

Caracterización molecular de Euptychiina (Lepidoptera: Satyrinae) del norte de la Cordillera Central de los Andes

Molecular characterization of Euptychiina (Lepidoptera: Satyrinae) from the northern Central Cordillera of the Andes

MARIO ALEJANDRO MARÍN¹, ANDRÉS LÓPEZ², ANDRÉ VICTOR LUCCI FREITAS³ y SANDRA INÉS URIBE⁴

Resumen: Euptychiina es considerado un grupo de difícil taxonomía debido a que presenta una alta diversidad de especies de homogeneidad morfológica aparente haciendo compleja su identificación. En este sentido, las secuencias de ADN proporcionan una herramienta útil para la diferenciación de especies al aportar información valiosa y complementaria al uso de caracteres morfológicos tradicionales. Se realizó una caracterización molecular de trece especies de Euptychiina comunes en el norte de la cordillera central de los Andes Colombianos empleando secuencias de ADN mitocondrial de la región 3' del gen Cyt b, el ARNt^{Ser} y el extremo 3' de ND1. En las secuencias del fragmento secuenciado se evidenciaron grados de variación que permitieron diferenciar todas las especies. La variación nucleotídica intraespecífica fue inferior a 2% y la interespecífica superior a 4%. Adicionalmente, se encontró en la región secuenciada un espaciador intergénico entre el Cyt b y el ARNt^{Ser}, el cual no había sido reportado para Nymphalidae. La variación nucleotídica en el espaciador a nivel interespecífico fue similar y complementaria a la encontrada en la región codificante. El fragmento secuenciado se presenta como una nueva herramienta para mejorar y complementar los estudios taxonómicos en grupos como este, donde se incluyen especies morfológicamente similares. La región propuesta combina varios genes con diferentes grados de variación nucleotídica aportando información útil en la identificación de especies.

Palabras clave: Cyt b. ARNt. ND1. Espaciador intergénico. Marcadores moleculares.

Abstract: Euptychiina is considered a taxonomically difficult group given a high diversity of species and morphological homogeneity among them, making their identification complex. In this sense, DNA sequences offer a useful tool for species differentiation, providing valuable and complementary information to traditional morphological characters. The molecular characterization of thirteen Euptychiina species common to the northern Central Cordillera of the Colombian Andes was carried out using mitochondrial DNA sequences of the 3' Cyt b gene, the tRNA^{Ser} and the terminal portion of 3' ND1. Sequences of the DNA fragments exhibited a degree of variation adequate for differentiating all species. Nucleotide variation was less than 2% at the intraspecific level and greater than 4% at the interspecific level. Additionally, an intergenic spacer was found in the Cyt b and the tRNA^{Ser} that has not previously been reported for the Nymphalidae. Nucleotide variation in the spacer at the interspecific level was similar and complementary to that found in the coding region. The sequenced fragment is presented as a new tool to improve and complement taxonomic studies in groups like this, which include morphologically similar species. The proposed region combines various genes with different degrees of nucleotide variation, providing useful information for species identification.

Keys words: Cyt b. tRNA. ND1. Intergenic spacer. Molecular markers.

Introducción

Euptychiina es uno de los grupos más diversos de Satyrinae con 42 géneros válidos y cerca de 400 especies descritas (Lamas 2004; Freitas y Peña 2006). Se le considera muy difícil taxonómicamente (Murray 2001; Peña y Lamas 2005) debido a la alta diversidad de especies, la existencia de muchos géneros mal definidos y la aparente homogeneidad morfológica entre especies relacionadas (Peña y Lamas 2005).

En géneros como *Pareuptychia* Foster (1964), la similitud morfológica entre sus especies y la gran variabilidad intraespecífica que se encuentra en estadios larvales y adultos hace aun más difícil su identificación (Murray 2001). En este sentido, la utilización de secuencias de ADN proporciona una herramienta útil para la diferenciación de sus especies (Murray 2001; Sperling 2003; Hebert *et al.* 2004; Roe y Sperling

2007), aportando información valiosa y complementaria a los caracteres morfológicos, permitiendo por ejemplo obtener un mayor soporte en las diferenciaciones y la validación o resolución de preguntas en aspectos como ecología, fisiología o etología (Hebert *et al.* 2004; Roe y Sperling 2007; Pfenninger *et al.* 2007; Stahls y Savolainen 2008; Silva-Brandão *et al.* 2008; Day *et al.* 2008; Albre *et al.* 2008).

El ADN mitocondrial ha sido ampliamente usado en estudios evolutivos, poblacionales (Sperling 2003; Simon *et al.* 1994) y como apoyo en la identificación de especies (Hebert *et al.* 2004; Roe y Sperling 2007; Pfenninger *et al.* 2007; Day *et al.* 2008). Dependiendo del gen empleado y del organismo en estudio, las secuencias de ADN mitocondrial permiten diferenciar desde categorías taxonómicas superiores como orden (Pashley y Ke 1992) hasta niveles como raza y forma (Loxdale y Lushai 1998), siendo necesaria la selección de ge-

¹ Ingeniero Agrónomo; Estudiante Maestría en Ciencias - Entomología; Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; Grupo de Investigación en Sistemática Molecular; Autor para correspondencia: Calle 59A No 63-20. Bloque 18-102 Medellín, Colombia. mamarin0@bt.unal.edu.co.

² Biólogo; Estudiante Maestría en Biología; Universidad de Antioquia; Grupo de Investigación en Sistemática Molecular; Medellín, Colombia. andreslop27@gmail.com.

³ Biólogo, M.Sc. Ph. D; Departamento de Biología Animal y Museu de Zoologia, Instituto de Biología; Universidade Estadual de Campinas; São Paulo, Brasil. baku@unicamp.br.

⁴ Ingeniera Agrónoma M. Sc. Ph. D; Profesora Asociada, Escuela de Biociencias; Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; Grupo de Investigación en Sistemática Molecular; Medellín, Colombia. suribe@unal.edu.co.

nes acordes con el nivel taxonómico de interés (Rand 2001). En Satyrinae, se han empleado para estudios evolutivos los genes mitocondriales de la citocromo oxidasa subunidad uno (COI), dos (COII) y b (Cyt b), NADH deshidrogenasa subunidad uno (ND1) y cinco (ND5), ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) y la región control (CR). Genes que han sido útiles para estudios de poblaciones (Vila y Björklund 2004), de separación de especies (Monte-Alegre *et al.* 2005; Weingartner *et al.* 2006; Albre *et al.* 2008), de relaciones entre géneros (Murray y Pashley 2005; Torres *et al.* 2001), tribus (Martin *et al.* 2000; Peña *et al.* 2006; Yin *et al.* 2007a) y subtribus (Yin *et al.* 2007b).

