

**ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE
HEXÁPODOS Y SU IMPACTO EN LA EVOLUCIÓN**

MANUELA ALEJANDRA MORENO CARMONA

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo**

Director

CARLOS FERNANDO PRADA QUIROGA

Doctor en Genética

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA

IBAGUÉ – TOLIMA

2020



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLÓGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: " ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES DEL GENOMA MITOCONDRIAL
DE INSECTOS Y SU IMPACTO EN LA EVOLUCIÓN"

AUTORES: MANUELA ALEJANDRA MORENO CARMONA (070100152015)

DIRECTOR CARLOS FERNANDO PRADA QUIROGA

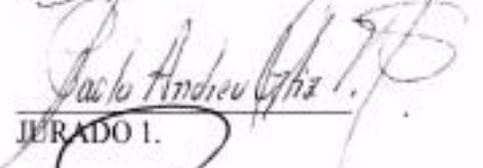
JURADOS: Paola Andrea Ortiz Vargas
Nelson Augusto Canal Daza

CALIFICACIÓN 4,9

APROBADO REPROBADO

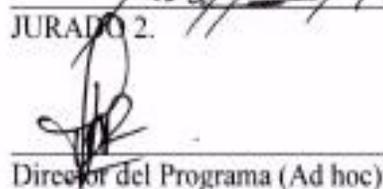
OBSERVACIONES _____

FIRMAS


JURADO 1.


JURADO 2.


Director del trabajo


Director del Programa (Ad hoc)

Ciudad y fecha: Ibague 11 Marzo 2010.

*“A mis padres Diana y Ricardo,
mi abuela Beatriz, mi compañero de vida Joan y toda mi familia, por apoyarme
en todas mis decisiones y por su amor”*

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos:

Al Dr. Carlos Fernando Prada Quiroga por su valiosa dirección, oportuna orientación, preciado apoyo y por toda su paciencia.

A mi equipo de trabajo Natalia Sofía Medina Camacho y Mauricio Jesús Ochoa Capera por su colaboración.

A la futura bióloga y gran amiga María Paula Montaña Lozano por su apoyo constante en el desarrollo de esta investigación.

Al Grupo de Investigación de Biología y Ecología de Artrópodos por su apoyo.

A la Unidad de Bioinformática por permitirme desarrollar mis habilidades.

A la Universidad del Tolima por permitirme llevar a cabo mi pregrado en esta maravillosa institución.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1 LA MITOCONDRIA	14
1.2 VARIABILIDAD ESTRUCTURAL	16
1.3 INSECTOS COMO MODELOS	20
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. METODOLOGÍA	22
3.1 TIPO DE ESTUDIO	22
3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	22
3.3 ANÁLISIS DE LA ARQUITECTURA DE LAS SECUENCIAS	22
3.4 ANALISIS DE LA REGIÓN CONTROL (RC)	24
3.5 VARIABILIDAD VS ADAPTACIÓN	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 CONFIRMACIÓN DE LAS ANOTACIONES	26
4.2 VARIABILIDAD ESTRUCTURAL	33
4.3 VARIABILIDAD DE LA REGIÓN CONTROL (RC)	56
5. CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES	67
REFERENCIAS	68

ANEXOS 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación del genoma mitocondrial ancestral de Insecta.	17
Figura 2. Verificación de reorganizaciones. a-c) <i>R. ferrugineus</i> x <i>S. oryzae</i> ; Coleoptera confirmación de error de anotación en inversión de trn-L. d-e) <i>S. bicornis</i> x <i>D. desiccata</i> ; Mantodea validación triplicación de trnI. Las flechas rojas indican la reorganización. ..	27
Figura 3. Ejemplificación errores de anotación o ausencia de la región control en a) genomas que carecen de secuenciación de RC y b) genomas sin anotación de RC. ..	32
Figura 4. Numero de rearrreglos presentes por cada gen del genoma mitocondrial en hexápodos.....	33
Figura 5. Ordenamiento ancestral de insectos (a) junto con las inversiones en trnI, trnQ y trnM más frecuentes en diferentes grupos de Hexapoda.	34
Figura 6. Comparación entre la cantidad de ordenes pertenecientes a cada distribución de reorganizaciones reportados en el 2014 y los presentados en esta investigación. ...	39
Figura 7. Filogenia de inversiones-translocaciones, duplicaciones y deleciones.	48
Figura 8. Disposición de genes en los ancestros presentados en la filogenia de inversiones- translocaciones (Figura 7a) y la filogenia taxonómica de los diferentes grupos de hexápodos.....	49
Figura 9. Filogenia taxonómica de Hexapoda que muestra las generalidades de los rearrreglos presentes en la Figura 5a. Las tonalidades de azul en los órdenes indican el nivel de reorganización, las líneas punteadas moradas indican posibles convergencias. El orden Hymenoptera esta ampliado en la Figura 10.	52
Figura 10. Ampliación filogenia taxonómica de las generalidades de los rearrreglos encontrados en la Figura 5a del orden Hymenoptera.	53
Figura 11. Porcentaje de identidad de la RC de los órdenes de hexápodos.....	56
Figura 12. Alineamiento de la región control de organismos del mismo género en diferentes órdenes de hexápodos.	57
Figura 13. Porcentaje del contenido de A+T en los grupos de la superclase Hexapoda.	58
Figura 14. Alineamiento entre las especies del género <i>Drosophila</i>	60

Figura 15. Tamaño promedio del Dloop para todos los órdenes del grupo Hexapoda..60

Figura 16. Box-Plot del tamaño de los diferentes órdenes de hexápodos. En este diagrama fueron excluidos los grupos Zoraptera, Strepsitera y Mantophasmatodea por poseer tan solo un organismo.....62

Figura 17. Coeficiente de correlación entre el promedio del tamaño del Dloop y el promedio de la identidad que presentan los diferentes grupos de hexápodos. Para ese diagrama fueron excluidos los órdenes Siphonaptera, Phthiraptera y Megaloptera.....63

RESUMEN

Introducción. La mitocondria cumple un papel fundamental en el metabolismo. Se reportó que el mitogenoma de los insectos es conservado, y si existen reordenamientos solo se presentan en grupos aislados. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo determinar la variabilidad del mitogenoma de Hexapoda y su asociación a procesos adaptativos. **Materiales y métodos.** Se descargaron 1198 mitogenomas de hexápodos de NCBI. Se verificaron las anotaciones génicas y se revisó el grado de conservación de los genomas. Se realizó una filogenia de reorganizaciones para encontrar posibles convergencias con los programas GRIMM, Unimog y Paup. Se determinó la variabilidad de los tamaños y la identidad entre los órdenes de Dloop. Finalmente, esto se contrastó con procesos adaptativos. **Resultados y Discusión.** El 9.1% de los genomas tiene errores de anotación y el 48.7% está reorganizado. Se encontraron convergencias en órdenes distantes y rearrreglos específicos en grupos cercanos. Se identificaron errores de anotación del Dloop en el 30% de los genomas y se reporta por primera vez una posible correlación fuertemente negativa entre la identidad y el tamaño del Dloop. Los insectos poseen una alta variabilidad en el mitogenoma, contrario a lo reportado previamente. Posiblemente el estilo de vida parasítico-parasitario, de plagas y vectores, propicia las reorganizaciones por el estrés oxidativo al que están expuestos. Por lo tanto, este es el primer trabajo que reúne los reordenamientos mitocondriales de 32 órdenes de Hexapoda y permite visualizar el alto nivel de reorganización que presentan algunos grupos de insectos ligado a su estilo de vida.

Palabras clave: Hexapoda, Genoma mitocondrial, Reorganizaciones génicas, Adaptaciones.

ABSTRACT

Introduction. The mitochondrion plays a fundamental role in metabolism, it was reported that the mitogenome of insects is conserved, and if there are rearrangements only occur in isolated groups. Therefore, this study aims to determine the variability of the Hexapoda mitogenome and its association with adaptive processes. **Materials and methods.** 1198 hexapod mitogenomas were downloaded from NCBI. Gene annotations were verified and the degree of conservation of the genomes was reviewed. A phylogeny of reorganizations was carried out to find possible convergences with the GRIMM, Unimog and Paup programs. Variability of sizes and identity between Dloop orders was determined. Finally, this was contrasted with adaptive processes. **Results and Discussion.** 9.1% of genomes have annotation errors and 48.7% are reorganized. Convergences were found in distant orders and specific rearrangements in nearby groups. Dloop annotation errors were identified in 30% of the genomes and a possible strongly negative correlation between the identity and size of the Dloop is reported for the first time. Insects have a high variability in the mitogenome, contrary to what was previously reported. Possibly the parasitic-parasitic lifestyle of pests and vectors, promotes reorganizations due to oxidative stress to which they are exposed. Therefore, this is the first work that brings together the mitochondrial rearrangements of 32 orders of Hexapoda and allows us to visualize the high level of reorganization that some groups of insects have linked to their lifestyle.

Keywords: Hexapod, Mitochondrial genome, Gene rearrangements, Adaptations.

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son organelos citoplasmáticos, descendientes de una α -proteobacteria que se instaló dentro de un miembro temprano del linaje eucariota (Boore, Macey, & Medina, 2005; Lang, Gray, & Burger, 1999). Una de las características que le confiere independencia e importancia a la mitocondria es poseer su propio genoma (Xiao, Jia, Murphy, & Huang, 2011). Este organelo cumple un papel fundamental en el metabolismo celular, al desempeñar funciones bioquímicas entre las que se destacan, la fosforilación oxidativa esencial para la producción de ATP, la apoptosis y el envejecimiento celular, entre otras (Boore, 1999). Por lo cual, debido al papel vital que cumple en el metabolismo y su tamaño relativamente pequeño, los genomas mitocondriales de animales están siendo intensamente investigados para ser aplicados en evolución (Xiao et al., 2011).

Hexapoda poseen una alta diversidad y son abundantes en la tierra, por lo tanto, entender sus relaciones evolutivas podría ayudar a comprender cada vez mejor la evolución de la vida. Además estas relaciones entre insectos están cada vez mejor respaldadas, debido a los avances tecnológicos en la secuenciación molecular y el análisis computacional filogenético (Trautwein, Wiegmann, Beutel, Kjer, & Yeates, 2012). En particular, estos organismos son importantes en una variedad enorme de campos en los que se destaca el funcionamiento ecológico de los sistemas naturales a través de diversas actividades que van desde la descomposición de la materia orgánica hasta el suministro de alimentos para peces y vida silvestre. De hecho, juegan roles como depredadores, parásitos, herbívoros, saprófagos y polinizadores, entre otros. Todo esto permite visualizar la gran importancia ecológica y económica de este grupo de animales tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres (Rosenberg, Danks, & Lehmkuhl, 1986).

En insectos el sistema genómico más extensamente estudiado es el genoma mitocondrial (mt), superando ampliamente a los genomas nucleares y representando a casi todos los órdenes (Cameron, 2014b). El ADN mitocondrial de Hexapoda (mtDNA) es una molécula circular de doble cadena que tiene una longitud entre 14-19 kb y

contiene en casi todos los casos 13 genes codificantes: subunidades 6 y 8 de la ATPasa (*atp6* y *atp8*), subunidades 1 a 3 del citocromo C oxidasa, citocromo B (*cox1-cox3 / cytB*), subunidades de NADH deshidrogenasa 1-6 y 4L (*nd1-6* y *nd4l*). También contiene dos genes de rRNA; rRNA de subunidad pequeña y grande (*rrnL* y *rrnS*), 22 genes de tRNA y un elemento no codificante denominado región rica en A + T o región control (RC), esta posee un mayor nivel de variabilidad que otras regiones del genoma y regula la transcripción y la replicación de mitogenomas (región Dloop) (Xin et al., 2017).

Los genomas mitocondriales (también conocidos como mtgenomas) han sido utilizados ampliamente en diferentes gamas de estudios y esto ha tenido un gran impacto en la genética entomológica. Inicialmente, los genes mt fueron utilizados por la escasez de genes nucleares alternativos que podían amplificarse con cebadores fiables casi universales (Caterino, Cho, & Sperling, 2000). De hecho, el desarrollo de protocolos confiables para secuenciar genes de codificación de proteínas nucleares (PCG) en insectos ha sido tan lento que los genes mt todavía predominan en conjuntos de datos sistemáticos moleculares (Hebert, Cywinska, Ball, & Dewaard, 2003). El éxito de las secuencias de ADNmt se debe a varias características, entre las que se destacan: compactación de genes, pocos nucleótidos intergénicos no codificantes, falta de recombinación, principalmente herencia materna, una evolución de secuencia más rápida en comparación con las secuencias nucleares, quizás debido a la ineficiencia de reparación y el estado de múltiples copias en una célula (Pereira, 2000).

Los genomas mitocondriales fueron estudiados de forma colectiva, lo que derivó en una inundación de datos mitocondriales que hoy en día son por órdenes de magnitud las secuencias de insectos más comunes en GenBank. Por lo que comprender la dinámica particular de la evolución genética de la mitocondria es vital para el uso apropiado de este enorme recurso de datos (Cameron, 2014b).

Según Cameron (2014), la variabilidad y disposición de forma general de los genes dentro del genoma de insectos, está altamente conservado y aunque se han registrado en algunos taxones específicas desviaciones significativas de los genomas ancestrales

en términos de estructura, contenido genético y disposición genética, se plantea que estas excepciones se encuentran solo en grupos altamente derivados del árbol de la vida de los insectos, como es el caso de los numerosos reordenamientos genéticos en el genoma mitocondrial del piojo de Wallaby, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera) (Shao, Campbell, & Barker, 2001).

Sin embargo, se han realizado estudios previos donde se han observado reordenamientos importantes en los genes mitocondriales de varios grupos de hexápodos como los hemípteroides, incluido trips (Liu et al., 2017) y algunos psocopteros (Shao, Campbell, Schmidt, & Barker, 2001), junto con reportes de reordenamientos menores, que implican la reorganización de genes de tRNA, en abejas melíferas (Crozier & Crozier, 1993) otros himenópteros (Dowton & Austin, 1999b), mosquitos (Beard, Hamm, & Collins, 1993) y colémbolos (Nardi et al., 2003) lo que demuestra la presencia de eventos de reorganizaciones en hexapoda. Además, se ha demostrado desde hace algunos años que cambios morfológicos en grupos grandes como Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera, y Homoptera, se deben sin duda en muchos casos, si no en la mayoría, a una interacción considerable genotipo-ambiente (Roff, 1986).

Por lo tanto, este estudio que hace parte de un macroproyecto que se encarga de estudiar la evolución mitocondrial mediante la comparación y revisión de los rearrreglos en diferentes clases del reino Animalia, intentara dilucidar esta problemática: ¿Las alteraciones en los genes mitocondriales están relacionados con estrategias adaptativas en insectos?

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LA MITOCONDRIA

Las células eucariotas se caracterizan por poseer organelos y el más notable de estos orgánulos es la mitocondria, la cual es descendiente de una alfa-proteobacteria hace aproximadamente 2 mil millones de años (Cameron, 2014b) (Van der Giezen, 2011). Existen varios tipos mitocondriales sobre la base de criterios funcionales sobre la producción de ATP:

1.1.1 Mitocondrias aerobias. Las mitocondrias típicas de las células de mamíferos respiran O_2 durante el proceso de descomposición del piruvato y la síntesis de ATP. Tales mitocondrias típicas también ocurren en plantas y en varios grupos de eucariotas (protistas) unicelulares (Martin & Mentel, 2010).

1.1.2 Mitocondrias anaeróbicas. Las mitocondrias de muchos invertebrados no usan O_2 como el aceptor terminal, estas mitocondrias permiten que la célula de crecimiento anaeróbico extraiga ATP (Martin & Mentel, 2010).

Algo a resaltar entre ciertos protistas unicelulares y algunos metazoos es la falta de una mitocondria típica. Algunos eucariotas en estos casos contienen orgánulos particulares llamados hidrogenosomas y mitosomas:

1.1.3 Hidrogenosomas. Este orgánulo que produce ATP y desarrolla hidrógeno, se encuentra en una amplia gama de protistas microaerófilos filogenéticamente distantes como tricomonas parabasales, ameboflagelados, ciliados de vida libre y rumiantes, así como hongos quítridos. Los hidrogenosomas, utilizan una vía fermentativa para metabolismo del piruvato y carecen por completo de una cadena de transporte de electrones (Dyall & Johnson, 2000).

1.1.4 Mitosomas. Son orgánulos pequeños que no están involucradas en la síntesis de ATP. Estos eucariotas sintetizan su ATP en el citosol con la ayuda de enzimas que normalmente se encuentran en los hidrogenosomas (Martin & Mentel, 2010).

Actualmente existen dos teorías sobre el origen de las mitocondrias. El punto de vista tradicional postula que el huésped que adquirió la mitocondria era una célula anaeróbica con núcleo, un eucariota que era capaz de engullir la mitocondria activamente a través de la fagocitosis. Los estudios geoquímicos apuntan hacia un "pico de oxígeno" que ocurrió hace 2.2–2.0 mil millones de años cuando los niveles de oxígeno atmosférico se dispararon. En los escenarios de "desintoxicación", la contribución de una α -proteobacteria aeróbica era consumir oxígeno que habría sido tóxico para el huésped anaerobio (Gray, 1998; Vellai, Takacs, & Vida, 1998). Una teoría alternativa postula que el huésped que adquirió la mitocondria fue un procariota, una archaeobacteria. Siendo la mitocondria ancestral un anaerobio facultativo, metabólicamente versátil.

El beneficio inicial de la simbiosis podría haber sido la producción de H_2 por parte del endosimbionte como fuente de energía y electrones para el huésped archaeobacteriano, que se considera que ha sido dependiente de H_2 . Las mitocondrias surgieron una vez en la evolución, y su origen implicó una endosimbiosis acompañada de transferencias de genes desde el endosimbionte al huésped. Por lo cual, las mitocondrias anaeróbicas encajan bien en las nuevas teorías sobre la evolución mitocondrial que se formularon específicamente para tomar en cuenta la ascendencia común de las mitocondrias y los hidrogenosomas (Martin & Mentel, 2010).

El ADN mitocondrial circular (ADNmt) de generalmente 16 kilobases contiene 37 genes. Trece de estos genes codifican subunidades de proteínas de los complejos respiratorios I, III, IV y V; solo el complejo II está compuesto únicamente de proteínas codificadas por genes nucleares. El ADNmt también codifica 22 tRNA mitocondriales y 2 rRNA que son esenciales para la traducción de transcritos de ADNmt (Chan, 2006), también contiene dos regiones principales no codificantes: (1) la región de control ("CR"), que contiene una estructura de bucle de desplazamiento ("Dloop") y tiene varios roles funcionales, incluido

un origen de replicación de la cadena pesada y promotores para la transcripción de cada cadena, y (2) el origen de replicación de cadena ligera (OL) (Prada & Boore, 2019; Shadel & Clayton, 1997).

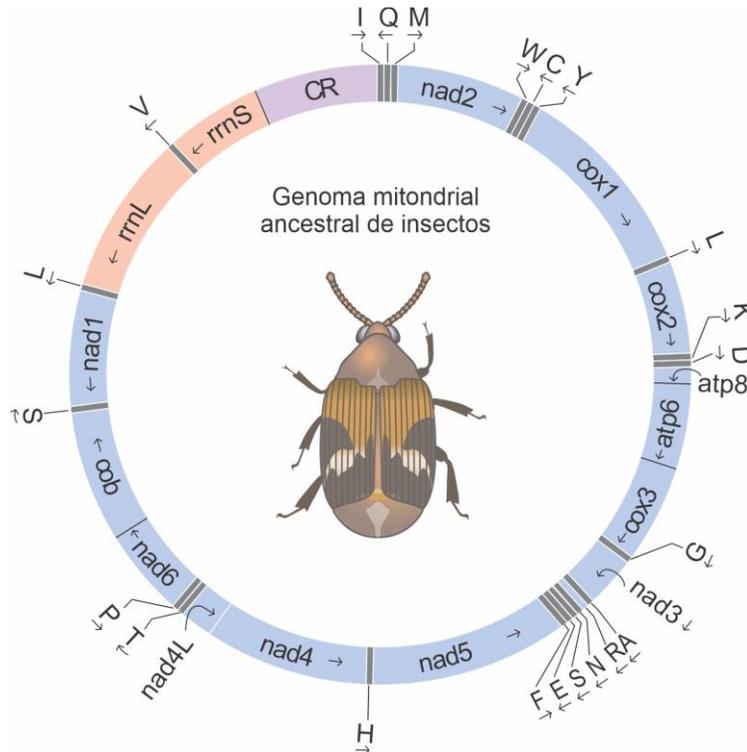
Las mitocondrias poseen dos membranas unitarias: una membrana externa lisa y una membrana interna que se compone de pliegues transversales altamente enrevesados denominados crestas. La serie de cuatro complejos de proteínas, la cadena de transporte de electrones (ETC), ubicada en la membrana interna de mt, pasa los electrones de los intermediarios de la respiración (NADH o succinato) al oxígeno, produciendo agua y bombeando protones al espacio intermembrana de mt. El equilibrio del gradiente electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz mt producida por el ETC se acopla a la producción de ATP por la ATP sintetasa. Las proteínas codificadas por el genoma de mt forman parcialmente tres de los cuatro complejos ETC y la ATP sintetasa; sin embargo, la gran mayoría de las proteínas activas están codificadas en el núcleo. Las mitocondrias también tienen funciones en la apoptosis y el envejecimiento celular (Lane, 2006).

