

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Genoma mitocondrial de *Drosophila* y su aplicación en la construcción de  
filogenias**

**Monografía previa a la obtención del título de Biólogo**

**MARÍA LAZALETH ENCALADA HINOJOSA**

**Quito, 2025**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que la Monografía de Biología, de la Srta. María Lazalet Encalada Hinojosa ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Doris Vela

Quito, 10 de julio 2025

**DEDICATORIA**

A mis padres, Marco y Mariana mi más grande ejemplo de dedicación, esfuerzo y sacrificio, gracias por dejarme volar y también por permitirme volver al nido, a ustedes mi agradecimiento eterno. A mis hermanos Alex y Erick mis modelos a seguir siempre, gracias por ser mis compañeros de vida y aventuras. A Washington, parte fundamental de mi formación como Bióloga, gracias por la paciencia, la ayuda constante y todo el amor durante este camino. A mi tía Pili, ejemplo de fortaleza y bondad gracias por la ayuda desinteresada. A todos ustedes, mi gratitud por inspirarme a seguir adelante.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
<b>5. DESARROLLO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
5.1. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>Drosophila</i> .....	7
5.1.1. COMPOSICIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL .....	7
5.1.2. TAMAÑO Y VARIABILIDAD DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN <i>Drosophila</i>	9
5.1.3. FUNCIONES PRINCIPALES DE LOS GENES MITOCONDRIALES .....	11
5.2. REGIONES INFORMATIVAS PARA ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	14
5.2.1. GENES ALTAMENTE CONSERVADOS .....	14
5.2.2. GENES Y REGIONES VARIABLES .....	17
5.2.3. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE MARCADORES MITOCONDRIALES.	18
5.3. ANÁLISIS COMPARATIVO CON OTROS INSECTOS MODELO.....	19
5.3.1. COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DEL MITOGENOMA.....	19
5.3.2. EVOLUCIÓN DE LAS TASAS DE MUTACIÓN .....	22
5.4. EVALUACIÓN DEL USO DE MARCADORES MITOCONDRIALES EN FILOGENIA.....	23
5.4.1. VENTAJA DE LOS MARCADORES MITOCONDRIALES.....	23
5.4.2. LIMITACIONES Y PROBLEMAS POTENCIALES.....	26
5.4.3. COMPARACIÓN CON MARCADORES NUCLEARES .....	27
5.5. IMPLICACIONES EVOLUTIVAS Y TAXONÓMICAS DE LAS FILOGENIAS MITOCONDRIALES.....	32
5.5.1. RECONSTRUCCIÓN DE RELACIONES EVOLUTIVAS.....	32
5.5.2. CONSIDERACIONES SOBRE EVOLUCIÓN RETICULADA .....	35
5.6. IMPLICACIONES FUTURAS.....	36
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## 1. RESUMEN

El genoma mitocondrial de *Drosophila* se ha consolidado como una herramienta esencial en estudios de evolución, filogenia y conservación. Su estructura compacta, herencia materna, ausencia de recombinación y elevada tasa de mutación lo convierten en un marcador molecular particularmente útil. Este mitogenoma está compuesto por 37 genes funcionales, entre ellos 13 codificadores de proteínas, 2 de ARN ribosomal y 22 de ARN de transferencia, todos involucrados en procesos celulares fundamentales como la fosforilación oxidativa y la síntesis proteica mitocondrial. En estudios filogenéticos, los genes altamente conservados como *COI*, *COII* y *CytB* han demostrado ser eficaces para resolver relaciones profundas dentro del género, mientras que genes más variables como *ND5*, *ATP6* y regiones intergénicas permiten dilucidar divergencias recientes entre especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, fenómenos como la introgresión mitocondrial o la saturación de mutaciones pueden afectar la resolución de árboles evolutivos, lo que ha motivado la incorporación de marcadores nucleares como *EF-1 $\alpha$* , *28S rRNA* y elementos ultraconservados (UCEs) para fortalecer las inferencias. Comparaciones con otros insectos, como *Apis mellifera* o *Bombyx mori*, han revelado tanto similitudes estructurales como particularidades funcionales del mitogenoma de *Drosophila*, reafirmando su valor como organismo modelo. Además, el análisis mitocondrial ha contribuido significativamente a la biogeografía evolutiva, permitiendo reconstruir patrones históricos de dispersión y colonización, principalmente en especies insulares como las del archipiélago hawaiano. Finalmente, el desarrollo de herramientas moleculares avanzadas como el secuenciamiento de nueva generación, el metabarcoding ambiental (eDNA) y los análisis coalescentes refuerza el papel del genoma mitocondrial como un eje integrador para la investigación en biología evolutiva, genética poblacional y conservación de la biodiversidad.

## 2. ABSTRACT

The mitochondrial genome of *Drosophila* has emerged as a fundamental tool for evolutionary, phylogenetic, and conservation studies due to its compact structure, maternal inheritance, lack of recombination, and elevated mutation rate. Comprising 37 essential genes—including protein-coding genes, rRNAs, and tRNAs—the *Drosophila* mitogenome supports vital cellular processes such as oxidative phosphorylation and mitochondrial translation. Highly conserved genes (*COI*, *COII*, *CytB*) provide reliable markers for deep phylogenetic inference, while variable regions (*ND5*, *ATP6*, intergenic spacers) enhance resolution at shallow evolutionary scales. Phylogenetic studies have successfully reconstructed evolutionary relationships within the genus *Drosophila*, though challenges such as mitochondrial introgression and saturation in deeper nodes necessitate the complementary use of nuclear markers (e.g., *EF-1 $\alpha$* , 28S rRNA, UCEs). Structural comparisons with other insects, including *Apis mellifera* and *Bombyx mori*, reveal conserved genomic organization, reinforcing the utility of *Drosophila* as a model for mitogenomic analysis across Insecta. Beyond phylogenetics, mitochondrial data have proven instrumental in evolutionary biogeography by tracing colonization pathways and historical refugia, notably in insular taxa like the Hawaiian *Drosophila*. Moreover, mitogenomic analyses have been applied to define Evolutionarily Significant Units (ESUs), contributing to the conservation of genetically distinct lineages. The integration of mitogenomics with phylogenomics, coalescent-based methods, and high-throughput sequencing technologies—such as environmental DNA (eDNA) and metabarcoding—offers promising prospects for advancing biodiversity research, population monitoring, and informed conservation strategies.

### 3. INTRODUCCIÓN

*Drosophila* es uno de los modelos biológicos más significativos en las ciencias biológicas. Este género ha sido fundamental para comprender principios básicos de genética, desarrollo y biología celular. Algunos estudios ayudaron a revelar como se organizan los genes en cromosomas y como las mutaciones genéticas pueden utilizarse como herramientas para desentrañar los procesos biológicos complejos. Además, se conoce que sus genes y funciones biológicas están altamente conservadas en la evolución, lo que permite que hallazgos encontrados en las moscas sean relevantes para entender enfermedades humanas y el avance de las investigaciones en la biomedicina (Perrimon et al., 2016). Durante más de un siglo, *Drosophila* ha servido como organismo modelo para investigar el comportamiento, el desarrollo, la genética, la regulación génica y la neurobiología. Su popularidad se debe a su ciclo de vida corto, su facilidad y bajo costo de cultivo en laboratorio, y a la amplia disponibilidad de herramientas genéticas específicas para este género. Aunque se han descrito más de 3 000 especies de *Drosophila* (Remsen & O'Grady, 2002), la mayoría de los estudios se ha centrado en *D. melanogaster* y unas pocas especies adicionales, por lo que los datos de genética de poblaciones escasean en la mayor parte del género. Afortunadamente, en muchas de estas especies ya se ha reconstruido la filogenia combinando caracteres morfológicos y moléculas, lo que proporciona una base esencial para futuras investigaciones (Remsen & O'Grady, 2002). El género *Drosophila* está dividido en diez subgéneros, de los cuales los dos más numerosos—*Drosophila* y *Sophophora*—abarcan aproximadamente el 95 % de todas las especies descritas (Markow & O'Grady, 2005).

El género *Drosophila*, incluye más de 1600 especies con una diversidad morfológica, ecológica y de comportamiento significativa. Este género es uno de los más estudiados debido a su importancia evolutiva y su capacidad para adaptarse rápidamente a diferentes nichos ecológicos. La rápida diversificación de este género ha permitido avances en la

comprensión de relaciones filogenéticas complejas dentro de la familia (O'Grady & DeSalle, 2018).

Estas moscas han desempeñado un papel fundamental en los estudios evolutivos debido a sus características únicas. Una de sus contribuciones más destacadas ha sido en el área de la genómica poblacional. Investigaciones sobre *Drosophila melanogaster*, por ejemplo, han ayudado a desentrañar los roles de la mutación, la recombinación y la selección natural en el mantenimiento de la diversidad genética en las poblaciones. Además, la secuenciación del genoma completo de especies de *Drosophila* ha proporcionado valiosos conocimientos sobre cómo los procesos evolutivos dan forma a la variación genética y la adaptación a diversos desafíos ambientales (Casillas & Barbadilla, 2017; Markow, 2015).

Estos hallazgos son cruciales porque ofrecen una comprensión más profunda de cómo las especies evolucionan, se adaptan y mantienen la estabilidad genética a lo largo del tiempo. La creciente disponibilidad de datos genómicos de múltiples especies de *Drosophila* ha mejorado aún más nuestra capacidad para explorar los mecanismos moleculares que impulsan los cambios evolutivos, consolidando su importancia en la biología evolutiva (Dowling & Wolff, 2023b).

El ADN mitocondrial es el material genético presente en las mitocondrias, que son organelas clave para la conversión de energía en los eucariotas, aunque se asumía que la variación genética de este genoma sería en su mayoría neutral. Las investigaciones durante los últimos años han desafiado este supuesto y ahora se conoce que existen enfermedades mitocondriales e interacciones genéticas que al interactuar con el ADN nuclear influyen en la expresión génica (Dowling & Wolff, 2023).



El genoma mitocondrial es una herramienta clave en estudios filogenéticos debido a su estructura compacta, alta tasa de mutación y herencia materna. En el género *Drosophila*, el análisis de genes mitocondriales, como el *cytochrome oxidase I* (COI), ha demostrado ser especialmente útil para resolver relaciones evolutivas, permitiendo identificar patrones de divergencia entre especies y reconstruir linajes con gran precisión. Además, la conservación en la organización genómica y las características específicas del ADN mitocondrial, como su alto contenido en A+T, refuerzan su importancia como marcador molecular en este género (Garesse, 1988).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. GENERAL

Analizar el genoma mitocondrial de *Drosophila* y su utilidad en la construcción de filogenias, evaluando su relevancia para la comprensión de las relaciones evolutivas dentro del género y otras especies relacionadas.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1. Describir la estructura y las características del genoma mitocondrial de *Drosophila*.
- 4.2.2. Identificar las regiones del genoma mitocondrial más informativas para el análisis filogenético.
- 4.2.3. Analizar información de genomas de insectos modelo para su posterior comparación con el género *Drosophila*.
- 4.2.4. Evaluar el uso de marcadores mitocondriales en estudios filogenéticos y compararlos con otros marcadores moleculares nucleares.
- 4.2.5. Analizar las implicaciones evolutivas y taxonómicas de las filogenias obtenidas a partir del genoma mitocondrial.

## 5. DESARROLLO TEÓRICO

### 5.1. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE *Drosophila*

#### 5.1.1. COMPOSICIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial (mtDNA) de los animales ha conservado un papel crucial en el metabolismo aeróbico durante amplios periodos evolutivos incluso con los cambios radicales en el genoma nuclear y en la fisiología y ecología de los organismos (Boore, 1999; Saccone et al., 1999). En los animales el ADN mitocondrial es usualmente un genoma de tamaño compacto (de 15 a 20kb) que contiene 37 genes. Aunque en algunos casos se han identificado algunos más extensos, suele deberse a duplicaciones internas de segmentos de ADN mitocondrial y no a genes distintos (Boyce et al., 1989; Fuller & Zouros, 1993).

