



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE *Heliconius sara* (Nymphalidae) EN LA ISLA GORGONA, COLOMBIA

Genetic characterization of the *Heliconius sara* (Nymphalidae) population in the Gorgona Island, Colombia

Raúl Ernesto SEDANO CRUZ¹ *, Humberto CALERO MEJÍA²

¹ Grupo de Investigación Ecología Animal y Grupo Ecofisiología, Biogeografía y Evolución. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cra 13 #100-00, Cali, Colombia.

² Maestría en Ciencias – Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cra 13 #100-00, Cali, Colombia.

* **For correspondence:** raul.sedano@correounivalle.edu.co

Received: 9th April 2020. **Returned for revision:** 18th September 2020. **Accepted:** 06th November 2020.

Associate Editor: Héctor Gasca Alvarez

Citation/ citar este artículo como: Sedano-Cruz RE, Calero-Mejía H. Caracterización genética de la población de *Heliconius sara* (Nymphalidae) en la Isla Gorgona, Colombia. Acta Biol Colomb. 2021;26(3):374-384. Doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.86205>

RESUMEN

La estructura genética de poblaciones de mariposas con distribución en islas y sus pares continentales ha sido poco documentada para el neotrópico. Este estudio presenta la caracterización de una población de *Heliconius sara* con distribución en la Isla Gorgona, ubicada en la región del Pacífico Oriental Colombiano. Para esto se examinaron secuencias parciales de un marcador mitocondrial incluyendo información obtenida del GenBank. Se comparó la diversidad y estructura genética con sus conoespecíficos continentales y también con congéneres, con los que comparte un ancestro común cercano en el clado *Sapho-Sara*. Para el análisis de diversidad y estructura genética se realizó un análisis de varianza molecular. Este análisis muestra que la distancia entre la población de la isla y sus pares en el continente es consistente con la variación intraespecífica observada en otras especies del género *Heliconius*. Para la reconstrucción de la genealogía y datación reciente en el Pleistoceno superior del grupo monofilético de secuencias de *H. sara*, se realizó un análisis de inferencia bayesiana, así como una de máxima verosimilitud. Del análisis demográfico se seleccionó un modelo histórico de flujo asimétrico desde la isla hacia el continente que sugiere baja resistencia de la discontinuidad geográfica a la dispersión de esta mariposa diurna desde la isla. Este es el primer estudio en examinar un posible evento de aislamiento de una población insular de mariposas en Colombia.

Palabras Clave: aislamiento por distancia, filogeografía, lepidóptera, COI, mariposas

ABSTRACT

The genetic structure of butterfly populations among islands and mainland has been poorly documented for the neotropics. This study shows a characterization of the *Heliconius sara* population with distribution on Gorgona Island in the Colombian Eastern Tropical Pacific region. We obtained partial sequences of a mitochondrial DNA, including information obtained from GenBank. The genetic diversity and structure were compared among the island population and their mainland conspecific, but also with congeners, with those shared by a recent common ancestor within the *Sapho / Sara* clade. For the analysis of diversity and genetic structure, an analysis of molecular variance was performed. This analysis shows that the genetic distance between the island's population and that of the mainland is consistent with the intraspecific variation observed in other species of the *Heliconius* genus. For the reconstruction of the genealogy and the recent dating calibration in the upper Pleistocene of the monophyletic group of *H. sara*, a Bayesian inference was carried out as well as one of maximum likelihood. From the demographic analysis, an asymmetric gene flow model from the island to the mainland was selected. This model suggests low historical resistance of the geographic discontinuity to dispersal of this small and diurnal butterfly from the island. This is the first study to examine a possible event of local isolation of an island population of a butterfly in Colombia.

Keywords: isolation by distance, Phylogeography, lepidoptera, COI, butterflies

INTRODUCCIÓN

La investigación de fauna en islas continúa siendo un sistema informativo para comprender el efecto del aislamiento en la acumulación diferencial de biodiversidad (Valente *et al.*, 2020). Las islas pueden funcionar como reservorios geográficamente discontinuos de poblaciones con características únicas o poco comunes en relación con sus pares continentales. En los sistemas insulares la discontinuidad geográfica respecto a sus áreas continentales es en sí misma, una hipótesis básica de la distribución espacial de la variación entre poblaciones (Templeton, 1989; Milá *et al.*, 2010). Este tipo de hipótesis corresponde al ejercicio disciplinar de la filogeografía y aunque no se disputa lo indispensable de los análisis de secuenciación de amplia cobertura genómica, la información de secuencias parciales de ADN mitocondrial (ADNmt) es una fuente de datos con un marco analítico sólido (Zink y Barrowclough, 2008). Por esto, no es sorprendente la actualidad del uso de secuencias parciales ADNmt en un contexto filogeográfico de las mariposas en sistemas insulares o discontinuidades geográficas (Linares *et al.*, 2009; Halbritter *et al.*, 2019; Maresova *et al.*, 2019).

Las mariposas constituyen un modelo interesante para el estudio de patrones de variación en el marco de discontinuidades geográficas (Brower, 1994; Todisco *et al.*, 2010). A pesar de su aparente fragilidad fenotípica, las mariposas, han logrado colonizar y segregarse genéticamente en remotas islas (Miyakawa *et al.*, 2018), pero este no siempre es el caso en condiciones de presumible aislamiento (Halbritter *et al.*, 2019). Esto sugiere que los procesos relacionados con aislamiento son complejos y requieren aún ser documentados. Las islas a menudo constituyen áreas marginales del rango de distribución de algunas poblaciones de mariposas, que, a su vez, podrían ser particularmente susceptibles a factores de variabilidad climática (Descimon, 1995). Estudios filogeográficos documentan importantes detalles sobre el patrón de ancestría y descendencia tanto de grupos en amplios rangos, como de aspectos de patrones demográficos a pequeña escala espacial (Todisco *et al.*, 2010; Maresova *et al.*, 2019).

En América, la distribución geográfica de mariposas continúa siendo documentada como un sistema excelente para comprender patrones de variación (Chazot *et al.*, 2018). Aunque la literatura sobre la evolución del género *Heliconius* es prolífica y muestra el contexto filogenético de atributos de su historia natural (Montejo-Kovacevich *et al.*, 2019), su sistemática (Kozak *et al.*, 2015) incluyendo patrones introgresión (Zhang *et al.*, 2016) y convergencia entre genomas (Morris *et al.*, 2020), como también de patrones de divergencia, flujo de genes (Nadeau *et al.*, 2013) y evidencia de selección natural (Martin *et al.*, 2016). Para la mayoría de las especies del género no existe un esfuerzo equivalente, esto a pesar de que existe una asombrosa

colección de la variación de su apariencia externa. Algunos estudios muestran un comprensivo esfuerzo por caracterizar la filogeografía de algunas especies en *Heliconius* (Arias *et al.*, 2014) y la diferenciación entre poblaciones geográficamente delimitadas parece ser un patrón común en *Heliconius* (de Moura *et al.*, 2011). Otros estudios ofrecen evidencia de divergencia dado el contexto vicariante que ofrecen los sistemas de montañas como los Andes (Brower, 1994).

