

**Evidencias moleculares de especiación incipiente
en *Heliconius erato* (*H. erato chestertonii* y *H.
erato venus*)**

Carlos Francisco Arias Mejía

**Tesis de grado para optar al título de maestro en
Biología**

**Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de los Andes
Bogotá D.C.
Agosto de 2005**

**Evidencias moleculares de especiación incipiente
en *Heliconius erato* (*H. erato chestertonii* y *H.
erato venus*)**

Carlos Francisco Arias Mejía

Director de tesis

Mauricio Linares Porto

Ph.D. Genética de Poblaciones

Codirector de tesis

Camilo Salazar C.

Ms.c. Biología

Departamento de Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Universidad de los Andes

Bogotá D.C.

Agosto de 2005

Tabla de Contenido

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	11
3. MARCO TEÓRICO.....	17
4.1. OBJETIVO GENERAL.	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
5. METODOLOGÍA.	22
5.1 MUESTREO DE INDIVIDUOS SILVESTRES.....	22
Localidad	22
5.2. ANÁLISIS MOLECULARES	23
5.2.1. <i>Extracción de ADN</i>	23
5.2.2. <i>Amplificación de mtDNA y microsatélites</i>	24
5.2.2.1. ADN mitocondrial.	24
5.2.2.2. Microsatélites.	25
5.2.3. <i>Análisis de ADN mitocondrial</i>	26
5.2.3.1. Alineamiento de secuencias	26
5.2.3.2. Reconstrucción filogenética	26
5.2.4. <i>Análisis multilocus</i>	27
6. RESULTADOS	29
6.1. ADN MITOCONDRIAL	29
6.2. MICROSATELITES.....	32
6.3. TEST DE ASIGNAMIENTO	39
7. DISCUSIÓN	41
7.1. FLUJO GENÉTICO E INTROGRESIÓN ASIMÉTRICA DEL ADN MITOCONDRIAL ...	43
7.2. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL	44

7.3. ZONAS HÍBRIDAS BIMODALES.....	45
7.4. ESPECIACIÓN INCIPIENTE?.....	47
8. CONCLUSIONES	49
9. BIBLIOGRAFÍA.	50
10. ANEXOS	56

Listado de Figuras

Figura 1. Distribución geográfica de las especies de este estudio.	13
Figura 2. Vista ventral y dorsal de las razas utilizadas en este estudio.	14
Figura 3. Relación entre las distintas razas de <i>Heliconius erato</i> inferida a partir del análisis de secuencias CO I y CO II del ADN mitocondrial.	15
Figura 4. Sitios de muestreo de los individuos silvestres usados en este estudio.	23
Figura 5 . Árbol filogenético de los taxa bajo estudio.	30
Figura 6. Cladograma de las razas bajo estudio.	31
Figura 7. Estadístico de F_{st} entre pares de poblaciones.	36
Figura 8. Test de Asignamiento para los 106 individuos usados en este estudio.	38
Figura 9. Probabilidad promedio de pertenecer a uno de los dos cluster según el sitio de muestreo.	40
Figura 10. Porcentajes en la tasa de eclosión de huevos en cruces interspecíficos e intraespecíficos y posibles rutas de herencia del ADN mitocondrial.	44

Listado de Tablas

Tabla 1. Procedencia y número de individuos silvestres utilizados en este estudio tanto para los análisis de microsatélites como los de ADN-mitocondrial.	22
Tabla 2. Priemers de ADN-mitocondrial usados para amplificar parcialmente el gen de COI y COII.	24
Tabla 3. Loci de microsatélites usados ente estudio.	26
Tabla 4. Estructura poblacional y distancias genéticas entre pares de poblaciones.	32
Tabla 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci usados en este estudio.	34
Tabla 6. Diferenciación genética entre pares de poblaciones.	35
Tabla 7. Estadísticos de F_{st} entre pares de poblaciones.	36
Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci usados en este estudio.	37

Resumen

Para evaluar la importancia del flujo genético en la especiación es fundamental estudiar especies incipientes o razas geográficas que entran en contacto e hibridizan en la naturaleza. *H. erato venus* y *H. erato chestertonii* presentan una zona híbrida bimodal en el Cañon de Río Calima en el Valle del Cauca (4 Km). Análisis de las secuencias de ADN-mitochondrial del gen COI y COII (1551 pares de bases) sugieren que *H. erato venus* es un grupo monofilético, mientras que *H. erato chestertonii* es parafilético. A su vez, siete loci de microsatélites mostraron un alto grado de diferenciación genética para poblaciones tanto alopátricas como simpátricas de estos dos taxa ($F_{st} P < 0.05$). Estos resultados, junto con un test de asignamiento genotípico y la existencia en simpatria de desequilibrio de Hardy-Weinberg (por déficit de heterocigotos), indican que *H. erato chestertonii* es una especie incipiente (en el sentido biológico), dado que mantiene su integridad genética en presencia de flujo genético.

1. Introducción

Desde la publicación del origen de las especies por Darwin en 1859, se ha intentado explicar tanto las bases genéticas como los procesos evolutivos que producen y dan origen a nuevas especies, convirtiéndose en uno de los temas pilares en biología evolutiva (Turelli et al. 2001). Grandes avances en este campo se han hecho en las últimas décadas con una gran cantidad de publicaciones y estudios que ha permitido construir un buen marco teórico y conceptual en dicha área (Otte y Endler 1989, Howard y Berlocher 1998, Coyne y Orr 2004). Distintos modelos de especiación han sido propuestos y cada uno de ellos con sus propios supuestos y limitaciones. Especiación en completo aislamiento geográfico (especiación alopátrica), parece no ser controversial y estar bien soportada (Coyne y Orr 2004), mientras que especiación en presencia de flujo genético (especiación simpátrica y parapátrica) es todavía hoy en día controversial y pocos casos han sido realmente comprobados (Coyne y Orr 2004). De esta manera, el estudio de los mecanismos que previenen el flujo genético y que mantienen la cohesión del genoma entre las distintas especies es de gran importancia en los distintos modelos de especiación (Hewitt 2001).

Hibridación ha sido un problema para los distintos modelos de especiación, sin embargo estudios en zonas de hibridación en las últimas décadas han ayudado a entender y clarificar muchos de estos inconvenientes (Hewitt 2001). Estos trabajos han mostrado que las zonas de hibridación son mantenidas la mayoría de ellas por la interacción de selección natural y flujo genético (Mallet y Barton 1989). Por ejemplo, selección divergente, gracias a diferencias en el ambiente puede reducir la aptitud de los híbridos entre poblaciones estrechamente relacionadas, generando barreras para el intercambio de genes y por consiguiente llevar a la especiación. Las zonas de hibridas por consiguiente son "laboratorios

naturales" que dan una oportunidad única para estudiar la arquitectura genética y los procesos evolutivos que dan origen a nuevas especies (Rieseberg et al 1999, Jiggins y Mallet 2000, Redenbach y Taylor 2003).

Las mariposas del género *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) han despertado el interés de muchos biólogos evolutivos gracias a que: Primero, presentan una gran variación fenotípica y geográfica entre sus distintas razas, Segundo, muestran extraordinarias asociaciones a anillos miméticos mülerianos entre razas de distintas especies, y Tercero, estas razas pueden formar zonas de hibridación donde las frecuencias en sus clases genotípicas cambian y determinan el tipo de zona híbrida (Benson 1972, Brown et al 1974, Jiggins et al 1997; Joron y Mallet 1998, , Linares 1989, 1996, 1997, Joron et al 2001). Esta enorme diversidad, su amplio espectro de variación geográfica, junto con su rápida evolución morfológica y un profundo conocimiento de su ecología y sistemática, las han convertido en un excelente sistema biológico para el estudio y prueba de hipótesis de micro y macro-evolución (Brower 1994, McMillan et al 1997, Hsu et al 2001).

Estudios recientes, en este grupo, proponen la existencia de especiación incipiente gracias a diferencias ecológicas, aislamiento reproductivo y selección mimética (Jiggins et al 1996, 1997). Es de particular interés el caso de *Heliconius himera* y *Heliconius erato* donde se muestra que la adaptación ecológica puede ser una fuerza de gran importancia para generar especiación (Jiggins et al 1997). Otro caso en donde puede estar ocurriendo un patrón similar, y el interés principal de este estudio es la posible existencia de especiación incipiente entre *Heliconius erato chestertonii* y *Heliconius erato venus*. Análisis anteriores de desequilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento en caracteres del patrón de coloración alar de estas razas, así como diferencias en el tamaño y morfología de las larvas y las alas de los individuos adultos, parecen estar acorde con una

zona de hibridación bimodal (Muñoz 2001, 2004). Este trabajo aporta evidencias moleculares de la existencia de una zona de hibridación bimodal entre estas supuestas "razas", y su posible proceso de especiación, gracias a una reducción del flujo genético entre ellas.

2. Antecedentes

Las mariposas del género *Heliconius* no son solo reconocidas por su extraordinario mimetismo mülleriano sino también por la gran diversidad geográfica de sus patrones de coloración (Mallet et al 1998). Además, presentan zonas de contacto donde diferentes especies y razas se encuentran e hibridizan. De esta forma, cerca de un 25 a 28 % del total de especies de este género presentan híbridos interespecíficos en la naturaleza (Mallet et al 1998). Aunque la hibridación entre especies en este grupo es bastante común la cantidad de individuos híbridos en algunos casos puede ser bastante baja, por ejemplo se ha visto que en zonas de hibridación entre *Heliconius cydno* y *H. melpomene* la frecuencia de los híbridos en la naturaleza puede ser menor al 1% en comparación con las formas parentales. Uno de los casos mejor estudiados es el caso de *Heliconius erato cyrbia* y *Heliconius himera* donde solo un 10% de la población son híbridos (Jiggins et al 1996, Mallet et al 1998). Esta baja cantidad de híbridos parece ser parcialmente explicada por diferencias en el uso del hábitat y por apareamiento asociativo entre las distintas especies (Jiggins et al 1996, 1997). *H. e. cyrbia* y *H. himera* forma una angosta zona de hibridación bimodal de más o menos 5 km, que es mantenida por una fuerte selección en contra de los híbridos, gracias a la importancia de su patrón de coloración de advertencia (Jiggins et al. 1996, 1997). De esta forma, selección mimética parece ser una fuerza importante y el motor que dispara la especiación en este grupo de mariposas (Jiggins et al 1996).

Otro caso interesante de estudio es el caso de *Heliconius erato venus* y *Heliconius erato chestertonii*, estudios preliminares en estas razas apoyan la idea de la existencia de una zona de hibridación bimodal de unos 4 km de longitud donde existen pocas formas intermedias y una gran cantidad

de las formas parentales. Estos dos taxa se distribuyen a través de hábitats diferentes, *H. erato chestertonii* se encuentra ampliamente distribuido a lo largo del bosque montano seco del Valle del Cauca, mientras que *H. erato venus* se encuentra distribuido a lo largo del bosque húmedo tropical en la costa Pacífica Colombiana (Linares, Muñoz y Arias Obs. Pers; Figura 1). Estudios genéticos, morfológicos y de aislamiento reproductivo mostraron fuertes evidencias de que estas dos razas son especies incipientes (Muñoz 2004). Las principales barreras al flujo genético entre estas "razas" parecen estar siendo mediadas por aislamiento reproductivo precigótico (apareamiento asociativo), así como un desarrollo leve de barreras postcigóticas por una baja en la tasa de eclosión por parte de los individuos híbridos en cruces de laboratorio (Muñoz 2004).

Fenotípicamente también muestran diferencias significativas en su patrón de coloración alar. *H. erato venus* se caracteriza por poseer en el ala anterior una banda roja, con un ala posterior melánica dorsalmente con un borde blanco. Mientras que ventralmente posee una banda amarilla en la zona media del ala, junto con una línea amarilla donde el ala anterior y posterior se solapan, además en algunos casos presenta de cero a cuatro puntos rojos en la zona de las alas cercanas al tórax (Figura 2). *H. erato chestertonii* por su parte se caracteriza por la presencia de un ala anterior melánica con un brillo iridiscente y una barra amarilla en el ala posterior sobre ambas superficies (Figura 2; Emsley 1965). Estas dos razas forman parte de anillos miméticos müllerianos distintos, *H. e. venus* mimetiza a *H. melpomene vulcanus*, mientras *H. erato chestertonii* mimetiza a *H. cydno weymerif. gustavi*.

Figura 1. Distribución geográfica de las especies de este estudio. *H. erato venus* es mostrada en sombreado rojo, mientras *H. erato chestertonii* aparece en sombreado azul.

