

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 13/11/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Cecília Artico Banho

**Desregulação de genes e elementos de transposição e incompatibilidade  
híbrida entre subespécies de *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae***

São José do Rio Preto  
2020

Cecília Artico Banho

**Desregulação de genes e elementos de transposição e incompatibilidade híbrida entre subespécies de *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae***

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós- Graduação em Biociências, Área de Genética e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, em cotutela com a Université Claude Bernard – Lyon 1.

Financiadores: FAPESP: processo 2016/19271-2  
CNPq: processos 303455/2017-9 e  
141413/2016-6  
ANR: processo 14-CE19-0016  
IDEX LYON  
Eiffel Program (Campus France)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Marcia Aparecida Carareto

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Vieira

São José do Rio Preto  
2020

Banho, Cecília Artico.

Desregulação de genes e elementos de transposição e incompatibilidade híbrida entre subespécies de *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae* / Cecília Artico Banho. -- São José do Rio Preto, 2020  
178 f.

Orientador: Claudia Marcia Aparecida Carareto

Orientador: Cristina Vieira

Tese (doutorado com dupla titulação) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto e Université Claude Bernard - Lyon 1, Villeurbanne

1. Genética. 2. Expressão gênica. 3. Elementos de DNA transponíveis. 4. *Drosophila*. I. Título.

CDU – 575.113

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Cecília Artico Banho

**Desregulação de genes e elementos de transposição e incompatibilidade híbrida entre subespécies de *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae***

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós- Graduação em Biociências, Área de Genética e Biologia Evolutiva, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, em cotutela com a Université Claude Bernard – Lyon 1.

Financiadores: FAPESP: processo 2016/19271-2

CNPq: processos 303455/2017-9 e  
141413/2016-6

ANR: processo 14-CE19-0016

IDEX LYON

Eiffel Program (Campus France)

**Comissão Examinadora:**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Marcia Aparecida CARARETO (UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Cristina VIEIRA Orientadora (Université Claude Bernard – Lyon 1)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lilian MADI-RAVAZZI (UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto)

Prof. Dr. Elgion LORETO (UFMS)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Laurence MOUTON (Université Claude Bernard – Lyon 1)

Dr. Marcelo Mendes BRANDÃO (UNICAMP)

Prof. Dr. Alessandro VARANI (UNESP – Câmpus de Jaboticabal)

São José do Rio Preto

13 de maio de 2020



Numéro d'ordre: 2020LYSE1055

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale**  
Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation

**Spécialité de doctorat** : Biomath-Bioinfo-Génomique évolutive

Soutenue publiquement/à São José do Rio Preto, São Paulo, Brésil le 13/05/2020, par :  
**Cecília Artico Banho**

---

**Dérégulation des gènes et élément transposables et incompatibilité hybride  
entre les sous-espèces *Drosophila mojavensis* et *D. arizonae***

---

**Devant le jury composé de:**

CARARETO, Claudia Marcia Aparecida Professeure Université d'état Paulista São José do  
Rio Preto: Directrice de thèse

GARCIA GUERREIRO, Maria del Pilar Professeure Université Autonome de Barcelone  
(Espagne): Rapporteur

LORETO, Elgion Professeur Université Fédérale de Santa Maria (Brésil):  
Rapporteur/Examinateur

BRANDÃO, Marcelo Mendes Chercheur Université de Campinas (Brésil):  
Rapporteur/Examinateur

MADI-RAVAZZI, Lilian Professeure Université d'état Paulista São José do Rio Preto:  
Presidente du jury/ Examinatrice

MOUTON, Laurence Maître de Conférences, Université Lyon 1 (France) : Examinatrice

VARANI, Alessandro Chercheur Université d'état Paulista Jabotical (Brésil): Examinateur

VIEIRA, Cristina Professeure Université Lyon1: Directrice de thèse

Este trabalho foi realizado sob convenção de co-tutela entre Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Brasil e l'Université Claude Bernard (Lyon1 - UCBL) – França, no laboratório de Evolução Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) – São José do Rio Preto/SP, e no Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE/Lyon1).

Universidade Estadual Paulista (UNESP – IBILCE) Laboratório de Evolução Molecular  
Departamento de Biologia  
Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth 15054-000 São José do Rio Preto-SP  
Brasil

Université Claude Bernard – Lyon 1  
Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive CNRS UMR 5558  
43 Boulevard du 11 novembre 1918  
69622 Cedex Villeurbanne

Cecilia ARTICO BANHO  
cecilia.artico-banho@etu.univ-lyon1.fr  
ceci.abanho@gmail.com

Palavras chave - Mots Clés – Keywords  
Elementos de Transposição - Eléments transposables – Transposable elements Híbridos -  
Híbridos – Hybrids  
Fenótipo – Phénotype – Phenotype  
Expressão Gênica– Gene Expression – Gene Expression  
*Drosophila mojavensis*  
*Drosophila arizonae*

*Aos meus pais, por toda dedicação, apoio  
e exemplo de força e perseverança.*

Aos meus pais, Rozangela de Fátima Artico e Claudio Banho, por todo apoio, amor e carinho ao longo destes anos. Obrigada por serem meu exemplo de bondade, honestidade, perseverança, luta e otimismo. Obrigada pelos valorosos ensinamentos, valores morais e por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse ter acesso à educação de qualidade. Essa conquista eu devo a vocês.

Ao meu namorado e companheiro Plinio Gabriel Sicuti por todo amor, carinho e paciência nesses últimos anos. Obrigada por sempre se fazer presente, mesmo durante o período em que estive na França, dando todo suporte e encorajamento. Obrigada por nunca me deixar desistir.

Às minhas orientadoras Claudia Marcia Aparecida Carareto e Cristina Vieira pelos valorosos ensinamentos, pela paciência, e por toda a confiança depositada em mim na realização desse trabalho. Sempre serei grata por todas as oportunidades que me concederam, as quais me tornaram uma profissional melhor e que me fizeram crescer como ser humano. Vocês são meus grandes exemplos de mulheres, de cientistas, de sucesso, e de amor à profissão. Obrigada por me pertirem aprender com vocês.

Aos meus avós Izaura Orlando Banho, Natalino Banho, Sebastiana Caetano Artico e Denilson Artico, por serem meu exemplo de bondade e fé. Obrigada por todo amor e carinho ao longo desses anos. Agradeço, também, ao meu irmão Vitor Henrique Artico Banho pelo companheirismo, e apoio durante todos esses anos.

Aos queridos amigos que a UNESP me deu e que com certeza levarei para sempre. Obrigada Samara Videira Zorzato, Ana Letícia Guerra, Ana Beatriz Bortolozo, Fernando César Silva Júnior, Tatiani Seni de Souza Firmino e Luis Lenin Vicente Pereira, por todos os momentos incríveis, por todas as risadas, conversas, apoio mútuo e carinho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Evolução Molecular, William Vilas Boas Nunes, Luis Gustavo Galego, Marcelo Jurado, Guilherme Matheus, Edoardo Estevam Lobl, Izabella Luisa Tambones, Lucas Moreira, Bianca Manfré, Felipe Santa-Rosa do Amaral, e em especial à minhas queridas amigas Camila Vieira e Maryanna Cristiano Simão. Obrigada por serem minha segunda família, por me acolherem há quatro anos e por compartilharem todo o seu

conhecimento. Muito obrigada por todos os momentos incríveis, por todas as longas conversas, por todas as risadas e por serem pessoas maravilhosas. Eu tenho muita sorte em poder trabalhar não com colegas, mas sim com grandes amigos.

A todos da equipe TREEP e do LBBE, Matthieu Boulesteix, Marie Fablet, Emmanuelle Lerat, Annabelle Haudry, Justine Picarle, Hélène Henri, Nicole Lara, que me acolheram de braços abertos, por sempre me auxiliarem e por todos os ensinamentos. À Nelly Burlet e Sonia Martinez por toda a paciência, longas conversas e por auxílio durante os experimentos com *Drosophila*. E, em especial, a Pierre Marin, Angelo Jacquet, Inessa Buch, Valentina Rodrigues Rada pela paciência, amizade, por todo auxílio, pelas risadas e pelos almoços juntos.

À Marlène Roy, pela amizade, pelo apoio e por todos os ensinamentos. Por sempre estar disposta a ajudar e por ser extremamente gentil. Ao Vincent Mérel, com quem tive o prazer de dividir a sala durante toda a minha estadia no LBBE. Obrigada por ser tão gentil, atencioso, por sempre estar disposto a ajudar, pela paciência, compreensão, pelas longas conversas, e acima de tudo, obrigada por me ensinar as análises que apresentarei nesse trabalho, tornando-o possível.

Aos amigos que pude conhecer em Lyon e que tornaram minha estadia muito mais leve e alegre.

A todos os docentes que contribuíram para a minha formação, aos quais serei eternamente grata. Em especial agradeço à Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, que me orientou durante a graduação e mestrado, a qual transmitiu grandes ensinamentos e foi um grande exemplo.

A todos os técnicos, funcionários, e alunos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos servidores do Pós-Graduação em Biociências, pelo profissionalismo e amor à pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de São José do Rio Preto, que me acolheu, permitindo a realização deste sonho.

À Université Claude Bernard Lyon 1 e ao Laboratoire de Biometrie et Biologie Evolutive, que

proporcionaram maior oportunidade da minha vida e contribuíram grandemente para minha formação acadêmica.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e preciosas contribuições ao trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP, sob o processo 2016/19271-2, do CNPq, sob o processo 303455/2017-9 e da Agence Nationale de la Recherche (ANR) sob o processo 14-CE19-0016. Agradeço ao CNPq (processo 141413/2016-6), à IDEX LYON e ao Eiffel Program (Campus France) pela concessão de bolsas de estudo no Brasil e na França, que possibilitaram a realização desse trabalho.