Algunos estudios que consideran la distribución espacial de la variación genética en este género han demostrado inferir correctamente la relación de ancestría y descendencia entre algunas especies con marcadores del ADNmt (Brower, 1994; Pardo-Díaz *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2014). Así mismo, este tipo de marcador genético es documentado como informativo para realizar estimaciones de reloj molecular en estas mariposas (Brower, 1994; Arias *et al.*, 2014). Lo anterior sugiere que, los fragmentos de ADNmt continúan proporcionando información de la distribución espacial y de la variación genética neutral como una aproximación preliminar en el cálculo de la distancia entre poblaciones.

Heliconius sara (Fabricius, 1793), es un lepidóptero típico en hábitats continentales e insulares de Centro y Sur América. Esta mariposa de alas elongadas, común en áreas abiertas del bosque, es una especie para la cual se han documentado hábitos gregarios y especialistas de plantas hospederas de la familia Passifloraceae (Ehrlich y Raven, 1964; DeVries, 1987). En esta especie no existe un dimorfismo sexual marcado en su morfología externa; su apariencia tiene un carácter aposemático con bandas de coloración amarilla en el ala sobre un fondo melánico de visos en azul metalizado. Un patrón de coloración de apariencia mimética con otras especies resultado de convergencia no-estructural (Thurman y Seymoure, 2016; Parnell *et al.*, 2018). Aunque *H. sara* presenta polimorfismo en el patrón de coloración entre una decena de subespecies, en general este polimorfismo representa una morfología conservada con relación a especies con las que comparte un ancestro común cercano en el subclado *Sapho-Sara* (Kozak *et al.*, 2015).

Se ha propuesto una baja capacidad de dispersión al menos en una forma de *Heliconius* dentro de su rango de residencia habitacional; de acuerdo con Mallet (1986), aún se requieren avances en el conocimiento del potencial de dispersión de las especies en este género. La capacidad de dispersión de *H. sara* aún se desconoce y aunque su rango de distribución alcanza la Isla Gorgona, a 35 km de la costa del suroccidente de Colombia, en la región del Pacífico oriental tropical (Calero-Mejía *et al.*, 2014). Otras especies comunes del género en la región del Chocó Biogeográfico en el Pacífico colombiano, no están presentes en los registros de los lepidópteros diurnos en esta isla. De esta observación, es razonable suponer capacidades diferenciales interespecíficas en el potencial de dispersión, colonización o extinción en ambientes insulares y potencialmente en el patrón espacial de la distribución de la variación genética.

En la Isla Gorgona se ha documentado la acumulación de endemismo en diferentes grupos biológicos (Fowler 1994; Giraldo *et al.*, 2014), un patrón espacial de la diversidad que aún debe ser examinado sistemáticamente para mariposas y otros insectos terrestres. Por lo tanto, es razonable suponer que, presumiblemente el rango de *H. sara* en la isla Gorgona separada de la costa del Pacífico colombiano por la actual discontinuidad marítima, podría ser congruente con el patrón de endemismo observado en esta isla.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la variación genética de la población que reside en la Isla Gorgona en un contexto filogenético explícito, que busca examinar la presumible monofilia mitocondrial de *H. sara*, mediante el análisis de secuencias parciales del ADNmt para el gen Citocromo oxidasa I (COI). Con base en este supuesto, se analizó el potencial aislamiento de la población insular desde una perspectiva filogeográfica y se examinaron modelos de migración histórica. La información obtenida podría contribuir al entendimiento del fenómeno de dispersión, y a la caracterización de poblaciones de mariposas diurnas como objetos de conservación en sistemas insulares de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área y objeto de estudio

El área de interés para este estudio fue el Parque Nacional Natural Isla Gorgona (2°9' N y 78°2' W). La isla presenta una cobertura de selva húmeda en una geografía que alcanza una elevación máxima de 338 m. El clima es cálido con temperatura promedio de 26 °C (Rangel-Ch., 1995) y se ha documentado una pluviosidad media anual de 6981 mm, que supera en precipitación a las áreas continentales cercanas como la localidad de Guapi a ca. 60 km (Blanco *et al.*, 2009). Para caracterizar la población de *H. sara* que habita en la Isla Gorgona, se colectaron especímenes con red entomológica durante caminatas por transectos de longitud no definida. Los especímenes colectados fueron inmovilizados mediante presión torácica, luego puestos en una cámara con acetona. Para la preservación de las alas se guardaron en sobres de papel encerado, por último, utilizando alfileres, se montaron con las alas extendidas en cajas depositadas en el Museo de Entomología de la Universidad del Valle (MUSENUV).

Extracción, PCR y Secuenciación de ADN

Para la extracción de ADN total se empleó un par de patas de cada espécimen de *H. Sara*. Las patas fueron sometidas a una solución de lisis a 56 °C durante 12 h en agitación constante. La extracción se realizó con el kit comercial @Thermo Fisher Scientific siguiendo el protocolo del fabricante. La muestra de las patas de cada espécimen y extracciones de ADN total, se almacenaron a -20 °C para su conservación. Para la amplificación por la PCR del ADNmt del gen COI se usaron los cebadores CAACATTTATTTTGGATTTTTGG (Jerry-COIF)

y GCTACTACATAATAKGTATCATG (Ben-COIR) (Simon *et al.*, 1994). En la mezcla de la PCR se utilizó 3,5 µl de H₂O, 12,5 µl de Taq DNA polimerasa (1X One Taq Hot Start Quic Maxter Mix), 2,5 µl BSA, 0,5 µl DMSO, 0,5 µl de cada cebador, 5 ng de DNA para un volumen total de 25 µl. La amplificación se realizó en un Termociclador Benchmark TC9639 con una denaturación inicial de 94 °C (4 min), seguido de una más corta a 94 °C (40 s), 45 °C (1 min) de alineación, una elongación a 72 °C (1,5 min) por seis ciclos desde el primer paso. Luego se realizó una segunda fase de denaturación a 94 °C (1 min), alineación de 55 °C (1 min), una elongación a 72 °C (1,5 min) por 30 ciclos desde el inicio de la segunda fase y una extensión final de 72 °C (10 min) seguida de 10 °C (5 min). Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa de 2 %. Las muestras fueron secuenciadas por el servicio de MACROGEN Inc. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas visualmente con el programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA). Para esto se corroboró la identidad de las secuencias usando la plataforma BLAST (Johnson *et al.*, 2008) y todas las secuencias *de novo* se encuentran disponibles en el GenBank (Benson *et al.*, 2011) (Tabla 1).