Entre los genes mitocondriales, el que codifica para la subunidad b de la citocromo oxidasa (Cyt b), ha mostrado una apropiada resolución filogenética a nivel intragenérico e intergenérico (Simmons y Weller 2001). Específicamente en Satyrinae se ha empleado la región 5' de este gen para estudiar las relaciones evolutivas entre géneros y especies encontrándose una adecuada tasa de variación a este nivel taxonómico (Torres *et al.* 2001; Monte-Alegre *et al.* 2005; Yin *et al.* 2007a). Hacia el extremo 3' de este gen se encuentran ubicadas otras regiones consideradas como marcadores potenciales incluyendo un ARN de transferencia para serina (ARNt^{ser}) y la porción terminal 3' del gen ND1. Segmentos de importancia, dado que los ARNt mitocondriales poseen altas tasas de evolución con niveles de variación superiores que los que presentan en el núcleo (Simon *et al.* 1994) y se considera que éstos pueden ser muy útiles en estudios a nivel de género y especie (Pesole *et al.* 1999). Igualmente para el gen ND1, la región 5' ha exhibido tasas de evolución útiles a niveles inter y supragenérico (Zimmermann *et al.* 2000; Martin *et al.* 2000; Nylin *et al.* 2001; Yin *et al.* 2007b) aunque en dichos estudios no se incluye la región 3' que presumiblemente posee tasas de evolución adecuadas para estudios a nivel de especie (Videira y Duarte 2001).

En el presente estudio se realizó una caracterización molecular de trece de las especies de la subtribu Euptychiina más comunes en el norte de la cordillera central de los Andes colombianos, empleando secuencias de ADN mitocondrial de la región 3' del gen de la citocromo oxidasa subunidad b (Cyt b), incluyendo un gen de ARN de transferencia para Serina UCN (ARNt^{ser}) y el extremo 3' del NADH deshidrogenasa subunidad uno (ND1).

Materiales y Métodos

Obtención de secuencias de ADN. Se obtuvieron muestras de trece especies pertenecientes a ocho géneros de Euptychiina y además se obtuvo una muestra de una especie de Haeterini (*Cithaerias pireta* Stoll, 1780) (Tabla 1) empleada como grupo externo. Todos los especímenes se recolectaron entre los años 1997 y 2001 en el extremo norte de la Cordillera Central y Valle del Magdalena Medio y depositados en el MEFLG. El ADN se extrajo de una de las patas media y posterior o en casos más difíciles de una porción del tórax removida cuidadosamente de las mariposas preservadas en seco a -20°C, las cuales se procesaron con buffer de lisis (Uribe 1999).

La amplificación de la porción de ADN seleccionada incluyendo el Cyt b, ARNt^{ser} y ND1 se realizó con oligonucleótidos cebadores diseñados por Beard *et al.* (1993): CB3FC (CAYATTCAACCWGAATGATA) y NINFR (GGTAYWTTGCCTCGAWTTCGTATGA). Las reacciones de amplificación del ADN se realizaron mediante PCR en 50 µl

de reacción. Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30s, 47°C 30s, 72°C 2 minutos y un período final de extensión de 72°C por 10 minutos. La verificación de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa en tampón 1X de TBE con bromuro de etidio y marcador de peso conocido 100 pb. El fragmento amplificado se secuenció en ambos sentidos de la cadena, en un secuenciador automático ABI 373 del CDC (USA).

Análisis molecular Las secuencias de nucleótidos se encuentran depositadas en la base de datos de Genbank (Tabla 1). Para su análisis, se realizó un alineamiento múltiple usando como referencia el genoma mitocondrial de *Coreana raphaelis* (Oberthür, 1880) (NC 007976.1) (Kim *et al.* 2006), *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (NC 010266) (Cameron y Whiting 2008) y *Bombyx mandarina* (Moore, 1872) (NC 003395) (Yukuhiro *et al.* 2002), en el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.* 1994) integrado en MEGA 4.0 (Kumar *et al.* 2008) usando los valores por defecto para la penalización por apertura y extensión de gaps y con posterior corrección manual del alineamiento.

A partir del alineamiento se calculó el modelo de evolución de las secuencias en jModeltest 0.1.1. (Posada 2008; Guindon y Gascuel 2003), que fue empleado para la obtención del dendrograma de distancias génicas con el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2003). Usando el programa MEGA 4.0 (Kumar *et al.* 2008) se estimó el test exacto de Fisher basado en los codones de los genes codificantes para proteínas para observar el modelo de selección actuando sobre las secuencias (Nei y Kumar 2000). Además se calcularon los valores de divergencia nucleotídica con distancias no corregidas (p) y se graficaron contra las tasas de transición/transversión. De forma complementaria se realizó un análisis de distribución de la variabilidad en el fragmento mitocondrial secuenciado determinando la entropía (Hx) de cada posición nucleotídica en el programa DAMBE (Xia y Xie 2001).

Por último se realizó un análisis filogenético exploratorio de la región secuenciada. Para éste se tomó como grupo externo a *Cithaerias pireta* (Stoll, 1780) (Satyrinae: Haeterini), debido a la posición filogenética propuesta para la tribu a la cual pertenece en relación con los miembros de la subfamilia (Miller 1968; Peña *et al.* 2006). La matriz de datos fue analizada mediante una búsqueda heurística en el programa TNT 1.1 (Tree analysis using New Technology) (Goloboff *et al.* 2003) y se evaluó la robustez de los nodos mediante bootstrap (Felsenstein 1985) y soporte de Bremer (1988, 1994). Igualmente se realizó un análisis bayesiano que se llevó a cabo en el programa MrBayes (Ronquist y Hoeselbeck 2003) con un muestreo de 10'000.000 de generaciones de cadenas al azar tomadas de la matriz de datos por medio de generación de cadenas Markovianas, siguiendo el modelo de evolución molecular sugerido por el programa jModeltest 0.1.1. (Guindon y Gascuel 2003; Posada 2008).