## RESUMO

Hibridização interespecífica é uma condição de estresse que pode levar à esterilidade ou à inviabilidade devido à desregulação de genes e elementos de transposição (TEs), particularmente em espécies do gênero *Drosophila* com grande tempo de divergência. Contudo, a extensão dessas anormalidades em híbridos de espécies com tempo de divergência recente ainda não é bem compreendida. *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae* são um bom sistema biológico para investigar essa questão uma vez que a divergência entre elas foi relativamente recente (~1,5 milhões de anos atrás), apresentam diferentes graus de isolamento reprodutivo, e são capazes de produzir híbridos em laboratório. A fim de verificar a ocorrência e o grau da incompatibilidade híbrida, neste estudo, foram realizadas análises fenotípicas para estimar parâmetros da história de vida de descendentes de cruzamentos intra e interespecíficos, bem como análises de expressão diferencial de genes e TEs que possam estar envolvidos no isolamento reprodutivo, por meio de análises de RNA-Seq, de parentais e híbridos. Todos os híbridos apresentaram menor viabilidade em comparação aos descendentes de cruzamentos intraespecíficos, como também todos os híbridos machos dos cruzamentos entre fêmeas *D. mojavensis* vs machos *D. arizonae* apresentaram espermatozoides móveis, enquanto que nos cruzamentos recíprocos, 75% dos híbridos apresentaram espermatozoides imóveis. As análises fenotípicas mostraram ausência de disgenesia gonadal em machos e fêmeas, bem como fertilidade em 100% das fêmeas híbridas. Contudo, apenas 50% dos híbridos com motilidade espermática foram férteis. As análises do transcriptoma evidenciaram expressão conservativa para a maioria dos genes e famílias de TEs em ovários de híbridos em relação às espécies parentais. Em testículos, por outro lado, menor número de genes e TEs tiveram expressão conservada, sendo observada uma tendência à superexpressão de TEs e subexpressão de genes. Além disso, foi verificado que híbridos sem motilidade espermática, provenientes de cruzamentos entre fêmeas *D. arizonae* vs machos *D. mojavensis* apresentaram maior número de genes desregulados que aqueles com espermatozoides móveis, e que a maioria desses genes estavam subexpressos e apresentaram funções relacionadas à espermatogênese, de acordo com análises de ontologia. O sistema de regulação pós-transcricional parece falhar no controle da expressão de TEs superexpressos em ovários e testículos, mesmo quando piRNAs estão presentes na linhagem materna. Isso evidencia que outros mecanismos podem estar relacionados à desregulação dos TEs nos tecidos

reprodutivos de híbridos entre *D. arizonae* e *D. mojavensis*. Dentre esses mecanismos pode-se sugerir a desregulação de alguns genes envolvidos na via de piRNAs, e de modificação de cromatina, como observado em testículos. Contudo, o mesmo não pode ser sugerido para ovários, uma vez que nessa gônada a expressão desses genes não estava desregulada. Em síntese, este estudo mostra que testículos de híbridos entre *D. arizonae* e *D. mojavensis* apresentam maior expressão diferencial de genes e de TEs em relação aos parentais do que em ovários e que, embora piRNAs estejam presentes para muitos dos TEs desregulados, eles não são capazes de controlar sua expressão, o que pode estar ligado ao fenótipo de esterilidade demonstrado pelos parâmetros de história de vida analisados nestes híbridos.

**Palavras-chave:** Híbridos, Isolamento pós-zigótico, Fenótipo, Expressão Diferencial, Grupo *repleta*

## ABSTRACT

Interspecific hybridization is a stress condition that can lead to sterility and/or inviability, by misregulation of genes and transposable elements (TEs) in *Drosophila* species with high divergence time. However, the extent of these anomalies in hybrids of recently diverged species is not clear. *Drosophila mojavensis* and *D. arizonae* are a useful biological system for such investigation, once they diverged recently (~1.5 m.y.a), have variable degrees of reproductive isolation and can produce hybrids in laboratory. In order to verify the occurrence and degree of hybrid incompatibility, in this study, the life history parameters of offspring of intra and interspecific crosses were estimated, as well as the differential expression of genes and TEs that may be involved in reproductive isolation, through RNA-Seq analyses of parental and hybrids. All hybrids had a decrease in viability compared to intraspecific offspring as well as all hybrid males from crosses between *D. mojavensis* females and *D. arizonae* males presented motile sperm, while in the reciprocal crosses 75% of the hybrids had immotile sperm. Phenotypic analyses showed no gonad dysgenesis and fertility in 100% of hybrid females, however, only 50% of males with mobile sperm were fertile. The analyses of the transcriptome showed that most of the genes and TE families had conservative expression related to the parental lines in hybrid ovaries. In testes, on the other hand, a less conservative gene and TE expression was found, since a bias for TE overexpression and gene underexpression was observed. Moreover, it was verified that hybrids presenting immotile sperm, from crosses between *D. arizonae* females and *D. mojavensis* males, have more misexpressed genes than those with motile sperm, and most of the deregulated genes were underexpressed, having spermatogenesis-related functions, according to GO enrichment. The post-transcriptional regulation system seems to fail to control the expression of overexpressed TEs in ovaries and testes, even when piRNAs are present in the maternal lines and hybrids, which suggests that other factors could be underlying TE up- regulation in reproductive tissues of hybrids between *D. arizonae* and *D. mojavensis*. Among these mechanisms, divergent expression of genes involved in the piRNA pathway, as well as, chromatin modification genes, in the hybrid testes, should be highlighted. However, the same cannot be suggested for ovaries, since in this gonad the expression of these genes was not

deregulated. In summary, this study shows that testes of hybrids between *D. arizonae* and *D. mojavensis* have greater differential expression of genes and TEs in relation to parental species than in ovaries. In addition, it shows that although piRNAs are present for many of the unregulated TEs, they are not able to control their expression, which may be linked to the sterility phenotype shown by the life history parameters estimated in these hybrids.

**Keywords:** Hybrids, Postzygotic isolation, Phenotype, Differential expression, *repleta* group

## RÉSUMÉ

L'hybridation interspécifique est une condition de stress qui peut conduire à des hybrides stériles ou non viables, en raison de la dérégulation des gènes et des éléments transposables (ET), en particulier chez les hybrides entre espèces du genre *Drosophila* ayant un long temps de divergence. Cependant, l'ampleur de ces anomalies chez les hybrides d'espèces ayant un temps de divergence récent n'est pas encore bien comprise. *Drosophila mojavensis* et *D. arizonae* constituent un bon système biologique pour étudier cette question car le temps de divergence est relativement récent (~1,5 m. a.). En plus, ces espèces présentent différents degrés d'isolement reproducteur et sont capables de produire des hybrides en laboratoire. Afin de vérifier l'occurrence et le degré d'incompatibilité des hybrides, nous avons mesuré les traits d'histoire de vie des descendants de croisements intra et interspécifiques, ainsi que l'expression différentielle des gènes et des ET qui peuvent être impliqués dans l'isolement reproducteur. Les analyses phénotypiques ont montré que tous les hybrides présentaient une viabilité inférieure aux descendants des croisements intraspécifiques. Les analyses de la motilité des spermatozoïdes ont montré que tous les hybrides mâles issus de croisement entre femelle *D. mojavensis* et mâle *D. arizonae* croisés avaient des spermatozoïdes mobiles, alors que dans le croisement réciproque, 75% des hybrides avaient des spermatozoïdes immobiles. Les analyses de fertilité des hybrides n'ont montré aucune dysgénésie gonadique chez les mâles et les femelles et une fertilité de 100% chez les hybrides femelles. Cependant, seulement 50% des hybrides mâles ayant la motilité des spermatozoïdes étaient fertiles. Les analyses RNASeq ont montré que la plupart des gènes et des familles d'ET présentaient une expression conservée par rapport aux espèces parentales dans les ovaires des hybrides. Dans les testicules, en revanche, moins de gènes et de ET ont une expression de type conservé et on observe une tendance à la surexpression des ET et à la sous-expression des gènes. En outre, il a été observé que les hybrides sans motilité des spermatozoïdes (issus de croisements entre les femelles *D. arizonae* et les mâles *D. mojavensis*) présentaient un nombre plus élevé de gènes dérégulés que ceux avec des spermatozoïdes mobiles, et que la majorité de ces gènes étaient sous-exprimés et présentaient des fonctions liées à la spermatogenèse. Le système de régulation post-transcriptionnel semble ne pas être efficace dans le contrôle de l'expression des ET qui sont surexprimées dans les ovaires et les testicules, même quand des piRNA sont présents dans la lignée maternelle. Cela montre que d'autres mécanismes peuvent être liés à la dérégulation des ET dans les tissus reproducteurs des hybrides entre *D. arizonae* et *D.*

*mojavensis*. Parmi ces mécanismes, on peut suggérer la dérégulation de certains gènes impliqués dans la voie des RNAi, et la modification de la chromatine, telle qu'observée dans les testicules. Cependant, on ne peut pas en dire autant des ovaires, car dans ce tissu, l'expression de ces gènes n'a pas été dérégulée. En résumé, cette étude montre que les testicules des hybrides entre *D. arizonae* et *D. mojavensis* présentent une expression différentielle des gènes et des ET plus importante par rapport à celle des parents que les ovaires et que, bien que des piARN soient présents pour un grand nombre des ET dérégulés, ils ne semblent pas être capables de contrôler leur expression. Ceci qui peut être associé au phénotype de stérilité observé pour les traits d'histoire de vie analysés chez les hybrides.

**Mots-clés:** Hybrides, Isolement postzygotique, Phénotype, Expression différentielle, groupe *repleta*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
1.1 Mecanismos de incompatibilidade híbrida .....	18
1.2 Elementos de transposição e seus mecanismos de regulação .....	21
1.3 Mobilização de TEs em híbridos .....	26
1.4 As espécies <i>D. arizonae</i> e <i>D. mojavensis</i> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3 CAPÍTULO 1:</b> Life-history traits in hybrids of <i>Drosophila arizonae</i> and <i>Drosophila mojavensis</i> subspecies .....	37
<b>4 CAPÍTULO 2:</b> Comparative transcriptomics between <i>Drosophila mojavensis</i> and <i>D. arizonae</i> reveal underexpression of spermatogenesis-related genes in male hybrids .....	66
<b>5 CAPÍTULO 3:</b> Misregulation of transposable elements in <i>Drosophila mojavensis</i> and <i>D. arizonae</i> hybrids .....	110
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	158
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	167
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	170



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Como novas espécies surgem e quais são os fatores genéticos envolvidos com o processo de especiação são duas das grandes questões em Biologia Evolutiva que, até os dias atuais, não são completamente esclarecidas. O conceito biológico define espécie como grupos de populações naturais intercruzantes que são reprodutivamente isoladas de outros grupos semelhantes (MAYR, 1942; 1963). Sendo assim, especiação pode ocorrer quando o fluxo de informação genética entre populações é inibido pela formação de barreiras que levam ao isolamento reprodutivo (DOBZHANSKY, 1937; 1940). Dessa forma, a magnitude e a taxa com que as barreiras de isolamento reprodutivo evoluem, em diferentes grupos de espécies, pode ser um fator chave na origem de novas espécies (TURISSINI *et al.*, 2018).