En los metazoos bilaterales el genoma mitocondrial, en general es altamente conservado, con similitudes en tamaño y en contenido de bases entre los taxones, formando un componente esencial en la colección genética de las células eucariotas (Nass, 1969; Sager R, 1972; Wallace, 1982). La mayoría de los genomas mitocondriales que se han encontrado tienen un set idéntico de genes con 22 ARN de transferencia (tRNAs), 2 unidades ribosomales (rRNAs) propios de la traducción en la mitocondria y 13 genes codificantes de proteínas que suministran componentes fundamentales del sistema de transporte de electrones que genera el ATP (Wolstenholme & Clary, 1985). El primer genoma de una especie de invertebrado que fue secuenciado completamente fue *Drosophila yakuba* (Clary et al., 1982; Wolstenholme & Clary, 1985). Mientras que la parte codificante del genoma de *Drosophila melanogaster* se secuenció poco tiempo después para posteriormente en 1995 obtener la secuencia completa (D. L. Lewis et al., 1995).

El genoma mitocondrial está compuesto por 37 genes funcionales que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la función mitocondrial. Entre estos genes, 13 codifican para proteínas relacionadas a la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Boore, 1999). La disposición de los genes dentro del genoma está altamente conservada, se ha identificado un orden ancestral para los 13 genes que codifican para las proteínas y los ribosomales (Adina M et al., 2009). La mayoría de los genes se encuentran codificados en una sola hebra, conocida como la hebra pesada o H-strand, otros como el gen *nad6* y ciertos tRNA se transcriben a partir de la hebra ligera o L-strand (S. C. Lewis et al., 2016).

La molécula circular de ADN de la mitcondria en *Drosophila*, específicamente en *D. yakuba* posee 16190 pares de bases, esta secuencia contiene los genes para moléculas de rRNA, y tRNA además de cinco polipéptidos (citocromo b, citocromo c, oxidasa subunidades I, II, III y una subunidad 6 de ATPasa) (Clary & Wolstenholme, 1984). La estructura presenta una alta densidad génica con intrones ausentes lo que hace que haya un uso eficiente del espacio genómico disponible (Clary & Wolstenholme, 1985a). Entre los espacios no codificantes, existe una región extensa denominada región de control, en donde se encuentran el origen de la replicación y los sitios de inicio de la transcripción o también conocida como región rica en A + T (Adina M et al., 2009).

En *Drosophila*, esta zona altamente repetitiva muestra una notable divergencia en secuencia y longitud entre diferentes especies del género convirtiéndolo en un marcador útil para estudios evolutivos y filogeográficos (Montooth et al., 2009a), en *D. melanogaster* se debe a inserciones y deleciones de repeticiones en tándem en la región de control. Esta dinámica mutacional característica brinda una oportunidad para comparar patrones de

variación en este marcador con los de otros marcadores con diferentes presiones mutacionales (Townsend & Rand, 2004). La región también contiene promotores, señales de terminación y sitios de unión para factores de replicación, debido a esto su variación puede tener efectos reguladores sobre la expresión génica mitocondrial (Gissi et al., 2008).

### 5.1.2. TAMAÑO Y VARIABILIDAD DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN *Drosophila*

El mitogenoma de las especies dentro del género *Drosophila* presenta una longitud que varía entre 15 000 y 19 500 pares de bases, dependiendo de la especie y de la presencia de regiones no codificantes. En el caso de *D. melanogaster* con 19 517 pb o en el de *D. yakuba* que contiene 16 019 pb (Clary & Wolstenholme, 1984, 1985a; Wolff et al., 2016). La razón de esta variabilidad en la longitud se debe a las diferencias en la región de control, la cuál es propensa a inserciones y deleciones (Clary & Wolstenholme, 1987a). Al comparar con los genomas mitocondriales de los vertebrados se observa que hay algunos genes ordenados diferente en *D. yakuba*. En ambos el sitio donde se origina la replicación se localiza dentro de una región de 800 np pero en el mtDNA de mamíferos solo cortas secciones de la región de origen de la replicación están altamente conservadas entre especies (Chang & Clayton, 1985; Walberg & Clayton, 1981).

En las moléculas de mtDNA de diferentes especies de *Drosophila* como se observa en la *Figura 1*, la región que contiene el origen de la replicación es considerablemente rica en adenina y timina, y varía ampliamente entre especies tanto en secuencia como en longitud (Fauron & Wolstenholme, 1976). Por ejemplo *D. virilis* 1 kb o *D. melanogaster* 5,1 kb, es importante mencionar que se han definido variantes de secuencia y longitud de regiones de origen ricas en A + T entre diferentes individuos de una misma especie y entre diferentes moléculas de ADN mitocondrial de una misma mosca (Fauron & Wolstenholme, 1980b,

1980a; Solignac et al., 1983). Se encontró que la región rica en A + T de *D. virilis* es de 1029 np y de *D. yakuba* es de 1077 np en donde dos secuencias en ambas especies son similares sugiriendo que estas secuencias han sido conservadas a partir de secuencias presentes en una mosca ancestral (Clary & Wolstenholme, 1987b).

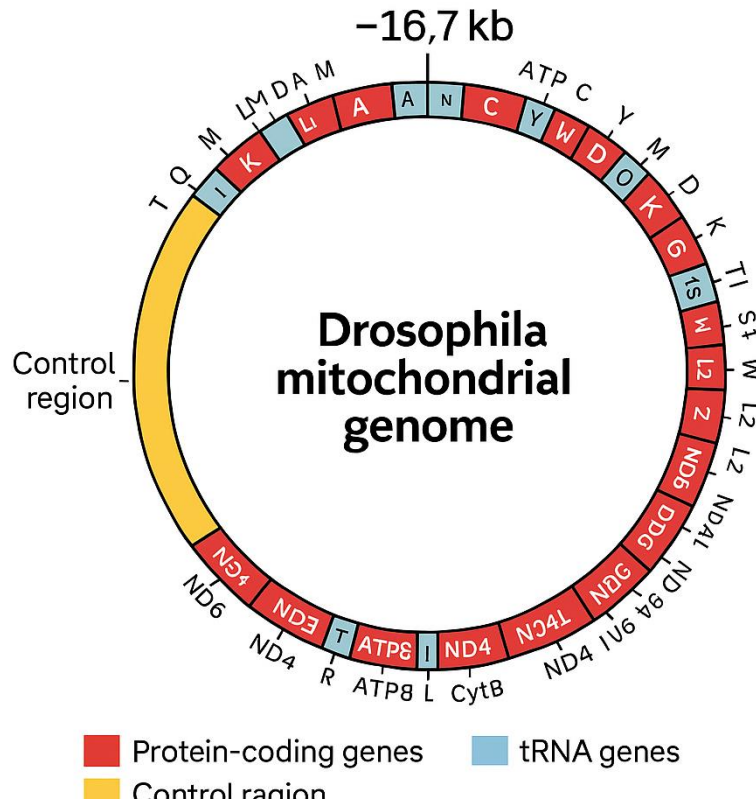


Figura 1 Mapa esquemático circular del genoma mitocondrial de *Drosophila melanogaster* mostrando genes codificantes, tRNAs y región A+T. Imagen generada con inteligencia artificial mediante ChatGPT/DALL-E (2025).

Durante varios años en estudios de variación y evolución de los mitogenomas se adoptaron dos suposiciones sobre la manera en la que cambia esta molécula, la primera es que se hereda del lado materno de los progenitores, es decir las moléculas son las mismas por lo tanto el individuo es homoplásico para el mtDNA, y en segundo es que las substituciones son más comunes que las otras mutaciones (Francisco et al., 1979; Lansman et al., 1983). Después se observaron varios casos de heteroplasmia en donde dos variantes de mtDNA ocurren en un individuo tanto en vertebrados como en invertebrados (Densmore et al., 1985). En poblaciones naturales de *D. melanogaster* es relativamente común la

variación del tamaño y la heteroplasmia del ADN mitocondrial comparándolo con sus sitios de restricción, se ha encontrado que de 92 isótipos femeninas de distintas regiones geográficas 17 eran heteroplásmicas (Hale & Singh, 1986).

Al compararlo con otras especies modelo, se han observado micro reordenamientos y variaciones en la secuencia entre especies, en *D.yakuba* 5 genes proteicos 2 genes de rRNA y 11 genes de tRNA están ordenados diferente en relación con genes adyacentes en las moléculas mitocondriales de los mamíferos específicamente de ratones, estas diferencias pueden estar dadas por translocaciones e inversiones, comparando los genomas se puede ver que 9 genes de tRNA han sido independientemente translocados durante la evolución (Clary & Wolstenholme, 1985b). Además 11 genes proteicos de *D.yakuba* se diferencian en tamaño con sus genes correspondientes de ratones ( menos del 3%), la deficiencia encontrada en los codones del extremo 5' del gen URF5 de *D.yakuba* comparándola con el gen URF5 del ratón es el primordial componente del 6% de una diferencia general entre los genes(Clary & Wolstenholme, 1985b).

### **5.1.3. FUNCIONES PRINCIPALES DE LOS GENES MITOCONDRIALES**

Las mitocondrias mantienen su propio genoma, evidenciando su origen bacteriano a lo largo de la evolución, la mayoría de las proteínas se sintetizan a partir de genes que se localizan en el núcleo, varias proteínas implicadas en la respiración celular, así como algunos tRNA se codifican por el ADN mitocondrial (Andersson et al., 1998) Para su adecuada formación es necesario que se regulen los genes nucleares y mitocondriales ya que ambos contribuyen a la producción de proteínas esenciales para que la cadena de respiración mitocondrial se ensamble y funcione de manera correcta (Anderson et al., 1981).

La respiración mitocondrial depende del oxígeno y permite establecer un gradiente de protones a través de la superficie expandida de las crestas mitocondriales. Este gradiente representado principalmente por un potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial es fundamental para llevar a cabo procesos clave como la producción de ATP, el movimiento de  $Ca^{2+}$  e iones, y la entrada de proteínas (Ryan & Hoogenraad, 2007). La fosforilación oxidativa es modulada a través de la interacción con las señales celulares de calcio, cuando las moléculas de calcio se transfieren hacia la matriz mitocondrial, actúa como una señal de aumento en la demanda energética, lo cual estimula la producción de energía al activar las enzimas clave que controlan la velocidad del ciclo del ácido cítrico (Jacobson & Duchon, 2004).

El genoma mitocondrial de *Drosophila* codifica genes esenciales para la producción de energía y también para la síntesis de proteínas dentro de la mitocondria, se dividen en 3 categorías principales: genes que codifican proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones, genes de RNA ribosómico (rRNA) y por último genes de RNA de transferencia (tRNA) (Clary & Wolstenholme, 1985b; Salinas et al., 2008; Wredenberg et al., 2002). Dentro del genoma existen 13 genes que codifican proteínas fundamentales para el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP. Las proteínas forman parte de los complejos I, II, III, IV, V de la fosforilación oxidativa, parte crucial para generar energía celular (J. W. O. Ballard et al., 2007; Clary & Wolstenholme, 1985b). Por ejemplo, los genes ND1 a ND6 y ND4L codifican subunidades del complejo I; el gen *cytb* forma parte del complejo III; los genes COI, COII y COIII están comprometidos en el complejo IV, y ATP6 y ATP8 participan en la alineación del complejo V o ATP sintasa (Clary & Wolstenholme, 1985b).

El complejo mitocondrial I también conocido como NADH: ubiquinona oxidoreductasa es una enzima importante en el metabolismo celular, necesario para la homeostasis del



NAD<sup>+</sup>, la respiración y la fosforilación oxidativa, es también un colaborador crucial para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) celulares (Hirst, 2013; Parey et al., 2020). La enzima responsable de la oxidación del NADH en la matriz mitocondrial, en conjunto con la reducción de la ubiquinona en la membrana interna, permite la regeneración de NAD<sup>+</sup>, una molécula principal para mantener activos procesos metabólicos fundamentales como el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación. Asimismo, este proceso genera equivalentes reductores necesarios para los siguientes pasos de la cadena de transporte de electrones. La energía liberada por esta reacción redox es utilizada para bombear cuatro protones hacia el espacio intermembranal, contribuyendo así al gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP (Jones et al., 2017).

El complejo III, conocido también como citocromo bc, interviene en la transferencia de electrones desde el ubiquinol, que es la forma reducida de la coenzima Q, hacia el citocromo c (proteína móvil que está localizada en el espacio intermembrana). Este proceso ocurre mediante el ciclo Q, que también transloca los protones al espacio intermembranal, ayudando a la generación del gradiente de protones para la síntesis del ATP. Después el citocromo c actúa como transportador y entrega los electrones al complejo IV (Hatefi, 1985; Klimova & Chandel, 2008).

