



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

Variación morfológica y molecular del complejo *Chlosyne rosita*

(Lepidoptera: Nymphalidae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. DULCE ABRIL TAPIA SEDEÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Moisés Armando Luis Martínez

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Blanca Estela Hernández Baños

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

Ciudad de México.

MAYO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SISTEMÁTICA

Variación morfológica y molecular del complejo *Chlosyne rosita*

(Lepidoptera: Nymphalidae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. DULCE ABRIL TAPIA SEDEÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Moisés Armando Luis Martínez

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Blanca Estela Hernández Baños

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, Ciudad de México.

MAYO, 2017

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/329/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de marzo de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** del (la) alumno (a) **TAPIA SEDEÑO DULCE ABRIL** con número de cuenta **409091632** con la tesis titulada "**Variación morfológica y molecular del complejo *Chlosyne rosita* (Lepidoptera: Nymphalidae)**", realizada bajo la dirección del (la) **M. EN C. MOISÉS ARMANDO LUIS MARTÍNEZ**:

Presidente: DR. SANTIAGO ZARAGOZA CABALLERO
Vocal: DR. LUIS ANTONIO SÁNCHEZ GONZÁLEZ
Secretario: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN
Suplente: DR. ISMAEL ALEJANDRO HINOJOSA DÍAZ
Suplente: M. EN C. FABIOLA RAMÍREZ CORONA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de abril de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas para realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención y el apoyo de becas mixtas otorgados durante mis estudios de Posgrado.

Al programa de apoyos PAEP 2016 por la beca otorgada para el financiamiento parcial de la estancia de investigación realizada en la Universidad Estatal de Campinas, Brasil.

A los miembros del Comité tutorial, por el apoyo y asesoría que me brindaron durante la realización de este proyecto:

M. en C. Moisés Armando Luis Martínez

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Dra. América NitxinCastañeda Sortibrán

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al M. en C. Armando Luis Martínez por proponerme el proyecto, por darme la libertad de trabajar a mi ritmo y a mi modo, pero sobre todo por la confianza otorgada desde hace ya varios años.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Baños por el apoyo que me brindó desde el principio, por su asesoría en el manejo de mis datos, pero principalmente por ayudarme y ofrecerme una solución cada vez que se me presentó una dificultad durante la elaboración de este trabajo.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona, por su excelente labor como Técnico Académico, por ofrecerme las instalaciones del Taller de Sistemática y Biogeografía para realizar las técnicas de laboratorio, por asesorarme en la obtención de datos genéticos y por revisar minuciosamente mi tesis. Por tu apoyo moral y el cariño que me brindaste siempre
¡Muchas gracias Fabi!

A los miembros del Jurado: Dra. América Castañeda Sortibrán, Dr. Santiago Zaragoza Caballero, Dr. Luis Antonio Sánchez González y Dr. Ismael Hinojosa Díaz por el tiempo invertido en la revisión de mis tesis, así como de las contribuciones aportadas para la mejora de este trabajo.

A la M. en C. Blanca Claudia Hernández Baños por su valiosa ayuda en la disección y estudio de la genitalia masculina de *C. rosita*.

A la M. en C. Nancy Gálvez Reyes por el apoyo que me brindo durante el análisis de mis datos, por enseñarme a usar los programas y por explicarme claramente la finalidad de cada uno de ellos.

Al Dr. André Victor Lucci Freitas por aceptarme en su laboratorio para realizar una estancia de investigación, por asesorarme en los métodos para analizar mis datos y por todas las atenciones que tuvo conmigo durante el tiempo que estuve en la UNICAMP.

Al Dr. José Luis Salinas Gutiérrez por acompañarme a coleccionar, por proporcionarme bibliografía, por revisar mi tesis, pero sobre todo por la gran amistad que hemos podido forjar a lo largo de mi estancia en la colección de mariposas.

Al Biól. Arturo Arellano Covarrubias por el apoyo y la compañía durante mi posgrado, por ser paciente y nunca desesperarse cada vez que le pedí ayuda aunque sea para la cosa más simple. Principalmente por tu amistad ¡Gracias!

A mis amigas Verónica Mendoza Portillo, Ángela Arango Galván y Jovana Martínez Jasso por ser mis compañeras de batalla, por su valiosa ayuda con algunos métodos, por las experiencias compartidas y por el apoyo incondicional ¡Mil gracias!

Dedicatoria

A mi mamá por su amor infinito

A mi papá por su apoyo incondicional

A mis hermanos por su confianza y cariño

A Sebastián y Elías por alegrarme los días

A Ale y Nayhe por acompañarme en mi proceso

A Néstor por ser partícipe de mis mejores momentos

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
Variación en <i>Chlosyne rosita</i> : ¿Adaptación ecológica o divergencia genética?	3
2. ANTECEDENTES	5
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIAL Y METODOS	9
Muestreo y Obtención de datos moleculares	9
<i>Obtención de ejemplares</i>	9
<i>Extracción de DNA</i>	10
<i>Amplificación de genes por PCR y secuenciación</i>	10
<i>Edición y alineamiento</i>	12
Reconstrucción filogenética	12
<i>Máxima Verosimilitud</i>	12
<i>Inferencia Bayesiana</i>	13
<i>Análisis de redes</i>	13
Variación y Estructura Genética:	13
<i>Diversidad Genética</i>	13
<i>Estructura Genética</i> :	14
<i>Red de haplotipos</i>	16
Obtención y estudio de datos morfológicos	16
<i>Descripción del patrón de coloración alar</i>	16
<i>Variación del patrón de coloración entre subespecies</i>	18
<i>Disección de genitales masculinos</i>	18
5. RESULTADOS	19
Reconstrucción filogenética	19
<i>Máxima Verosimilitud</i> :	19
<i>Inferencia Bayesiana</i>	20
<i>Análisis de redes</i>	21
Variación y estructura genética	24

<i>Diversidad genética</i>	24
<i>Estructura genética</i>	25
<i>Red de haplotipos</i>	29
Estudio de datos morfológicos.....	30
<i>Descripción del patrón de coloración alar</i>	30
<i>Variación del patrón de coloración entre subespecies</i>	36
<i>Disección y estudio de genitales masculinos</i>	39
6. DISCUSIÓN.....	44
Reconstrucción filogenética.....	44
Estructura filogeográfica.....	44
Variación y Estructura Genética.....	47
Distribución geográfica de la diversidad genética.....	47
Variación morfológica.....	49
7. CONCLUSIÓN.....	51
8. PERSPECTIVAS.....	52
9. REFERENCIAS.....	53
10. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	61
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Chlosyne rosita</i>	3
Figura 2. Variación del patrón de coloración alar y distribución geográfica de las subespecies de <i>Chlosyne rosita</i>	4
Figura 3. Hipótesis filogenética propuesta por Kons (2000) para la subtribu Chlosyniti.	7
Figura 4. Distribución geográfica de los individuos de <i>Chlosyne rosita</i> analizados genéticamente.	10
Figura 5. Elementos del patrón de coloración y morfología alar en los lepidópteros.	17
Figura 6. Diagrama general de la armadura genital del género <i>Chlosyne</i>	18
Figura 7. Filogenia de <i>Chlosyne</i> a partir de Máxima Verosimilitud con base en los genes EF1- α y COI.	19
Figura 8. Filogenia de <i>Chlosyne</i> a partir de Inferencia Bayesiana con base en los genes EF1- α y COI.	21
Figura 9. Red genealógica sugerida por Splits Tree para el gen mitocondrial COI.	22
Figura 10. Red genealógica sugerida por Splits Tree para el gen nuclear EF1- α	23
Figura 11. Análisis de estructura genética de las poblaciones de los individuos de <i>Chlosyne rosita</i> sugerido por BAPS.	26
Figura 12. Dendograma de distancia genética del gen mitocondrial COI.	27
Figura 13. Correlación entre el índice de diferenciación entre subespecies apareadas (F_{ST}) y su distancia geográfica (Km).	29
Figura 14. Red de haplotipos de <i>Chlosyne rosita</i> con base en el gen COI generada con el programa NETWORK.	30
Figura 15. Patrón de coloración de <i>Chlosyne rosita rosita</i>	31
Figura 16. Patrón de coloración de <i>Chlosyne rosita browni</i>	32
Figura 17. Patrón de coloración de <i>Chlosyne rosita montana</i>	34
Figura 18. Patrón de coloración de <i>Chlosyne rosita riobalsensis</i>	35
Figura 19. Patrón de coloración de <i>Chlosyne rosita mazarum</i>	36
Figura 20. Zona ventral de la armadura genital del Complejo <i>Chlosyne rosita</i>	40
Figura 21. Zona dorsal de la armadura genital del Complejo <i>Chlosyne rosita</i>	41
Figura 22. Zona ventral del phallus del Complejo <i>Chlosyne rosita</i>	42

Figura 23. Morfología del octavo tergito abdominal del Complejo *Chlosyne rosita*..... 43

Figura 24. Filogenia de *Chlosyne* a partir de Inferencia Bayesiana con base en el gen COI.
..... 61

Figura 25. Filogenia de *Chlosyne* a partir de Inferencia Bayesiana con base en el gen EF1-
 α 62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones para la técnica de PCR mediante el kit Phire animal tissue direct (Thermo Scientific).....	11
Tabla 2. Primers utilizados en la estandarización de la técnica de PCR	11
Tabla 3. Diversidad genética de las subespecies de <i>Chlosyne rosita</i>	24
Tabla 4. Valores de diferenciación genética (F_{ST}) entre pares de subespecies de <i>Chlosyne rosita</i>	25
Tabla 5. Valores de K (Numero de grupos) y ϕ_{ST} (Medida de diferenciación genética entre grupos) obtenidos a través del Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA).	27
Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de <i>Chlosyne rosita</i> usando los grupos que generó SAMOVA (K=2).	28
Tabla 7. Variación en la morfología del patrón de coloración alar en las subespecies de <i>Chlosyne rosita</i>	37

RESUMEN

Chlosyne rosita es una mariposa que se caracteriza por presentar un amplio grado de variación en su patrón de coloración alar, la cual es explicada a través de la propuesta de cinco subespecies. El conocimiento acerca de sus relaciones filogenéticas con el resto de los taxones del género *Chlosyne*; así como de las relaciones filogeográficas que existen entre sus subespecies son poco claras; por lo que surgen interrogantes con respecto a su monofilia y a la validez e importancia en términos evolutivos de sus subespecies.

Para responder a estas preguntas se realizó un análisis filogenético a partir de un gen nuclear (EF1- α) y un mitocondrial (COI), que posteriormente fue comparado con los resultados de la variación en el patrón de la coloración alar descritos para *C. rosita*. También se estimaron parámetros de variación y estructura genética para conocer la distribución de la variación genética entre las subespecies. Finalmente se estudió la genitalia masculina como método para evaluar la variación morfológica.

El análisis filogenético concatenado apoya la monofilia del grupo y recupera a tres de las subespecies como grupos monofiléticos. Las relaciones filogeográficas sugieren la formación de dos grupos genéticos dentro de *C. rosita*: uno al Este (*C. r. browni* y *C. r. rosita*) y otro al Oeste/Centro de México (*C. r. montana*, *C. r. mazarum*, *C. r. riobalsensis*). Estos patrones geográficos sugieren la influencia de procesos históricos (principalmente de vicarianza) en la separación de estos linajes. Los análisis de estructura genética reconocen una fuerte diferenciación poblacional entre las subespecies y en el caso del centro de México la diferenciación entre individuos se presentó a escalas geográficas muy pequeñas que se asocian principalmente a factores ecológicos. A partir del estudio de la genitalia masculina, no se observaron diferencias significativas entre las distintas subespecies, por lo que se puede corroborar que todas las formas pertenecen a una misma especie y se destaca que esta estructura no denota una barrera para el entrecruzamiento de las subespecies.

ABSTRACT

Chlosyne rosita is a butterfly characterized by a wide range of variation in the coloration wings pattern, which is explained by the proposal of five subspecies. The knowledge about its phylogenetic relationships with the rest of *Chlosyne* taxa; as well as the phylogeographic relationships among its subspecies are unclear, so the questions about its monophyly, and the validity and importance in evolutionary terms of its subspecies were proposed in this study.

To answer these question a phylogenetic was performed from nuclear (EF1- α) and mitochondrial (COI)genes, then it was compared with the results of the variation in the coloration wingspattern described for *C. rosita*. Also, parameters of variation and genetic structure were estimated to know the distribution of genetic variation between subspecies. Finally, male genitalia was studied to evaluate the morphological variation.

Concatenated phylogenetic analysis supports the monophyly of the group and retrieves three subspecies as monophyletic groups. The phylogeographic relationships suggest the formation of two genetic groups: East Mexico (*C. r. browni*, and *C. r. rosita*), and West/Central Mexico (*C. r. montana*, *C. r. mazarum*, *C. r. riobalsensis*). These geographical patterns suggest the influence of historic processes (mainly vicariance) in the separation of these lineages. Genetic structure analyzes recognize a high population differentiation between subspecies, in the case of central Mexico, differentiation between individuals was presented at very small geographic scales, that are associated mainly with ecological factors. The study of the male genitalia, no significant differences were observed between the different subspecies, so it can be corroborated that all forms belong to the same specie, and it emphasize that this structure does not denote a barrier for interbreeding of subspecies

1. INTRODUCCIÓN

La delimitación de las especies es un tema fundamental dentro de los campos de la Biología (*v. gr.* Ecología, Biogeografía y Conservación), debido a que a través de una evaluación precisa de los límites de las especies se pueden inferir los procesos evolutivos por los cuales surgen nuevas especies (Camargo *et al.*, 2012, Duminil *et al.*, 2012). Sin embargo, la delimitación de las especies puede ser complicada por distintas razones; en primer lugar, debido a que el término “especie” en sí mismo carece de una definición clara, dando como resultado un gran número de conceptos que muchas veces son incompatibles y pueden conducir a conclusiones diferentes en relación con los límites y el número de especies (Sites y Marshall, 2003; De Queiroz, 2005, Hey, 2006). En segundo lugar, debido a las características mismas de los organismos; como en el caso de los complejos de especies, cuya variación continua en los caracteres morfológicos a menudo confunden a los taxónomos que basan sus hipótesis en la morfología, dificultando así el diagnóstico taxonómico de algunos grupos de individuos (Rosell *et al.*, 2010; Duminil *et al.*, 2010).

En el caso de los complejos de especies, la delimitación de sus entidades taxonómicas es de importancia fundamental para abordar preguntas acerca de los procesos evolutivos que sufren los organismos a lo largo del tiempo, los cuales pueden incluir divergencia filogenética reciente, introgresión, alta plasticidad fenotípica, diferenciación de variedades en curso y barreras parciales para el flujo genético entre ecotipos; por lo que para entender la historia evolutiva de este tipo de complejos de especies es necesario el análisis de distintos tipos de evidencias, con los cuales se pueda lograr una visión rigurosa y objetiva de la especie, evitando al mismo tiempo las limitaciones inherentes asociadas a un único tipo de carácter o a un solo tipo de método (Duminil *et al.*, 2012).

Entre los principales caracteres utilizados para la delimitación de especies, se encuentran los morfológicos, debido a que históricamente la similitud fenotípica ha sido el criterio utilizado por los taxónomos para agrupar a los individuos en especies (Duminil y Di Michele, 2009). No obstante, para el caso de los complejos de especies este tipo de caracteres pueden no tener la capacidad para denotar diferencias entre entidades evolutivamente significativas, subdividiendo las especies de manera incorrecta a través de la interpretación inexacta de la diversidad fenotípica natural sobre su distribución (*v. gr.* ecotipos y variedades;

Rannala y Yang 2003; Degnan y Rosenberg, 2009). Una alternativa para este tipo de casos, son los marcadores moleculares, los cuales son universales y en muchos casos son bastante efectivos cuando se requiere comparar linajes con divergencia genética temprana (Rentería-Alcántara, 2007).

Así mismo, existen diferentes métodos para delimitar especies, que al ser combinados con el tipo de marcador genético adecuado aporta una hipótesis mucho más robusta acerca de la historia evolutiva de las especies. Dentro de estos métodos, existen los basados en árboles filogenéticos donde la monofilia y el soporte de las ramas representan los criterios diagnósticos para la delimitación de las especies (Fazekas *et al.*, 2008; Ruiz, 2009). Por otro lado, los métodos que no se basan en árboles filogenéticos se aplican sobre la base de la estimación del flujo genético, incorporando la teoría de la Genética de Poblaciones (Wiens y Penkrot, 2002; Feng *et al.*, 2016). Al hacer inferencias a partir del flujo genético se considera a la especie como un grupo aislado reproductivamente de otros grupos análogos, pero que al interior se compone por un conjunto de poblaciones donde actual o potencialmente existe intercambio genético (Mayr, 1942). No obstante, el flujo genético entre estas poblaciones puede ser interrumpido parcial o totalmente por ciertas barreras (*v. gr.* una fuente ecológica de selección divergente, una barrera geográfica o como un mecanismo genético vinculado) generando un aislamiento reproductivo acumulado que al combinarse con otras fuerzas evolutivas tales como la selección natural o la deriva génica dan lugar a la diferenciación de las poblaciones y potencialmente a la especiación (Kirpatrick y Ravigné, 2002). De acuerdo con el concepto biológico de Mayr (1942) la especiación como producto de esta diferenciación se hace evidente cuando existe un contacto secundario entre las poblaciones diferenciadas y los individuos de éstas no se reproducen entre sí debido al aislamiento reproductivo precigótico o postcigótico que presentan (Rundle y Nosil, 2005; Cerritos-Flores, 2007).

Variación en *Chlosyne rosita*: ¿Adaptación ecológica o divergencia genética?

Chlosyne rosita es un lepidóptero perteneciente a la familia Nymphalidae, tribu Melitaeinae y subtribu Chlosynina (Long *et al.*, 2014). Su área de distribución comprende desde el suroeste de Estados Unidos hasta Costa Rica, mostrando una mayor afinidad hacia las zonas cálidas con vegetación de selva baja caducifolia (Luis-Martínez *et al.*, 2010).

Entre las características más conspicuas que se pueden enunciar de acuerdo con las descripciones de Hall (1924), Higgins (1960) y Kons (2000) se encuentran: alas anteriores con superficie dorsal negra marcada con pequeños puntos blancos en serie y cuatro puntos blancos en la celda discal. Alas posteriores rojas-anaranjadas en su superficie dorsal con un borde ancho y negro en el margen exterior. Presenta escamas naranjas en las patas, mientras que en su zona ventral, el tórax presenta escamas negras dominantes mezcladas en menor proporción con escamas blancas (Figura 1).



Figura 1. Morfología de *Chlosyne rosita*.

C. rosita, presenta caracteres diagnósticos que permiten su separación del resto de las especies del género. No obstante, presenta un amplio grado de variación en el patrón de coloración alarde norte a sur y de este a oeste entre sus poblaciones, por lo que se han documentado estas diferencias a través del reconocimiento de cinco subespecies: *C. r. rosita*, *C. r. browni*, *C. r. riobalsensis*, *C. r. montana*, y *C. r. mazarum* (Figura 2).

Un problema fundamental en la descripción de las subespecies de *C. rosita*, es que se basa únicamente en caracteres morfológicos, asignando los especímenes a diferentes subespecies primordialmente por su patrón de coloración alar y su localización geográfica, dejando de lado la base genética. Con base en lo anterior, actualmente se considera a *Chlosyne rosita* como un complejo de especies dado que la delimitación de sus entidades evolutivas, así como de las relaciones entre éstas es a menudo poco clara y se desconoce si la variación morfológica observada se deba a cierto grado de aislamiento reproductivo o bien, si es producto de adaptaciones ecológicas locales como lo propone Higgins (1960).