### 1.1 Mecanismos de incompatibilidade híbrida

Sabe-se, atualmente, que o processo de hibridização interespecífica, que já foi considerado um evento raro, é relativamente comum na natureza, ocorrendo em cerca de 25% das espécies vegetais e em 10% das animais (MALLET, 2005) e que, em espécies incipientes, as barreiras que levam à restrição ao fluxo gênico podem ser incompletas, levando à produção de descendentes híbridos. De modo geral, os mecanismos de isolamento reprodutivo podem ser classificados em diferentes tipos, dependendo do momento em que ocorrem durante o ciclo reprodutivo, podendo ser pré-zigótico, pré-zigótico pós-cópula, ou pós-zigótico. O isolamento pré-zigótico resulta no impedimento de cruzamentos interespecíficos, e pode ocorrer em decorrência de especificidade de nicho, de preferências de habitats e no período reprodutivo, como também devido a fatores comportamentais (padrões de corte e preferência de acasalamento) e mecânicos (morfologia das genitálias externas) (TURISSINI *et al.*, 2018). Os mecanismos de isolamento pré-zigótico pós-cópula, por sua vez, são aqueles que envolvem incompatibilidades entre os gametas, ou mesmo, entre proteínas do trato reprodutivo feminino e fluido seminal masculino (MARKOW; HOCUTT, 1998; KNOWLES; MARKOW, 2001;

COYNE; ORR, 2004; REED; MARKOW, 2008; TURISSINI *et al.*, 2018). Por outro lado, mecanismos de isolamento pós-zigóticos, incluem incompatibilidades que levam à redução do valor adaptativo de híbridos interespecíficos em relação às espécies puras, podendo ocasionar anormalidades no desenvolvimento (inviabilidade) e na reprodução (esterilidade) dos híbridos F<sub>1</sub> ou F<sub>2</sub>, e mesmo no comportamento, como o padrão de corte dos híbridos (ORR; PRESGRAVES, 2000; PRESGRAVES, 2010; MCBRIDE; SINGER, 2010; TURISSINI *et al.*, 2018).

Embora os mecanismos de isolamento pós-zigótico sejam extensivamente estudados, principalmente em espécies de *Drosophila*, ainda não se tem amplo conhecimento dos fatores genéticos que influenciam a fertilidade e/ou viabilidade híbrida. Coyne *et al.* (1997) mostraram, pela análise de dados de 171 cruzamentos interespecíficos em *Drosophila*, que os mecanismos de isolamento pós-zigótico evoluem primeiramente em machos que em fêmeas, e que o grau da inviabilidade ou esterilidade está diretamente relacionado à distância genética entre as espécies. Além disso, ao analisarem o tempo de divergência das espécies, os autores constataram que hibridizações entre espécies com tempo de divergência recente produziam principalmente híbridos machos inviáveis ou estéreis, ao passo que apenas intercruzamentos entre espécies com maior tempo de divergência produziam fêmeas inviáveis. Estes resultados corroboram a regra de Haldane (1922), que postula que em eventos de hibridização, quando há esterilidade híbrida, essa afetará primeiramente o sexo heterogamético.

Com o avanço das técnicas de Biologia Molecular e sequenciamento genômico, diversos estudos têm buscado compreender as bases genéticas da especiação. Esses estudos têm mostrado que mudanças na expressão gênica são importantes fontes de variação em características morfológicas adaptativas (MCGIRR; MARTIN, 2019), e, em especial para o processo de especiação. A incompatibilidade decorrente da divergência genética entre os parentais pode causar desregulação de genes específicos em híbridos, os quais podem ser expressos em nível superior ou inferior ao das espécies parentais, resultando na redução do valor adaptativo do híbrido, aumentando, portanto, as barreiras de isolamento pós-zigótico.

Diversos autores vêm pesquisando genes candidatos à especiação, principalmente utilizando como modelo espécies de *Drosophila* (WU *et al.*, 1996; TING *et al.*, 1998; MICHALAK; NOOR, 2003; MICHALAK; NOOR, 2004; HAERTY; SINGH 2006; MA; MICHALAK, 2011; GOMES; CIVETTA, 2014). Dentre os genes identificados que apresentam associação direta com o fenótipo de incompatibilidade híbrida destacam-se os genes listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Genes associados diretamente com incompatibilidade e/ou esterilidade em *Drosophila*.

Gene	Fenótipo de incompatibilidade e/ou esterilidade	Referências
<i>Odysseus (Odsh)</i>	Híbridos de <i>D. mauritiana</i> - <i>D. simulans</i>	TING <i>et al.</i> 1998
<i>Acylphosphatase (Acyp)</i>	Híbridos de <i>D. mauritiana</i> - <i>D. simulans</i> e híbridos de <i>D. p. pseudoobscura</i> - <i>D. persimilis</i>	NOOR, 2005; MICHALACK; MA, 2008; GOMES; CIVETTA, 2014
<i>Jyalpha</i>	Híbridos de <i>D. melanogaster</i> - <i>D. simulans</i>	MASLY <i>et al.</i> 2006
<i>Zygote hybrid rescue (Zhr)</i>	Híbridos de <i>D. melanogaster</i> - <i>D. simulans</i>	SAWAMURA; YAMAMOTO, 1997
<i>Nucleoporin 153kD (Nup153) e Nucleoporin 96kD (Nup96)</i>	Híbridos de <i>D. melanogaster</i> - <i>D. simulans</i>	PRESGRAVES <i>et al.</i> , 2003; PRESGRAVES; STEPHAN, 2007
<i>Hybrid male rescue (Hmr) e Lethal male rescue (Lmr)</i>	Híbridos de <i>D. melanogaster</i> - <i>D. simulans</i>	BARBASH <i>et al.</i> , 2003; BARBASH <i>et al.</i> , 2004; BRIDEAU <i>et al.</i> , 2006; FERREE; BARBASH, 2009; SATYAKI <i>et al.</i> , 2014
<i>Gzf</i>	Híbridos de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. simulans</i>	PHADNIS <i>et al.</i> , 2015; COOPER; PHADNIS, 2016.
<i>Overdrive (Ovd)</i>	Híbridos de <i>D. p. pseudoobscura</i> e <i>D. p. bogotana</i>	PHADNIS; ORR, 2008; PHADNIS, 2011
<i>gonadal (gdl)</i>	Híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. mauritiana</i> e híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. sechellia</i>	MOEHRING <i>et al.</i> 2006
<i>don juan (dj)</i>	Híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. mauritiana</i> e híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. sechellia</i>	MOEHRING <i>et al.</i> 2006
<i>always early (aly)</i>	Híbridos de <i>D. p. pseudoobscura</i> - <i>D. persimilis</i> e em mutantes de <i>D. melanogaster</i>	NOOR, 2005; GOMES; CIVETTA, 2014; WHITE-COOPER, 1998; JIANG; WHITE-COOPER, 2003
<i>cannonball (can)</i>	Mutantes de <i>D. melanogaster</i>	WHITE-COOPER, 1998
<i>meiosis I arrest (mia)</i>	Mutantes de <i>D. melanogaster</i>	WHITE-COOPER, 1998
<i>Spermatocyte arrest (sa)</i>	Mutantes de <i>D. melanogaster</i>	WHITE-COOPER, 1998
<i>twine (twe)</i>	Mutantes de <i>D. melanogaster</i>	WHITE-COOPER, 1998
<i>cookie monster (comr)</i>	Mutantes de <i>D. melanogaster</i>	JIANG; WHITE-COOPER, 2003
<i>janusB (janB)</i>	Mutantes de <i>D. melanogaster</i>	YANICOSTAS; LEPESANT, 1990
<i>gonadal (gdl)</i>	Híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. mauritiana</i> e híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. sechellia</i>	MOEHRING <i>et al.</i> 2006
<i>don juan (dj)</i>	Híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. mauritiana</i> e híbridos de <i>D. simulans</i> - <i>D. sechellia</i>	MOEHRING <i>et al.</i> 2006

Fonte: Elaborado pelo autor

Embora grande quantidade de genes envolvidos com isolamento reprodutivo tenha sido identificada em híbridos de diferentes espécies, ainda é difícil encontrar uma associação entre a desregulação de genes específicos em diferentes híbridos e o processo de isolamento pós-zigótico, isso porque, diversos genes codificantes de proteínas e reguladores podem estar envolvidos nesse processo. Além disso, a desregulação de muitos genes pode ser espécie-específica, devido ao maior ou menor grau de divergência das espécies, ou mesmo pode haver a influência de outras sequências genéticas nesse processo, como os elementos de transposição (do Inglês, *Transposable Elements* (TEs)).

## 1.2 Elementos de Transposição e seus mecanismos de regulação

Os elementos de transposição são sequências de DNA repetitivas capazes de se movimentar de um local para outro no genoma, replicando-se a si mesmos, sendo essa capacidade a essência de seu sucesso evolutivo. Essas sequências estão presentes em grandes proporções e diversidade nos genomas de quase todos os eucariotos (exceto em *Plasmodium falciparum*) (WICKER *et al.*, 2007), sendo que em fungos 3 a 20% do genoma é composto por TEs, ao passo que em metazoários essa proporção varia de 3 a 45% (DABOUSSI; CAPY, 2003; WICKER *et al.*, 2007). Finnegan (1989) pioneiramente propôs que os TEs fossem classificados em duas classes, com base no seu mecanismo de transposição: elementos de Classe I, que se transpõem por transcrição reversa de um intermediário de RNA usando um mecanismo DNA-RNA-DNA, e elementos de Classe II que se transpõem diretamente de DNA para DNA. A classificação de Finnegan foi objeto de duas grandes atualizações que têm sido debatidas ativamente; uma delas, o sistema hierárquico de classificação de Wicker (WICKER *et al.*, 2007) e a outra a utilizada pelo Repbase, que é o banco de dados de elementos repetitivos de DNA mais comumente usado (JURKA *et al.*, 2005; KAPITONOV; JURKA, 2008).

Como não há consenso para um sistema universal de classificação dos TEs (PIEGU *et al.* 2015), descreve-se a seguir o sistema hierárquico de classificação de TEs em eucariotos proposto

por Wicker *et al.* (2007), que mantém a divisão dos TEs em duas classes, mas aplicando critérios enzimáticos e mecanicistas, e inclui em ordem hierárquica os níveis subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. Na Classe I estão inclusos os elementos que utilizam uma etapa de transcrição reversa, mobilizando-se por meio de um mecanismo denominado *copy and paste* (elementos de RNA, conhecidos como retrotransposons). Essa classe é composta por cinco ordens, sendo denominadas LTR (*Long terminal repeat*), DIRS (*Dictyostelium intermediate repeat sequence*), PLE (*Penelope-like elements*), LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*) e SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*), as quais são distinguidas pela organização de seus constituintes internos, filogenia da enzima transcriptase reversa, bem como pelo seu mecanismo de transposição (WICKER *et al.*, 2007). Por outro lado, a Classe II é composta por elementos de DNA, ou seja, aqueles que não utilizam uma etapa intermediária de RNA para mobilização, possuindo um mecanismo de transposição conhecido como *cut and paste*, uma vez que ocorre a excisão do elemento do genoma antes de sua reinserção em outra região (FINNEGAN, 1989; WICKER *et al.*, 2007). Esta classe contém duas subclasses, que são distinguidas pelo número de cadeias de DNA que são cortadas durante a transposição. A Subclasse I é composta por elementos das ordens TIR (*terminal inverted repeat*) e Crypton, e a Subclasse II por elementos das ordens Maverick e Helitron (WICKER *et al.*, 2007).