El citocromo c (complejo IV) oxidasa es la enzima final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, responsable de transferir electrones del citocromo c al oxígeno, lo que permite la formación de agua. Este proceso también ayuda a la translocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, aumentando la eficiencia en la producción de energía (Rich, 2003).

Por último, las subunidades mitocondriales ATP6 y ATP8 desempeñan funciones esenciales en la síntesis del ATP, ya que forman parte integral del dominio transmembranal de la ATP sintasa, las subunidades codificadas por ADN mitocondrial son importantes para el ensamblaje y la funcionalidad del complejo (He et al., 2018). La subunidad ATP6 forma parte del canal de protones de la ATP sintasa, actuando como la subunidad "a", cuya función principal es permitir el flujo de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Este movimiento de protones crea la rotación del anillo de subunidades c, que es un proceso clave al activar la producción de ATP en el dominio catalítico  $F_1$  del complejo (He et al., 2018).

En *Drosophila* los genes de ARN ribosómico mitocondrial son el 12S rRNA (subunidad menor) y el 16S rRNA (subunidad mayor). Se ensamblan con proteínas que van desde el citosol para formar los ribosomas mitocondriales (Clary & Wolstenholme, 1985c).

## **5.2. REGIONES INFORMATIVAS PARA ANÁLISIS FILOGENÉTICO**

### **5.2.1. GENES ALTAMENTE CONSERVADOS**

Los genes que codifican proteínas mitocondriales usualmente evolucionan con rapidez y se saturan velozmente, debido a un sistema deficiente de reparación de errores de apareamiento o a una composición de bases ricas en A↔T (mutación de transversión). Y gracias a ello el mtDNA es una molécula útil para el análisis de alta resolución del proceso evolutivo (Brown et al., 1979a). Algunos genes mitocondriales como COI, COII y CytB se han solidificado como marcadores de elección para reconstruir relaciones evolutivas profundas gracias a la combinación de conservación de regiones ribosomales críticas y a la variabilidad suficiente en sitios sinónimos (Cameron, 2014; Hebert, Ratnasingham, et al., 2003; Irwin et al., 1991; C. Simon et al., 1994).

Investigaciones recientes han demostrado que la identificación de ADN basada en el gen mitocondrial del citocromo c oxidasa subunidad I (COI) contribuye eficazmente al estudio de la diversidad taxonómica en el reino animal. Se ha sugerido que, en casi todos los filos, las variaciones en las secuencias de COI son suficientes para diferenciar especies muy parecidas, debido a la rápida tasa de evolución de este gen en la mayoría de los grupos animales y a la baja variabilidad del ADN mitocondrial dentro de cada especie. Esta reducida variación intraespecífica refleja eventos de barridos selectivos que interactúan con el genoma nuclear (Hebert et al., 2003). El gen COII de mtDNA codifica la subunidad II del citocromo c oxidasa, que incluye el centro CuA responsable de recibir los electrones del citocromo c antes de transferirlos al hemo a<sub>3</sub>-CuB para la reducción de oxígeno (Fontanesi et al., 2006). En *Drosophila yakuba*, esa región abarca 681 pb, según el mapeo completo del mtDNA que fue publicado en 1985 (Clary & Wolstenholme, 1985b). Su tasa de evolución es intermedia —más rápida que la de muchos genes nucleares, pero algo menor que la de COI—, lo que lo hace particularmente útil tanto para filogenias profundas como para comparaciones entre géneros cercanos (C. Simon et al., 1994).

El gen CytB evoluciona más rápido que COI/COII, su longitud es de aproximadamente ~1 140 bp y las diferencias proporcionales entre regiones de alta y baja conservación lo convierten en un marcador eficaz para inferir filogenéticamente desde el nivel de género hasta el de orden. Este gen codifica una subunidad esencial del complejo III de la cadena de transporte de electrones, lo que le otorga una función biológica conservada, pero con suficiente variabilidad para análisis filogenéticos (Mindell et al., 1998). En estudios publicados hace varios años se demostró tempranamente su eficacia en teleósteos (Irwin et al., 1991), y su aplicabilidad se ha extendido exitosamente a artrópodos, incluyendo insectos como *Drosophila*, donde CytB aporta señales filogenéticas complementarias que ayudan a resolver discrepancias entre árboles construidos exclusivamente con COI (Simmons & Weller, 2001), se ha observado que la combinación de COI y CytB mejora la resolución de especies

crípticas, ya que mientras COI se satura más rápidamente en ramas profundas, CytB mantiene niveles de divergencia informativos en escalas más antiguas (Cameron et al., 2007) Estudios recientes también destacan que el uso de múltiples marcadores mitocondriales, incluyendo CytB, reduce errores sistemáticos derivados de la evolución convergente o de la saturación de sitios sinónimos (Rubinoff & Holland, 2005).

Debido a estas características los genes mitocondriales altamente conservados como COI, COII y CytB son fundamentales en el estudio de filogenias profundas en el género *Drosophila*, así como en diversos grupos de insectos. La conservación evolutiva de estos genes a lo largo de largas escalas temporales ha permitido realizar inferencias robustas sobre sus relaciones ancestrales, en especial entre linajes divergentes. Como se ha dicho estos genes codifican para componentes importantes dentro del sistema de transporte de electrones mitocondrial por lo tanto están sujetos a fuertes presiones de selección purificadora lo que ayuda a la reducción de su tasa de cambio y una alta señal filogenética en diferentes niveles taxonómicos(Boore, 1999; C. Simon et al., 1994) Se consideran útiles debido a su equilibrio entre conservación funcional y su ritmo evolutivo moderado, los mismos que permiten detectar divergencias a nivel de géneros y familias sin saturar las señales .Mandal et al., 2014).

Se han realizado estudios con el género *Drosophila*, particularmente en un análisis filogenético multigenico que usó COI, COII y CytB en mas de 200 especies de *Drosophila* expuso que estos genes altamente conservados conservan suficiente señal evolutiva para reconstruir eventos de diversificación profunda en el linaje, lo cual confirmaría su valor como herramientas para estudiar relaciones filogenéticas profundas dentro del género y entre géneros cercanos (Remsen & O'Grady, 2002). Y al compararlos con marcadores mas variables, los genes conservados son útiles en trabajos investigativos donde se busca

establecer las bases del árbol evolutivo, minimizar la saturación de cambios de nucleótidos y evitar la homoplasia, aunque es importante también complementar con genes más rápidos en estudios de especiación reciente para llegar a un equilibrio entre resolución y profundidad (Cameron, 2014).

### 5.2.2. GENES Y REGIONES VARIABLES

Dentro del mitogenoma del género *Drosophila*, ciertos genes como ND5 y ATP6 y regiones intergénicas presentan niveles de variabilidad superiores, lo que los hace marcadores útiles para analizar procesos evolutivos a escalas temporales medias y recientes a demás de escalas de tiempo largas. Por ejemplo, se ha observado que las secuencias del gen *ND5* en *D. melanogaster* y *D. simulans* muestran patrones de variabilidad que reflejan tanto deriva genética como posibles barridos selectivos, lo cual le otorga un valor informativo considerable en estudios filogeográficos (Rand et al., 1994) Asimismo, se ha documentado que las inserciones y deleciones en regiones intergénicas mitocondriales —como aquellas con repeticiones ricas en A+T— contribuyen significativamente a la diversidad genética intraespecífica e interespecífica en *Drosophila* (Nigro et al., 1991).

El gen ND5, que codifica una subunidad de la NADH deshidrogenasa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y ha sido identificado como uno de los componentes clave en las variaciones genéticas mitocondriales que afectan el fenotipo en *Drosophila melanogaster*. La diversidad en regiones que incluyen ND5 contribuye a las diferencias entre haplogrupos mitocondriales, los mismos que se han asociado con variaciones en funciones metabólicas, como la producción de energía y el metabolismo, fundamentales para la actividad locomotora y los patrones de sueño de los dípteros (Anderson et al., 1981; Lang et al., 1999). La evidencia sugiere que las mutaciones en genes como ND5 pueden alterar la eficiencia del metabolismo mitocondrial, lo que se refleja en cambios en comportamientos

relacionados con la energía, como el movimiento y el descanso, en función de las variaciones específicas en su secuencia (Lang et al., 1999).

Especialmente, las secuencias del gen *ND5* han sido estudiadas de forma extensa para evaluar la evolución neutral; un análisis comparativo de poblaciones de *D. melanogaster* y *D. simulans* reveló que el número de sitios variables en *ND5* cumple en general con las expectativas neutrales, aunque también presentaron posibles señales de barridos selectivos en *D. simulans* (J. W. Ballard & Kreitman, 1994). En *Drosophila melanogaster*, el gen *ATP6* presenta niveles inusualmente altos de polimorfismo de aminoácidos en comparación con especies hermanas como *D. simulans* y *D. mauritiana*, lo que sugiere cierto grado de relajación de restricción selectiva y potencial reparto de mutaciones neutrales específicas de *D. melanogaster* (J. W. Ballard & Kreitman, 1994; Rand et al., 1994).

Las regiones intergénicas del genoma mitocondrial que están localizadas entre los genes codificantes y los tRNAs, acumulan inserciones y deleciones (indels). Esto hace que se incremente la diversidad observada entre poblaciones de moscas del género y ha sido utilizado con éxito en los análisis filogeográficos de estudios recientes (Anderson et al., 1981).

### **5.2.3. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE MARCADORES MITOCONDRIALES**

#### **EVOLUCION NEUTRAL VS SELECCIÓN POSITIVA**

En *Drosophila*, la mayor parte del cambio en el ADN mitocondrial es resultado de la selección purificadora, que trabaja para mantener las funciones esenciales del organismo eliminando mutaciones dañinas (J. W. O. Ballard, 2000). Esto se refleja en la baja tasa de cambios en las proteínas y en la conservación de regiones clave, como las relacionadas con

la producción de energía, lo que indica que muchas mutaciones en esas áreas son eliminadas por la presión de la selección negativa. Sin embargo, también hay evidencia de que, en ciertos linajes y regiones del genoma, la selección positiva y las corridas evolutivas recurrentes pueden impulsar cambios que ayudan a la especie a adaptarse a diferentes condiciones ecológicas o fisiológicas. La existencia de mutaciones que, aunque en su mayoría dañinas, logran fijarse en la población, también muestra que procesos como la deriva genética, en conjunto con la selección, están moldeando la evolución mitocondrial de manera compleja (Kern & Kondrashov, 2004; Montooth et al., 2009b).

Por otro lado, la interacción entre mutaciones en el ADN mitocondrial y en el núcleo, junto con fenómenos como la deriva génica y las ventajas selectivas en ciertos contextos, crean una dinámica en la que tanto la eliminación de mutaciones dañinas como la incorporación de cambios adaptativos coexisten. Esto se relaciona con la coadaptación entre los genes nucleares y mitocondriales, que es fundamental para mantener la eficiencia metabólica en diferentes linajes y ambientes (J. W. O. Ballard, 2000). Es decir, la evolución del ADN mitocondrial no puede entenderse por separado de estos procesos, sino que resulta de un equilibrio entre fuerzas que actúan en diferentes niveles y en diferentes momentos de la historia evolutiva de las especies. Por tanto, la diversidad génica en las mitocondrias de *Drosophila* resulta de fuerzas evolutivas en conflicto y cooperación, aún en un sistema sin recombinación, resaltando la complejidad de su historia evolutiva (Montooth et al., 2009b).

### **5.3. ANÁLISIS COMPARATIVO CON OTROS INSECTOS MODELO**

#### **5.3.1. COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DEL MITOGENOMA**

El genoma mitocondrial de los insectos conserva en la mayoría de los casos una forma básica incluyendo 37 genes, 13 de los cuales son genes codificadores de proteínas (PCGs),

22 genes de tRNA y 2 genes de rRNA. También incluye una región no codificante rica en A+T. Pese a esta generalidad, existen variaciones en longitud, organización y contenido entre distintos órdenes de insectos (Cameron, 2014). Algunos de los genomas comparados se encuentran en la Tabla 1.