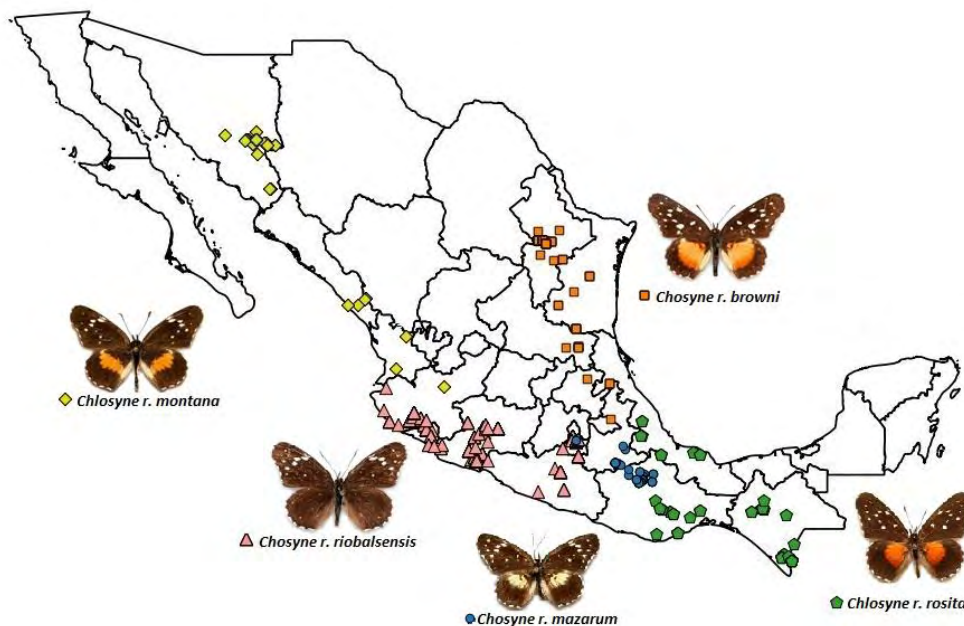


Figura 2. Variación del patrón de coloración alar y distribución geográfica de las subespecies de *Chlosyne rosita*.

2. ANTECEDENTES

La bibliografía referente a *C. rosita* es escasa y se limita en la mayoría de los casos a descripciones taxonómicas que no incluyen información acerca de su historia evolutiva ni de sus relaciones filogenéticas respecto al resto de las especies pertenecientes al género *Chlosyne*.

El primer trabajo que citó al complejo fue el de Hall (1924), quien propuso la existencia de dos nuevos taxones para el género *Chlosyne*: *C. rosita* y *C. lacinia montana*. Para el primer caso, sus observaciones se basan en la presencia de individuos reconocidos inicialmente como *Chlosyne lacinia*, pero que carecían de puntos negros submarginales en el área ventral de alas posteriores en comparación con el resto de los individuos. Al realizar las disecciones de los genitales masculinos de estos ejemplares observó una diferencia muy marcada respecto a los individuos de *Chlosyne lacinia*; por lo que propuso la existencia de una nueva especie a la que denominó *Chlosyne rosita*.

Chlosyne rosita montana fue situada inicialmente dentro de la especie *C. lacinia* por Hall en 1924; propuesta que fue retomada por Higgins (1960). Actualmente esta hipótesis se encuentra fuertemente refutada por los resultados de los análisis filogenéticos basados en caracteres morfológicos realizados por Kons (2000); por lo que este taxón se ubica dentro del complejo *C. rosita*,

En el trabajo de Bauer (1961) se reconocieron dos nuevas subespecies para *Chlosyne rosita*: *C. r. browni* (noreste de México) y *C. r. riobalsensis* (suroeste y centro de México). La propuesta de estas nuevas formas dentro del complejo tiene que ver con el descubrimiento de ejemplares que anteriormente se consideraban como *C. lacinia*, pero que al ser examinados detenidamente se observó que al igual que los miembros de *C. rosita* carecían de puntos submarginales en las alas posteriores y sus genitales masculinos tenían más relación con *C. rosita*.

Miller y Rotger (1979) describieron una nueva subespecie para el complejo a la que denominaron *Chlosyne r. mazarum*. En un principio *C. r. mazarum* fue considerada como una variante de *C. r. riobalsensis* por Roberto de la Maza Ramírez (Miller y Rotger, 1979), debido a que geográficamente presentan áreas de distribución en simpatria (centro de

México). Sin embargo, cuando realizaron la disección de los genitales masculinos, observaron ligeras diferencias entre ambas variantes, además de la presencia de algunos caracteres claramente distintos en el patrón de coloración alar (v. gr. presencia de una banda amarilla/crema en la zona dorsal de las alas posteriores en *C. r. mazarum* y ausente en *C. r. riobalsensis*); por lo que le asignaron la categoría de subespecie a los especímenes analizados.

Una vez realizadas las descripciones morfológicas del complejo, los trabajos subsecuentes acerca de la evolución, sistemática y biogeografía de *Chlosyne rosita* son escasos. Algunos trabajos que incluyen especies de *Chlosyne* en análisis filogenéticos son Higgins (1981), Harvey (1991), Wahlberg y Zimmerman (2000), Wahlberg *et al.*, (2005) y Long *et al.*, (2014), no obstante, en ninguno de estos trabajos se incluyen ejemplares de *Chlosyne rosita*. Únicamente Kons (2000) incluye al complejo y lo propone como un grupo monofilético conformado por cinco especies (Figura 3). De acuerdo con esta hipótesis basada en caracteres morfológicos, *C. janais* es la especie más estrechamente relacionada al complejo dentro de la filogenia del género *Chlosyne* (*C. marianna* es una sinonimia de *C. janais*; Llorente-Bousquets *et al.*, 2006).

En lo que respecta a las relaciones filogenéticas al interior del complejo, en primer lugar reconoce a *C. mazarum* y *C. riobalsensis* como el grupo más cercanamente relacionado (*mazarum+riobalsensis*). A este grupo se le unen *C. r. browni* y *C. montana* como las más cercanas filogenéticamente; sin embargo la relación entre (*mazarum+riobalsensis*), *C. r. browni* y *C. montana* no está resuelta. Finalmente propone a la subespecie *C. r. rosita* como el taxón basal dentro del complejo. Esta hipótesis filogenética contrasta con la asignación taxonómica que se tomó en cuenta para cada uno de los miembros del complejo, dado que inicialmente se consideró como parte del complejo a cuatro especies, una de ellas conformada por dos subespecies (*C. rosita rosita* y *C. rosita browni*), pero de acuerdo con los resultados de Kons (2000) estas subespecies no conforman un grupo estrechamente relacionado por lo que se elevaron a nivel de especie. Este trabajo es el primero en proponer una topología acerca de las relaciones filogenéticas del complejo *Chlosyne rosita*.

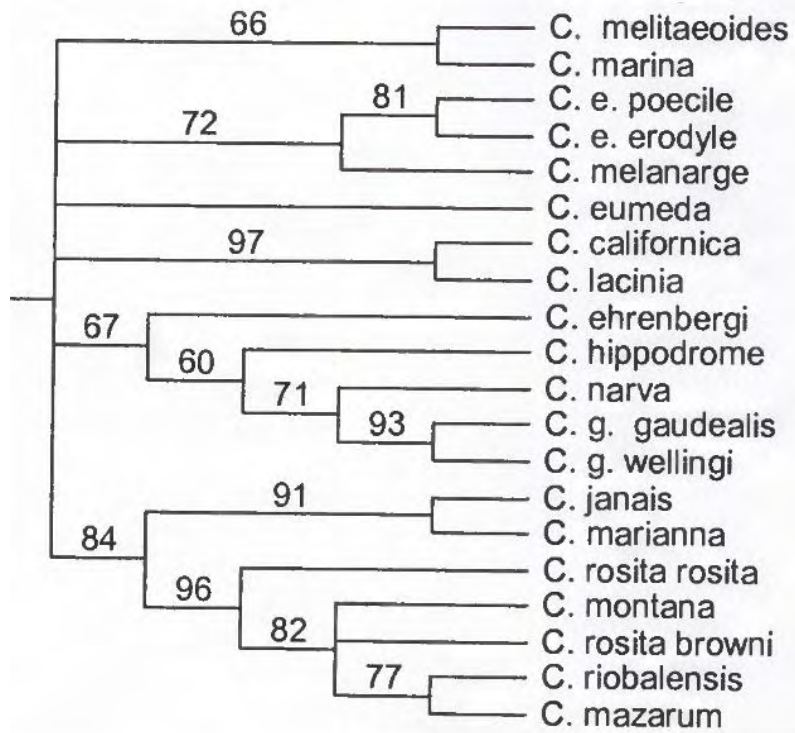


Figura 3. Hipótesis filogenética propuesta por Kons (2000) para la subtribu Chlosyniti.

3. OBJETIVOS

Generales

- Proponer una hipótesis de las relaciones filogenéticas y filogeográficas para el complejo *Chlosyne rosita*.

Particulares

- Conocer la ubicación taxonómica de *C. rosita* en la filogenia del género *Chlosyne*.
- Determinar la presencia de filogrupos a partir de los genes EF1- α (nuclear) y COI (mitocondrial) para el complejo *Chlosyne rosita*.
- En el caso de que existan, contrastar la presencia de estos filogrupos con los patrones de variación morfológica descritos para el complejo.
- Elaborar una hipótesis sobre los posibles procesos históricos y ecológicos que operaron en la divergencia de los filogrupos encontrados.

4. MATERIAL Y METODOS

Muestreo y Obtención de datos moleculares

Obtención de ejemplares. Se realizó una revisión exhaustiva de los ejemplares de *Chlosyne rosita* depositados en la Colección de Lepidoptera del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias, UNAM; de los cuales se obtuvieron 39 individuos pertenecientes a cada una de las cinco subespecies a estudiar. Dado que la mayoría de los individuos a analizar pertenecían a la colección de mariposas y contaban con más de 10 años de antigüedad, se procedió a coleccionar material fresco para comparar la eficiencia de los métodos de laboratorio en la obtención de datos genéticos. Durante los meses de junio a agosto de 2014 y 2015 se realizaron recolectas en el estado de Morelos, en las localidades de Temoac, Cerro de Chalcatzingo y Cañón de lobos. Se eligieron estos sitios de colecta debido a que se ha reportado que en estas localidades converge la distribución de las subespecies *C. r. mazarum* y *C. r. riobalsensis*; sin embargo, únicamente se pudieron obtener seis ejemplares de *C. r. riobalsensis*.

Para preservar adecuadamente el tejido a analizar en el laboratorio, se cortó un par de patas de cada individuo y posteriormente se colocó en un tubo tipo eppendorf, el cual contenía alcohol al 96% a temperatura ambiente. El resto del ejemplar fue colocado en bolsas de papel glassé con sus respectivos datos de ubicación y fecha de colecta.

En total se obtuvieron 45 individuos correspondientes a las cinco subespecies (ver procedencia de cada ejemplar en el ANEXO 1). La ubicación geográfica de los individuos seleccionados se puede observar en la Figura 4.

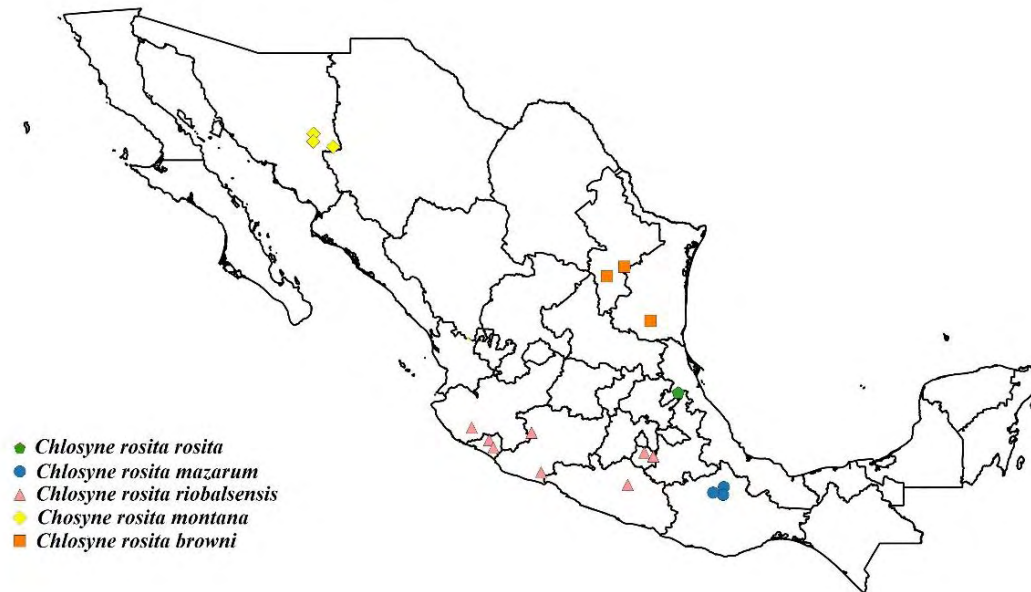


Figura 4. Distribución geográfica de los individuos de *Chlosyne rosita* analizados genéticamente.

Extracción de DNA. La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 45 individuos de *Chlosyne rosita* en el Taller de Sistemática y Biogeografía de la Facultad de Ciencias, UNAM. El tejido procesado se obtuvo a partir de un par de patas de cada individuo siguiendo el protocolo del kit *Master Pure* marca *Epicentre* (modificado por la M. en C. Fabiola Ramírez Corona). Posteriormente se precipitó el DNA con el objetivo de incrementar su calidad y evitar inhibidores de la amplificación. Al término del proceso se procedió a cuantificar la cantidad de DNA midiendo la absorbancia a 260/280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop2000c (*Thermo Scientific*). Las extracciones fueron almacenadas a -20 °C.

Amplificación de genes por PCR y secuenciación. Se utilizaron dos pares de *primers* para secuenciar dos genes: un nuclear (EF-1 α) y un mitocondrial (COI). Se eligieron estos genes porque han demostrado tener una variación importante para resolver preguntas acerca de las relaciones filogenéticas de las especies pertenecientes a la tribu Melitaeini (Wahlberg y Zimmerman, 2000).

Las condiciones de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) siguieron las especificaciones descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones para la técnica de PCR mediante el kit *Phire animal tissue direct* (ThermoScientific).

Reactivo	Concentración Stock	Volumen para una reacción de 20 μ L
ddH ₂ O libre de nucleasas	----	6.6 μ L
2X Phire Animal (Buffer + DNTP's)	----	10 μ L
Primer Forward	0.5 μ M	1 μ L
Primer Reverse	0.5 μ M	1 μ L
Phire Hot Star II (DNA Polimerasa)	----	0.4 μ L
DNA		1 μ L

El programa de amplificación se llevó a cabo en un termociclador *Teche Flexigene Thermal Cycler* y contó con un ciclo de incubación de 98°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos de 98°C de desnaturalización por 20 segundos, una temperatura de alineamiento que varió para cada gen durante 20 segundos, una temperatura de extensión de 72°C por 20 segundos, para finalizar con un único ciclo de 72°C de extensión por un minuto. La Tabla 2, muestra las temperaturas de alineamiento para cada gen amplificado y la secuencia de cada uno de los *primers* utilizados.

Tabla 2. *Primer* utilizados en la estandarización de la técnica de PCR

Gen	Primer	Secuencia (3'→5')	TM (°C)
COI	Jerry (Forward)	CAA CAY TTA TTT TGA TTT TTT GG	50
COI	Pat (Reverse)	ATC CAT TAC ATA TAA TCT GCC ATA	
EF1- α	Cho (Forward)	GTC ACC ATC ATY GAC GC	48
EF1- α	Verdi (Reverse)	GAT ACC AGTCTCAACTCTTCC	

Para verificar el éxito de la amplificación, se realizó la electroforesis de los productos de PCR con un indicador de peso molecular o escalera en geles de agarosa al 1% con un buffer TBE 1X durante una hora a 100 V. Para teñir el producto de PCR se utilizó bromuro de etidio, que posteriormente se visualizó con luz ultravioleta y se fotografió con una cámara digital.

Las reacciones con el peso molecular requerido fueron secuenciadas en la Universidad de Washington y en el Instituto de Biología de la UNAM. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en GenBank (Benson *et al.*, 2005) mediante el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (Blast) para verificar que se tratara del gen amplificado así como del género taxonómico correcto.

Edición y alineamiento. La edición de las secuencias se realizó con el Software Sequencher v5.4.1 (Gen Codes Corporation). El alineamiento automático se realizó con el programa CLUSTAL X (Larkin *et al.*, 2007).

Para determinar las relaciones filogenéticas de *C. rosita* con el resto de las especies pertenecientes al género *Chlosyne*, se emplearon las secuencias de los genes EF1- α y COI utilizadas en los trabajos de Wahlberg y Zimmerman (2000), Wahlberg *et al.* (2003a, b), Wahlberg *et al.* (2005), Leneveu *et al.* (2009) y Long *et al.* (2014) disponibles en GenBank (ver ANEXO 2).

Las secuencias de cada gen fueron alineadas por separado con las pertenecientes al complejo *Chlosyne rosita* mediante el programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Se construyeron dos matrices de genes (COI y EF1- α). Posteriormente se obtuvo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica para cada gen con el programa jModeltest0.1 (Posada, 2008), con base en el criterio de información de Akaike (AIC; Burnham y Anderson, 2004). Finalmente se concatenaron la matrices de los genes con el programa Mesquite 3.1 (Madison y Madison, 2016).

Reconstrucción filogenética

Máxima Verosimilitud. Se obtuvo el árbol de Máxima Verosimilitud utilizando el programa IQ-tree (Trifinopoulos *et al.*, 2016). Para llevar a cabo éste análisis con la matriz concatenada (COI+EF1- α) se calcularon los modelos evolutivos correspondientes para cada gen (TIM2+G para COI y TIM1ef+G para EF1- α), además de establecer las particiones correspondientes (una para cada gen). El soporte de las ramas se calculó con 10.000 réplicas de bootstrap y se realizó la edición del árbol filogenético con el software iTOL v.3 (Letunic y Bork, 2016).

Inferencia Bayesiana. Se estimó el árbol filogenético a partir de la matriz de datos concatenados utilizando el criterio de inferencia bayesiana (IB) mediante el software Mr. Bayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Para este análisis se utilizó el algoritmo de *Reversible Jump* debido a que caracteriza de mejor manera los datos que no son homogéneos (diferentes genes), dado que considera modelos en todo el rango de complejidad (Eastman *et al.*, 2011). El análisis se efectuó bajo los siguientes parámetros: dos cadenas frías y dos calientes en el análisis de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC) durante 10.000.000 de generaciones. La convergencia de las cadenas se analizó por medio de la desviación estándar de frecuencias (datos por debajo de 0.001). El 25% de los árboles estimados (correspondientes al burn-in se descartaron y el árbol consenso de mayoría se generó usando los árboles restantes con probabilidades posteriores para cada nodo. Se editó el árbol con el software iTOL v.3 (Letunic y Bork, 2016).

Análisis de redes. Adicionalmente, se realizó un análisis de redes a través del programa Splits Tree 4.0 (Huson, 1988) para reconstruir la genealogía de los genes COI y EF1- α . Este método reconstruye los árboles filogenéticos transformando los datos evolutivos, es decir; se “descomponen canónicamente” en una suma de “divisiones débilmente compatibles” y luego se representan por un gráfico de divisiones. Este gráfico puede ser considerado como un árbol filogenético. Sin embargo, en sentido más estricto se trata de una red similar a un árbol que puede ser interpretada como una posible evidencia de diferencias y conflictos en las filogenias (Huson, 1988; Xiang *et al.*, 2015).

Variación y Estructura Genética: Con la finalidad de obtener una hipótesis más robusta acerca de las relaciones filogenéticas al interior del complejo, así como de complementar la obtenida mediante la reconstrucción filogenética, se estimaron algunos parámetros de diversidad y estructura genética de las subespecies. El número de individuos utilizados por subespecie, así como su respectiva ubicación geográfica se puede ver en el ANEXO 2.

Diversidad Genética. Se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética a través del programa DnaSP v. 5 (Librado y Rozas, 2009): número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (H), número de mutaciones (M), Diversidad haplotípica (Hd) y Diversidad Nucleotídica (π).

Lo sitios segregantes son aquellos donde se ha sustituido una base por otra cuando se comparan dos secuencias y representan el total de mutaciones. De estos se pueden distinguir los *singletons*, que indican las autapomorfías y los sitios parsimoniosamente informativos. Las autapomorfías son los caracteres derivados únicos no compartidos, mientras que los sitios parsimoniosamente informativos son los caracteres informativos en uno o más taxa (Arnedo, 1999).