É interessante ressaltar que os elementos de Classe I apresentam cópias adicionais em cada novo evento de mobilização, enquanto que em elementos de Classe II, a transposição é, na maior parte das vezes, conservativa (WICKER *et al.*, 2007). Considerando esses aspectos e o fato de que TEs são entidades dinâmicas, durante eventos de mobilização essas sequências podem ter efeitos relevantes sobre o genoma hospedeiro. Esses efeitos podem ser verificados em nível da linhagem celular germinativa ou em estados precoces de desenvolvimento, assim como em nível somático, resultando em mudanças fenotípicas no hospedeiro. Além disso, eventos transposição podem desencadear modificações estruturais no genoma, como translocações, duplicações segmentais e deleções capazes de induzir profundas alterações genômicas, levando à

sua contração ou expansão, além do estabelecimento de novas relações de ligação entre genes (KIDWELL; LISCH, 2001). Tem-se reportado, também, que os TEs desempenham papel importante na regulação de diversos processos celulares e diversificação das famílias gênicas, sendo capazes de promover a transdução e amplificação de fragmentos de genes do genoma hospedeiro (VAN de LAGEMAAT *et al.*, 2003); bem como, de influenciar a expressão e função gênica, ampliando a variabilidade do repertório transcricional e proteico (CARARETO *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2008, 2013). Em humanos, estima-se que 25% das regiões promotoras contêm sequências derivadas de TEs, e aproximadamente 20% dos genes em humanos e ratos contêm esses elementos em suas regiões UTRs (*Untranslated Regions*) (WONG; CHOO, 2004).

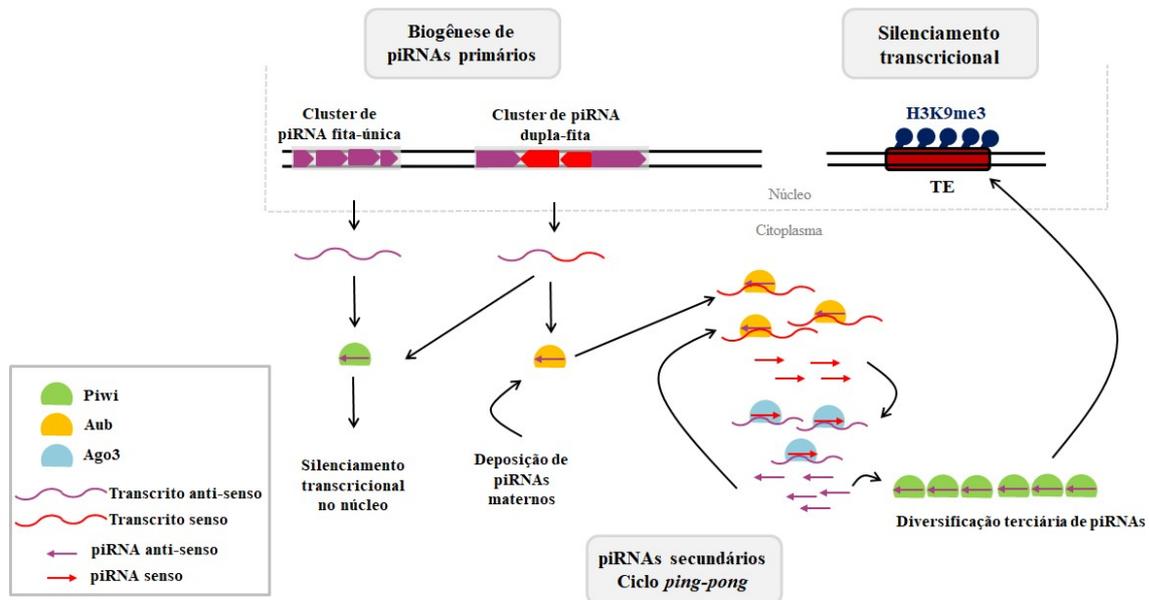
A relação dinâmica dos TEs com o genoma no qual estão inseridos explica, em alguns pontos, os processos evolutivos que ocorrem nos organismos. Em geral, a intensa mobilização de TEs, em organismos bem adaptados, pode ocasionar efeitos deletérios aos hospedeiros. Sendo assim, o controle da sua expressão é fundamental para estabelecer um balanço de efeitos positivos e negativos, garantindo a viabilidade das funções do genoma nos organismos. Esse controle é realizado por meio do silenciamento pós-transcricional (utilizando RNAs de interferências) e do silenciamento transcricional (metilação do DNA e modificação de histonas) (BRENNECKE *et al.*, 2007; RIGAL; MATHIEU, 2011). Os mecanismos de regulação pós-transcricionais envolvem a maquinaria de RNA de interferência (RNAi). Em células somáticas, os TEs são controlados por meio de siRNAs (*small interfering RNA*), que ao reconhecerem e se ligarem ao mRNA promovem sua degradação (HIRAKATA; SIOMI, 2019; SATO; SIOMI, 2020). Em células germinativas, o mecanismo de regulação pós-transcricional, descrito em *Drosophila* e humanos, possui algumas semelhanças com o que ocorre em células somáticas, contudo, neste caso o RNA de interferência é denominado de piRNA (*piwi-interacting RNAs*), devido ao grupo de proteínas que participam do mecanismo de silenciamento, pertencentes à família das Argonautas, Ago3, Aubergina (Aub) e Piwi (revisado em HIRAKATA; SIOMI, 2019; SATO; SIOMI, 2020).

A produção de piRNAs acontece por duas vias em *Drosophila*. A via de biogênese de piRNAs primários ocorre a partir de transcritos provenientes de *clusters* de piRNAs presentes nos genomas. Esse processo envolve principalmente as proteínas *Piwi* e *Zucchini (Zuc)*, entre outras (BRENNECKE *et al.*, 2007; IPSARO *et al.*, 2012; SATO; SIOMI, 2020). Por outro lado, a via de piRNAs secundários é produzida apenas em células germinativas, por meio de um mecanismo de amplificação chamado de *ping-pong* (BRENNECKE *et al.*, 2007). Nesse mecanismo, piRNAs primários ou de origem materna são necessários para iniciar a via, uma vez que, piRNAs anti-senso precisam ser ligados às proteínas *Piwi* ou *Aub*. Quando esse complexo (piRNA-proteína) é formado, ele é capaz de degradar transcritos complementares (no sentido senso) de TEs que provavelmente estavam ativos no genoma. Essa clivagem produz, então, transcritos de piRNA senso, os quais são ligados à proteína *Ago3*, que degrada transcritos de TEs anti-senso, levando então ao mecanismo de amplificação *ping-pong* (Figura 1). Esse mecanismo, geralmente, permite uma eficiente resposta contra cópias de TEs ativas nos genomas (BRENNECKE *et al.*, 2007; FABLET, 2014). Adicionalmente, em tecidos germinativos de *Drosophila* foi verificado que os complexos *Piwi*-piRNA são capazes de reprimir a transcrição de TEs por modificação do estado da cromatina (IWASAKI *et al.*, 2016). Em gônadas animais, muitas inserções de TEs são metiladas nos resíduos H3K9 de maneira dependente de *PIWI*-piRNA e problemas nessa via podem resultar em perda seletiva da marca repressiva H3K9me3 em inserções de TEs alvo e, portanto, na sua ativação (SIENSKI *et al.*, 2015).

O impacto causado pela instabilidade genética proveniente da hibridização interespecífica pode gerar diversas modificações no genoma hospedeiro. Dentre elas se encontram a desregulação de TEs, bem como de seus elementos regulatórios, podendo influenciar diretamente a expressão gênica. De acordo com Senti *et al.* (2015), o aumento da expressão de TEs no genoma pode gerar maiores quantidades de mRNAs de TEs disponíveis no citoplasma. Esse processo, conseqüentemente, influencia o complexo nuclear *Piwi*-piRNA, aumentando a repressão em nível transcricional, pelo recrutamento de marcas inativadoras da cromatina, como

H3K9me3. De fato, diversos estudos analisaram a influência de TEs na expressão de genes vizinhos, por meio da análise de marcas repressoras ou ativadoras da cromatina. Sienski *et al.* (2012) observaram que, em pelo menos 88% das regiões genômicas em *D. melanogaster* que continham a marca inativadora H3K9me3 na eucromatina haviam inserções de TEs, com pelo menos 5 kb de distância, à jusante ou à montante de onde estavam localizadas. Essas inserções são capazes de influenciar a expressão de genes vizinhos, como foi verificado para o locus *ex (expanded)* no qual o retrotransposon *Gypsy* é normalmente inserido. Nesse loco, *Gypsy* está, aproximadamente, a 1,2 kb à jusante do sítio de iniciação da transcrição (TSS) e, em condições normais, esse TE tem sua expressão controlada pelo espalhamento da marca de inativação da cromatina H3K9me3, em aproximadamente 10 a 12 kb, cobrindo, portanto, o TSS de *ex*. Contudo, em mutantes para a proteína Piwi, a qual participa das vias de silenciamento transcricional e pós-transcricional, foi verificada a perda completa de marcas H3K9me3, desencadeando a expressão desse elemento. Além disso, também foi reportado que em mutantes para essa proteína, 34% dos genes com inserções de TEs próximas a eles foram superexpressos, sendo que 80% desses estavam associados com inserções de TEs com até 5 kb de distância (SIENSKI *et al.*, 2012).

Esses resultados evidenciam o impacto do aumento da expressão de TEs nos processos de regulação e expressão de genes vizinhos, favorecendo indagações sobre a existência de associação desses elementos com genes diferencialmente expressos em tecidos germinativos de híbridos, e conseqüentemente, com o surgimento de barreiras reprodutivas pós-zigóticas que podem levar ao processo de especiação. Embora atualmente não existam evidências diretas sobre a influência da desregulação dos TEs sobre os genes da especiação, tem sido demonstrado que híbridos interespecíficos apresentam diversos genes desregulados, bem como aumento nas taxas de transposição (KELEHER *et al.*, 2012; SATYAKI *et al.*, 2014; ROMERO-SORIANO *et al.*, 2017; LOPEZ-MAESTRE *et al.*, 2017), contudo, associação de ambos fatores ainda não é completamente entendida.



**Figura 1.** Mecanismo de silenciamento via piRNAs em *Drosophila*. Na biogênese de piRNAs primários, os piRNAs são transcritos de regiões genômicas denominadas *clusters*, os quais podem ser de fita única ou de dupla fita (específico de células germinativas). Posteriormente, os piRNAs são processados e se ligam às proteínas Piwi ou Abu (Aubergina). piRNAs anti-senso ligados à proteína Aub tem como alvo transcritos de TEs no sentido senso. Após o reconhecimento do transcrito por complementariedade o complexo Aub-piRNAs, por meio de atividade endonuclease, degrada o TE originando piRNAs senso, os quais são ligados à Ago3 (Argonauta3), que tem como alvo transcritos de TEs no sentido anti-senso. Este mecanismo é denominado ciclo *ping-pong*, originando piRNAs secundários. Alguns complexos Aub-piRNA são herdados maternalmente e contribuem para o início do ciclo de amplificação de piRNAs secundários (*ping-pong*). As proteínas Piwi ligadas à piRNAs antisense (primários ou originados por diversificação terciária) se dirigem ao núcleo celular, onde recrutam proteínas de metilação que promovem silenciamento transcricional ao adicionar marcas de histona H3K9me3.