Para tener una mejor comprensión acerca de la diversidad genética de *H. sara* y en particular de la población en la Isla Gorgona, primero se examinó un contexto filogenético más amplio y se incluyeron algunas Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs) pertenecientes al subclado *Sapho-Sara* (Kozak *et al.*, 2015): *H. antiochus* (Linnaeus, 1767), *H. leucadia* (Bates, 1862), *H. hewitsoni* (Hewitson, 1875), *H. sapho* (Drury, 1782), *H. congener* (Weymer, 1890) y *H. eleuchia* (Hewitson, 1854) (ver Tabla 1). El mapa de distribución de los especímenes georreferenciados en este estudio se realizó en QGIS (QGIS.org, 2020).

Diversidad nucleotídica

Con el alineamiento de las secuencias parciales del gen COI se calcularon los sitios variables (S), la diversidad nucleotídica (π), así como el estadístico D de Tajima para aquellas unidades cuando el tamaño de muestra fue adecuado, y para esto se usó el programa Arlequín 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2010). Con este alineamiento también se realizó una determinación de haplogrupos, definidos aquí con un criterio de mínima identidad nucleotídica, que resultará en la discriminación máxima entre *H. sara*, *H. eleuchia*, *H. congener*, *H. sapho*, *H. hewitsoni*, *H. antiochus*, *H. leucadia* usando para esto el algoritmo USEARCH (Edgar, 2010).

Estructura Genética

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para comparar la población de *H. sara* de la Isla Gorgona y sus conoespecíficos continentales usando el programa Arlequín 3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2010). Con el AMOVA se calculó el índice de fijación Φ_{st} , con una prueba exacta de

Tabla 1. Accesoión de secuencias del GenBank para las unidades taxonomicas operativas seleccionadas del subclado *Sapho-Sara*, además del país y localidad de origen.

Número de accesoión	Especie	País	Localidad
AF413695	<i>Heliconius sara</i>	Panamá	Canal Zone, Pipeline Road*
AY748038	<i>Heliconius sara</i>	Guayana Francesa	St Maurice on road to Apatou*
HQ446860	<i>Heliconius sara</i>	Desconocido	NA
HQ446861	<i>Heliconius sara</i>	Desconocido	NA
HQ446862	<i>Heliconius sara</i>	Desconocido	NA
HQ446863	<i>Heliconius sara</i>	Desconocido	NA
KP074841	<i>Heliconius sara</i>	Guayana Francesa	Pointe Macouria*
KP074842	<i>Heliconius sara</i>	Panamá	Pipeline Rd, Colon
KP074843	<i>Heliconius sara</i>	Perú	Tarapoto, San Martin*
KP074844	<i>Heliconius sara</i>	Panamá	Cana, Darien*
KP281778	<i>Heliconius sara</i>	Panamá	NA
MH397389	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona*
MH397390	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397391	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397392	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397393	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397394	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Valle del Cauca, Pance*
MH397395	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397396	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397397	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Valle del Cauca, Vía al Palmar*
MH397398	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397399	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Isla Gorgona
MH397400	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Guapi*
MH397401	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Guapi
MH397402	<i>Heliconius sara</i>	Colombia	Cauca, Guapi
NC_026564	<i>Heliconius sara</i>	Panamá*	NA
AF413698	<i>Heliconius sapho</i>	Panamá	Canal Zone, Pipeline Road
AY748075	<i>Heliconius sapho</i>	Panamá	Canal Zone, Pipeline Road
KP074838	<i>Heliconius sapho</i>	Colombia	Mariquita Reserve, Tolima*
KP074839	<i>Heliconius sapho</i>	Panamá	Pipeline Rd, Colon*
KP074840	<i>Heliconius sapho</i>	Ecuador	Pedro Maldonado, Pichincha*
AY748041	<i>Heliconius congener</i>	Colombia	Provincia del Putumayo*
KP074775	<i>Heliconius congener</i>	Ecuador	El Topo, Tungurahua*
AY748040	<i>Heliconius hewitsoni</i>	Panamá	NA
AY748076	<i>Heliconius hewitsoni</i>	Panamá	NA
AF413697	<i>Heliconius eleuchia</i>	Panamá	Canal Zone, Pipeline Road
AY748074	<i>Heliconius eleuchia</i>	Panamá	Santa Rita bridge*
KP074788	<i>Heliconius eleuchia</i>	Panamá	Pipeline Rd, Colon
AY748039	<i>Heliconius antiochus</i>	Panamá	NA
KP074762	<i>Heliconius antiochus</i>	Suriname*	NA
AY748042	<i>Heliconius leucadia</i>	Brazil	Rondônia, Cacaullandia*
AF413696	<i>Heliconius ricini</i>	Guayana Francesa	Rio Compte
AY748073	<i>Heliconius ricini</i>	Guayana Francesa	Sablance (La Victoire)
KP074837	<i>Heliconius ricini</i>	Guayana Francesa	Rio Compte

*Localidades usadas para realizar la prueba de Mantel (ver métodos). NA indica provincia indeterminada.

diferenciación entre UTOs realizando 16 000 permutaciones. Como complemento al AMOVA y para examinar la relación espacial de las distancias genéticas entre localidades, se calculó el patrón espacial de variación interespecífica con un modelo de aislamiento por distancia (APD). Para el análisis de APD la matriz de distancia genética patrística entre UTOs fue calculada con MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) y la distancia geográfica fue obtenida con una calculadora en línea (ver “Geographic Distance Matrix Generator” por (Ersts, 2014). Con estas matrices se realizó una prueba de Mantel con el paquete *Vegan* en RStudio Team (2016) (RStudio, Inc., Boston, MA, USA) entre 18 localidades de Centroamérica y Suramérica en donde se han reportado estas subespecies en la literatura citada (Beltrán *et al.*, 2002; 2007; Kozak *et al.*, 2015) y el GenBank (Benson *et al.*, 2011). Para visualizar el patrón de asociación más parsimoniosa entre haplogrupos, se construyó una red entre estos utilizando valores de la mediana entre haplogrupos para su unión en red con el programa PopArt v.1.7 (Leigh y Bryant, 2015).