La diversidad génica es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar dentro de una población sean distintos (Toro *et al.*, 2009). Esta medida se utilizó como un estimado de la variación genética que existe tanto para cada subespecie como para el total de individuos de *C. rosita*. Puede ser calculada de la siguiente manera (Inicialmente H , pero modificada a H_d por ser haplotipos de mitocondria: diversidad haplotípica).

$$H_d = \frac{2n(1 - \sum P_i^2)}{2n - 1}$$

Dónde: n es el número de individuos muestreados y P_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo.

La diversidad nucleotídica indica el grado de diferencia que existe entre dos secuencias de una población proporcional a la frecuencia de las mismas (Nei, 1987). Para calcularla se usó la siguiente fórmula

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

Dónde: n es el número de individuos, p_i y p_j son las frecuencias de las secuencias examinadas y π_{ij} la proporción de diferencias nucleotídicas entre ambas secuencias (Nei, 1987). Al igual que H_d , la diversidad nucleotídica se calculó para tener un estimado de la variación genética presente en cada subespecie.

Estructura Genética: Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones constituyen la estructura genética (Eguiarte *et al.*, 2015). Para obtener un estimado del patrón

de variación espacial de la diversidad genética de *Chlosyne rosita* se determinó la estructura genética entre sus subespecies. El cálculo se hizo a partir del estadístico F_{ST} o índice de diferenciación poblacional entre cada par de subespecies. Si $F_{ST}=0$, indica que las frecuencias alélicas son idénticas en todas las poblaciones estudiadas o sea que no ha habido diferenciación entre ellas. El máximo posible en la F_{ST} es de 1, al que se llega cuando cada población está fija en alelos diferentes, es decir; son completamente diferentes en las frecuencias alélicas que lo conforman (Eguiarte *et al.*, 2015).

Así mismo, se evaluó el grado de estructura genética existente en las muestras para saber si coincidían con la distribución de las subespecies descritas para el complejo. El análisis se realizó con el programa BAPS 6.0 (Corander *et al.*, 2008). Este software trabaja con base en la inferencia bayesiana considerando a los grupos genéticos como variables aleatorias. Para realizar el análisis de agrupamiento de individuos se utilizó un modelo de mezcla “*admixture*”, con el cual se realizaron 10 corridas independientes, explorando valores para el número de poblaciones (k) de 1 a 20. Se eligió el agrupamiento con mayor probabilidad.

Para conocer la relación entre los grupos formados, se construyó un dendograma usando el método de Neighbor joining con el programa BAPS 6.0.

Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA), el cual simula K grupos de n localidades, identificando barreras genéticas a través del valor de ϕ_{ST} . Este valor representa la proporción total de variación genética debida a las diferencias entre los grupos. El valor más alto de ϕ_{ST} en K grupos genéticos indica la máxima diferencia entre grupos y la mayor similitud dentro de localidades de cada grupo. El análisis se realizó con el programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) especificando 100 condiciones iniciales, donde se exploraron valores desde $K=2$ hasta $K=5$ y se eligió el caso que reportó el valor de ϕ_{ST} más alto.

Con base en los resultados del SAMOVA, se especificaron los grupos correspondientes y se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa Arlequin 3.5.2.2. (Excoffier y Lischer, 2010). La finalidad de este análisis fue corroborar si la distribución geográfica de los individuos tiene alguna influencia sobre el patrón de variación de la distribución genética. Los valores obtenidos fueron utilizados como

indicativos de la magnitud relativa de flujo genético entre las regiones geográficas, entre las subespecies dentro de cada región geográfica y dentro de cada subespecie.

Para observar si existe evidencia de aislamiento por distancia entre las subespecies se realizó una prueba de Mantel con el programa Arlequin 3.5.2.2. (Excoffier y Lischer, 2010). Esta prueba consiste en determinar el grado de significancia que hay entre la correlación de dos o más matrices cuadradas realizando permutaciones. La correlación entre las matrices cuadradas $X=\{X_{ij}\}$ y $Y= \{X_{ij}\}$ está dada por:

$$r_{XY} = \frac{SP(X,Y)}{\sqrt{SS(X).SS(Y)}}$$

Donde SP es el producto de dos matrices cuadradas y SS es la suma de cuadrados de una matriz cuadrada (Excoffier *et al.*, 2007). En este análisis las matrices se construyeron con los valores de F_{ST} y las distancias geográficas pareadas entre subespecies (obtenidas con Google Earth). En el caso de las subespecies que presentan más de una localidad muestreada, se procedió a calcular la distancia promedio entre pares de localidades. Para determinar la significancia se realizaron 10, 000 permutaciones.

Red de haplotipos: A partir de las secuencias del gen mitocondrial COI, se obtuvo la relación haplotípica de los individuos de las diferentes subespecies utilizando el método basado en probabilidades con el algoritmo “Median Joining” a través del programa Network (Bandelt *et al.*, 1999). Se utilizó este programa debido a que sus algoritmos están diseñados para DNA mitocondrial reconstruyendo redes para inferir haplotipos ancestrales y ramificaciones evolutivas.

Obtención y estudio de datos morfológicos

Descripción del patrón de coloración alar. El estudio del patrón de coloración alar se realizó por observación directa de ejemplares depositados en la colección de Lepidoptera del Museo

de Zoología “Alfonso L. Herrera”, MZFC-UNAM. Las fotografías reportadas se obtuvieron de la página “Butterflies of America” (<http://butterfliesofamerica.com>; Warren *et al.*, 2012).

Para la descripción del patrón de coloración y morfología alar, se empleó la terminología del Sistema Comstock-Needham por Comstock (1918), Miller (1970) y Le Crom *et al.* (2004). En la Figura 5, se observan los elementos del patrón de coloración de un lepidóptero: (Izquierda) esquema de acuerdo con la terminología acorde a Le Crom *et al.* (2004), (Derecha) patrón de venación, mostrando la terminología acorde al sistema de Comstock-Nedham: Hu, vena humeral; Sc, vena subcostal; R1, R2, R3, R4, Y R5, de la primera a la quinta ramificación de la vena radial; Rs, vena sector radial; M1, M2 y M3, primera, segunda y tercera ramificación de la vena mediana; CuA1 y CuA2, primer y segunda ramificación de la vena cubital; 2A y 3A, segunda y tercera vena anal; CD, celda discal; Di-S., vena disco celular superior; Di-M., vena disco celular media; Di-I., vena disco celular inferior.

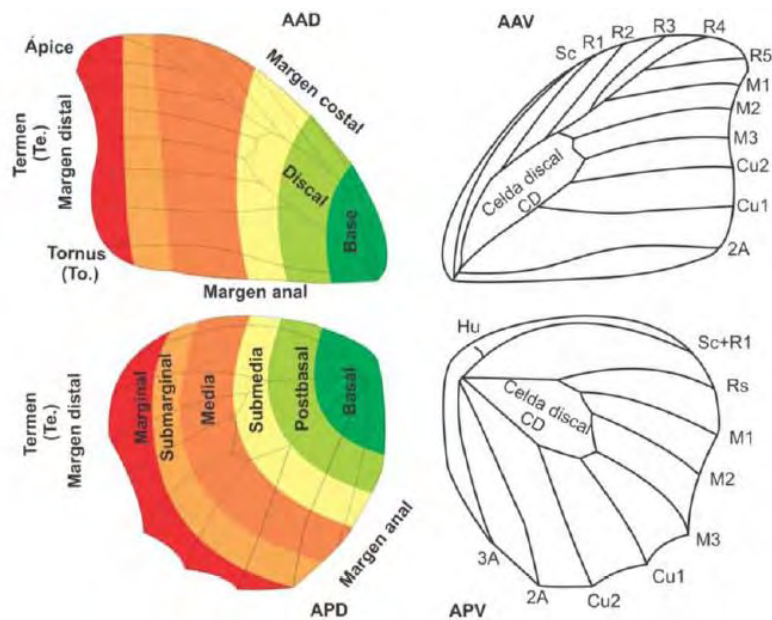


Figura 5. Elementos del patrón de coloración y morfología alar en los lepidópteros (Imagen tomada de Murillo-Ramos, 2014).

Variación del patrón de coloración entre subespecies. Para visualizar las diferencias del patrón de coloración alar, se construyó un cuadro comparativo con las principales variaciones observadas en cada subespecie.

Disección de genitales masculinos. De los 45 ejemplares utilizados para la extracción de DNA, se seleccionaron diez ejemplares machos (dos de cada subespecie) para realizar la genitalia masculina. El proceso se inició con la inmersión de los abdómenes por 12 horas en una solución de KOH al 10%. Se extrajo el genital masculino con la ayuda de unas pinzas de punta fina, a continuación se retiraron los primeros segmentos abdominales cuidando de no dañar las estructuras. Se colocaron en una caja de Petri con agua destilada y se procedió a retirar los cuerpos grasos, tejido conectivo y adherencias hasta dejarlos libres de cualquier residuo. Así mismo, se realizó la limpieza del octavo terguito del abdomen. Una vez extraídas ambas partes del ejemplar se colocaron en cajas de Petri con etanol al 70% para su posterior estudio e ilustración. Además se tomaron fotografías de las estructuras genitales, con una cámara Olympus DP12 integrada a un microscopio SZX12, una cámara Sony Cyber-shot de 7.2 megapíxeles y una Nikon Coolpix p510. Para la descripción de las estructuras disectadas se siguió la terminología empleada por Kons (2000; Figura 6).

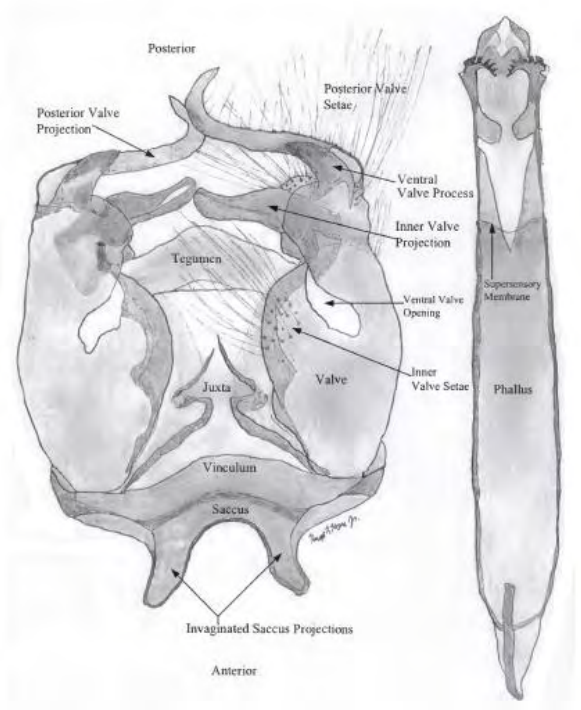


Figura 6. Diagrama general de la armadura genital del género *Chlosyne* (Tomado de Kons, 2000).

5. RESULTADOS

Reconstrucción filogenética

Máxima Verosimilitud: De acuerdo con la topología obtenida a partir de los datos concatenados de los genes COI y EF1- α , se obtuvo que *Chlosyne rosita* es un taxón monofilético, en donde el grupo más cercanamente relacionado se encuentra conformado por las especies *C. janais*, *C. gaudialis* y *C. narva* con un valor de bootstrap=55 (Figura 7).

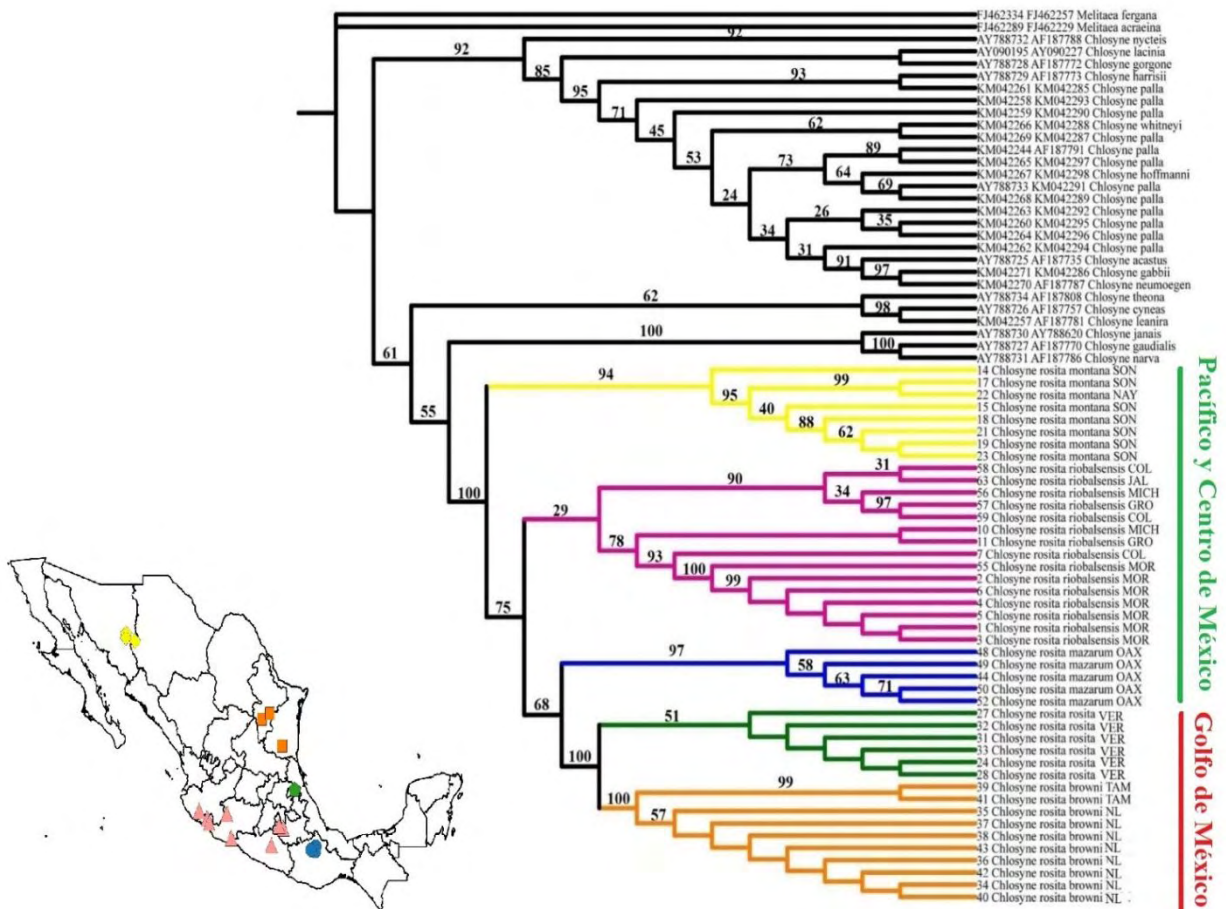


Figura 7. Filogenia de *Chlosyne* a partir de Máxima Verosimilitud con base en los genes EF1- α y COI. Los valores de bootstrap se muestran por encima de las ramas. Los colores de las ramas indican las subespecies de *Chlosyne rosita*: *C. r. montana*, amarillo; *C. r. riobalsensis*, rosa, *C. r. mazarum*, azul; *C. r. rosita*, verde; *C. r. browni*, anaranjado.

Chlosyne rosita conforma un grupo monofilético (bootstrap=100), en donde las subespecies descritas para el complejo forman a su vez grupos monofiléticos. En el caso de *C. r. riobalsensis* y *C. r. rosita* los valores de bootstrap son bajos (29 y 51 respectivamente).

En el árbol filogenético obtenido, se observa que *C. r. rosita* y *C. r. browni* (*rosita-browni*) conforman un grupo cercanamente relacionado, conformando un clado con un fuerte soporte de la rama (100 bootstrap); le sigue *C. r. mazarum* como la más relacionada al clado formado por *rosita-browni* con un soporte de bootstrap=68, después está *C. r. riobalsensis* como el más relacionado al grupo formado por *rosita-browni* + *mazarum*, por último está *C. rosita montana* como el grupo basal con un soporte de 94 de bootstrap.

Inferencia Bayesiana. El árbol bayesiano obtenido a partir de los genes concatenados muestra el mismo resultado que el obtenido en el análisis de Máxima Verosimilitud (Figura 7), recuperando nuevamente la monofilia de *Chlosyne rosita*. No obstante, a diferencia del árbol anterior, el análisis bayesiano muestra que las relaciones filogenéticas con su grupo hermano no están resueltas (Figura 8).

Dentro del complejo, las subespecies *C. r. mazarum*, *C. r. montana* y *C. r. browni* se recuperaron como grupos monofiléticos mostrando valores de probabilidad de 0.95 y 0.99. En contraste, *C. r. riobalsensis* se presenta como un grupo polifilético y los clados que lo conforman muestran valores de probabilidad altos (0.71, 0.86 y 0.97). Por su parte, *C. r. rosita* es un grupo parafilético, dado que en el árbol filogenético incluye a los individuos de *C. r. browni*.

En la Figura 8, se observa que las relaciones al interior del complejo no están resueltas, destacando la formación de dos clados geográficos principales: el primero conformado por las subespecies que se distribuye en la vertiente del Golfo de México (*C. r. browni* y *C. r. rosita*) con un valor de probabilidad=1 y el segundo que comprende a las subespecies distribuidas en la Vertiente del Pacífico y Centro de México (Probabilidad=0.6).

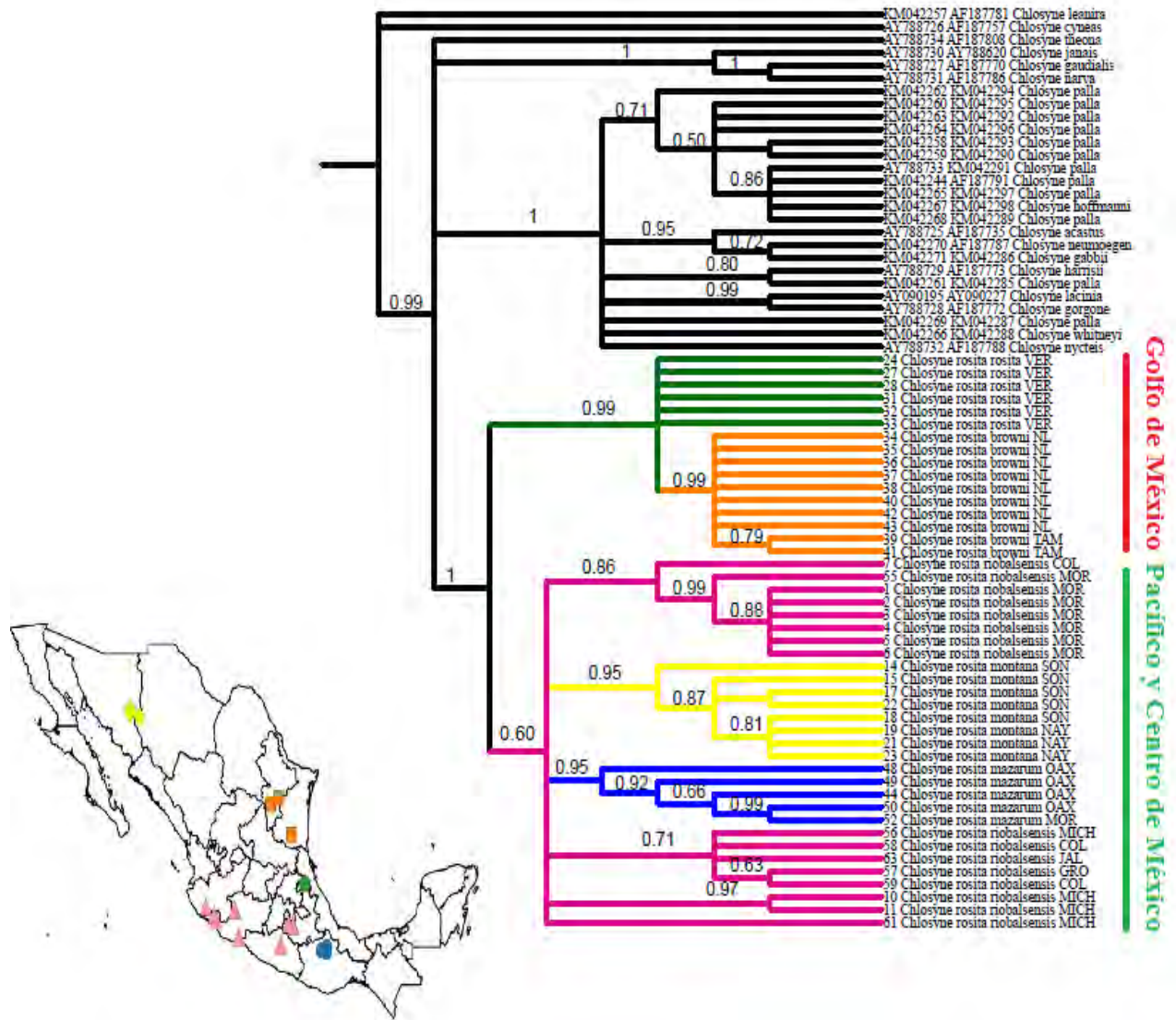


Figura 8. Filogenia de *Chlosyne* a partir de Inferencia Bayesiana con base en los genes EF1- α y COI. Los valores de probabilidad se muestran por encima de las ramas. Los colores de las ramas indican las subespecies de *Chlosyne rosita*: *C. r. montana*, amarillo; *C. r. riobalsensis*, rosa, *C. r. mazarum*, azul; *C. r. rosita*, verde; *C. r. bowni*, anaranjado.