Resultados y Discusión

Caracterización de las secuencias. En total se obtuvieron 42 secuencias de Euptychiina correspondientes a la región 3' del gen Cyt b, la secuencia completa del ARNt^{ser} (UCN) y un fragmento del extremo 3' de ND1. Se encontró variación en la longitud de las secuencias entre las especies. A nivel intra-

específico la variación fue mínima, solo se encontró en dos nucleótidos (nt) al interior de *Pareuptychia ocirrhoe*. A nivel interespecífico la variación en la longitud del fragmento secuenciado estuvo entre 449 nt (*Megeuptychia antonoe*) y 474 nt (*Hermeuptychia* sp2) (Fig. 1). La longitud de las secuencias por sí misma permite diferenciar las especies, incluso aquellas morfológicamente muy similares como *Hermeuptychia* sp.1 (459 nt) y *Hermeuptychia* sp.2 (474 nt). Resultados similares en cuanto a la longitud de las secuencias en la misma región fueron obtenidos en Lepidoptera con *Hypoleria lavinia* (Hewitson, 1855) (Lepidoptera: Ithomiinae) (Álvarez 2005). En dicho estudio se encontró una variabilidad en la longitud de las secuencias entre especies de hasta cuatro nucleótidos. En otros ordenes como Diptera, se han reportado variaciones de un nucleótido en *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) (Psychodidae) (Moin-Vaziri *et al.* 2007) y hasta de diez nucleó-

tidos entre especies del género *Drosophila* (Drosophilidae) (Kastanis *et al.* 2003; Grady y DeSalle 2008).

Cada una de las regiones amplificadas presentó distintos niveles de variación en su longitud (Tabla 2). La región 3' del gen Cyt b mostró un número de nucleótidos constante de 299 nt, el ARNt^{ser} (UCN) varió en su longitud desde 65 nt en el género *Hermeuptychia* a 70 nt en *Taygetis* y *Coeruleotaygetis* y el extremo 3' del ND1 presentó una longitud desde 80 nt en *Cissia confusa*, *Coeruleotaygetis peribaea*, *Magneuptychia alcinoe*, *M. libye*, *M. antonoe* y *Taygetis kerea* a 95 nt en *Hermeuptychia* sp1. Además se obtuvo una región no codificante de hasta 15 nt ubicada entre los genes Cyt b y ARNt^{ser}, reportada por Cameron y Whiting (2008) como espaciador intergénico 5 (Sp5) en *Manduca sexta*.

El número invariante de nucleótidos de Cyt b, posiblemente es ocasionado por la alternación en el producto codi-

Tabla 1. Información de los especímenes usados para el análisis molecular.

Especie	Localidad	Coordenadas	m.s.n.m.*	Genbank
<i>Cithaerias pireta</i> (Stoll, 1780)	Colombia. Antioquia. Porce. Hacienda.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660001
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 45 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU659994
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU659995
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. Hacienda	06°47' N 75°04' W	1000	EU659996
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU659997
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU659998
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU659999
<i>Cissia confusa</i> (Staudinger, 1887)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660027
<i>Cissia pompilia</i> (C. & R. Felder, 1867)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 45 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660002
<i>Chloreuptychia</i> sp.	Colombia. Antioquia. Puerto Berrio. La Carlota.	6°31'00" N 74°26'29" W	150	EU660003
<i>Chloreuptychia</i> sp.	Colombia. Antioquia. Puerto Berrio. La Carlota.	6°31'00" N 74°26'29" W	150	EU660004
<i>Chloreuptychia</i> sp.	Colombia. Antioquia. Puerto Berrio. La Carlota.	6°31'00" N 74°26'29" W	150	EU660005
<i>Coeruleotaygetis peribaea</i> (Godman & Salvin, 1880)	Colombia. Antioquia. Porce. El Encanto.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660000
<i>Hermeuptychia</i> sp1	Colombia. Antioquia. Porce. Caiman.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660028
<i>Hermeuptychia</i> sp1	Colombia. Santander. Cimitarra. El Ecuador.	6°27' N 74°18' W	130	EU660029
<i>Hermeuptychia</i> sp1	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	AY858562
<i>Hermeuptychia</i> sp2	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660031
<i>Hermeuptychia</i> sp2	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 45 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	AY858564
<i>Hermeuptychia</i> sp2	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660033
<i>Hermeuptychia</i> sp2	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660034
<i>Hermeuptychia</i> sp2	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660035
<i>Hermeuptychia</i> sp2	Colombia. Antioquia. Porce. Tenche.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660036
<i>Magneuptychia alcinoe</i> (C. & R. Felder, 1867)	Colombia. Antioquia. Porce. Fosforito.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660007
<i>Magneuptychia</i> sp.	Colombia. Antioquia. Porce. El Encanto.	06°47' N 75°04' W	1000	EU710843
<i>Megeuptychia antonoe</i> (Cramer, 1775)	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660008
<i>Megeuptychia antonoe</i> (Cramer, 1775)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660009
<i>Megeuptychia antonoe</i> (Cramer, 1775)	Colombia. Antioquia. Puerto Berrio. La Carlota.	6°31'00" N 74°26'29" W	1000	EU660010
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. Hacienda.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660011
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. Santa Lucia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660012
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. Santa Lucia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660013
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. Santa Lucia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660014
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. Normandia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660015
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. Caiman.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660016
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660017
<i>Magneuptychia libye</i> (Linnaeus, 1767)	Colombia. Antioquia. Porce. El Encanto.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660018
<i>Pareuptychia metaleuca</i> (Boisduval, 1870)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660019
<i>Pareuptychia metaleuca</i> (Boisduval, 1870)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 13 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660020
<i>Pareuptychia metaleuca</i> (Boisduval, 1870)	Colombia. Antioquia. Porce. San Ignacio 45 ha.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660021
<i>Pareuptychia ocirrhoe</i> (Fabricius, 1776)	Colombia. Antioquia. Porce. Santa Lucia.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660022
<i>Pareuptychia ocirrhoe</i> (Fabricius, 1776)	Colombia. Antioquia. Porce. Fosforito.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660023
<i>Pareuptychia ocirrhoe</i> (Fabricius, 1776)	Colombia. Antioquia. Porce. Fosforito.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660024
<i>Pareuptychia ocirrhoe</i> (Fabricius, 1776)	Colombia. Antioquia. Puerto Berrio. La Carlota.	6°31'00" N 74°26'29" W	150	EU660025
<i>Taygetis kerea</i> (Butler, 1869)	Colombia. Antioquia. Porce. Caiman.	06°47' N 75°04' W	1000	EU660026

* Metros sobre el nivel del mar.