En *Drosophila*, orden Diptera, el mitogenoma posee una longitud aproximada de 19,517 pb con una organización altamente conservada que no tiene reordenamientos ni codones no convencionales. La región rica en A+T representa cerca del 78% del genoma total y la estructura es congruentemente estable (Clary & Wolstenholme, 1985b). En comparación con *Apis mellifera*, orden Hymenoptera, que tiene un mitogenoma de 16.343 pb, más compacto que *Drosophila* pero con múltiples reordenamientos de genes tRNA, además su región rica en A+T es una de las más amplias entre los insectos, cercana al 85%, lo que podría influir en la tasa de mutación y en la evolución de la estructura del genoma (Crozier & Crozier, 1993). Mientras que en el lepidóptero *Bombyx mori*, el famoso gusano de seda, el genoma mitocondrial presenta una longitud de 15 629 bp, y aunque posee el conjunto estándar de genes, este genoma se destaca por el uso de codones de inicio no canónicos como CGA para el gen COI y por una región de control con repeticiones en tándem (Zhang et al., 2016).

Por otro lado, el mosquito *Anopheles gambiae*, orden Diptera, cuenta con un mitogenoma con 15,363 bp, los elementos estructurales son en su mayoría similares a *Drosophila*, pero en su región de control presenta una variabilidad superior, lo que lo hace útil para diferencias linajes en estudios de evolución reciente (Beard et al., 1993). Entre coleopteros el escarabajo *Tribolium castaneum*, tiene un mitogenoma de 15 881 bp que mantiene el orden de genes ancestrales, la característica más notable es la relativa escasez de motivos de secuencia especiales en la región de control (Friedrich & Muqim, 2003). En el



saltamontes *Locusta migratoria*, la secuencia tiene una longitud de 15 722 bp y contiene 75.3% de regio rica en A+T, el valor más bajo entre los insectos comparados hasta el momento en este trabajo, por lo demás contiene un ordenamiento parecido a *Drosophila* (Flook et al., 1995). Por último, el hemíptero *Nilaparvata lugens* contiene una excepción importante en el orden conservado de los demás insectos. Su mitogenoma es de 17 619 bp y muestra una inversión única del gen trnQ, representando un reordenamiento poco común en los insectos que probablemente ocurrió por un proceso evolutivo específico dentro del grupo (Zhang KaiJun et al., 2013) .

**Tabla 1** Comparación del genoma mitocondrial de varios insectos de diferentes órdenes

ESPECIE	ORDEN	LONGITUD (bp)	REGIÓN RICA A+T (%)	REORDENAMIENTO	FUENTE
<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera	19 517	~ 78,6	No	(Clary & Wolstenholme, 1985b)
<i>Apis mellifera</i>	Himenóptera	16 343	~84,9	Sí (tRNAs)	(Crozier & Crozier, 1993)
<i>Bombyx mori</i>	Lepidóptera	15 629	~81,2	No	(Zhang et al., 2016)
<i>Anopheles gambiae</i>	Diptera	15 363	~82	Sí	(Beard et al., 1993)

<i>Tribolium castaneum</i>	Coleóptera	15 881	~76,6	No	(Friedrich & Muqim, 2003)
<i>Locusta migratoria</i>	Ortóptera	15 722	~74,2	No	(Flook et al., 1995)
<i>Nilaparvata lugens</i>	Hemíptera	17 619	~78,9	Prominente	(Zhang KaiJun et al., 2013)

### 5.3.2. EVOLUCIÓN DE LAS TASAS DE MUTACIÓN

La tasa de sustitución mitocondrial varía cuantiosamente entre especies de insectos y esta relacionada con la dinámica de la estructura del genoma. En un estudio realizado en el 2003, se analizó la correlación entre los reordenamientos genómicos y la tasa de sustitución de 20 genomas mitocondriales de insectos y los resultados muestran una correlación positiva ( $R^2= 0.73$ ,  $p= 0,01$ ) lo que indica que los insectos con mas reordenamientos en sus mitogenomas son los que tienen a acumular mutaciones genéticas con mayor rapidez (Shao et al., 2003).

En *Drosophila melanogaster*, se ha estimado una tasa de mutación puntual de  $\sim 6.2 \times 10^{-8}$  mutaciones por sitio por generación, esta tasa es aproximadamente diez veces mayor que la de los genes nucleares. Además, se ha observado un marcado sesgo de transiciones  $G \rightarrow A$  en  $\sim 70$  veces más frecuente que en el genoma nuclear (Haag-Liautard et al., 2008a). Estos hallazgos sugieren que la elevada tasa de mutación contribuye a una señal genética sólida para el análisis de poblaciones recientes sin alcanzar niveles críticos de

saturación evolutiva. Comparativamente insectos con distribución mitocondrial reorganizada como algunos psocópteros y hemípteros, es decir estos presentan tanto tasas más altas de mutación como un número considerable de sitios con microdeleciones (Shao et al., 2003). En contraste con especies como *Bombyx mori*, con una organización genómica mas conservada, muestran tasas de mutación inferiores, lo que limita su resolución en estudios de diversificación recientes (Zhang et al., 2016).

Estos análisis confirman que el género *Drosophila*, combina una organización genómica conservada con una alta dinámica mutacional, lo que lo convierte en un grupo ideal para realizar estudios de evolución rápida a nivel poblacional mientras que, en insectos con mayor reordenamiento presentan una evolución mitocondrial aún más acelerada, pues es el reflejo de presiones selectivas o aumentada tasa mutacional neutra (Haag-Liautard et al., 2008a; Shao et al., 2003).

#### **5.4. EVALUACIÓN DEL USO DE MARCADORES MITOCONDRIALES EN FILOGENIA**

##### **5.4.1. VENTAJA DE LOS MARCADORES MITOCONDRIALES**

##### **HERENCIA MATERNA Y AUSENCIA DE RECOMBINACIÓN**

La transmisión materna del genoma mitocondrial llama un filtro selectivo específico del sexo, por el cuál las mutaciones en el ADN mitocondrial solo generan una respuesta directa y adaptativa a la selección que actúa directamente sobre las hembras mientras que los machos representan un callejón sin salida evolutivo. Teóricamente, esto establece una presión selectiva diferenciada según el sexo, lo que posibilita que mutaciones perjudiciales se acumulen en el genoma mitocondrial si sus efectos negativos se manifiestan exclusivamente en los machos (Frank & Hurst, 1996; Gemmell et al., 2004; Innocenti et al., 2011). Cabe mencionar que hay estudios en los que se sugiere una posibilidad de transmisión

materna incompleta del mtDNA por la presencia de heteroplasma donde se mostraron evidencias de clara fuga paterna de mtDNA (Kondo et al., 1990).

La maldición materna, como es conocida esta dinámica, puede evitar la complejidad que genera un sistema haplotípico uniparental sin recombinación del ADN nuclear; esto permite reconstrucciones filogenéticas más claras, detalladas, precisas, amplias y lineales, especialmente en estudios de linajes femeninos y en análisis poblacionales complejos (Avice et al., 1987a). Además, al ser haploides, los marcadores mitocondriales tienen un tamaño efectivo de población más bajo que los autosomas, lo que provoca una coalescencia más rápida y mayor sensibilidad para detectar eventos demográficos recientes, ya que las mutaciones logran fijarse con más eficacia en poblaciones pequeñas o en expansión (J. W. O. Ballard & Whitlock, 2004).

Sin embargo, la herencia sin recombinación también puede facilitar el arrastre genético mitocondrial (genetic hitchhiking) en donde mutaciones beneficiosas por ejemplo en un gen de tRNA o proteína mitocondrial en un locus influyen en la frecuencia de todo el haplotipo, limpiando la diversidad mitocondrial y fijando nuevas variantes neutrales en poblaciones naturales, lo que puede distorsionar las interpretaciones filogenéticas (Hill, 2020).

### **ALTA TASA DE MUTACIÓN EFECTIVA PARA DELIMITAR ESPECIES**

El ADN mitocondrial evoluciona entre 5 y diez veces más rápido que el nuclear en animales, lo que se atribuye en parte a su proximidad a la cadena de transporte de electrones y mecanismos de reparación menos eficientes (Brown et al., 1979b). En *Drosophila melanogaster*, estudios de líneas de acumulación de mutaciones han estimado que la tasa puntual de mutación mitocondrial es aproximadamente diez veces superior a la de los loci

nucleares, reforzando su utilidad para detectar divergencias recientes y eventos demográficos a escalas cortas (Haag-Liautard et al., 2008b).

Esta rapidez en la acumulación de mutaciones, unida a la ausencia de recombinación, es la base del gran éxito del DNA barcoding: utilizar fragmentos del gen *COI* estándar ha permitido identificar correctamente más del 95 % de las especies en numerosos estudios de insectos. Se ha estimado que la identificación de especies fue correcta en el 98% de los casos puesto que las divergencias interespecíficas superaron consistentemente el 2% mientras que las intraespecíficas rara vez excedieron el 1% (Hebert, Cywinska, et al., 2003). Asimismo, genes aún más variables como *ND5* y *ATP6* ofrecen una resolución extra al analizar especies hermanas, la tasa media de sustituciones sinónimas en genes mitocondriales es aproximadamente 16 veces mayor que la de loci nucleares comparables. Esto siempre que se combinen con marcadores más estables para evitar la saturación (Oliveira et al., 2008).

## **SEÑAL CONSISTENTE Y ROBUSTA EN ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

La señal filogenética mitocondrial destaca por su firmeza y consistencia debido a la transmisión uniparental, la ausencia de recombinación y un orden génico muy conservado que reduce los conflictos marcadores. Varios estudios han demostrado que árboles filogenéticos generados a partir de distintos genes mitocondriales—como *COI*, *COII* y *CytB*—muestran altos niveles de congruencia tanto en relaciones profundas entre géneros como en divergencias más recientes dentro de *Drosophilidae* y otros órdenes de insectos. Esta coherencia persiste aún cuando se emplean metodologías diferentes (máximum likelihood, Bayesian inference), lo que refleja la robustez de la señal mitocondrial frente a artefactos como la homoplasia o las variaciones en tasas evolutivas entre linajes. Además, al compararse con filogenias construidas con datos nucleares, los mitogenomas a menudo

recuperan topologías muy similares, validando su utilidad para inferencias evolutivas en múltiples escalas temporales (Boore, 1999; Cameron, 2014; C. Simon et al., 1994).

#### 5.4.2. LIMITACIONES Y PROBLEMAS POTENCIALES

##### INTROGRESIÓN MITOCONDRIAL

La introgresión mitocondrial tiene lugar cuando el ADNmt de una especie se incorpora con el genoma de otra a través de hibridación y múltiples cruces, creando discordancias entre filogenias mitocondriales y nucleares. Este fenómeno se ha documentado en numerosos grupos de insectos, incluyendo dípteros como *Drosophila* y lepidópteros, y este fenómeno puede ocultar la verdadera historia evolutiva de los linajes estudiados (Toews & Brelsford, 2012). Por ejemplo, se han realizado estudios que en avifauna y anfibios donde evidencian casos de “captura” mitocondrial donde la señal mtDNA muestra patrones que visibilizan antiguos procesos hibernatorios en lugar de divergencias inter-especies, lo que obliga a realizar análisis con múltiples marcadores nucleares para validar sus conclusiones (Funk & Omland, 2003a).

Además de los ejemplos generales de captura de mitocondrias en vertebrados, hay documentación específica sobre la introgresión mitocondrial en insectos que demuestra su influencia en las filogenias. En el grupo de especies de *Anopheles gambiae*, se ha evidenciado a través de la secuenciación del mitogenoma que los haplotipos de mtDNA se intercambiaron entre especies estrechamente relacionadas en eventos de hibridación que ocurrieron hace menos de 100 mil años, lo que provocó discrepancias significativas entre los árboles mitocondriales y nucleares. De manera análoga, en ciertas mariposas del género *Heliconius* se ha registrado que la introgresión de mitogenomas entre *H. melpomene* y *H. timareta* resultó en una captura mitocondrial que oculta la verdadera historia de especiación

al utilizar únicamente datos de mtDNA. Estos casos muestran que, aunque el ADN mitocondrial ofrece una señal muy clara, es crucial complementarlo con marcadores nucleares para obtener una comprensión completa de los procesos evolutivos y evitar deducciones incorrectas basadas en un solo relato genómico (Fontaine et al., 2015; Salazar et al., 2010; Toews & Brelsford, 2012).