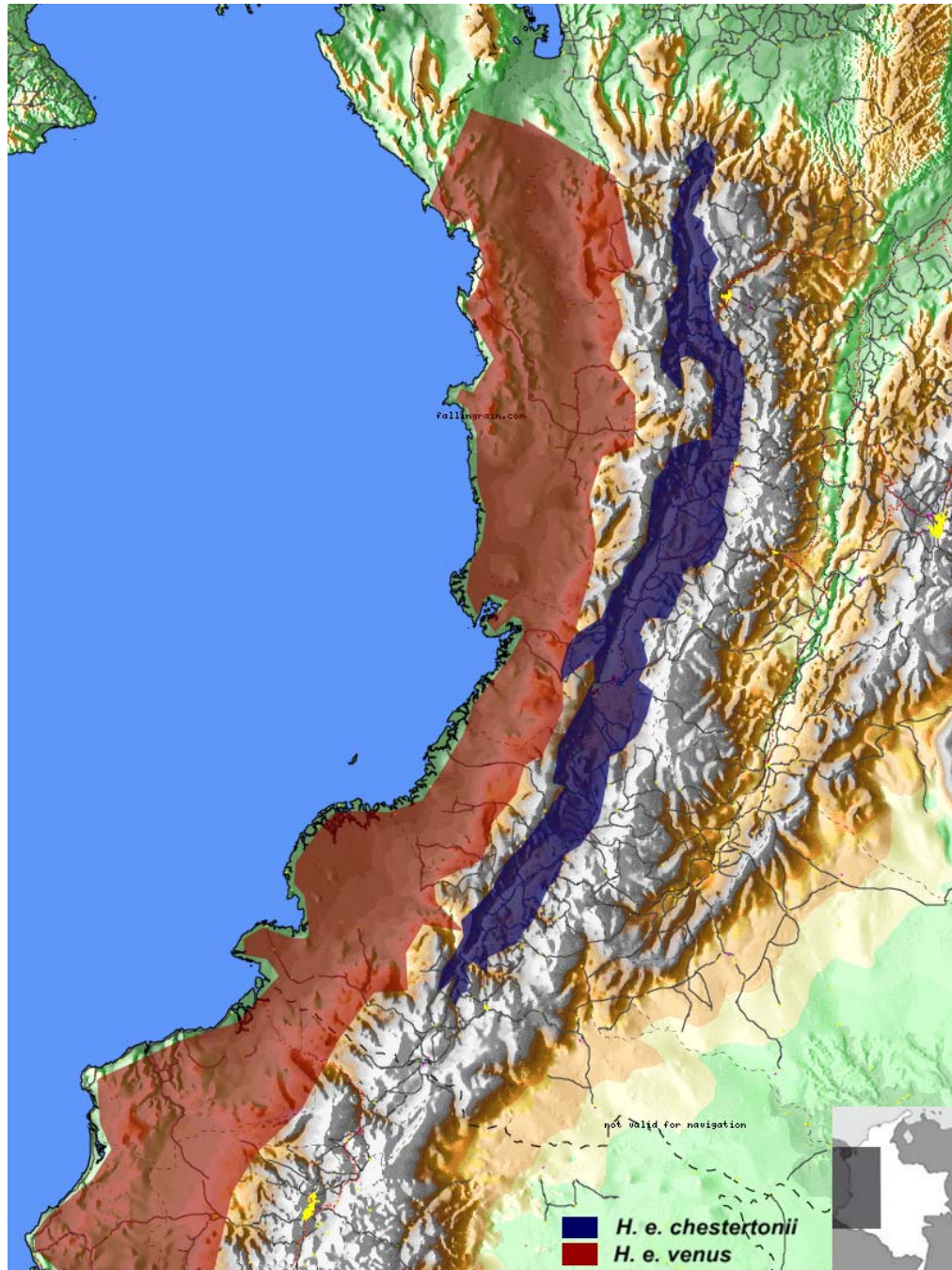
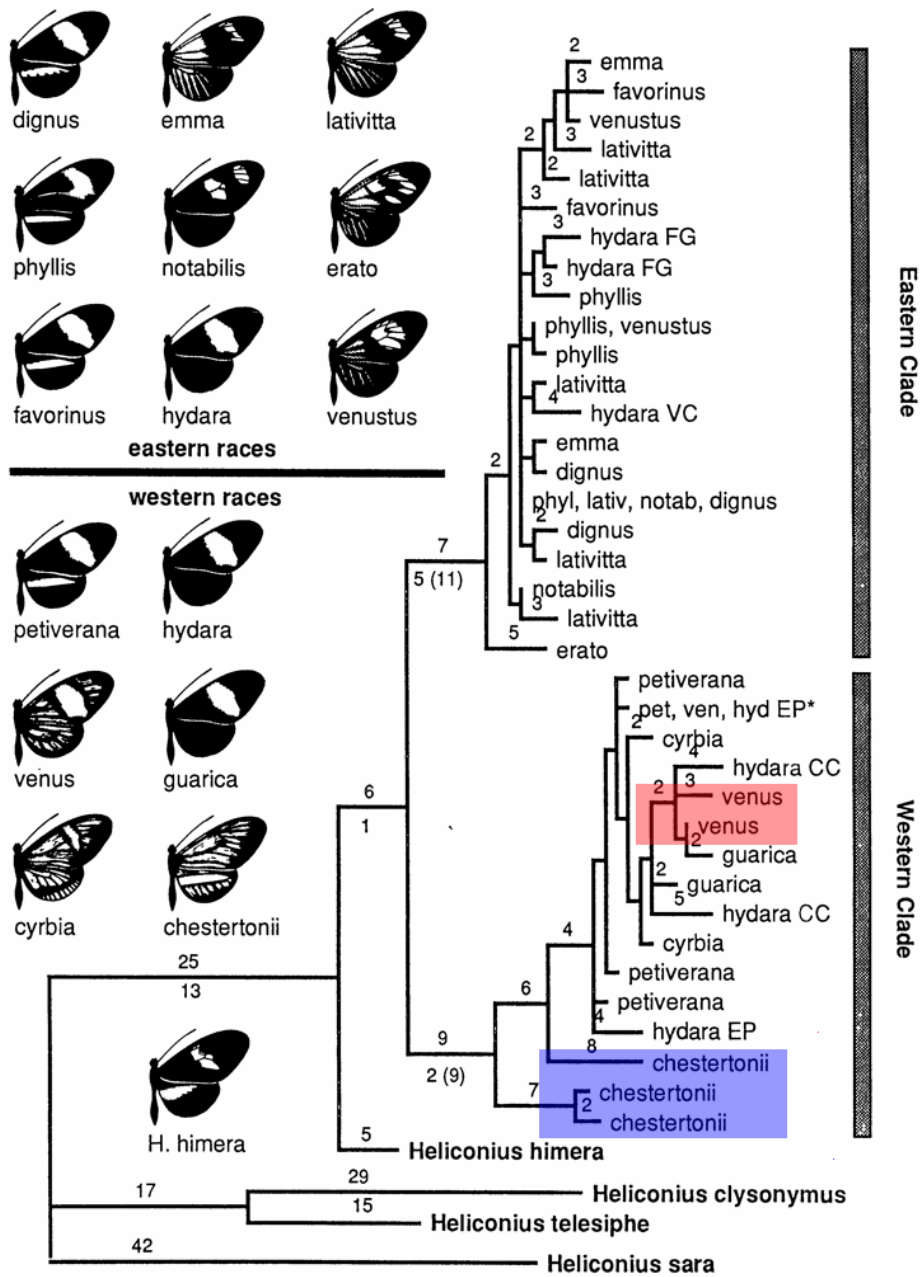


Figura 2. Vista ventral y dorsal de las razas utilizadas en este estudio. a) *Heliconius erato chestertonii*. b) *Heliconius erato venus*.



Por otro lado, análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales (COI y COII) en el grupo erato, ubican a *H. erato chestertonii* de forma basal y parafilético en el clado occidental del grupo erato, mientras que *H. erato venus* se muestra bien diferenciado de este último dentro del mismo clado (Figura 3). *H. erato chestertonii* representado en el árbol por tres individuos, muestra la mayor divergencia interracial en sus secuencias con cerca de un 2.5 % entre individuos tanto del este como del oeste del valle de Cauca, así mismo muestra una divergencia promedio entre pares de secuencias del 2.3 % con respecto al clado occidental de erato, clado en el que se encuentra *H. erato venus* (Brower, 1994, 1996).

Figura 3. Relación entre las distintas razas de *Heliconius erato* inferida a partir del análisis de secuencias CO I y CO II del ADN mitocondrial. En Sombreado se encuentra las especies de interés de este estudio. Tomado de Brower 1994.



Todas estas evidencias hacen pensar que *H. erato chestertonii* es una especie incipiente, no obstante, estudios que midan la tasa de flujo genético entre estas razas son necesarios para establecer si realmente existen poblaciones claramente diferenciadas. De esta forma, en este estudio se pretende mediante el uso de marcadores moleculares establecer la cantidad de flujo genético que existe entre estas dos supuestas "razas".

3. Marco teórico.

Distintas preguntas, escenarios e hipótesis se han formulado para intentar establecer los mecanismos y fuerzas evolutivas que dan origen a las especies, siendo uno de los temas centrales y de mayor importancia en biología evolutiva. Sin embargo las distintas interpretaciones de estos procesos continúan, siendo controversiales (Barton 2001). No obstante especiación parece ser simplemente el producto de la divergencia genética entre organismos, y la responsable de la gran diversidad de la vida (Gavrilets 2003). Dicha divergencia entre las distintas poblaciones es entonces el resultado de aislamiento reproductivo (prezigótico y/o postzigótico), el cual puede ser mediado por la acción de distintos factores como: mutación, deriva genética, recombinación, selección natural y flujo genético. Los distintos modelos teóricos existentes simplemente intentan explicar las interacciones de estos factores dentro de las poblaciones y así entender la dinámica de los distintos mecanismos y modos de especiación (Gavrilets 2003).

El estudio de zonas de hibridación puede entonces ayudar al mejor entendimiento de los distintos modos de especiación (Jiggins y Mallet 2000). Las zonas de hibridación son áreas donde linajes distintos entran en contacto e hibridizan, generando individuos con rasgos fenotípicos y genotípicos intermedios al de los taxa parentales (Redenbah y Taylor 2003, Barton y Hewit 1985). Las diferencias en la distribución fenotípica y genotípica de los individuos pueden dar una idea del tipo de zona de hibridación. Zonas híbridas compuestas en su mayoría por fenotipos o genotipos recombinantes son llamadas "unimodales" (Harrison 1993, Harrison y Bogdanowicz 1997, Jiggins y Mallet 2000). Mientras que las zonas de hibridación bimodales muestran gran cantidad de individuos fenotípicamente y genéticamente iguales a las formas parentales, con

unos pocos individuos con características intermedias a estos (Harrison 1993, Harrison y Bogdanowicz 1997, Jiggins y Mallet 2000). Esta falta de formas intermedias puede ser entendida genéticamente como un déficit de heterocigotos o desequilibrio de ligamiento entre distintos loci (Jiggins y Mallet 2000). Estudios distintos en aves, mariposas, grillos, girasoles y peces muestran bajos porcentajes de heterocigotos, estas diferencias parecen estar fuertemente correlacionadas con algún tipo de aislamiento precigótico (Jiggins y Mallet 2000, Redenbah y Taylor 2003). Sugiriendo que el proceso de especiación entre las formas parentales es casi completo. Así mismo el paso de un tipo de zona de hibridación a otro (unimodal a bimodal o viceversa) puede verse como un continuo, donde la especiación es un proceso gradual y acumulativo de diferencias entre distintas poblaciones o taxa (Jiggins y Mallet 2000). De este modo el estudio y entendimiento de zonas de hibridación es de gran importancia, ya que estas pueden estar jugando un rol importante en la especiación.

Evidencia molecular que muestre reducción de flujo genético puede contribuir a un mejor entendimiento de las fuerzas y los procesos que contribuyen a la especiación en zonas donde entran en contacto poblaciones con algún grado de divergencia (Schulter 2001, Ogden y Torpe 2002). Modelos evolutivos que involucren estudios de flujo genético pueden entonces aportar evidencias del rol que juega selección natural en el umbral de la especiación (Machado 2002). Recientemente, se ha propuesto una nueva rama para el estudio de los procesos que llevan a la especiación llamado "Divergencia genética de poblaciones" (Kliman et al 2000), Esta nueva rama de la genética de poblaciones utiliza métodos estadísticos y modelos de evolución sobre múltiples loci. Permitiendo realizar inferencias acerca de la historia y la forma en que está actuado el flujo genético y la selección natural sobre ciertas zonas del genoma (Machado 2002) y como estas contribuyen a la divergencia de distintas poblaciones.