1.2 VARIABILIDAD ESTRUCTURAL

A pesar de la organización genética simple que presentan las mitocondrias, los aspectos fundamentales de las mutaciones del ADNmt son poco conocidos (Chan, 2006). Se sabe que las secuencias mitocondriales de los animales evolucionan rápidamente y sus arreglos genéticos a menudo permanecen sin cambios durante extensos períodos de tiempo evolutivo. Con pocas excepciones, las disposiciones de genes son relativamente estables dentro de los grupos principales, pero son variables entre ellas (Boore, 1999). Se puede identificar una posición ancestral de los 13 genes codificadores de proteínas y dos genes de rRNA para Bilateria (Mwinyi et al., 2009), que está ligeramente modificada en los genomas mitocondriales ancestrales de ecdisozoos y artrópodos (Braband, Cameron, Podsiadlowski, Daniels, & Mayer, 2010). Dentro de los artrópodos, se ha reportado un reordenamiento genético derivado común para el gen tRNA leucina, designado L (UUR) entre los insectos (disposición genética ejemplificada en la Figura 1) y

crustáceos pero ausente en los otros grupos de artrópodos (Boore, Lavrov, & Brown, 1998). La mayoría de las variaciones tienen que ver con la organización del genoma, en donde intervienen ciertos mecanismos: duplicaciones en tándem de regiones genómicas, seguido por la subsecuente delección de regiones, o inversiones. Lo primero puede ocurrir a través de una combinación errónea en las cadenas o por un mal inicio de la replicación en la cadena ligera. Un tercer mecanismo posible implica la recombinación, que normalmente solo ocurre entre segmentos de ADN homólogos, pero posiblemente podría involucrar porciones de segmentos no homólogos (Bensch & Harlid, 2000).

Figura 1. Representación del genoma mitocondrial ancestral de Insecta.



Fuente: Cameron (2014b). Los genes de transferencia de ARN se indican mediante una sola letra (abreviaturas IUPAC) para su correspondiente aminoácido. La dirección de la transcripción del gen es indicada por una flecha. Abreviaturas: atp6 y atp8 (genes de ATP sintasa subunidades 6 y 8); cob (gen del citocromo oxidasa b); cox1 – cox3 (genes citocromo oxidasa c subunidad 1–3); nad1–6, nad4L (genes de NADH deshidrogenasa subunidades 1–6 y 4L); rrnS y rrnL (subunidades de ARN ribosómico pequeño y grande); CR (región de control) (Cameron, 2014b).

Según lo anterior, J. Zhang (2003) plantea que la aparición de duplicaciones es un proceso común, y estas sugieren 4 destinos, en donde interviene:

(1) La desfuncionalización, en la cual, una copia de esta duplicación se convierte en un pseudogen y procede a ser eliminado del genoma.

(2) La subfuncionalización, en donde las copias de un gen multifuncional pueden volverse especializadas para cumplir una de las diferentes funciones originales.

(3) La neofuncionalización, en la que un gen duplicado adquiere una función novedosa debido a mutaciones o en la copia del gen.

(4) El mantenimiento redundante, donde múltiples copias se mantienen a través de la conversión del gen o la selección purificadora porque las copias adicionales ayudan a satisfacer las altas demandas de expresión.

Dependiendo de qué copia de un gen se elimine, puede surgir una nueva reorganización de genes o se puede restaurar el orden original (Boore, 2000).

1.2.1 Estructura de la región de control mitocondrial de insectos. Como fue mencionado por D. X. Zhang and Hewitt (1997), la mayoría de las regiones de control mitocondrial de insectos son ricas en A + T, compuestas por más del 85% de estos nucleótidos. El contenido más alto de A + T observado hasta ahora es del 96% (por ejemplo, en la abeja melífera y la mosca de la fruta *D. melanogaster*). Por otro lado, el tamaño de la región de control en los insectos varía considerablemente en diferentes taxones e incluso dentro de la misma especie. Por ejemplo, en varias especies de lepidópteros: 350 pb, saltamontes: 762 pb, en las moscas de la fruta: 1077 pb y en *D. melanogaster*: 4601 pb. Las variaciones de longitud entre taxones estrechamente relacionados se deben principalmente a repeticiones en tándem en las regiones de control. Las pequeñas inserciones / eliminaciones también contribuyen a la variación de tamaño, pero aparentemente solo juegan un papel menor en la variación. La gran variación de tamaño

entre taxones distantes no está relacionada exclusivamente con la repetición en tándem en la región de control.

1.2.2 Convergencias. Cuando existe la evolución independiente de características similares en diferentes taxones, se puede hablar de evolución convergente. Las convergencias tienen la capacidad de producir sin restricciones de la selección natural soluciones óptimas a los problemas planteados repetidamente por el medio ambiente (Losos, 2011; Morris, 2010). Las convergencias pueden ocurrir de varias maneras:

Como coincidencia, si los rasgos evolucionan de manera convergente por razones no relacionadas con la selección natural, entonces no se debería esperar que exista una correlación entre la posesión de un rasgo y la ocurrencia en un entorno selectivo particular (Losos, 2011; Pagel, 1994). Sin embargo, es posible que, si un rasgo evoluciona de manera convergente en múltiples taxones por razones no relacionadas con la selección natural, todos los taxones pueden ocupar el mismo entorno selectivo.

Adaptación vs exaptación: La adaptación es una característica que evolucionó en respuesta a la selección natural en el entorno en el que se produce actualmente, mientras que una exaptación proporciona una mejor condición física en un entorno, pero originalmente no evolucionó en respuesta a la selección natural en ese entorno. Por lo tanto, dos especies pueden exhibir fenotipos similares mientras ocupan entornos selectivos similares, incluso si uno o ambos no desarrollaron la característica como una adaptación para usar ese entorno (Gould & Vrba, 1982; Losos, 2011).

Respuesta correlacionada a la selección en otro personaje: si los taxones comparten restricciones similares, entonces la selección en rasgos similares en múltiples taxones puede conducir a respuestas correlacionadas similares. Las restricciones y la selección natural pueden interactuar para producir correlaciones fenotipo-ambiente (Losos, 2011).

Las restricciones, que son sesgos compartidos en la producción de variación, pueden conducir a la convergencia. En el caso de que las variantes que puedan producirse sean

limitadas, es probable que las especies no relacionadas produzcan las mismas variaciones, que luego pueden fijarse en la población por deriva genética o por selección. Esto se ve fácilmente en la evolución del ADN, debido a que solo existen cuatro estados posibles para una posición de nucleótido dada, la probabilidad de que los taxones relacionados distantes adquieran independientemente el mismo cambio por casualidad es relativamente alta (Losos, 2011).

1.3 INSECTOS COMO MODELOS

Los insectos son las especies dominantes en la comunidad biótica generalizada en todos los hábitats de la tierra. Se conocen alrededor de un millón de especies de insectos, lo que representa un número semejante a tres veces el resto de los animales juntos y se plantea que las especies de insectos puedan alcanzar una cifra entre 10 a 30 millones (Toro, Chiappa, & Tobar, 2003). La superclase Hexapoda (*Insecta sensu lato*) se clasifica taxonómicamente en dos clases principales: Entognatha y Ectognatha (*Insecta sensu stricto*). Entognatha comprende tres grupos sin alas: Protura, Collembola y Diplura, (Hennig, 1953; Sasaki, Ishiwata, Machida, Miyata, & Su, 2013). Entognatha es la clase más diversa, los órdenes ápteros Archaeognatha y Zygentoma dan el concepto más cercano de lo que el insecto original podría haber parecido, estos órdenes conducen a los insectos alados (Pterygota), y comparten con Zygentoma características importantes en la mandíbula y el ovopositor. Los insectos alados, son monofiléticos, y representan un origen único de alas y vuelos entre los insectos. Los primeros linajes divergentes de Pterygota tenían alas con posiciones fijas, extendidas, y sus únicos descendientes existentes son Ephemeroptera y Odonata. Las modificaciones posteriores permitieron el pliegue de las alas sobre el abdomen y dieron lugar a los neópteros. La hemimetabolía, o metamorfosis incompleta, abarca una gama de variados patrones de desarrollo, pero comparte una semejanza morfológica en todas las etapas, siendo las ninfas, adultos miniaturizados mientras que la holometabolis, o metamorfosis completa, se caracteriza por una larva de cuerpo blando y morfológicamente reducida, seguida de una pupa en gran parte inactiva y un adulto completamente diferente (Engel, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la variabilidad de los genes mitocondriales asociados a procesos adaptativos entre los diferentes grupos taxonómicos de la superclase Hexapoda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las reorganizaciones presentes en el genoma mitocondrial en los diferentes órdenes de hexápodos.
- Relacionar los cambios en los genes del genoma mitocondrial con procesos adaptativos en los diferentes órdenes de la superclase Hexapoda.

3. METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo básico, documental y cuasiexperimental.

3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvieron 1198 secuencias de 32 órdenes de la superclase Hexapoda con un criterio de inclusión donde se seleccionaron los organismos con un rango taxonómico de especie, tres representantes por género y un solo cromosoma, disponibles en la base de datos Organelle del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/organelles/>), las cuales fueron descargadas tanto en formato GenBank y FASTA. Las secuencias muestreadas se agruparon por órdenes y familias según la clasificación taxonómica encontrada en las bases de datos ITIS (Integrated Taxonomic Information System) - <https://www.itis.gov>- y Taxonomy Browser de NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>-. Por último, se realizó una búsqueda manual de organismos que pertenezcan a órdenes poco representados. Estas fueron descargadas en un periodo de 8 meses (marzo- noviembre del 2018).

3.3 ANÁLISIS DE LA ARQUITECTURA DE LAS SECUENCIAS

3.3.1. Confirmación de las anotaciones. Para verificar la correcta anotación de los genes anotados en las secuencias analizadas, se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas, las cuales permitieron la comparación entre las regiones problemáticas con la región homóloga de la especie evolutivamente más cercana para observar el nivel de identidad y así detectar si las reorganizaciones son verdaderas. Para ello, primero se realizó un alineamiento pareado mediante Muscle en Geneious (Edgar, 2004), y posteriormente se llevó a cabo un Blast2seq de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para observar la posición y orientación de los

tRNAs especialmente en grupos de organismos con amplia reorganización y poca homología con especies cercanas fueron utilizados los programas MITOS web server - <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>- (Bernt, Donath, et al., 2013) y ARWEN web server -<http://130.235.46.10/ARWEN/>- (Laslett & Canback, 2008).

3.3.2. Reorganizaciones en la arquitectura del genoma de insectos. Se identificó el orden de los genes ancestrales del genoma mitocondrial de insectos según lo reportado por Stephen L. Cameron (Cameron, 2014b). A partir de las secuencias depuradas, mediante un análisis observacional por medio del programa Geneious versión 4.8.5 (Kearse et al., 2012) se construyó una matriz de datos con una base genómica comparativa entre las secuencias muestreadas y la secuencia ancestral determinada para identificar las posibles reorganizaciones (duplicación, delección e inversión- translocación), esto se realizó teniendo en cuenta una disposición numérica de los genes (de 1 a 37, considerando a 1 como el gen *trnI* y a 2 como el gen *trnQ*; y así sucesivamente) y su orientación (siendo identificada la orientación plus/plus como + y la orientación plus/minus como -). Aquí y en lo sucesivo, los arreglos de los genes de tRNA se indicarán mediante el código de una letra según la nomenclatura IUPAC.

3.3.3. Filogenia de inversiones-translocaciones, duplicaciones y delecciones. Se realizó una filogenia de inversiones-translocaciones mediante los programas Grimm - <http://grimm.ucsd.edu/GRIMM/>- (Tesler, 2002) y Unimog (Hilker, Sickinger, Pedersen, & Stoye, 2012) para identificar mediante algoritmos como Hannenhalli-Pevzner, el código GRAPPA y DCJ eventos de reordenamiento comunes en la evolución molecular entre genomas por medio de distancias de inversión y genómicas, respectivamente. Mediante la herramienta MGR -<http://grimm.ucsd.edu/MGR/>- (Bourque & Pevzner, 2002) se construyó una filogenia basada en el orden de genes, posteriormente, esta se visualizó con FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y se editó en CorelDraw Graphics Suite 2019: Software de diseño gráfico vectorial. Debido a que el programa Grimm no considera “word problems” es decir duplicaciones y delecciones, estas fueron agregadas manualmente en la filogenia a los genomas que además de inversiones-translocaciones posean algún evento de inserción o delección. Posterior a ello, mediante

PAUP (Swofford, 2001) se realizó una filogenia para los mitogenomas que poseen únicamente duplicaciones y deleciones.

Por último, se realizó una filogenia taxonómica de la superclase Hexapoda basada en las filogenias presentadas por Li et al. (2015) y Trautwein et al. (2012), la filogenia se profundizó en los órdenes que fueron los más reorganizados, los cuales son Neuroptera (Kumar, Stecher, Suleski, & Hedges, 2017), Protura, Diplura, Poduromorpha (Luan, Mallatt, Xie, Yang, & Yin, 2005) Phthiraptera (Shao et al., 2015) y Psocoptera (Song et al., 2015) para resumir las generalidades de las reorganizaciones encontradas en la filogenia realizada con Grimm y Unimog, para posteriormente, encontrar posibles convergencias en las reorganizaciones presentes en los insectos. Como caso especial por su nivel de reorganización y el número de familias se ampliaron en una filogenia independiente las relaciones de Hymenoptera basadas en las investigaciones realizadas por Peters et al. (2017) y Branstetter et al. (2017). Las distancias de inversión compartidas por más del 50% de los organismos de una familia u orden fueron incluidas en la filogenia, de igual forma, los grupos que poseían tantos organismos con una organización ancestrales y reorganizados fueron marcados con un asterisco.

3.4 ANALISIS DE LA REGIÓN CONTROL (RC)

Mediante el programa Geneious (Kearse et al., 2012) se identificaron los organismos que no poseían secuenciación de RC, los cuales, fueron excluidos del análisis. De igual forma, los organismos que poseían secuenciación pero no anotación, por medio de alineamientos pareados con el algoritmo Muscle de la plataforma Geneious (Edgar, 2004) se anotó como una región control putativa manualmente. Posteriormente, se extrajeron las RC de los mitogenomas, se realizó un alinamiento por medio de Muscle (Edgar, 2004) con todos las RC de las especies correspondientes a un orden taxonomico para se determinar el porcentaje de A+T y de identidad. Luego se consolidó una matriz con los tamaños de RC de los 32 órdenes de la superclase Hexapoda. Se realizaron diferentes análisis estadísticos descriptivos mediante Excel entre los cuales se encuentran un box plot para representar gráficamente la variabilidad de los tamaños de

RC y un coeficiente de correlación para encontrar el grado de relación entre las variables: largo de RC y porcentaje de identidad, y detectar alguna señal adaptativa relacionada con el tamaño de RC.

3.5 VARIABILIDAD VS ADAPTACIÓN

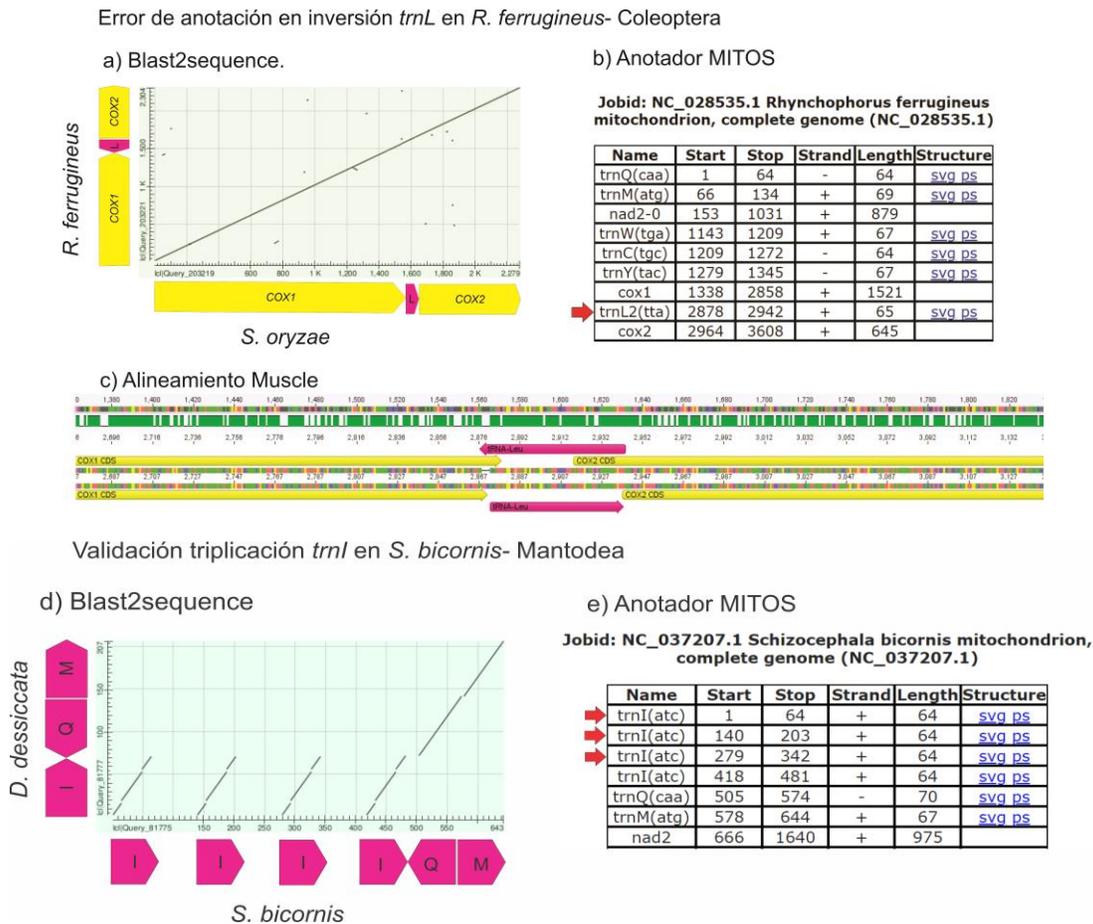
Se revisó en las diferentes bases de datos o libros especializados las adaptaciones para cada orden y/o familia, dichas adaptaciones se contrastaron con los resultados de variabilidad estructural o en el tamaño de RC obtenida en el genoma mitocondriales de hexápodos, con el propósito de identificar señales filogenéticas claras con procesos adaptativos diferenciales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONFIRMACIÓN DE LAS ANOTACIONES

El 9,1% de los genomas analizados (110/1198) tienen al menos un error de anotación, por lo tanto, de los 44326 genes anotados en los genomas analizados, fueron identificados 151 genes mal anotados, lo que significa una tasa de error de anotación de 0,34% (Tabla 1). Al analizar los errores de anotación, se determinó que los tRNAs poseen el nivel más alto de anotaciones incorrectas (71%) teniendo los valores más elevados los genes *trnL* (9,9%) y *trnC* (9,2%), mientras que el 29% restante pertenece a rRNAs representado en su mayoría por errores en el *rrn16s* (10,6%) presentándose estos errores abundantemente en órdenes como Lepidoptera y Orthoptera con 44 y 23 genes con errores de anotación, respectivamente. Se ejemplifican las diferentes herramientas bioinformáticas (Blast2sequence, MITOS y alineamientos pareados) para identificar errores de anotación en la Figura 2.

Figura 2. Verificación de reorganizaciones. a-c) *Rhynchophorus ferrugineus* x *Sitophilus oryzae*; Coleoptera confirmación de error de anotación en inversión de trn-L. d-e) *Schizocephala bicornis* x *Deroplatys desiccata*; Mantodea validación triplicación de trnI. Las flechas rojas indican la reorganización.



Fuente: Autor.

Tabla 1. Número de genes reorganizados, refutados y confirmados en los mitogenomas de hexápodos.