### **SATURACIÓN MUTACIONAL EN RAMAS PROFUNDAS**

Al comparar secuencias que son muy diferentes entre sí, los mismos lugares pueden sufrir varias sustituciones a lo largo del tiempo, lo que resulta en una saturación de mutaciones y una disminución gradual de la señal filogenética genuina. Este problema se observa claramente en genes mitocondriales que evolucionan rápidamente y en las posiciones del tercer codón, donde la acumulación de homoplasias puede dar lugar a agrupaciones erróneas entre linajes que no están relacionados. Philippe et al. (2011) señalan que este tipo de saturación impacta significativamente los nodos más antiguos en los árboles filogenéticos, y en esos casos, únicamente agregar más datos no mejora la claridad, sino que puede fortalecer inferencias incorrectas con un alto nivel de soporte estadístico. Por lo tanto, sugieren que es fundamental utilizar modelos evolutivos más avanzados y elegir marcadores menos saturados de manera cuidadosa para evitar reconstrucciones equivocadas, especialmente al inferir relaciones antiguas entre clados divergentes (Philippe et al., 2011).

#### **5.4.3. COMPARACIÓN CON MARCADORES NUCLEARES**

Se conocen dos posturas extremas respecto al uso de marcadores mitocondriales: una de ellas propone desechar el ADN mitocondrial ya que han existido casos aislados de filogenias incongruentes con marcadores nucleares, y la otra postura respalda el DNA barcoding, que es la utilización exclusiva de un fragmento pequeño de COI para identificar

toda la diversidad de especies. Los dos enfoques omiten que, tras varios años de investigación el ADN mitocondrial ha aportado valiosos datos y alcanza su máxima utilidad cuando se integra con información de ADN nuclear, morfología y otros caracteres biológicos, todo esto aprovechando su fortaleza en la resolución rápida de linajes recientes sin ignorar sus limitaciones en contextos de hibridación o saturación mutacional. Además la combinación de múltiples marcadores mitocondriales con loci nucleares permite validar los patrones filogenéticos y corregir problemas como la captura mitocondrial o las señales no verdaderas que pueden ser producidas por la homoplasia temprana (Rubinoff & Holland, 2005).

Los genes nucleares codificantes se han asociado cada vez más en estudios filogenéticos de insectos complementando a los marcadores mitocondriales clásicos como COI, 16S (Lin & Danforth, 2004). En general, los genes nucleares evolucionan más lentamente y con una composición de bases menos sesgada que los mitocondriales (Lin & Danforth, 2004), lo que los hace especialmente útiles para resolver divergencias profundas en las filogenias. En *Drosophila* estos marcadores han sido extensamente estudiados por ejemplo se ha reportado que este género de dípteros tiene dos copias paralelas de EF-1 $\alpha$  (también denominadas F1 y F2) con diferentes posiciones de intrones (Danforth & Ji, 1998), indicando sobre posibles confusiones filogenéticas si no se distinguen los parálogos, en general el EF-1 $\alpha$  es un gen nuclear altamente conservado a nivel de aminoácidos y es reconocido como un marcador prometedor para relaciones evolutivas de orden superior en insectos (Danforth & Ji, 1998; S. Simon et al., 2010).

El factor de elongación EF-1 $\alpha$  es una proteína involucrada en la traducción, su secuencia codificante evoluciona de manera lenta, y tanto la secuencia de ADN como la posición de intrones han demostrado ser de utilidad informativa para filogenias de insectos pterigotos (insectos voladores) (S. Simon et al., 2010). Se mostró que esta proteína aporta



caracteres valiosos en niveles intraordinales e interordinales concluyendo que las secuencias de EF-1 $\alpha$  y la ubicación de sus intrones proporcionan marcadores útiles para reconstruir la filogenia de insectos pterigotos (S. Simon et al., 2010). Se comparó a EF-1 $\alpha$  con genes mitocondriales como el 16S o el citocromo b además de ribosomales como el 28S en triatomíneos y se encontró que EF-1 $\alpha$  muestra un nivel de diversidad intermedio, pero resulta altamente informativo para la resolución de relaciones filogenéticas profundas como tribus o géneros (Díaz et al., 2016).

Algunas ventajas del factor de elongación EF-1 $\alpha$  son su alto nivel de conservación, lo que hace que su alineamiento sea más fácil, y la presencia de intrones en diferentes posiciones que aportan caracteres filogenéticos adicionales (S. Simon et al., 2010). Aparte de ser un marcador nuclear de un solo locus, da una estimación de la historia evolutiva independientemente de la herencia del ADN mitocondrial. Pese a sus ventajas, tiene también limitaciones, como su lenta tasa de sustitución que implica poca variabilidad en eventos muy recientes y la existencia de duplicados paralogénicos, como las copias de F1 y F2 en *Drosophila* y en abejas, haciendo que se puedan confundir los análisis filogenéticos (Danforth & Ji, 1998).

La proteína de histona H3 es otro de los marcadores nucleares que se emplean en la construcción de filogenias, sus genes codifican proteínas nucleosomales esenciales y se hallan en copias múltiples muy conservadas en los eucariotas, lo que permite alinear de forma confiable secuencias de H3 en taxones distantes. Se utilizaron ~4500 bp de datos nucleares que incluyen genes como 18S, 28S y H3, para inferir la filogenia de insectos del orden Phasmatodea y se obtuvieron topologías consistentes y bien soportadas (Stone & French, 2003). Mientras que en otro estudio se incorporaron datos de H# en un análisis de relaciones

entre artrópodos mayores y observaron que esta proteína de histona aporta caracteres adicionales en análisis concatenados (Colgan et al., 1998).

H3 evoluciona lentamente por lo que su potencial resolutivo es limitado, Colgan et al. (1998) señalaron que en los artrópodos estudiados los datos de la proteína mostraron un fuerte sesgo de uso de codones y un bajo índice de consistencia (CI=0,26), indicando un alto nivel de homoplasia. Lo que sugiere que el gen H3 por sí solo puede generar árboles filogenéticos débiles o que presenten incongruencias, esto si no se usa en conjunto con otros marcadores nucleares que aporten señales adicionales (Colgan et al., 1998). En resumen, H3 funciona como un marcador nuclear que se conserva (se alinea adecuadamente y carece de intrones en la zona codificante), sin embargo, su baja variabilidad restringe su capacidad para diferenciar clados recientes.(Colgan et al., 1998).

Los marcadores mitocondriales como COI, 16S o citocromo b, son populares en filogenias de insectos por su facilidad de amplificación con primers universales y por su rápida tasa de mutación. No obstante, si presentan claras diferencias con los genes nucleares como que evolucionan a una rapidez de 2-9 veces más rápido que los nucleares en insectos (Lin & Danforth, 2004). Su ritmo acelerado de mutación es ventajoso para resolver divergencias recientes pero conduce a una saturación en divergencias mayores a ~5-10 millones de años (Lin & Danforth, 2004). Asimismo, los genes mitocondriales suelen presentar un marcado sesgo de nucleótidos, es decir alto contenido de A/T en la tercera posición del codón, lo que aumenta la homoplasia (Lin & Danforth, 2004). Se observa en la *Tabla 2* las principales características y limitaciones tanto en genes nucleares como mitocondriales.

Tabla 2 Comparación entre genes mitocondriales y nucleares utilizados en estudios filogenéticos del género *Drosophila*.

<b>Gen</b>	<b>Origen</b>	<b>Función principal</b>	<b>Uso filogenético</b>	<b>Ventajas / Limitaciones</b>
COI	Mitocondrial	Subunidad de la citocromo c oxidasa (complejo IV)	Marcador universal, útil en filogenias profundas	Alta conservación; puede saturarse en divergencias antiguas
COII	Mitocondrial	Subunidad de la citocromo c oxidasa	Complementa a COI en filogenias	Buena resolución filogenética
CytB	Mitocondrial	Codifica citocromo b (complejo III)	Frecuente en genética de poblaciones	Moderada variabilidad; útil en divergencias intermedias
ND5	Mitocondrial	Subunidad del complejo I de la cadena respiratoria	Alta variabilidad; útil en especies cercanas	Elevada tasa de mutación
ATP6 / ATP8	Mitocondrial	Subunidades de ATP sintasa (complejo V)	Resolución de divergencias recientes	Sensibles a saturación; no siempre presentes
rrnS / rrnL	Mitocondrial	ARNr 12S y 16S	Útiles para linajes antiguos	Muy conservados; baja resolución en niveles bajos
EF-1 $\alpha$ (F1/F2)	Nuclear	Factor de elongación de la traducción	Usado en insectos; distingue copias paralogas	Alta resolución; requiere diferenciación F1/F2
28S rRNA	Nuclear	ARN ribosomal de subunidad grande	Relaciones profundas entre géneros	Conservado; baja variabilidad intraspecífica
Adh	Nuclear	Alcohol deshidrogenasa	Estudios de adaptación y evolución	Informativo pero rápidamente variable
Period	Nuclear	Ritmo circadiano	Filogenia del grupo repleta	Buena resolución en clados intermedios
Sensilla	Nuclear	Desarrollo de órganos sensoriales	Marcador complementario	Poco explorado aún
UCEs	Nuclear	Regiones ultraconservadas del genoma	Filogenómica moderna	Alta resolución; requiere secuenciación masiva

En *Drosophila*, los grupos de especies han sido analizados usando marcadores en combinación, como es el caso de la filogenia del grupo repleta que se ha estudiado usando genes mitocondriales junto con genes nucleares para mejorar la resolución filogenética. La filogenia de más de 60 especies de este grupo fue construida mediante un conjunto de cuatro fragmentos mitocondriales, los genes usados fueron COII, ND1 y 16S, y seis marcadores nucleares incluido EF-1 $\alpha$ , lo que colaboró para apoyar la monofilia del grupo y confirmar subdivisiones internas significativas (Durando et al., 2000). Finalmente, se ha registrado que en *D. repleta* y *D. buzzatii*, el locus *Adh* experimentó duplicaciones y reorganizaciones en los cromosomas, lo que dificulta su análisis filogenético, pero al mismo tiempo proporciona información adicional para comprender la evolución del grupo (Menotti-Raymond et al., 1991). Como resultado, la filogenia del grupo repleta suele fundamentarse en datos combinados de diversos genes mitocondriales y nucleares, equilibrando sus fortalezas (alta variabilidad mitocondrial) y debilidades (eventos de duplicación o reordenamientos nucleares), con el fin de aumentar la solidez y confiabilidad de las conclusiones evolutivas (Durando et al., 2000; Menotti-Raymond et al., 1991; Morán & Fontdevila, 2005).

## **5.5. IMPLICACIONES EVOLUTIVAS Y TAXONÓMICAS DE LAS FILOGENIAS MITOCONDRIALES**

### **5.5.1. RECONSTRUCCIÓN DE RELACIONES EVOLUTIVAS**

La reconstrucción de relaciones evolutivas utilizando secuencias mitocondriales en *Drosophila* emplea diversas técnicas filogenéticas que facilitan la inferencia de árboles filogenéticos precisos. Uno de los métodos más comunes es la máxima parsimonia, que busca la estructura con el menor número de cambios genéticos, aunque puede presentar limitaciones en áreas que presentan saturación o elevadas tasas de mutación (Gompel &

Carroll, 2003). No obstante, en investigaciones recientes predominan técnicas estadísticas como la máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana que modelan de forma clara los patrones de evolución molecular, permitiendo evaluar la credibilidad de los árboles generados a través de valores de probabilidad o posteriores (Arnold et al., 2014; Gao et al., 2011).

La máxima verosimilitud es especialmente valorada por su capacidad de incluir modelos complejos de sustitución de nucleótidos, lo que permite distinguir entre diferentes ritmos evolutivos en diversas partes del árbol filogenético. Por ejemplo, Oliveira y colaboradores (2012), utilizaron este método para analizar las relaciones en un grupo diverso, sugiriendo tiempos de divergencia precisos y patrones de radiación adaptativa (Oliveira et al., 2012). La inferencia bayesiana, en contraste, permite evaluar la probabilidad de diferentes árboles de manera simultánea y proporciona medidas de apoyo a través de valores probabilísticos, facilitando así la representación de la incertidumbre en las inferencias. Ambos métodos han sido cruciales para desentrañar la historia evolutiva en investigaciones sobre *Drosophila* y otros insectos (Arnold et al., 2014).