Los marcadores genéticos mendelianos son herramientas invaluable para el estudio de las zonas híbridas (Avice 1994), ya que permiten la caracterización de individuos dentro de distintas categorías o clases genotípicas y fenotípicas (Puros, Híbridos, F1, retrocruces). Lo que puede ayudar a medir el intercambio de genes e introgresión entre distintas especies o poblaciones (Anderson y Thomson 2002). El ADN-mitocondrial ha mostrado tener características ideales para análisis filogenéticos y de genética de poblaciones (Avice 1987, 1994) y ha sido de gran utilidad en estudios de hibridación y de introgresión en varios grupos de animales (ranas, ballenas, peces, roedores; Avice 1994). Siendo en algunos casos capaz de diferenciar la dirección del intercambio de genes y dando pistas de la arquitectura genética de la zona de híbrida (Avice 1994). Por otro lado, marcadores moleculares como los microsatélites han venido siendo ampliamente utilizados en biología evolutiva por su gran versatilidad (Chambers y Macoy 2000). Los microsatélites son repeticiones en tandem de secuencias de ADN que se encuentran en gran abundancia en los genomas de muchos organismos. Entre sus principales características esta su alta tasas de evolución lo que genera su alto grado de polimorfismo. Sus aplicaciones van desde su relativa fácil amplificación en distintos segmentos cromosomales, hasta la identificación y asignación de individuos dentro de poblaciones. Estas características lo convierten en excelentes herramientas para inferir la historia biológica de diferentes poblaciones (Chambers y Macoy 2000).

En algunas zonas híbridas los patrones de variación de marcadores mitocondriales y nucleares pueden ser altamente concordantes (Avice 1994), sin embargo en algunos casos se puede observar discordancia entre distintos loci, lo que puede estar reflejando diferencias históricas entre los distintos marcadores (árboles de genes Vs árboles de especies; Nichols 2001, Hudson y Coyne 2002). Estas diferencias puede deberse a variación ancestral compartida, así como también a introgresión

diferencial en distintas partes del genoma (Machado et al 2002, Pääbo 2003). No obstante análisis multilocus puede mostrar una imagen completa del genoma y dar una idea de como las distintas fuerzas contribuyen a la especiación.

El interés central de este estudio es entonces dar evidencias moleculares, de la existencia de una zona de hibridación bimodal entre *H. e. venus* y *H. e. chesteronii* con una reducción del flujo genético entre ellas, así como también su posible proceso de especiación, mediante el uso de ADN-mitochondrial y diferentes loci de microsatélites.

4.1. Objetivo General.

Aportar evidencia molecular mediante el uso de ADN mitocondrial y microsatélites de la posible especiación incipiente de dos razas de mariposas del genero *Heliconius*: *H. erato chestertonii* y *H. erato venus*.

4.2. Objetivos específicos.

- Estandarizar el uso de ADN mitocondrial y microsatélites como marcadores moleculares en dos razas de mariposas del genero *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae): *H. erato chestertonii* y *H. erato venus*.
- Determinar si existe estructura poblacional entre *H. erato chestertonii* y *H. erato venus*.
- Determinar si existe flujo genético entre poblaciones en alopatria y simpatria de *H. erato chestertonii* y *H. erato venus*.
- Aportar evidencias moleculares de la posible especiación incipiente en *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae): *H. erato chestertonii* y *H. erato venus*.
- Establecer mediante el uso de marcadores moleculares si la de zona hibridación de *H. erato chestertonii* y *H. erato venus* se ajusta al modelo teórico bimodal.

5. Metodología.

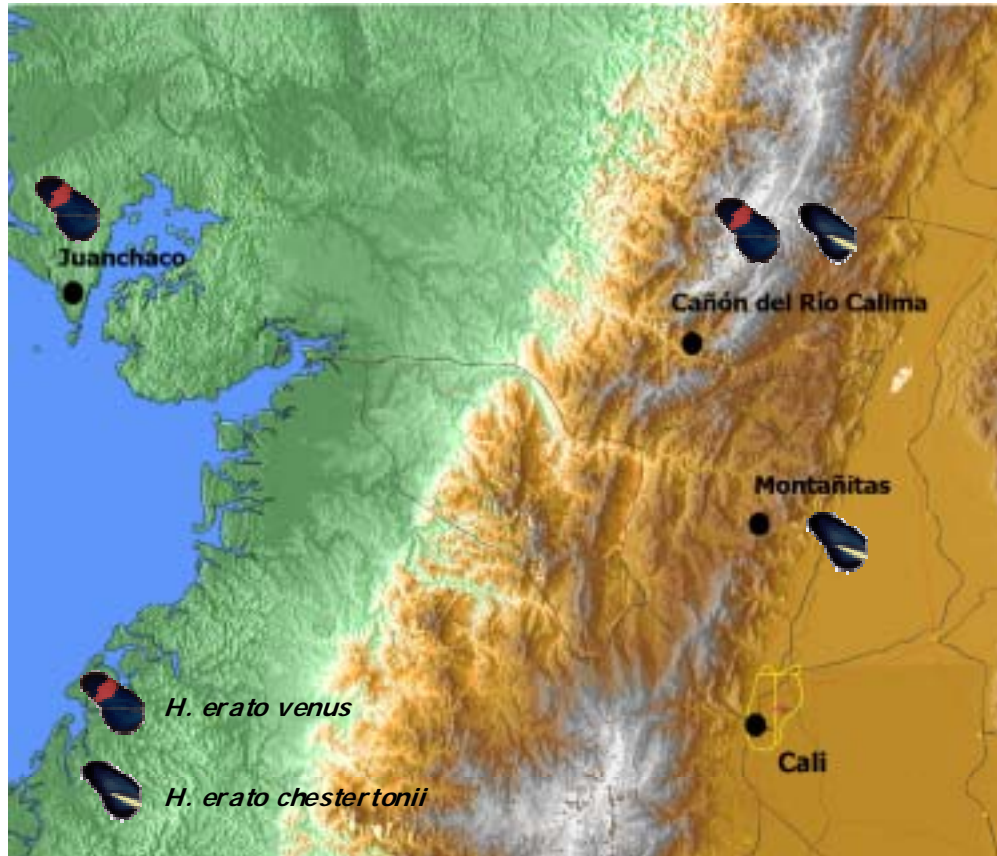
5.1 Muestreo de Individuos Silvestres.

Para este estudio se colectaron individuos silvestres de *Heliconius erato venus* y *Heliconius erato chestertonii* tanto en alopatria como en simpatria en el valle del Cauca (Tabla 1, Figura 4), los individuos fueron colectados por Mauricio Linares, Astrid G. Muñoz y Carlos F. Arias en el periodo comprendido entre el 1997 y el 2004, los individuos capturados fueron preservados en Etanol al 98% o DMSO en el campo y luego colocados a -80°C en la colección de tejidos del instituto de genética de la Universidad de los Andes.

Especie (Subespecie)	No. De Ind. Microsa/mtDNA	Localidad		
<i>H. erato chestertonii</i>	30/5	Montañitas	Valle del Cauca	Alopatria
<i>H. erato chestertonii</i>	10/0	Km 4 Río Calima	Valle del Cauca	Simpatria
<i>H. erato chestertonii</i>	12/5	Km 15 Río Calima	Valle del Cauca	Simpatria
<i>H. erato venus</i>	13/5	Km 15 Río Calima	Valle del Cauca	Simpatria
<i>H. erato venus</i>	30/5	Juanchaco	Valle del Cauca	Alopatria

Tabla 1. Procedencia y número de individuos silvestres utilizados en este estudio tanto para los análisis de microsatélites como los de ADN-mitocondrial.

Figura 4. Sitios de muestreo de los individuos silvestres usados en este estudio. Localidades: Juanchaco (Valle del Cauca), Cañón del Río Calima (Valle del Cauca), Montañitas (Valle del Cauca).



5.2. Análisis moleculares

5.2.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN geonómico se realizó a partir de la maceración de un tercio de tórax y mediante el uso de columnas de extracción de ADN (Dnaeasy tissue kit Qiagen).

5.2.2. Amplificación de mtDNA y microsatélites

5.2.2.1. ADN mitocondrial.

Los genes mitocondriales amplificados incluyen el extremo 3' de la subunidad I de la Citocromo oxidasa (COI), el gen del RNAt de Leucina y la subunidad II de la Citocromo oxidasa (COII). Estas regiones fueron amplificadas a partir de ADN genómico por medio de la técnica de PCR. La enzima utilizada fue la taq polimerasa (Invitrogen) y los primers específicos Jerry y Pat para COI y GeorgeIII e Imelda para CO II de acuerdo a Beltrán et al, 2002.

mtDNA	Primers	Secuencia
COI	Jerry	5' CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG 3'
	Pat	5' TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A 3'
COII	George	5' TAG GAT TAG CTG GAA TAC C 3'
	Imelda	5' CAT TAG AAG TAA TTG CTA ATT TAAC TA 3'

Tabla 2. Primers de ADN-mitocondrial usados para amplificar parcialmente el gen de COI y COII. según Beltrán et al 2002.

La PCR se llevo a cabo a una temperatura de denaturación de 94°C, anillaje 48°C y extensión a 52°C durante 29 ciclos usando un termociclador Peltier Thermal Cycler referencia PTC-200 DNA Engine™ (MJ Research Inc.). Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa regular al 1.5% para verificar la obtención de amplificación. La reacción total se purifico en agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% con bromuro de etidio (1 mg/ml). Posteriormente las bandas de ADN fueron cortadas y disueltas en gelasa. Este producto de PCR se secuenció usando los primers externos mencionados arriba y los primers internos Phylip y Romeo. La reacción se llevó a cabo usando Dye-terminator, tomando 2µl de Big Dye, 0.6µl de buffer 5x, 2.5µl de primer y 2µl de templado. La condiciones del ciclo de

secuenciación serán 96°C por 30 segundos, 96 °C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos repitiendo 30 ciclos, la reacción se llevó a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cyder referencia PTC-200 DNA Engine™ (MJ Research Inc.). Luego estos productos fueron purificados por medio de precipitación con acetato de sodio. Las muestras fueron resuspendidas en formamida desionizada y denaturadas a 94°C por cinco minutos para luego ser corridas en una máquina de secuencia ABI Prism 3100 Sequencher (PE Applied Biosystems).

5.2.2.2. Microsatélites.

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron 10 loci utilizando sus respectivos primers (Tabla 2, Flanagan et al. 2002)., Los primers fueron marcados con distintos fluorocromos (FAM, HEX, NED, PET, VIC). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 96°C por 6 min, seguido de 30 ciclos a 92°C por 20s, 55°C por 30s y 72°C por 45s y finalmente 72°C por 20min (Flanagan et al. 2002) la reacción se llevó a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cyder referencia PTC-200 DNA Engine™ (MJ Research Inc.). Los productos de las distintas amplificaciones fueron observados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y coloreados con bromuro de etidio para determinar la calidad de la amplificación.

El análisis de los fragmentos fue corrido en una máquina de secuencia ABI Prism 3100 Sequencher (PE Applied Biosystems) usando GeneScan 3.7 y Genotyper 3.7 (PE Applied Biosystems) para genotipificar y establecer el tamaño de los distintos fragmentos usando como estandar de tamaño rox 500 y Liz 500 (PE Applied Biosystems).

Primer	Temperatura de anillaje (Ta)	Tamaño (pb)
Hel 01 (B 6)	55°C	418-448
Hel 02 (B 32)	55°C	158-178
Hel 04 (GA8)	55°C	178-250
Hel 05 (GA 11)	55°C	246-350
Hel 10 (CA9)	55°C	292-356
Hel 11 (CA10)	56°C	186-208
Hel 12 (TGA4)	55°C	353-407
Hel 13 (CA13)	55°C	226-242
Hel 14 (AAT4)	55°C	165-180
Hel 17 (Ms14)	55°C	160

Tabla 3. Loci de microsatélites usados en estudio. Según Flanagan et al. 2002.

Ta= Temperatura de anillaje.

5.2.3. Análisis de ADN mitocondrial.

5.2.3.1. Alineamiento de secuencias

Los cromatogramas de ADN-mitocondrial fueron editados a mano usando SEQUENCHER 3.0 (Gene Codes Corporation, Inc.). Después de verificar la secuencia para cada individuo, las secuencias fueron alineadas con este mismo programa para todos los taxa. Las secuencias fueron alineadas con otras secuencias de Eratos disponibles en el GenBank y usado como grupo ageno las siguientes taxa: *H. sara*, *H. hecalesia*, *H. clysonimus*, *H. telesiphe* (ver Beltrán et al 2002).