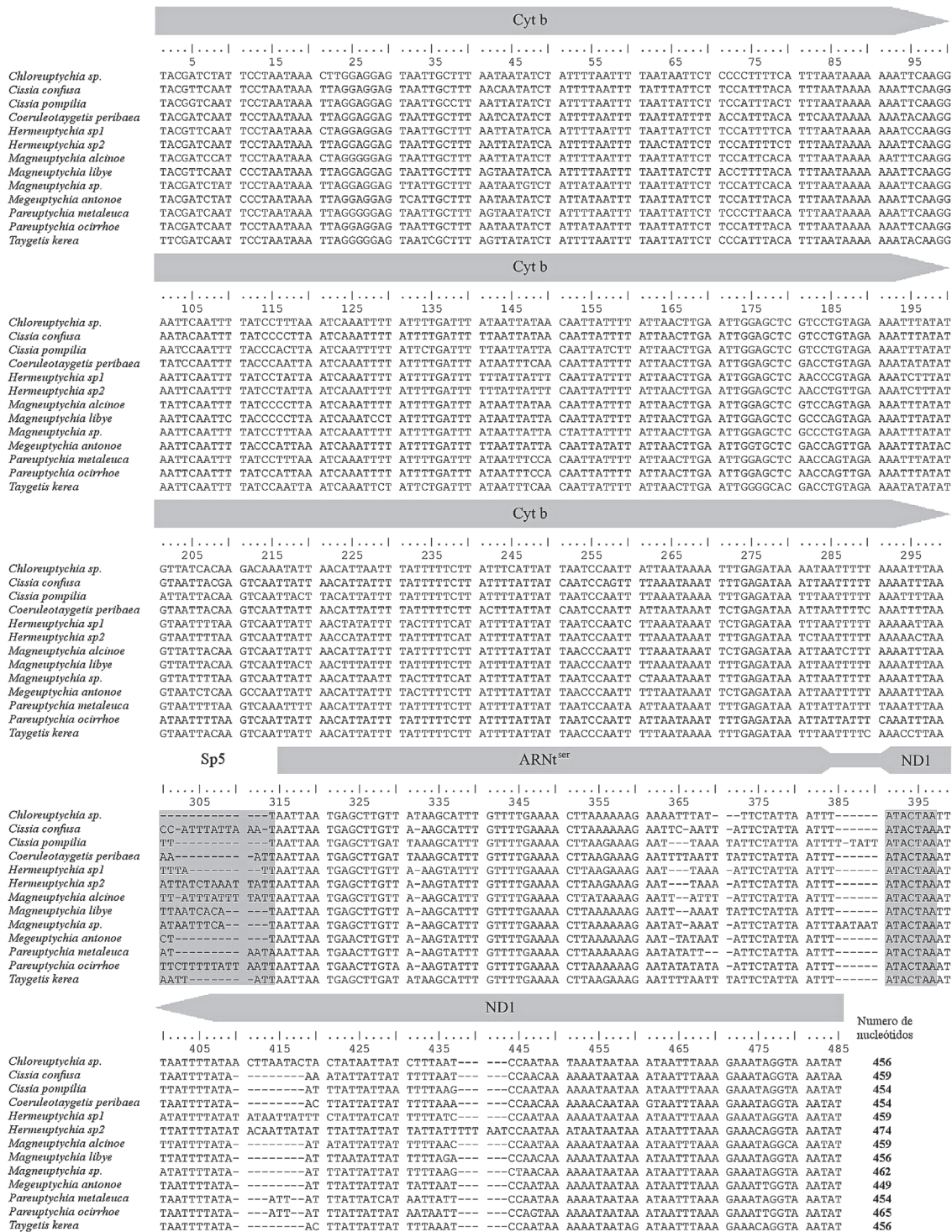


Figura 1. Secuencias de los genes Cyt b + ARNt^{ser} + ND1 en Euptychiina, resaltando con sombreado en gris a Sp5 y la región conservada de reconocimiento del gen ND1.

ficado entre dominios intra y extramembrana, con distintas características funcionales o estructurales que varían entre dominios, causando que el tamaño de la proteína tenga una presión de selección sobre su longitud (Jermin *et al.* 1994; Krajewski y King 1996). En cambio, el extremo 3' del ND1, codifica exclusivamente para aminoácidos estructurales de la proteína, permitiendo la variación de esta región (Videira y Duarte 2001; Dupuis *et al.* 2001; Brandt *et al.* 2003). Igualmente los cambios en la longitud del ARNt^{ser}, concuer-

dan con lo reportado por Vivero *et al.* (2007) en especies de dípteros del género *Lutzomyia*, con variaciones en el número de nucleótidos que no alteran la estructura funcional de la molécula, siendo un gen susceptible a cambios discretos en su longitud.

En promedio las secuencias presentaron un alto contenido de adenina y timina (A+T) que en Cyt b fue de 81,7%, para ARNt^{ser} de 83,3% y en ND1 de 90,7%, correspondiendo con lo encontrado previamente para los genes mitocondriales

Tabla 3. Valores de distancias no corregidas (p).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>Chloreuptychia</i>												
2 <i>Cissia confusa</i>	0,094											
3 <i>Cissia pompilia</i>	0,127	0,092										
4 <i>Coeruleotaygetis peribaea</i>	0,123	0,084	0,108									
5 <i>Hermeuptychia</i> sp.1	0,137	0,107	0,106	0,111								
6 <i>Hermeuptychia</i> sp.2	0,137	0,104	0,119	0,112	0,045							
7 <i>Magneuptychia alcinoe</i>	0,099	0,072	0,096	0,089	0,109	0,107						
8 <i>Magneuptychia libye</i>	0,117	0,083	0,099	0,102	0,119	0,107	0,086					
9 <i>Magneuptychia</i> sp.	0,107	0,099	0,105	0,120	0,118	0,110	0,099	0,106				
10 <i>Megeuptychia antonoe</i>	0,099	0,091	0,111	0,111	0,108	0,119	0,094	0,100	0,095			
11 <i>Pareuptychia ocirrhoe</i>	0,105	0,100	0,128	0,104	0,115	0,117	0,104	0,116	0,107	0,065		
12 <i>Pareuptychia metaleuca</i>	0,100	0,104	0,137	0,104	0,113	0,111	0,095	0,113	0,106	0,087	0,046	
13 <i>Taygetis kerea</i>	0,121	0,106	0,116	0,073	0,109	0,118	0,100	0,119	0,141	0,114	0,110	0,099