Fonte: Elaborado pelo autor e Adaptado de FABLET *et al.*, 2017 e IWASAKI *et al.*, 2015.

### 1.3 Mobilização de TEs em híbridos

Em eventos de hibridização, os genomas de duas espécies ou populações diferentes se encontram no *background* híbrido podendo levar a uma ampla desregulação genômica, do transcriptoma, do epigenoma e podendo também influenciar a mobilização de TEs (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007; REBOLLO *et al.*, 2012). De fato, a ativação dos TEs em genomas híbridos tem sido reportada na literatura (CARNELOSSI, *et al.*, 2014; KELLEHER *et al.*, 2012; VELA *et al.*, 2014; GUERREIRO, 2015; SATYAKI *et al.*, 2014; LOPEZ-MAESTRE *et al.*, 2017; ROMERO-SORIANO *et al.*, 2017). Devido à instabilidade genética causada pelo choque

genômico, eventos de transposição foram relatados em híbridos de plantas e animais (KIDWELL *et al.*, 1977; PETROV *et al.*, 1985; BAACK *et al.*, 2005; PARISOD *et al.*, 2010; KAWAKAMI *et al.*, 2011; KELLEHER *et al.*, 2012; VELA *et al.*, 2014; GUERREIRO *et al.*, 2015; HILL *et al.*, 2016; ROMERO-SORIANO *et al.*, 2017; CASTILLO; MOYLE, 2019). Em plantas, explosões de transposição foram registradas em três diferentes híbridos de girassol (gênero *Helianthus*), as quais estavam relacionadas ao aumento do número de cópias de elementos da ordem LTR (*Ty1/copia-like* e *Ty3/gypsy-like*), os quais foram responsáveis pelo aumento do genoma híbrido em aproximadamente 50% (BAACK *et al.*, 2005; KAWAKAMI *et al.*, 2011). Em animais, aumento nas taxas de transposição em decorrência de hibridização foi verificado em híbridos de espécies de cangurus, *Macropus eugenii* e *Wallabia bicolor* (O'NEILL *et al.*, 1998; METCALFE *et al.*, 2007). Nesses híbridos as consequências de eventos de transposição foram detectadas como grandes alterações cromossômicas, cariotípicas e no estado de metilação da cromatina, contribuindo para o menor valor adaptativo desses híbridos (O'NEILL *et al.*, 1998; METCALFE *et al.*, 2007).

*Drosophila* é um grupo extensivamente estudado quanto aos efeitos de eventos de mobilização de TEs em decorrência de eventos de hibridização. Nessas espécies, a ativação de TEs pode ser verificada em híbridos provenientes de cruzamentos intraespecíficos, bem como interespecíficos. Em nível intraespecífico, diversos estudos mostraram o fenômeno de disgenesia híbrida, caracterizado por atrofia gonadal ou inviabilidade larval, o qual está relacionado à mobilização de elementos específicos em determinadas espécies (PICARD, 1976; BLACKMAN *et al.*, 1987; YANNOPOULOS *et al.*, 1987; KIDWELL *et al.*, 1977; HILL *et al.*, 2016). Como exemplo, o sistema de disgenesia P-M, que ocorre em *D. melanogaster* e *D. simulans*, está relacionado à presença do elemento *P* ativo em apenas uma das populações submetidas a cruzamentos intraespecíficos. Quando populações maternas que não possuem o elemento *P* ativo (denominadas M) se cruzam com machos provenientes de populações que apresentam este elemento ativo em seus genomas (denominados P), as fêmeas híbridas geradas apresentam

diversos efeitos disgênicos como atrofia gonadal, e conseqüentemente ausência ou redução de fertilidade, aberrações cromossômicas e mutações espontâneas (KIDWELL *et al.*, 1977; BINGHAM *et al.*, 1982; HILL *et al.*, 2016). Contudo, é interessante ressaltar que essas conseqüências são verificadas em apenas uma direção de cruzamento, na qual as fêmeas não possuem os elementos ativos em seus genomas (KIDWELL *et al.*, 1977; BINGHAM *et al.*, 1982). Estudos posteriores mostraram que a mobilização desses elementos na linhagem germinal, e conseqüente prejuízo para os híbridos estavam relacionadas à falhas no sistema de regulação pós-transcricional, associado à via de piRNAs (revisado em LUO; LU, 2017). Mais especificamente, quando a linhagem materna não possui em seu genoma elementos que estão ativo na linhagem paterna, piRNAs primários provenientes de *clusters* genômicos e de deposição materna estarão ausentes, e portanto, a via de biogênese de piRNAs secundários, *ping-pong loop*, será prejudicada, resultando na ausência de controle pós-transcricional desse elemento (LUO; LU, 2017).

Em nível interespecífico foi mostrado que em híbridos de *D. buzzatii* e *D. koepferae* (espécies irmãs do grupo *repleta*, subgênero *Drosophila*) houve aumento na transposição do retrotransposon *Oswaldo*, que se encontra reprimido nos genomas parentais (LABRADOR *et al.*, 1994), bem como, uma explosão de transposição associada a três elementos: *Oswaldo*, *Helena* e *Galileo* (GUERREIRO, 2015; VELA *et al.*, 2014). Um estudo mais recente em híbridos desse par de espécies evidenciou que a desregulação, e conseqüente ativação de determinados TEs estava associada à divergência de genes que participavam do sistema de regulação pós-transcricional, via piRNAs, entre as espécies parentais (ROMERO-SORIANO *et al.*, 2017). Dessa forma, nos híbridos, a regulação desses elementos não era realizada de forma eficiente, resultando no aumento de sua expressão. Similarmente, análises de transcriptomas de híbridos de *D. melanogaster* e *D. simulans* mostraram ativação global de famílias de TEs, herdados tanto maternamente, quanto paternalmente, e que a desrepressão poderia ter sido ocasionada pela grande divergência adaptativa de genes da via de piRNA ao invés de diferenças espécies-

específicas de piRNAs derivados de TEs (KELLEHER *et al.*, 2012). Assim, a hibridização ou introgressão em populações podem contribuir para eventos de mobilização de TEs e instabilidade genômica que pode ser benéfica ao híbrido ao lhe conferir a capacidade de adaptação e especiação, ou ser prejudicial, podendo levá-lo à extinção (FONTDEVILA, 2005).

Embora, ainda não existam evidências se o aumento de transposição influencia a regulação gênica em híbridos, e vice versa, contribuindo para as barreiras de isolamento reprodutivo (REBOLLO *et al.*, 2010), um estudo em híbridos de *D. melanogaster* e *D. simulans* mostrou uma associação direta de efeitos epistáticos deletérios entre dois genes específicos, *Hmr* (*Hybrid male rescue*) e *Lmr* (*Lethal male rescue*), levando à desregulação de genes de heterocromatina, e culminando no aumento de expressão TEs e sequências satélites, principalmente em regiões centroméricas (SATYAKI *et al.*, 2014). Considerando esses fatores, espécies que divergiram recentemente e que apresentam barreiras de isolamento pré e pós-zigóticas incompletas, que propiciam a produção de híbridos, são bons modelos para o estudo das bases genéticas que influenciam o isolamento reprodutivo, bem como a dinâmica dos TEs nos genomas híbridos e sua influência nos passos iniciais do processo de especiação.

#### **1.4 As espécies *Drosophila mojavensis* e *D. arizonae***

Dentre as espécies do gênero *Drosophila*, *D. mojavensis* e *D. arizonae* (grupo *repleta*, subgênero *Drosophila*) são espécies irmãs, cactofílicas, que constituem populações alopátricas e simpátricas, capazes de produzir híbridos em laboratório (RUIZ *et al.*, 1990; MASSIE; MARKOW, 2005; JENNINGS; ETGES, 2009). Populações de *D. arizonae* são mais generalistas, utilizando como sítios de alimentação e reprodução cactos colunares ou do gênero *Opuntia*, dependendo de sua distribuição geográfica (RUIZ; HEED 1988; REED *et al.*, 2006). Essa espécie é encontrada a partir do sul da Guatemala, México e sudoeste dos Estados Unidos da América, onde podem constituir populações simpátricas com *D. mojavensis* (HEED, 1982; RUIZ; HEED, 1988; REED *et al.*, 2006). *D. mojavensis*, por sua vez, foi dividida em quatro

subespécies, sendo elas *D. m. mojavenensis*, encontrada no Deserto de Mojave, *D. m. baja*, presente na Península de Baja Califórnia, *D. m. sonorensis*, localizada no deserto de Sonora e sul do Arizona e *D. m. wrigleyi*, endêmica da ilha de Santa Catalina, na costa da Califórnia (REED *et al.*, 2006), e em cada uma dessas regiões, as diferentes subespécies utilizam diferentes cactos colunares como sítio de alimentação e reprodução (REED *et al.*, 2006; JENNINGS; ETGES, 2009). Reed *et al.* (2006) também reportaram que as populações pertencentes às quatro principais áreas de distribuição de *D. mojavenensis* apresentam-se estruturadas e com diferenças genéticas significativas, em relação aos haplótipos de DNA mitocondrial. Dados semelhantes foram reportados por Ross *et al.* (2006) utilizando locos microssatélites. Esses dados evidenciam que as populações de *D. mojavenensis* apresentam restrição do fluxo gênico entre as quatro principais regiões geográficas.

Embora existam poucos estudos sobre as barreiras de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre *D. arizonae* e *D. m. mojavenensis*, muitos estudos têm evidenciado a complexidade de suas barreiras de isolamento pré-zigótico. Isto é, essas espécies apresentam isolamento pré-zigótico e isolamento pré-zigótico pós-copula variável e dependente da direção de cruzamento, bem como da subespécie de *D. mojavenensis* considerada (PATTERSON, 1946; RUIZ *et al.*, 1990; MARKOW; HOCUTT, 1998; KNOWLES; MARKOW, 2001; REED; MARKOW, 2004, ETGES *et al.*, 2006; KELLEHER; MARKOW, 2007). Alguns estudos reportaram que fêmeas de *D. mojavenensis* provenientes de populações simpátricas apresentam isolamento reprodutivo pré-zigótico quase completo em relação a machos de *D. arizonae*, ao passo que fêmeas de *D. mojavenensis* que vivem em alopatria com *D. arizonae* mostraram menor índice de isolamento reprodutivo (RUIZ *et al.*, 1990; WARSEMAN; KOEPFER, 1977; MASSIE; MARKOW, 2005), o que se ajusta à Teoria do Reforço (DOBZHANSKY, 1937). Por outro lado, Markow *et al.* (1998), ao analisarem fêmeas de *D. mojavenensis* provenientes da península de Baja California, encontraram maiores taxas de isolamento reprodutivo em relação à *D. arizonae* em comparação com populações de *D. mojavenensis* do sul do Arizona (USA), evidenciando que índices de

isolamento pré-zigótico são variáveis entre essas subespécies. Além disso, considerando a barreira de isolamento reprodutivo pré-zigótico pós-cópula, foi mostrado que após cruzamentos interespecíficos de *D. mojavensis* e *D. arizonae*, uma massa espermática, denominada reação de inseminação (consequência de incompatibilidades entre proteínas presentes no esperma e no trato reprodutivo feminino) é formada no útero das fêmeas. A persistência dessa massa no trato reprodutivo feminino é variável de acordo com as subespécies de *D. mojavensis*, contudo, em alguns casos ela pode permanecer por dias (KNOWLES; MARKOW, 2001), sendo capaz de esterilizar as fêmeas ou evitar o comportamento de re-cópula nessas espécies, o qual é essencial para seu sucesso reprodutivo (PATTERSON, 1946; MARKOW; ANKNEY, 1984; ALONSO-PIMENTEL, 1994).