Genealogía por Máxima Verosimilitud y por Inferencia Bayesiana

La reconstrucción de la genealogía se realizó por el método de Máxima Verosimilitud (MV) en la plataforma de PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) y se ejecutó sin restricción alguna sobre la topología. El árbol inicial presenta puntas aleatoriamente distribuidas y se incluye a *H. ricini* como grupo externo para UTOs aquí seleccionadas dentro del subclado *Sapho-Sara*. Se implementó para el análisis a un modelo de sustitución HKY, ajustado con igual frecuencia para todas las bases. Este modelo con un valor de heterogeneidad en el patrón de sustituciones dividido en diez categorías Gama, con una distribución normal para el parámetro de transiciones y transversiones que tienen un valor inicial de 0 y una media de 3,14625 (sd = 1,7). Se determinaron *a priori* dos particiones para las posiciones en el codón (1+2 y 3). Al final se realizó un consenso con 5000 repeticiones para calcular porcentualmente el soporte de los nodos.

La genealogía fue calibrada con los aspectos mejor soportados de la topología del subclado *Sapho-Sara* de acuerdo con Kozak *et al.* (2015). En esta filogenia se documenta un alto soporte para un clado conformado por *H. sapho*, *H. eleuchia* y *H. congener*. El segundo grupo restringido incluye todas las UTOs en este estudio como un grupo monofilético, pero excluyendo a *H. ricini* (ver Tabla 1). Este patrón de la topología fue ajustado en BEAUTi v1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012), la reconstrucción de la genealogía se realizó con el método de IB en BEAST v1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) como esta desplegado en la plataforma CIPRES (Miller *et al.*, 2010). Para este análisis se implementó el mismo modelo del análisis por MV, misma partición de datos, igual patrón de sustituciones con diez categorías y se estableció una longitud de cadena de 10 000 000 pasos, recolectando datos cada 1000 pasos. El reloj molecular se indicó de carácter relajado Log normal con un modelo coalescente de tamaño poblacional

constante. El ancestro común más cercano al grupo interno fue calibrado con una media de $2,1 \pm 1,0$ millones de años de acuerdo con Kozak *et al.* (2015). Con el anotador de árboles TreeAnnotator v1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012), se procesó el archivo de salida producido en BEAST v1.8.4 y se excluyó un exceso del 25 % de las inferencias iniciales (*Burn-in*). Con los datos restantes se generó un árbol de mayor credibilidad y su visualización se realizó en el programa MrEnt v2.5 (Zuccon y Zuccon, 2014). La congruencia entre los resultados por IB y MV se examinaron usando como referencia el soporte de los nodos mayor o igual a 0,95 para la IB y al 70 % para el análisis de MV.

Análisis demográfico para *H. sara*

Con el fin de examinar el patrón histórico de migración para *H. sara* entre el área continental y la Isla Gorgona, se realizó un análisis de la coalescencia del marcador COI. Con este alineamiento de secuencias se estima de manera conjunta el tamaño efectivo poblacional (θ) y la tasa de migración total (M) (ambos escalados a la tasa de mutación) mediante un método de IB en Migrate-n 4.2.14 (Beerli *et al.*, 2019). Para este análisis se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica HKY con el objetivo de realizar un análisis consistente con el modelo implementado para el método de inferencia de la genealogía por IB. En Migrate-n se programó una cadena de 250 000 pasos, *Burn-in* de 200 000 pasos iniciales, con 20 repeticiones independientes del análisis para calcular un promedio de la estimación de los parámetros. Adicionalmente, se implementó un modo adaptativo de muestreo durante la IB en Migrate-n, donde a cada paso se realizan intercambios de aceptación y rechazo en las estimaciones, lo que facilita el rastreo de los parámetros sobre el paisaje estadístico. La estacionalidad del proceso de la IB fue determinada por los valores ESS $>10^4$ para cada parámetro. La aproximación de Bézier de integración termodinámica (implementada en Migrate-n) fue utilizada para estimar el valor marginal de verosimilitud y con este valor calcular la probabilidad condicionada a los datos de los diferentes modelos de migración (Apéndice 3). Con el modelo de mayor probabilidad se reinterpretan los valores de M , como el cálculo en RStudio Team (2016) de un producto con θ que se aproxima al número de inmigrantes efectivos por generación (Nm) (Beerli *et al.*, 2019).

RESULTADOS

Variación Genética

Se obtuvieron 14 secuencias del gen COI de especímenes de *H. sara* para Colombia, de los cuales nueve provienen de la isla Gorgona (Fig. 1). Con la consulta realizada en el GenBank se obtuvieron 35 secuencias adicionales de áreas continentales, tanto para *H. sara* (17 secuencias) como para las demás especies del subclado *Sapho-Sara* (18 secuencias). Estas últimas incluidas para efectos de examinar la hipótesis



Figura 1. Morfología externa de *Heliconius sara* de la Isla Gorgona, Colombia. En vista ventral (Izq) los adultos son negros opacos con manchas rojas en la zona basal y postbasal del ala posterior. El ala anterior en vista ventral tiene una franja clara en la zona de traslape con el ala posterior, presenta una línea amarilla en el margen costal del ala anterior desde la base hasta la zona media y dos manchas de color amarillo claro en la zona medial y apical de las alas. En la vista dorsal (Der.) se aprecia que el color negro es más intenso y se mezcla con las tonalidades de un azul iridesciente que se extiende desde la base hacia las márgenes distales. En vista dorsal son ausentes las manchas rojas observadas en vista ventral, pero las dos bandas del AA se conservan, contrastando con el negro en una señal aposemática.

de monofilia de *H. sara*. Un total de 44 accesiones de secuencias de COI fueron alineadas de modo que presentan información de un fragmento de 508 pares de bases para el gen COI (Tabla 1). El alineamiento presenta menos del 1,2 % de datos faltantes, un 77,6 % de loci invariables, mientras que el 19,1 % corresponde a loci informativos. La definición de haplogrupos con un criterio de similaridad nucleotídica ≥ 98 % entre secuencias parciales del gen COI en USEARCH es congruente con el resultado de la red de haplogrupos. Esto implica que en la red de haplogrupos un mínimo de 2 % de diferenciación genética permite discriminar entre todas y cada una de las UTOs (Fig. 2a).

Análisis de Varianza Molecular

La distribución del patrón de variación nucleotídica del gen COI es diferencial *entre* y *dentro* de las UTOs del subclado *Sapho-Sara* [AMOVA $\Phi_{st_{8,35}} = 0,94483$, prueba exacta de distribución individual $P = 0,00001$]. Esto indica que la diferenciación promedio entre UTOs es mucho más alta (Φ_{st}) que el mínimo valor (2 %) de diferenciación calculado en el análisis con USEARCH. Considerando el tamaño de la muestra para cada UTO, la prueba de Tajimas D solo fue posible calcularla para *H. sara* y *H. sapho*. Los valores negativos del índice D sugieren que el conjunto de datos para estas dos formas de *Heliconius* podría presentar un exceso de variantes de menor frecuencia; sin embargo, la hipótesis de neutralidad de la variación en COI no puede ser rechazada para *H. sapho* ($D = -0,81650$, $p = 0,30500$) y *H. sara* ($D = -1,51978$, $p = 0,0520$).