Clase	Ordenes	Total de individuos	Genes reorganizados	Reorganizaciones confirmadas	Reorganizaciones refutadas
Ectognatha	Archaeognatha	5	4	2	2
	Blattodea	146	5	4	1
	Coleoptera	143	39	21	18
	Dermoptera	2	19	19	0

Clase	Ordenes	Total de individuos	Genes rearreglados	Reorganizaciones confirmadas	Reorganizaciones refuradas
	Diptera	96	145	126	19
	Ephemeroptera	4	2	1	1
	Hemiptera	166	214	196	18
	Hymenoptera	50	452	446	2
	Lepidoptera	294	915	871	44
	Mantodea	21	14	14	0
	Mantophasmatodea	1	0	0	0
	Mecoptera	3	0	0	0
	Megaloptera	11	0	0	0
	Neuroptera	17	34	32	2
	Odonata	19	1	0	1
	Orthoptera	139	226	203	23
	Phasmatodea	8	6	6	0
	Phthiraptera	6	233	233	0
	Plecoptera	11	0	0	0
	Psocoptera	10	125	124	1
	Raphidioptera	1	0	0	0
	Siphonaptera	2	0	0	0
	Strepsitera	1	3	3	0
	Thysanoptera	6	198	195	3
	Trichoptera	11	11	9	2
	Zoraptera	1	0	0	0
	Zygentoma	3	0	0	0

Entognatha	Diplura	6	0	0	0
Entomobryomorpha		4	0	0	0
Poduromorpha		6	14	6	8
Protura		3	82	81	1
Symphyleona		2	4	3	1
Total		1198	2746	2595	151

Fuente: Autor.

La base de datos de NCBI (GenBank) contiene un abundante número de genomas mitocondriales los cuales son corregidos y estandarizados por el programa “Refseq”, debido a que otras bases de datos derivan en cierta medida de estos registros, sin embargo, se ha informado que las entradas de esta base de datos están repletas de errores fácilmente detectables (Boore, 2006) (Coordinators, 2018). Donath et al. (2019) informaron que las anotaciones RefSeq contienen errores, en particular, asignaciones inverosímiles de posiciones precisas de codón de inicio y parada, y una fracción sustancial de anotaciones incompletas que solo identifican fragmentos de genes codificadores de proteínas para mitogenomas de Metazoa. Previamente se ha reportado que el el 36,6% de los genomas mitocondriales de mamíferos obtenidos de la base de datos NCBI analizados poseía errores de anotación (Prada & Boore, 2019), mientras que esta investigación reporta para hexápodos un porcentaje mucho mas bajo de genes mal anotados.

Cameron (2014a) menciona que los métodos de anotación automatizados no han sido adoptados ampliamente en los mitogenomas de insectos, debido a las dificultades que se presentan. DOGMA (Cameron, 2014a; Wyman, Jansen, & Boore, 2004) fue el primer paquete desarrollado. Sin embargo, su base de datos interna de mitogenomas curados está extremadamente desactualizada. MOSAS (Cameron, 2014a; Sheffield, Hiatt, Valentine, Song, & Whiting, 2010) utilizó métodos de inferencia de tRNAs refinados y una base de datos interna más grande y centrada en insectos; sin embargo, el programa ya no está alojado en la web para el momento de la publicación de Cameron (2014a), por lo que en esta investigación no pudo ser utilizada. MITOS (Bernt, Donath, et al., 2013;

Cameron, 2014a) es el programa de anotación más avanzado que se haya producido, y fue el programa utilizado en esta investigación para verificar la anotación realizada previamente por los investigadores, sin embargo, sus anotaciones de genes codificadores de proteínas son muy poco confiables (en la medida en que claramente no se aplica correctamente el código genético elegido). Por lo tanto, el bajo porcentaje de errores de anotación que presentan los hexápodos en comparación con un grupo taxonómico como mamíferos (Prada & Boore, 2019) podría deberse a las dificultades presentes para realizar una anotación certera y, de igual forma, una identificación y verificación de las mismas, por la falta de herramientas bioinformáticas fiables al momento de realizar esta investigación, especialmente en genomas donde se han encontrado cambios importantes en la organización del mitogenoma como son los órdenes Phthiraptera (piojos parásitos) (Liu et al., 2017; Shao, Kirkness, & Barker, 2009) Psocoptera (piojos de los libros) (Chen et al., 2014; Liu et al., 2017) y Thysanoptera (trips) (Dickey et al., 2015; Liu et al., 2017).

Las anotaciones incorrectas pueden ser tan extensas, que los errores se pueden propagar a futuras asignaciones, dando como resultado lo que se ha denominado filtración de errores (Prada & Boore, 2019). Esto se evidencia en hexápodos, en los grupos con la tasa más alta de errores de anotación, los cuales son Orthoptera con *trnH*, *trnY* y *trnC*, y de igual forma, en grupo Lepidoptera en *trnH*, *trnP* y *trnL* donde el 100% de las reorganizaciones reportadas en estos genes son falsas. Por lo tanto, las bases de datos están tan contaminadas que podrían llegar a ser casi inútiles si no se evita que los errores se propaguen fuera de control, y para ello, la curación de los datos por parte de la comunidad científica debe ser esencial (Brenner, 1999; Prada & Boore, 2019). La anotación precisa y coherente de los genes mitocondriales es fundamental y se ha convertido en un requisito previo para realizar análisis posteriores, en particular, para la genómica y filogenética comparativas (Donath et al., 2019).

Los errores de anotación más comunes según Boore (2006) y Donath et al. (2019) son:

1) Designaciones de genes en una cadena incluso cuando algún subconjunto de genes debe marcarse como complemento inverso, 2) Designaciones genéticas incorrectas, 3) Falta de algunas designaciones de genes, incluso cuando se pueden encontrar fácilmente, 4) Inconsistencia en los nombres de genes y 5) Asignación incorrecta de codones de inicio y parada. Todos estos errores que se engloban en su gran mayoría en reorganizaciones falsas, así como asignación incorrecta de nombres y un gran número de denominaciones para un mismo gen, se presentan en la base de datos realizada en esta investigación para hexápodos.

Todo lo anteriormente mencionado, subraya la importancia de implementar una anotación manual, como es realizado por otros autores (Popadin, Mamirova, & Kondrashov, 2007) y en esta investigación. En particular, Popadin et al. (2007) sugiere realizar la verificación de las anotaciones de genes de tRNAs manualmente para garantizar un mayor nivel de fidelidad en la anotación, debido a que presenta la ventaja inherente de un tasa de error más baja en comparación con los métodos automatizados. Sin embargo, un ensamblaje manual de una base de datos extensa consume muchos recursos, por lo que, se han planteado alternativas en donde se podrían implementar scripts en NCBI (Boore, 2006; Prada & Boore, 2019) para detectar de manera automatizada los errores más obvios y comunes, usando un BLAST para una inspección más cercana de las anotaciones incorrectas.

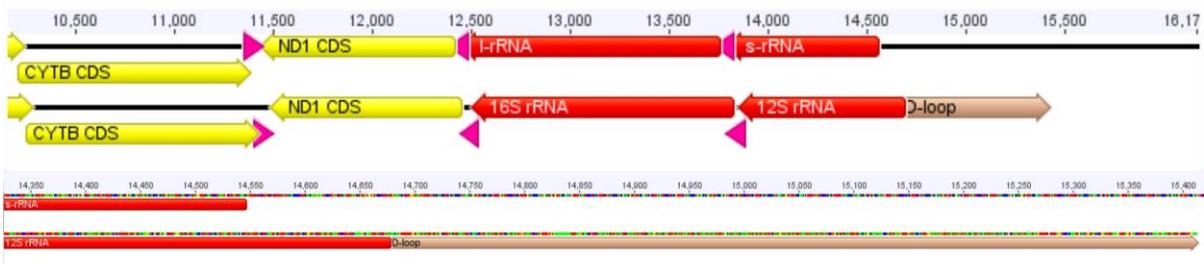
En lo que se refiere a la región control del mitogenoma, de 1198 organismos analizados, aproximadamente el 30% de las secuencias de hexápodos carecen de RC o de una correcta anotación en esta. La RC en insectos es la región peor anotadas del mtgenoma, presentándose errores en 309 secuencias. 148 especies de hexápodos analizadas no poseen secuenciación de la RC de su mitogenoma (14,2%) siendo representados en su gran mayoría por el orden Blattodea, en el cual solo 31 individuos de 146 poseen RC. 161 individuos de hexapoda no presenta anotación de RC (15,5%), los cuales, en su gran mayoría, corresponden a organismos del orden Coleoptera, esto se encuentra ejemplificado en la Figura 3.

Figura 3. Ejemplificación errores de anotación o ausencia de la región control en a) genomas que carecen de secuenciación de RC y b) genomas sin anotación de RC.

a) Blattodea, *Atlantitermes oculatissimus* sin secuencia de región control y *Blaptica dubia* con una correcta anotación de RC



b) Coleoptera, *Apatides fortis* sin anotación en la región control y *Apriona swainsoni* con una correcta anotación de RC



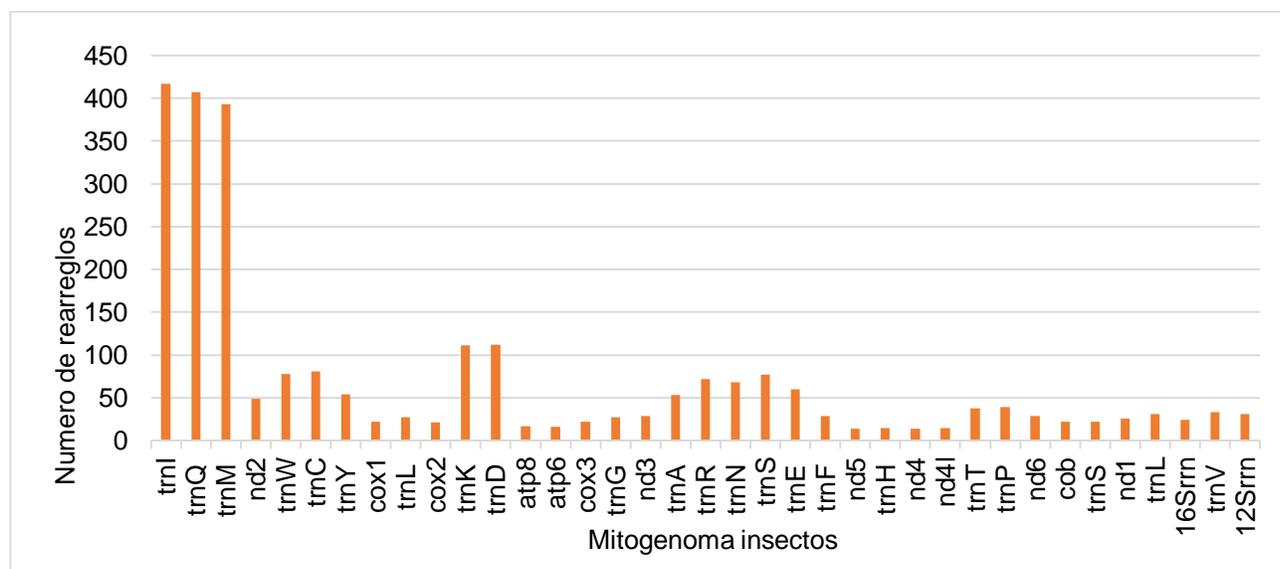
Fuente: Autor. RC (región control)

Como se mencionó anteriormente, los métodos de anotación automatizados no han sido adoptados en insectos, debido a las dificultades que se presentan. Hoy en día no existen anotadores disponibles específicamente para RC en metazoa, por lo que realizar anotaciones de regiones hipervariables y ricas en A+T como lo es la RC de insectos plantea como un gran desafío (Taylor, McKechnie, Pierce, & Kreitman, 1993). Taylor et al. (1993) informaron que el conocimiento de la función y evolución de la región control mitocondrial se ve obstaculizado por la falta de datos para una variedad de grupos en diferentes niveles taxonómicos. En esta investigación se encontró un porcentaje considerable de falta de anotaciones o secuenciación, por lo que se demuestra que esto aún sigue siendo un desafío para los análisis realizados en la región control y que la falta de herramientas bioinformáticas robustas podría explicar el alto nivel de error en la anotación de una zona tan particular como lo es la RC.

4.2 VARIABILIDAD ESTRUCTURAL

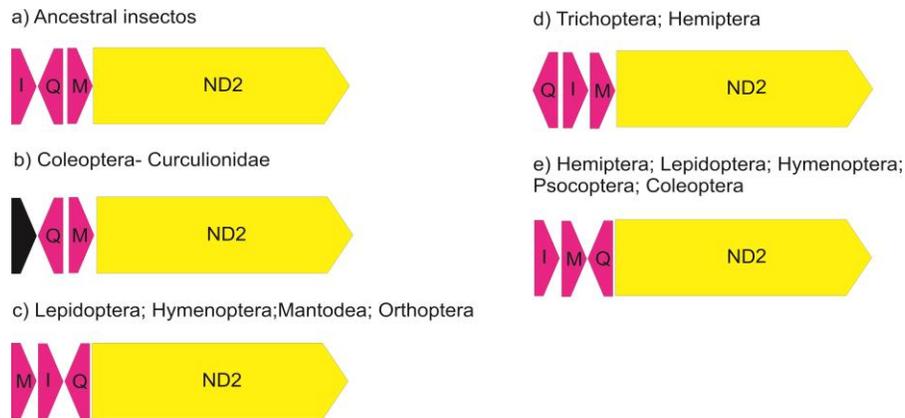
4.2.1 Reorganizaciones en la arquitectura del genoma de hexápodos. De 1198 genomas mitocondriales de hexápodos analizados, 573 mitogenomas (47.8%) poseen al menos una reorganización. De la totalidad de 44326 genes estudiados se presentaron 2595 genes reorganizados (Figura 4), los cuales están representados principalmente por *trnI*, *trnQ* y *trnM* con 417, 407 y 393 rearrreglos, siendo los genes más variables del genoma mitocondrial presentando diversos reordenamientos a lo largo del grupo Hexapoda (Figura 5). En contraste, se pueden observar que dentro del mitogenoma de insectos existen bloques relativamente conservados, como es el caso de genes como *atp8-atp6* (17 y 16 rearrreglos) y *nd4-nd4l* (14 y 15 rearrreglos), los cuales poseen un nivel de reorganización mucho más bajo que otras zonas del genoma hasta en los casos de órdenes con una alta tasa de variabilidad como es el caso de Thysanoptera y Phthiraptera. Las inversiones-translocaciones con un 96,6% son los rearrreglos más frecuentes, seguido por las duplicaciones (1,8%) y las deleciones (1,5%) que en comparación presentan una frecuencia mucho menor.

Figura 4. Número de rearrreglos presentes por cada gen del genoma mitocondrial en hexápodos.



Fuente: Autor.

Figura 5. Ordenamiento ancestral de insectos (a) junto con las inversiones en trnI, trnQ y trnM más frecuentes en diferentes grupos de Hexapoda.



Fuente: Autor.

Se ha planteado anteriormente que Bilateria se encuentra entre los sistemas genómicos más estables en orden y estructura (Cameron, Yoshizawa, Mizukoshi, Whiting, & Johnson, 2011). Se propuso que si existen cambios excepcionales, estos se restringen a grupos aislados de Bilateria, como por ejemplo, la pérdida de genes codificadores de proteínas en nematodos superiores (Lavrov & Brown, 2001) y de *tRNAs* en algunos ácaros (Domes, Maraun, Scheu, & Cameron, 2008). Los artrópodos son junto con los Cordados, el filo con el ADNmt mejor estudiado (Black & Roehrdanz, 1998), dentro de estos, los insectos son un grupo con un alto nivel de conservación y que mantienen la condición ancestral de Hexapoda, o derivan ligeramente de esta (Hassanin, 2006). No obstante, los resultados encontrados en este trabajo no concuerdan con lo antes mencionado. Hexapoda se puede considerar como un grupo altamente variable debido a su elevado nivel de reorganización (48%), estos resultados son similares a los encontrados en grupos como anfibios (48%) que presentan igualmente un gran número de rearrreglos y difiere abundante de grupos como reptiles (39%) y aves (7%).

Anteriormente se ha reportado que genes específicos como los *tRNAs* exhiben una mayor variabilidad, en contraste, con los genes codificadores de rRNA y de proteínas

que muestran una variación mínima, lo que concuerda con lo planteado anteriormente (Dowton & Austin, 1999a; Pääbo, Thomas, Whitfield, Kumazawa, & Wilson, 1991). Parece que regiones como el tRNA pueden “moverse” a lo largo de la molécula debido a su capacidad para formar estructuras estables de tallo y asa (Stanton, Daehler, Moritz, & Brown, 1994). Para el genoma mitocondrial se reporta que casi el 80% de los reordenamientos que afectan la arquitectura del mitogenoma involucran a los RNA de transferencia (Bernt, Braband, Schierwater, & Stadler, 2013), este trabajo corrobora esta dato, presentando un 86,4% de reorganizaciones en tRNAs para insectos. Por lo tanto, los tRNA son considerados los genes con mayor movilidad y diferentes tRNA se mueven a diferentes ritmos (Moritz, Dowling, & Brown, 1987).

Se ha propuesto que los tRNAs que se encuentran individualmente (es decir, entre dos genes que codifican proteínas) son menos móviles (Cha et al., 2007), como por ejemplo el *trnH* que se encuentra entre *nd5* y *nd4l*, y el *trnG* que se encuentra entre *cox3* y *nd3*, entre otros. Mientras que el cluster que engloba los genes *trnI*, *trnQ* y *trnM*, parece ser una de las regiones más móviles dentro de los artrópodos, por el hecho que está adyacente a la región control (Boore, 1999), lo cual concuerda con lo encontrado en los análisis realizados en esta investigación a 1198 genomas de Hexápodos (Figura 5). Se propusieron varios mecanismos, como la inversión, la transposición, la recombinación intramolecular, la duplicación y la eliminación en tándem para explicar los reordenamientos. Y, aunque, la duplicación en tándem y los mecanismos de eliminación múltiple podrían explicar el origen de la mayoría de los reordenamientos encontrados hasta ahora, algunos de los reordenamientos observados no pueden explicarse por los mecanismos anteriores, y otros mecanismos desconocidos deben estar actuando (Stanton et al., 1994) (Van der Giezen, 2011).

Dentro de la superclase Hexapoda en esta investigación se identificaron 11 grupos que presentan el ordenamiento ancestral para Insecta reportado por Cameron (2014) (Figura 1), los cuales se encuentran resaltados mediante un asterisco en la Tabla 2, y 21 órdenes con algún tipo de reorganización a diferentes niveles. Los eventos de reorganización más leves se pueden encontrar en ordenes como Archaeognatha, Blattodea y Ephemeroptera

y los eventos con un alto nivel de reorganización están representados principalmente en órdenes como Lepidoptera, Phthiraptera e Hymenoptera (Tabla 2).

Dentro de los órdenes con una reorganización leve, la mayoría de los casos son translocaciones-inversiones específicas como por ejemplo el caso de *Cryptocercus meridianus*; Blattodea, donde *trnS* ubicado entre *trnN* y *trnE* difiere de esta posición y se encuentra entre *nd3* y *trnA* o duplicaciones muy puntuales en tRNAs como por ejemplo la triplicación de *trnR* en género *Creobroter*; Mantodea, estas reorganizaciones en la mayoría de los casos no involucran una gran cantidad de genes y se presentan aleatoriamente en los diferentes organismos dentro de los grupos.

En los órdenes con un alto nivel de reorganización se pueden encontrar grupos como Orthoptera, Lepidoptera, Psocoptera y Diptera donde los reordenamientos se encuentran a lo largo de un grupo de organismos involucrando más de un gen. En los casos de los dos primeros ordenes mencionados, regiones específicas presentan un nivel de reorganización alta en la mayoría de los organismos de un orden, en Orthoptera 76 de los 139 genomas analizados presentan variación en el orden de genes de la región *trnK* y *trnD* y en Lepidoptera, 282 especies de 294 revisadas poseen una alteración de la posición de *trnI*, *trnQ* y *trnM* (Figura 5, c). A diferencia del orden Diptera y Psocoptera donde pocos organismos de una familia específica están altamente reorganizados en muchas regiones del mitogenoma como es el caso de la familia Cecidomyiidae; Diptera y Liposcelidae; Psocoptera. En grupos como Hymenoptera, Phthiraptera y Thysanoptera el nivel de reorganización es muy elevado, el 84% de los organismos de Hymenoptera junto con los últimos dos órdenes mencionados tienen una arquitectura mitocondrial propia (54 individuos), diferente al resto de las variaciones presentes en Hexapoda. En Hymenoptera, individuos filogenéticamente cercanos presentan el mismo nivel de variabilidad (8), por ejemplo, organismos del mismo género. Sin embargo, esto se produce de forma excepcional, debido a que en la mayoría de los casos (42 individuos) tienen un mitogenoma con organizaciones particulares irrepetibles en el resto del orden. En Thysanoptera el nivel de reorganización es muy elevado, sin embargo, se pueden observar bloques de genes reorganizados que se mantienen a lo largo de los grupos,

como es el caso de la familia Thripidae, donde se mantiene la reorganización *nd1*, (*trnM* o Ausencia), *trnA*, *trnF* y *rrn12S* o el bloque *trnC*, *nd6*, (Ausencia o *trnP*), *trnV*, *rrn16S* y *trnS*, a lo largo de los individuos. Por otra parte, en el caso del orden Phthiraptera el grado de reorganización es tan alto que no se puede encontrar un patrón o bloque de reorganización conservado.