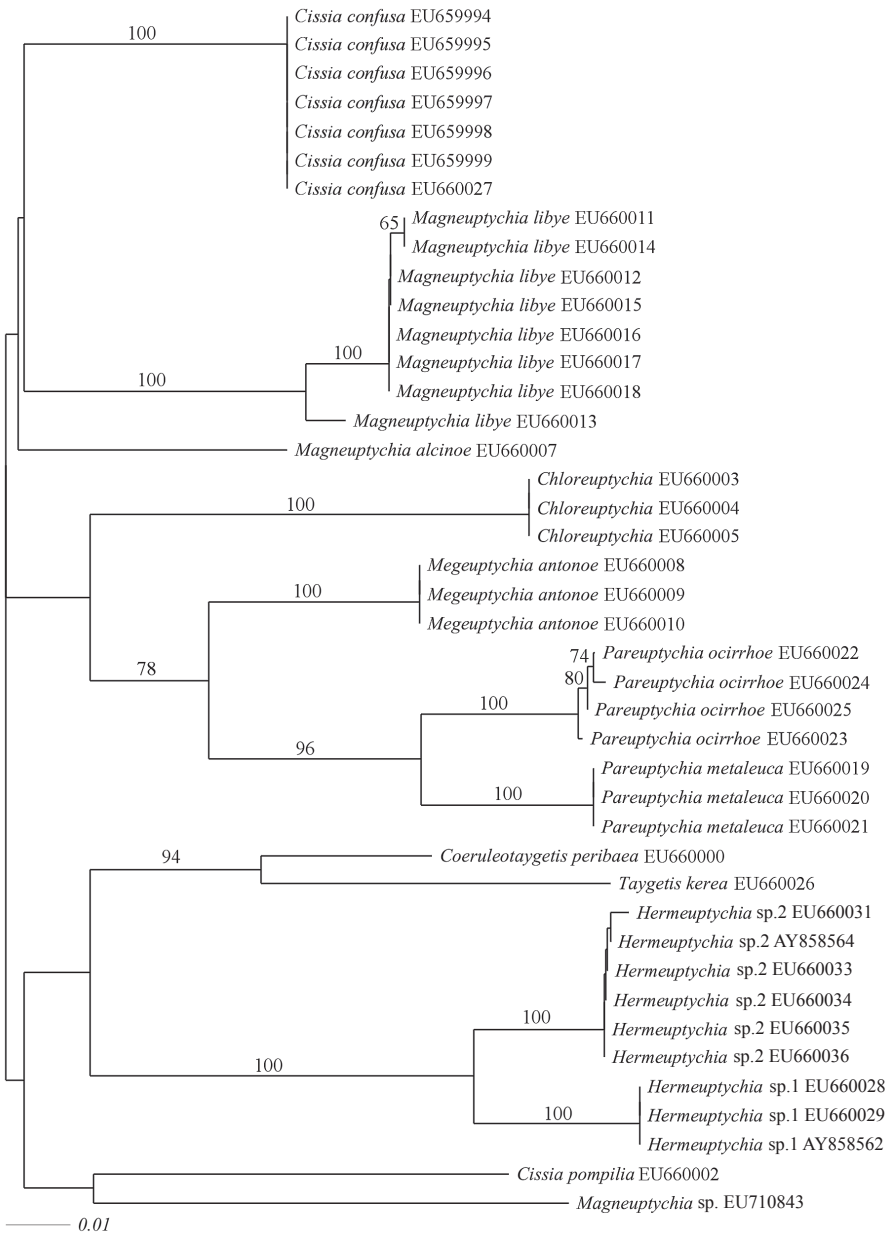


Figura 3. Dendrograma de NJ con el modelo GTR+G y bootstrap de 1000 réplicas, mostrando solo los valores superiores al 50% de las secuencias de Cyt b + ARNt^{scf} + ND1 las 13 especies de Euptychiina.

y composición nucleotídica, con 19 sitios polimórficos que diferencian la mayoría de especies del complejo. Esta variación puede ser explicada por las pocas restricciones funcionales de la molécula debido a la inestabilidad del apareamiento codon/anticodon que ocurre en el genoma mitocondrial, con niveles de variación en los genes de ARN de transferencia 92 veces superiores a los genes nucleares (Pesole *et al.* 1999).

Para el gen ND1, el test de Fisher indica que está sometido a una selección de tipo neutral. Para esta región se observaron 49 sitios polimórficos con 18 sustituciones no sinónimas, siendo la región que proporcionalmente presentó la mayor variabilidad por nucleótido. El análisis de entropía revela que la variabilidad está concentrada en las posiciones 385-390 y 410-445. Comportamiento en el extremo 3' del ND1, ocasionado por la carencia del espaciador 6 (Sp6) entre los genes ND1 y ARNt^{ser}, reportado comúnmente en Lepidoptera (Cameron y Whiting 2008). La ausencia de este espaciador es debida a un cambio del codón de terminación del gen ND1, el cual se encuentra en límites del gen ARNt^{ser} con una superposición de dos nucleótidos entre ambos genes.

El cambio en el codón de parada de ND1 causa la traducción de Sp6, que es verificada por la traducción de la región conservada ATACTAA (Fig. 1) en las posiciones 392 a 398, que normalmente se presenta en Sp6 de Lepidoptera (Cameron y Whiting 2008). Esta región cumple una función esencial para el reconocimiento del gen por la ARN polimerasa (Taanman 1999). Este cambio resultaría en una proteína de mayor longitud en el extremo carboxilo (Fig. 2B) pero que no debe causar alteraciones en la actividad catalítica de la proteína debido a que el extremo carboxilo cumple una función estructural y normalmente se reporta como la región más variable del gen (Videira y Duarte 2001; Dupuis *et al.* 2001; Brandt *et al.* 2003). Estas variaciones en longitud del extre-

mo carboxilo del ND1, permiten diferenciar entre especies morfológicamente muy similares como *Hermeuptychia* sp1 con *Hermeuptychia* sp2 inicialmente identificadas como *H. hermes* (Fabricius, 1775).

Distancias génicas y análisis filogenético. La relación entre transiciones/transversiones (Fig. 2C), mostró un aumento gradual de las tasas de sustitución nucleotídica con respecto a las distancias génicas entre las especies, especialmente de las transversiones, aunque sin presentar saturación de sustituciones. Todo esto sugiere que el fragmento secuenciado es apropiado para el nivel taxonómico al cual se realiza el estudio.

La diferencias nucleotídicas entre géneros variaron de 6,5 a 13,7%, entre especies de 4,5 a 10,6% (Tabla 3) y dentro de las especies de 0 a 1,8%. Resultados similares han sido obtenidos por Torres *et al.* (2001) en complejos de especies de Mycalesina usando el gen COII con diferencias nucleotídicas entre especies hermanas, superiores a un 2,7%; igualmente Yin *et al.* (2007a) en Satyrinae empleando los genes Cyt b y COI reportó una divergencia a nivel interespecífico de 3,5 a 9,7%. Álvarez (2005) en Ithomiinae con secuencias de Cyt b, ARNt^{ser} y ND1 encuentra diferencias intraespecíficas de entre 0 a 2,1% y Murray y Pashley (2005), reportan para Euptychiina con el gen COI, diferencias intergenéricas de entre 4,6 y 16,6% e intragenéricas de 2 y 7,8%.