Existe evidencia, de un patrón de diferenciación entre la población de *H. sara* recolectada de la Isla Gorgona con su segmento conespecífico de distribución en el área continental (ver Tabla 3). Así como también, se encuentra un patrón de diferenciación genética para *H. sara* de la isla

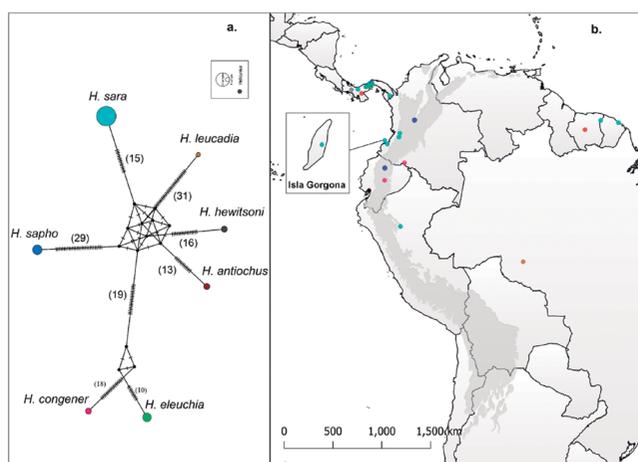


Figura 2. a) Red de haplogrupos de especies del subclado Sapho-Sara incluidas en este estudio. El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias disponibles de cada haplogrupo en el GenBank. Las líneas entre los haplogrupos y los números entre paréntesis representan el número de pasos mutacionales. La estructura geométrica donde convergen todas las especies indica una politomía dado que este análisis no está polarizado con el grupo externo en el subclado *Sapho-Sara* (ver Métodos). **b)** Distribución de las localidades de donde provienen las secuencias reportadas en GenBank de las especies objeto de análisis con un recuadro de ampliación para ilustrar la localidad Isla Gorgona (ver Métodos y Tabla 1).

con las demás UTOs excepto con *H. leucadia* con quien su valor Φ_{st} no puede ser diferenciado (ver Tabla 3). Sobre lo anterior se enfatiza que la estructura genética observada entre UTOs no puede ser explicada *a priori* por el patrón de distribución espacial de las muestras. Esto quiere decir que la variación genética entre especies del subclado *Sapho-Sara* presenta una muy pobre correlación lineal con la estructura de la matriz de distancias geográficas ($r = -0,002425$, $p = 0,45455$, $perm=10000$).

Tabla 2. Número de nucleótidos y tamaño de la muestra para calcular índices de diversidad molecular para la especie *H. sara* de la Isla Gorgona, del área continental y otras UTOs del subclado *Sapho-Sara*.

Especies	Nucleótidos útiles	Tamaño de muestra	S	π
<i>Heliconius eleuchia</i>	508	3	0	NA
<i>Heliconius congener</i>	508	2	0	NA
<i>Heliconius sapho</i>	508	5	1	0.0079
<i>Heliconius hewitsoni</i>	508	2	0	NA
<i>Heliconius antiochus</i>	508	2	8	0.01575
<i>Heliconius sara</i> (Gorgona)	350	9	0	NA
<i>Heliconius sara</i> (Continente)	306	17	6	0.00317
<i>Heliconius leucadia</i>	508	1	0	NA

NA: no procede el cálculo dado que (i) el tamaño de la muestra es uno o (ii) S=0.

Inferencia filogenética

Se utilizó el alineamiento del conjunto de 44 accesiones de secuencias del gen COI, incluyendo el grupo externo del subclado, para la selección de un modelo de sustitución nucleotídica HKY (BIC= 3770, K=91) para mitigar el efecto de la potencial saturación de sustituciones en ese fragmento de ADNmt. Este modelo de sustitución y el proceso de inferencia filogenética por MV (LogMV = -1616,68932) es parcialmente congruente con la IB en la que se predeterminaron aspectos de la topología del clado *Sapho-Sara* (Ver Apéndice 1). Ambos análisis coinciden en el soporte del 56 % de los subclados en la genealogía resultante pero solo el análisis de remuestreo por MV ofrece un 93 % de soporte para la monofilia de las secuencias de *H. sara* (Apéndice 1). De acuerdo con la calibración de la genealogía por la IB, la diversificación haplotípica en *H. sara* es muy reciente, comenzó *grasso modo* en el Pleistoceno superior hacia principios del Holoceno entre 0,0796-0,0143 millones de años (Apéndice 1).

Análisis demográfico

El análisis del patrón histórico de migración de *H. sara* entre el área continental y la Isla Gorgona sugiere un ajuste razonable con un modelo que obtuvo el mayor valor de probabilidad 0,95 (Apéndices 2 y 3). El resultado soporta la conjetura de un patrón de estructura genética y rechaza la hipótesis nula de una población panmíctica. El modelo de tipo XX0X (como se parametriza en Migare-n) (Beerli *et al.*, 2019), describe flujo genético asimétrico de *H. sara* y sugiere la posibilidad de una historia de migración unidireccional desde la isla hacia el continente (Apéndice 3). Para el modelo, la estimación de parámetros demográficos $\theta_{\text{continente}}$

Tabla 3. Índice de fijación entre agrupaciones para calcular el grado de diferenciación genética entre *H. sara* de la Isla Gorgona comparado con *H. sara* (continente) y otras unidades taxonómicas operativas del subclado *Sapho-Sara*.

Población	N	Φ_{st}	P < 0.05
<i>Heliconius ricini</i>	3	0.99736	+
<i>Heliconius eleuchia</i>	3	1.00000	+
<i>Heliconius congener</i>	2	1.00000	+
<i>Heliconius sapho</i>	5	0.99424	+
<i>Heliconius hewitsoni</i>	2	1.00000	+
<i>Heliconius antiochus</i>	2	0.95824	+
<i>Heliconius sara</i> (Continente)	17	0.24257	+
<i>Heliconius leucadia</i>	1	1.00000	-

θ_{Gorgona} y $M_{\text{Gorgona} \rightarrow \text{Continente}}$ tiene valores modales de 0,00446, 0,00002 y 217,5 respectivamente y curvas unimodales de distribución de frecuencia para la estimación de cada parámetro (Apéndice 2). Sin embargo, el intervalo del 95 % de confianza para los parámetros $\theta_{\text{continente}}$ (0,0-0,14228), θ_{Gorgona} (0,0-0,14228) y $M_{\text{Gorgona} \rightarrow \text{Continente}}$ (0,0 a 18150,0) presentan una parte de su curva de distribución de frecuencia que podría no diferenciarse claramente de cero, y por esto, la interpretación de los valores modales debe realizarse con precaución. Con esto en consideración, en el patrón histórico de migración de *H. sara* la conversión del número total de migrantes M a Nm resulta en *ca.* 18 inmigrantes por generación. Si la inferencia de los valores modales de los parámetros estimados es adecuada, entonces Nm , es el número de individuos que probablemente ha fluido históricamente por generación hacia áreas continentales desde la isla. Sin embargo, para efectos de la interpretación del modelo es importante considerar que la cantidad de variación en el alineamiento de secuencias parciales de COI podría ser insuficiente para la estimación de una distribución de M con todos sus valores diferentes de cero.