5.2.3.2. Reconstrucción filogenética

Las secuencias de nucleótidos para las regiones codificantes del ADN-mitocondrial fueron corregidas según el marco de lectura de las proteínas (codones de terminación y secuencias peptídicas funcionales) por medio

del uso del programa MacClade 4.0 (Maddison y Maddison 1997). El análisis filogenético bajo los criterios de parsimonia, incluyendo el soporte de clados por bootstrap (Felsenstein 1985) y verosimilitud se llevaron a cabo con PAUP* versión 4.0b 10 (Swofford 2000). En el caso de máxima parsimonia, los árboles fueron obtenidos por una búsqueda heurística con TBR-branch swapping. El árbol consenso fue calculado usando el algoritmo de regla por mayoría al 50%. La confianza de cada nodo se obtuvo por medio de un bootstrap de 10000 réplicas. Los análisis con estadística bayesiana fueron llevados a cabo con el programa Mr Bayes 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist. 2001). Inicialmente se estableció el modelo de evolución molecular con el programa MrModelTest 2.1 (Nylander 2004). El modelo elegido fue GTR+I+G y los análisis fueron llevados a cabo con 4 cadenas de Markov, con 1000000 de generaciones, guardando un árbol cada 100 generaciones. Una vez el programa terminó de correr, se determinó el valor para el cual la verosimilitud se mantenía constante y se realizó un consenso de regla por mayoría al 50 % para así calcular las probabilidades posteriores de cada nodo.

5.2.4. Análisis multilocus.

Los análisis estadísticos de genética de poblaciones se llevaron a cabo por medio del uso del programa ARLEQUIN versión 2.000 (Shneider et al 2000) y Genepop (Raymond y Rousset 1995). Por medio del uso de estos programas se estimó el coeficiente de endogamia F_{is} como una medida del defecto de heterocigotos, equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento entre pares de loci, además de otros estadísticos de F y diferenciación genética como estimativos de la cantidad de flujo existente entre las distintas poblaciones.

La presencia de desequilibrio de Hardy-Weinberg para algunos loci en algunas poblaciones, fue corregida para la presencia de alelos nulos mediante el uso del programa MicroChecker versión 2.2.3 (Oosterhout et al 2003). Después de realizar esta corrección los datos fueron reanalizados con los programas Arlequín 2.000 (Shneider et al. 2000) y Genepop versión 3.4 (Raymond y Rousset 1995).

Test de asignamiento genotípico se realizaron por medio de la implementación del programa Structure versión 2.0 (Pritchard et al 2000). Este programa utiliza estadística bayesiana y determina la probabilidad de la existencia de distintos clusters en las muestras para demostrar la presencia de estructura en un conjunto de datos. El programa asigna una probabilidad a cada individuo de pertenecer o compartir información de los distintos cluster. El programa asume que existen K poblaciones (donde K puede ser desconocido), cada una de ellas con unas frecuencias de alelos características para cada locus, las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento. El modelo no asume ningún modelo de mutación. Los análisis fueron corridos usando 5 cadenas de Markov con 1000000 de repeticiones y 5 replicas para K=2, 3, 4, 5 clusters a priori (Pritchard et al 2000).

6. Resultados

6.1. ADN Mitochondrial.

El alineamiento final de las secuencias de ADN mitocondrial de COI y COII fue de 1551 caracteres para 36 individuos (Incluidas las secuencias tomadas del GeneBank). De estos 1551 caracteres, 795 pb corresponden al gen de COI, 62 pb a RNAt y 694 pb al COII. Los análisis bajo el criterio de máxima parsimonia encontraron 3 árboles de igual longitud. La longitud de estos árboles fue de 422 pasos con un índice de consistencia de 0,751 y un índice de rescalado de 0,893 (Figura 5). Estos árboles muestran bien diferenciado y como un grupo monofilético el clado formado por los individuos tanto en simpatria como en parapatria de *H. erato venus*. Sin embargo, dicho clado presenta un soporte de solo un 60% en un análisis de Bootstrap y un 69% de soporte bajo un criterio estadístico bayesiano (Figura 6). Pese a esto, parece existir algo de estructura poblacional entre las poblaciones de Venus de Juanchaco y del cañón del Rio Calima con un soporte del 63% para Bootstrap y 70% para Bayesiana para esta ultima población (Figura 6).

Por otro lado, *H. erato chestertonii* aparece como un clado parafilético, los individuos de la población del Cañón del Rio Calima (Simpátrica) aparecen algo basales y como un clado bien diferenciado con un 100% de soporte tanto para Bootstrap como para Bayesiana (Figura 6). La población de *H. erato chestertonii* de Montañas (Alopátrica), se encuentra como grupo hermano del clado Venus con un soporte de 94% para Bootstrap y 82% para Bayesiana (Figura 6). Sin embargo, se ve cercanamente relacionada con otras razas de erato (*H. erato petiverana*, *H. erato cyrbia*).

Figura 5 . Árbol filogenético de los taxa bajo estudio. Este es uno de los 3 árboles obtenidos bajo el criterio de máxima parsimonia. Los 3 árboles muestran una longitud 422 pasos. Azul = *H. erato chesteronii*, Rojos = *H. erato venus*.

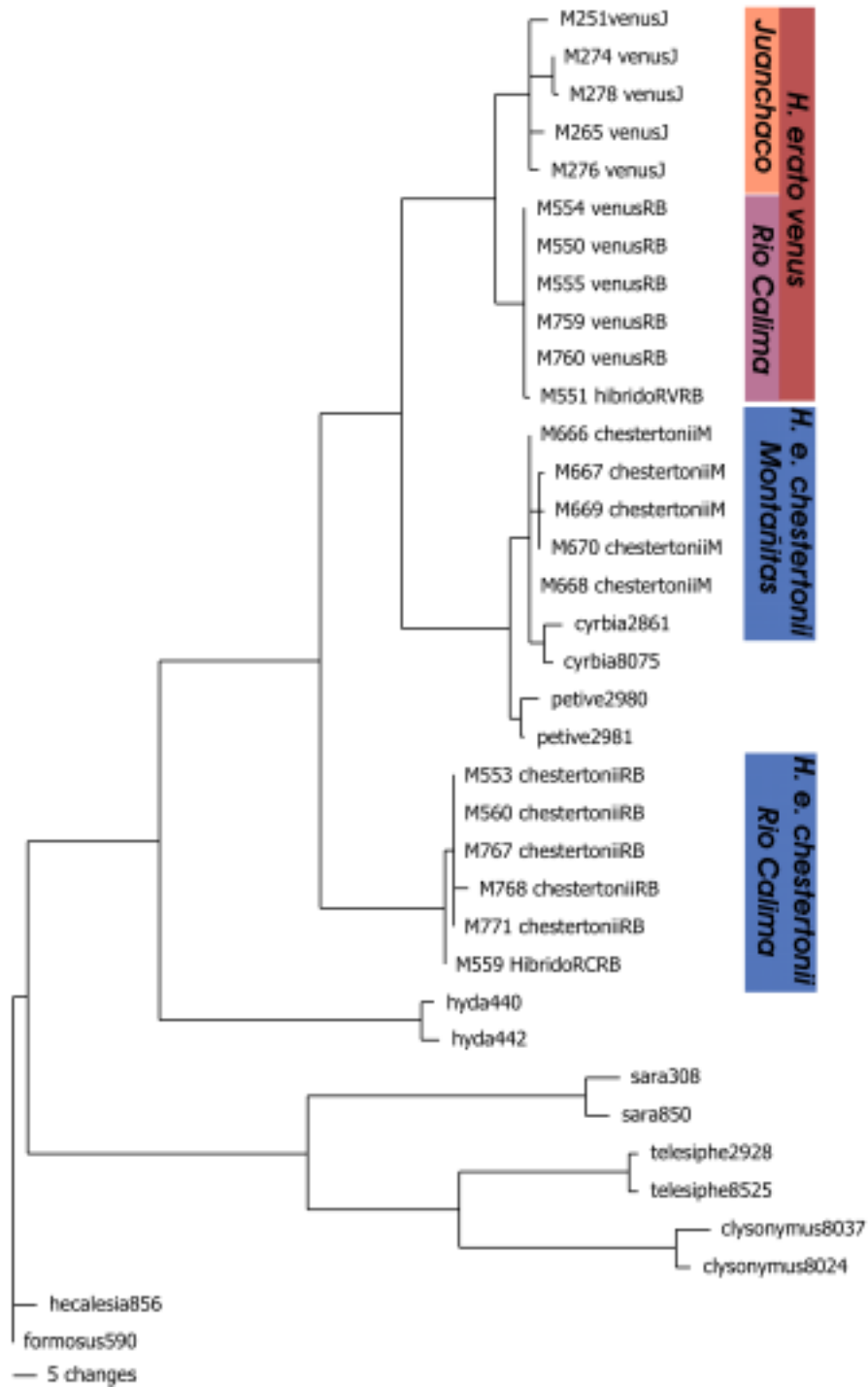
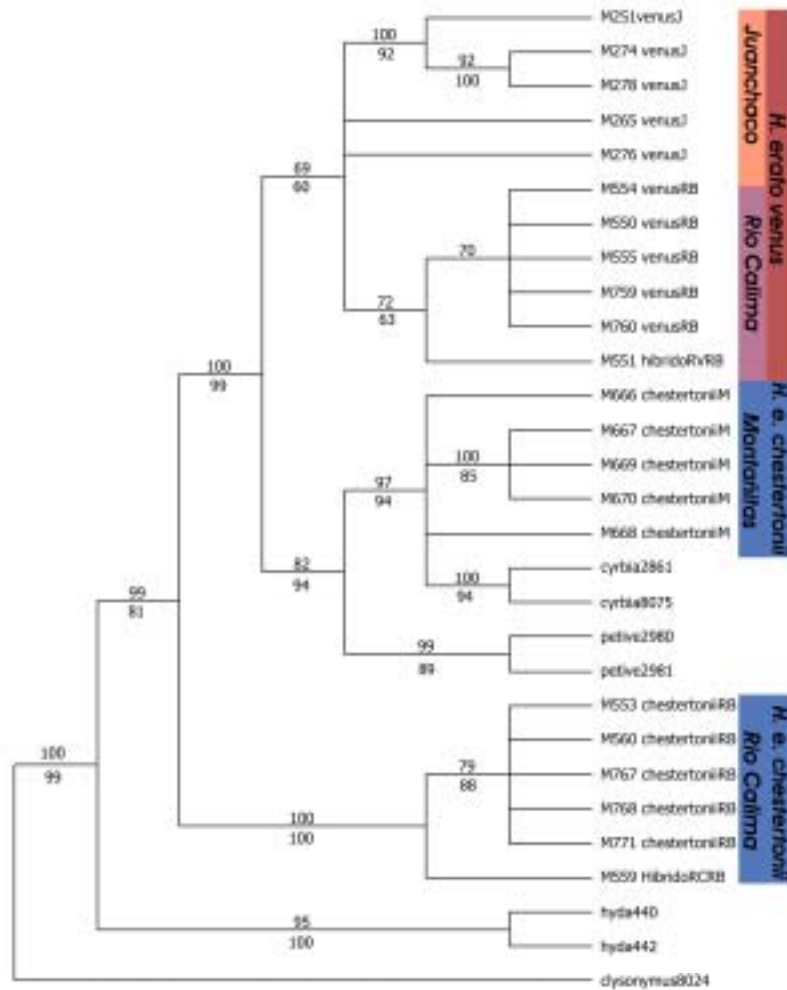


Figura 6. Cladograma de las razas bajo estudió. Este árbol muestra las relaciones y soporte de las ramas. Los valores sobre las ramas corresponde a un soporte por estadística bayesiana (9001 árboles), mientras que los valores bajo la línea representan el soporte de Bootstrap con 1000 replicas bajo el criterio de máxima parsimonia.



Análisis poblacionales a nivel de la variación de las secuencias del ADN mitocondrial mostraron una fuerte estructura y diferenciación genética en una comparación entre pares de poblaciones de *H. erato venus* y *H. erato chestertonii* ($F_{st} = 0.90204$; Hudson et al 1992; Anexo 2; Tabla 4).

Population 1	Population 2	Fst (Hudson et al 1992)	Dxy (Nei 1987)
Venus J	Venus R	0,58049	0,00441
Venus J	Chest R	0,90493	0,02396
Venus J	Chest M	0,75974	0,00993
Venus R	Chest R	0,96907	0,02085
Venus R	Chest M	0,92441	0,00995
Chest RB	Chest M	0,95014	0,02371

Tabla 4. Estructura poblacional y distancias genéticas entre pares de poblaciones. F_{st} para secuencias de nucleótidos según Hudson et al 1992 y Dxy distancias según Nei 1987, y usando una corrección de Jukes and Cantor.

La diversidad nucleotídica total para las secuencias de estas dos supuestas "razas" fue de 0,01267 con un total de 57 sitios segregantes entre sus secuencias. La población alpatría de *H. erato venus* presentó la mayor diversidad nucleotídica ($P_i = 0,0038$), mientras que su población simpátrica mostró la menor diversidad ($P_i: 0,00021$). Por otro lado, *H. e. chestertonii* muestra diversidades nucleotídicas similares entre sus dos poblaciones ($P_i: 0,00107$ alopatria y $P_i: 0,00129$ simpatria; Anexos 2).