Los porcentajes de divergencia nucleotídica a nivel intra e interespecífico presentaron una marcada distancia, pero a nivel intergenérico no existe una clara diferenciación, fenómeno particularmente visible entre los géneros y especies de *Magneuptychia* y *Cissia*, donde las diferencias a nivel intra-genérico son de 8,6 a 10,2% en *Magneuptychia* y de 9,2% en *Cissia*, en tanto los porcentajes de divergencia nucleotídica

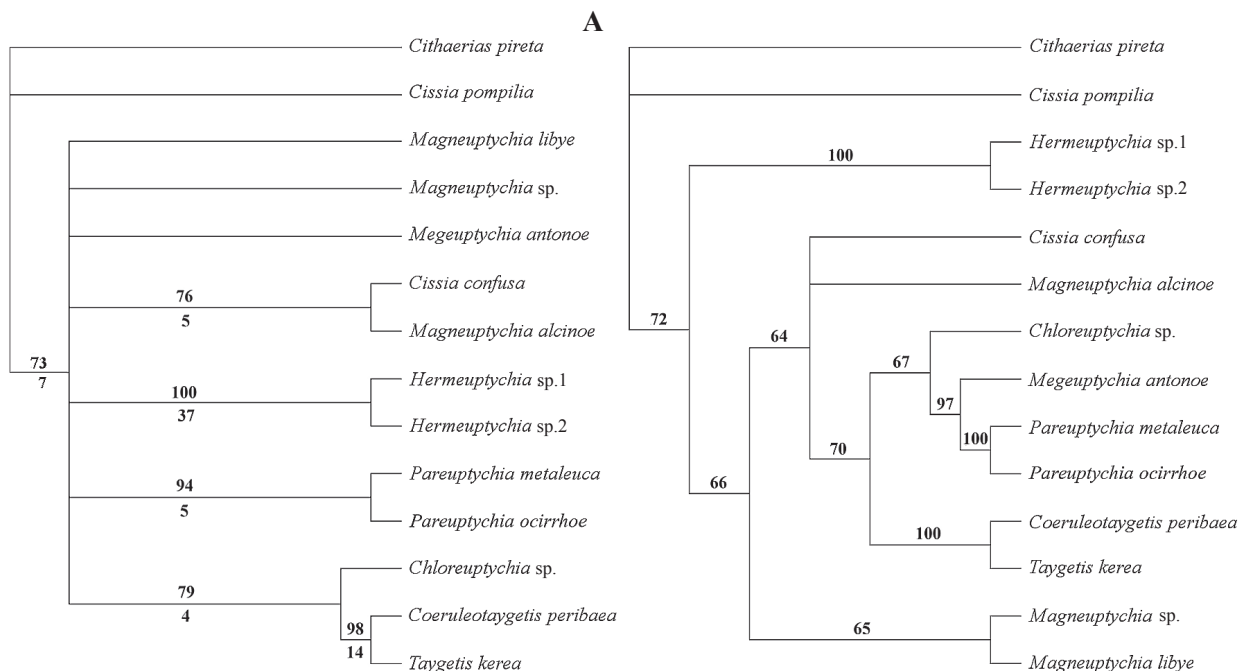


Figura 4. Análisis filogenético con las secuencias de Cyt b + ARNt^{ser} + ND1 de Euptychiina. **A.** Consenso de los dos árboles más parsimoniosos (longitud de 432, CI: 0.6042, RI: 0.4083), soporte de nodos con bootstrap indicado en la parte superior y soporte de Bremer en la parte inferior. **B.** Inferencia Bayesiana con 10.000.000 de cadenas Markovianas y el modelo GTR+G (forma gamma = 0.2030). Se muestran los valores de bootstrap y probabilidad posterior superiores al 50%.

entre estos dos géneros oscilan entre 7,2 a 10,5%. Resultados similares fueron reportados por Murray (2001), para *Cissia penelope* (Fabricius, 1775) con las demás especies de *Cissia*, concordando con la conformación parafilética del clado (Murray 2001; Murray y Pashley 2005).

El modelo de evolución molecular calculado con jModeltest 0.1.1 (Guindon y Gascuel 2003; Posada 2008) correspondió al GTR (General Time Reversible) (Rodríguez *et al.* 1990) con distribución gamma (forma gamma = 1,3060), el cual fue empleado para calcular el dendrograma de NJ (Figura 3). El dendrograma recobra todas las especies incluidas con valores de bootstrap de 100, mostrando la utilidad del fragmento secuenciado para distinguir entre especies. A nivel de género, el dendrograma de NJ agrupa con valores altos de soporte a los géneros *Hermeuptychia*, *Pareuptychia* y confirma los resultados de divergencia nucleotídica, al no diferenciar a *Magneuptychia* y *Cissia*.

Los árboles filogenéticos (Fig. 4), recobran los clados *Pareuptychia* (*P. metaleuca* + *P. ocirrhoe*), *Taygetis* (*C. peribaea* + *T. kerea*) y *Hermeuptychia* (*Hermeuptychia* sp1 + *Hermeuptychia* sp2), siendo igualmente recobrados por Murray (2001) y Murray y Pashley (2005), en estudios previos con características morfológicas de inmaduros y los genes COI y EF-1 α . La posición filogenética de *C. pompilia* dentro de Euptychiina es similar a lo encontrado por Murray (2001) y Murray y Pashley (2005) para *C. penelope*, presentándose como grupo hermano de las demás especies de Euptychiina y distanciadas de las demás especies del género. La posición filogenética de *C. pompilia* y *C. penelope* concuerda con la clasificación desarrollada por Forster (1964) y empleada por Miller (1968) al tratarlas estas dos especies como parte de los géneros *Argyreuptychia* y *Vareuptychia* y no como *Cissia*. La relación entre las especies de *Magneuptychia* y *C. confusa* no se encuentra resuelta y se presenta *Magneuptychia* como un grupo parafilético, con un comportamiento ambiguo en análisis previamente realizados correspondiendo con su posible agrupación artificial propuesta por Murray y Pashley (2005) y Murray (2001), que sugieren reunir al género *Magneuptychia* y *Cissia* "sensu stricto" en único género.