Tabla 2. Numero de eventos de duplicación, deleción e inversión-translocación encontrados en los 32 órdenes de superclase Hexapoda. Los órdenes que no presentan rearreglos se indican con un asterisco.

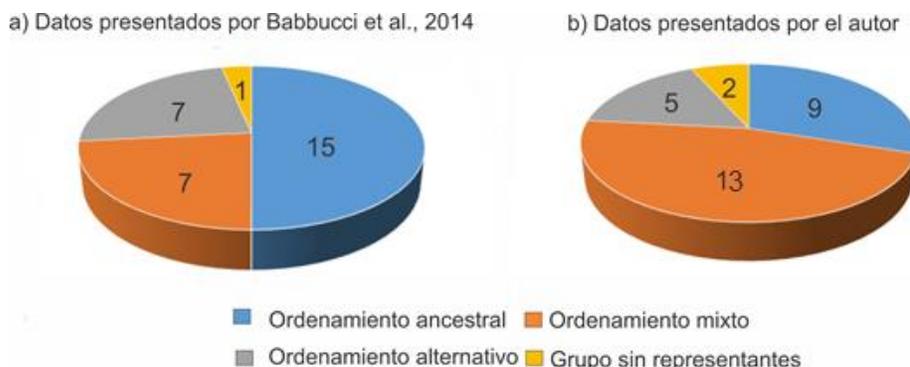
Clase	Ordenes	Duplicación	Deleción	Inversión- Translocación	Total
<u>Ectognatha</u>	Archaeognatha	0	0	2	2
	Blattodea	0	0	4	4
	Coleoptera	0	7	14	21
	Dermaptera	0	1	18	19
	Diptera	5	0	121	126
	Ephemeroptera	1	0	0	1
	Hemiptera	5	12	179	196
	Hymenoptera	10	12	424	446
	Lepidoptera	2	0	869	871
	Mantodea	11	0	3	14
	Mantophasmatodea*	0	0	0	0
	Mecoptera*	0	0	0	0
	Megaloptera*	0	0	0	0
	Neuroptera	0	0	32	32
	Odonata*	0	0	0	0
	Orthoptera	1	1	201	203
	Phasmatodea	3	0	3	6
	Phthiraptera	7	2	224	233
	Plecoptera*	0	0	0	0
	Psocoptera	0	2	122	124
Raphidioptera*	0	0	0	0	
Siphonaptera*	0	0	0	0	

Clase	Ordenes	Duplicación	Delección	Inversión- Translocación	Total
	Strepsitera	0	0	3	3
	Thysanoptera	2	1	192	195
	Trichoptera	0	0	9	9
	Zoraptera*	0	0	0	0
	Zygentoma*	0	0	0	0
<hr/>					
<u>Entognatha</u>	Diplura*	0	0	0	0
	Entomobryomorpha*	0	0	0	0
	Poduromorpha	0	0	6	6
	Protura	0	1	80	81
	Symphyleona	0	0	3	3
	Total	47	39	2509	2595

Fuente: Autor.

Cameron (2014b) reportó anteriormente que los cambios que Insecta presenta son relativamente poco comunes, están limitados a grupos derivados y se encuentran en mtgenomas altamente reorganizados de organismos como piojos (Cameron, Johnson, & Whiting, 2007) y avispas (Dowton, Cameron, Dowavic, Austin, & Whiting, 2009). Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran que de los 32 órdenes de la superclase Hexapoda analizados, más de la mitad (65%) poseen algún nivel de reorganización, presentándose eventos de cambio en la disposición de los genes desde los grupos basales como lo son Protura, Archaeognatha, Ephemeroptera y Dermaptera hasta los grupos más derivados como Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera, contrario a lo reportado anteriormente.

Figura 6. Comparación entre la cantidad de órdenes pertenecientes a cada distribución de reorganizaciones reportados en el 2014 y los presentados en esta investigación.



Fuente: Información de Babbucci, Basso, Scupola, Patarnello, and Negrisolo (2014) y el autor. Órdenes pertenecientes a cada arquitectura (Anexo 1).

Investigaciones recientes reconocen que la clase Insecta presenta una amplia gama de órdenes genéticos alternativos con una distribución muy desigual, considerándose firmas moleculares para varios linajes (Babbucci et al., 2014); estos investigadores plantearon la distribución de las diferentes reorganizaciones en 30 órdenes de Insecta (Figura 6a); en donde para el orden Zoraptera no existían datos de ADNmt disponibles. Los órdenes Embioptera, Grylloblattodea e Isoptera se incluyeron en la filogenia realizada por Babbucci et al. (2014), pero para los dos primeros grupos hoy en día no existen datos mitocondriales disponibles en la base de datos NCBI, y el último grupo, actualmente es considerado parte del orden Blattodea, siendo clasificado como familia Termitidae (cucarachas sociales) (Inward, Beccaloni, & Eggleton, 2007). En comparación con lo anteriormente reportado, este trabajo encontró en 28 órdenes de la clase Insecta un menor número de grupos ancestrales (9) dentro los cuales se encuentra Zoraptera, un aumento de grupos (14) con organizaciones mixtas incluyendo ahora los órdenes Blattodea, Ephemeroptera, Phasmatodea, Mantodea y Psocoptera y, finalmente, 5 grupos únicamente con órdenes alternativos debido a la presencia de ordenamiento ancestral en el orden Psocoptera (Figura 6b). Además, esta investigación incluye 2 órdenes completamente ancestrales, 2 mixtos y 1 con ordenamientos alternativos de la

Clase Ectognatha. Por lo que esta comparación reafirma la alta tasa de reorganización en genomas mitocondriales en todo el grupo Hexapoda (47,8 %), el cual aumenta a medida que se secuencian nuevos genomas mitocondriales.

Dowton et al. (2009) reportó que los reordenamientos de genes mitocondriales parecen ocurrir con menos frecuencia en vertebrados que en invertebrados. Los insectos son los únicos organismos entre los invertebrados con la capacidad de volar, y por ello, se ha concluido que estos alcanzan las tasas más altas de metabolismo aeróbico en el Reino Animal y poseen un abundante transporte de O_2 a través de sus sistemas traqueales (Sacktor, 1976; Yang, Xu, Xu, Guo, & Yang, 2014). Se informó que los insectos poseen tasas de consumo de O_2 por unidad de superficie más altas que las estimadas en mamíferos como consecuencia de mayor recambio enzimático durante el vuelo, esto se logra mediante (i) un alto contenido de enzimas respiratorias por unidad de masa muscular y (ii) el funcionamiento de estas enzimas a altas velocidades fraccionales (Suarez, Staples, Lighton, & Mathieu-Costello, 2000). Las tasas metabólicas específicas de masa obtenidas para las abejas voladoras por Suarez et al. (2000) son aproximadamente tres veces mayores que las medidas en colibríes revoloteando (Suarez, 1992) y 30 veces mayores que las alcanzadas por atletas humanos (Blomstrand, Ekblom, & Newsholme, 1986). Por lo tanto, debido a que la mitocondria produce continuamente especies reactivas del oxígeno (Balaban, Nemoto, & Finkel, 2005), una alta tasa metabólica alta podría estar ligada a una mayor producción de radicales libres y por lo tanto a una predisposición a sufrir reorganizaciones en la arquitectura del genoma mitocondrial (Dowton & Campbell, 2001).

Además de esta tasa metabólica elevada, otros factores podrían estar ligados a aumentar el nivel de rearreglos, Castro, Austin, and Dowton (2002) reportaron que un aumento en la tasa de evolución molecular mitocondrial podría coincidir con una transición evolutiva al estilo de vida parasitario, presente en los órdenes Hymenoptera y Phthiraptera dentro de los insectos. Se ha reportado una tasa más alta de divergencia en secuencias de ADNmt en las avispas parásitas en comparación con las avispas no parásitas (Dowton & Austin, 1995) y resultados similares han sido encontrados en piojos

parásitos (Hafner et al., 1994) y plantas parásitas (Nickrent & Starr, 1994). Las posibles causas de la correlación entre estas dos variables son una mayor tasa de especiación (Page, Lee, Becher, Griffiths, & Clayton, 1998), un mayor flujo de mutágenos o una disminución en la eficiencia de reparación del ADN (Dowton & Campbell, 2001).

Se ha reportado previamente que la respuesta adaptativa mutua entre parásito y hospedero, podría explicar su alto nivel de reorganización mediante el modelo de coevolución llamado Carrera Armamentista Evolutiva (CAE) (Carius, Little, & Ebert, 2001). El modelo asume que parásito y hospedero evolucionan constantemente, primero el parásito reduce la adecuación del hospedero y éste adquiere mecanismos de defensa contra el parásito, a través de mutación o de recombinación. El hospedero con este nuevo mecanismo de defensa aumenta su adecuación y el carácter se dispersa dentro de la población. Eventualmente, una nueva mutación o recombinación aparece en la población del parásito y lo hace capaz de superar la nueva defensa. Si esta contra-defensa aumenta, la adecuación del parásito, se esparcirá en la población y será capaz de parasitar al grupo antes protegido (Bush, Fernández, Esch, & Seed, 2001).

Con respecto a Phthiraptera, se han planteado que su elevado nivel de rearreglos, es debido a una alta tasa de sustituciones ligeramente nocivas debido a los repetidos cuellos de botella en las poblaciones tras la transmisión entre hospedadores, la endogamia en hospedadores individuales (Page et al., 1998).

De igual forma, la idea de transferencia génica por la interacción dada entre parasito-hospedero (IPH), puede explicar el alto nivel de reorganización encontrado en grupos como Phthiraptera e Hymenoptera. Esta fue introducida por Howell (1985) y se basa en la habilidad de algunos parásitos de producir moléculas análogas a las de su hospedero y así evitar el reconocimiento, siendo esto posible por las secuencias de ADN en los parásitos cercanamente relacionadas a la del hospedero producto de la incorporación directa del material genético (Hernández, 2011).

Existe un caso bien documentado, en el que un ácaro semiparasítico, *Proctolaelaps regalis*, logró la transferencia de genes entre dos especies de *Drosophila*, alimentándose de los huevos por medio de una perforación (Houck, 1994). De la misma manera, varios informes concluyen que las interacciones ecológicas cercanas aumentan las posibilidades de transferencias genéticas horizontales (THG) (Venner et al., 2017). Anteriormente se ha reportado, la presencia de la secuencia Alo-3, un péptido antifúngico que se encuentra en muchas plantas, y que en el reino animal solo se ha reportado en el escarabajo *Acrocinus longimanus*, como producto un evento de TGH que involucra la transferencia de esta secuencia de plantas a insectos (Husnik et al., 2013). Para piojos parásitos, aunque Nakabachi et al. (2006) propusieron que la integración de genes esenciales de los endosimbionte que habitan en estos organismos podría ser posible, aun no se han encontrado genes de origen procariota por lo que no existe evidencia de transferencia génica en Phthiraptera (Kirkness et al., 2010). Sin embargo, para Hymenoptera se informó el primer caso reportado de transferencia horizontal de dos copias de un supuesto péptido antimicrobiano (AMP) con un origen claro en el orden Hymenoptera, presentes en el megaplasmido pSCL4 de *Streptomyces clavuligerus*, debido a la interacción estrecha previamente reportada en diferentes especies de himenópteros con *S. clavuligerus* debido a los usos protectores dados a los antibióticos producidos este (Ayala-Ruano, Santander-Gordón, Tejera, Perez-Castillo, & Armijos-Jaramillo, 2019)

En relación con Hymenoptera, las avispas parásitas pasan su etapa de vida embrionaria dentro de otro organismo, en la mayoría de los casos pasan desapercibidas por el sistema inmunitario del huésped posiblemente por la IPH mencionada anteriormente, pero en algunos casos, el huésped genera una respuesta inmunitaria (Carton & Nappi, 1997). La encapsulación del huevo con hemocitos que lo bombardean con radicales de oxígeno en un intento de destruirlo es la primera respuesta del sistema inmunológico (Nappi, Vass, Frey, & Carton, 1995). En ciertas asociaciones huésped-parasitoide, algunos huevos sobreviven a este ataque, y estos huevos podrían contener una proporción relativamente alta de genomas mitocondriales reorganizados por la alta exposición a los radicales libres (Dowton & Campbell, 2001).

Se ha planteado, de igual forma, que posiblemente dentro de las adaptaciones al estilo de vida parasitario, otro de los motores de cambio es aparición la cintura como una adaptación mecánica y fisiológica para mejorar el vuelo, que perduro aún en Himenópteros de Aculeata (Hunt, 2007). Los músculos del vuelo tienen una demanda metabólica muy alta, otros insectos pueden metabolizar ácidos grasos, pero los Apocrita dependen de trehalosa. La constricción de la cintura mejoró la eficiencia metabólica de los músculos del vuelo por la presencia de sacos de aire grandes junto a los intestinos y órganos reproductivos en el gáster, y de igual forma adaptaciones como que este último sea más maniobrable al ser más pequeño en Apocrita constituyen una importante adaptación previa al estilo de vida parasitoide (Hunt, 2007; Kristensen, 1999).

Otro posible factor que podría ser considerado un motor de cambio del mitogenoma en diferentes linajes de insectos, es el efecto causado por el amplio uso de piretroides (pesticidas) para disminuir los problemas de salud basados en vectores y para aumentar el rendimiento de campo contra las plagas agrícolas (Davies, Field, Usherwood, & Williamson, 2007; Guven, Sevgiler, & Taskin, 2018). En este trabajo, se reportaron especies de hexápodos con un genoma mitocondrial altamente reorganizados reportados previamente como plagas de cultivos o vectores de enfermedades, por ejemplo, Coleoptera - Curculionidae, (gorgojos) plagas importantes del grano almacenado (Plague, Voltaire, Walsh, & Dougherty, 2010). Diptera – Cecidomyiidae, plagas graves de cereales (Makni, Marrakchi, & Pasteur, 2000). Culicidae - *Anopheles*: vector de *Phasmodium* (Briegel, 1990), *Culex*: vector de Virus del Nilo (Turell, O'Guinn, Dohm, & Jones, 2001), *Aedes*: vector de *Flavivirus* (Paul, Harrington, & Scott, 2006), entre otros. Hemiptera – Aleyrodidae, (mosca blanca) se consideran una de las plagas de insectos más importantes (Ángel et al., 2016). Psocoptera, plaga de alimentos almacenados (Turner, 1994) y Thrips, plaga de cultivos (Funderburk, 2009).

Aunque existen muy pocos estudios sobre las alteraciones del ADN mitocondrial (ADNmt) inducidas por piretroides, según los resultados del estudio de Wang and Zhao (2012) la frecuencia de mutación del ADNmt se ha incrementado en organismos expuestos a pesticidas (incluidos los piretroides), por lo tanto, posiblemente el aumento

de la frecuencia de mutaciones de ADNmt puede ser el resultado de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) debido a la adyacencia del ADNmt a los posibles centros de formación de ROS en las mitocondrias (Bendich, 2010; Guven et al., 2018). Curiosamente, hay algunos estudios relacionados con la unión de los piretroides a la macromolécula de ADN a través de diferentes mecanismos de enlace (Ahmadi & Ghanbari, 2014). Por ejemplo, mediante intercalación con el ADN o unión principalmente por enlaces de hidrógeno entre el ADN y diferentes moléculas del pesticida, donde las secuencias ricas en AT son sitios más susceptibles a esta unión (Y. K. Zhang, Zhang, Li, & Hu, 2013).

4.2.2 Filogenia de inversiones-translocación, duplicaciones y deleciones. Para estas filogenias fueron utilizadas 573 secuencias mitocondriales de hexápodos, los cuales, presentan al menos un evento de reorganización (Figura 7 a-b). Los organismos que poseen los mismos rearrreglos, es decir, genomas completamente idénticos fueron colapsados en grupos como se muestra en la Anexo 2a.

Como se evidencia en la Figura 7a, en la filogenia resultante de inversiones-translocaciones de hexápodos se pueden identificar cuatro grandes grupos monofiléticos, el primer grupo monofilético (resaltado en verde- A1), es el grupo más externo de la filogenia y pertenece a las 6 especies del orden Phthiraptera, estos organismos poseen la distancia genómica más alta con respecto a los demás grupos de esta filogenia, debido a su alto nivel de cambio en la disposición de los genes. El segundo grupo monofilético (resaltado en azul) está conformado principalmente por Thysanoptera (A71), Dermaptera, Strepsitera y el orden Diptera con la familia Culicidae. El ancestro de este grupo es A10 (Ancestros hipotéticos ejemplificados en la Figura 8), al igual que para los dos grupos monofiléticos restantes.

El tercer grupo monofilético (señalado en morado en la Figura 7a) está compuesto a grandes rasgos principalmente por el orden Lepidoptera (A87) (Figura 8) y algunas familias de Hymenoptera como Mutillidae, Vespidae y Formicidae. El último grupo monofilético encontrado (señalado en café, Figura 7a) está compuesto por la familia

Aleyrodidae del orden Hemiptera, las familias Megachilidae, Melittidae, Colletidae y Apidae del orden Hymenoptera agrupadas por A40 (Figura 8) y todas las especies reorganizadas pertenecientes al orden Neuroptera. Esta filogenia muestra que en algunos casos la mayoría o totalidad de alguna familia u orden se encuentra agrupado en alguna de las ramas del árbol por su alta similitud como se evidencia en el caso del orden Orthoptera que se ubica en entre el grupo monofilético 1 y el 2, donde se reúnen la mayoría de las familias del orden (Grupo 5 – Anexo 2a). Por el contrario, otros organismos como es el caso de la mayoría de las especies del orden Diptera y Hemiptera se encuentran distribuidas a través de la filogenia agrupándose rara vez por especies muy cercanas por su considerable divergencia y falta de similaridad.

Con respecto a las duplicaciones presentes en la filogenia de inversiones-translocaciones, organismos de los órdenes Hymenoptera, Orthoptera y Thysanoptera presentan duplicaciones compartidas de los *trnS*, *trnL* y *trnM*. En cuanto a las deleciones, los órdenes Hemiptera, Hymenoptera, Thysanoptera, Psocoptera y Phthiraptera comparten la delección de genes como los *trnI*, *trnQ*, *trnA*, *trnG* y *trnS*. Es importante recalcar la duplicación del gen codificante *cox2* en *Falcolipeurus quadripustulatus* del orden Phthiraptera, junto con las deleciones de *nd4I* en *Liposcelis keleri* del orden Psocoptera y de *atp8* en *Haplothrips aculeatus* del orden Thysanoptera.

La pérdida o adquisición es poco frecuente en genes codificantes, sin embargo en insectos se han reportado diversos casos, en Phthiraptera se encontró una duplicación de *cox2*, evento que solo se ha presentado en el ADN mitocondrial de bivalvos ligado a una herencia doblemente uniparental (DUI) la cual es una excepción fascinante a la herencia matrilineal (Passamonti, Ricci, Milani, & Ghiselli, 2011). En Psocoptera, se identificó la pérdida de *nd4L* en *Liposcelis keleri*, la cual se ha presentado, en la especie del mismo género *L. entomophila* y en las especies *Pthirus pubis* (piojo púbico) y *Haematomyzus elephantis* (piojo de elefante) (Shao et al., 2015; Shao, Zhu, Barker, & Herd, 2012; Shi et al., 2016); la carencia de *nd4L* podría ser explicada por la existencia de un minicromosoma que podría contener este gen y que aún no ha sido identificado (Dickey et al., 2015; Shi et al., 2016). Por último, en el orden Thysanoptera, se encontró

una deleción de *atp8*, el cual, está ausente o altamente modificado en varios grupos filogenéticamente distantes como, por ejemplo, en Chaetognatha, Rotifera, Mollusca, Bivalvia, Nematoda y Platyhelminthes (Gissi, Iannelli, & Pesole, 2008; Gray, 1999).