6.2. Microsatelites

Los análisis de microsatélites incluyeron la amplificación de 10 loci distintos. De los 10 loci amplificados para las cinco poblaciones, 9 de ellos fueron polimórficos y mostraron una gran variación en el tamaño y

número de alelos para cada loci en todas las poblaciones, resultados similares se han obtenido en otros estudios en Lepidoptera (Flanaga et al 2002). El locus Hel 17 (Ms14) no fue incluido en los análisis al ser monomorfo (solo un alelo de 160pb para todas las poblaciones). Los 9 loci restantes fueron analizados con el programa Arlequín 2.000 (Shneider et al 2000) para verificar si estas poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Muchos de los loci analizados mostraron déficit de heterocigotos para las distintas poblaciones. Déficit de heterocigotos para loci de microsatélite han sido reportados en Lepidoptera y posibles explicaciones a este patrón son: 1) sub-estructuración dentro de las poblaciones y 2) presencia de alelos nulos y errores de genotipaje (Flanagan et al 2002). Correcciones para la presencia de alelos nulos fueron realizadas por medio de la implementación del programa Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout et al 2003). Este programa busca la probabilidad de errores en la genotipaje de los individuos ya sea por "stuttering" o "drop out". Sin embargo, el programa encontró pocas evidencias de este tipo de errores, siendo incapaz de corregir los déficit de heterocigotos en todos los casos. Aquellos loci que mostraron estar en desequilibrio de Hardy-Weinberg para la mayoría de las poblaciones fueron omitidos de los análisis (Hel 02 y Hel 10). Análisis completos fueron realizados para los siete loci que mostraban equilibrio de Hardy-Weinberg en la mayoría de las poblaciones (Hel 01, Hel 04, Hel 05, Hel 11, Hel 12, Hel 13, Hel 14; Tabla 5).

Venu J						
Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps
1	30	0.76667	0.89096	0.16595	0.00076	100172
2	30	0.40000	0.52599	0.14258	0.00055	100172
3	30	0.53333	0.76328	0.00000	0.00000	100172
4	30	0.90000	0.95932	0.06639	0.00031	100172
5	30	0.83333	0.73955	0.59460	0.00123	100172
6	30	0.56667	0.86158	0.00000	0.00000	100172
7	29	0.79310	0.90926	0.18471	0.00057	100172
Venus R						
Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps
1	13	0.69231	0.86769	0.10180	0.00081	100172
2	13	0.30769	0.88000	0.00000	0.00000	100172
3	13	0.69231	0.91077	0.16479	0.00085	100172
4	13	0.84615	0.94154	0.20218	0.00043	100172
5	13	0.46154	0.60808	0.25217	0.00145	100172
6	13	0.38462	0.69231	0.00378	0.00019	100172
7	12	0.75000	0.87319	0.62332	0.00131	100172
Chest R						
Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps
1	12	0.50000	0.74638	0.24595	0.00073	100172
2	12	0.58333	0.67029	0.00581	0.00022	100172
3	12	0.66667	0.84783	0.16793	0.00064	100172
4	12	0.91667	0.84420	0.93026	0.00040	100172
5	12	0.58333	0.72826	0.28758	0.00094	100172
6	12	0.25000	0.30797	1.00000	0.00000	100172
7	11	0.45455	0.54113	0.58357	0.00100	100172
Ches 4						
Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps
1	10	0.50000	0.86842	0.03952	0.00055	100172
2	9	0.11111	0.68627	0.00111	0.00010	100172
3	10	0.80000	0.93684	0.13836	0.00057	100172
4	10	1.00000	0.85789	0.58958	0.00135	100172
5	10	0.50000	0.66316	0.54483	0.00185	100172
6	10	0.10000	0.19474	1.00000	0.00000	100172
7	8	0.00000	0.35000	0.06667	0.00076	100172
Chest M						
Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Steps
1	30	0.60000	0.71864	0.09147	0.00076	100172
2	30	0.33333	0.60282	0.00421	0.00022	100172
3	28	0.57143	0.76948	0.00000	0.00000	100172
4	29	0.82759	0.84997	0.68544	0.00037	100172
5	30	0.53333	0.71695	0.03472	0.00058	100172
6	30	0.03333	0.06610	1.00000	0.00000	100172
7	23	0.52174	0.69275	0.09808	0.00039	100172

Tabla 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci usados en este estudio.

Pares de poblaciones		Chi ²	df	Valor de P
venusJ	& venusR	Infinito	14	Altamente sign.
venusJ	& chestR	Infinito	14	Altamente Sign
venusJ	& chest4	Infinito	14	Altamente sign.
venusJ	& chestM	Infinito	14	Altamente sign.
venusR	& chestR	64.941	14	0.00000
venusR	& chest4	63.926	14	0.00000
venusR	& chestM	Infinito	14	Altamente sign.
chestR	& chest4	20.462	14	0.11625
chestR	& chestM	Infinito	14	Altamente sign.
Chest4	& chestM	37.738	14	0.00057

Tabla 6. Diferenciación genética entre pares de poblaciones. Valor de P entre pares de poblaciones para todos los loci. Test exacto de Fischer. Genepop (Raymond y Rousset 1995).

Ninguno de los alelos observados por los distintos loci resultó ser un marcador diagnóstico en alguna de las dos "razas". Sin embargo, existen diferencias en las frecuencias de estos alelos suficientes para diferenciar genéticamente las distintas poblaciones (Tabla 6).

Por otro lado, los análisis de los estadísticos de F muestran que: 1) *H. e. venus* de Juanchaco y *H. e. chestertonii* de Motañitas tienen la mayor estructura entre pares de poblaciones ($F_{st}=0,16576$ $p=0,0001^{***}$ Tabla 7 y Figura 7), 2) *H. erato venus* de Juanchaco se diferencia de todas las poblaciones de Chestertonii (Tabla 7 y Figura 7), 3) *H. erato venus* de Rio Calima tiene un comportamiento similar a Venus de Juanchaco con respecto a las poblaciones de Chestertonii aunque con un menor grado de estructura (Tabla 7 y Figura 7) y Finalmente, las comparaciones intraespecíficas presentan la menor estructura, siendo Chestertonii del km 15 y Chestertonii del km 4 las únicas poblaciones que no muestran una estructura significativa entre ellas ($F_{st}= 0,00697$ $p=0.0$; Tabla 7 y Figura 7).

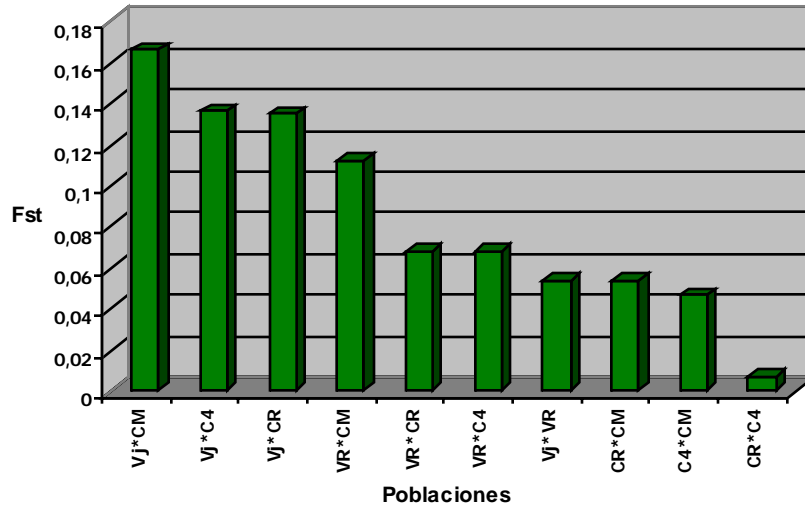


Figura 7. Estadístico de Fst entre pares de poblaciones. Vj= *H. erato venus* de Juanchaco, VR= *H. erato venus* de Río Calima Km 15, CR= *H. erato chestertonii* de Río Calima Km 15, C4= *H. erato chestertonii* de Río Calima Km 4 y CM= *H. erato chestertonii* de Montañitas.

Poblaciones	VJ	VR	CR	C4	CM
VJ	*	0,00 +-0,00	0,00 +-0,0001	0,00 +-0,0002	0,00 +-0,0004
VR	0,05378	*	0,00099 +-0,0006	0,00231 +-0,0008	0,00 +-0,00
CR	0,13464	0,06832	*	0,48430+- 0,0096	0,00198 +-0,0008
C4	0,13654	0,06847	0,00697	*	0,01587 +-0,0021
CM	0,16576	0,11275	0,05442	0,04658	*

Tabla 7. Estadísticos de Fst entre pares de poblaciones. Diagonal izquierda valores de Fst, Diagonal derecha probabilidad P y desviación estándar. Vj= *H. erato venus* de Juanchaco, VR= *H. erato venus* de Río Calima Km 15, CR= *H. erato chestertonii* de Río Calima Km 15, C4= *H. erato chestertonii* de Río Calima Km 4 y CM= *H. erato chestertonii* de Montañitas.

Un último análisis fue realizado para este grupo de datos, este análisis tomó como una sola población todos los individuos capturados en el Km 15 sin importar su clasificación fenotípica (Venus Km 15 + Chestertonii Km 15 + Híbridos). Esta exploración muestra que de los siete loci usados en este estudio, seis de ellos están en desequilibrio de Hardy-Weinberg y que estos desequilibrios se deben a un fuerte déficit de heterocigotos (Tabla 8).

Locus	#Genot	Obs.Heter.	Exp.Heter.	P. value	s.d.	Fis (W&C)	Fis (R&H)
1	36	0.61111	0.83372	0.01368	0.00027	+0.294	+0.329
2	36	0.63889	0.82746	0.00027	0.00005	+0.423	+0.428
3	35	0.62857	0.86501	0.00000	0.00000	+0.263	+0.263
4	34	0.85294	0.93371	0.00790	0.00009	+0.086	+0.040
5	36	0.50000	0.58881	0.07684	0.00069	+0.118	+0.036
6	36	0.36111	0.56612	0.00120	0.00009	+0.344	+0.207
7	33	0.66667	0.77156	0.05394	0.00027	+0.132	+0.034

Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci usados en este estudio.

Para este análisis se tomó como una sola población todos los individuos capturados en el Km 15 sin importar su clasificación fenotípica (Venus Km 15 + Chestertonii Km 15 + Híbridos). Subrayado en azul daro aparecen marcados los valores de P significativos.

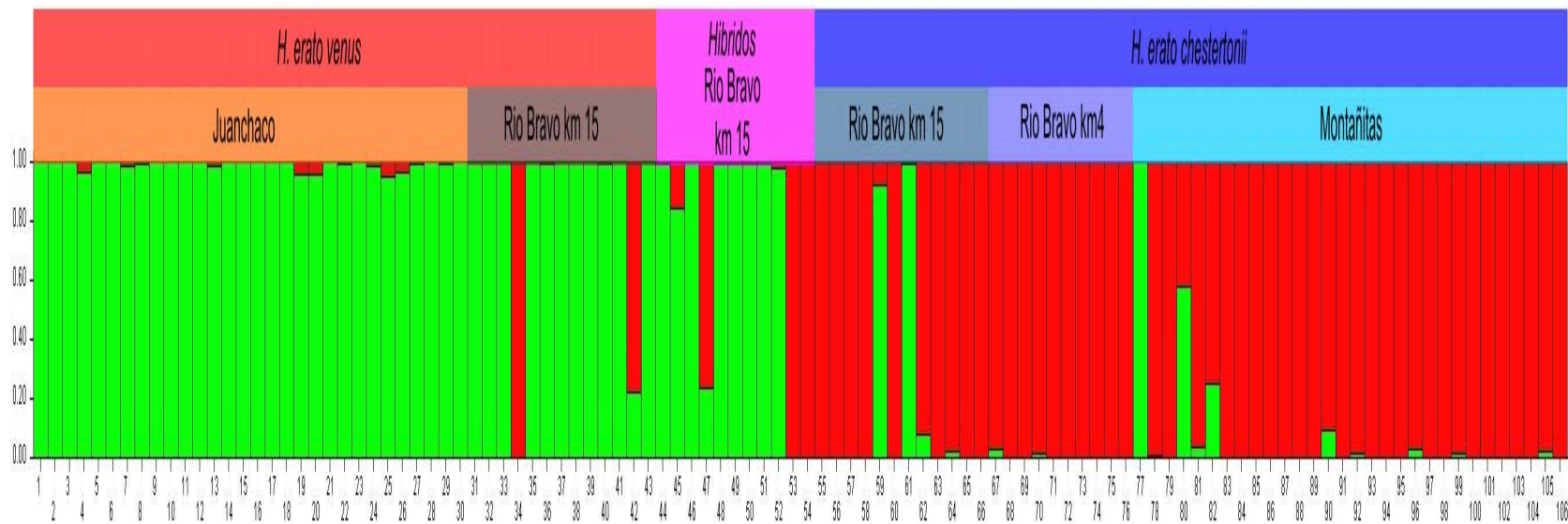


Figura 8. Test de Asignamiento para los 106 individuos usados en este estudio. Las barras representa a cada uno de los individuos de la población, en el eje de las "Y" esta la probabilidad que tiene un individuo de pertenecer a uno de los cluster según su conformación genotípica. En la parte superior de la grafica aparece la localidad en que fue capturado el individuo y su clasificación fenotípica. El programa encontró dos cluster con una valor de máxima verosimilitud de -2805 ($K=2$, $\text{Log P}(x/K)=-2805$, $\alpha=0,02$). Cluster 1 en rojo concordante con *H. erato chesteronii* y Cluster 2 en verde concordante con *H. erato venus*.

