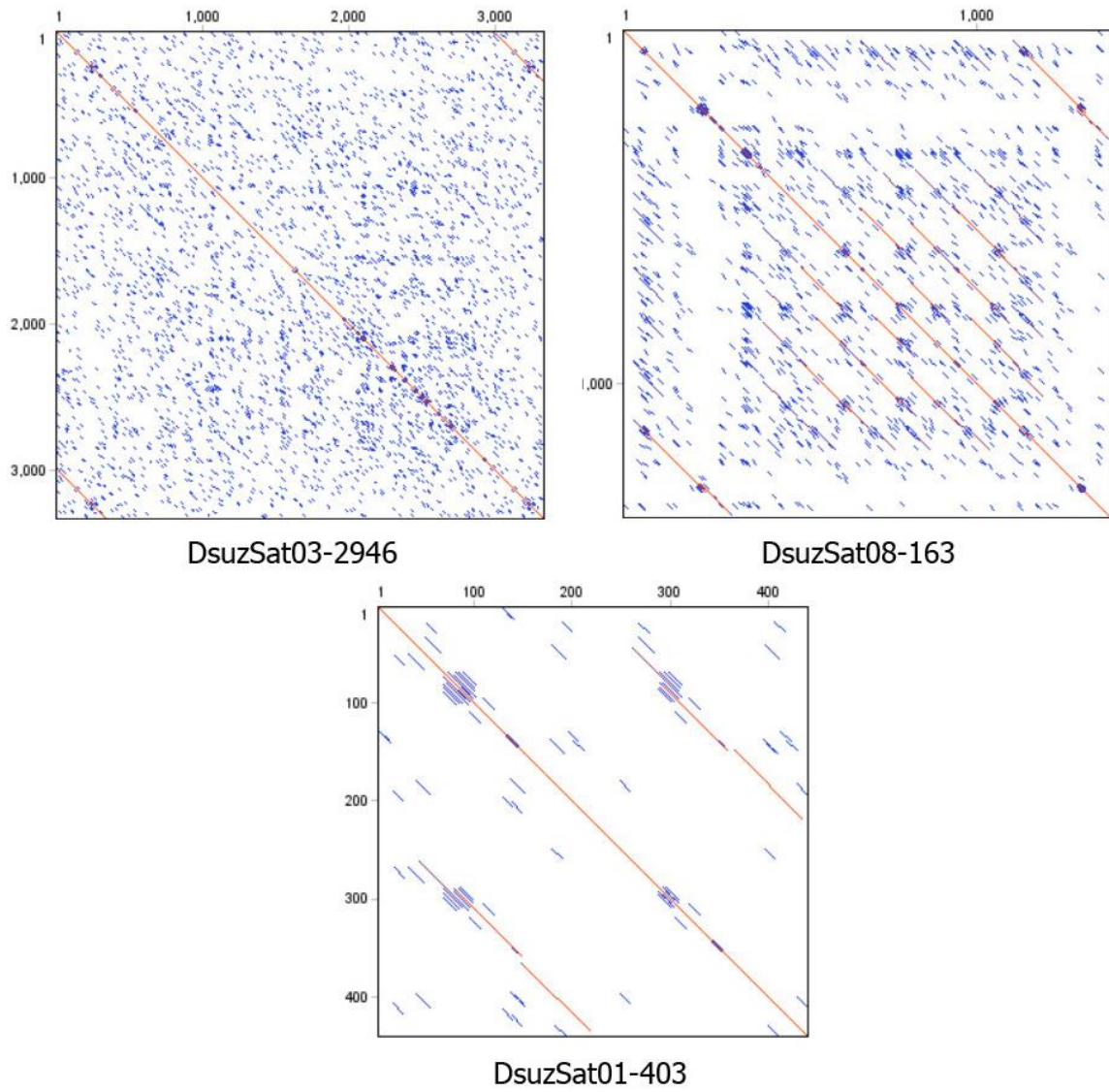


Tabela S2: Homologia de DNAsat com sequências depositadas em banco de dados

DNA satélite	Elementos repetitivos		
	Descrição	Similaridade %	Cobertura
DsuzSat01-403	Helitron-2N2_DSuz (<i>D.suzukii</i>)	~98.77 %	1-284 / 286-397
DsuzSat03-2946	BEL-41C_DTa-I (<i>D. takahasshi</i>)	~80.56%	4-91 / 229-345 / 434-484 / 512-2234 / 2235-2471 / 2567-2946
DsuzSat06-6571	Gypsy-40_DSuz-I (<i>D.suzukii</i>)	~96.57%	2-1281 / 1283-3332 / 3333-4479 / 4480-6091 / 6092-6571
DsuzSat07-5174*	Genes para Histona	~88.0%	
DsuzSat08-163	Helitron-1N1_DSuz (<i>D.suzukii</i>)	100%	1-162
DsuzSat09-198	DNAsat 1.688 (<i>D. melanogaster</i>)	73.02%	16-198
DsuzSat11-206	DNAsat 1.688 (<i>D. melanogaster</i>)	70.68%	1-185
DsuzSat15-418*	DNAr 5S	~95,0%	

*Sequências que apresentaram homologia com várias espécies do gênero *Drosophila*