Análisis de redes. De acuerdo con la red construida a partir del gen mitocondrial COI (Figura 9), *Chlosyne rosita* se separa del resto de las especies del género y forma un grupo monofilético en donde la especie más cercana es *Chlosyne leanira*. Dentro del complejo, se observa la presencia de cuatro clados: tres de ellos corresponden a las subespecies *C. r.*

riobalsensis, *C. r. mazarum* y *C. r. montana*, mientras que el cuarto está compuesto por *C. r. rosita* y *C. r. browni*. La ubicación de *C. r. rosita* y *C. r. browni* dentro de un mismo clado concuerda con el resultado obtenido mediante el análisis de Inferencia Bayesiana (Figura 8).

A diferencia de lo que se observa en el árbol de inferencia bayesiana, esta red muestra una relación más clara entre las subespecies del complejo. *C. r. montana* es más cercana a *C. r. riobalsensis* (Vertiente del Pacífico), mientras que *C. r. browni* se agrupa con *C. r. rosita* (Vertiente del Golfo). Por su parte, la relación de *C. r. mazarum* con el resto de las subespecies es correspondiente con su distribución geográfica, debido a que en la red, ésta última se relaciona en mayor medida con las subespecies que se distribuyen contiguamente a ella (*C. r. rosita* y *C. r. riobalsensis*; Figura 9).

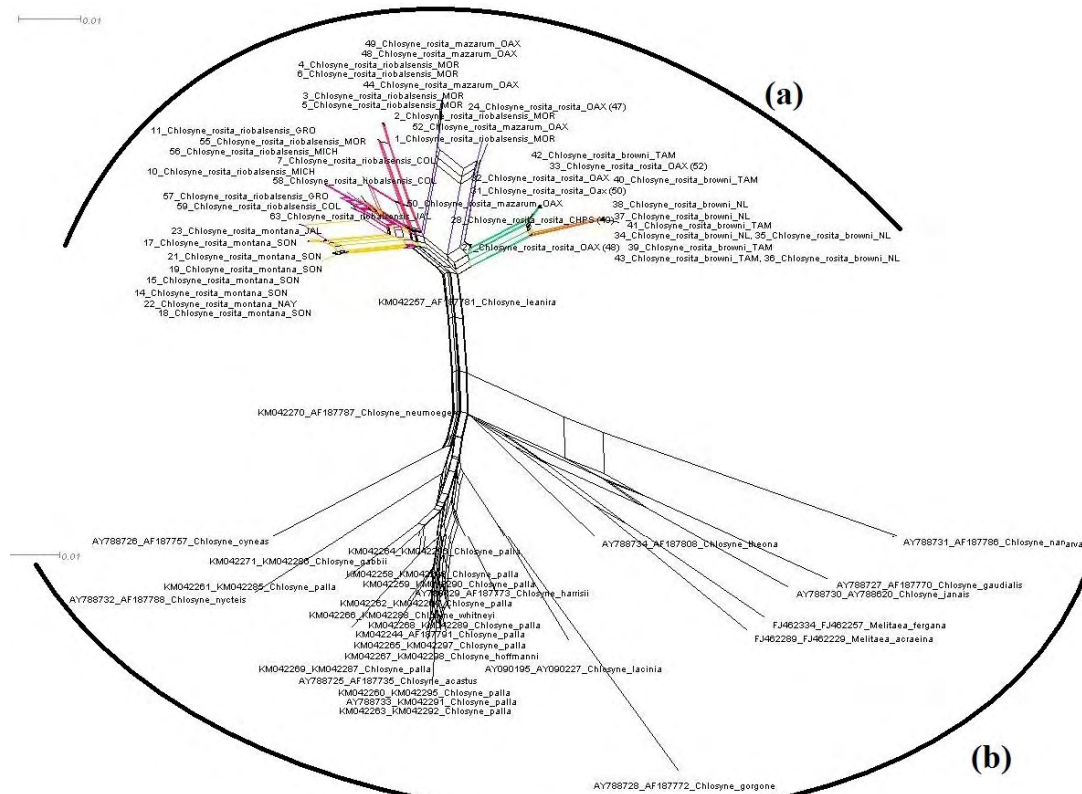


Figura 9. Red genealógica sugerida por Splits Tree para el gen mitocondrial COI. La curva (a) indica el grupo conformado por *Chlosyne rosita* y la curva (b) indica los grupos externos. Los colores dentro de la curva (a) indican las subespecies: amarillo, *C. r. montana*; rosa, *C. r. riobalsensis*; azul, *C. r. mazarum*; verde, *C. r. rosita*; anaranjado, *C. r. browni*.

En lo que se refiere a la red obtenida con el gen nuclear EF1- α , únicamente se destaca la presencia de un grupo monofilético formado por *Chlosyne rosita*, que se separa del resto de las especies del género. Debido a que el gen no presentó variación entre subespecies, las relaciones al interior del complejo no son claras, destacando la presencia únicamente de dos filogrupos los cuales no presentan correspondencia con su distribución geográfica. El primer grupo está conformado por individuos de *C. r. riobalsensis* y el segundo por el resto de las subespecies pertenecientes al complejo (Figura 10).

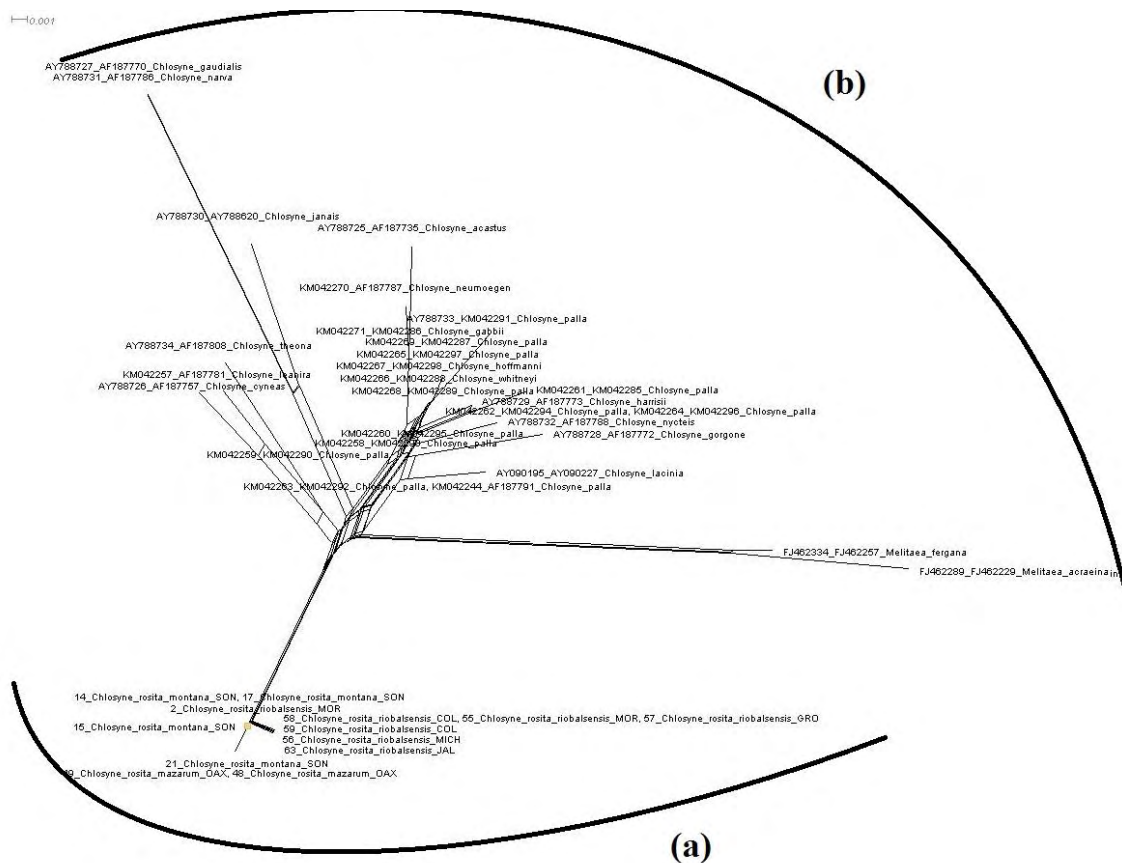


Figura 10. Red genealógica sugerida por Splits Tree para el gen nuclear EF1- α . La curva (a) indica el grupo conformado por *Chlosyne rosita* y la curva (b) indica los grupos externos.

Variación y estructura genética

Diversidad genética. Debido a que el gen nuclear EF1- α no mostró variación entre los diferentes individuos analizados. Los siguientes resultados únicamente corresponden al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

Se secuenciaron 488 bases del gen mitocondrial COI, para un total de 44 individuos pertenecientes a las cinco subespecies del Complejo *Chlosyne rosita*. Se encontraron 21 haplotipos con 34 sitios segregantes (S) y 34 mutaciones totales (Tabla 3).

La Tabla 3 muestra los índices de diversidad para todo el complejo *Chlosyne rosita* ($Hd=0.931$ y $\pi=0.0243$). Respecto a la diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (Hd) calculada para cada subespecie se observó que *C. r. riobalsensis*, *C. r. montana* y *C. r. mazarum* (distribuidas en la vertiente del Pacífico y Centro de México) son las que presentan mayores índices de diversidad con valores de $\pi= 0.1319$, 0.1172 y 0.01025 y $Hd=0.848$, 0.857 y 0.9 respectivamente. En contraste, las subespecies presentes en la Vertiente del Golfo de México se caracterizan por tener valores de diversidad haplotípica y nucleotídica bajos: *C. r. browni* ($\pi=0.00073$ y $Hd=0.356$) y *C. r. rosita* ($\pi=0$ y $Hd=0$). Los valores de cero en *C. r. rosita* indican que todas las secuencias analizadas son iguales.

Tabla 3. Diversidad genética de las subespecies de *Chlosyne rosita*.

Subespecie	N	S	H	M	<i>Hd</i>	π
<i>C. r. riobalsensis</i>	15	13	9	13	0.848	0.1319
<i>C. r. montana</i>	8	6	5	6	0.857	0.1172
<i>C. r. rosita</i>	6	0	1	0	0	0
<i>C. r. browni</i>	10	1	2	1	0.356	0.00073
<i>C. r. mazarum</i>	5	11	4	11	0.9	0.01025
Total	44	34	21	34	0.931	0.02433

N= Número de individuos en la muestra, S= Número de sitios segregantes, H= Número de haplotipos, M= Número de mutaciones, *Hd*= Diversidad haplotípica, π = Diversidad nucleotídica

Estructura genética. En la tabla 4 se observa que todos los valores de F_{ST} se encuentran por encima de 0.5, siendo los grupos *C. r. montana/C. r. browni* y *C. r. montana/C. r. rosita* los que presentan mayor diferenciación en sus frecuencias alélicas con un valor de $F_{ST}=0.929$ y 0.918 respectivamente. Las más parecidas en sus frecuencias alélicas son los conjuntos *C. r. riobalsensis/C. r. mazarum*, *C. r. riobalsensis/C. r. montana* y *C. r. rosita/C. r. browni* con valores de F_{ST} de 0.558, 0.573 y 0.563 respectivamente; por lo que se infiere que ha existido un menor grado de diferenciación genética entre ellas.

Tabla 4. Valores de diferenciación genética (F_{ST}) entre pares de subespecies de *Chlosyne rosita*.

Subespecies	<i>C. r. riobalsensis</i>	<i>C. r. montana</i>	<i>C. r. rosita</i>	<i>C. r. browni</i>	<i>C. r. mazarum</i>
<i>C. r. riobalsensis</i>	0				
<i>C. r. montana</i>	0.57329	0			
<i>C. r. rosita</i>	0.66871	0.91882	0		
<i>C. r. browni</i>	0.78317	0.92960	0.56336	0	
<i>C. r. mazarum</i>	0.55807	0.76430	0.85394	0.89835	0

El análisis de BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure; Corander *et al.*, 2008) mostró que los individuos de *Chlosyne rosita* se agrupan en seis conjuntos, en donde la asignación de los individuos de *C. r. montana*, *C. r. rosita*, *C. r. browni* y *C. r. mazarum* corresponde con el grupo asignado por el análisis. Sin embargo, para los individuos de *C. r. riobalsensis*, el programa divide a la subespecie en dos poblaciones distintas (Figura 11).

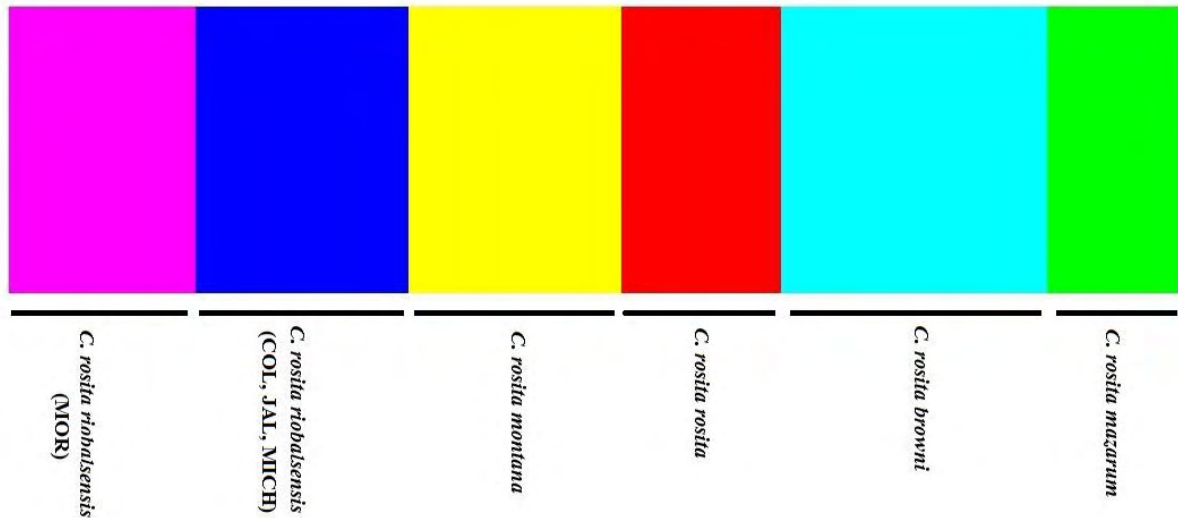


Figura 11. Análisis de estructura genética de las poblaciones de los individuos de *Chlosyne rosita* sugerido por BAPS. Los colores representan los grupos formados (K=6).

El dendograma obtenido a partir de los grupos formados por BAPS, muestra dos grupos principales: el primero formado por las subespecies que se distribuyen en la vertiente del Pacífico (*C. r. montana* y *C. r. riobalsensis*) y en el Centro de México (*C. r. riobalsensis* MOR y *C. r. mazarum*) y el segundo conformado por las subespecies que se encuentran en la Vertiente del Golfo (*C. r. rosita* y *C. r. browni*). Dentro del grupo del Pacífico y Centro de México, las poblaciones más parecidas de acuerdo con su distancia genética son las pertenecientes a *C. r. riobalsensis*, posteriormente se agrupa *C. r. montana* y finalmente *C. r. mazarum* (Figura 12).

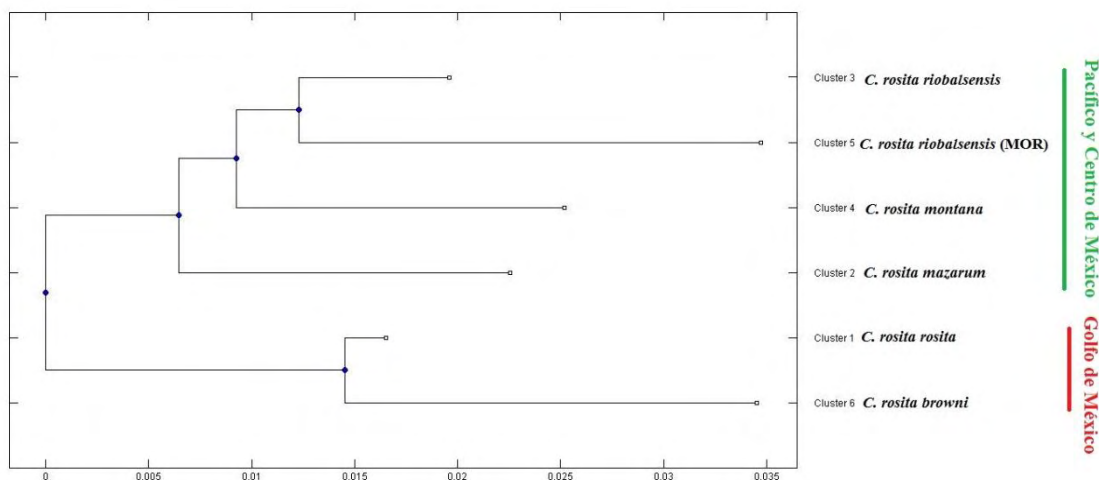


Figura 12. Dendrograma de distancia genética del gen mitocondrial COI. Las terminales representan los grupos formados en el análisis de BAPS.

Con base en el análisis de varianza molecular espacial (SAMOVA), se encontró que el valor de K que maximiza la ϕ_{ST} (análogo de F_{ST}) es 2. El primer grupo quedó conformado por las subespecies *C. r. rosita* y *C. r. browni*, que son las que se distribuyen a lo largo de la vertiente del Golfo de México, mientras que el segundo grupo quedó conformado por las subespecies que se distribuyen en la Vertiente del Pacífico y el centro de México (*C. r. riobalsensis*, *C. r. montana* y *C. r. mazarum*) (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de K (Numero de grupos) y ϕ_{ST} (Medida de diferenciación genética entre grupos) obtenidos a través del Análisis de Varianza Molecular Espacial (SAMOVA).

K	ϕ_{ST}	Grupos
2	0.93081	Grupo 1: <i>C. r. rosita</i>, <i>C. r. browni</i> Grupo 2: <i>C. r. riobalsensis</i>, <i>C. r. montana</i>, <i>C. r. mazarum</i>
3	0.92608	Grupo 1: <i>C. r. rosita</i> , <i>C. r. browni</i> Grupo 2: <i>C. r. riobalsensis</i> , <i>C. r. montana</i> , <i>C. r. mazarum</i> Grupo 3: <i>C. r. riobalsensis</i> (Mor)
4	0.92167	Grupo 1: <i>C. r. rosita</i> , <i>C. r. browni</i> Grupo 2: <i>C. r. riobalsensis</i> , <i>C. r. mazarum</i> Grupo 3: <i>C. r. riobalsensis</i> (Mor) Grupo 4: <i>C. r. montana</i>

5	0.92018	Grupo 1: <i>C. r. rosita</i> , <i>C. r. browni</i> Grupo 2: <i>C. r. riobalsensis</i> Grupo 3: <i>C. r. riobalsensis</i> (Mor) Grupo 4: <i>C. r. montana</i> Grupo 5: <i>C. r. mazarum</i>
---	---------	--

La Tabla 6 muestra que de los grupos que se sometieron al análisis de varianza molecular (Vertiente del Pacífico-Centro de México y Vertiente del Golfo), se obtuvo que la diferenciación entre subespecies fue alta ($F_{ST}=0.805$) explicando un porcentaje alto de varianza dentro del complejo (42.36%), mientras que la diferenciación entre regiones (Golfo y Pacifico-Centro) fue intermedia con una $F_{CT}=0.413$ explicando un 38.17% de la variación presente en todos los individuos. Así mismo se puede observar, que la diferenciación entre los individuos de cada subespecie explica el menor porcentaje de la variación genética en el complejo (19.47%).

Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de *Chlosyne rosita* usando los grupos que generó SAMOVA (K=2).

Fuente de Variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Componentes de varianza		Porcentaje de varianza
Entre regiones	1	100.497	3.20024	Va	38.17
Entre subespecies dentro de regiones	3	91.155	3.55177	Vb	42.36
Dentro de subespecies	39	63.667	1.63248	Vc	19.47
Total	43	255.318	8.38449		100
F_{SC}		0.81962		$P=0.00000+-0.00000$	
F_{ST}		0.80530		$P=0.00000+-0.00000$	
F_{CT}		0.41303		$P=0.04008+-0.00586$	

La Figura 13 muestra los resultados de la prueba de Mantel donde se observa una correlación positiva pero no significativa ($r=0.280$; $P=0.440$) para los individuos de *C. rosita* entre las distancias geográficas (Km) y la diferenciación genética (F_{ST}).

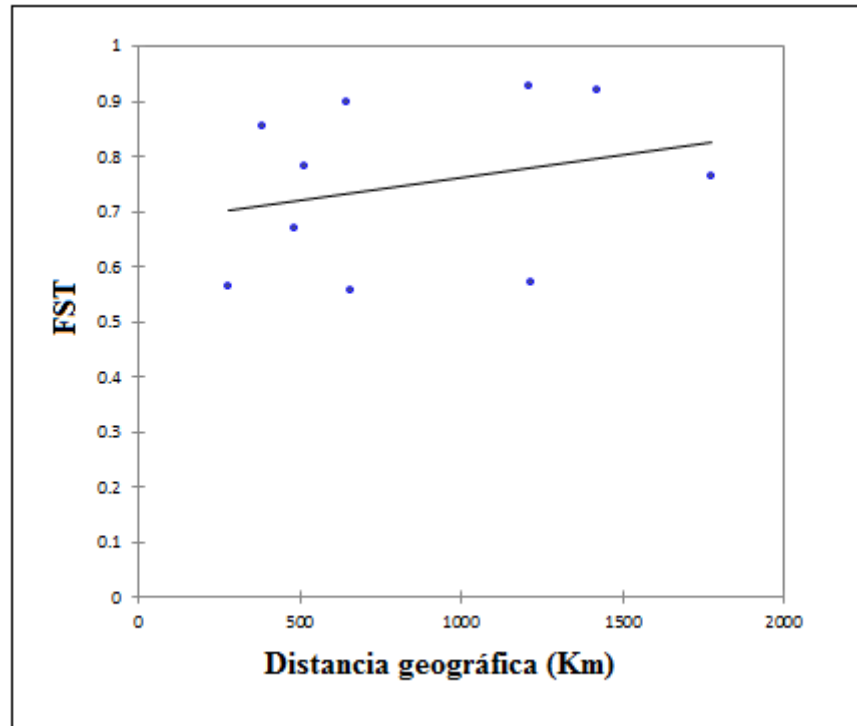


Figura 13. Correlación entre el índice de diferenciación entre subespecies pareadas (F_{ST}) y su distancia geográfica (Km).

Red de haplotipos. La red de haplotipos construida a partir del gen mitocondrial COI muestra una correspondencia geográfica entre los haplotipos y las subespecies, separando los haplotipos distribuidos en la vertiente del Pacífico con el centro de México de los haplotipos del Golfo de México (Figura 14). Estos dos grupos se encuentran separados por siete pasos mutacionales, además de la presencia de un haplotipo hipotético.

En contraste a los haplotipos que se distribuyen en la Vertiente del Pacífico y Centro de México, los distribuidos en el Golfo de México son menos diversos, encontrándose únicamente tres haplotipos diferentes (H9, H10 y H11). Además, en la red se puede observar que se encuentran unidos con un menor número de pasos mutacionales respecto a los del Pacífico y Centro de México y no se observa la presencia de haplotipos hipotéticos entre

ellos. Respecto a los haplotipos pertenecientes a la Vertiente del Pacífico y Centro de México, se observa que existe un grado mayor de variación en las secuencias al encontrarse 18 haplotipos, los cuales se encuentran unidos por un número alto de pasos mutacionales, donde en ocasiones se nota la presencia de tres haplotipos hipotéticos, que en ocasiones pueden ser considerados como ancestrales o no muestreados.

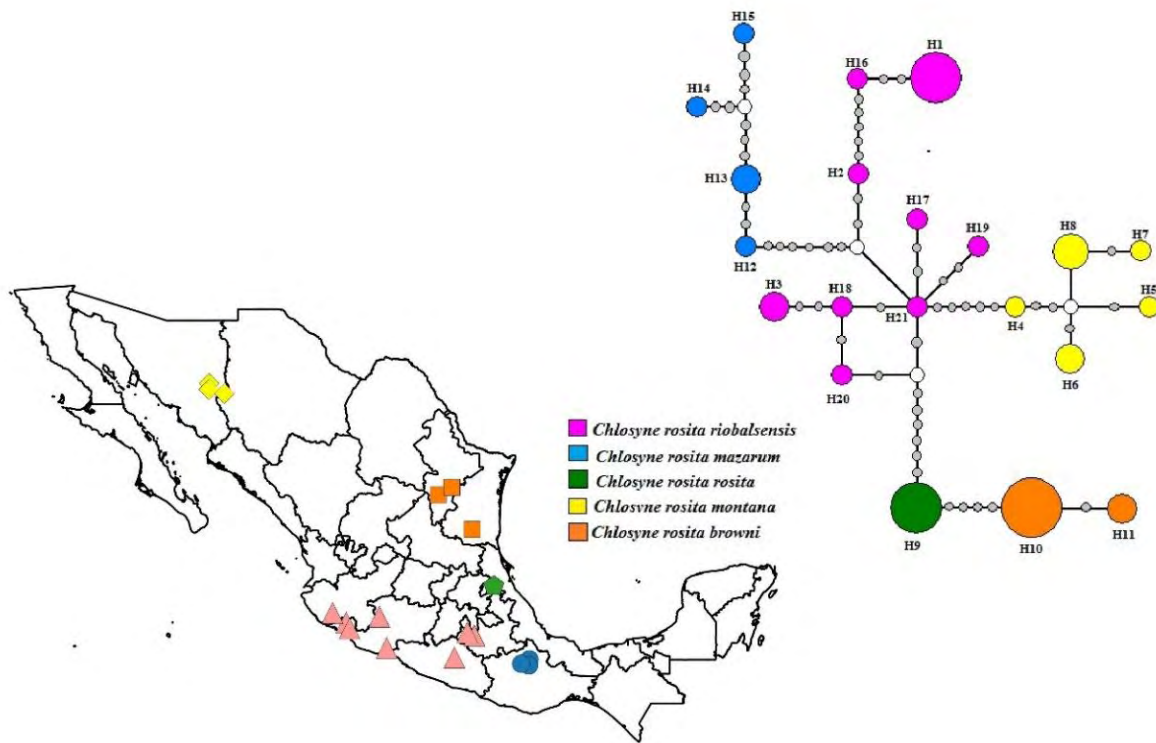


Figura 14. Red de haplotipos de *Chlosyne rosita* con base en el gen COI generada con el programa NETWORK. Los colores representan las subespecies y el tamaño del círculo representa la frecuencia del haplotipo.

Estudio de datos morfológicos

Descripción del patrón de coloración alar.

Chlosyne rosita rosita. Es la única subespecie con un parche o banda media naranja en la zona dorsal de las alas posteriores (Figura 15).

Descripción detallada: Las alas anteriores y posteriores en su vista ventral y dorsal presentan mayoritariamente escamas negras con una serie de puntos blancos en el margen distal.

Las alas anteriores, en su zona ventral y dorsal presentan puntos blancos que varían en tamaño y forma abarcando la mayor parte de la estructura alar (desde la vena Sc hasta la Cu1 incluida la celda discal). Ventralmente, la celda basal costal por lo general es negra, pero ocasionalmente presenta un parche de escamas color crema. Los machos tienen las alas anteriores más alargadas en relación con las hembras.

Dorsalmente, las alas posteriores presenta una prominente banda media o parche color naranja oscuro que abarca desde la vena Cu2 hasta MI incluida la celda discal CD (ocasionalmente se extienden hasta la vena R1 como un diminuto parche). Rodeando a la banda media, se localiza una banda naranja submarginal más oscura de tamaño y forma similar a la que se encuentra en *C. janais*. Ventralmente, las alas posteriores tienen la banda media en la misma posición que en la zona dorsal, pero color crema y presentan un parche naranja en la zona postbasal de la celda Cu2 que se separa de la banda media por una fila completa o casi completa de escamas negras de ancho variable. Las bandas del sistema de simetría son distintas en relación al color crema del parche basal. A diferencia de las otras subespecies, las celdas anales ventrales son a menudo predominantemente negras en lugar de color crema.



Figura 15. Patrón de coloración de *Chlosyne rosita rosita*: a) zona dorsal, b) zona ventral.

Chlosyne rosita browni. Se diferencia de *C. r. rosita* por el color de la banda media dorsal de las alas posteriores: en *C. r. browni* es color crema rodeado por una banda naranja claro (Figura 16).

Descripción detallada: Las alas anteriores tienen características similares a *C. r. rosita*, con excepción de los puntos blancos en la parte dorsal y ventral de las alas anteriores, los cuales tienden a ser más grandes en *C. r. browni*, sin embargo, esta característica no siempre se cumple.

La banda media dorsal de las alas posteriores y el parche basal son de tamaño comparable a *C. r. rosita*, excepto que el color es diferente (naranja oscuro en *C. r. rosita* y naranja/crema con un borde naranja claro en *C. r. browni*). La zona ventral de las alas posteriores tiene una banda de tamaño y forma similar a la de la zona dorsal, pero varía en el color de la banda media (en este caso es crema), y se rodea de un parche naranja claro que se ubica en la región media/submarginal abarcando desde la vena 3A a la M1. En la región basal de las alas anteriores se presentan parches negros, mientras que en su región submarginal se observan una serie de puntos blancos que rodean a la banda media.

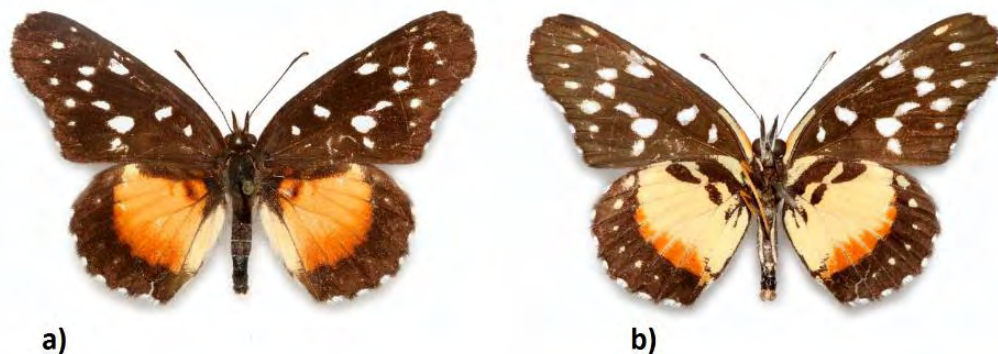


Figura 16. Patrón de coloración de *Chlosyne rosita browni*: a) zona dorsal, b) zona ventral.

Chlosyne rosita montana. La diferencia más importante entre *C. r. montana* y *C. r. browni* es el color y tamaño de la banda media dorsal de las alas posteriores; en *C. r. montana* es

amarillo/naranja, similar a la que se presenta en *C. r. rosita*, mientras que en *C. r. browni* es más clara y de mayor tamaño (Figura 17).

Descripción detallada: Dorsal y ventralmente las alas anteriores tienen las mismas características que las subespecies del este de México (*C. r. rosita* y *C. r. browni*), sin embargo, *C. r. montana* cuenta con un menor número de puntos blancos que ocasionalmente se encuentran reducidos, siendo más visibles en la zona dorsal que en la ventral. Comparado con las subespecies anteriores, estos puntos se extienden en una mayor proporción de las alas (desde la vena Sc a la 2A).

Dorsalmente las alas posteriores tienen un parche amarillo (mucho más reducido que en el resto de las subespecies) que va de la región postbasal a la media, mientras que en su región basal se observa un parche de menor tamaño compuesto por escamas negras. Rodeando al parche naranja, en la región marginal/submarginal se localiza una banda negra que presenta puntos blancos en el margen distal.

En la superficie ventral de las alas posteriores, se observa una banda crema que abarca la región submedia y media y generalmente se encuentra rodeada por una delgada fila de escamas naranjas que va desde la vena 3A a la Cu1. La proporción de la superficie negra de la zona basal ventral de las alas posteriores es muy similar a la proporción presente en la superficie dorsal. Se observa un parche negro que abarca la región basal y postbasal de las alas posteriores y una franja negra que rodea al parche medio con pequeños puntos blancos en serie en el margen distal.

Las hembras tienen las alas posteriores más alargadas que las hembras de las otras subespecies, mientras que los machos tienen el ala posterior más alargada que las subespecies de *C. r. mazarum* y *C. r. riobalsensis*



Figura 17. Patrón de coloración de *Chlosyne rosita montana*: a) zona dorsal, b) zona ventral.

Chlosyne rosita riobalsensis. Es la única subespecie donde las alas posteriores en su vista dorsal son completamente negras, a excepción de los puntos blancos localizados en el margen distal (Figura 18).

Descripción detallada: Ventral y dorsalmente las alas anteriores son mayoritariamente negras con un menor número de puntos blancos en relación al resto de las subespecies. Así mismo, la proporción alar ocupada por estos puntos es menor abarcando desde la vena Sc a la Cu1, pero únicamente en la región media, submarginal y marginal de las alas. Dorsalmente, las alas anteriores presentan un mayor número de puntos blancos y de mayor tamaño comparado con la zona ventral.

Las alas posteriores en su vista dorsal únicamente presentan escamas negras, con excepción de los puntos blancos en serie que se localizan en el margen distal. Ventralmente, el color de las alas posteriores es mayoritariamente negro, pero presentan una pequeña proporción de escamas blancas que se evidencian por la presencia de pequeños puntos en la región submarginal y en el margen distal. Ocasionalmente se presenta un pequeño parche rojo en la región submarginal de las alas posteriores, que va desde la vena 3A a la Cu2.

Ningún sexo tiene las alas anteriores particularmente alargadas pero el ápice de las alas anteriores es ligeramente más prolongado en los machos que en las hembras.

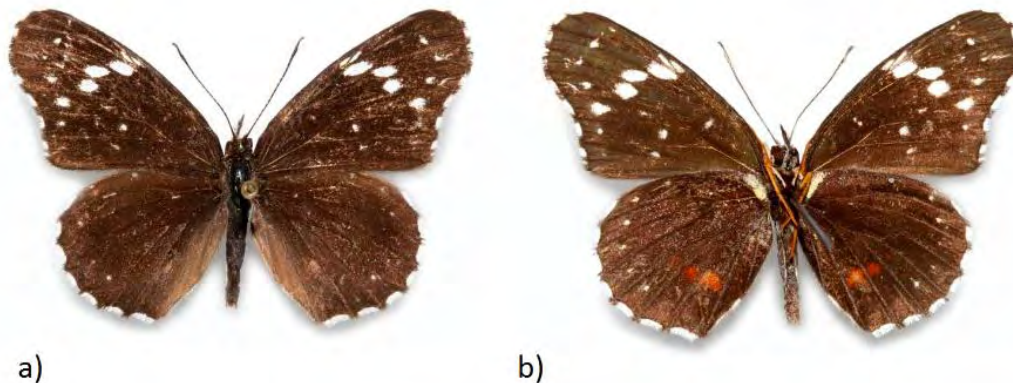


Figura 18. Patrón de coloración de *Chlosyne rosita riobalsensis*: a) zona dorsal, b) zona ventral.

Chlosyne rosita mazarum. Las diferencias observadas entre *C. r. mazarum* y *C. r. riobalsensis* es que *C. r. mazarum* tiene una parche crema pálido/amarillo en la zona dorsal de las alas posteriores y en la zona ventral presenta un parche crema comparable a la subespecie *C. r. montana* (Figura 19).

Descripción detallada: Dorsal y ventralmente, las alas anteriores presentan puntos blancos con una distribución y tamaño similar a *C. r. riobalsensis*, pero abarcan una mayor proporción de la superficie alar que incluye las regiones media, submarginal y marginal desde la vena Sc a la Cu1. Al igual que en el resto de las subespecies, los puntos blancos en el margen distal de las alas posteriores y anteriores están presentes.

Las alas posteriores en su vista ventral tienen un parche o banda media color crema en la región media/submedia, y basalmente presentan un parche negro de menor tamaño. La forma y tamaño del parche crema es muy similar a la de *C. r. montana*, pero se diferencian en el color. Ventralmente se observa un parche color crema de mayor tamaño que en la superficie dorsal y se separa claramente de la zona basal por una superficie negra. Al igual que en *C. r. riobalsensis*, un pequeño parche rojo es visible y va desde la vena 3A a la Cu1, además de una serie de puntos blancos que rodean a la banda media en la región submarginal.

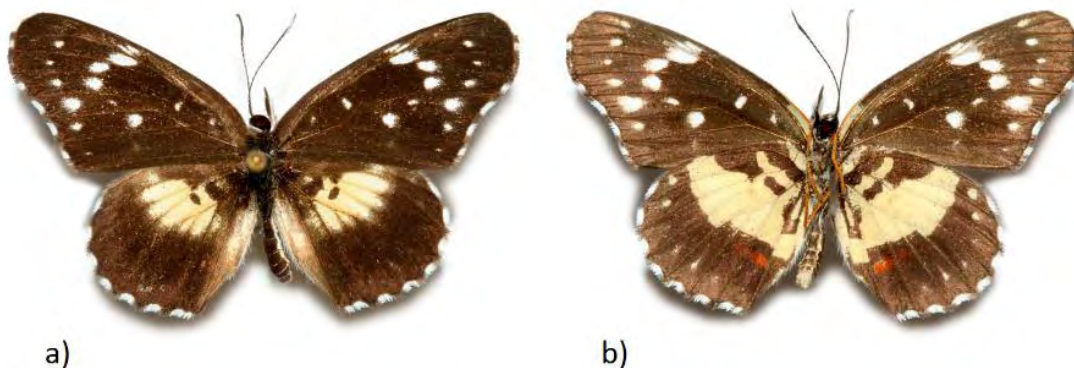







Figura 19. Patrón de coloración de *Chlosyne rosita mazarum*: a) zona dorsal, b) zona ventral.

Variación del patrón de coloración entre subespecies. El carácter más variable entre subespecies es la banda media de las alas posteriores, tanto en su vista ventral como en su vista dorsal (ver Tabla 7). Así mismo, es notable que las subespecies distribuidas en la Vertiente del Golfo (*C. r. rosita* y *C. r. boweni*) son más parecidas entre sí, presentando un menor grado de variación en cuanto a la forma y coloración de la banda media (dorsal y ventral). Por su parte las subespecies que se distribuyen en el Centro de México y en la Vertiente del Pacífico (*C. r. montana*, *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum*) son más variables entre sí. Es preciso mencionar que aunque existen claras diferencias entre subespecies, también existe una variación significativa entre los individuos pertenecientes a una misma subespecie, principalmente en el tamaño y forma de los puntos blancos de las alas anteriores (v. gr. *C. r. mazarum*).