6.3. Test de asignamiento

El test de asignamiento genotípico para los 106 individuos y siete loci de microsatélite usados en este estudio, mostraron fuerte evidencia de la presencia de dos clusters bien diferenciados que corresponden con la clasificación fenotípica para *H. erato venus* (Color verde Figura 8) y *H. erato chestertonii* (Color rojo Figura 8). Sin embargo, dos individuos clasificados fenotípicamente como *H. erato venus* y capturados en el Km 15 muestran un gran probabilidad de asignamiento dentro del clado *H. erato chestertonii* (Individuo 34 Cluster 1=0.996, Individuo 42 Cluster 1=0.772). Por otro lado, de cinco individuos catalogados fenotípicamente como *H. erato chestertonii*, tres mostraron mayor proporción genotípica de *H. erato venus* (Individuo 59 Cluster 2=0,928, Individuo 61 Cluster 2= 0,998, Individuo 77 Cluster 2 =1) y los otros dos individuos mostraron una mezcla de ambos clusters (Individuo 80 Cluster 2= 0,579, Individuo 82 Cluster 2= 0,256 Figura 8). Los individuos híbridos mostraron en todos los casos tener mayor proporción genotípica de uno de los clusters (ver discusión por más detalle).

La probabilidad de pertenecer a un cluster u otro según el sitio de muestreo y clasificación fenotípica, muestra que en promedio los individuos capturados en Juanchaco son un 99% genotípicamente Venus. Por su parte, los individuos fenotípicamente Venus y capturados en el Km 15 son 87% Venus, mientras que los individuos fenotípicamente Chestertonii en este mismo sitio son un 83% Chestertonii. Por otro lado, los individuos capturados en el el Km 4 y en montañas mostraron un 99% y 93 % respectivamente de ser genotípicamente Chestertonii (Figura 9).

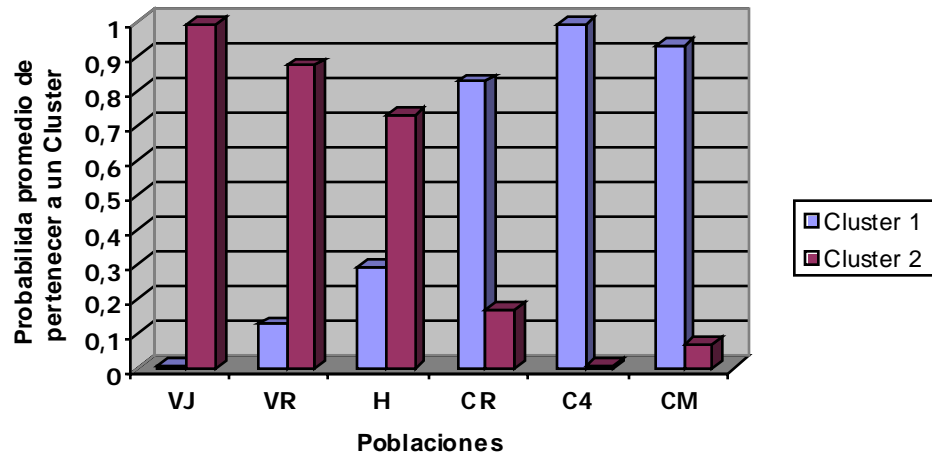


Figura 9. Probabilidad promedio de pertenecer a uno de los dos cluster según el sitio de muestreo. Vj= *H. erato venus* de Juanchaco, VR= *H. erato venus* de Río Calima Km 15, H= Híbridos (F1, F2 y Retrocruces), CR= *H. erato chestertonii* de Río Calima Km 15, C4= *H. erato chestertonii* de Río Calima Km 4 y CM= *H. erato chestertonii* de Montañitas.

7. Discusión

Bajo el "Concepto Biológico de Especie" una especie es: "un grupo de organismos que actualmente o potencialmente se entrecruzan en la naturaleza y que están reproductivamente aislados de otros grupos" (Mayr 1963). De esta manera, una característica importante de una especie es su integridad genética cuando entra o mantiene contacto con otros taxa estrechamente relacionados (Templeton 1989). Análisis geográficos de subdivisión dentro y entre especies que hibridizan dan una oportunidad única para entender los mecanismos que dan origen al aislamiento reproductivo y a especiación en la naturaleza (Hewit 1989). *H. erato venus* y *H. erato chestertonii* presentan una distribución parapátrica, con una zona de contacto de al menos 4 kilómetros (Muñoz 2004). Además, muestran una gran variación en el patrón de coloración alar y diferencias bien marcadas en el uso del hábitat (Muñoz 2004). Estas diferencias parecen ser concordante con una reducción en el flujo de genético tanto para genes mitocondriales como nucleares. No obstante, ciertas partes del genoma pueden ser más susceptibles a introgresión que otras (Machado et al 2002), ya sea por que flujo genético o selección natural actúa de manera diferencial en algunos genes (Hudson y Coyne 2002, Machado et al 2002). De esta manera distintos genes o marcadores moleculares pueden entonces contar historias distintas de los taxa bajo estudio.

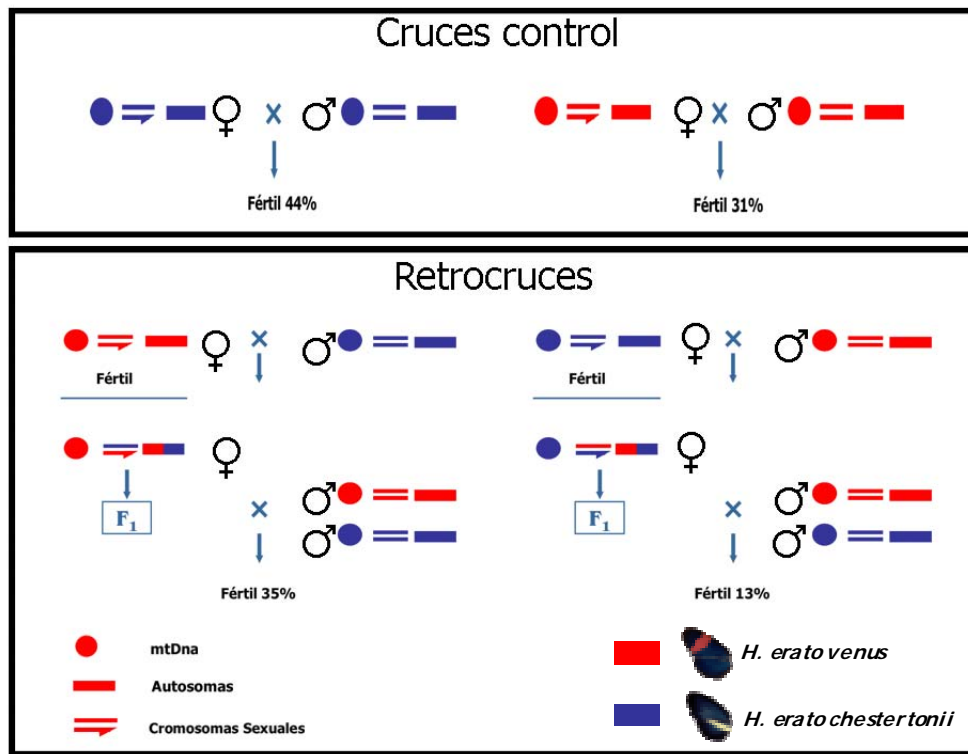
El análisis del ADN mitocondrial muestra a *H. e. venus* como un clado monofilético y con algo de estructura geográfica entre sus dos poblaciones. *H. e. chestertonii* por el contrario aparece parafilético y exhibe una gran divergencia intraracial (cerca de un 2.4% de divergencia entre individuos de Río Calima y Montañas), resultados similares fueron

encontrados en estudios anteriores (2,5 %; Brower 1994, 1996). Por otro lado, la población más cercana filogenéticamente a *H. e. venus* es la población de *H. e. chestertonii* de Montañitas, la cual se halla en un clado hermano bien diferenciado pero compartido con otras razas de Erato. Especies incipientes pueden mostrar variación ancestral compartida o flujo genético reciente (Machado et al 2002), Sin embargo, diferenciar entre estos dos casos es complicado (Good et al 2003). Si el flujo genético es reciente, se espera que existan haplotipos o alelos compartidos entre las taxa en la zona de contacto, mientras que el polimorfismo ancestral, plausiblemente mostrará una distribución uniforme de estos haplotipos o alelos entre los distintos clados (Good et al 2003). Para el patrón observado en este estudio existen cuatro posibles explicaciones: Primero, polimorfismo ancestral compartido, esta hipótesis parece poco probable dado que no existen haplotipos mitocondriales compartidos o comunes y que muestren una distribución uniforme entre los dos clados (Figura 6), Segundo, flujo genético reciente, poco probable por la gran distancia genética que existe entre estos dos clados (cerca de 1% de divergencia entre Venus y Chestertonii de montañas). Dicha distancia es bastante alta para este género de mariposas, por ejemplo, *H. melpomene* y *H. cydno* son dos especies bien diferenciadas dentro de este grupo y muestran una divergencia de 3.3% (Brower 1996), tercero, flujo genético en el pasado, bastante plausible dada la distancia genética entre los clados, y Finalmente, eventos de hibridación en otras zonas de contacto, dado que la población que aparece más cercana genéticamente es la que se encuentra más alejada geográficamente. Si vemos la distribución geográfica que muestran estas especies es probable encontrar otras zonas de contacto entre ellas (Figura 1).

7.1. Flujo Genético e introgresión asimétrica del ADN mitocondrial.

Introgresión asimétrica de ADN mitocondrial animal es bastante común (Awise 1994), y también ha sido reportada entre especies de *Heliconius* (Moreno et al 2005). Flujo genético en una dirección puede surgir asociado tanto a mecanismos de aislamiento precigóticos como postcigóticos (Good et al 2003). Ahora, si existió flujo genético de haplotipos mitocondriales entre estas taxa parece probable que este haya sido en la dirección de Venus a Chestertonii, dado que se espera, que el taxa donante comparta sus haplotipos con otros taxa en un mismo clado. Gracias a que el ADN mitocondrial presenta una herencia matrilineal, la posible vía de flujo es cruces entre Hembras Venus con machos Chestertonii y sus hijas F_1 retrocruzadas a Chestertonii. Análisis de aislamiento reproductivo postcigótico entre estas taxa parecen mostrar un patrón acorde con esta posible ruta de flujo. Cruces de laboratorio entre machos puros y hembras F_1 provenientes de cruces entre hembras Chestertonii y machos Venus, mostraron una tasa de eclosión de huevos del 13% la cual es significativamente distinta a los cruces controles (Venus 31%, Chestertonii 44%), mientras que cruces de machos puros con hembras F_1 provenientes de cruces entre hembras Venus y machos Chestertonii, tuvieron tasas de eclosión de un 35%, la cual no es significativamente distinta a los cruces controles (Muñoz 2004; Figura 10). De esta manera, parece más fácil para una hembra Venus introgresar su haplotipo mitocondrial en Chestertonii que lo contrario y dicha asimetría podría explicar el patrón del mitocondrial observado.

Figura 10. Porcentajes en la tasa de eclosión de huevos en cruces interspecíficos e intraespecíficos y posibles rutas de herencia del ADN mitocondrial. Rojo=*H. erato venus*, Azul = *H. erato chesteronii*.