DISCUSIÓN

El contexto filogenético de *H. sara*

En este estudio se examina el patrón de variación genética de *H. sara* entre una población con distribución en la isla Gorgona y aquellas muestras de la misma especie con distribución en el área continental en un contexto de análisis inter-específico (Fig. 2b). Para esto se ha caracterizado un fragmento de ADNmt del gen COI que ha sido documentado como un marcador informativo en el estudio de ancestría y descendencia de mariposas, y en particular del género *Heliconius* (Linares *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2014). Este análisis implementa la inferencia por MV de una genealogía con un fragmento de ADNmt que es consistente con la filogenia del clado *Sapho-Sara* de Kozak *et al.* (2015). La inferencia muestra evidencia de (i) soporte por MV para un grupo monofilético de secuencias de ADNmt de *H. sara* y (ii) la datación por IB

acotada sobre la genealogía del clado de *H. sara* a partir de secuencias que provienen de un amplio marco geográfico.

La red de haplogrupos de las UTOs constituye una síntesis gráfica de la genealogía desde una perspectiva ultramétrica por el criterio de parsimonia y representa gráficamente que una distancia genética (no corregida) de un 2% en promedio permite diferenciar mínimamente entre todos y cada uno de los diferentes UTOs (Fig. 2a). La diferenciación mínima representada en la red es consistente con la diferenciación porcentual entre especies del género *Heliconius* que se ha documentado con fragmentos aún más largos de ADNmt (Mallet *et al.*, 2007). El análisis de ultrametrización de la genealogía mediante la IB calibra la datación como un fenómeno de diversificación reciente para la distribución diferencial de la variación nucleotídica de ADNmt de *H. sara* entre otras especies del género *Heliconius*. En adición, la evidencia de la monofilia de secuencias parciales de ADNmt de *H. sara* soporta el tratamiento de este subconjunto de datos en un marco de análisis demográfico.

Diversidad de *H. sara*

La diversidad nucleotídica observada en *H. sara* es menor a lo reportado para otras especies del género como *H. melpomene* (Linnaeus, 1758), *H. cydno* (Doubleday, 1847) y *H. timareta* Hewitson, 1867 (Arias *et al.*, 2014) o que lo calculado aquí para *H. Sapho* (Dury, 1782). En Costa Rica se han documentado valores moderados de variación genética local de *H. sara*, en relación con otras especies del género en condiciones sintópicas (Kronforst y Gilbert, 2008). Para *H. sara* presentamos evidencia de un patrón de diferenciación genética consistente con el aislamiento de la población en la isla, presumiblemente asociado con la discontinuidad geográfica con el continente. La distancia genética entre poblaciones de *H. sara* en la isla y el continente es menor que la distancia entre *H. sara* con cualquiera de las otras especies incluidas en este estudio con las que comparte un ancestro común cercano (Kozak *et al.*, 2015). Es importante enfatizar que la distancia genética entre *H. sara* entre la isla y el continente es más parecida al nivel de diferenciación intraespecífica observado en el género *Heliconius* (Arias *et al.*, 2014).

Análisis demográfico

El análisis de la coalescencia soporta un modelo de flujo restringido hacia la isla como el patrón histórico de dispersión efectiva desde la isla hacia el continente. Una consideración importante en la interpretación de este análisis es que no es posible obtener información de la incertidumbre asociada a la estimación del proceso coalescente con ADNmt como el único locus analizado (Zink y Barrowclough, 2008). Sin embargo, el modelo obtenido con Migrate-n sugiere que las estimaciones de θ son consistentes con el supuesto de un tamaño efectivo de la población menor en la isla comparado con el área continental (Apéndice 2). De modo que si la inferencia en Migrate-n del parámetro M es una

aproximación cercanamente correcta, este análisis puede resultar más informativo del fenómeno de migración efectiva, que pueda ser interpretado a partir del cálculo del índice de fijación Φ_{st} (Bohonak y Roderick 2001). Así, el modelo aquí seleccionado sugiere un patrón histórico de abundante inmigración por generación (Nm) de la isla hacia el rango de la especie en el área continental del pacífico colombiano. Cabe aquí recordar un evento anecdótico importante entre los lepidópteros de la isla, en el que *H. sara* es una de las pocas especies que ha sido documentada volando en mar abierto y en dirección al continente (Calero-Mejía *et al.*, 2014). Lo cual ofrece evidencia circunstancial del potencial de dispersión de esta mariposa sobre esta discontinuidad geográfica de 35 km en la actualidad.

Dado que se presume que, el fenómeno de hibridación con otras especies es particularmente raro en *H. sara* (Brown *et al.*, 1992). Los resultados de diferenciación porcentual promedio observada entre la población del continente y la Isla Gorgona, así como el soporte de monofilia para el conjunto de secuencias parciales de ADNmt, sugiere mínimamente, una aminorada posibilidad de anticipar evidencia de herencia uniparental matrilineal como parte de un fenómeno de hibridación interespecífica con *H. sara*. Esto sería consistente con la predicción de cruces interespecíficos en el género *Heliconius* en condiciones silvestres (Mallet *et al.*, 2007). Sobre los resultados aquí presentados se especula que, la historia coalescente de *H. sara* posiblemente no ha sido sustancialmente distorsionada por evolución reticulada (al menos no ligada a herencia de ADNmt). Sin embargo, la evolución reticulada es un fenómeno aparente entre especies más o menos distantes en su relación filogenética en el género (Zhang *et al.*, 2016), como ha sido documentado en *H. heurippa* (Hewitson, 1854) (Salazar *et al.*, 2008).

Por primera vez se examina el posible contexto de aislamiento de una población de mariposa en la Isla Gorgona, Colombia. Se utilizó en este estudio un segmento de ADNmt con el que se obtiene información sobre la distribución espacial de la variación genética neutral entre la isla y el área continental. Además de marcadores como el ADNmt que ha sido documentado como informativo para lepidópteros; otros marcadores de la determinación del sexo también se han documentado como prometedores para estudiar la historia demográfica en el género *Heliconius* (Van Belleghem *et al.*, 2018).