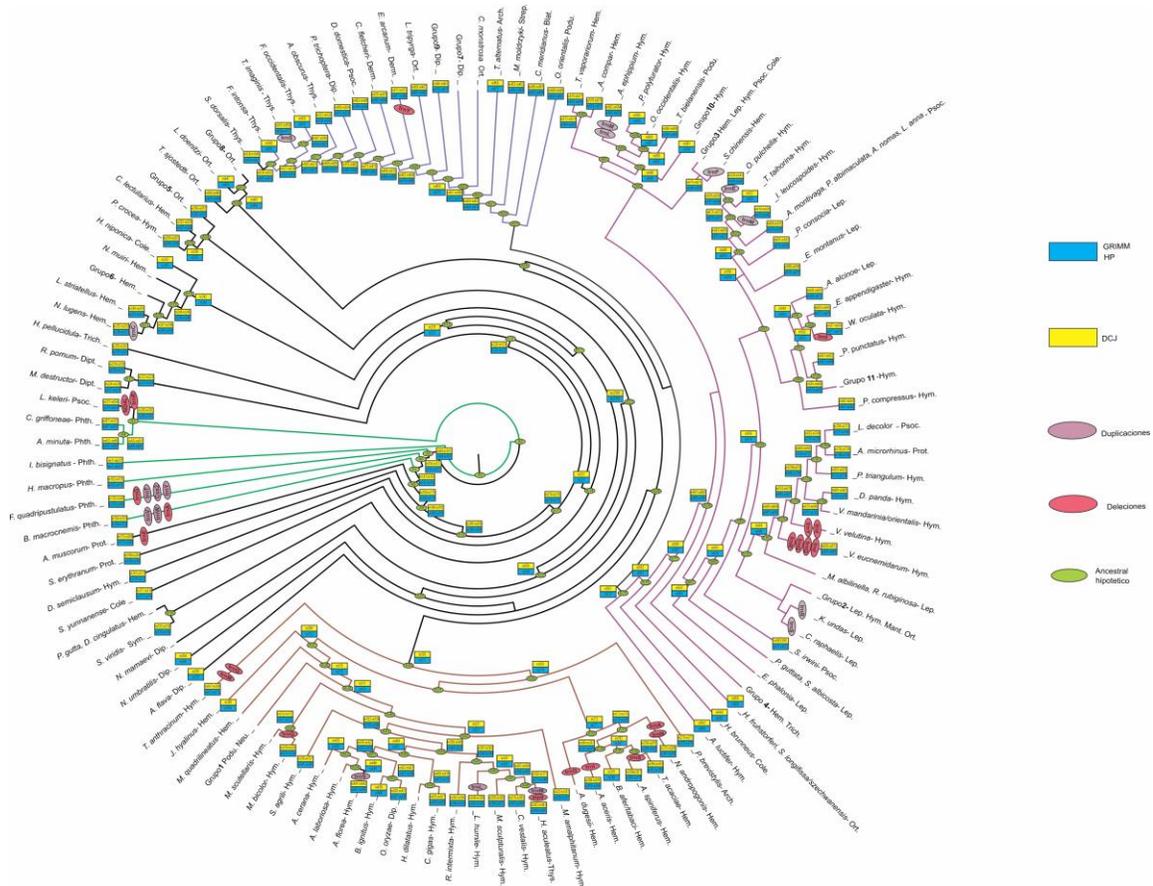
Cabe destacar que los genes que codifican las subunidades del complejo sintasa de trifosfato de adenosina (ATP) muestran una tendencia significativa a ser perdidos o adquiridos por el ADNmt de metazoos, esto debido a que la proteína *atp8* se caracteriza por una longitud corta y variable, y por una mayor conservación de la estructura secundaria en comparación con la secuencia primaria, por lo que ambas características han obstaculizado la anotación de *atp8* (Gissi et al., 2008). La pérdida de genes en insectos podría explicarse por la transferencias de estos al genoma nuclear, el reemplazó funcional por genes nucleares o que los genes que faltan podrían haberse perdido en el largo proceso de evolución, sin embargo, la pérdida de estos genes presentaría serios desafíos metabólicos a las células, por lo que su reemplazo o movilidad serían la explicación más acertada (Shi et al., 2016).

En lo que se refiere a la filogenia de duplicaciones- deleciones (Figura 7b), los individuos de los grupos 1 y 2 (Anexo 2-b) principalmente de los órdenes Hemiptera y Coleoptera son las únicas especies que poseen deleciones particularmente en los *trnI* y en algunos casos de *trnQ* y *trnM*. Como se discutió anteriormente, esto puede ser debido, por la cercanía del clúster *trnI-trnQ-trnM* a la región control, lo que la hace una de las regiones más variable dentro de los artrópodos. En el caso de las duplicaciones, se debe recalcar de igual forma los tRNAs antes mencionados, especialmente la duplicación de *trnM* compartida por *Ramulus hainanense* del orden Phasmatodea y *Parafronurus youi* del orden Ephemeroptera. Es importante resaltar las duplicaciones presentes en el orden Mantodea específicamente en el género *Creobroter* con *trnR* y el género *Schizocephala* con *trnI* (Grupo 3- Anexo 2-b) por las múltiples copias que poseen de estos. El *trnR* especialmente en Mantodea, exhibe una gran diversidad evolutiva, incluida la duplicación, reasignación y reordenamiento. Aunque la copia adicional de este gen es poco común en el mitogenoma animal, varios individuos de Mantodea reportan duplicaciones y triplicaciones de este.

En el caso reportado por Ye, Lan, Zhu, and You (2016) en *Statilia sp.* la similitud de secuencia obvia de *trnW* y *trnR*, lo que indica que el *trnR* duplicado en esta especie se sometió a un proceso de reclutamiento de genes, es decir, *trnR* convertido a *trnW* por mutación puntual en la tercera posición anticodón del triplete "TCG" a "TCA", el cual es el primer caso de reasignación de *tRNA* para un insecto.

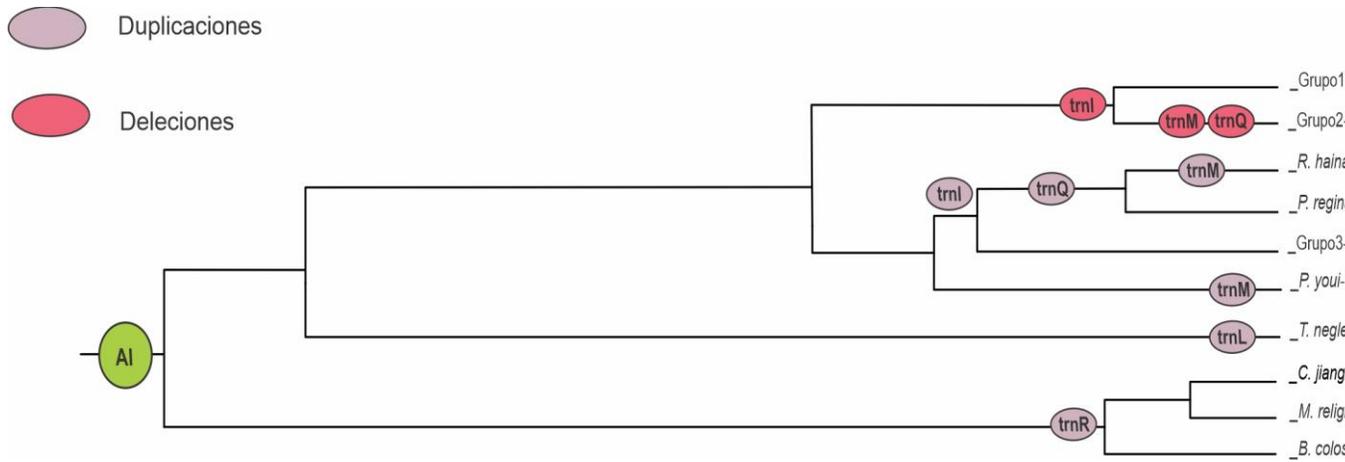
Figura 7. Filogenia de inversiones-translocaciones, duplicaciones y deleciones.

a) Filogenia de inversiones-translocaciones, duplicaciones y deleciones para las especies con rearrreglos de la superclase Hexapoda.



Fuente: Autor.

b) Filogenia de duplicaciones-deleciones para las especies de la superclase Hexapoda que poseen exclusivamente los rearrreglos mencionados. AI- indica el orden de genes ancestrales reportado para Insecta.



Fuente: Autor.

Figura 8. Disposición de genes en los ancestros presentados en la filogenia de inversiones- translocaciones (Figura 7a) y la filogenia taxonómica de los diferentes grupos de hexápodos.



A. IN	Ancestro Insecta
A10	Ancestro General
A1	Ancestro Phthiraptera
A87	Ancestro Lepidoptera
A71	Ancestro Thysanoptera
A22	Ancestro Dermaptera y Ancestro parcial Poduromorpha y Orthoptera
A40	Ancestro parcial Hymenoptera

1000 pb

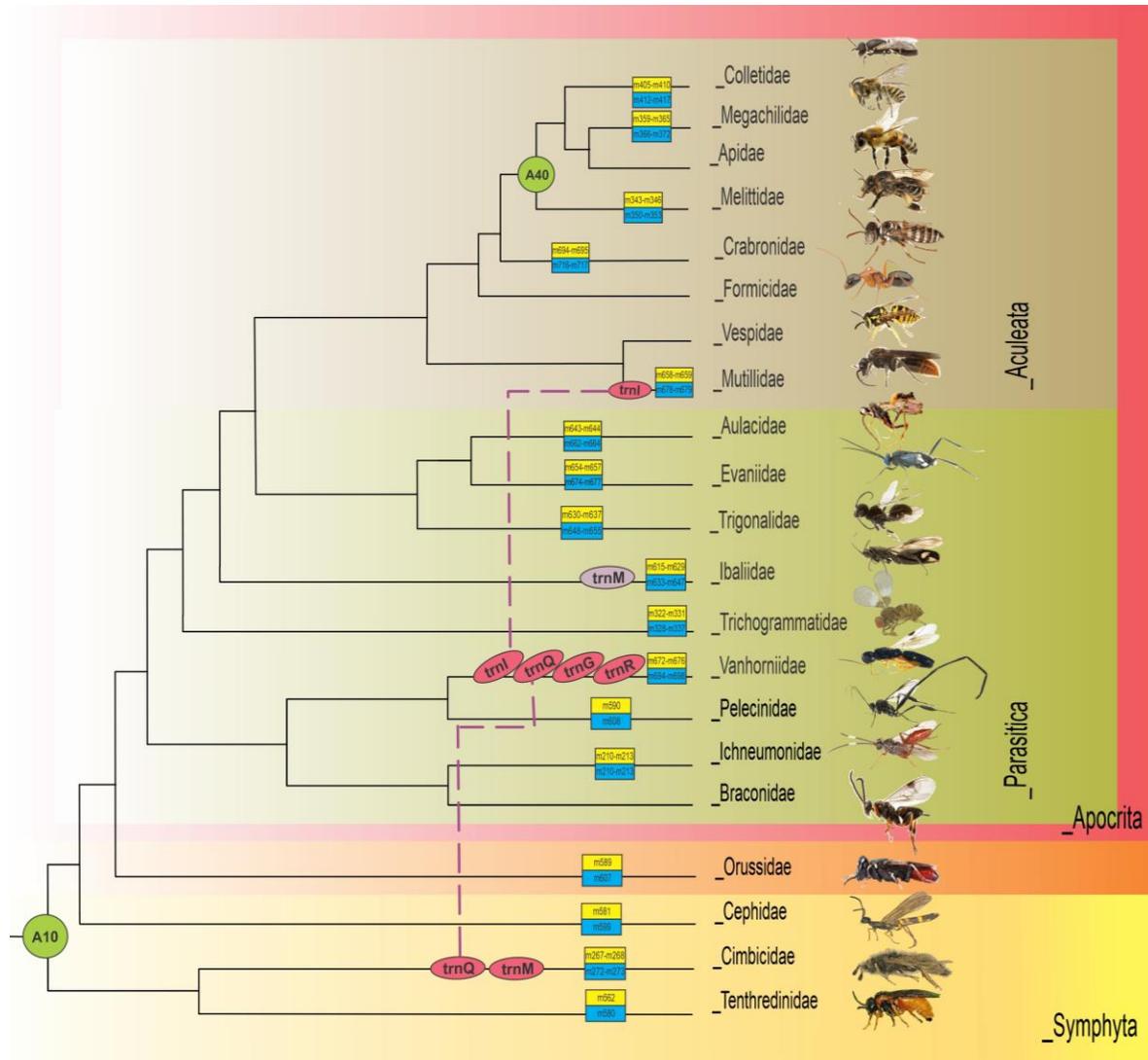
Fuente: Autor.

Mediante la filogenia taxonómica (Figura 9) se evidenció que existen rearrreglos compartidos dentro de grupos taxonómicos, lo que permite hacer una diferenciación dentro de los órdenes, como por ejemplo, la inversión- translocación de *trnD* entre *cox2* y *trnK* que diferencia el suborden Caelifera (verdaderos saltamontes), del suborden Ensifera (grillos verdaderos) que posee una reorganización ancestral en esta zona del mitogenoma y la translocación-inversión de *trnC* entre *ND2* y *W* en todas las especies del orden Neuroptera a excepción de la familia Osmylidae considerado el linaje vivo más antiguo del grupo (Figura 9). Existen casos específicos en familias particulares de grupos que se consideraron ancestrales (más del 50% de los individuos sin reorganizaciones) que no se visualizan en la filogenia pero que presentan eventos de rearrreglos compartidos como es el caso de los grupos 6, 8 y 10 (Anexo 2-a) con Familia Delphacidae del orden Hemiptera, con todas las especies de la familia Culicidae a excepción del género *Sabethes*, en Diptera y la familia Cephidae en Hymenoptera, respectivamente.

Por otra parte, la filogenia permitió encontrar reorganizaciones compartidas en organismos de ordenes filogenéticamente distantes que podrían ser considerados como convergencias, estos eventos de evolución convergentes se muestran en los grupos 1, 2, 3 y 4 en la Anexo 2. Las posibles convergencias se encuentran dentro de grupos tan filogenéticamente distantes como Poduromorpha y Neuroptera o Orthoptera y Lepidoptera-Hymenoptera (Figura 9- Líneas punteadas violetas), lo cual, evidencia que una reorganización completamente idéntica se puede encontrar en ramas muy distantes y variables.

En el caso del orden Hymenoptera, la filogenia taxonómica evidenció que la especie *Vanhornia eucnemidarum*; Vanhorniidae comparte con el organismo *Trichiosoma anthracinum*; Cimbicidae la delección del *trnI* y de igual forma, con la especie *Wallacidia oculata*; Mutillidae la perdida de *trnQ*. Las familias Vespidae, Braconidae, Formicidae y Apidae poseen unas distancias genómicas muy variables a lo largo de todas sus especies, pero de forma general, las familias del orden Hymenoptera presentan unas distancias genómicas particulares, esto debido a que la disposición de genes es similar entre los organismos emparentados, pero difieren entre organismos de otras familias.

Figura 10. Ampliación filogenia taxonómica de las generalidades de los rearrreglos encontrados en la Figura 5a del orden Hymenoptera.



Fuente: Modificada de Peters et al. (2017) y Branstetter et al. (2017)

Los genes mitocondriales podrían haberse movido a lo largo del mismo camino en distintos linajes filogénicos generando reordenamientos homoplásticos. El primer caso reportado en insectos involucró a *Locusta migratoria* (Orthoptera) y *Apis mellifera* (Hymenoptera) que exhiben el mismo arreglo en *trnD trnK* frente a *trnK trnD* (Babbucci

et al., 2014; Flook, Rowell, & Gellissen, 1995). Se han identificado cinco reorganizaciones homoplásticas en insectos presentadas por Babbucci et al. (2014):

1) Transposición de *trnM* crea la disposición *trnM trnI trn-Q* frente a *trnI trn-Q trnM* en *F. fusca* y *Dytrisia* (el clado más grande de los lepidópteros), siendo esta la única reorganización compartida con un orden genómico completamente idéntico (Babbucci et al., 2014), este trabajo complementa esta convergencia reportándola en los organismos presentados en el Anexo 2a- grupo 2.

2) Transposición de *trnT* generando el reordenamiento *trn-P trnT* frente a *trnT trn-P* que ocurrió independientemente tres veces en los ADN mitocondriales de los himenópteros en *D. semiclausum*, *P. triangulum* y *B. ignitus* (Kaltenpoth et al., 2012).

3) La transposición de *trnC* que genera el reordenamiento de *trn-C trnW* frente a *trnW trn-C* encontrado en muchos Neuroptera, en la avispa braconidae *S. agrii* y en la familia Delphacidae (Hemiptera) (K. J. Zhang et al., 2013) de igual forma al caso 1), este trabajo complementa esta convergencia reportándola en los organismos presentados en Anexo 2a- grupo 1.

4) La transposición de *trnR* que produce el reordenamiento *trnR trnA* frente a *trnA trnR* que es característico de los mosquitos de la familia Culicidae, y dos escarabajos, *Peploptera acromialis* (Chrysomelidae) y *Naupactus xanthographus* (Curculionidae) (Song, Sheffield, Cameron, Miller, & Whiting, 2010).

5) Y por último, la transposición de *trn-Y* creando el reordenamiento *trn-Y trn-C* frente a *trn-C trn-Y* en la familia Ichneumonidae en *D. semiclausum*, el género *Enicospilus* (Hymenoptera) (Wei, Shi, He, Sharkey, & Chen, 2009) y en moscas blancas de la familia Aleyrodidae (Hemiptera) (Thao, Baumann, & Baumann, 2004), presentando estos últimos 4 ejemplos distintos órdenes genómicos, es decir, que la arquitectura de estos organismos no son idénticos.

Para hexápodos, este trabajo, complementa lo reportado anteriormente presentando convergencias en grupos filogenéticamente distantes en el Anexo 2a – Grupos 1-4 y paralelismos en grupos filogenéticamente más relacionados que se presentan en el Anexo 2a- Grupos 5-11. Se han presentado posturas divergentes respecto a la convergencia de reorganizaciones, se plantea que la gran cantidad de posibles arreglos genéticos hace que sea muy poco probable que diferentes taxones adopten independientemente un estado idéntico, por lo que no sería posible que los reordenamientos complejos sean convergentes (Boore, 1999). Sin embargo, se ha reportado que en puntos críticos o “hotspots” de reorganización, la convergencia evolutiva es más probable de lo que sería si hubiera iguales probabilidades de cambio en cada posición del gen (Boore & Brown, 1998).

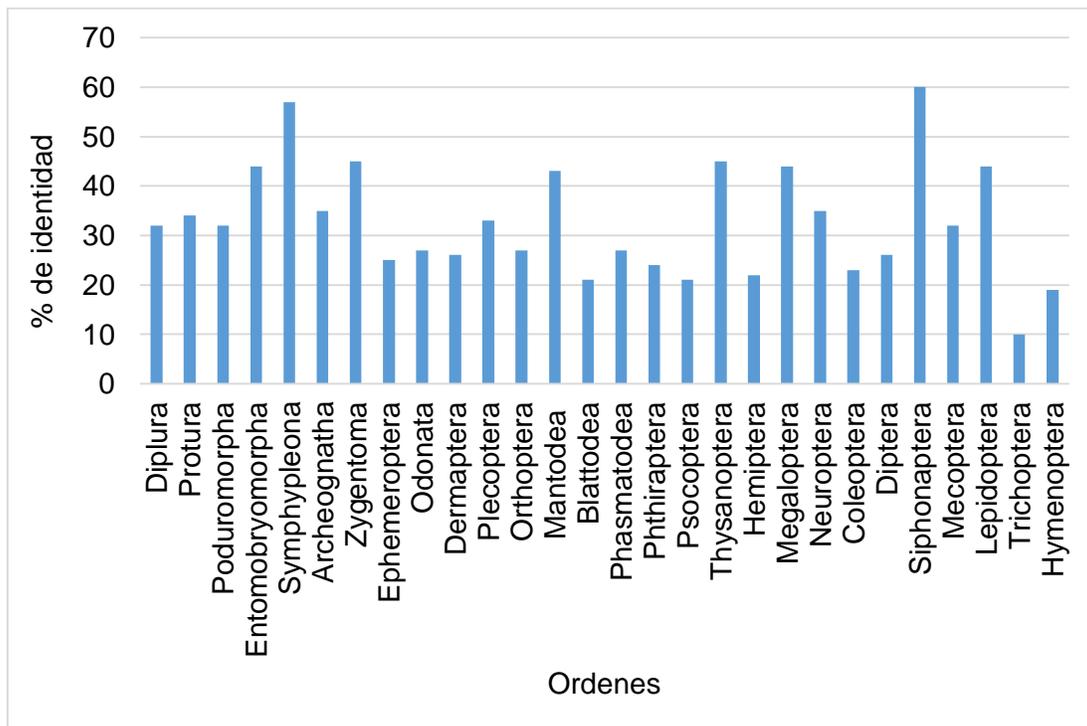
Previamente se han identificado homoplasias solo dos veces en taxones de vertebrados. Sin embargo, se ha demostrado que pueden ocurrir ordenes idénticos en insectos, el cual es rico en ordenes alternativos y dinámico en términos de reordenamientos, por lo que se ha favorecido la opinión acerca que la evolución convergente es un fenómeno general del ADNmt animal y no se limita a un linaje particular (Babbucci et al., 2014). Los sesgos compartidos en la producción de variación, comúnmente llamados restricciones, pueden conducir a la convergencia si existe una limitación en las posibles variantes, debido a que es probable que las especies distantes produzcan las mismas variaciones para luego poder fijarse en la población por deriva genética (o por selección) (Losos, 2011). Esto se ve fácilmente en la evolución del ADN, debido a que solo existen cuatro estados posibles para una posición de nucleótido dada, la probabilidad de que los taxones relacionados distantemente adquieran independientemente el mismo cambio por casualidad es relativamente alta, y en consecuencia, si los taxones comparten el mismo sistema de desarrollo (y, por lo tanto, las mismas restricciones), estarán predispuestos a evolucionar de la misma manera, produciendo una evolución convergente (Losos, 2011). Sin embargo, las convergencias pueden ocurrir por razones no relacionadas con la adaptación y la selección natural como fue mencionado

anteriormente, por lo que es necesario ampliar la información acerca de la biología de los organismos para comprender mucho mejor estos procesos convergentes.