As espécies *D. arizonae* e *D. mojavensis* apresentam isolamento pós-zigótico incompleto e assimétrico, visto que em cruzamentos de fêmeas de *D. arizonae* com machos de *D. mojavensis* os machos híbridos são estéreis, mas em cruzamentos recíprocos a prole pode ser fértil, dependendo da origem da população materna (RUIZ *et al.*, 1990; REED; MARKOW, 2004). Esse par de espécies apresenta tempo divergência recente, cerca de 1,5 milhões de anos (SANCHES-FLORES *et al.*, 2016); diferindo, portanto, das espécies já estudadas quanto aos efeitos da hibridização na expressão gênica e de TEs, como *D. melanogaster* e *D. simulans* (KELLEHER *et al.*, 2012) e *D. buzzatti* e *D. koepferae* (ROMERO-SORIANO *et al.*, 2017). Nesses dois pares de espécies, em cujos híbridos ocorre intensa desregulação de TEs, o tempo de divergência está em torno de 1,2 a 5 (RUSSO *et al.*, 1995; KLIMAN *et al.*, 2000; TAMURA *et al.*, 2004; CUTTER, 2008) e 4,63 milhões de anos (GOMEZ; HASSON, 2003; LAAYOUNI *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012), respectivamente. Além disso, estudos anteriores evidenciaram que, diferentemente dos híbridos das espécies acima citadas, em híbridos fêmeas de *D. arizonae* e uma subespécie de *D. mojavensis*, não há intensa desregulação, mas sim a ativação de determinados TEs (LOPEZ-MAESTRE *et al.*, 2017). Mais especificamente, Lopes-Maestre *et al.* (2017), a partir da análise de expressão global de TEs mostraram que três

elementos se apresentaram superexpressos nos híbridos em relação aos parentais (*GTWIN*, *Copia1* e *Frogger*) e que a provável causa dessa desregulação foi a ausência de piRNAs correspondentes na linhagem materna, impedindo, portanto, o controle da transcrição. Os autores também encontraram, por análise global do transcriptoma, que em híbridos haviam alguns genes específicos, relacionados à reprodução e ao desenvolvimento, desregulados em relação aos parentais; contudo, análises para verificar se esses TEs estavam influenciando a desregulação desses genes não foram realizadas. Adicionalmente, Carnelossi *et al.* (2014) analisaram a expressão do elemento *I*, um retrotransposon sem LTR que está associado ao fenômeno de disgenesia híbrida em *D. melanogaster*, em tecidos germinativos de híbridos de *D. m. mojavenis* e *D. arizonae*. Os autores verificaram que os ovários dos híbridos, independente da direção do cruzamento parental, como também os testículos de híbridos parcialmente férteis, apresentaram níveis de expressão semelhantes aos parentais. No entanto, em testículos dos híbridos do cruzamento recíproco (fêmeas *D. arizonae* e machos de *D. mojavenis*), que são estéreis, houve maior expressão do elemento *I*, mais especificamente nos espermatozóitos primários, locais onde já foram detectados altos níveis de transcrição de genes codificadores de proteínas responsáveis pela espermatogênese, e de genes específicos da linhagem germinativa masculina (FULLER, 1998). Esses resultados sugeriram que, de alguma forma, a maior expressão desse TE poderia estar relacionada ao fenômeno de esterilidade observado.

Devido ao fato de *D. mojavenis* e *D. arizonae* estarem em processo recente de especiação, a investigação de mecanismos genéticos que podem levar ao isolamento reprodutivo, e o papel dos TEs nesse processo é relevante. Além disso, analisar descendentes de cruzamentos de *D. arizonae* com diferentes subespécies de *D. mojavenis*, as quais apresentam diferentes graus de incompatibilidade híbrida pode ampliar o entendimento dos fatores polimórficos que influenciam o surgimento de barreiras de isolamento reprodutivo. Adicionalmente, de acordo com Gomes *et al.* (2015), espécies que apresentam esterilidade híbrida assimétrica, como é o caso de *D. arizonae* e *D. mojavenis*, são candidatas ideais em estudos de isolamento

reprodutivo, visto que é possível comparar a expressão de sequências genéticas de híbridos estéreis com férteis e seus respectivos parentais.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu elaborar as seguintes conclusões:

1. Redução de viabilidade nos dois sexos em híbridos recíprocos provenientes de cruzamentos entre *D. arizonae* e quatro subespécies de *D. mojavensis* e esterilidade variável dos machos híbridos dependente da população materna de *D. mojavensis*, sugerem que os fatores que levam à incompatibilidade híbrida nesse par de espécies são polimórficos, os quais podem evoluir a diferentes taxas em cada população de *D. mojavensis*, dependendo de sua origem geográfica, isto é, se estão em simpatria ou em alopatria.
2. Machos híbridos sem espermatozoides móveis apresentaram diversos genes diferencialmente expressos, os quais eram, em sua maioria, subexpressos em relação à expressão gênica nos parentais, e tinham funções reprodutivas e de motilidade dos espermatozoides. No entanto, híbridos machos que possuíam espermatozoides móveis apresentaram menos genes diferencialmente expressos, os quais tinham diversas funções, como regulação e transcrição gênica. Esses resultados indicam que a motilidade espermática está relacionada ao grau de desregulação da expressão gênica que ocorre nesses híbridos.
3. Fêmeas híbridas apresentaram poucos genes diferencialmente expressos, concordando com fenótipo fértil, e sugerindo menor disrupção de elementos regulatórios. Em machos híbridos, a maior expressão diferencial de genes pode estar relacionada com a evolução mais rápida de sequências regulatórias, principalmente para genes exclusivamente expressos em testículos, bem como a incompatibilidade decorrente de alelos localizados no cromossomo X, uma vez que em machos, alelos que normalmente se expressam em condições de recessividade podem se comportar como dominantes devido ao fato de estarem em hemizigose.

4. Em fêmeas híbridas ocorre menor desregulação de TEs do que em machos híbridos, o que também pode ter um papel importante no fenótipo fértil e estéril, respectivamente, verificados nesses híbridos.
  
5. Diferentes mecanismos que envolvem a via de regulação de TEs atuam em ovários e testículos, uma vez que híbridos machos e fêmeas provenientes dos mesmos cruzamentos interespecíficos não apresentaram os mesmos TEs superexpressos.
  
6. Os mecanismos de silenciamento por meio das vias de piRNA e siRNAs se mostraram complexos em fêmeas e machos híbridos, uma vez que TEs que tinham piRNAs e siRNAs complementares não estavam regulados, estando superexpressos, sugerindo ocorrência de falhas em outros mecanismos de regulação, tais como divergência de expressão de genes envolvidos nas vias de regulação em machos híbridos. Isso indica que, em machos, assim como verificado em análises de expressão gênica, interações epistáticas de alelos com maior taxa de evolução ou expressão dominante podem contribuir para a desregulação de TEs.



## REFERÊNCIAS

- AKKOUCHE, A. *et al.* Maternally deposited germ-line piRNAs silence the *tirant* retrotransposon in somatic cells. **EMBO Rep**, v. 14, p. 458–464, 2013.
- ALONSO-PIMENTEL, H.; TOLBERT, L. P.; HEED, W. B. Ultrastructural examination of the insemination reaction in *Drosophila*. **Cell Tissue Res.**, v. 275, p. 467-479, 1994.
- ANTONIO SERRATO-CAPUCHINA, A.; MATUTE, D. R. The Role of Transposable Elements in Speciation. **Genes**, v. 9, n. 254, p. 1-29, 2018.
- ARTIERI, C. G., HAERTY, W. Association Between Levels of Coding Sequence Divergence and Gene Misregulation in *Drosophila* Male Hybrids. **J Mol Evol**, v. 65, n. 6, p. 697-704, 2007.
- BAACK, E. J.; WHITNEY, K. D.; RIESEBERG, L. H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species, **New Phytol**, v.167, n.2, p. 623–630, 2005.
- BARBASH, D. A. *et al.* A rapidly evolving MYB-related protein causes species isolation in *Drosophila*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 9, p. 5302–5307, 2003.
- BARBASH, D. A.; AWADALLA, P.; TARONE, A. M. Functional divergence caused by ancient positive selection of a *Drosophila* hybrid incompatibility locus. **PLoS Biol.** v. 2, p. 839–848, 2004.
- BARBASH, D. A.; LORIGAN, J. G. Lethality in *Drosophila melanogaster/Drosophila simulans* species hybrids is not associated with substantial transcriptional misregulation. **J Exp Zool B Mol Dev Evol.** v. 308, n. 11, p. 74-84, 2007.
- BINGHAM, P. M.; KIDWELL. M. G.; RUBIN, G. M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a Pstrain-specific transposon family. **Cell**, v. 29, n. 3, p. 995-1 004, 1982.
- BONO, J. M.; MARKOW, T. A. Post-zygotic isolation in cactophilic *Drosophila*: larval viability and adult life-history traits of *D. mojavensis/D. arizonae* hybrids. **J Evol Biol.**, v. 22, n. 7, p. 1387–1395, 2009.
- BRENNECKE J. *et al.* An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. **Science**, v. 322, p. 1387–1392, 2008.
- BRENNECKE, J. *et al.* Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**, v. 128, n. 6, 1089–103, 2007.
- BRIDEAU, N. J. *et al.* Two Dobzhansky–Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. **Science**, v. 314, n. 5803, p. 1292–5, 2006.
- CARARETO, C. M. A.; HERNANDEZ, E. H; VIEIRA, C. Genomic regions harboring insecticide resistance associated Cyp genes are enriched by transposable element fragments carrying putative transcription factor binding sites in two sibling *Drosophila* species. **Gene**, v. 537, n.1, p. 93-99, 2013.