Los resultados aquí presentados sugieren un patrón de diversificación reciente con dispersión restringida hacia la Isla Gorgona. Este parece un modelo histórico consistente con la distribución diferencial del patrón de variación del ADNmt de la población de *H. sara* entre la Isla Gorgona y el área continental. Otras fuentes de datos, como la variación fenotípica o el análisis de patrones de dispersión local que puedan ser implementados en estudios posteriores, podrían contribuir a establecer el grado de congruencia con el patrón aquí observado de acumulación de variación genética neutral en *H. sara* de la Isla Gorgona.

CONCLUSIONES

Este estudio es una contribución a la caracterización de poblaciones de lepidópteros diurnos en la región del Pacífico colombiano. La forma de *H. sara* en la isla presenta un patrón de diferenciación genética neutral característica de la diferenciación intraespecífica observada en el género *Heliconius*. Proponemos un modelo histórico relativamente simple de flujo de genes asimétrico y restringido del área continental hacia la isla que podría remontarse -como una estimación cautelosa- a los últimos 80 k años. Estudios en el futuro de secuenciación de amplia cobertura genómica en esta especie podrían examinar el modelo aquí presentado. Nuestro modelo soporta la noción de divergencia local en aislamiento para esta población insular, promovido por restricción en el flujo de genes. La restricción de flujo del continente hacia la isla se daría presumiblemente por la actual barrera marítima con el continente; evidencia anecdótica de *H. sara* sobrevolando la discontinuidad marina desde la isla da cuenta de su potencial de dispersión. Un esfuerzo de investigación complementario que incluya la observación de patrones de dispersión *in situ* podría contribuir a analizar el modelo histórico aquí presentado. Este modelo también puede ser utilizado en el estudio de otros aspectos de la biología en esta especie como la evolución reciente de características fenotípicas en ese contexto espacial (Fig. 1). La congruencia de nuestra hipótesis de trabajo para otras especies de mariposas diurnas e insectos en la isla con distribución en el área continental continua de Chocó Biogeográfico es una pregunta abierta que aún queda por resolver.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a Natalia Pérez y Lee Calvert durante la recolección de datos, a Diana Gil por su colaboración en el formato de este manuscrito y a tres revisores anónimos que realizaron comentarios constructivos para mejorar una versión inicial del manuscrito. RS agradece a Claritza Muñoz como asistente para la realización de la PCR y al laboratorio del Departamento de Ciencias Fisiológicas dirigido por Dra. Mildrey Mosquera-Escudero quien generosamente nos acogió en sus instalaciones. Agradecemos al MUSENUV que custodia el material recolectado y en especial a Carmen Eliza Poso. Este estudio es una contribución para la formación de estudiantes otorgada a HC por la Universidad del Valle. La Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia aprobó el permiso de recolección en la isla por lo cual agradecemos. Agradecemos a los biólogos Luis Payan y Ximena Zorrilla por su apoyo en los aspectos de orientación logística y administrativa en el Parque Nacional Natural Isla Gorgona.

REFERENCIAS

- Arias CF, Salazar C, Rosales C, Kronforst MR, Linares M, Bermingham E, *et al.* Phylogeography of *Heliconius cydno* and its closest relatives: disentangling their origin and diversification. *Mol Ecol.* 2014;23(16):4137-52. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.12844>
- Beerli P, Mashayekhi S, Sadeghi M, Khodaei M, Shaw K. Population Genetic Inference With MIGRATE. *Curr Protoc Bioinforma.* 2019;68(1):1-28. Doi: <https://doi.org/10.1002/cpbi.87>
- Van Belleghem SM, Baquero M, Papa R, Salazar C, McMillan WO, Counterman BA, *et al.* Patterns of Z chromosome divergence among *Heliconius* species highlight the importance of historical demography. *Mol Ecol.* 2018;27(19):3852-72. Doi: <https://doi.org/10.1111/mec.14560>
- Beltrán M, Jiggins CD, Brower AVZ, Bermingham E, Mallet J. Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biol J Linn Soc.* 2007;92(2):221-39. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00830.x>
- Beltrán M, Jiggins CD, Bull V, Linares M, Mallet J, McMillan WO, *et al.* Phylogenetic Discordance at the Species Boundary: Comparative Gene Genealogies Among Rapidly Radiating *Heliconius* Butterflies. *Mol Biol Evol.* 2002;19(12):2176-90. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004042>
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Suppl1):D32-7. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1079>
- Blanco JF, Ramírez A, Scatena F. The streams of Gorgona National Natural Park within the global context: an introduction to the special issue. *Actual Biol.* 2009;31(91):105-10.
- Bohonak AJ, Roderick GK. Dispersal of Invertebrates Among Temporary Ponds: are Genetic Estimates Accurate? *Isr J Zool.* Taylor & Francis. 2001;47(4):367-86. Doi: <https://doi.org/10.1560/HM51-9Y1V-QCRQ-CJP5>
- Brower AVZ. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(14):6491-5. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6491>
- Brown KS, Emmel TC, Eliazar PJ, Suomalainen E. Evolutionary patterns in chromosome numbers in neotropical Lepidoptera. *Hereditas.* 1992;117(2):109-25. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1992.tb00165.x>
- Calero-Mejía H, Armbrecht I, Montoya-Lerma J. Mariposas diurnas y nocturnas (Lepidoptera: Papilionoidea, Saturniidae, Sphingidae) del Parque Nacional Natural Gorgona, Pacífico Colombiano. *Rev Biol Trop.* 2014;62(Suppl1):317-28. Doi: <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i0.16351>