4.3 VARIABILIDAD DE LA REGIÓN CONTROL (RC)

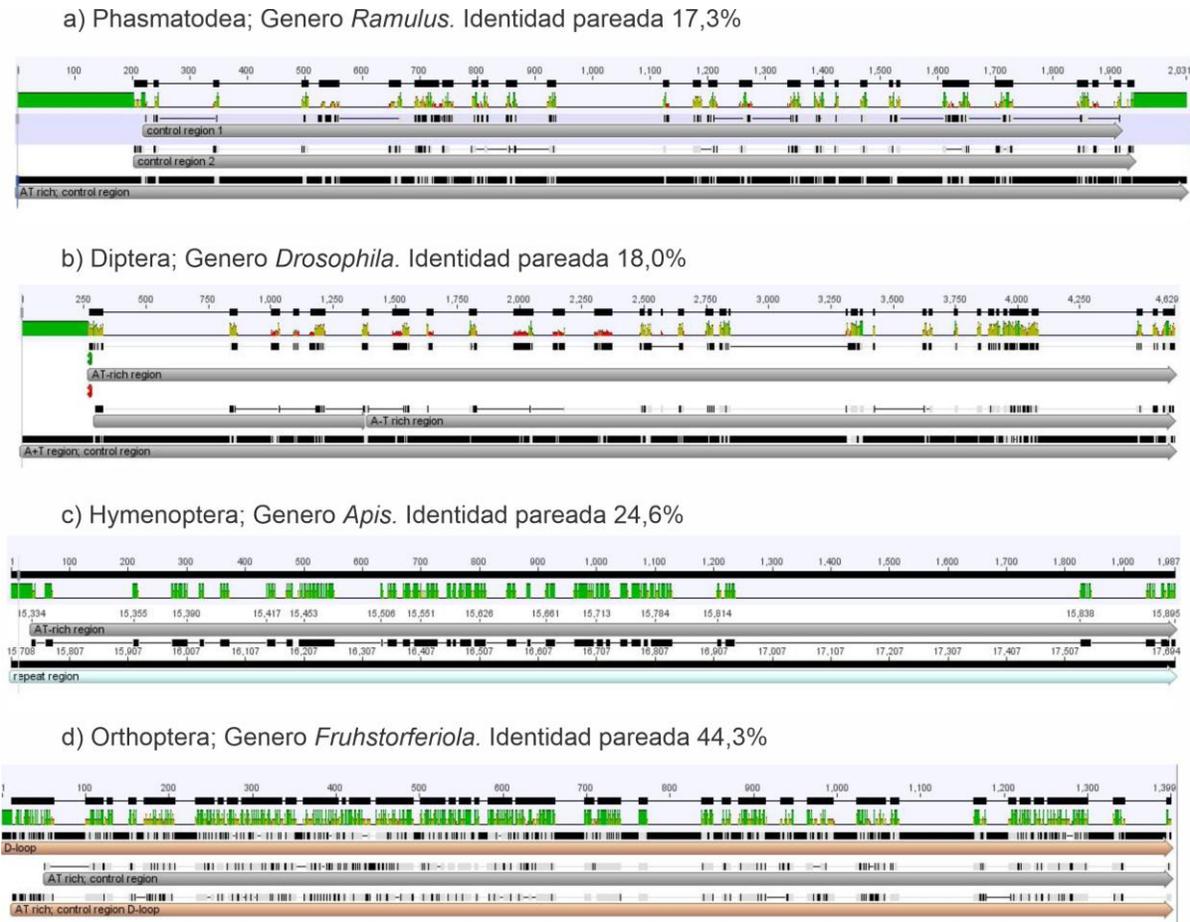
4.3.1 Análisis nucleotídico de la RC. Posterior a la revisión de las anotaciones de las RC de hexápodos, fueron analizadas en total 1036 secuencias. Se determinó que especialmente esta zona del mitogenoma presenta una baja identidad (Figura 11) (identidad promedio de Hexapoda: 32,6 %) aún entre regiones control de organismos muy emparentados (mismo género) (Figura 12), posiblemente derivado, de un alto contenido de A+T en la RC.

Figura 11. Porcentaje de identidad de la RC de los órdenes de hexápodos.



Fuente: Autor.

Figura 12. Alineamiento de la región control de organismos del mismo género en diferentes órdenes de hexápodos.

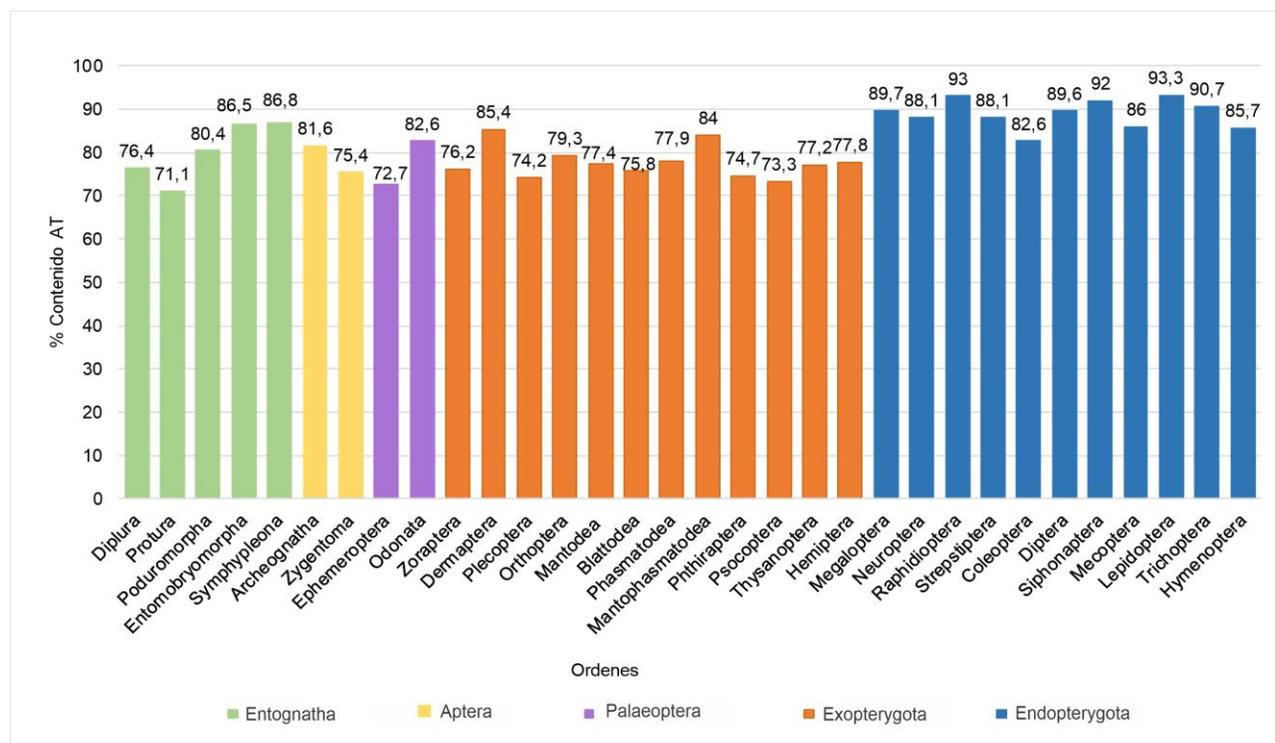


Fuente: Autor.

Para el grupo hexapoda, en esta investigación se encontró un nivel de A+T de ~82,04% siendo el Protura el orden con el % A+T más bajo entre todos los insectos con 71,1% y Lepidoptera y Raphidioptera los órdenes con él % A+T más alto con 93,3 y 93%, respectivamente. De forma general, se encontró un aumento en el nivel de A+T con un promedio de 89% en el grupo Endopterygota (Figura 13) en comparación con los órdenes que constituyen Neoptera (77,7%), Palaeoptera (77,6%), Aptera (78,5%) y Entognatha (80,2%), con algunas excepciones como Coleoptera y Mecoptera esto posiblemente

debido a los errores de anotación en Dloop encontrados en Coleoptera y la baja representatividad de Mecoptera (3 individuos).

Figura 13. Porcentaje del contenido de A+T en los grupos de la superclase Hexapoda.



Fuente: Autor.

El ADNmt de los hexápodos, y especialmente el Dloop es rico en A + T, en comparación con el ADNmt de otros animales. Se identificó en esta investigación el promedio de los porcentajes de A+T en la región control para aves: 59%, reptiles: 64% y anfibios: 65% (datos no publicados), que en comparación con el porcentaje promedio encontrado para hexápodos (82%) son valores bajos, corroborando lo reportado anteriormente acerca de la composición extrema y abundantemente sesgada hacia A+T de los insectos, en comparación con otros taxones. Según análisis detallados de los patrones de distribución de A + T en el mitogenoma, se sugiere la existencia de presión de mutación direccional hacia un alto contenido de A + T en el ADNmt de insectos (Crozier & Crozier, 1993; Jermini, Graur, Lowe, & Crozier, 1994). De hecho, el alto contenido de A + T de la región

de control parece ser una característica filogenética de Insecta, y la presión de mutación direccional de A + T puede haberse ejercido en esta región temprano en la radiación de los insectos (D. X. Zhang & Hewitt, 1997).

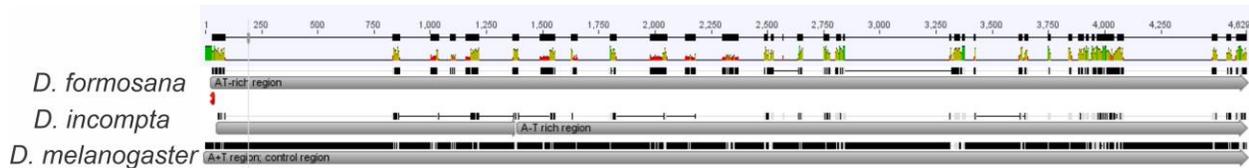
Según lo reportado por D. X. Zhang and Hewitt (1997) existen dos grupos de RC en insectos: el primer grupo que muestra patrones de conservación cuando se comparan secuencias de la RC entre insectos taxonómicamente cercanos. Por ejemplo, la existencia de un dominio altamente conservado que contiene un supuesto origen de replicación, adyacente al gen *trnI* entre las especies *Drosophila tristis* y *Drosophila virilis* (no disponibles para esta investigación), junto con un dominio variable que incluye el resto de la región y es muy variable tanto en la secuencia de nucleótidos como en la longitud (Monnerot, Solignac, & Wolstenholme, 1990). El segundo grupo incluye saltamontes, mosquitos y posiblemente mariposas y a diferencia del primer grupo, estas regiones de control no se pueden dividir en dominios distintos conservados y variables, debido a que los bloques de secuencia conservados son cortos y están dispersos por toda la región, con repeticiones en tándem.

Algunos autores han propuesto la existencia de características altamente conservadas comunes a todas las regiones de control mitocondrial (Taylor et al., 1993). Las RC de los genomas de mamíferos se han secuenciado ampliamente y, si bien existe una divergencia y reordenamiento sustancial, que incluye heteroplasma y polimorfismo para grandes repeticiones, existen bloques de conservación de secuencias claramente identificables (Hoelzel, Hancock, & Dover, 1991; Saccone, Pesole, & Sbisà, 1991).

Sin embargo, este trabajo encontró que a diferencia de lo reportado para secuencias de mamíferos, en hexápodos la RC tiene un comportamiento distinto. Se encontró que dentro de las especies de *Drosophila* analizadas en esta investigación, no existen bloques conservados o bloques variables, por el contrario, la identidad entre las secuencias es muy baja con aproximadamente un 17,2% y esta distribuida a lo largo de

la región control (Figura 14), presentándose esto de igual forma en especies del mismo género en otros ordenes (Figura 12).

Figura 14. Alineamiento entre las especies del género *Drosophila*.



Fuente: Autor.

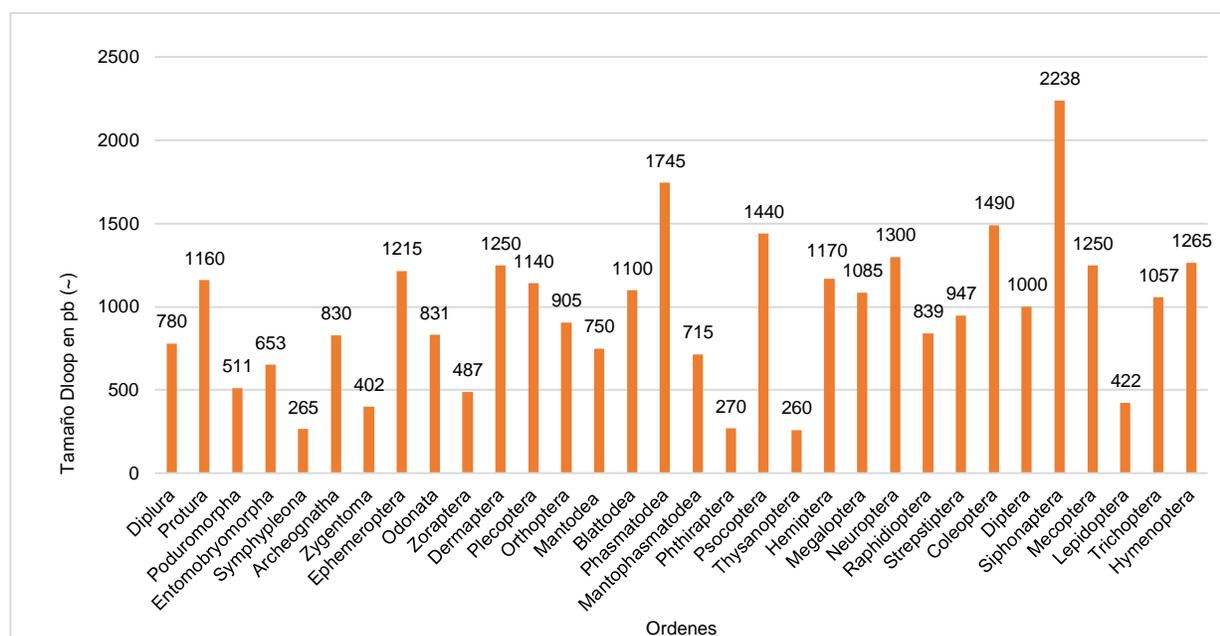
Se ha reportado anteriormente que se presenta una divergencia más elevada en el tamaño en el Dloop entre taxones filogenéticamente distantes en comparación con unas tasas más moderadas de sustitución inter e intraespecífica, lo que concuerda con lo reportado en este estudio, esto sugeriría que los modos evolutivos difieren en la región de control en diferentes niveles taxonómicos y tal vez la inserción, eliminación y duplicación han jugado un papel importante en su evolución en un alto nivel taxonómico (D. X. Zhang & Hewitt, 1997).

La gran diferencia podría ser el contenido de A+T unico para hexápodos e inusualmente alto como fue mencionado anteriormente. En mamíferos, existe un dominio central en la RC, el cual es una de las regiones más conservadas y se caracteriza por un contenido de G mayor que en la otra parte de la molécula, lo cual probablemente es indicativo de una restricción funcional (Saccone et al., 1991). Al poseer Hexapoda un contenido tan elevado de A+T, esta región conservada (mas rica en G+C) no esta presente y posiblemente sea la causa de la usencia de una región conservada.

4.3.2 Analisis de la arquitectura de la RC. El tamaño promedio del mtgenoma en hexápodos es ~15.7 kb, sin embargo, se observó un amplio rango de tamaños dentro de Hexapoda que va desde ~12 kb, esto debido a errores de anotación o secuenciación en -12S y Dloop, hasta ~25 kb, por regiones control excepcionalmente grandes [~4-8 kb]. El tamaño promedio de Dloop es de 960 pb para todo el grupo Hexapoda, sin embargo, el

rango de variabilidad entre los diferentes órdenes de hexápodos es muy amplio con una diferencia de más de 7000 pb. Con excepciones en regiones control con menos de 100 pb en *Heterodoxus macropus*; Phthiraptera con 73 pb y con más de 7000 pb en *Hydropsyche pellucidula*, Trichoptera con 7096. De forma general, los Dloop de insectos pueden comprender un tamaño entre 270 pb (Phthiraptera) y 2238 pb (Siphonaptera) con un rango muy amplio de variabilidad a lo largo de los 32 órdenes (Figura 15).

Figura 15. Tamaño promedio del Dloop para todos los órdenes del grupo Hexapoda.

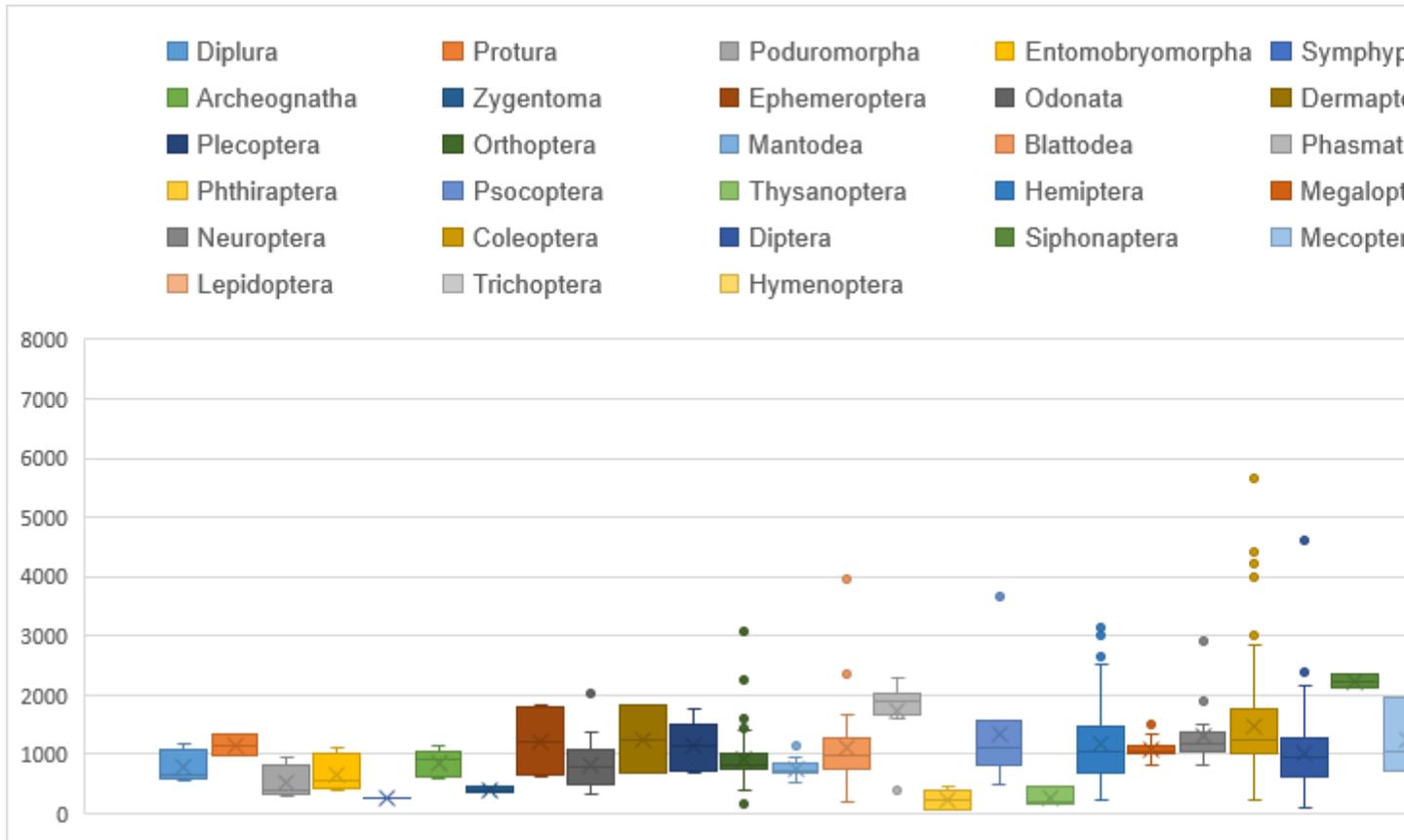


Fuente: Autor.