CARNELOSSI, E. A. G. *et al.* Specific activation of an I-like element in *Drosophila* interspecific hybrids. **Genome Biology Evolution**. v. 6, n. 7, p. 1806–1817, 2014.

CASTILLO D. M. ; MOYLE, L. C. Transposable elements that cause dysgenesis also contribute to postzygotic isolation in the *Drosophila virilis* clade. **bioRxiv preprint first posted online**. Doi: <http://dx.doi.org/10.1101/753814>, 2019.

COYNE, J. A., ORR, H. A. “Patterns of speciation in *Drosophila*” revisited. **Evolution**, v. 51, n.1, p. 295–303, 1997.

COYNE, J. A.; ORTH, B. C.; ORR, H. Notes and comments Haldane's Rule revisited. **Evolution**, v. 45, n. 7, p. 1710—1714, 1991.

CUTTER A. D. Divergence times in *Caenorhabditis* and *Drosophila* inferred from direct estimates of the neutral mutation rate. **Mol Biol Evol**, v. 25, n. 4, p. 778–786, 2008.

DABOUSSI, M.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annu. Rev. Microbiol.** V. 57, p. 275–299, 2003.

DOBZHANSKY T. Speciation as a stage in evolutionary divergence. **Am Nat.**, v. 74, p. 312–321, 1940.

DOBZHANSKY, T. **Genetics and the Origin of Species**. Columbia Univ. Press, New York, 1937.

ETGES, W. J. *et al.* Inheritance of courtship song variation among geographically isolated populations of *Drosophila mojavensis*. **Animal Behaviour**, v. 71, p. 1205–1214, 2006.

FABIAN, L.; BRILL, J. A. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages. **Spermatogenesis**, v 2, n. 3, p. 197-212, 2012.

FABLET, M. *et al.* Dynamic interactions between the genome and an endogenous retrovirus: Tirant in *Drosophila simulans* Wild-Type Strains. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, 2019.

FABLET, M. Host Control of insect endogenous retroviruses: Small RNA silencing and immune response. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4447-64, 2014b.

FABLET, M. *et al.* **Self and Nonself from a Genomic Perspective: Transposable Elements**, p. 111-128, 2017 In: PONTAROTTI, P. Evolutionary Biology: Self/Nonself Evolution, Species and Complex Traits Evolution, Methods and Concepts, Springer, 2017.

FERREE, P. M.; BARBASH, D. A. Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. **PLoS Biol.**, v. 7, n. 10, e1000234, 2009.

FOSSELA, J. *et al.* An axonemal dynein at the Hybrid Sterility 6 locus: implications for T haplotype-specific male sterility and the evolution of species barriers Mammalian. **Genome**, v. 11, n. 1, p. 8-15, 2000.

FULLER, M. T. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. **Semin Cell Dev Biol**. v. 9, p. 433–444, 1998.

FUNIKOV, S. Y. *et al.* Spontaneous gain of susceptibility suggests a novel mechanism of resistance to hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. **PLOS Genetics**, p. 1-20, 2018.

GIRARD, A. *et al.* A germline-specific class of RNAs binds mammalian Piwi proteins. **Nature**, v. 442, p. 199-202, 2006.

GOMES S.; CIVETTA A. Misregulation of spermatogenesis genes in *Drosophila* hybrids is lineage-specific and driven by the combined effects of sterility and fast male regulatory divergence. **J Evol Biol.** v. 27, n. 9, p. 1775–1783. 2014.

GOMES, S.; CIVETTA, A. Hybrid male sterility and genome-wide misexpression of male reproductive proteases. **Scientific Reports**, v. 5: 11976, 2015.

GOMEZ, G.A.; HASSON, E. Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatii*. **Mol Biol Evol.** v. 20, n. 3, p.410–423, 2003.

GUERREIRO, M. P. Changes of *Oswaldo* expression patterns in germ-line of male hybrids between the species *Drosophila buzzatii* and *Drosophila koepferae*. **Mol. Genet. Genomics**, v. 290, n. 4, p.1471-83, 2015.

GUERREIRO, M. P. Interspecific hybridization as a genomic stressor inducing mobilization of transposable elements in *Drosophila*. **Mob Genet Elements**. v. 4, p. e34394-1-e34394-1, 2014.

HAERTY, W.; SINGH, R. S. Gene Regulation Divergence Is a Major Contributor to the Evolution of Dobzhansky–Muller Incompatibilities between Species of *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 9, p. 1707–14, 2006.

HALDANE, J. B. S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. **Journal of Genetics**. v.12, p. 101–109, 1922.

HARDY, R. W.; LOUGHEED, A. ; MARKOW, T. A. Reproductive tract and spermatid abnormalities of hybrid males from reciprocal crosses between *Drosophila mojavensis* and *D arizonae*. *Fly*, v. 5, n. 2, p. 76-80, 2011.

HEED, W. B. The origin of *Drosophila* in the Sonoran Desert. **In: Ecological Genetics and Evolution: The Cactus-Yeast-Drosophila Model System**. Ed: Academic Press, Sydney; p. 65–80, 1982.

HILL T.; SCHLOTTERER C.; BETANCOUT A. J. Hybrid Dysgenesis in *Drosophila simulans* associated with a rapid Invasion of the P-Element. **PLoS Genet.** v. 12, n. 3, p. e1005920, 2016.

HIRAKATA, S.; SIOMI, M. C. Assembly and Function of Gonad-Specific Non-Membranous Organelles in *Drosophila* piRNA Biogenesis. **Non-coding RNA** , v. 5, n. 52, 2019.

IPSARO, J. J. *et al.* The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 279–283, 2012.

IWASAKI, Y. W.; SIOMI, M. C.; SIOMI, H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. **Annu. Rev. Biochem**, v. 84, p. 405–33, 2015.

IWASAKI, Y. W. *et al.* Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. **Molecular Cell**, v. 63, n. 3, p. 408–419, 2016.

JENNINGS, J. H.; ETGES, W. J. Species hybrids in the laboratory but not in nature: a reanalysis of premating isolation between *Drosophila arizonae* and *D. mojavensis*. **The Society for the Study of Evolution**, v. 64, n. 2, p. 587–598, 2009.

JIANG, J.; WHITE-COOPER, H. Transcriptional activation in *Drosophila* spermatogenesis involves the mutually dependent function of aly and a novel meiotic arrest gene *cookie monster*. **Development**, v. 130, n. 3, p. 563–573, 2003.

JURKA, J. *et al.* Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet. Genome Res.** v. 110, p. 462–467, 2005.

KALMYKOVA, A. I.; KLENOV, M. S.; GVOZDEV, V. A. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 6, p. 2052–2059, 2005.

KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. **Nat. Rev. Genet.** v. 9, p. 411–412, 2008.

KARAK, S. *et al.* Diverse Roles of Axonemal Dyneins in *Drosophila* Auditory Neuron Function and Mechanical Amplification in Hearing. **Scientific Reports**, v. 5, p. 17085, 2015.

KARPOVA N. *et al.* Jupiter a New *Drosophila* Protein Associated With Microtubules. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 63, n. 5, p. 301–312, 2006.

KAWAKAMI, T. *et al.* Different Scales of *Tyl/copia*-like Retrotransposon Proliferation in the Genomes of Three Diploid Hybrid Sunflower Species. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 341–50, 2010.

KELLEHER, E. S.; EDELMAN, N. B.; BARBASH, D. A. *Drosophila* interspecific hybrids phenocopy piRNA-pathway mutants. **PLoS biology**, v. 10, n. 11, 2012.

KELLEHER, E. S.; MARKOW, T. A. Reproductive Tract Interactions Contribute to Isolation in *Drosophila*. **Fly**, v. 1, n. 1, p. 33–37, 2007.

KIDWELL, M. G.; KIDWELL, J. F.; SVED, J. A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: A syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. **Genetics**, v. 86, p. 813–833, 1977.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 1–24, 2001.

KLIMAN, R. M. *et al.* The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. **Genetics**, v. 156, n. 4, p. 1913–31, 2000.

KNOWLES, L. L.; MARKOW, T. A. Sexually antagonistic coevolution of a postmating-prezygotic reproductive character in desert *Drosophila*. **PNAS**, v. 98, n. 15, p. 8692–8696, 2001.

LAAYOUNI, H. *et al.* The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. XXXV. Inversion polymorphism and nucleotide variability in different regions of the second chromosome. **Mol**

**Biol Evol.** v. 20, n. 6, p. 931–944, 2003.

LABRADOR M. *et al.* Interspecific hybridization increases transposition rates of *Osvaldo*. **Mol Biol Evol.** v. 16, p. 931–937, 1999.

LACHAISE, D. *et al.* Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. P. 159-225, 1998 in HECHT, M. K.; WALLACE, B.; PRANCE, G. T. E. **Evolutionary Biology**, Springer, Boston, MA, v. 22, 1978.

LINDSLEY, D. L.; ROOTE, J.; KENNISON, J. A. *Anent* the genomics of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Plos One.** v. 8, n. 2, p. e55915, 2013.

LLOPART, A. *et al.* Support for the dominance theory in *Drosophila* Transcriptomes. **Genetics**, v. 210, n. 2, p. 703–718, 2018.

LLOPART A. The rapid evolution of X-linked male-biased gene expression and the large-X effect in *Drosophila yakuba*, *D. santomea*, and their hybrids. **Mol. Biol. Evol.**, v. 29, n. 12, p. 3873–3886, 2012.

LOPES, F. R. *et al.* Transcriptional activity, chromosomal distribution and expression effects of transposable elements in *Coffea* genomes. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. e78931, 2013.

LOPES, F. R. *et al.* Transposable elements in *Coffea* (Gentianales: Rubiaceae) transcripts and their role in the origin of protein diversity in flowering plants. **Molecular Genetics and Genomics.** v. 279, n. 4, p. 385-401, 2008.

LOPEZ-MAESTRE, H. *et al.* Identification of misexpressed genetic elements in hybrids between *Drosophila*-related species. **Scientific Report**, v. 7, n. 40618, 2017.

LUO, S. ; LU, J. Silencing of transposable elements by piRNAs in *Drosophila*: An evolutionary perspective. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 15, n. 3, p. 164–176, 2017.

MA, D.; MICHALAK, P. Ephemeral association between Gene CG5762 and hybrid male Sterility in *Drosophila* sibling species. **J. Mol. Evol.**, v. 73, n. 3-4, p.181–187, 2011.

MAINES, J. Z.; WASSEMAN, S. A. Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by Dazl orthologue Boule. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 171-9, 1999.

MALLET, J. Hybridization as an Invasion of the Genome. **Trends Ecol. Evol.**, v. 20, n. 5, p. 229-37, 2005.

MALONE C. D. *et al.* Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. **Cell**, v. 137, p. 522–535, 2009.

MAMUTE, D. R.; GAVIN-SMYTH, J.; LIU, G. Variable post-zygotic isolation *Drosophila melanogaster*/*D. simulans* hybrids. **J Evol Biol**, v. 27, n. 8, p. 1691-705, 2014.