Es fundamental mencionar que distintas secciones del ADN mitocondrial, como COI, CYTB o ATPasa, pueden ofrecer diversas resoluciones dependiendo del nivel taxonómico en cuestión. La evaluación de estos marcadores, junto con modelos estadísticos adecuados, ayuda a esclarecer relaciones en diferentes escalas filogenéticas. Además, en los estudios que incluyen tiempos de divergencia, es indispensable el uso de relojes moleculares calibrados, basados en datos fósiles o eventos históricos, utilizando programas como BEAST o MrBayes para lograr estimaciones cronológicas fiables (Russo C A et al., 1995).

Sin embargo, también existen retos asociados a estos métodos, como la saturación de mutaciones, que puede restringir la resolución en períodos temporales más profundos y la

variabilidad en las tasas evolutivas en diferentes linajes. Además, podrían surgir discrepancias entre las filogenias mitocondriales y aquellas reconstruidas a partir de datos nucleares, debido a fenómenos como la hibridación o la introgresión. Por lo tanto, las estrategias actuales sugieren combinar datos mitocondriales con secuencias nucleares y análisis genómicos integrales, para lograr reconstrucciones filogenéticas más sólidas y precisas (Rosenfeld et al., 2012). El análisis filogenómico mitocondrial ha indicado que es fundamental reevaluar el sistema de clasificación habitual que se basa en morfología, puesto que ciertas especies presentan conexiones más cercanas de lo anticipado en función de su ubicación geográfica o rasgos reproductivos (P. M. O'Grady & DeSalle, 2018).

En *Drosophila*, estudios filogenéticos recientes han demostrado que el género *Lordiphosa*, tradicionalmente considerado externo al subgénero *Sophophora*, está filogenéticamente anidado dentro de este último, lo que evidencia la **parafilía de Sophophora** (Gao et al., 2011; Katoh et al., 2000). En una filogenia construida a partir de genomas mitocondriales completos, se propone incluir varias especies de *Lordiphosa* (como *clarofinis* y *magnipectinata*) dentro de *Sophophora*, reforzando la necesidad de una revisión taxonómica del grupo (DeSalle et al., 2022)

En definitiva, las técnicas estadísticas como máxima verosimilitud y bayesianas, junto con la utilización de diversas regiones mitocondriales, han facilitado la comprensión de la historia evolutiva de *Drosophila*, contribuyendo a la comprensión de su diversificación, biogeografía y tiempos de divergencia, aunque es esencial complementar estas investigaciones con otros datos genómicos y fenotípicos para mejorar la resolución y la fiabilidad de las inferencias filogenéticas (Oliveira et al., 2012; Rosenfeld et al., 2012; Russo C A et al., 1995).

### 5.5.2. CONSIDERACIONES SOBRE EVOLUCIÓN RETICULADA

La evolución reticulada es una idea clave para entender de qué manera las especies intercambian material genético a lo largo de su historia evolutiva, retando las ideas tradicionales de aislamiento completo. En el caso de *Drosophila yakuba* y *D. santomea*, la presencia de zonas de contacto, como la zona híbrida en São Tomé, evidencia la existencia de un flujo génico que ha reconocido la introgresión de ciertos loci, como el ADN mitocondrial y algunos genes nucleares (Llopart et al., 2005). Este intercambio de genes indica que la historia evolutiva de estas especies no ocurre de manera lineal, sino reticulada, donde la hibridación y la transferencia horizontal de genes contribuyen a su divergencia y adaptación, en lugar de la separación absoluta (Llopart et al., 2005; Mallet, 2007). La detección de signos de introgresión en algunos loci refuerza la idea de que la evolución puede seguir caminos enredados, enriqueciendo la diversidad genética y facilitando procesos adaptativos (Abbott et al., 2013; Llopart et al., 2005).

Este fenómeno plantea también desafíos importantes para las clasificaciones taxonómicas y las definiciones de las especies. Según Mayr (1996), las especies, bajo el concepto biológico, se consideran unidades de aislamiento reproductivo, pero los estudios genéticos recientes muestran que muchas especies no cumplen con este criterio rígido (Funk & Omland, 2003b; Mayr, 1996). La utilización de modelos de análisis de divergencia y flujo génico, como el modelo de aislamiento con migración, ha permitido identificar regiones específicas del genoma que intercambian genes entre poblaciones o especies, evidenciando redes reticulares de relaciones evolutivas (Nielsen & Wakeley, 2001). La reticulación genética en estos procesos puede favorecer el apareamiento de nuevas formas híbridas o ampliar la variabilidad, contribuyendo a la diversificación evolutiva dentro de ecosistemas naturales complejos (Abbott et al., 2013).

Es decir, la evolución reticulada tiene implicaciones en la dinámica de la especiación y en el proceso de adaptación. La transferencia de genes puede aportar variantes que incrementan la capacidad de adaptación de las poblaciones a nuevos hábitats o condiciones ambientales adversas, promoviendo la coexistencia y la formación de híbridos viables (Mallet, 2007). La evolución reticulada puede generar combinaciones génicas novedosas que deriven en especies híbridas con rasgos distintivos, incrementando la diversidad biológica; no obstante, también puede causar la dilución genética y la pérdida de la identidad de las especies que hibridan con frecuencia (Rhymer & Simberloff, 1996; Rieseberg et al., 1995). En esencia, la evolución reticulada es un proceso complicado que usa enfoques multidisciplinarios para lograr su comprensión ya que puede enriquecer o complicar la historia evolutiva de diversas especies, así como se ilustra en varios casos de *Drosophila* y otras especies de insectos en la naturaleza (Llopart et al., 2005).

## 5.6. IMPLICACIONES FUTURAS

El uso de genomas mitocondriales en *Drosophila* sigue abriendo nuevas vías para comprender cómo la historia evolutiva de las especies se entrelaza con la geografía y los cambios ambientales, a la vez que aporta herramientas prácticas para la conservación y el monitoreo ecológico (Avice et al., 1987b; Lapoint et al., 2013). El estudio del genoma mitocondrial en *Drosophila* ha brindado valiosas herramientas para explorar la biogeografía evolutiva, al vincular las variaciones en el ADN mitocondrial con procesos históricos y geológicos. A través de redes haplotípicas construidas con fragmentos como *COI* y *ND5*, se han identificado trayectorias de dispersión y antiguos refugios glaciales en linajes europeos del subgénero *Sophophora*, mostrando cómo ciertos haplotipos ancestrales quedaron aislados en zonas montañosas durante el Pleistoceno, recolonizando otras áreas tras el deshielo (Avice et al., 1987b; Schmidt et al., 2005). Además, el uso de relojes moleculares mitocondriales —con tasas de divergencia estimadas en ~1.5–2.3 % por millón de años— ha



facilitado fechar eventos de especiación relacionados con la formación del archipiélago hawaiano, donde diferentes linajes presentan divergencias marcadas en Kaua'i y múltiples colonizaciones en Hawai'i (Craddock & Kambysellis, 1997; Russo C A et al., 1995).

En el campo de la conservación biológica, el estudio del ADN mitocondrial en poblaciones aisladas de *Drosophila* ha demostrado ser clave para identificar Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), es decir, linajes genéticamente distintos que merecen atención especial. Un ejemplo concreto es el caso de *Drosophila grimshawi*, una especie endémica de Hawái, cuyo análisis genómico reveló grupos genéticos confinados a valles volcánicos de la Isla Grande. Esta información ha sido esencial para guiar esfuerzos de cría en cautiverio y restauración de hábitats prioritarios con el fin de conservar su diversidad genética (P. O'Grady & DeSalle, 2008). En investigaciones con *Drosophila subobscura*, el análisis de un fragmento del gen mitocondrial ND5 reveló patrones de diversidad genética compatibles con una expansión poblacional tras un cuello de botella que posiblemente ocurrió después de la última glaciación o de manera estacional (Castro et al., 2010). Este estudio describe dos haplotipos comunes (I y II) junto con variantes raras y endémicas, y concluye que los datos son más consistentes con un escenario de expansión post-cuello de botella que con selección neutral o continua (Avice et al., 1987b; Castro et al., 2010). Por lo tanto, se aporta evidencia de cómo eventos demográficos extremos—como veranos largos o inviernos intensos—pueden dejar huellas duraderas en la variabilidad mitocondrial, incluso dentro de poblaciones que se recuperan rápidamente después de ser afectadas (Castro et al., 2010).

La incorporación de métodos coalescentes avanzados, como los Bayesian skyline plots, permite reconstruir con detalle dinámicas poblacionales a lo largo del tiempo y evaluar respuestas demográficas a alta resolución (Drummond et al., 2005). Por otra parte, la combinación de datos mitocondriales con ultraconserved elements (UCEs) y SNPs nucleares

ofrece un enfoque filogenómico de genoma completo que reduce el sesgo de un solo marcador y fortalece la robustez de las inferencias evolutivas (Faircloth et al., 2012). El metabarcoding ambiental (eDNA) basado en fragmentos cortos de ADN mitocondrial se está consolidando como herramienta para evaluar la biodiversidad de comunidades de *Drosophila* y otros artrópodos sin muestreos destructivos, permitiendo monitorizar cambios en la estructura comunitaria en hábitats naturales o perturbados (Bista et al., 2018).

A futuro, combinar los datos de mitogenómica con la transcriptómica y la epigenómica en *Drosophila* nos permitirá entender de qué manera las variantes del ADN mitocondrial regulan la actividad de los genes y facilitan adaptaciones específicas a condiciones extremas. Este enfoque integrador será clave para diseñar estrategias de conservación que tengan en cuenta tanto la variación genética como los cambios funcionales que permiten a estas moscas sobrevivir y diversificarse en distintos ambientes (J. W. O. Ballard & Pichaud, 2014).

## 6. CONCLUSIONES

- 6.1. El análisis del genoma mitocondrial de *Drosophila* ha revelado que este tipo de ADN, debido a su herencia materna, falta de recombinación y alta tasa de mutación, constituye una herramienta poderosa para estudiar las relaciones evolutivas entre especies de este género (Boore, 1999; Wolstenholme & Clary, 1985).
- 6.2. El mitogenoma en *Drosophila* es altamente conservado en su organización y codificación, conteniendo 37 genes esenciales para funciones como la respiración celular y la síntesis proteica, lo que refuerza su valor como marcador filogenético confiable (Garesse, 1988; Montooth et al., 2009a).
- 6.3. La existencia de genes mitocondriales altamente conservados, como COI, COII y CytB, permite reconstruir filogenias profundas, mientras que regiones variables como ND5, ATP6 y las regiones intergénicas son útiles para resolver divergencias recientes, permitiendo una resolución jerárquica en distintos niveles taxonómicos (Simon et al., 1994; Cameron, 2014)(Cameron, 2014; C. Simon et al., 1994).
- 6.4. Comparaciones con otros insectos, como *Apis mellifera*, *Bombyx mori* y *Locusta migratoria*, evidencian tanto la conservación como la diversidad estructural del genoma mitocondrial en insectos, y posicionan a *Drosophila* como un modelo ideal por su equilibrio entre estabilidad estructural y variabilidad funcional (Crozier & Crozier, 1993; Zhang et al., 2016).
- 6.5. A pesar de sus ventajas, el uso exclusivo del ADN mitocondrial puede llevar a inferencias erróneas debido a problemas como la introgresión mitocondrial o la saturación mutacional en ramas profundas del árbol filogenético. Esto justifica la

necesidad de combinarlo con marcadores nucleares como EF-1 $\alpha$ , 28S rRNA y UCEs, que ayudan a equilibrar las fortalezas y limitaciones de cada tipo de marcador (Durando et al., 2000; Lin & Danforth, 2004).

- 6.6. La evolución reticulada detectada en algunos linajes de *Drosophila* refleja una compleja red de relaciones filogenéticas, en la que la hibridación, la introgresión y el flujo génico desafían los modelos tradicionales de especiación. Estos procesos no solo enriquecen la diversidad genética sino que también reconfiguran los límites entre especies (Abbott et al., 2013; Llopart et al., 2005).
- 6.7. La aplicación de genomas mitocondriales en estudios de biogeografía ha permitido rastrear eventos históricos de dispersión, colonización y refugios glaciales en linajes de *Drosophila*, como los de las islas hawaianas o regiones montañosas europeas, demostrando la utilidad del ADNmt para reconstruir historias evolutivas en contextos geográficos complejos (Craddock & Kambysellis, 1997; Schmidt et al., 2005).
- 6.8. Desde la conservación, el ADN mitocondrial ha sido fundamental para identificar Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), linajes genéticamente distintos con prioridades de manejo. Esto ha sido aplicado exitosamente en especies endémicas como *Drosophila grimshawi*, apoyando estrategias de conservación en hábitats insulares vulnerables (P. O'Grady & DeSalle, 2008).
- 6.9. La incorporación de metodologías filogenómicas como el uso de UCEs, SNPs y análisis bayesianos coalescentes ha fortalecido la precisión de las inferencias filogenéticas en *Drosophila*, permitiendo entender patrones demográficos y eventos de especiación con mayor resolución (Drummond et al., 2005; Faircloth et al., 2012).