7.2. Diferenciación Genética y estructura poblacional.

Los análisis de los siete loci de microsatélites muestran una fuerte diferenciación genética y estructura poblacional entre todas las poblaciones de este estudio. Aunque, no hubo alelos diagnósticos para ninguno de los siete loci, si hubo variación en las frecuencias alélicas de estos entre las poblaciones. *H. erato venus* aparece bien diferenciado de todas las poblaciones de *H. erato chesteronii*. Sin embargo, parece existir algo de flujo genético. Ahora, si no existiera flujo genético entre las poblaciones, se esperaría: Primero, que el valor de F_{st} para las

poblaciones alopátricas y simpátricas fuera parecido ($VJ*CM = VR*CR$). Sin embargo, el valor de F_{st} de las poblaciones en alopátria es mayor que el valor de F_{st} de las poblaciones en simpátria ($VJ*CM > VR*CR$). Segundo, las poblaciones simpátricas deberían mostrar valores de F_{st} similares al compararse con las poblaciones alopátricas o simpátricas del otro taxa ($VR*CR=VR*CM$, $VRCR=VJ*CR$). Ambas comparaciones mostraron que las poblaciones simpátricas tanto de Venus como de *Chesteronii* muestran valores de F_{st} menores en presencia de la población simpátrica del otro taxa. Finalmente, la comparación anterior también puede dar evidencias de la dirección del flujo genético si es que existe. Por ejemplo si el flujo genético fuera en dirección a Venus se esperaría que la diferencia entre el F_{st} de la comparación para Venus fuera mayor que la comparación para *Chesteronii* ($VR*CR - VRCM > VR*CR - VJ*CM$). Al realizar dicha comparación se encuentra que *Chesteronii* presenta mayor variación en su estructura dependiendo del Venus con el que se compare ($VR*CR - VRCM = 0.044 > 0.066 = VR*CR - VJ*CM$). De esta forma parece haber mayor introgresión de Venus a *Chesteronii* que lo contrario. Estos resultados no van en contra a lo visto en el patrón mitocondrial (ver arriba en el texto).

7.3. Zonas Híbridas Bimodales

Las zonas híbridas son áreas donde se encuentran y se entrecruzan poblaciones genéticamente distintas y forma una descendencia con características intermedias. Estas zonas han venido siendo clasificadas según la distribución de sus clases genotípicas (Harrison y Bogdanowicz 1997). Las zonas de hibridación bimodales presentan una gran cantidad de individuos fenotípicamente y genéticamente iguales a las formas parentales, con unos pocos individuos con características intermedias a estos (Harrison 1993, Harrison y Bogdanowicz 1997, Jiggins y Mallet

2000). La mayoría de zonas híbridas bimodales se caracterizan por tener desequilibrios de Hardy-Weinberg causados por déficit de heterocigotos, además, pueden presentar desequilibrio de ligamiento entre pares de Loci, y bajo porcentaje de híbridos donde los pocos observados son retrocruces a los parentales o F_2 . En general estas diferencias parecen estar siendo marcadas por fuertes barreras precigóticas y en muy pocos casos muestra relación con aislamiento postcigótico. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con este patrón. Al realizar análisis de la localidad de Rio Calima como una sola población (Venus Km 15 + Chestertonii Km 15 + Híbridos) se observó un desequilibrio de Hardy-Weinberg para seis de los loci de microsatélite (Tabla 8), estos desequilibrios fueron causados en todos los casos por un déficit en los heterocigotos (Tabla 8). Por otro lado, el test de asignamiento de individuos fue capaz de diferenciar dos cluster genotípicos. Estos dos cluster fueron concordantes con la clasificación fenotípica de los individuos y con la distribución geográfica de estos mismos. A su vez, los individuos que fueron clasificados fenotípicamente como híbridos mostraron semejanza en la clasificación genotípica. La cantidad de híbridos genotípicos que puede diferenciar el programa fue de un 15% en la zona de contacto. Si se suman los individuos fenotípicamente y genotípicamente híbridos el porcentaje aumenta a un 35% por ciento, siendo la mayoría de estos híbridos catalogados como retrocruce o F_2 . Estudios anteriores sobre los genes que controlan el patrón de colocación alar encontraron resultados similares (Muñoz 2004). De esta forma, el fuerte cambio en las frecuencias genotípicas y fenotípicas que muestra esta zona, sumado al restringido flujo genético tanto de marcadores mitocondriales como nucleares, hacen pensar que *H. erato venus* y *H. erato chestertonii* presenta una zona de contacto bimodal de al menos 4 kilómetros en el caño del Rio Calima en el Valle del Cauca.

7.4. Especiación incipiente?

Los distintos tipos de zonas híbridas pueden ser vistos como un continuo de una zona unimodal hasta una zona bimodal a través del tiempo (Jiggins y Mallet 2000). De esta forma la bimodalidad puede ser tomada como un indicativo de que las formas parentales ya casi han completado las barreras al flujo de genes y por ende son especies distintas (Jiggins y Mallet 2000). El desarrollo de aislamiento reproductivo a pesar de un continuo flujo genético es bastante controversial y difícil de probar (Futuyma, 1998). Sin embargo, *H. erato venus* y *H. erato chestertonii* mantiene su constitución genética no obstante a la hibridación que mantienen (35% de híbridos naturales). Esta distinción genética parece ser afín con la historia natural de ambas "razas". Primero, *H. e. chestertonii* y *H. e. venus* presentan una zona de híbrida de al menos cuatro Kilómetros de longitud. Segundo, Los análisis de la genética del patrón de coloración, así como marcadores moleculares nucleares y mitocondriales mostraron una gran distinción entre estas dos supuestas razas. Tercero, los individuos capturados en campo son su mayoría fenotípicamente y genéticamente como los parentales, mientras que los híbridos capturados en general fueron la mayoría posibles retrocruces a uno de los genotipos parentales (Muñoz 2004, y este estudio ver arriba), Cuarto existe un alto déficit de heterocigotos tanto para los genes del patrón de coloración como para marcadores nucleares, Quinto existen evidencias fuertes de apareamiento asociativo y una disminución en la tasa de eclosión de individuos híbridos que puede explicar el patrón observado en el ADN mitocondrial y Finalmente, existen diferencias bien marcadas en el tipo de hábitat que utilizan estas dos supuestas razas. *H. e. venus* se distribuye a lo largo del bosque húmedo tropical, mientras que *H. e. chestertonii* lo hace en bosque montano seco en el Valle del Río Cauca. De esta manera, existe evidencia suficiente para proponer que *H. e. chestertonii* es una especie incipiente y no una raza geográfica donde

la integridad específica parece ser mantenida por un fuerte apareamiento asociativo y las diferencias ecológicas de uso de hábitat que tienen. De esta forma, esta zona híbrida puede contribuir al mejor entendimiento de los procesos ecológicos que contribuyen en la especiación en presencia de flujo genético.

8. Conclusiones

H. erato venus y *H. erato chestertonii* presentan una zona híbrida bimodal donde existe una marcada distinción genética entre ellas, ya que:

- Los datos de ADN mitocondrial muestran *H. erato venus* como un grupo monofilético y con una distancia genética del 1% respecto al clado de *chestertonii* más cercano a él, mientras que *Chestertonii* es parafilético y muestra una divergencia del 2.3% intraespecífica. Estadísticos de F para estas secuencias muestran una fuerte estructura entre todas las comparaciones de pares de poblaciones.
- Los datos de microsatélites muestran valores significativos de F_{st} y diferenciación genética tanto en alopatria como en simpatria. Sin embargo existe una disminución de estos valores en simpatria por un posible flujo genético reducido entre sus poblaciones.
- Los tests de asignamientos de individuos muestran consistentemente dos clusters bien diferenciados y que son concordantes con la distribución geográfica y fenotipo de los individuos.
- Los análisis de la población en simpatria de *Venus* y *Chestertonii* muestran desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg por déficit de heterocigotos para seis de los loci de este estudio.

H. erato chestertonii es una especie incipiente (en el sentido biológico) dado que mantiene su integridad genética en presencia de flujo genético, esa diferenciación parece ser producto de un fuerte apareamiento asociativo, diferencias en el uso del hábitat y una reducción asimétrica en la fertilidad de los individuos híbridos.

9. Bibliografía.

- Anderson E. C. and E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160: 1217-1229.
- Avise J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, y N. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:489-522.
- Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution.* Chapman and Hall, Inc. New York
- Barton N.H. y G. M. Hewit. 1985. Analysis of Hybrid zones. *Ann. Rev. Evol. Syst.* 16: 113-148.
- Barton, N. H. 2001. Speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 325.
- Beltran M., C. D. Jiggins, V. Bull, M. Linares, J. Mallet, W. O. MacMillan y E. Bermingham 2002. Phylogenetic Discordance at the species boundary: Comparative gene genealogies among rapidly radiating *Heliconius* butterflies. *Mol. Biol. Evol.* 19 (12): 2176-2190.
- Benson, W. 1972. Natural selection for Mullerian mimicry in *Heliconius erato* and *H. melpomene* in Costa Rica. *Science* 176:936-939.
- Bioinformatics* 17:754-755.
- Brower, A. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91:6491-6495.
- Brower A. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: A phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50 (1): 195-221.

- Brown, K.S., P. M. Sheppard y J.R.G Turner. 1974. Quaternary refugia in tropical America: evidence from race formation in *Heliconius* butterflies. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 187:369-378.
- Chambers G. K. and E. S. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 126: 455-476.
- Coyne, J. A. and H. A. Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Darwin, Ch. 1859. *El origen de las especies*. Libro editado para distribuciones editoriales. Barcelona, España.
- Emsley, M. 1965. Speciation in *Heliconius* (Lepidoptera.: Nymphalidae: morphology and geographic distribution). *Zoologica* 50: 191-254.
- Felsenstein J. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution.* 22: 160-174.
- Flanagan, N. S., M. J. Blum, A. Davison, M. Alamo, R. Albarran, K. Faulhaber, E. Peterson y W. O. McMillan. 2002. Characterization of microsatellite loci in neotropical *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology Notes.* 2: 398-491.
- Futuyma, D. 1998. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Gavrilets, S. 2003 "Models of speciation: what have we learned in 40 years?" *Evolution*
- Good J. M., J. R. Demboski, D. W. Nagorsen and J. Sullivan. 2003. Phylogeography and introgressive hybridization: Chipmunks (Genus *Tamias*) in the northern rocky mountains. *Evolution* 57 (8): 1900-1916.
- Harrison R. G. 1993. Hybrids and hybrid zones: Historical perspective. In *Hybrids zones and the evolutionary process*. Oxford University press. 3-12.
- Harrison R. G. and S. M. Bogdanowicz. 1997. Patterns of variation and linkage disequilibrium in a field cricket hybrid zone. *Evolution* 51: 493-505.

- Hewitt G. M. 1989. The subdivision of species by hybrid zones. In D. Otte and J. A. Endler (eds.), *Speciation and its consequences*, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Hewitt G. M. 2001. Speciation, hybrids zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*. 10: 537-549.
- Howard D. J. And S. H. Berlocher. 1998. *Endless forms: Species and Speciation*. Oxford University Press. New York.
- Hsu, R., A.D. Briscoe, B.S.W. Chang and N. E. Pierce. 2001. Molecular evolution of a long waveleght-sensitive opsin in mimetic *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) *biological journal of Linnean Society*, 72: 435-449.
- Hudson R. and J. Coyne. 2002. mathematical consequences of genealogical species concept. *Evolution* 56: 1557-1565.
- Huelsensbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny.
- Jiggins, C. D., W. O. McMillan, P. King y J. Mallet. 1997. The maintenance of species differences across a *Heliconius* hybrid zone. *Heredity*. 79:495-505.
- Jiggins, C. D., W. O. McMillan, W. Neukirchen y J. Mallet. 1996. What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. himera* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol. Journ. Linn. Soc.* 59:221-242.
- Jiggins, C. y J. Mallet. 2000. Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 15:250-255
- Joron, M., I. R. Wynne, G. Lamas y J. Mallet. 2001. Variable selection and the coexistence of multiple mimetic forms of the butterfly *Heliconius numata*. *Evol. Ecol.* 13(7/8):721-754.
- Joron, M., y J. Mallet. 1998. Diversity in mimicry: paradox or paradigm? *Trends in Ecology and Evolution* 13(11):429-469.
- Kliman, R. M., P. Andolfatto, J. A. Coyne, F. Depaulis, M. Kreitman, A. J. Berry, J. McCarter, J. Wakeley y J. Hey. 2000. The population genetics of

- the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. *Genetics* 156: 1913-1931.
- Linares, M. 1989. Adaptive microevolution through hybridization and biotic destruction in the neotropics. PhD Dissertation, University of Texas.
- Linares, M. 1996. The genetics of the mimetic coloration in the butterfly *Heliconius cydno weymeri*. *Journal of Heredity*. 87(2):142-149.
- Linares, M. 1997. The ghost of mimicry past: laboratory reconstitution of an extinct butterfly "race". *Heredity*. 78: 628-635.
- Machado, C. A., R. M. Kliman, J. A. Markert y J. Hey. 2002. Inferring the history of speciation from multilocus DNA sequence data: The case of *Drosophila pseudoobscura* and close relatives. *Mol. Biol. Evol.* 19(4): 472-488.
- Maddison W. P. and D. R. Maddison. 1997. *MacClade: Analysis of phylogenetic and character evolution*. 3.07. edition Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Mallet, J. y N. Barton, 1989. Strong natural selection in a warning colour hybrid zone. *Evolution*, 43:421-431.
- Mallet, J., O. McMillan y C. Jiggins. 1998. Mimicry and warning colour at the boundary between races and species. In: Berlocher, S. y Howard, D. (eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Mayr E. 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Ma.
- McMillan W.O., C. D. Jiggins y J. Mallet. 1997. What initiates speciation in passion-vine butterflies?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94: 8628-8633.
- Moreno L. P., C. Salazar, M. Beltran, E. Bermingham, C. D. Jiggins y M. Linares. The failure of mitochondrial DNA barcodes to provide reliable species diagnosis among *Heliconius* butterflies. *Royal Society of London Serie B*. Submitted.