- Chazot N, De-Silva DL, Willmott KR, Freitas AVL, Lamas G, Mallet J, *et al.* Contrasting patterns of Andean diversification among three diverse clades of Neotropical clearwing butterflies. *Ecol Evol.* 2018;8(8):3965-82. Doi: <https://doi.org/10.1002/ece3.3622>
- Descimon H. La conservation des Parnassius en France: aspects zoogéographiques, écologiques, démographiques et génétiques. Francia, Marsella: Universidad de Provenza; 1995.
- DeVries PJ. The butterflies of Costa Rica and their natural history: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton: Princeton University Press; 1987. p.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29(8):1969–1973. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2460-1. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Ehrlich PR, Raven PH. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 1964;18(4):586. Doi: <https://doi.org/10.2307/2406212>
- Ersts PJ. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). Am Museum Nat. Hist Cent Biodivers Conserv. 2014.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(3):564-7. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fowler HW. Fresh-Water Fishes from Northwestern Colombia. *Proc Acad Nat Sci Philadelphia.* 1994;96:227-48.
- Giraldo A, Diazgranados MC, Gutiérrez-Landázuri C. Isla Gorgona, enclave estratégico para los esfuerzos de conservación en el Pacífico Oriental Tropical. *Rev Biol Trop.* 2014;62: 1–12. Doi: <https://doi.org/10.15517/RBT.V62I0.15975>
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59(3):307-21. Doi: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Halbritter DA, Storer CG, Kawahara AY, Daniels JC. Phylogeography and population genetics of pine butterflies: Sky islands increase genetic divergence. *Ecol Evol.* 2019;9(23):13389-401. Doi: <https://doi.org/10.1002/ece3.5793>
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Suppl 1-2):5-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Kozak KM, Wahlberg N, Neild AFE, Dasmahapatra KK, Mallet J, Jiggins CD. Multilocus Species Trees Show the Recent Adaptive Radiation of the Mimetic *Heliconius* Butterflies. *Syst Biol.* 2015;64(3):505-24. Doi: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv007>
- Kronforst MR, Gilbert LE. The population genetics of mimetic diversity in *Heliconius* butterflies. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2008;275(1634):493-500. Doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1378>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Battistuzzi FU, editor. Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leigh JW, Bryant D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015;6(9):1110-6. Doi: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Linares MC, Soto-Calderón ID, Lees DC, Anthony NM. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: A test of the DNA barcoding approach. *Mol Phylogenet Evol. Elsevier Inc.;* 2009;50(3):485-95. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.11.008>
- Mallet J. Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behavior: *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Oecologia.* 1986;68(2):210-7. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00384789>
- Mallet J, Beltrán M, Neukirchen W, Linares M. Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evol Biol.* 2007;7(1):28. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-28>
- Maresova J, Habel JC, Neve G, Sielezniew M, Bartonova A, *et al.*, Cross-continental phylogeography of two Holarctic Nymphalid butterflies, *Boloria eunomia* and *Boloria selene*. *PLoS One.* 2019;14(3):e0214483. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214483>
- Martin SH, Möst M, Palmer WJ, Salazar C, McMillan WO, Jiggins FM, *et al.* Natural Selection and Genetic Diversity in the Butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics.* 2016;203(1):525-41. Doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183285>
- Milá B, Warren BH, Heeb P, Thébaud C. The geographic scale of diversification on islands: genetic and morphological divergence at a very small spatial scale in the Mascarene grey white-eye (Aves: *Zosterops borbonicus*). *BMC Evol Biol.* 2010;10(1):158. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-158>
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 2010 *Gatew Comput Environ Work. IEEE;* 2010 p. 1-8. Doi: <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Miyakawa M, Hosoi M, Kawakita A, Ito-Harashima S, Yagi T, Ishihara M. Genetic variations and phylogeography of the swallowtail butterfly *Papilio machaon* on the Japanese Islands. *Entomol Sci.* 2018;21(3):248-59. Doi: <https://doi.org/10.1111/ens.12302>

- Montejo-Kovacevich G, Smith JE, Meier JL, Bacquet CN, Whiltshire-Romero E, Nadeau NJ, *et al.*, Altitude and life-history shape the evolution of *Heliconius* wings. *Evolution* (N Y). 2019;73(12):2436-50. Doi: <https://doi.org/10.1111/evo.13865>
- Morris J, Hanly JJ, Martin SH, Van Belleghem SM, Salazar C, Jiggins CD, *et al.*, Deep Convergence, Shared Ancestry and Evolutionary Novelty in the Genetic Architecture of *Heliconius* Mimicry. *Genetics*. 2020;216(3):765-780. Doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303611>
- De Moura PA, Quek S-P, Cardoso MZ, Kronforst MR. Comparative population genetics of mimetic *Heliconius* butterflies in an endangered habitat; Brazil's Atlantic Forest. *BMC Genet*. 2011;12(1):9. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-9>
- Nadeau NJ, Martin SH, Kozak KM, Salazar C, Dasmahapatra KK, Davey JW, *et al.* Genome-wide patterns of divergence and gene flow across a butterfly radiation. *Mol Ecol*. 2013;22(3):814-26. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05730.x>
- Pardo-Diaz C, Salazar C, Baxter SW, Merot C, Figueiredo-Ready W, Joron M, *et al.* Adaptive Introgression across Species Boundaries in *Heliconius* Butterflies. *R. PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002752. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002752>
- Parnell AJ, Bradford JE, Curran EV, Washington AL, Adams G, Brien MN, *et al.* Wing scale ultrastructure underlying convergent and divergent iridescent colours in mimetic *Heliconius* butterflies. *J R Soc Interface*. 2018;15(141):20170948. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0948>
- QGIS.org. QGIS Sistema de Información Geográfica. Proyecto de Fundación Geoespacial de Código Abierto [Internet]; 2020. Available in: <https://qgis.org/es/> Cited: 03 ene 2021.
- Rangel-Ch. JO. Islas de Gorgona y Gorgonilla. *Colomb Divers Biot I*. 1995 p: 145-54.
- Rstudio Team. RStudio: Integrated Development for R. Boston, USA: RStudio, Inc. Boston, MA; 2016. p. 77.
- Salazar C, Jiggins CD, Taylor JE, Kronforst MR, Linares M. Gene flow and the genealogical history of *Heliconius heurippa*. *BMC Evol Biol*. 2008;8(1):132. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-132>
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am*. 1994;87(6):651-701. Doi: <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Templeton A. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. En: Otte D, Endler J, editores. *Speciat its consequences*. Sunderland: Sinauer Associates; 1989 p. 3-27.
- Thurman TJ, Seymoure BM. A bird's eye view of two mimetic tropical butterflies: Coloration matches predator's sensitivity. *J Zool*. 2016;298(3):159-68. Doi: <https://doi.org/10.1111/jzo.12305>
- Todisco V, Gratton P, Cesaroni D, Sbordoni V. Phylogeography of *Parnassius apollo*: hints on taxonomy and conservation of a vulnerable glacial butterfly invader. *Biol J Linn Soc*. 2010;101(1):169-83. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01476.x>
- Valente L, Phillimore AB, Melo M, Warren BH, Clegg SM, Havenstein K, *et al.*, A simple dynamic model explains the diversity of island birds worldwide. *Nature*. Springer US; 2020;579(7797):92-6. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2022-5>
- Zhang W, Dasmahapatra KK, Mallet J, Moreira GRP, Kronforst MR. Genome-wide introgression among distantly related *Heliconius* butterfly species. *Genome Biol*. *Genome Biol*. 2016;17(1). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0889-0>
- Zink RM, Barrowclough GF. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol Ecol*. 2008;17(9):2107-21. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03737.x>
- Zuccon A, Zuccon D. MrEnt: an editor for publication-quality phylogenetic tree illustrations. *Mol Ecol Resour*. 2014;14(5):1090-4. Doi: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12253>