- 6.10. Para finalizar, la amplia disponibilidad de herramientas moleculares en *Drosophila*, junto con el creciente acervo de datos mitogenómicos y nucleares, seguirá posicionando a este género como un modelo de referencia para los estudios evolutivos, ecológicos y de conservación a nivel global (Perrimon et al., 2016b; Remsen & O'Grady, 2002).

## 7. RECOMENDACIONES

- 7.1. Se recomienda ampliar los estudios mitogenómicos en especies poco exploradas del género *Drosophila*, especialmente aquellas distribuidas en regiones tropicales y endémicas, donde la diversidad genética aún no está completamente documentada.
- 7.2. Es fundamental integrar análisis multilocus (ADNmt + ADN nuclear) y enfoques filogenómicos en los estudios filogenéticos para obtener resultados más robustos y evitar errores derivados de procesos como la introgresión.
- 7.3. Se sugiere fomentar la aplicación del ADN mitocondrial en programas de conservación para especies amenazadas o con distribución restringida, particularmente en islas y hábitats fragmentados, donde el análisis genético puede orientar decisiones de manejo.
- 7.4. Sería valioso incorporar análisis de dinámica poblacional mediante herramientas coalescentes para entender cómo eventos ambientales (como el cambio climático) afectan la estructura genética de las poblaciones de *Drosophila*.
- 7.5. Finalmente, se alienta el uso de tecnologías emergentes como el metabarcoding y el secuenciamiento de nueva generación para expandir el conocimiento de la biodiversidad de *Drosophila* en hábitats naturales y disturbados por los humanos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., ... Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation\*. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229–246. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>
- Adina Mwinyi, Achim Meyer, Christoph Bleidorn, Bernhard Lieb, & Thomas Bartolomaeus. (2009). Mitochondrial genome sequence and gene order of *Sipunculus nudus* give additional support for an inclusion of Sipuncula into Annelida. *BMC Genomics*, 27.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A.-S., Winkler, H. H., & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396(6707), 133–140. <https://doi.org/10.1038/24094>
- Arnold, C. D., Gerlach, D., Spies, D., Matts, J. A., Sytnikova, Y. A., Pagani, M., Lau, N. C., & Stark, A. (2014). Quantitative genome-wide enhancer activity maps for five *Drosophila* species show functional enhancer conservation and turnover during cis-regulatory evolution. *Nature Genetics*, 46(7), 685–692. <https://doi.org/10.1038/ng.3009>
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987a). INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987b). INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>
- Ballard, J. W., & Kreitman, M. (1994). Unraveling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila*. *Genetics*, 138(3), 757–772. <https://doi.org/10.1093/genetics/138.3.757>
- Ballard, J. W. O. (2000). When One Is Not Enough: Introgression of Mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1126–1130. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026394>
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G., Katewa, S. D., & Maas, K. (2007). MITOCHONDRIAL DNA VARIATION IS ASSOCIATED WITH MEASURABLE DIFFERENCES IN LIFE-HISTORY TRAITS AND MITOCHONDRIAL METABOLISM IN *DROSOPHILA SIMULANS*. *Evolution*, 61(7), 1735–1747. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00133.x>
- Ballard, J. W. O., & Pichaud, N. (2014). Mitochondrial DNA : more than an evolutionary bystander. *Functional Ecology*, 28(1), 218–231. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12177>

- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, *13*(4), 729–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
- Beard, C. B., Hamm, D. M., & Collins, F. H. (1993). The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, *2*(2), 103–124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x>
- Bista, I., Carvalho, G. R., Tang, M., Walsh, K., Zhou, X., Hajibabaei, M., Shokralla, S., Seymour, M., Bradley, D., Liu, S., Christmas, M., & Creer, S. (2018). Performance of amplicon and shotgun sequencing for accurate biomass estimation in invertebrate community samples. *Molecular Ecology Resources*, *18*(5), 1020–1034. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12888>
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, *27*(8), 1767–1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>
- Boyce, T. M., Zwick, M. E., & Aquadro, C. F. (1989). Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, *123*(4), 825–836. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.4.825>
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979a). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(4), 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979b). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(4), 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Cameron, S. L. (2014). Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny. *Annual Review of Entomology*, *59*(1), 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162007>
- CAMERON, S. L., LAMBKIN, C. L., BARKER, S. C., & WHITING, M. F. (2007). A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Systematic Entomology*, *32*(1), 40–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.00355.x>
- Casillas, S., & Barbadilla, A. (2017). Molecular Population Genetics. *Genetics*, *205*(3), 1003–1035. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.196493>
- Castro, J. A., Barrio, E., González, A., Picornell, A., Ramon, M. M., & Moya, A. (2010). Nucleotide diversity of a ND5 fragment confirms that population expansion is the most suitable explanation for the mtDNA haplotype polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, *138*(8), 819–829. <https://doi.org/10.1007/s10709-010-9464-x>
- Chang, D. D., & Clayton, D. A. (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(2), 351–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.351>
- Clary, D. O., Goddard, J. M., Martin, S. C., Fauron, C. M., & Wolstenholme, D. R. (1982). *Drosophila* mitochondrial DNA: a novel gene order. *Nucleic Acids Research*, *10*(21), 6619–6637. <https://doi.org/10.1093/nar/10.21.6619>
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1984). The *Drosophila* mitochondrial genome. *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes*, *1*, 1–35.
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1985a). The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code.



- Journal of Molecular Evolution*, 22(3), 252–271.  
<https://doi.org/10.1007/BF02099755>
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1985b). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22(3), 252–271.  
<https://doi.org/10.1007/BF02099755>
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1985c). The ribosomal RNA genes of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 13(11), 4029–4045.  
<https://doi.org/10.1093/nar/13.11.4029>
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1987a). *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A + T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 25(2), 116–125. <https://doi.org/10.1007/BF02101753>
- Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1987b). *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A + T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 25(2), 116–125. <https://doi.org/10.1007/BF02101753>
- Colgan, D. J., McLauchlan, A., Wilson, G. D. F., Livingston, S. P., Edgecombe, G. D., Macaranas, J., Cassis, G., & Gray, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, 46(5), 419. <https://doi.org/10.1071/ZO98048>
- Craddock, E. M., & Kambysellis, M. P. (1997). *Adaptive radiation in the Hawaiian Drosophila (Diptera: Drosophilidae): Ecological and reproductive character analyses*.
- Crozier, R. H., & Crozier, Y. C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133(1), 97–117. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.1.97>
- Danforth, B. N., & Ji, S. (1998). Elongation factor-1 alpha occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of EF-1 alpha sequences in insects. *Molecular Biology and Evolution*, 15(3), 225–235.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025920>
- Densmore, L. D., Wright, J. W., & Brown, W. M. (1985). Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*). *Genetics*, 110(4), 689–707.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/110.4.689>
- DeSalle, R., Sara, O., & O'Grady, P. M. (2022). Whole mitochondrial genome phylogeny of Drosophilidae. *Mitochondrial DNA Part A*, 33(1–8), 1–9.  
<https://doi.org/10.1080/24701394.2023.2295247>
- Díaz, S., Triana-Chávez, O., & Gómez-Palacio, A. (2016). The nuclear elongation factor-1 $\alpha$  gene: a promising marker for phylogenetic studies of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 274–280.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.010>
- Dowling, D. K., & Wolff, J. N. (2023a). Evolutionary genetics of the mitochondrial genome: insights from *Drosophila*. *GENETICS*, 224(3).  
<https://doi.org/10.1093/genetics/iyad036>
- Dowling, D. K., & Wolff, J. N. (2023b). Evolutionary genetics of the mitochondrial genome: insights from *Drosophila*. *GENETICS*, 224(3).  
<https://doi.org/10.1093/genetics/iyad036>
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences.

- Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1185–1192.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msi103>
- Durando, C. M., Baker, R. H., Etges, W. J., Heed, W. B., Wasserman, M., & DeSalle, R. (2000). Phylogenetic Analysis of the repleta Species Group of the Genus *Drosophila* Using Multiple Sources of Characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(2), 296–307. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0824>
- Faircloth, B. C., McCormack, J. E., Crawford, N. G., Harvey, M. G., Brumfield, R. T., & Glenn, T. C. (2012). Ultraconserved Elements Anchor Thousands of Genetic Markers Spanning Multiple Evolutionary Timescales. *Systematic Biology*, 61(5), 717–726. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys004>
- Fauron, C. M., & Wolstenholme, D. R. (1976). Structural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within the genus *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10), 3623–3627. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3623>
- Fauron, C. M., & Wolstenholme, D. R. (1980a). Extensive diversity among *Drosophila* species with respect to nucleotide sequences within the adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules. *Nucleic Acids Research*, 8(11), 2439–2452. <https://doi.org/10.1093/nar/8.11.2439>
- Fauron, C. M., & Wolstenholme, D. R. (1980b). Intraspecific diversity of nucleotide sequences within the adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Nucleic Acids Research*, 8(22), 5391–5410. <https://doi.org/10.1093/nar/8.22.5391>
- Flook, P. K., Rowell, C. H. F., & Gellissen, G. (1995). The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 41(6), 928–941. <https://doi.org/10.1007/BF00173173>
- Fontaine, M. C., Pease, J. B., Steele, A., Waterhouse, R. M., Neafsey, D. E., Sharakhov, I. V., Jiang, X., Hall, A. B., Catteruccia, F., Kakani, E., Mitchell, S. N., Wu, Y.-C., Smith, H. A., Love, R. R., Lawnczak, M. K., Slotman, M. A., Emrich, S. J., Hahn, M. W., & Besansky, N. J. (2015). Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics. *Science*, 347(6217), 1258524. <https://doi.org/10.1126/science.1258524>
- Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., & Barrientos, A. (2006). Assembly of mitochondrial cytochrome c -oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(6), C1129–C1147. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00233.2006>
- Francisco, J. F., Brown, G. G., & Simpson, M. V. (1979). Further studies on types A and B rat mtDNAs: cleavage maps and evidence for cytoplasmic inheritance in mammals. *Plasmid*, 2(3), 426–436. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(79\)90026-x](https://doi.org/10.1016/0147-619x(79)90026-x)
- Frank, S. A., & Hurst, L. D. (1996). Mitochondria and male disease. *Nature*, 383(6597), 224–224. <https://doi.org/10.1038/383224a0>
- Friedrich, M., & Muqim, N. (2003). Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(3), 502–512. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00335-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00335-4)
- Fuller, K. M., & Zouros, E. (1993). Dispersed discrete length polymorphism of mitochondrial DNA in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Current Genetics*, 23(4), 365–369. <https://doi.org/10.1007/BF00310901>

- Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003a). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003b). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Gao, J., Hu, Y., Toda, M. J., Katoh, T., & Tamura, K. (2011). Phylogenetic relationships between Sophophora and Lordiphosa, with proposition of a hypothesis on the vicariant divergences of tropical lineages between the Old and New Worlds in the family Drosophilidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.04.012>
- Garesse, R. (1988). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics*, 118(4), 649–663. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.649>
- Gemmell, N. J., Metcalf, V. J., & Allendorf, F. W. (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.02.002>
- Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4), 301–320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62>
- Gompel, N., & Carroll, S. B. (2003). Genetic mechanisms and constraints governing the evolution of correlated traits in drosophilid flies. *Nature*, 424(6951), 931–935. <https://doi.org/10.1038/nature01787>
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., & Keightley, P. D. (2008a). Direct Estimation of the Mitochondrial DNA Mutation Rate in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biology*, 6(8), e204-. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060204>
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., & Keightley, P. D. (2008b). Direct Estimation of the Mitochondrial DNA Mutation Rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6(8), e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060204>
- Hale, L. R., & Singh, R. S. (1986). Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8813–8817. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8813>
- Hatefi, Y. (1985). THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 1015–1069. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>
- He, J., Ford, H. C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2018). Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(12), 2988–2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species.

- Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl\_1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hill, G. E. (2020). Genetic hitchhiking, mitonuclear coadaptation, and the origins of mt DNA barcode gaps. *Ecology and Evolution*, 10(17), 9048–9059. <https://doi.org/10.1002/ece3.6640>
- Hirst, J. (2013). Mitochondrial Complex I. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 551–575. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>
- Innocenti, P., Morrow, E. H., & Dowling, D. K. (2011). Experimental Evidence Supports a Sex-Specific Selective Sieve in Mitochondrial Genome Evolution. *Science*, 332(6031), 845–848. <https://doi.org/10.1126/science.1201157>
- Irwin, D. M., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2), 128–144. <https://doi.org/10.1007/BF02515385>
- Jacobson, J., & Duchon, M. R. (2004). Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256(1), 209–218. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000009869.29827.df>
- Jones, A. J. Y., Blaza, J. N., Varghese, F., & Hirst, J. (2017). Respiratory Complex I in *Bos taurus* and *Paracoccus denitrificans* Pumps Four Protons across the Membrane for Every NADH Oxidized. *Journal of Biological Chemistry*, 292(12), 4987–4995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771899>
- Katoh, T., Tamura, K., & Aotsuka, T. (2000). Phylogenetic Position of the Subgenus *Lordiphosa* of the Genus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) Inferred from Alcohol Dehydrogenase (Adh) Gene Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 51(2), 122–130. <https://doi.org/10.1007/s002390010072>
- Kern, A. D., & Kondrashov, F. A. (2004). Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nature Genetics*, 36(11), 1207–1212. <https://doi.org/10.1038/ng1451>
- Klimova, T., & Chandel, N. S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death & Differentiation*, 15(4), 660–666. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402307>
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E. T., Ishiwa, H., Takahata, N., & Chigusa, S. I. (1990). Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*, 126(3), 657–663. <https://doi.org/10.1093/genetics/126.3.657>
- Lang, B. F., Gray, M. W., & Burger, G. (1999). Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 33(1), 351–397. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.351>
- Lansman, R. A., Avise, J. C., & Huettel, M. D. (1983). Critical experimental test of the possibility of “paternal leakage” of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(7), 1969–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1969>
- Lapoint, R. T., O’Grady, P. M., & Whiteman, N. K. (2013). Diversification and dispersal of the Hawaiian Drosophilidae: The evolution of *Scaptomyza*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.04.032>
- Lewis, D. L., Farr, C. L., & Kaguni, L. S. (1995). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect Molecular Biology*, 4(4), 263–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1995.tb00032.x>

- Lewis, S. C., Uchiyama, L. F., & Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*, 353(6296), aaf5549. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5549>
- Lin, C.-P., & Danforth, B. N. (2004). How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3), 686–702. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00241-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00241-0)
- Llopart, A., Lachaise, D., & Coyne, J. A. (2005). Multilocus Analysis of Introgression Between Two Sympatric Sister Species of *Drosophila*: *Drosophila yakuba* and *D. santomea*. *Genetics*, 171(1), 197–210. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.033597>
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), 279–283. <https://doi.org/10.1038/nature05706>
- Mandal, S. De, Chhakchhuak, L., Gurusubramanian, G., & Kumar, N. S. (2014). Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects – A Review. *DNA Barcodes*, 2(1). <https://doi.org/10.2478/dna-2014-0001>
- Markow, T. A. (2015). The secret lives of *Drosophila* flies. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06793>
- Markow, T. A., & O'Grady, P. (2005). *Drosophila: a guide to species identification and use*. Elsevier.
- Mayr, E. (1996). What is a Species, and What is Not? *Philosophy of Science*, 63(2), 262–277. <https://doi.org/DOI:10.1086/289912>
- Menotti-Raymond, M., Starmer, W. T., & Sullivan, D. T. (1991). Characterization of the structure and evolution of the Adh region of *Drosophila hydei*. *Genetics*, 127(2), 355–366. <https://doi.org/10.1093/genetics/127.2.355>
- Mindell, D. P., Sorenson, M. D., & Dimcheff, D. E. (1998). Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10693–10697. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10693>
- Montooth, K. L., Abt, D. N., Hofmann, J. W., & Rand, D. M. (2009a). Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: Novel features of conservation and change across functional domains and lineages. *Journal of Molecular Evolution*, 69(1), 94–114. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9255-0>
- Montooth, K. L., Abt, D. N., Hofmann, J. W., & Rand, D. M. (2009b). Comparative Genomics of *Drosophila* mtDNA: Novel Features of Conservation and Change Across Functional Domains and Lineages. *Journal of Molecular Evolution*, 69(1), 94–114. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9255-0>
- Morán, T., & Fontdevila, A. (2005). Phylogeny and molecular evolution of the *Drosophila hydei* subgroup (*Drosophila repleta* group) inferred from the Xanthine dehydrogenase gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(3), 695–705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.04.009>
- Nass, M. M. (1969). Mitochondrial DNA: Advances, Problems, and Goals. *Science (New York, N.Y.)*, 165(3888), 25–35. <https://doi.org/10.1126/science.165.3888.25>
- Nielsen, R., & Wakeley, J. (2001). Distinguishing Migration From Isolation: A Markov Chain Monte Carlo Approach. *Genetics*, 158(2), 885–896. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.885>
- Nigro, L., Solignac, M., & Sharp, P. M. (1991). Mitochondrial DNA sequence divergence in the *Melanogaster* and oriental species subgroups of *Drosophila*.

- Journal of Molecular Evolution*, 33(2), 156–162.  
<https://doi.org/10.1007/BF02193630>
- O'Grady, P., & DeSalle, R. (2008). Out of Hawaii: the origin and biogeography of the genus *Scaptomyza* (Diptera: Drosophilidae). *Biology Letters*, 4(2), 195–199.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0575>
- O'Grady, P. M., & DeSalle, R. (2018). Phylogeny of the Genus *Drosophila*. *Genetics*, 209(1), 1–25. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300583>
- O'Grady, P. M., & DeSalle, R. (2018). Phylogeny of the Genus *Drosophila*. *Genetics*, 209(1), 1–25. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300583>
- Oliveira, D. C. S. G., Almeida, F. C., O'Grady, P. M., Armella, M. A., DeSalle, R., & Etges, W. J. (2012). Monophyly, divergence times, and evolution of host plant use inferred from a revised phylogeny of the *Drosophila repleta* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(3), 533–544.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.012>
- Oliveira, D. C. S. G., Raychoudhury, R., Lavrov, D. V., & Werren, J. H. (2008). Rapidly Evolving Mitochondrial Genome and Directional Selection in Mitochondrial Genes in the Parasitic Wasp *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Molecular Biology and Evolution*, 25(10), 2167–2180.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn159>
- Parey, K., Wirth, C., Vonck, J., & Zickermann, V. (2020). Respiratory complex I — structure, mechanism and evolution. *Current Opinion in Structural Biology*, 63, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.01.004>
- Perrimon, N., Bonini, N. M., & Dhillon, P. (2016a). Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3), 229–231. <https://doi.org/10.1242/dmm.024810>
- Perrimon, N., Bonini, N. M., & Dhillon, P. (2016b). Fruit flies on the front line: the translational impact of *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3), 229–231. <https://doi.org/10.1242/dmm.024810>
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D. V., Littlewood, D. T. J., Manuel, M., Wörheide, G., & Baurain, D. (2011). Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough. *PLoS Biology*, 9(3), e1000602.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000602>
- Rand, D. M., Dorfsman, M., & Kann, L. M. (1994). Neutral and non-neutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, 138(3), 741–756.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/138.3.741>
- Remsen, J., & O'Grady, P. (2002). Phylogeny of Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae), with comments on combined analysis and character support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24(2), 249–264.  
[https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00226-9](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00226-9)
- Rhymer, J. M., & Simberloff, D. (1996). EXTINCTION BY HYBRIDIZATION AND INTROGRESSION. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 83–109.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
- Rich, P. R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1095–1105.  
<https://doi.org/10.1042/bst0311095>
- Rieseberg, L. H., Van Fossen, C., & Desrochers, A. M. (1995). Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature*, 375(6529), 313–316. <https://doi.org/10.1038/375313a0>

- Rosenfeld, J. A., Payne, A., & DeSalle, R. (2012). Random roots and lineage sorting. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.029>
- Rubinoff, D., & Holland, B. S. (2005). Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. *Systematic Biology*, 54(6), 952–961. <https://doi.org/10.1080/10635150500234674>
- Russo C A, Takezaki N, & Nei M. (1995). Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040214>
- Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-Nuclear Communications. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 701–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.091720>
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195–209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00270-X)
- Sager R. (1972). *Cytoplasmic genes and organelles*. Academic Press.
- Salazar, C., Baxter, S. W., Pardo-Diaz, C., Wu, G., SurrIDGE, A., Linares, M., Bermingham, E., & Jiggins, C. D. (2010). Genetic Evidence for Hybrid Trait Speciation in Heliconius Butterflies. *PLoS Genetics*, 6(4), e1000930. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000930>
- Salinas, T., Duchêne, A.-M., & Maréchal-Drouard, L. (2008). Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(7), 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.010>
- Schmidt, P. S., Matzkin, L., Ippolito, M., & Eanes, W. F. (2005). Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 59(8), 1721–1732.
- Shao, R., Downton, M., Murrell, A., & Barker, S. C. (2003). Rates of Gene Rearrangement and Nucleotide Substitution Are Correlated in the Mitochondrial Genomes of Insects. *Molecular Biology and Evolution*, 20(10), 1612–1619. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg176>
- Simmons, R. B., & Weller, S. J. (2001). Utility and Evolution of Cytochrome b in Insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(2), 196–210. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0958>
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Simon, S., Schierwater, B., & Hadrys, H. (2010). On the value of Elongation factor-1 $\alpha$  for reconstructing pterygote insect phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.029>
- Solignac, M., Monnerot, M., & Mounolou, J. C. (1983). Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(22), 6942–6946. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.22.6942>
- Stone, G., & French, V. (2003). Evolution: Have Wings Come, Gone and Come Again? *Current Biology*, 13(11), R436–R438. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00364-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00364-6)

- Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, *21*(16), 3907–3930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
- Townsend, J. P., & Rand, D. M. (2004). Mitochondrial genome size variation in New World and Old World populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, *93*(1), 98–103. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800484>
- Walberg, M. W., & Clayton, D. A. (1981). Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, *9*(20), 5411–5421. <https://doi.org/10.1093/nar/9.20.5411>
- Wallace, D. C. (1982). Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiological Reviews*, *46*(2), 208–240. <https://doi.org/10.1128/mr.46.2.208-240.1982>
- Wolff, J. N., M. Florencia, C., David J., C., & Dowling, D. K. (2016). Complete mitochondrial genome sequences of thirteen globally sourced strains of fruit fly (*Drosophila melanogaster*) form a powerful model for mitochondrial research. *Mitochondrial DNA Part A*, *27*(6), 4672–4674. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1106496>
- Wolstenholme, D. R., & Clary, D. O. (1985). Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, *109*(4), 725–744. <https://doi.org/10.1093/genetics/109.4.725>
- Wredenberg, A., Wibom, R., Wilhelmsson, H., Graff, C., Wiener, H. H., Burden, S. J., Oldfors, A., Westerblad, H., & Larsson, N.-G. (2002). Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(23), 15066–15071. <https://doi.org/10.1073/pnas.232591499>
- Zhang, H., Li, F., Zhu, X., & Meng, Z. (2016). The complete mitochondrial genome of *Bombyx mori* strain Baiyun (Lepidoptera: Bombycidae). *Mitochondrial DNA Part A*, *27*(3), 1652–1653. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.958713>
- Zhang KaiJun, Z. K., Zhu WenChao, Z. W., Rong Xia, R. X., Zhang YanKai, Z. Y., Ding XiuLei, D. X., Liu Jing, L. J., Chen DaSong, C. D., Du Yu, D. Y., & Hong XiaoYue, H. X. (2013). *The complete mitochondrial genomes of two rice planthoppers, Nilaparvata lugens and Laodelphax striatellus: conserved genome rearrangement in Delphacidae and discovery of new characteristics of atp8 and tRNA genes*. *14*(417), (22 June 2013). <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-14-417.pdf>