Tabla 7. Variación en la morfología del patrón de coloración alar en las subespecies de *Chlosyne rosita*

Subespecie/ Carácteres	<i>C. r. rosita</i> 	<i>C. r. browni</i> 	<i>C. r. montana</i> 	<i>C. r. riobalsensis</i> 	<i>C. r. mazarum</i> 
Puntos blancos en la región dorsal y ventral de las alas anteriores y posteriores	Presentes de la región discal a submarginal, con excepción de las celdas Cu1 y 2A	Presentes de la región discal a la submarginal, desde la vena Sc a la 3A. Son de mayor tamaño que en <i>C. r. rosita</i>	Presentes de la región media a submarginal, desde la vena Sc a la 2A. Están reducidos en tamaño, pero se presentan en mayor número. Son más visibles en la vista dorsal que en la ventral.	Presentes en la región media a submarginal, desde la vena Sc a la Cu1. Tamaño y forma similar a <i>C. r. montana</i> . Menor número de puntos respecto al resto de las subespecies.	Presentes de la región discal a submarginal, desde la vena Sc a la Cu1. Forma y tamaño muy variable entre los individuos.
Tamaño de las alas anteriores	Más alargadas en machos que en hembras	Mismo tamaño en machos que en hembras	Mismo tamaño en machos que en hembras	Ápice más alargado en machos que en hembras	Ligeramente más alargadas en machos que en hembras
Alas posteriores en vista dorsal, con presencia de una banda media	Naranja oscuro que abarca desde la Vena Sc+R1 hasta la 3A (región basal-media)	Naranja/crema con un borde naranja claro desde la Vena Sc+R1 hasta la 3A (región basal-submarginal)	Amarilla fuerte que abarca desde la Vena Sc+R1 hasta la 3A (región postbasal-media)	No presenta banda media	Crema desde la vena Sc+R1 hasta la 3A (región submedia-media)
Alas posteriores en vista ventral, con presencia de una banda media	Crema, con la misma posición que la vista dorsal con pequeños parches negros en la región basal	Crema, con la misma posición que la vista dorsal. Presenta parches negros y alargados en la región basal y postbasal. Los parches son de	Crema, con la misma posición que la vista dorsal. Presenta un parche negro y alargado en la región basal y postbasal. El parche es de mayor tamaño respecto a <i>C. r. browni</i> . Ocasionalmente	No presenta banda media	Crema, desde la región basal a media. Presenta parches negros y alargados en la región basal y postbasal.

		mayor tamaño respecto a <i>C. r. rosita</i>	se presenta un pache crema en la región basal.		
Alas posteriores en vista ventral con parche submarginal	Uno ó dos, con forma redonda, naranja oscuro. Presente en la celda Cu2	Uno con forma largada, naranja claro. Presente desde la vena 3A a la M1	Uno con forma alargada, naranja claro. Presente desde la vena 3A a la Cu1	Dos ó tres con forma redonda, rojo/naranja oscuro. Presentes desde la vena 3A a la Cu1	Uno con forma alargada, rojo/naranja oscuro. Presente desde la vena 3A a la Cu2
Alas posteriores en vista ventral, con puntos blancos en serie en la zona submarginal	Visibles desde la vena Sc+R1 a la M1	Visibles desde la vena Sc+R1 a 3A	Visibles desde la vena Sc+R1 a 2A	Visibles desde la vena Sc+R1 a Cu2	Visibles desde la vena Sc+R1 a 2A

Disección y estudio de genitales masculinos

Caracteres de la valva. Las valvas se encuentran separadas ampliamente en la región ventral, extendiéndose hacia el lado posterior ventral en forma alargada y estrecha en las subespecies *C. r. rosita*, *C. r. browni* y *C. r. montana*, mientras que en *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum* se observan valvas más ensanchadas y con el borde lateral curvado. Desde una vista dorsal, las cinco subespecies presentan sedas en el borde lateral interno de las valvas, así como proyecciones ventrales huecas orientadas hacia la parte interna de la cápsula en dirección del tegumen. Estas proyecciones tienen el extremo distal más esclerosado que el resto de la estructura en todos los individuos examinados, sin embargo, la longitud de estas proyecciones es variable observándose un menor tamaño en *C. r. riobalsensis*.

La región anterior de cada valva presenta sedas que asemejan a pelos en todas las subespecies, no obstante, el número y longitud de éstas es variable; ejemplo de ello es *C. r. browni*, que tiene una menor cantidad de sedas en comparación con el resto de las subespecies. El proceso interno de la valva es entero, con paredes delgadas y con el extremo distal acuminado y más esclerosado, se encuentra orientado hacia la parte interna de la cápsula, formando una curva cóncava si se observa desde una posición ventral; no se observa variación en la forma, pero sí en la longitud, presentando un menor tamaño en *C. r. riobalsensis* (Figura 20).

Caracteres del tegumen. En las cinco subespecies, el tegumen carece de proyecciones y se encuentra reducido a un puente delgado y esclerosado entre las valvas. Presenta variación en el grosor dado que en *C. r. rosita* y *C. r. browni* es más delgado comparado con las otras tres subespecies.

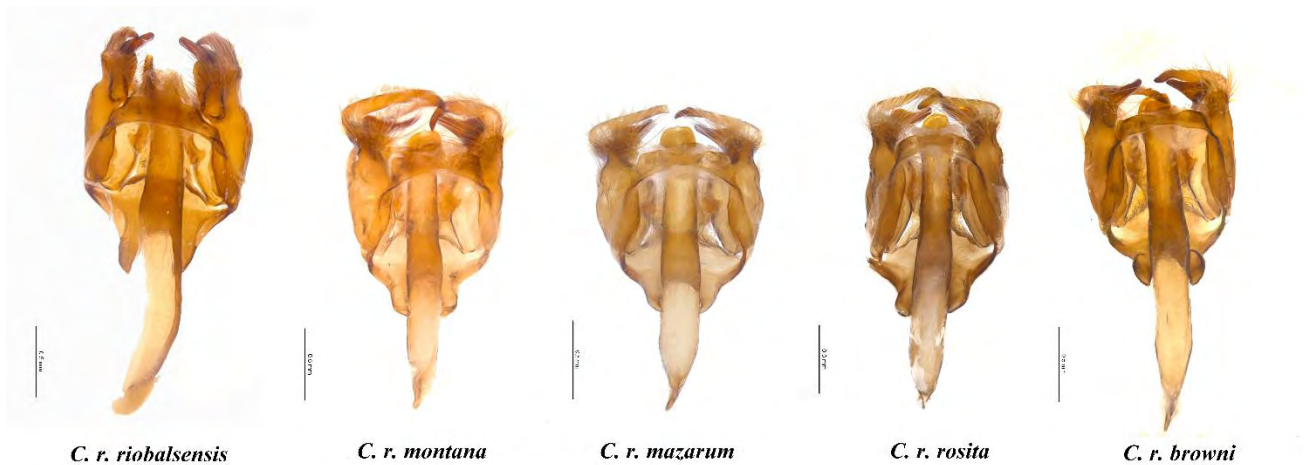


Figura 20. Zona ventral de la armadura genital del Complejo *Chlosyne rosita*.

Caracteres de la juxta. La variación en los caracteres de la juxta entre subespecies no es evidente. La superficie ventral tiene forma de meseta elevada compuesta por una sección anterior en forma de diamante que se amplía posteriormente en una sección triangular ligeramente cóncava. Los lados laterales de la meseta se encuentran ligeramente plegados, provocando que el borde de esta estructura sea curvado (Figura 21).

El saccus es bifurcado y forma dos proyecciones que rodean al phallus en las cinco subespecies, sin embargo en *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum* los extremos distales son acuminados y largos, mientras que en *C. r. montana*, *C. r. rosita* y *C. r. browni* son de menor longitud y más redondeados. La extensión del saccus en el centro de la zona anterior ventral de los genitales se encuentra bien desarrollada en todo el complejo (Figura 21).

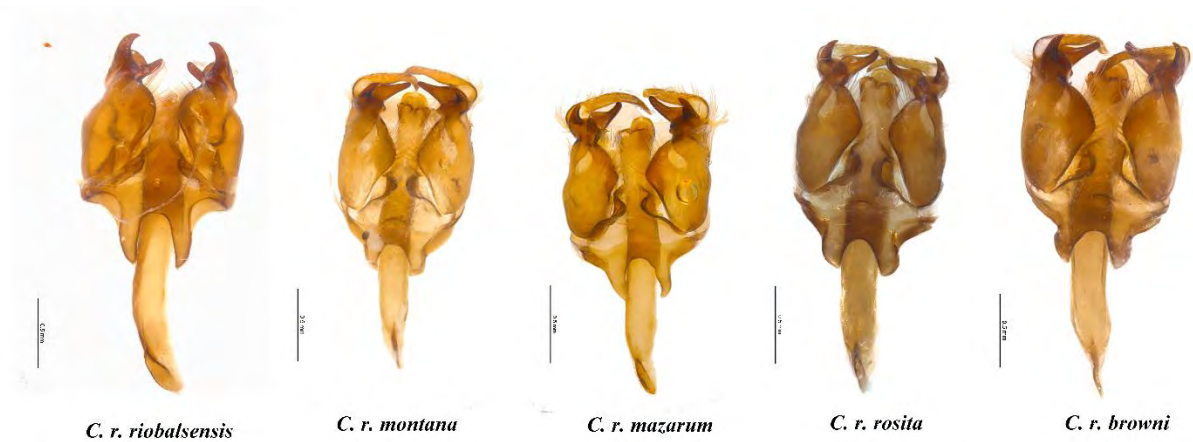


Figura 21. Zona dorsal de la armadura genital del Complejo *Chlosyne rosita*.

Caracteres del phallus. Esta estructura presenta variación únicamente en la longitud, siendo *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum* las que se caracterizan por poseer un mayor tamaño. En todos los individuos examinados el phallus tiene una quilla aplanada lateralmente en el extremo anterior-ventral. La orientación de la abertura posterior del phallus con relación a la abertura anterior es de aproximadamente 180 grados. El patrón de esclerosamiento de la zona ventral que va del extremo posterior hasta la membrana supersensorial presenta forma de lanza, mientras que la superficie dorsal se encuentra uniformemente esclerosada. El extremo dorsal posterior presenta una extensión amplia con base convexa, mientras que el extremo anterior se compone de dos placas: la primera se encuentra esclerosada en la vesica y se une a cada lado lateral-ventral del phallus y la segunda presenta dientes y se encuentra unida a la vesica, la cual se conecta a la esquina del extremo distal ventral de la placa adjunta del phallus. Los cornuti que se presentan en la segunda placa son prominentes con variación en el tamaño y se encuentran dispuestos en una fila formando dos arcos (Figura 22).

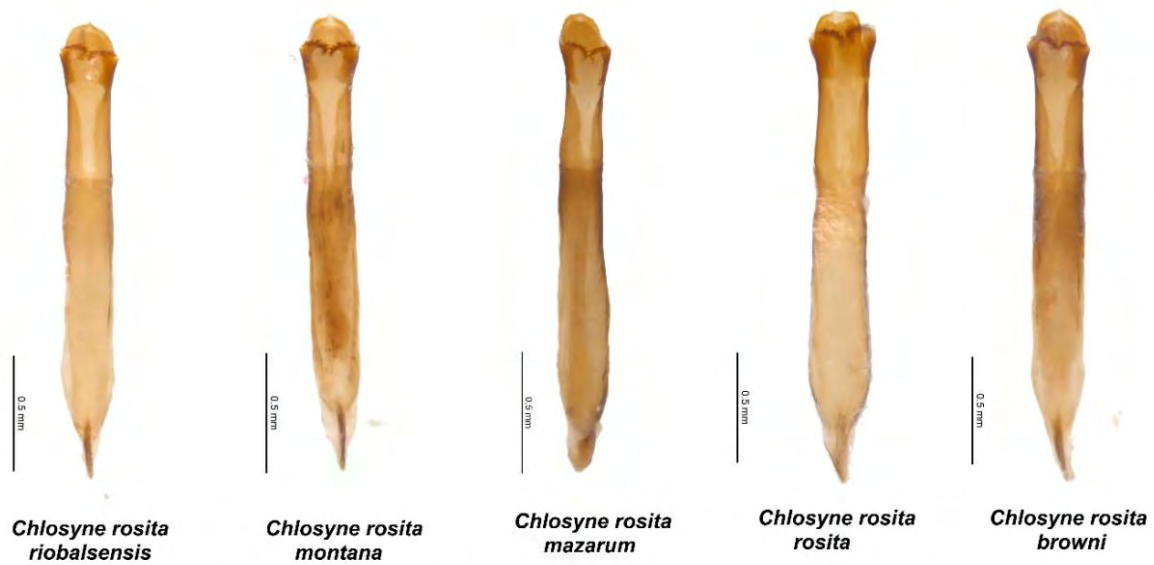


Figura 22. Zona ventral del phallus del Complejo *Chlosyne rosita*.

Caracteres del octavo tergito. El octavo tergito abdominal presenta dos proyecciones en su extremo anterior en todas las subespecies con excepción de *C. r. riobalsensis*. El patrón de esclerosamiento es uniforme para cuatro de las subespecies, con excepción de *C. r. montana* que presenta dos zonas hialinas cerca de los bordes laterales (Figura 23).

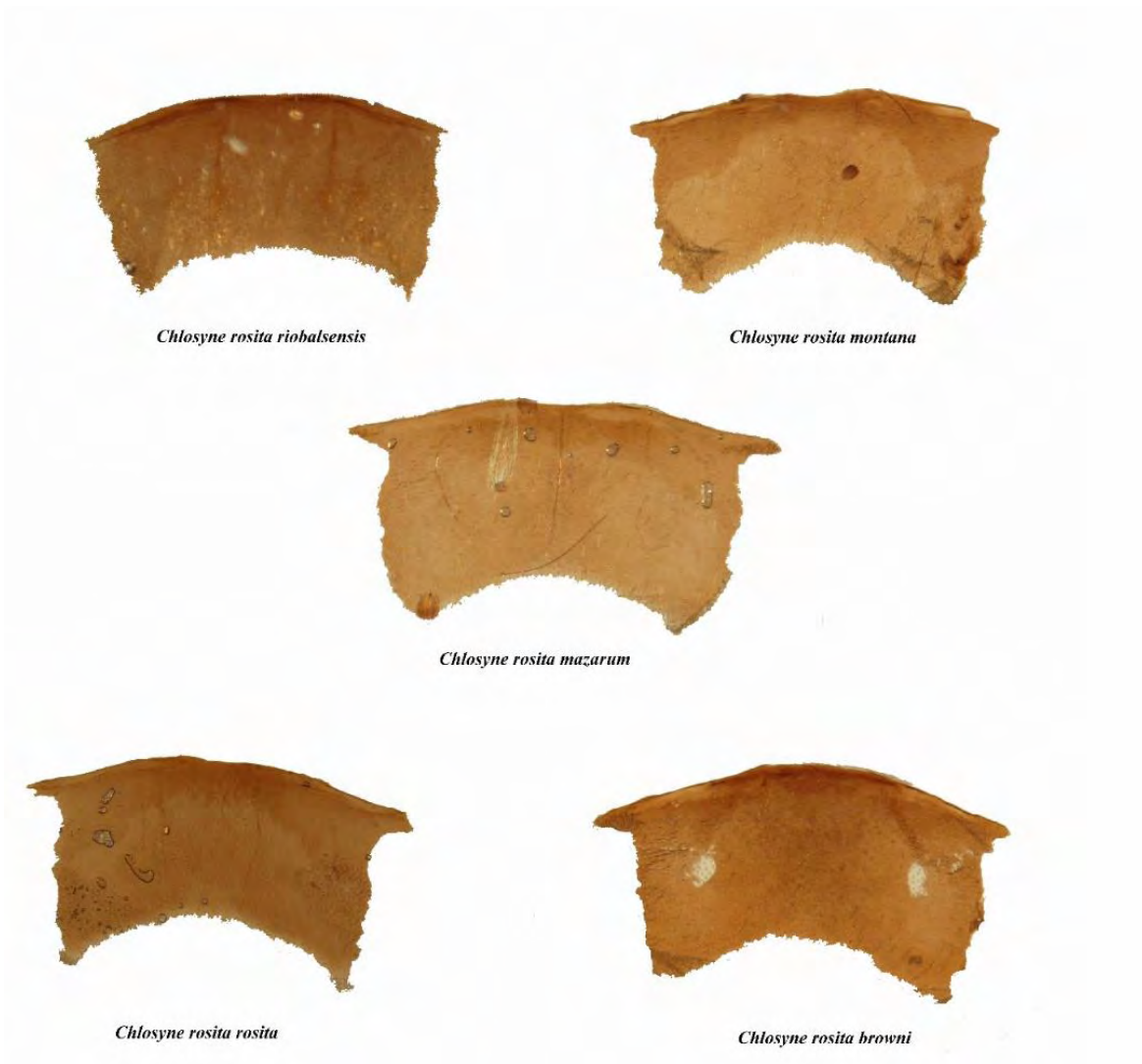


Figura 23. Morfología del octavo tergito abdominal del Complejo *Chlosyne rosita*.

6. DISCUSIÓN

Reconstrucción filogenética: El presente estudio es el primero en incorporar secuencias de DNA pertenecientes a individuos de *Chlosyne rosita* en la filogenia del género. Los resultados aportan evidencia de que se trata de un grupo monofilético y son consistentes con la hipótesis de Kons (2000), por lo que se considera a *C. rosita* como un taxón que presenta congruencia taxonómica apoyada por caracteres morfológicos y moleculares. La topología resultante es congruente con las relaciones filogenéticas propuestas para las especies del género *Chlosyne* (v. gr. Wahlberg y Zimmermann, 2000; Wahlberg *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2014), sin embargo, la relación de *C. rosita* con su grupo hermano no es clara. El árbol de Inferencia Bayesiana muestra un clado que incluye a *C. rosita* con otras especies, pero que no resuelve las relaciones entre éstas (Figura 8). En los análisis de Máxima Verosimilitud se relaciona al complejo con el grupo formado por *C. janais*, *C. gaudialis* y *C. narva*, pero con un valor de soporte bajo. A diferencia del trabajo de Kons (2000), en el que propone a *C. janais* como la especie hermana de *C. rosita*, este trabajo únicamente demuestra la cercanía filogenética de ambas especies, pero no se recupera como la especie más relacionada al complejo dentro de todo el género *Chlosyne*. La incongruencia en las diferentes hipótesis respecto al grupo hermano de *C. rosita* puede deberse al método de reconstrucción filogenética y al tipo de carácter utilizado, dado que Kons (2000) utilizó caracteres morfológicos y un criterio de Máxima Parsimonia, el cual a diferencia de los métodos utilizados en este trabajo, no utiliza un modelo evolutivo para inferir filogenias y únicamente se aplica seleccionando el árbol que minimice la longitud total, es decir, el número de pasos evolutivos requeridos para explicar un conjunto de datos (Goyenechea y Contreras-Ramos, 2007). Además de que de acuerdo con Wahlberg y Zimmermann (2000), un problema de trabajar con caracteres morfológicos en la construcción de filogenias para el género *Chlosyne* es que presentan un rango de variación continua; por lo que la delimitación de los estados de carácter en este taxón muchas veces es dependiente del criterio del taxónomo; por lo que las hipótesis filogenéticas (v. gr. Kons, 2000) pueden diferir considerablemente respecto las obtenidas mediante caracteres discretos como lo son las secuencias de DNA.

Estructura filogeográfica: Las relaciones al interior del clado conformado por las subespecies de *C. rosita* también presentan inconsistencias en las topologías obtenidas por

ambos métodos; en el árbol de Máxima Verosimilitud se muestra a las cinco subespecies como grupos monofiléticos (pero con un valor de soporte bajo), mientras que en el de Inferencia Bayesiana la monofilia de algunas subespecies no está determinada. Una característica común entre los dos tipos de árboles (Figura 7 y Figura 8) es la formación de un grupo que incluye a las especies distribuidas al Este de México (*C. r. rosita* y *C. r. browni*) y que las separa de las subespecies distribuidas en el Oeste y Centro de México (Figura 2). La hipótesis de Kohn (2000) es congruente con los resultados de Máxima Verosimilitud en donde se recupera a las cinco subespecies como grupos monofiléticos y es consistente con los resultados de ambos métodos (Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana) en donde se recupera a *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum* como parte de un grupo cercanamente relacionado. No obstante, las relaciones filogenéticas del resto de las subespecies no son consistentes con las obtenidas en este trabajo y no se reconocen los dos clados pertenecientes al Este y Oeste/Centro de México. Las posibles causas de las diferencias en las topologías se relacionan con el método de reconstrucción filogenética y el tipo de carácter utilizado, las cuales fueron discutidas anteriormente.