MARKOW, T. A.; HOCUTT, G. D. **Reproductive Isolation in Sonoran Desert *Drosophila*: Testing the Limits of the Rules.** p. 234–244, 1998 in HOWARD, D. J.; BERLOCHER, S. H. *Endless forms: species and speciation.* Oxford Univ. Press, New York, 1998.

MARKOW, T.; ANKNEY, P. *Drosophila* males contribute to oogenesis in a multiple mating

species. **Science**, v. 224, p. 302—303, 1984.

MASLY, J. P. *et al.* Gene transposition as a cause of hybrid sterility in *Drosophila*. **Science**, v. 313, n. 5792, p. 1448–1450, 2006.

MASSIE, K. R.; MARKOW, T. A. Sympatry, allopatry and sexual isolation *between Drosophila mojavensis* and *D. arizonae*. **Hereditas**, v. 142, p. 51-55, 2005.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1963.

MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species**. Columbia Univ. Press, New York, 1942.  
MCBRIDE, C. S.; SINGER, M. C. Field Studies Reveal Strong Postmating Isolation between Ecologically Divergent Butterfly Populations. **PloS Biol.** v. 8, n. 10, 2010.

MCGIRR, J. A.; MARTIN, C. H. Hybrid gene misregulation in multiple developing tissues within a recent adaptive radiation of *Cyprinodon* pupfishes. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0218899, 2019.

MEIKLEJOHN, C. D. *et al.* Rapid Evolution of Male-Biased Gene Expression in *Drosophila*. **PNAS**, v. 100, n. 17, p. 9894-9899, 2003.

METCALFE, C. J. *et al.* Genomic instability within centromeres of interspecific marsupial hybrids. **Genetics**, v. 177, n. 4, p. 2507-2517, 2007

MICHALAK, P.; MA, D. The acylphosphatase (Acyp) alleles associate with male hybrid sterility in *Drosophila*. **Gene**, v. 416, n. 1-2, p. 61-65, 2008.

MICHALAK, P.; NOOR, M. A. Association of misexpression with sterility in hybrids of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. **J. Mol. Evol.**, v. 59, n. 2, p. 277–282, 2004.

MICHALAK, P.; NOOR, M. A. Genome-wide patterns of expression in *Drosophila* pure species and hybrid males. **Mol. Biol. Evol.**, v. 20, n. 7, p. 1070–6, 2003.

MOEHRING, A. J.; TEETER, K. C. ; Noor, M. A. F. Genome-wide patterns of expression in *Drosophila* pure species and hybrid males. II. Examination of multiple-species hybridizations, platforms, and life cycle stages. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 1, p. 137-145, 2007.

MULLER, H. J. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. **Biol. Symp.**, v. 6, 71–125, 1942.

O'NEILL, R. J.; O'NEILL, M. J.; GRAVES, J. A. Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodeling in an interspecific mammalian hybrid. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 68-72, 1998.

OLIVEIRA, D. C.S. G; *et al.* Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. **Mol Phylogenet Evol.** v. 64, n. 3, p. 533–544, 2012.

ORR, H. A.; MASLY, J. P.; PRESGRAVES, D. C. Speciation Genes. **Curr Opin Genet Dev.** v. 14, n. 6, p. 675-9, 2004.

ORR, H. A.; PRESGRAVES, D. C. Speciation by Postzygotic Isolation: Forces, Genes and Molecules. **Bioessays**, v. 22, n. 12, p. 1085-94, 2000.

ORSI, G. A. *et al.* *Drosophila* I-R hybrid dysgenesis is associated with catastrophic meiosis and abnormal zygote formation. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 3515-3524, 2010.

PANTAZIDIS, A. C., ZOUROS E. Location of an autosomal factor causing sterility in *Drosophila-mojavensis* males carrying the *Drosophila-arizonensis* Y-chromosome. **Heredity**, v. 60, p. 299–304, 1988.

PARISOD, C. *et al.* Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. **The New Phytologist**, v. 186, n. 1, p. 37-45, 2010.

PASYUKOVA E. *et al.* Germ line transposition of the copia retrotransposon in *Drosophila melanogaster* is restricted to males by tissue-specific control of copia RNA levels. **Mol Gen Genet**, v. 255, p. 115–124, 1997.

PATTERSON, J. T. A new type of isolating mechanism in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 32, p. 202-208, 1946.

PHADNIS, N. Genetic architecture of male sterility and segregation distortion in *Drosophila pseudoobscura* Bogota–USA hybrids. **Genetics**, v. 189, n. 3, p. 1001–1009, 2011.

PHADNIS, N.; ORR, H. A. A single gene causes both male sterility and segregation distortion in *Drosophila* hybrids. **Science**, v. 323, n. 5912, p. 376–379, 2008.

PICARD, G. Non-mendelian female sterility in *Drosophila melanogaster*: hereditary transmission of I factor. **Genetics**, v. 83, p. 107–123, 1976.

PIÉGU B.; BIRE S.; ARENSBURGER P. A survey of transposable element classification systems—a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 86, p. 90–109, 2015.

PRESGRAVES, D. C. The molecular evolutionary basis of species formation. **Nature Reviews Genetics**. v. 11, n. 3, p. 175-80, 2010.

PRESGRAVES, D. C.; STEPHAN, W. Pervasive adaptive evolution among interactors of the *Drosophila* hybrid inviability gene, *Nup96*. **Mol. Biol. Evol.** v. 24, n. 1, p. 306–314, 2007.

PRESGRAVES, D. *et al.* Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 715–719, 2003.

QUÉNERCH'DU, E.; ANAND, A.; KAI, T. The piRNA pathway is developmentally regulated during spermatogenesis in *Drosophila*. **RNA**, v. 22, n. 7, p.1044–1054, 2016.

RANZ J. M. *et al.* Sex-Dependent Gene Expression and Evolution of the *Drosophila* Transcriptome. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1742-5, 2003.

RASMUSSEN, K. *et al.* Family of Dynein Genes in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 5, n. 1, p. 45-55, 1994.

- REBOLLO, R. *et al.* A Snapshot of histone modifications within transposable elements in *Drosophila* wild type strains. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. e44253, 2012.
- REBOLLO, R. *et al.* Jumping genes and epigenetics: towards new species. **Gene**, 454, n. 1/2, p. 1-7, 2010.
- REED, L. K.; LAFLAMME, B. A.; MARKOW, T. A. Genetic architecture of hybrid male sterility in *Drosophila*: analysis of intraspecies variation for interspecies isolation. **Plos One**, v. 3, n. 8, p. e3076, 2008.
- REED, L. K.; MARKOW, T. A. Early events in speciation: polymorphism for hybrid male sterility in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 24, 9009-9012, 2004.
- REED, L. K.; NYBOER, M.; MARKOW, T. A. Evolutionary relationships of *Drosophila mojavensis* geographic host races and their sister species *Drosophila arizonae*. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1007-1022, 2006.
- RIESEBERG, L. H.; WILLIS, J. H. Plant speciation. **Science**, v. 317, p. 910–914, 2007.
- RIGAL, M.; MATHIEU, O. A “mille-feuille” of silencing: Epigenetic control of transposable elements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1809, n. 8, p. 452–458, 2011.
- ROMERO-SORIANO, V. *et al.* Transposable element misregulation is linked to the divergence between parental piRNA pathways in *Drosophila* Hybrids. **Genome Biol. Evol.** v. 9, n.6, p.1450–1470, 2017.
- ROMERO-SORIANO, V.; GARCIA GUERREIRO, M. P. Expression of the retrotransposon Helena reveals a complex pattern of TE deregulation in *Drosophila* hybrids. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147903, 2016.
- ROSS, C. L.; MARKOW T. A. Microsatellite variation among diverging populations of *Drosophila mojavensis*. **Journal Compilation European Society For Evolutionary Biology**, p. 1691–1700, 2006.
- RUIZ, A.; HEED, W. B. Host-plant specificity in the cactophilic *Drosophila mulleri* species complex. **Journal of Animal Ecology**. V. 57,n. 237–249, 1988.
- RUIZ, A.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M. Evolution of the mojavensis cluster of cactophilic *Drosophila* with descriptions of two new species. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 1, p.30-42, 1990.
- RUSSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 391–404, 1995.
- SANCHES-FLORES, A. *et al.* Genome evolution in three species of cactophilic *Drosophila*. **G3, Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, 2016.
- SATO, K.; SIOMI, M. C. The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells. **The Japan Academy**, v. 96, n. 1, p. 32-42, 2020.
- SATYAKI, P. R. V. *et al.* The Hmr and Lhr hybrid incompatibility genes suppress a broad range

of heterochromatic repeats. **PLOS Genetics**, v. 10, e1004240, 2014.

SAWAMURA, K. ; YAMAMOTO, M. T. Characterization of a reproductive isolation gene, zygotic hybrid rescue, of *Drosophila melanogaster* by using minichromosomes. **Heredity**, v. 79, p. 97–103, 1997.

SENTI, K. A.; JUCZAK, D.; SACHIDANANDAM, R.; BRENNECKE, J. piRNA-guided slicing of transposon transcripts enforces their transcriptional silencing via specifying the nuclear piRNA repertoire. **Genes & Development**, v. 29, p. 1747–176, 2015.

SIENSKI, G.; BATKI, J. SENTI, K. A. Silencio/CG9754 connects the Piwi–piRNA complex to the cellular heterochromatin machinery. **Genes e Development**, v. 14, n. 2258–2271, 2015.

SIENSKI, G.; DONERTAS, D.; BRENNECKE, J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and Maelstrom and its Impact on chromatin state and gene expression. **Cell**, v. 151, p. 964–980, 2012.

SLOTKIN, R.; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 272–285, 2007.

SONG, J. *et al.* Variation in piRNA and transposable element content in strains of *Drosophila melanogaster*. **Genome Biol. Evol.**, v. 6, n. 10, p. 2786–2798 2014.

STELKENS, R. B.; SCHMID C.; SEEHAUSEN O. Hybrid breakdown in cichlid fish. **PLoS ONE**, v. 10, n.5, p.e0127207, 2015.

TAMURA, K.; SUBRAMANIAN, S.; KUMAR, S. Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. **Mol Biol Evol.**, v. 21, p. 36–44, 2004.

TING, C. T. *et al.* A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. **Science**, 282, 5393:1501–1504, 1998.

TURISSINI, D. A. *et al.* The rate of evolution of postmating-prezygotic reproductive isolation in *Drosophila*. **Mol Biol Evol.**, v. 35, n. 2, p. 312–334, 2018.

VAN DE LAGEMAAT, L. N. *et al.* Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 10, p. 530–536, 2003.

VEDELEK, V. *et al.* Analysis of *Drosophila melanogaster* testis Transcriptome. **BMC Genomics**, v. 19, n. 697, 2018.

VELA, D. *et al.* A genome-wide survey of genetic instability by transposition in *Drosophila* hybrids. **PloS One**, v. 9, p. e88992, 2014.