- Muñoz, A. G. 2001. Evidencia de especiación en *Heliconius erato* (*H. e. chestertonii* *H. e. chestertonii* y *H. e. venus*). Tesis para optar al título de Bióloga. Universidad de Los Andes
- Muñoz A. G. 2004. Evidencia de la especiación incipiente entre *Heliconius erato venus* y *H. e. chestertonii*. Tesis para optar al título de maestría. Universidad de los Andes.
- Nichols R. A. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends Ecol. Evol.* 16: 358-364.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Ogden, R. y R.S. Thorpe. 2002. Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *PNAS*. Vol. 99. No. 21: 13612-13615.
- Oosterhout C. van, W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills and P.F. Shipley. 2003. Micro-checker. The University of Hull.
- Otte, D. y J.A. Endler (editors). 1989. *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 670pp.
- Pääbo S. 2003. The mosaic that is our genome. *Nature*. 421: 409-412.
- Pritchard J. K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Raymond M. and Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249
- Redenbach, Z. y E.B. Taylor. 2003. Evidence for bimodal hybrid zones between two species of char (*Pisces: Salvelinus*) in northwestern North America. *J. Evol. Biol.* 16: 1135-1148.
- Rieseberg L. H., J. Whitton and K. Gardner. 1999. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflowers species. *Genetics*. 152: 713-727.

- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
- Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution* 16:372-380.
- Schneider, S., D. Roessli, y L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.
- Swofford D. L. 2000. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony and (other methods)* 4th. Edition. Sinauer Associates, Sunderland Mass.
- Templeton A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In D. Otte and J. A. Endler (eds.), *Speciation and its consequences*, Sinauer Associates, Sunderland,Mass.
- Turelli, M., N. H. Barton y J. A. Coyne . 2001. Theory and speciation. *TRENDS in Ecology and Evolution*. Vol 16 NO.7: 330-336.

10. ANEXOS

Anexo 1. Listado de individuos usados en este estudio .

#	Especie	Numero	Localidad
1	<i>H. evenus</i>	M251	Juanchaco
2	<i>H. evenus</i>	M265	Juanchaco
3	<i>H. evenus</i>	M274	Juanchaco
4	<i>H. evenus</i>	M276	Juanchaco
5	<i>H. evenus</i>	M278	Juanchaco
6	<i>H. evenus</i>	M284	Juanchaco
7	<i>H. evenus</i>	M285	Juanchaco
8	<i>H. evenus</i>	M286	Juanchaco
9	<i>H. evenus</i>	M287	Juanchaco
10	<i>H. evenus</i>	M288	Juanchaco
11	<i>H. evenus</i>	M289	Juanchaco
12	<i>H. evenus</i>	M329	Juanchaco
13	<i>H. evenus</i>	M627	Juanchaco
14	<i>H. evenus</i>	M628	Juanchaco
15	<i>H. evenus</i>	M630	Juanchaco
16	<i>H. evenus</i>	M631	Juanchaco
17	<i>H. evenus</i>	M632	Juanchaco
18	<i>H. evenus</i>	M633	Juanchaco
19	<i>H. evenus</i>	M634	Juanchaco
20	<i>H. evenus</i>	M635	Juanchaco
21	<i>H. evenus</i>	M637	Juanchaco
22	<i>H. evenus</i>	M638	Juanchaco
23	<i>H. evenus</i>	M639	Juanchaco
24	<i>H. evenus</i>	M640	Juanchaco
25	<i>H. evenus</i>	M641	Juanchaco
26	<i>H. evenus</i>	M642	Juanchaco
27	<i>H. evenus</i>	M643	Juanchaco
28	<i>H. evenus</i>	M644	Juanchaco
29	<i>H. evenus</i>	M645	Juanchaco
30	<i>H. evenus</i>	M646	Juanchaco
31	<i>H. evenus</i>	M629	R.C. Km 15.
32	<i>H. evenus</i>	M664	R.C. Km 15.
33	<i>H. evenus</i>	M759	R.C. Km 15.
34	<i>H. evenus</i>	M760	R.C. Km 15.
35	<i>H. evenus</i>	M550	R.C. Km 15.
36	<i>H. evenus</i>	M554	R.C. Km 15.
37	<i>H. evenus</i>	M555	R.C. Km 15.
38	<i>H. evenus</i>	M567	R.C. Km 15.

39	<i>H. evenus</i>	M568	R.C. Km 15.
40	<i>H. evenus</i>	M569	R.C. Km 15.
41	<i>H. evenus</i>	M570	R.C. Km 15.
42	<i>H. evenus</i>	M571	R.C. Km 15.
43	<i>H. evenus</i>	M572	R.C. Km 15.
44	<i>Hbrido</i>	M626	R.C. Km 15.
45	<i>Hbrido</i>	M552	R.C. Km 15.
46	<i>Hbrido</i>	M556	R.C. Km 15.
47	<i>Hbrido</i>	M557	R.C. Km 15.
48	<i>Hbrido</i>	M529	R.C. Km 15.
49	<i>Hbrido</i>	M566	R.C. Km 15.
50	<i>Hbrido</i>	M551	R.C. Km 15.
51	<i>Hbrido</i>	M758	R.C. Km 15.
52	<i>Hbrido</i>	M762	R.C. Km 15.
53	<i>Hbrido</i>	M765	R.C. Km 15.
54	<i>H. e. chesteronii</i>	M553	R.C. Km 15.
55	<i>H. e. chesteronii</i>	M560	R.C. Km 15.
56	<i>H. e. chesteronii</i>	M561	R.C. Km 15.
57	<i>H. e. chesteronii</i>	M562	R.C. Km 15.
58	<i>H. e. chesteronii</i>	M563	R.C. Km 15.
59	<i>H. e. chesteronii</i>	M530	R.C. Km 15.
60	<i>H. e. chesteronii</i>	M559	R.C. Km 15.
61	<i>H. e. chesteronii</i>	M558	R.C. Km 15.
62	<i>H. e. chesteronii</i>	M573	R.C. Km 15.
63	<i>H. e. chesteronii</i>	M531	R.C. Km 15.
64	<i>H. e. chesteronii</i>	M532	R.C. Km 15.
65	<i>H. e. chesteronii</i>	M761	R.C. Km 15.
66	<i>H. e. chesteronii</i>	M763	R.C. Km 15.
67	<i>H. e. chesteronii</i>	M764	R.C. Km 4.
68	<i>H. e. chesteronii</i>	M766	R.C. Km 4.
69	<i>H. e. chesteronii</i>	M767	R.C. Km 4.
70	<i>H. e. chesteronii</i>	M768	R.C. Km 4.
71	<i>H. e. chesteronii</i>	M771	R.C. Km 4.
72	<i>H. e. chesteronii</i>	M565	R.C. Km 4.
73	<i>H. e. chesteronii</i>	M564	R.C. Km 4.
74	<i>H. e. chesteronii</i>	M517	R.C. Km 4.
75	<i>H. e. chesteronii</i>	M518	R.C. Km 4.
76	<i>H. e. chesteronii</i>	M522	R.C. Km 4.
77	<i>H. e. chesteronii</i>	M666	Montañas
78	<i>H. e. chesteronii</i>	M667	Montañas
79	<i>H. e. chesteronii</i>	M668	Montañas
80	<i>H. e. chesteronii</i>	M669	Montañas
81	<i>H. e. chesteronii</i>	M670	Montañas
82	<i>H. e. chesteronii</i>	M671	Montañas
83	<i>H. e. chesteronii</i>	M672	Montañas

84	<i>H. e. chesteronii</i>	M673	Montañitas
85	<i>H. e. chesteronii</i>	M674	Montañitas
86	<i>H. e. chesteronii</i>	M675	Montañitas
87	<i>H. e. chesteronii</i>	M676	Montañitas
88	<i>H. e. chesteronii</i>	M677	Montañitas
89	<i>H. e. chesteronii</i>	M678	Montañitas
90	<i>H. e. chesteronii</i>	M679	Montañitas
91	<i>H. e. chesteronii</i>	M680	Montañitas
92	<i>H. e. chesteronii</i>	M773	Montañitas
93	<i>H. e. chesteronii</i>	M774	Montañitas
94	<i>H. e. chesteronii</i>	M775	Montañitas
95	<i>H. e. chesteronii</i>	M776	Montañitas
96	<i>H. e. chesteronii</i>	M777	Montañitas
97	<i>H. e. chesteronii</i>	M778	Montañitas
98	<i>H. e. chesteronii</i>	M779	Montañitas
99	<i>H. e. chesteronii</i>	M780	Montañitas
100	<i>H. e. chesteronii</i>	M781	Montañitas
101	<i>H. e. chesteronii</i>	M782	Montañitas
102	<i>H. e. chesteronii</i>	M783	Montañitas
103	<i>H. e. chesteronii</i>	M784	Montañitas
104	<i>H. e. chesteronii</i>	M785	Montañitas
105	<i>H. e. chesteronii</i>	M786	Montañitas
106	<i>H. e. chesteronii</i>	M787	Montañitas

Anexo 2. Resultados arrojados por DNASp para las comparaciones entre las distintas poblaciones. Resultados sin editar.

Gene Flow and Genetic Differentiation

Input Data File: C:\...\erevisadomodelt

Number of Populations Included: 4

Selected region: 1-1551 Number of sites: 1551

Sites with alignment gaps are: Excluded

Total sites (excluding alignment gaps): 1551

Population 1: VenusJ

Number of sequences: 5

Number of segregating sites, S: 11
Number of haplotypes, h: 5
Haplotype diversity, Hd: 1,00000
Average number of differences, K: 5,40000
Nucleotide diversity, Pi: 0,00348
Nucleotide diversity with JC, PJC: 0,00349

Population 2: VenusRB

Number of sequences: 6
Number of segregating sites, S: 1
Number of haplotypes, h: 2
Haplotype diversity, Hd: 0,33333
Average number of differences, K: 0,33333
Nucleotide diversity, Pi: 0,00021
Nucleotide diversity with JC, PJC: 0,00022

Population 3: ChestRB

Number of sequences: 6
Number of segregating sites, S: 5
Number of haplotypes, h: 3
Haplotype diversity, Hd: 0,60000
Average number of differences, K: 1,66667
Nucleotide diversity, Pi: 0,00107
Nucleotide diversity with JC, PJC: 0,00108

Population 4: ChestM

Number of sequences: 5
Number of segregating sites, S: 4
Number of haplotypes, h: 4
Haplotype diversity, Hd: 0,90000
Average number of differences, K: 2,00000

Nucleotide diversity, Pi: 0,00129
Nucleotide diversity with JC, PJC: 0,00129

Total Data Estimates

Number of sequences: 22
Number of segregating sites, S: 57
Number of haplotypes, h: 14
Haplotype diversity, Hd: 0,92641
Average number of nucleotide differences, Kt: 19,64935
Nucleotide diversity, PiT: 0,01267

===== Genetic Differentiation Estimates =====

Chi-square (table), Chi2: 66,000 P-value of Chi2: 0,0044 **; (df = 39)

HBK 1992, Hs: 0,67381 Hst: 0,27266

PM test; P-value of Hs, Hst: 0,0000 ***

HBK 1992, Ks: 2,22727 Kst: 0,88665

PM test; P-value of Ks, Kst: 0,0000 ***

HBK 1992, Ks*: 0,87459 Kst*: 0,66424

PM test; P-value of Ks*, Kst*: 0,0000 ***

HBK 1992, Zs: 27,55000

PM test; P-value of Z: 0,0000 ***

HBK 1992, Zs*: 3,11541

PM test; P-value of Z*: 0,0000 ***

Hudson 2000, Snn: 0,93182

PM test; P-value of Snn: 0,0000 ***

PM test; Probability obtained by the permutation test with 1000 replicates)

ns, not significant; *, 0.01<P<0.05; **, 0.001<P<0.01; ***, P<0.001

===== Gene Flow Estimates =====

Genome: Haploid

Haplotype Data Information

Nei 1973

Gst: 0,25049 Nm: 1,50

Sequence Data Information

Nei 1982

DeltaSt: 0,01093 GammaSt: 0,90403 Nm: 0,05

Lynch and Crease 1990 (with Jukes and Cantor correction)

Nst: 0,90310 Nm: 0,05

Hudson, Slatkin and Maddison 1992

Fst: 0,90204 Nm: 0,05