A diferencia de los resultados obtenidos por medio de los métodos filogenéticos, la relación entre las subespecies de *C. rosita* es más evidente en los resultados obtenidos a partir del análisis de redes. Este método, al no someter los datos a un modelo evolutivo determinado muestra de manera más clara las afinidades y conflictos entre las secuencias de cada individuo (Leaché, 2009). A partir del gen nuclear EF1- α se corroboró la monofilia de *C. rosita* obtenida anteriormente con los análisis filogenéticos debido a que mostró una importante variación respecto al resto de las especies del género *Chlosyne*. Sin embargo, las relaciones dentro del complejo no se resolvieron. Estos resultados obedecen principalmente a que los genes nucleares presentan menores tasas de mutación que el DNA mitocondrial, por lo que encontrar diferencias en poblaciones de una misma especie es más complicado (Zhang y Hewitt, 2003). Respecto al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa, se evidenció la presencia de dos grupos; el primero está formado por las subespecies distribuidas en la vertiente del Golfo y el segundo por las subespecies pertenecientes a la vertiente del Pacífico y el Centro de México (Figura 9). Este patrón es interesante debido a que se repite en distintos grupos de organismos con capacidades de dispersión diferentes; por lo que se infiere que pudieron estar sometidos a los mismos procesos biogeográficos a través del tiempo (Yañez-

Ordoñez *et al.*, 2008). Ejemplo de estos taxones son los anfibios (Greenbaum *et al.*, 2011); aves (Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza, 2014) y mamíferos (Castañeda-Rico *et al.*, 2014). Una primera hipótesis planteada por los autores de estos trabajos para explicar la presencia de estos dos linajes evolutivos es la influencia de las oscilaciones climáticas durante el Peistoceno. Estos eventos pudieron propiciar una conexión entre las selvas bajas del este y oeste de México, logrando que las poblaciones colonizaran nuevos territorios que posteriormente quedaron aislados (Castañeda-Rico *et al.*, 2014). Esta idea es apoyada por los patrones de distribución propuestos por Halffter (1976), que indican que las especies de afinidad Neotropical (como es el caso de *C. rosita*) penetraron a la zona de Transición Mexicana en un tiempo relativamente reciente (finales del Plioceno, principios del Pleistoceno), cuando el Altiplano Mexicano ya existía al igual que las montañas que lo rodean. De acuerdo con Llorente (1983), las razones por las que estas especies no se distribuyen en las montañas tienen que ver en primer lugar con la barrera geográfica que suponen estas elevaciones y en segundo por causas de tipo ecológico, ya que el altiplano presenta características más húmedas que dificultan la presencia de grupos con afinidad tropical. Con base en la distribución de estas especies (restringida a las tierras tropicales del sistema volcánico transversal y a las planicies costeras de ambos lados del litoral mexicano) se infiere que la evolución de ambos linajes ha sido independiente a lo largo del tiempo, asumiendo que no ha existido contacto entre estos grupos desde que se separaron y siguieron el patrón de dispersión Neotropical (Halffter y Morrone, 2017).

Una segunda hipótesis considera a la Sierra Madre del Sur como la promotora de la diferenciación entre ambos linajes, que aunado a la formación del Eje Neovolcánico Transversal durante el Plioceno Medio aislaron la región del Balsas limitando la dispersión de las especies confinadas a las selvas bajas del este y oeste de México (Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza, 2014; Bacon *et al.*, 2015). Esta conjetura podría ser menos aceptada para *C. rosita*, debido a que los grupos de mariposas que penetraron al área mesoamericana antes de la formación del Eje Neovolcánico Transversal presentan un mayor grado de diferenciación, formando géneros y subgéneros (Llorente, 1983). No obstante, para tener mayor certeza de los eventos geológicos que influenciaron la diferenciación genética en *C. rosita* es necesario estimar el tiempo de divergencia entre los linajes obtenidos, pero debido

a que no se cuenta con un registro fósil de algún miembro de la tribu, en este trabajo no se llevó a cabo esta calibración.

Variación y Estructura Genética:El presente estudio sugiere una alta diversidad haplotípica y nucleotídica para *C. rosita* ($Hd= 0.931$ y $\pi=0.02433$). Los altos valores de diversidad obtenidos obedecen principalmente a que existe una fuerte diferenciación entre subespecies con haplotipos únicos para cada población (Tabla 4).En lo que respecta a las estimaciones por subespecie, los valores de los índices de diversidad son variables, pero es importante mencionar que los valores se encuentran influenciados de manera importante por el muestreo geográfico, dado que en las subespecies con altos valores de diversidad (v. gr. *C. r. riobalsensis*, *C. r. montana* y *C. r. mazarum*) se cuenta con un mayor número de localidades muestreadas, mientras que en *C. r. rosita* y *C. r. browni* los valores de diversidad disminuyen considerablemente debido a que únicamente se cuenta con individuos pertenecientes a una y dos localidades respectivamente. Estas características del muestreo además de influir en los parámetros de diversidad, denotan una fuerte diferenciación entre las poblaciones a una escala geográfica relativamente pequeña. Este fenómeno ya se ha reportado en otras especies de mariposas del género *Heliconius*, las cuales al igual que *C. rosita* presentan variación en sus patrones de coloración alar, exhibiendo una fuerte estructuración genética a una escala local reducida (Arias *et al.*, 2014).

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de BAPS, se obtuvo una correspondencia casi perfecta entre las subespecies y los “clusters” asignados por el programa (con excepción de *C. r. riobalsensis*). Este agrupamiento tiene que ver con los altos valores de diferenciación genética observada entre subespecies, sin embargo, no se puede descartar que este patrón de estructuración en realidad sea producto de un muestreo discreto en poblaciones que exhiben una variación genética continua (Pritchard *et al.*, 2000).

Distribución geográfica de la diversidad genética: El dendograma construido a partir de los “clusters” sugeridos por BAPS y el análisis de SAMOVA, muestra el mismo patrón de agrupamiento entre las subespecies distribuidas en la vertiente del Pacífico y las del Golfo de México. Así mismo, los patrones de distribución de la diversidad al interior de cada linaje, también son importantes, dado que con base en el Análisis de Varianza Molecular, el 42.36% de la diversidad dentro de todo el complejo está explicada por la variación entre las

subespecies dentro de cada región geográfica (Este y Oeste-Centro de México). Se infiere que esta subdivisión de la diversidad genética tiene que ver con la compleja constitución fisiográfica del territorio mexicano, que propicia el escenario perfecto para la diferenciación entre poblaciones (Ferrusquía-Villafranca, 1998).

En el caso de la vertiente del Golfo, se observa una clara separación tanto genética como morfológica entre las poblaciones del norte y sur de esta área geográfica. La diferenciación genética de estas poblaciones coincide con las diferencias en la morfología alar de los individuos (representadas como subespecies). Se infiere que esta separación tiene que ver con la barrera climática que existe entre ambos subconjuntos, ya que las poblaciones más norteñas (*C. r. browni*) se distribuyen en condiciones ambientales más secas, mientras que las poblaciones que se distribuyen hacia el sur de Tamaulipas y San Luis Potosí (*C. r. rosita*) se distribuyen en áreas de mayor humedad (Llorente, 1983).

Para el caso del Oeste y Centro de México, tanto la variabilidad genética como morfológica es mayor comparada con la del Golfo de México, por lo que se deduce que los factores que influenciaron esta distribución de la diversidad, pueden ser histórica y ecológicamente más complejos. En términos biogeográficos, la elevada diversidad genética de las subespecies *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum*, es explicada por sus áreas de distribución, debido a que se localizan en la zona donde convergen la Sierra Madre del Sur, Eje Neovolcánico, Sierra Madre Oriental, Sierra del Norte de Oaxaca, Cuenca del Balsas y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, dando lugar a una gran heterogeneidad tanto ecológica como geológica y que al igual que en otros grupos de organismos, han actuado como barreras para la diferenciación de las poblaciones (Villaseñor *et al.*, 2009). No obstante, la presencia de distintos haplotipos en áreas geográficas pequeñas es indicio de que existe una diferenciación significativa a escala local, por lo que se podría tratar de un aislamiento influenciado por la presencia de un gradiente ambiental (como es el caso de la zona centro de México). A pesar de la importancia de la topografía, existe la posibilidad de que esta diferenciación en realidad sea producto de un fuerte aislamiento por distancia dentro de cada vertiente, el cual podría estar actuando de manera importante en la distribución de la diversidad genética, ya que este fenómeno es el principal promotor de la diferenciación de poblaciones a escala local (Mallet, 2010). *C. rosita* no es una especie que se desplace grandes distancias y regularmente sus

poblaciones están confinadas a parches de vegetación donde se localiza su planta de alimentación larval, por lo que este tipo de aislamiento bien puede ser característico de la especie.

Variación morfológica. *Chlosyne rosita*, al igual que otras especies de su género, presenta una marcada variación fenotípica. De acuerdo con Higgins (1960), esta variación se atribuye a distintas adaptaciones ecológicas; sin embargo, de acuerdo con la teoría biogeográfica, estas formas representan entidades evolutivas distintas. *C. rosita* presenta cinco formas con base en su patrón de coloración (que corresponden a las subespecies descritas), las cuales, a excepción de *C. r. mazarum*, presentan distribución alopátrida. Independiente de la validez que pueda tener el término “subespecie”, el reconocimiento y la descripción de la variación morfológica son de gran utilidad para complementar las hipótesis surgidas a partir de datos genéticos (Sánchez-González *et al.*, 2007). De acuerdo con la descripción de la morfología alar, se obtuvo que al igual que en los resultados genéticos, las subespecies que se distribuyen en la vertiente del Golfo, son menos variables que las que se encuentran en el Centro de México y en la vertiente del Pacífico. Así mismo, mediante este estudio se pudo corroborar que existe correspondencia entre los distintos patrones de coloración de *C. rosita* y el grado de diferenciación genética observada. Esta correlación puede ser atribuida a la separación de cinco linajes independientes dentro de *C. rosita* y el patrón de coloración podría estar denotando una barrera genética entre estas poblaciones. Sin embargo, no se puede descartar que en realidad esta relación sea producto de dos procesos independientes: por una parte el aislamiento genético dado por la distancia entre las poblaciones y por otra, la diferenciación morfológica provocada por adaptaciones ecológicas locales. Para complementar esta hipótesis sería conveniente analizar la diversidad genética en zonas de confluencia entre individuos con distintos patrones de coloración alar, así como de las poblaciones intermedias a las localidades utilizadas en este trabajo.

En lo que respecta al estudio de la genitalia masculina, no se observó una diferenciación importante entre las distintas subespecies, por lo que se considera que esta estructura no representa una barrera para el flujo genético intraespecífico. Sin embargo, con base en su estudio se puede corroborar que todos los individuos analizados pertenecen a una

misma especie tal y como lo proponen los análisis genéticos. En este sentido el estudio de los caracteres morfológicos resultó útil para robustecer lo obtenido con el DNA.

7. CONCLUSIÓN

Chlosyne rosita, es un grupo monofilético con base en el estudio de la genitalia masculina y los datos moleculares; por lo que se considera como una especie. La relación con su grupo hermano no es clara, pero filogenéticamente es más cercana a las especies *C. janais*, *C. narva* y *C. leanira*. A nivel intraespecífico se evidencia la presencia de dos linajes evolutivos independientes: Vertiente del Pacífico/Centro de México y Vertiente del Golfo, los cuales fueron separados en el pasado por eventos de vicarianza que se relacionan con eventos geológicos. Dentro de cada linaje existe un patrón de estructura significativa entre sus variantes morfológicas, y particularmente en la región del centro de México se observa una fuerte diferenciación a escala local, que se relaciona principalmente a factores ambientales; por lo que se infiere que la diversificación de *Chlosyne rosita* ha sido producto de una importante interacción entre procesos históricos y ecológicos.

8. PERSPECTIVAS

Se realizó el primer análisis genético de *C. rosita*, en el cual se pudo conocer su relación filogenética respecto al resto de las especies del género, así como la estructura filogeográfica de sus subespecies. Sin embargo, para tener una hipótesis más robusta acerca de la historia evolutiva de esta especie es fundamental incorporar marcadores nucleares (*v. gr.* microsatélites), los cuales podrían ayudar a conocer los niveles de flujo genético absolutos que ocurren entre las subespecies. Además, dado que este estudio sugiere una divergencia evolutiva temprana, un marcador con una tasa de mutación mayor que COI podría ser de mayor utilidad para esclarecer la relación de las subespecies en conflicto: *C. r. riobalsensis* y *C. r. mazarum*. Así mismo, es necesario incorporar poblaciones intermedias entre las poblaciones colectadas, específicamente tomando en cuenta las zonas de confluencia entre distintas subespecies (*v. gr.* centro de México). Finalmente, sería interesante complementar el trabajo con un análisis de distribución potencial de nicho, ya que a partir de estos resultados se podría estudiar el efecto de las características ecológicas del medio en la diferenciación genética de las poblaciones.

9. REFERENCIAS

- Arbeláez-Cortes, E. y Navarro-Sigüenza, A. G. (2014). Multilocus analysis of intraespecific differentiation in three endemic bird species from the northern Neotropical dry forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 362-377.
- Arias, C. F., Salazar, C., Rosales, C., Kronforst, M. R., Linares, M., Bermingham E. y MacMillan W. O. (2014). Phylogeography of *Heliconius cydno* and its closest relatives: disentangling their origin and diversification. *Molecular Ecology*, 23, 4137-4152.
- Arnedo, M. A. 1999. Cladismo: La reconstrucción filogenética basada en parsimonia. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26, 57-84.
- Bacon, C. D., Silvestro, C., Smith, B. T., Chakrabarty, P. y Antonelli, A. (2015). Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 6110-6115.
- Bandelt, H. J., Forster J. y Rohl, A. (1999). Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Bauer, D. L. (1961). Descriptions of two new *Chlosyne* (Nymphalidae) from Mexico, with a discussion of related forms. *Journal of the Lepidopterists Society*, 14, 148-154.
- Benson, D., Karsh-Mizrachi, A. Lipman, I., Ostell, D. J. y Wheeler, J. (2005). Gene Bank. *Nucleic Acids Research*, 33, 34-38.
- Burnham, K. P. y Anderson, D. R. (2004). Multimodel inference understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological methods y research*, 33, 261-304.
- Camargo, A., Morando, M., Avila, L. J. y Sites J. W. (2012). Species delimitation with ABC and other Coalescent-based methods: A test of accuracy with simulations and an empirical example with lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). *Evolution*, 66-9, 2834-2849.
- Castañeda-Rico, S., León-Paniagua, L., Vázquez-Domínguez, E. y Navarro-Sigüenza, A. (2014). Evolutionary diversification and speciation in rodents of the Mexican lowlands: the *Peromyscus melanophrys* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 454-463

- Cerritos-Flores, R. (2007). La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. En L. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Comps), *Ecología Molecular*(pp. 325-350). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México, México.
- Comstock. J. H. (1918). *The Wings of Insects*. Nueva York, The Comstock Publishing Company.
- Corander, J., Siren, J. y Arias, E. (2008). Bayesian spatial modeling of genetic population structure Computational. *Statistics*, 23, 111-129.
- De Queiroz K. (2005). Different species problems and their resolution. *BioEssays*, 27, 1263–1269.
- Degnan, J. H., y Rosenberg, N. A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology Evolution*, 24, 332–340.
- Dupanloup, I., Schneider, S. y Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571-2581.
- Duminil, J. y M. Di Michele. (2009). Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems*, 1-15.
- Duminil, J., Heuertz, M., Doucet, J.L., Bourland, N., Cruaud, C., Gavory, F., Doumenge, C., Navascues, M. y Hardy, O. J.(2010). CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species. *Molecular Ecology*. 19, 5469–5483.
- Duminil, J., Kenfack, D., Viscosi, V., Grumiau, L. y Hardy, O. J. (2012). Testing species delimitation sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa spp.* (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62. 275-285.
- Eastman, J. M., Alfaro, P., Hipp, L., Andrew, L. y Harmon, L. (2011). A novel Comparative Method for Identifying Shifts in the Rate of Character Evolution on Trees. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65, 3578-3589
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González-González, A. y Souza, V. (2015). Diferenciación, flujo génico y estructura genética de las poblaciones, con énfasis en especies de plantas mexicanas. En A. Becerra, A. Castañeda y D. Piñero

- (Coords.). Evolución orgánica (pp.77-104). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. (2007). Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suit V. 3.5. A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M. y Barrett, S.C. (2008). Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PlosOne*. 3.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1998). Geología de México: una sinopsis. En T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Eds.), *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. (pp. 3–108). Universidad Nacional Autónoma de México: México, DF.
- Feng, X., Liu, J. y Gong, X. (2016). Species Delimitation of *Cycas segmebtifida* of the *Cycassegmentifida* Complex (Cycadaceae) Resolved by Phylogenetic and Distance Analyses of Molecular Data. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-34
- Goyenechea I. y Contreras-Ramos, A. (2007). Controversia en sistemática filogenética. En A. Contreras-Ramos, C. Cuevas-Cardona, I. Goyenechea y U. Iturbide (Eds.). *La Sistemática, base del conocimiento de la Biodiversidad* (pp. 47-54). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Greenbaum, E., Smith, E. N. y De Sá, R. O. (2011). Molecular systematics of the Middle American genus *Hypopachus* (Anura: Microhylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 265-277.
- Halfpfter, G. (1976). Distribución de los insectos en la Zona de Transición Mexicana: relaciones con la entomofauna de Norteamérica. *Folia Entomológica Mexicana*, 35, 1-64.
- Halfpfter G. y Morrone, J. J. (2017). An analytical review of Halfpfter's Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa*, 1, 1-46

- Hall, A. (1924). Descriptions of two new forms of *Chlosyne* (Lepidoptera:Nymphalidae). *Entomologist*, 57, 241-242.
- Harvey, D. J. (1991). Higher classification of the Nymphalidae. Appendix B. En F. H. Nijhout (Ed.). *The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns* (pp. 455-484). Smithsonian Institution.
- Hey J. (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 447–450.
- Higgins L. G. (1960). A revision of the Melitaeini Genus *Chlosyne* and allied species (Lepidoptera: Nymphalinae). *Royal Entomological Society of London*.
- Higgins, L. G. (1981). A revision of *Phyciodes* and related genera, with a review of the classification of the Melitaeinae. *Entomology: Bulletin of the British Museum*, 43, 77-243.
- Huson, D. H. (1998). Splits Tree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, 14, 754-755.
- Kirpatrick, M. yRavigné, V. (2002). Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. *The American Naturalist*, 159, S22-S35.
- Kons, J. H. (2000). Phylogenetics studies of Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae: Nymphalinae) and a revision of the genus *Chlosyne* (Butler). Tesis Doctoral. Universidad de Florida.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A, McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, R. Lopez, J., Thompson, D., Gibson, T.J. y Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Leaché, A. (2009). Species Tree Discordance to Phylogeographic Clade Boundaries in North American Fence Lizards (Sceloporus). *Society of Systematic Biologists*, 58, 1-13
- Le Crom, J. F., Llorente, J. E., Constantino, L. M. y Salazar, J. A. (2004). Mariposas de Colombia. Tomo 2: *Pieridae*. Bogotá: Carlec.
- Leneveu, J., Chichvarkhin, A., y Wahlberg, N. (2009). Varying rates of diversification in the genus *Melitaea* (Lepidoptera: Nymphalidae) during the past 20 million years. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97, 346–361.