Como se puede observar en la Figura 15 los grupos de Diplura, Protura, Poduromorpha, Entomobryomorpha, Archaeognatha, Odonata, Mantodea, Neuroptera, Blattodea y Megaloptera son órdenes con una región control moderadamente conservada en tamaño, en donde, de forma general el Dloop se mantiene entre 500 y 1300 pb con una dispersión pequeña. De igual forma, los grupos Zygentoma, Symphyleona, Phthiraptera, Thysanoptera, Phasmatodea y Siphonaptera presentan el mismo comportamiento, pero como particularidad los primeros cuatro grupos poseen una región

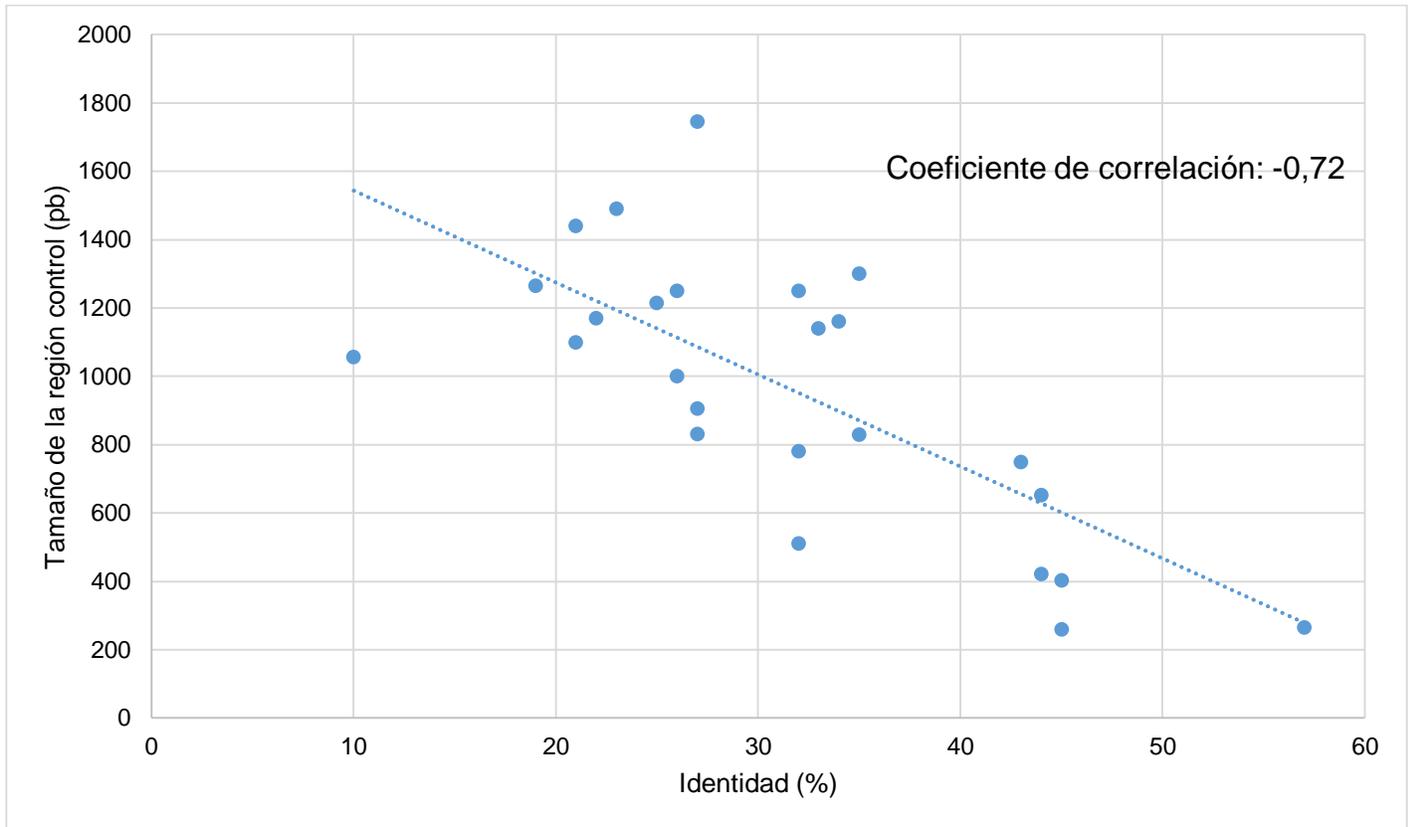
control muy pequeña que ronda los 300 pb y los últimos dos, presentan una región control muy grande que ronda los 2000 pb. Por otro lado, los grupos Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera e Hymenoptera son organismos que poseen una gran dispersión de datos con una abundante presencia de datos atípicos debido a su alta representatividad, es decir, el tamaño del Dloop en estos grupos es muy variable. De igual forma, los órdenes Mecoptera, Ephemeroptera, Dermaptera, Plecoptera y Psocoptera son ordenes con una gran dispersión, pero con poca representatividad y por lo tanto pocos datos atípicos. Por último, los órdenes Lepidoptera y Trichoptera presentan un comportamiento propio y único, el primer orden mencionado posee una alta representatividad de datos con poca dispersión lo que indica su alto nivel de conservación en el tamaño del Dloop (~420 pb). Y el segundo, posee la dispersión más grande presente en Hexapoda con valores que van desde 235 pb hasta 7096 pb.

Figura 16. Box-Plot del tamaño de los diferentes órdenes de hexápodos. En este diagrama fueron excluidos los grupos Zoraptera, Strepsitera y Mantophasmatodea por poseer tan solo un organismo.



Fuente: Autor.

Figura 17. Coeficiente de correlación entre el promedio del tamaño del Dloop y el promedio de la identidad que presentan los diferentes grupos de hexápodos. Para ese diagrama fueron excluidos los órdenes Siphonaptera, Phthiraptera y Megaloptera.



Fuente: Autor.

La identidad de la región control en los órdenes de la superclase Hexapoda, como fue mencionado anteriormente, es relativamente baja con un valor menor al 35%. De forma general, se puede percatar que cuando existe un bajo nivel de identidad, el tamaño del Dloop aumenta, por lo tanto, se observó que existe una correlación fuertemente negativa (-0,72) entre estas dos variables, lo que indica que se presenta una dependencia entre el tamaño y la identidad, con una relación inversamente proporcional, es decir, que cuando el tamaño aumenta, la identidad disminuye en proporción constante, o viceversa (Figura 14).

Los órdenes Siphonaptera, Phthiraptera y Megaloptera fueron excluidos debido a que estos presentan un comportamiento contrario al que presentan la mayoría de los grupos de los hexápodos. En estos ordenes se observa una relación directamente proporcional en donde, al incrementarse o disminuir una de las variables, la otra lo hace en la misma proporción. En el caso del orden Phthiraptera, la identidad es muy baja con un 24% y el promedio de la región control también lo es con 270 pb, a diferencia de los órdenes Megaloptera y Siphonaptera los cuales poseen unos de los más altos niveles de identidad (44%-60%) y de igual unos promedios altos en Dloop con 1085 pb y 2238 pb respectivamente. Este es el primer trabajo que reporta una correlación fuertemente negativa entre el tamaño del Dloop y el porcentaje de identidad, por lo que no existen datos previos para comparar estos resultados.

5. CONCLUSIONES

- De los 44326 genes mitocondriales de Hexapoda, se identificaron 147 reorganizaciones mal anotadas. Se observó que el 48.7% de los genomas están reorganizados, presentándose en total 2595 rearrreglos, siendo las translocaciones-inversiones las más frecuentes. Los insectos poseen un amplio rango de variabilidad en la arquitectura de sus mitogenomas, posiblemente el estilo de vida parasítico-parasitario, de plagas y vectores, propicia las reorganizaciones por el estrés oxidativo al que están expuestos.
- Se encontraron convergencias de rearrreglos en los mitogenomas entre ordenes filogenéticamente distantes y de igual forma, rearrreglos específicos permiten diferenciar organismos cercanos. Por lo tanto, los organismos que comparten el mismo sistema de desarrollo (y, por lo tanto, las mismas restricciones), estarán predispuestos a evolucionar de la misma manera produciendo una evolución convergente.
- Se corroboró el alto nivel de A+T en Dloop en Hexapoda, en comparación con diferentes grupos taxonómicos de Metazoa. Se encontró que posiblemente existe una correlación negativa entre el nivel de identidad y el tamaño del Dloop.
- Este es el primer trabajo que reúne los reordenamientos mitocondriales presentes en 32 órdenes de la superclase Hexapoda y permite visualizar el alto nivel de reordenamiento que presentan algunos grupos de insectos.

RECOMENDACIONES

- Desarrollar un software o herramienta bioinformática fiable que permita realizar una anotación certera y, de igual forma, una identificación y verificación de estas, además, automatizar el proceso en el caso de análisis con un numero abundante de secuencias. Especificamente para insectos, sería necesario una herramienta con una base de datos amplia, especializada en secuencias ricas en A+T.
- Ampliar el estudio de la biología y adaptaciones de los hexápodos para poder comprender de una forma mas adecuada la relación que existe entre las adaptaciones de los organismos y los rearrreglos mitocondriales.
- Fomentar el estudio de regiones poco estudiadas del genoma mitocondrial en hexápodos como el Dloop y la región del origen de la replicación fundamentales para el funcionamiento de la mitocondria. De igual forma, con organismos poco estudiados que no poseen datos completos de mitogenomas como individuos de los ordenes Embioptera y Grylloblattodea o que poseen muy pocos representantes como Strepsiptera y Zoraptera.

REFERENCIAS

- Ahmadi, F., & Ghanbari, K. (2014). Proposed model for binding of permethrin and deltamethrin insecticides with ct-DNA, a structural comparative study. *Ecotoxicology and environmental safety*, 106, 136-145.
- Ángel, D., Jorge, E., Martínez, H., Santamaria, G., Parada, P., & Ebratt, R. (2016). Identification and distribution of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato crops (*Solanum lycopersicum*) in Cundinamarca (Colombia). *Agronomía Colombiana*, 34(1), 42-50.
- Ayala-Ruano, S., Santander-Gordón, D., Tejera, E., Perez-Castillo, Y., & Armijos-Jaramillo, V. (2019). A putative antimicrobial peptide from Hymenoptera in the megaplasmid pSCL4 of *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 reveals a singular case of horizontal gene transfer with potential applications. *Ecology and evolution*, 9(5), 2602-2614.
- Babbucci, M., Basso, A., Scupola, A., Patarnello, T., & Negrisolo, E. (2014). Is it an ant or a butterfly? Convergent evolution in the mitochondrial gene order of Hymenoptera and Lepidoptera. *Genome Biol Evol*, 6(12), 3326-3343.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.
- 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 Mol Biol*, 2(2), 103-124.
- Bendich, A. J. (2010). Mitochondrial DNA, chloroplast DNA and the origins of development in eukaryotic organisms. *Biology direct*, 5(1), 42.
- Bensch, S., & Harlid, A. (2000). Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Mol Biol Evol*, 17(1), 107-113. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026223
- Bernt, M., Braband, A., Schierwater, B., & Stadler, P. F. (2013). Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Mol Phylogenet Evol*, 69(2), 328-338.

- Bernt, M., Donath, A., Juhling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritsch, G., . . . Stadler, P. F. (2013). MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol Phylogenet Evol*, 69(2), 313-319. doi: 10.1016/j.ympev.2012.08.023
- Black, W. C., & Roehrdanz, R. L. (1998). Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. *Mol Biol Evol*, 15(12), 1772-1785.
- Blomstrand, E., Ekblom, B., & Newsholme, E. (1986). Maximum activities of key glycolytic and oxidative enzymes in human muscle from differently trained individuals. *The Journal of physiology*, 381(1), 111-118.
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 27(8), 1767-1780. doi: 10.1093/nar/27.8.1767
- Boore, J. L. (2000). The duplication/random loss model for gene rearrangement exemplified by mitochondrial genomes of deuterostome animals *Comparative genomics* (pp. 133-147): Springer.
- Boore, J. L. (2006). Requirements and standards for organelle genome databases. *Omics: a journal of integrative biology*, 10(2), 119-126.
- Boore, J. L., & Brown, W. M. (1998). Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Current opinion in genetics & development*, 8(6), 668-674.
- Boore, J. L., Lavrov, D. V., & Brown, W. M. (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature*, 392(6677), 667.
- Boore, J. L., Macey, J. R., & Medina, M. (2005). Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Methods Enzymol*, 395, 311-348. doi: 10.1016/s0076-6879(05)95019-2
- Bourque, G., & Pevzner, P. A. (2002). Genome-scale evolution: reconstructing gene orders in the ancestral species. *Genome Res*, 12(1), 26-36.
- Braband, A., Cameron, S. L., Podsiadlowski, L., Daniels, S. R., & Mayer, G. (2010). The mitochondrial genome of the onychophoran *Opisthopatus cinctipes*

- (Peripatopsidae) reflects the ancestral mitochondrial gene arrangement of Panarthropoda and Ecdysozoa. *Mol Phylogenet Evol*, 57(1), 285-292.
- Branstetter, M. G., Danforth, B. N., Pitts, J. P., Faircloth, B. C., Ward, P. S., Buffington, M. L., . . . Brady, S. G. (2017). Phylogenomic insights into the evolution of stinging wasps and the origins of ants and bees. *Current Biology*, 27(7), 1019-1025.
- Brenner, S. E. (1999). Errors in genome annotation. *Trends in Genetics*, 15(4), 132-133.
- Briegel, H. (1990). Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of medical entomology*, 27(5), 839-850.
- Bush, A. O., Fernández, J. C., Esch, G. W., & Seed, J. R. (2001). *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*: Cambridge University Press.
- Cameron, S. L. (2014a). How to sequence and annotate insect mitochondrial genomes for systematic and comparative genomics research. *Systematic Entomology*, 39(3), 400-411.
- Cameron, S. L. (2014b). Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annu Rev Entomol*, 59, 95-117. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162007
- Cameron, S. L., Johnson, K. P., & Whiting, M. F. (2007). The mitochondrial genome of the screamer louse *Bothriometopus* (Phthiraptera: Ischnocera): effects of extensive gene rearrangements on the evolution of the genome. *J Mol Evol*, 65(5), 589-604.
- Cameron, S. L., Yoshizawa, K., Mizukoshi, A., Whiting, M. F., & Johnson, K. P. (2011). Mitochondrial genome deletions and minicircles are common in lice (Insecta: Phthiraptera). *BMC Genomics*, 12(1), 394.
- Carius, H. J., Little, T. J., & Ebert, D. (2001). Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55(6), 1136-1145.
- Carton, Y., & Nappi, A. (1997). *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology today*, 13(6), 218-227.

- Castro, L. R., Austin, A. D., & Dowton, M. (2002). Contrasting Rates of Mitochondrial Molecular Evolution in Parasitic Diptera and Hymenoptera. *Mol Biol Evol*, 19(7), 1100-1113. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004168
- Caterino, M. S., Cho, S., & Sperling, F. A. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu Rev Entomol*, 45, 1-54. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.1
- Coordinators, N. R. (2018). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res*, 46(Database issue), D8.
- 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.
- Cha, S. Y., Yoon, H. J., Lee, E. M., Yoon, M. H., Hwang, J. S., Jin, B. R., . . . Kim, I. (2007). The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Gene*, 392(1-2), 206-220.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125(7), 1241-1252. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.010
- Chen, S., Wei, D., Shao, R., Shi, J., Dou, W., & Wang, J. (2014). Evolution of multipartite mitochondrial genomes in the booklice of the genus *Liposcelis* (Psocoptera). *BMC Genomics*, 15(1), 861.
- Davies, T., Field, L., Usherwood, P., & Williamson, M. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3), 151-162.
- Dickey, A. M., Kumar, V., Morgan, J. K., Jara-Cavieres, A., Shatters, R. G., McKenzie, C. L., & Osborne, L. S. (2015). A novel mitochondrial genome architecture in thrips (Insecta: Thysanoptera): extreme size asymmetry among chromosomes and possible recent control region duplication. *BMC Genomics*, 16(1), 439.
- Domes, K., Maraun, M., Scheu, S., & Cameron, S. L. (2008). The complete mitochondrial genome of the sexual oribatid mite *Steganacarus magnus*: genome rearrangements and loss of tRNAs. *BMC Genomics*, 9(1), 532.

- Donath, A., Jühling, F., Al-Arab, M., Bernhart, S. H., Reinhardt, F., Stadler, P. F., . . . Bernt, M. (2019). Improved annotation of protein-coding genes boundaries in metazoan mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkz833
- Dowton, M., & Austin, A. D. (1995). Increased genetic diversity in mitochondrial genes is correlated with the evolution of parasitism in the Hymenoptera. *J Mol Evol*, 41(6), 958-965.
- Dowton, M., & Austin, A. D. (1999a). Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement "hot spot" in the Hymenoptera. *Mol Biol Evol*, 16(2), 298-309. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026111
- Dowton, M., & Austin, A. D. (1999b). Models of analysis for molecular datasets for the reconstruction of basal hymenopteran relationships. *Zoologica Scripta*, 28(1-2), 69-74.
- Dowton, M., Cameron, S. L., Dowavic, J. I., Austin, A. D., & Whiting, M. F. (2009). Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Mol Biol Evol*, 26(7), 1607-1617. doi: 10.1093/molbev/msp072
- Dowton, M., & Campbell, N. J. (2001). Intramitochondrial recombination - is it why some mitochondrial genes sleep around? *Trends Ecol Evol*, 16(6), 269-271.
- Dyall, S. D., & Johnson, P. J. (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 3(4), 404-411.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Engel, M. S. (2015). Insect evolution. *Curr Biol*, 25(19), R868-872. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.059
- Flook, P., Rowell, C., & Gellissen, G. (1995). The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *J Mol Evol*, 41(6), 928-941.
- Funderburk, J. (2009). Management of the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in fruiting vegetables. *Florida Entomologist*, 92(1), 1-7.