Las relaciones filogenéticas entre géneros no se encuentran resueltas, en gran parte debido al reducido muestreo taxonómico y a la falta de un mayor número de caracteres. El análisis de máxima parsimonia (Fig. 4A) presenta una politomía entre géneros, y el análisis bayesiano (Fig. 4B) obtiene a *Hermeuptychia* como grupo hermano de los demás clados, recobra los clados *Pareuptychia* (*Chloreuptychia* sp + *M. antonoe* + *P. metaleuca* + *P. ocirrhoe*) y *Taygetis* (*C. peribaea* + *T. kerea*) y aunque *Magneuptychia* y *C. confusa* son un grupo no resuelto, se observa que estas especies son hermanas del los clados *Pareuptychia* y *Taygetis*, relación similar reportada por Murray (2001), Murray y Pashley (2005) y Peña *et al.* (2006).

Conclusiones

El fragmento de ADN mitocondrial correspondiente a la región 3' de Cyt b, el gen completo de ARNt^{ser} y el extremo 3' de ND1, muestra ser eficaz para la diferenciación de las especies de Euptychiina. Siendo de utilidad para la diferenciación de especies debido principalmente a que presenta gran variabilidad con un modo de selección de tipo neutral y combina genes con distintas funciones en la mitocondria, brindando independencia a las mutaciones presentes entre las

regiones amplificadas. Características que posibilitan su empleo en estudios de diversidad de mariposas y que mediante la combinación con otros genes comúnmente usados en estudios taxonómicos como el gen COI, permitirían una mayor resolución y confianza a estos análisis.

El presente estudio sugiere la presencia de especies muy similares morfológicamente (crípticas), en algunos géneros de Euptychiina, que pueden ser diferenciadas con la ayuda de datos moleculares. Como es el caso del género *Hermeuptychia* donde inicialmente los ejemplares habían sido identificados como *H. hermes* y a partir del análisis molecular se sugiere la presencia de más de una especie (*Hermeuptychia* sp1 y *Hermeuptychia* sp2), estableciendo la necesidad de aumentar los trabajos taxonómicos y sistemáticos dentro del grupo, empleando herramientas moleculares y morfológicas.

Agradecimientos

Agradecemos a Luz Miryam Gómez por su asistencia en el trabajo de laboratorio, Carlos Federico Álvarez por su colaboración para la obtención de los ejemplares, a Carlos Peña, Blanca Huertas, Ana María Vélez y Alejandro Ramírez por los comentarios realizados y a dos evaluadores anónimos por sus críticas constructivas que enriquecieron el análisis del manuscrito. Este trabajo se realizó con el apoyo de la Dirección de investigaciones DIME, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y André V. L. Freitas agradece a la Fapesp (04/05269-9), al CNPq (300282/2008-7) y a la National Science Foundation (DEB-0527441) por los auxilios financieros.

Literatura citada

- ALBRE, J.; GERS, C.; LEGAL, L. 2008. Molecular phylogeny of the *Erebia tyndarus* (Lepidoptera, Rhopalocera, Nymphalidae, Satyrinae) species group combining CoxII and ND5 mitochondrial genes: A case study of a recent radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 196-210.
- ÁLVAREZ, C. F. 2005. Elementos de estructura genética de poblaciones y de paisaje: una aproximación a la conservación y manejo del área de Porce. Tesis M. Sc. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 106 p.
- BEARD, C. B.; HAMM, D. M.; COLLINS, F. H. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology* 2: 103-124.
- BRANDT, U.; KERSCHER, S.; DROSE, S.; ZWICKER, K.; ZICKERMANN, V. 2003. Proton pumping by NADH: ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism?. *FEBS Letters* 545: 9-17.
- BREMER, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- CAMERON, S. L.; WHITING, M. F. 2008. The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability with butterflies and moths. *Gene* 408: 112-123.
- DAY, J. C.; GOODALL, T. I.; POST, R. J. 2008. Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galeratum* in Britain using molecular taxonomy. *Medical and Veterinary Entomology* 22: 55-61.
- DUPUIS, A.; PRIEUR, I.; LUNARDI, J. 2001. Toward a characterization of the connecting module of complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33 (3): 159-168.

- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FORSTER, W. 1964. Beiträge zur kenntnis der insektenfauna Boliviens XIX Lepidoptera III. Satyridae. Veröffentlichungen der staatsammlung Manchen 8: 51-188. pls. 27-35.
- FREITAS, A. V. L.; PEÑA, C. 2006. Description of genus *Guaianaza* for "*Euptychia*" *pronophila* (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) with a description of the immature stages. *Zootaxa* 1163: 49-59.
- GOLOBOFF, P.; FARRIS, J.; NIXON, K. 2003. T.N.T.: Tree analysis using new technology. Program and documentation. www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- GRADY, P. O.; DESALLE, R. 2008. Out of Hawaii: the origin and biogeography of the genus *Scaptomyza* (Diptera: Drosophilidae). *Biological Letters* 4: 195-199.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (41): 14812-14817.
- JERMIN, L. S.; GRAUR, D.; LOWE, R. M.; CROZIER, R. H. 1994. Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. *Journal of Molecular Evolution* 39: 160-173.
- KASTANIS, P.; ELIOPOULUS, E.; GOULIELMOS, G. N.; TSAKAS, S.; LOUKAS, M. 2003. Macroevolutionary relationships of species of *Drosophila melanogaster* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 518-528.
- KIM, I.; LEE, E. M.; SEOL, K. Y.; YUN, E. Y.; LEE, Y. B.; HWANG, J. S.; JIN, B. R. 2006. The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreana raphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Insect Molecular Biology* 15 (2): 217-225.
- KRAJEWSKI, C.; KING, D. G. 1996. Molecular Divergence and phylogeny: rates and patterns of cytochrome b evolution in cranes. *Molecular Biology and Evolution* 13 (1): 21-30.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 2008. MEGA 4.0: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- LAMAS, G. 2004. Nymphalidae. Satyrinae. Tribe Satyrini. Subtribe Euptychiina, pp. 217-223. En: Lamas, G. (Ed.). Checklist: Part 4A. Hesperioidea – Papilionoidea. En: Heppner, J. B. (Ed.). Atlas of the Neotropical Lepidoptera. Volume 5A. Association for Tropical Lepidoptera/Scientific Publishers. Gainesville. United States of America. 439 p.
- LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88: 577-600.
- MARTIN, J. F.; GILLES, A.; DESCIMON, H. 2000. Molecular phylogeny and evolutionary patterns of the European satyrids (Lepidoptera: Satyridae) as revealed by mitochondrial gene sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15 (1): 70-82.
- MILLER, L. D. 1968. The higher classification, phylogeny and zoogeography of the Satyridae (Lepidoptera). *Memoirs of the American Entomological Society* 24: 1-173.
- MOIN-VAZIRI, V.; DEPAQUIT, J.; YAGHOUBI-ERSHADI, M.; OSHAGHI, M.; DERAKHSHANDEH-PEYKAR, P.; FERT, H.; KALTENBACH, M.; BARGUES, M. D.; NADIM, A. 2007. Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917) (Diptera: Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran. *Acta Tropica* 102: 29-37.
- MONTE-ALEGRE, A.; RAKOTOMALALA, Z.; LEVEUGLE, M.; COULIER, F.; FAURE, E. 2005. Ecological, vertical and elevational distributions of *Heteropsis* (Lepidoptera, Satyrinae) in the rainforest of Masoala (NE Madagascar). *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research* 43 (3): 214-222.
- MURRAY, D. L. 2001. Systematics of neotropical Satyrinae butterflies (Nymphalidae: Satyrinae: Euptychiina) based on larval morphology and DNA sequence data and the evolution of life history traits. Doctor philosophy thesis. Louisiana State University. United States of America. 380 p.
- MURRAY, D.; PASHLEY, D. P. 2005. Molecular phylogenetics and evolutionary history of the neotropical Satyrine Subtribe Euptychiina (Nymphalidae: Satyrinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 67-80.
- NEI, M.; KUMAR, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York. 333 p.
- NYLIN, S.; NYBLOM, K.; RONQUIST, F.; JANZ, N.; BELICEK, J.; LLERSJÖ, M. 2001. Phylogeny of *Polygonia*, *Nymphalis* and related butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a total evidence analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society* 132: 441-468.
- PASHLEY, D. P.; KE, L. D. 1992. Sequence Evolution in Mitochondrial Ribosomal and ND-1 Genes in Lepidoptera: Implications for Phylogenetic Analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9 (6): 1061-1075.
- PEÑA, C.; LAMAS, G. 2005. Revision of the butterfly genus *Forsiterinaria* Gray, 1973 (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae). *Revista Peruana de Biología* 12 (1): 5-48.
- PEÑA, C.; WAHLBERG, N.; WEINGARTNER, E.; KODANDARAMAIAH, U.; NYLIN, S.; FREITAS, A. V. L.; BROWER, A. V. Z. 2006. Higher level phylogeny of Satyrinae butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 29-49.
- PESOLE, G.; GISSI, C.; DE CHIRICO, A.; SACCONI, C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 48: 427-434.
- PFENNIGER, M.; NOWAK, C.; KLEY, C.; STEINKE, D.; STREIT, B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Molecular Ecology* 16: 1957-1968.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- RAND, D. M. 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 415-448.
- RODRÍGUEZ, F. J.; MARÍN, O. A.; MEDINA, J. R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501.
- ROE, A.; SPERLING, F. H. 2007. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. *Molecular Ecology* 16: 3617-3633.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-425.
- STAHL, G.; SAVOLAINEN, E. 2008. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 82-87.
- SCHEFFLER, I. E. 2008. *Mitochondria* 2ed. John Wiley & Sons. Hoboken. New Jersey. United States of America. 462 p.
- SILVA-BRANDÃO, K. L.; AZEREDO, A. M. L.; FREITAS, A. V. L. 2008. New evidence on the systematic and phylogenetic position of *Parides burchellanus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 502-511.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87 (6): 651-701.
- SIMMONS, R. B.; WELLER, S. J. 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (2): 196-210.

- SPERLING, F. 2003. Butterfly molecular systematics: From Species Definitions to Higher-Level Phylogenies, pp. 431-458. En: Boogs, C. L.; Watt, W. B.; Ehrlich, P. R. (Eds.). *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*. University of Chicago Press. London. 692 p.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAANMAN, J. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta* 1410: 103-123.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- TORRES, E; LEES, C. D.; VANE-WRIGHT, R. I.; KREMEN, C.; LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K. 2001. Examining monophyly in a large radiation of Madagascan butterflies (Lepidoptera: Satyrinae: Mycalesina) based on mitochondrial DNA data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20 (3): 460-473.
- URIBE, S. I. 1999. Population structure and speciation in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from mitochondrial ND4 gene. Tesis (Ph. D. Biología molecular). Universidad de Antioquia-Center for Diseases Control. Medellín. Colombia. 73 p.
- VIDEIRA, A.; DUARTE, M. 2001. On complex I and other NADH: ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33 (3): 197-203.
- VILA, M.; BJÖRKLUND, M. 2004. Testing biennialism in the butterfly *Erebia palarica* (Nymphalidae: Satyrinae) by mtDNA sequencing. *Insect Molecular Biology* 13 (2): 213-217.
- VIVERO, R. J.; CONTRERAS-GUTIÉRREZ, M. A.; BEJARANO, E. E. 2007. Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. *Biomédica* 27: 429-438.
- WEINGARTNER, E.; WAHLBERG, N.; NYLIN, S. 2006. Speciation in *Pararge* (Satyrinae: Nymphalidae) butterflies – North Africa is the source of ancestral populations of all *Pararge* species. *Systematic Entomology* 31: 621-632.
- WEISS, H.; FRIEDRICH, T.; HOFHAUS, G.; PREIS, D. 1991. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 197: 563-576.
- XIA, X.; XIE, Z. 2001. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *The Journal of Heredity* 92 (4): 371-373.
- YIN, X.; HAO, J.; XU, L.; ZHU, G.; HUANG, D.; PAN, H.; ZHANG, X. 2007a. Phylogeny of butterflies of the subfamily Elymninae and Satyrinae (Lepidoptera: Satyridae) based on mitochondrial COI and Cyt b gene sequences. *Acta Entomologica Sinica* 50 (12): 1263-1271.
- YIN, X.; HAO, J.; XU, L.; ZHU, G.; HUANG, D.; PAN, H. 2007b. Phylogenetic relationships of butterflies in the subfamily Elymninae (Lepidoptera: Satyridae) based on mitochondrial ND1 and COI gene sequences. *Zoological Research* 28 (5): 477-484.
- YUKUHIRO, K.; SEZUTSU, H.; MASANOBU, I.; SHIMIZU, K.; BANNO, Y. 2002. Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology and Evolution* 19 (8): 1385-1389.
- ZIMMERMANN, M.; WAHLBERG, N.; DESCIMON, H. 2000. Phylogeny of *Euphydryas* checkerspot butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on mitochondrial DNA sequence data. *Annals of the Entomological Society of America* 93 (3): 347-355.

Recibido: 7-nov-2008 • Aceptado: 12-jul-2009