- Letunic, I. y Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 44, W242-W245.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009). DnaSP v5; a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Llorente, B. J. 1983. Sinopsis sistemática y biogeográfica de los Dismorphiinae de México con especial referencia al género *Enantia* Huebner (Lepidoptera: Pieridae). *Folia Entomológica Mexicana*, 58, 3-206.
- Llorente-Bousquets, J., Luis-Martínez, A. y Vargas-Fernández, I. (2006). Apéndice general de Papilionoidea: lista sistemática, distribución estatal y provincias biogeográficas. En J. J. Morrone y J. Llorente-Bousquets (Eds.). Componentes bióticos principales de la entomofauna mexicana (pp. 733-797). Las prensas de Ciencias UNAM, México, Distrito Federal.
- Long, E., Thomson, R. y Shapiro A. M. (2014). A time-calibrated phylogeny of the butterfly tribe Melitaeini. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 69-81.
- Luis-Martínez, A., Llorente-Bousquets, J. E., Vargas-Fernández, I. y Pozo, C. (2010). Nymphalidae de México III (Nymphalinae): distribución geográfica e ilustración. Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México: Las Prensas de Ciencias.
- Maddison, W. P. y Maddison, D. R. (2016). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>
- Mallet, J. (2010). Shift happens! Shifting balance and the evolution of diversity in warning colour and mimicry. *Ecological Entomology*, 35, 90–104.
- Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species. New York: Columbia University Press.
- Miller, L. D. (1970). Nomenclature of wings veins and cells. *Journal of Research on the Lepidoptera*, 8, 37-48.
- Miller, L. D. y Rotger, B. (1979). The new Chlosyne (Nymphalidae) from México. *Bulletin of the Allyn Museum*. 54: 1-4
- Murillo-Ramos L. (2014). Relaciones del género *Aphrissa* (Pieridae) con géneros afines. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25, 1253-1256.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rannala, B. y Yang, Z. (2003). Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics*, 164, 1645–1656.
- Rentería-Alcantara. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Comps). *Ecología Molecular* (pp. 541-566). Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Rosell, J. A., Olson, M. E., Weeks, A., De-Nova, J. A., Medina Lemos, R., Pérez-Camacho, J., Feria, T. P., Gomez-Berbejo, R., Montero, J. C. y Eguiarte, L. E. (2010). Diversification in species complexes: Test of species origin and delimitation in the *Bursera simaruba* clade of tropical trees (Burseraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 798-811.
- Rundle, H. D. y Nosil. P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8, 336-352
- Ruiz, E. (2009). Delimitación de especies y posición filogenética del bambú americano *Oatea* (Poaceae: Bambusoideae). Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-González, L. A., Navarro-Sigüenza, A., Peterson, A. T. y García-Moreno, J. Taxonomy of *Chlorospingus ophthalmicus* in Mexico and northern Central America. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*, 127, 34-49
- Sequencer versión 5.4.1 sequence analysis software, Gene Codes Corporation, *Ann Arbor*. <http://www.genecodes.com>
- Sites, J. W. y Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 462–470.
- Toro, M. A., Fernández, J. y Caballero, A. (2009). Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*, 120, 174-195

- Trifinopoulos, J., Nguyen L. T., von Haeseler, A. y Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 44, W232-W235.
- Villaseñor, J.L., Maeda, P. Colín-López, J.J. y Ortiz, E. (2009). Estimación de la riqueza de especies de Asteraceae mediante extrapolación a partir de datos de presencia-ausencia. *Bolletín de la sociedad Botánica de México*, 76, 5-18
- Warren, A. D., Davis, K. J., Stangland, E. M., Pelham, J. P. y Grishin, N. V. (2012). Illustrated List of American Butterflies. Recuperado el 07 de octubre, 2016 de: <http://www.butterfliesofamerica.com/>
- Wahlberg, N. y Zimmermann, M. (2000). Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Cladistics*, 16, 347-363.
- Wahlberg N, Oliveira R, Scott J. A. (2003a). Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Systematic Entomology*, 28, 257–273.
- Wahlberg N, Weingartner E. y Nylin S. (2003b). Towards a better understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28, 473–484
- Wahlberg, N., Brower, A. V. Z. y Nylin, S. (2005). Phylogenetic relationships and historical biogeography of tribes and genera in the subfamily Nymphalinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 86, 227-251
- Wiens, J. J. y Penkrot, T. A. (2002). Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematics Biology*, 51, 69-91.
- Xiang, Q., Wei, R., Shao, Y., Yang, Z., Wang, X. y Zhang, X. (2015). Phylogenetic relationships, possible ancient hybridization, and biogeographic history of *Abies* (Pinaceae) based on data from nuclear, plastid and mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 1-14
- Yáñez-Ordoñez, O., Trujano-Ortega, M. y Llorente-Bousquets, J. (2008). Patrones de distribución de las especies de la tribu Meliponini (Hymenoptera, Apoidea, Apidae) en México. *Interciencia*, 33, 41-45

Zhang, D. X. y Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12, 563-584.

10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

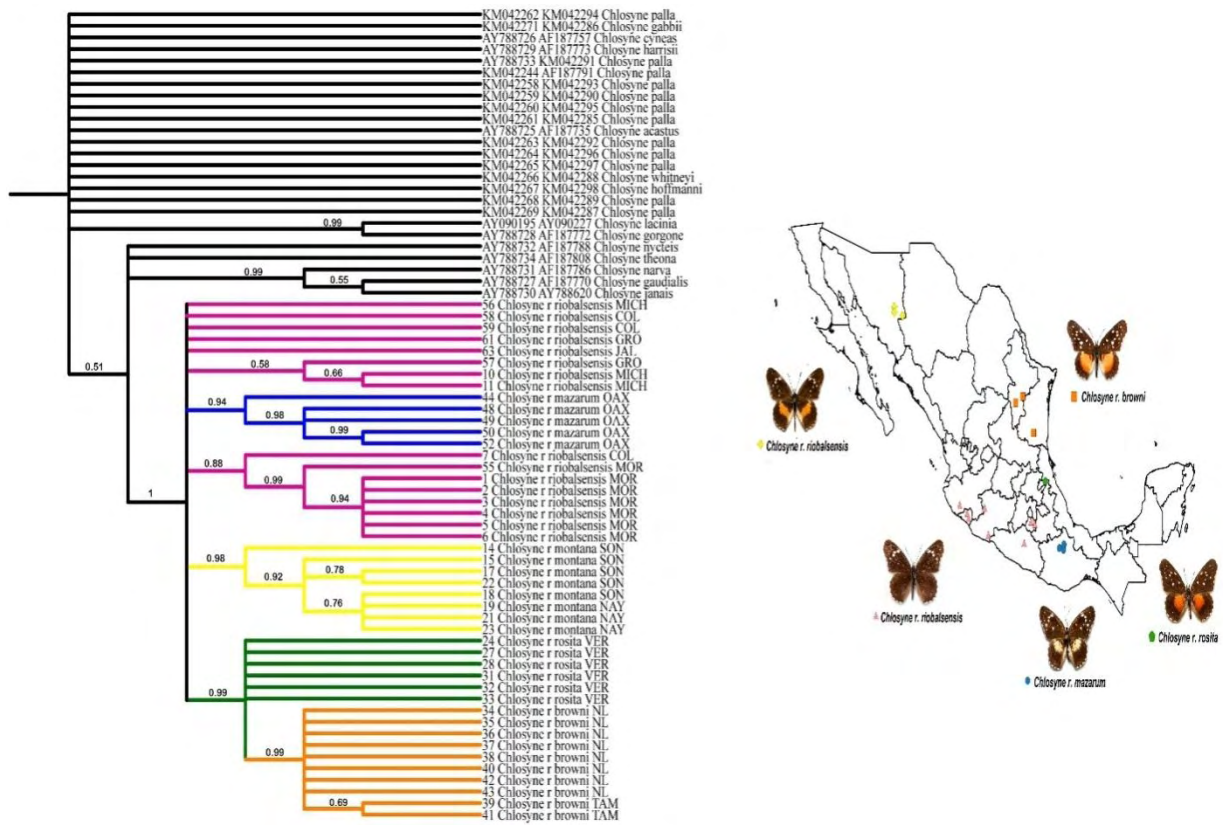


Figura 24. Filogenia de *Chlosyne* a partir de Inferencia Bayesiana con base en el gen COI. Los valores de probabilidad se muestran por encima de las ramas. Los colores de las ramas indican las subespecies de *Chlosyne rosita*: *C. r. montana*, amarillo; *C. r. riobalsensis*, rosa, *C. r. mazarum*, azul; *C. r. rosita*, verde; *C. r. browni*, anaranjado.

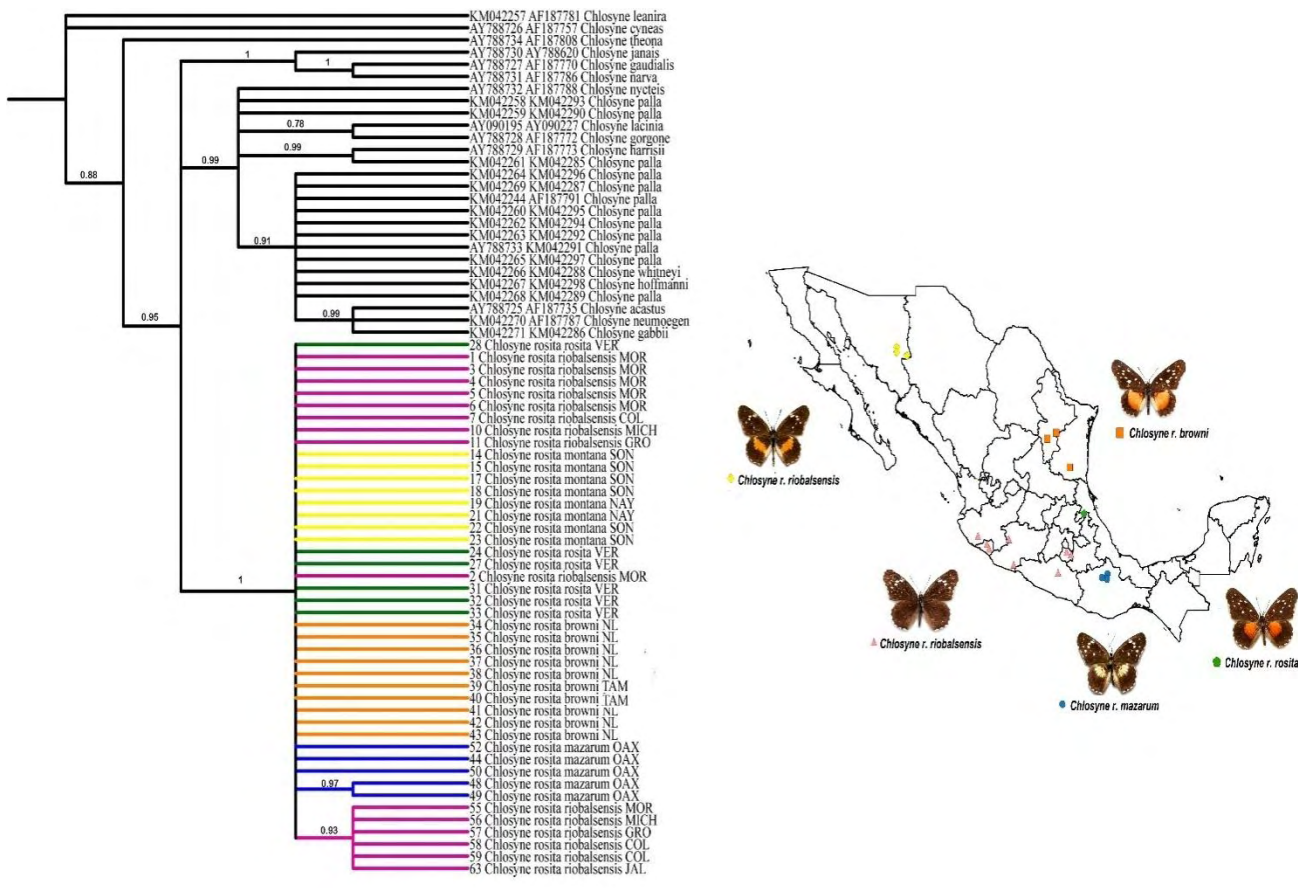


Figura 25. Filogenia de *Chlosyne* a partir de Inferencia Bayesiana con base en el gen EF1- α . Los colores de las ramas indican las subespecies de *Chlosyne rosita*: *C. r. montana*, amarillo; *C. r. riobalsensis*, rosa, *C. r. mazarum*, azul; *C. r. rosita*, verde; *C. r. boweni*, anaranjado.

ANEXO 1.

Información geográfica de los individuos obtenidos a partir de colectas en campo y de la colección de mariposas del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”, Facultad de Ciencias, UNAM.

Ind.	Localidad	Municipio	Estado	Latitud	Longitud	Tipo de tejido
1	Temoac	Temoac	Morelos	18.7775	-98.778611	Fresco
2	Temoac	Temoac	Morelos	18.7775	-98.778611	Fresco
3	Temoac	Temoac	Morelos	18.7775	-98.778611	Fresco
4	Temoac	Temoac	Morelos	18.7775	-98.778611	Fresco
5	Cerro de Chalcatzingo	Jantetelco	Morelos	18.689167	-98.775278	Fresco
6	Cerro de Chalcatzingo	Jantetelco	Morelos	18.689167	-98.775278	Fresco
7	Agua Dulce	Villa de Alvarez	Colima	19.288611	-103.89	Museo
10	Chorros del Varal	Los Reyes	Michoacán	19.52	-102.570278	Museo
11	Chorros del Varal	Los Reyes	Michoacán	19.52	-102.570278	Museo
14	Pine Barrens	Soyopa	Sonora	28.8266667	-109.359444	Museo
15	23 Mi E Tecoripa	Alamos	Sonora	28.8266667	-109.359722	Museo
17	Carretera 16, 11.2 mi al SE de Río Yaqui	Yecora	Sonora	28.5830556	-109.366667	Museo
18	Tepoca	Yecora	Sonora	28.4188889	-108.75	Museo
19	Jesús María, Coamil-Cora	El Nayar	Nayarit	22.2697222	-104.536667	Museo
21	Jesús María, Coamil-Cora	El Nayar	Nayarit	22.2697222	-104.536667	Museo
22	Carretera 16, 11.2 mi al SE de Río Yaqui	Yecora	Sonora	28.5830556	-109.366667	Museo
23	Jesús María, Coamil-Cora	El Nayar	Nayarit	22.2697222	-104.536667	Museo
24	San Francisco	Ixhuatlán de Madero	Veracruz	20.751666	-98.0019	Museo
27	San Francisco	Ixhuatlán de Madero	Veracruz	20.751666	-98.0019	Museo
28	San Francisco	Ixhuatlán de Madero	Veracruz	20.751666	-98.0019	Museo
31	San Francisco	Ixhuatlán de Madero	Veracruz	20.751666	-98.0019	Museo
32	San Francisco	Ixhuatlán de Madero	Veracruz	20.751666	-98.0019	Museo
33	San Francisco	Ixhuatlán de Madero	Veracruz	20.751666	-98.0019	Museo
34	Las Margaritas	Doctor Arroyo	Nuevo Leon	24.3905556	-100.223056	Museo
35	Las Margaritas	Doctor Arroyo	Nuevo Leon	24.3905556	-100.223056	Museo
36	Las Margaritas	Doctor Arroyo	Nuevo Leon	24.3905556	-100.223056	Museo
37	Las Margaritas	Doctor Arroyo	Nuevo Leon	24.3905556	-100.223056	Museo
38	Los Laureles	Linares	Nuevo Leon	24.685633	-99.681371	Museo
39	Nacimiento, el, cerca de Gómez Farías	Xicotencatl	Tamaulipas	23.0030556	-98.8663889	Museo
40	Los Laureles	Linares	Nuevo Leon	24.685633	-99.681371	Museo
41	Nacimiento, el, cerca de Gómez Farías	Xicotencatl	Tamaulipas	23.0030556	-98.8663889	Museo
42	Los Laureles	Linares	Nuevo Leon	24.685633	-99.681371	Museo
43	Los Laureles	Linares	Nuevo Leon	24.685633	-99.681371	Museo

44	carretera 135 mi S de Cuicatlán	Valerio Trujano	Oaxaca	17.8275	-96.5830556	Museo
48	Tehuacán-Oaxaca, Carretera, km 147	San Juan Bautista Valle Nacional	Oaxaca	17.5866667	-96.6063889	Museo
49	Tehuacán-Oaxaca, Carretera, km 147	San Juan Bautista Valle Nacional	Oaxaca	17.5866667	-96.6063889	Museo
50	Tehuacán-Oaxaca, Carretera, km 147	San Juan Bautista Valle Nacional	Oaxaca	17.5866667	-96.6063889	Museo
52	Dominguillo, 2 mi S, La Cañada	San Juan Bautista Cuicatlán	Oaxaca	17.6530556	-96.9163889	Museo
55	Cañón de Lobos, 10 mi E Cuernavaca	Yautepec	Morelos	18.8994444	-99.0575	Museo
56	Rancho "El Zorrillo", Cañada Húmeda	Arteaga	Michoacán	18.2822222	-102.276389	Museo
57	Mexcala	Eduardo Neri	Guerrero	17.895	-99.5758333	Museo
58	La Salada	Tecoman	Colima	19.0511111	-103.756944	Museo
59	Platanarillo	Minatitlan	Colima	-103.756944	-103.972222	Museo
61	Mexcala	Eduardo Neri	Guerrero	17.895	-99.5758333	Museo
63	La Calera	Casimiro Castillo	Jalisco	19.676919	-104.433822	Museo

ANEXO 2.

Especies de *Chlosyne* y su grupo externo utilizados en el análisis filogenético. Las columnas muestran los números de acceso al GenBank para los genes COI y EF1- α y el superíndice indica su referencia bibliográfica.

Espece	COI	EF1
<i>Chlosyne acastus</i> (Edwards 1874)	AF187735 ^a	AY788725 ^b
<i>Chlosyne cyneas</i> (Godman and Salvin 1878)	AF187757 ^a	AY788726 ^b
<i>Chlosyne gabbii</i> (Behr 1863)	KM042286 ^c	KM042271 ^c
<i>Chlosyne gaudialis</i> (Bates 1864)	AF187770 ^a	AY788727 ^b
<i>Chlosyne gorgone</i> (Hübner [1810])	AF187772 ^a	AY788728 ^b
<i>Chlosyne harrisii</i> (Scudder 1864)	AF187773 ^a	AY788729 ^b
<i>Chlosyne hoffmanni</i> (Behr 1863)	KM042298 ^c	KM042267 ^c
<i>Chlosyne janais</i> (Drury 1783)	AY788620 ^b	AY788730 ^b
<i>Chlosyne lacinia</i> (Geyer 1837)	AY090227 ^d	AY090195 ^d
<i>Chlosyne leanira</i> (Felder and Felder 1860)	AF187781 ^a	KM042257 ^c
<i>Chlosyne narva</i> (Fabricius 1793)	AF187786 ^a	AY788731 ^b
<i>Chlosyne neumogeni</i> (<i>C. acastus</i> neumogeni Skinner 1895)	AF187787 ^a	KM042270 ^d
<i>Chlosyne nycteis</i> (Doubleday [1847])	AF187788 ^a	AY788732 ^b
<i>Chlosyne palla</i> (Boisduval 1852)	AF187791 ^a	AY788733 ^b
<i>Chlosyne palla</i> ButtsCyn	KM042295 ^c	KM042260 ^c
<i>Chlosyne palla</i> GoatMtn	KM042296 ^c	KM042264 ^c
<i>Chlosyne palla</i> IowaHill	KM042292 ^c	KM042263 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Jackson	KM042285 ^c	KM042261 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Leap	KM042287 ^c	KM042269 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Lumgrey	KM042293 ^c	KM042258 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Ramshorn	KM042289 ^c	KM042268 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Sierraville	KM042297 ^c	KM042265 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Warner	KM042290 ^c	KM042259 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Weed	KM042294 ^c	KM042262 ^c
<i>Chlosyne palla</i> Yuba49	KM042291 ^c	KM042244 ^c
<i>Chlosyne theona</i> (Ménétriés 1855)	AF187808 ^a	AY788734 ^b
<i>Chlosyne whitneyi</i> (Behr 1863)	KM042288 ^c	KM042266 ^c
<i>Melitea acraeina</i> (Staudinger 1886)	FJ462229 ^e	FJ462289 ^e
<i>Melitea fergana</i> (Staudinger 1882)	FJ462257 ^e	FJ462289 ^e
a. Wahlberg and Zimmermann (2000) b. Wahlberg <i>et al.</i> (2005) c. Long <i>et al.</i> (2014) d. Wahlberg <i>et al.</i> (2003a, b). e. Leneveu <i>et al.</i> (2009).		