- 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.
- Gould, S. J., & Vrba, E. S. (1982). Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology*, 8(1), 4-15.
- Gray, M. W. (1998). Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature*, 396(6707), 109-110. doi: 10.1038/24030
- Gray, M. W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Current opinion in genetics & development*, 9(6), 678-687.
- Güven, C., Sevgiler, Y., & Taskin, E. (2018). Pyrethroid Insecticides as the Mitochondrial Dysfunction Inducers. *Mitochondrial Diseases*, 293.
- Hafner, M. S., Sudman, P. D., Villablanca, F. X., Spradling, T. A., Demastes, J. W., & Nadler, S. A. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*, 265(5175), 1087-1090.
- Hassanin, A. (2006). Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. *Mol Phylogenet Evol*, 38(1), 100-116.
- Hebert, P. D., 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.
- Hennig, W. (1953). Kritische Bemerkungen zum phylogenetischen System der Insekten. (Mit Beiträgen von H. Bollmann und J. Machatschke). *Beiträge zur Entomologie= Contributions to Entomology*, 3(Sonderheft), 1-85.
- Hernández, G. R. (2011). Evolución de interacciones parásito–hospedero: coevolución, selección sexual y otras teorías propuestas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 119-130.
- Hilker, R., Sickinger, C., Pedersen, C. N., & Stoye, J. (2012). UniMoG—a unifying framework for genomic distance calculation and sorting based on DCJ. *Bioinformatics*, 28(19), 2509-2511. doi: 10.1093/bioinformatics/bts440

- Hoelzel, A., Hancock, J., & Dover, G. (1991). Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Mol Biol Evol*, 8(4), 475-493.
- Houck, M. A. (1994). Mites as potential horizontal transfer vectors of eukaryotic mobile genes: *Proctolaelaps regalis* as a model *Mites* (pp. 45-69): Springer.
- Howell, M. (1985). Australian society for parasitology presidential address: Gene exchange between hosts and parasites. *International journal for parasitology*, 15(6), 597-600.
- Hunt, J. H. (2007). *The evolution of social wasps*: Oxford University Press.
- Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., . . . Wilson, A. C. (2013). Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*, 153(7), 1567-1578.
- Inward, D., Beccaloni, G., & Eggleton, P. (2007). Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biology letters*, 3(3), 331-335.
- Jermiin, L. S., Graur, D., Lowe, R. M., & Crozier, R. H. (1994). Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. *J Mol Evol*, 39(2), 160-173.
- Kaltenpoth, M., Corneli, P. S., Dunn, D. M., Weiss, R. B., Strohm, E., & Seger, J. (2012). Accelerated evolution of mitochondrial but not nuclear genomes of Hymenoptera: new evidence from crabronid wasps. *PLoS One*, 7(3), e32826.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., . . . Elhaik, E. (2010). Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12168-12173.
- Kristensen, N. P. (1999). Phylogeny of endopterygote insects, the most successful lineage of living organisms. *European Journal of Entomology*, 96, 237-254.

- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., & Hedges, S. B. (2017). TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol Biol Evol*, *34*(7), 1812-1819.
- Lane, N. (2006). *Power, sex, suicide: mitochondria and the meaning of life*: Oxford University Press.
- Lang, B. F., Gray, M. W., & Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, *33*, 351-397. doi: 10.1146/annurev.genet.33.1.351
- Laslett, D., & Canback, B. (2008). ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *24*(2), 172-175. doi: 10.1093/bioinformatics/btm573
- Lavrov, D. V., & Brown, W. M. (2001). *Trichinella spiralis* mtDNA: a nematode mitochondrial genome that encodes a putative ATP8 and normally structured tRNAs and has a gene arrangement relatable to those of coelomate metazoans. *Genetics*, *157*(2), 621-637.
- Li, H., Shao, R., Song, N., Song, F., Jiang, P., Li, Z., & Cai, W. (2015). Higher-level phylogeny of paraneopteran insects inferred from mitochondrial genome sequences. *Sci Rep*, *5*, 8527.
- Liu, H., Li, H., Song, F., Gu, W., Feng, J., Cai, W., & Shao, R. (2017). Novel insights into mitochondrial gene rearrangement in thrips (Insecta: Thysanoptera) from the grass thrips, *Anaphothrips obscurus*. *Sci Rep*, *7*(1), 4284. doi: 10.1038/s41598-017-04617-5
- Losos, J. B. (2011). Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, *65*(7), 1827-1840.
- Luan, Y.-x., Mallatt, J. M., Xie, R.-d., Yang, Y.-m., & Yin, W.-y. (2005). The phylogenetic positions of three basal-hexapod groups (Protura, Diplura, and Collembola) based on ribosomal RNA gene sequences. *Mol Biol Evol*, *22*(7), 1579-1592.
- Makni, H., Marrakchi, M., & Pasteur, N. (2000). Biochemical characterization of sibling species in Tunisian Mayetiola (Diptera: Cecidomyiidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, *28*(2), 101-109.
- Martin, W., & Mentel, M. (2010). The origin of mitochondria. *Nature Education*, *3*(9), 58.

- Monnerot, M., Solignac, M., & Wolstenholme, D. R. (1990). Discrepancy in divergence of the mitochondrial and nuclear genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. *J Mol Evol*, 30(6), 500-508.
- Moritz, C., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, 18(1), 269-292.
- Morris, S. C. (2010). Darwin at the edge of the visible universe. *EMBO reports*, 11(12), 898-898.
- Mwinyi, A., Meyer, A., Bleidorn, C., Lieb, B., Bartolomaeus, T., & Podsiadlowski, L. (2009). Mitochondrial genome sequence and gene order of *Sipunculus nudus* give additional support for an inclusion of Sipuncula into Annelida. *BMC Genomics*, 10(1), 27.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A., & Hattori, M. (2006). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science*, 314(5797), 267-267.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F., & Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European journal of cell biology*, 68(4), 450-456.
- Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J. L., Carapelli, A., Dallai, R., & Frati, F. (2003). Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science*, 299(5614), 1887-1889. doi: 10.1126/science.1078607
- Nickrent, D., & Starr, E. (1994). High rates of nucleotide substitution in nuclear small-subunit (18S) rDNA from holoparasitic flowering plants. *J Mol Evol*, 39(1), 62-70.
- Pääbo, S., Thomas, W. K., Whitfield, K. M., Kumazawa, Y., & Wilson, A. C. (1991). Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. *J Mol Evol*, 33(5), 426-430.
- Page, R. D., Lee, P. L., Becher, S. A., Griffiths, R., & Clayton, D. H. (1998). A different tempo of mitochondrial DNA evolution in birds and their parasitic lice. *Mol Phylogenet Evol*, 9(2), 276-293.

- Pagel, M. (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 255(1342), 37-45.
- Passamonti, M., Ricci, A., Milani, L., & Ghiselli, F. (2011). Mitochondrial genomes and Doubly Uniparental Inheritance: new insights from *Musculista senhousia* sex-linked mitochondrial DNAs (Bivalvia Mytilidae). *BMC Genomics*, 12(1), 442.
- Paul, A., Harrington, L. C., & Scott, J. G. (2006). Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 43(1), 55-60.
- Pereira, S. L. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular biology*, 23(4), 745-752.
- Peters, R. S., Krogmann, L., Mayer, C., Donath, A., Gunkel, S., Meusemann, K., . . . Lanfear, R. (2017). Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology*, 27(7), 1013-1018.
- Plague, G. R., Voltaire, G., Walsh, B. E., & Dougherty, K. M. (2010). Rice weevils and maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) respond differently to disturbance of stored grain. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(4), 683-687.
- Popadin, K. Y., Mamirova, L. A., & Kondrashov, F. A. (2007). A manually curated database of tetrapod mitochondrially encoded tRNA sequences and secondary structures. *BMC bioinformatics*, 8(1), 441.
- Prada, C. F., & Boore, J. L. (2019). Gene annotation errors are common in the mammalian mitochondrial genomes database. *BMC Genomics*, 20(1), 73. doi: 10.1186/s12864-019-5447-1
- Roff, D. (1986). Evolution of wing polymorphism and its impact on life cycle adaptation in insects *The evolution of insect life cycles* (pp. 204-221): Springer.
- Rosenberg, D. M., Danks, H., & Lehmkuhl, D. M. (1986). Importance of insects in environmental impact assessment. *Environmental management*, 10(6), 773-783.
- Saccone, C., Pesole, G., & Sbisà, E. (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J Mol Evol*, 33(1), 83-91.

- Sacktor, B. (1976). *Biochemical adaptations for flight in the insect*. Paper presented at the Biochemical Society Symposium.
- Sasaki, G., Ishiwata, K., Machida, R., Miyata, T., & Su, Z.-H. (2013). Molecular phylogenetic analyses support the monophyly of Hexapoda and suggest the paraphyly of Entognatha. *BMC Evol Biol*, *13*(1), 236.
- Shadel, G. S., & Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*, *66*, 409-435. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.409
- Shao, R., Barker, S. C., Li, H., Song, S., Poudel, S., & Su, Y. (2015). Fragmented mitochondrial genomes in two suborders of parasitic lice of eutherian mammals (Anoplura and Rhynchophthirina, Insecta). *Sci Rep*, *5*, 17389.
- Shao, R., Campbell, N. J., & Barker, S. C. (2001). Numerous gene rearrangements in the mitochondrial genome of the wallaby louse, *Heterodoxus macropus* (Phthiraptera). *Mol Biol Evol*, *18*(5), 858-865. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003867
- Shao, R., Campbell, N. J., Schmidt, E. R., & Barker, S. C. (2001). Increased rate of gene rearrangement in the mitochondrial genomes of three orders of hemipteroid insects. *Mol Biol Evol*, *18*(9), 1828-1832. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003970
- Shao, R., Kirkness, E. F., & Barker, S. C. (2009). The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*. *Genome Res*, *19*(5), 904-912.
- Shao, R., Zhu, X. Q., Barker, S. C., & Herd, K. (2012). Evolution of extensively fragmented mitochondrial genomes in the lice of humans. *Genome Biol Evol*, *4*(11), 1088-1101.
- Sheffield, N. C., Hiatt, K. D., Valentine, M. C., Song, H., & Whiting, M. F. (2010). Mitochondrial genomics in Orthoptera using MOSAS. *Mitochondrial DNA*, *21*(3-4), 87-104.
- Shi, Y., Chu, Q., Wei, D.-D., Qiu, Y.-J., Shang, F., Dou, W., & Wang, J.-J. (2016). The mitochondrial genome of booklouse, *Liposcelis sculptilis* (Psocoptera: Liposcelididae) and the evolutionary timescale of *Liposcelis*. *Sci Rep*, *6*, 30660.

- Song, H., Amédégnato, C., Cigliano, M. M., Desutter-Grandcolas, L., Heads, S. W., Huang, Y., . . . Whiting, M. F. (2015). 300 million years of diversification: elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. *Cladistics*, 31(6), 621-651.
- Song, H., Sheffield, N. C., Cameron, S. L., Miller, K. B., & Whiting, M. F. (2010). When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. *Systematic Entomology*, 35(3), 429-448.
- Stanton, D. J., Daehler, L. L., Moritz, C. C., & Brown, W. M. (1994). Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 137(1), 233-241.
- Suarez, R. (1992). Hummingbird flight: sustaining the highest mass-specific metabolic rates among vertebrates. *Experientia*, 48(6), 565-570.
- Suarez, R., Staples, J., Lighton, J., & Mathieu-Costello, O. (2000). Mitochondrial function in flying honeybees (*Apis mellifera*): respiratory chain enzymes and electron flow from complex III to oxygen. *Journal of Experimental Biology*, 203(5), 905-911.
- Swofford, D. L. (2001). Paup*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0. B5.
- Taylor, M., McKechnie, S. W., Pierce, N., & Kreitman, M. (1993). The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Mol Biol Evol*, 10(6), 1259-1272.
- Tesler, G. (2002). Efficient algorithms for multichromosomal genome rearrangements. *Journal of Computer and System Sciences*, 65(3), 587-609.
- Thao, M. L., Baumann, L., & Baumann, P. (2004). Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evol Biol*, 4(1), 25.
- Toro, H., Chiappa, E., & Tobar, C. (2003). Biología de insectos. *Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.*

- Trautwein, M. D., Wiegmann, B. M., Beutel, R., Kjer, K. M., & Yeates, D. K. (2012). Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annu Rev Entomol*, *57*, 449-468. doi: 10.1146/annurev-ento-120710-100538
- Turell, M. J., O'Guinn, M. L., Dohm, D. J., & Jones, J. W. (2001). Vector competence of North American mosquitoes (diptera: culicidae) for West Nile virus. *Journal of medical entomology*, *38*(2), 130-134.
- Turner, B. D. (1994). *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelididae), a stored food pest in the UK. *International Journal of Pest Management*, *40*(2), 179-190.
- Van der Giezen, M. (2011). Mitochondria and the rise of eukaryotes. *BioScience*, *61*(8), 594-601.
- Vellai, T., Takacs, K., & Vida, G. (1998). A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J Mol Evol*, *46*(5), 499-507.
- Venner, S., Miele, V., Terzian, C., Biemont, C., Daubin, V., Feschotte, C., & Pontier, D. (2017). Ecological networks to unravel the routes to horizontal transposon transfers. *PLoS biology*, *15*(2), e2001536.
- Wang, C.-Y., & Zhao, Z.-B. (2012). Somatic mtDNA mutations in lung tissues of pesticide-exposed fruit growers. *Toxicology*, *291*(1-3), 51-55.
- Wei, S.-j., Shi, M., He, J.-h., Sharkey, M., & Chen, X.-x. (2009). The complete mitochondrial genome of *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae) indicates extensive independent evolutionary events. *Genome*, *52*(4), 308-319.
- Wyman, S. K., Jansen, R. K., & Boore, J. L. (2004). Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, *20*(17), 3252-3255.
- Xiao, J. H., Jia, J. G., Murphy, R. W., & Huang, D. W. (2011). Rapid evolution of the mitochondrial genome in Chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) driven by parasitic lifestyles. *PLoS One*, *6*(11), e26645. doi: 10.1371/journal.pone.0026645
- Xin, Z. Z., Yu, L., Zhu, X. Y., Wang, Y., Zhang, H. B., Zhang, D. Z., . . . Liu, Q. N. (2017). Mitochondrial Genomes of Two Bombycoidea Insects and Implications for Their Phylogeny. *Sci Rep*, *7*(1), 6544. doi: 10.1038/s41598-017-06930-5

- Yang, Y., Xu, S., Xu, J., Guo, Y., & Yang, G. (2014). Adaptive evolution of mitochondrial energy metabolism genes associated with increased energy demand in flying insects. *PLoS One*, 9(6), e99120.
- Ye, F., Lan, X.-e., Zhu, W.-b., & You, P. (2016). Mitochondrial genomes of praying mantises (Dictyoptera, Mantodea): rearrangement, duplication, and reassignment of tRNA genes. *Sci Rep*, 6, 25634.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(2), 99-120.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol*, 18(6), 292-298.
- Zhang, K. J., Zhu, W. C., Rong, X., Zhang, Y. K., Ding, X. L., Liu, J., . . . Hong, X. Y. (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. *BMC Genomics*, 14(1), 417.
- Zhang, Y. K., Zhang, G., Li, Y., & Hu, Y. (2013). Probing the binding of insecticide permethrin to calf thymus DNA by spectroscopic techniques merging with chemometrics method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(11), 2638-2647.

ANEXOS

Anexo A. Ordenes pertenecientes a cada tipo de arquitectura publicados por Babbucci et al. 2014 y el autor.

Tipo de arquitectura	Bubbuci et al., 2014	Datos reportados en esta investigación
Ordenamiento ancestral	Trichoptera, Siphonaptera, Mecoptera, Megaloptera, Raphidioptera, Blattodea, Isoptera, Mantodea, Plecoptera, Grylloblattodea, Mantophasmatodea, Phasmatodea, Ephemeroptera, Odonata, Zygentoma	Mantophasmatodea, Mecoptera, Megaloptera, Odonata, Plecoptera, Raphidioptera, Siphonaptera, Zoraptera, Zygentoma
Arquitectura mixta	Lepidoptera, Diptera, Neuroptera, Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera, Archaeognatha	Archaeognatha, Blattodea (Isoptera), Coleoptera, Diptera, Ephemeroptera, Hemiptera, Lepidoptera, Mantodea, Neuroptera, Orthoptera, Phasmatodea, Psocoptera, Trichoptera
Arquitectura alternativa	Dermaptera, Embioptera, Phthiraptera, Psocoptera, Thysanoptera, Hymenoptera, Strepsiptera	Dermaptera, Hymenoptera, Phthiraptera, Strepsiptera, Thysanoptera
Grupos sin representantes	Zoraptera	Embioptera y Grylloblattodea

Anexo B. Especies que conforman los grupos presentados en la Figura 5a-b y su respectiva reorganización.

a)

Grupo	Orden	Especies	Reorganización
Grupo 1	Poduromorpha Neuroptera	<i>P. aquatica</i> Todas las especies a excepción de la familia Osmylidae	Inversión-Translocación de -C entre ND2 Y W
Grupo 2	Mantodea Hymenoptera Lepidoptera Orthoptera	<i>H. nada</i> <i>P. dives</i> , <i>W. auropunctata</i> , <i>F. fusca</i> , <i>F. selysi</i> y <i>L. pallens</i> Todas las especies a excepción de 12 especies de las familias Hesperidae, Nymphalidae, Noctuidae, Limacodidae, Gelechiidae, Zygaenidae y Hepialidae. <i>P. detersus</i> , <i>P. sinicus</i> y <i>P. titan</i>	Inversión-Translocación de M antes del I
Grupo 3	Coleoptera Hymenoptera Psocoptera Lepidoptera Hemiptera	<i>T. domesticum</i> y <i>T. signatum</i> <i>C. atrox</i> <i>S. japonicus</i> <i>E. nyctelius</i> 9 especies de Pemphigidae	Inversión-Translocación de M entre los I y -Q
Grupo 4	Hymenoptera Hemiptera	<i>C. filiformis</i> , <i>C. idolon</i> , <i>C. cinctus</i> , <i>T. tabidus</i> y <i>T. iudaicus</i> <i>A. similis</i> , <i>A. sublobatus</i> , <i>B. hsiaoi</i> , <i>L. heissi</i> , <i>N. parus</i> , <i>T. arisana</i> y <i>R. tenebrosus</i>	Inversión-Translocación de -Q antes del I

Grupo 5	Orthoptera	Todas las especies de las familias Acridae, Episactidae, Lentulidae, Ommexechidae, Pamphagidae, Pneumoridae, Tetrigidae, Pyrgacrididae, Pyrgomorphidea, Romaleidae, Tetrigidae, Thericleidae y Tristiridae	Inversión-Translocación de <i>D</i> entre <i>COX2</i> y <i>K</i>
Grupo 6	Hemiptera	Familia Delphacidae	Inversión-Translocación de <i>-C</i> entre <i>ND2</i> y <i>W</i> ; Inversión translocación de <i>ND6</i> y <i>-P</i> después de <i>-ND4L</i>
Grupo 7	Diptera	Todas las especies de la familia Culicidae a excepción del género <i>Sabethes</i>	Inversión-Translocación de <i>R</i> antes de <i>A</i>
Grupo 8	Orthoptera	Todas las especies de la familia gryllidae a excepción de <i>M. manni</i> , <i>L. doenitzi</i> y <i>T. sjostedti</i>	Inversión-Translocación de <i>-E</i> , <i>-S1</i> , <i>-N</i> entre <i>R</i> y <i>-F</i>
Grupo 9	Diptera	Familia Culicidae, género <i>Sabethes</i>	Inversión-Translocación de <i>-C</i> y <i>-Y</i> antes de <i>I</i> ; Inversión-Translocación de <i>R</i> entre <i>A</i> y <i>ND3</i>
Grupo 10	Hymenoptera	Familia Cephidae	Inversión-Translocación de <i>-Q</i> antes de <i>I</i> ; Inversión-Translocación de <i>M</i> después de <i>12S</i>

Grupo 11	Hymenoptera	<i>M. scabrinodis</i> , <i>V. emeryi</i> , <i>S. geminata</i> , <i>S. invicta</i> y <i>S. richteri</i>	Inversión-Translocación de <i>M</i> antes del <i>I</i> ; Inversión-Translocación de <i>V</i> después de <i>12S</i>
-------------	-------------	--	---

b)

Grupo	Orden	Especies	Duplicación/ Delección
Grupo 1	Hemiptera Orthoptera Coleoptera	<i>P. americana</i> <i>C. campestris</i> <i>A. superciliosus</i> , <i>E. brandti</i> y <i>E. chinensis</i>	Delección <i>I</i>
Grupo 2	Hemiptera Coleoptera	<i>N. apicalis</i> <i>R. ohbai</i>	Delección <i>I</i> , - <i>Q</i> y <i>M</i>
Grupo 3	Mantodea Diptera	<i>S. bicornis</i> Género <i>Chrysomya</i>	Duplicación <i>I</i>

Fuente: Autor.

	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 2
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 04
		Fecha Aprobación: 04/03/2019

Los autores:

Nombre Completo	Identificación N°
Manuela Alejandra Moreno-Camona	1.110.592.019

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

No Autorizar Motivo: _____

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirla en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifiestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

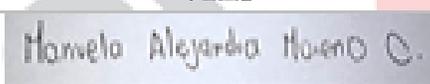
	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 2 de 2
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 04
		Fecha Aprobación: 04/03/2019

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 "...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable" y 37 "...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro". El artículo 11 de la Decisión Andina 361 de 1988, "los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores" y en su artículo 81 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo:	Análisis de las alteraciones del genoma mitocondrial de hexápodos y su impacto en la evolución
Trabajo de grado presentado para optar al título de:	BIÓLOGO

Quiénes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el día 08 del mes JUNIO del año 2019.

Nombre Completo	Firma	Identificación N°.
Manuela Alejandra Moreno Camena		1.110.592.019

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.