



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

GENÉTICA DE POBLACIONES DEL COMPLEJO JETHYS (LEPIDOPTERA:  
PAPILIONOIDEA; *Enantia*) EN MÉXICO

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOVANA MAGDALENA JASSO MARTÍNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. SALIMA CHRISTINE MACHKOUR M'RABET  
ECOSUR, UNIDAD CHETUMAL

MÉXICO, CD. MX., ENERO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

GENÉTICA DE POBLACIONES DEL COMPLEJO JETHYS (LEPIDOPTERA:  
PAPILIONOIDEA; *Enantia*) EN MÉXICO

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOVANA MAGDALENA JASSO MARTÍNEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. SALIMA CHRISTINE MACHKOUR M'RABET  
ECOSUR, UNIDAD CHETUMAL

MÉXICO, CD. MX., ENERO 2017

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

OFICIO FCIE/DEP/742/2016

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 17 de octubre de 2016 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** del (la) alumno (a) **JASSO MARTÍNEZ JOVANA MAGDALENA** con número de cuenta **306028645** con la tesis titulada "**GENÉTICA DE POBLACIONES DEL COMPLEJO JETHYS (LEPIDOPTERA: PAPILIONOIDEA; *Enantia*) EN MÉXICO**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN**:

Presidente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Vocal: M. EN C. MARYSOL TRUJANO ORTEGA  
Secretario: DRA. SALIMA CHRISTINE MACHKOUR M RABET  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN  
Suplente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de noviembre de 2016

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/grf\*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme llevar a cabo mis estudios de Maestría en el campo de Biología Evolutiva.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de una beca para realizar mis estudios de Maestría en el programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) por brindarme el apoyo para realizar una estancia de investigación internacional y una estancia nacional.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor por sus observaciones y apoyo a lo largo de la realización de este proyecto:

Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

Dra. Salima Christine Machkour M'Rabet

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Muchas personas han contribuido en la realización de este proyecto. En primer lugar quiero agradecer a la Dra. América Castañeda por todo el apoyo que me ha brindado, el cual no solo ha sido académico. América es una de las mejores personas con quien he tenido el placer de convivir. Quiero agradecer al M. en C. Armando Luis, quien no solo me ha apoyado en las recolectas en el campo, ha estado presente a lo largo del desarrollo de este trabajo. Al Biól. Arturo Arellano y a Saray Juárez por su contribución en la recolecta de ejemplares del complejo *Enantia jethys*. Agradezco a Gordon Strom por invitarnos a su “Finca Mariposa”, sitio de muestreo que fue relevante en este trabajo. Me es grato agradecer a la M. en C. Elizabeth Labastida, a la Biól. Landy Chablé y a la Biól. Lorena Perales por todo su apoyo en el laboratorio de Ecología Molecular (ECOSUR) y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas. Quiero agradecer a la Dra. Carmen Pozo y al Dr. Benjamín Morales por abrirme siempre las puertas de su casa y por todo su apoyo. Agradezco también al Dr. Jorge Llorente-Bousquets, su investigación sobre el complejo *E. jethys* ha sido relevante para la realización de este trabajo. Gracias a la Dra. Rosario Rodríguez en el Laboratorio de Genética y Evolución por todo el apoyo brindado en estos años. Agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución, en especial a la Biól. Ana Cruz y a la Biól. Viridiana Martínez, quienes siempre me apoyan y me brindan consejos, y lo más importante, su amistad. Agradezco a la Biól. Abril Tapia, quien además de brindarme todo su apoyo en el aula desde el momento de conocernos, me ha brindado su amistad. Agradezco a Holger Weissenberg por ayudarme a hacer el mapa de sitios de recolecta de los ejemplares del complejo *jethys*. Quiero agradecer a la Dra. Marisol de la Mora y Dr. Jaime Gasca por aclarar mis dudas en esta investigación. Agradezco también a los miembros del jurado en mi examen de grado: Dr. Daniel Piñero, M. en C. Marysol Trujano, Dra. Salima Machkour, Dr. Alejandro Zaldívar y Dra. Rosario Rodríguez. Sus contribuciones sin duda, han hecho de este un mejor trabajo.

## DEDICATORIAS

Antes que nada, le dedico este trabajo a mis padres: Juan Jasso y Magdalena Martínez, a quienes debo todo lo que soy y lo que tengo. Gracias por ser los padres más amorosos y comprensivos. Dedico este trabajo a Alvar Rodríguez, quien estando cerca o lejos, siempre me impulsa a seguir adelante. Quiero dedicar mi trabajo a mis hermanos: Luz María Martínez, Arturo Martínez, Dulce María Martínez y Vannia Martínez. Ellos siempre me apoyan, me dan ánimos, y lo más importante: me dan su cariño. Quiero agradecer a Miguel García y Abraham Echávarri por sus consejos y todo su apoyo. Quiero dedicar también este trabajo a Susana Hernández y Mariana Benítez, mis amigas, mis compañeras, mis hermanas. Dedico mi trabajo a mis queridos sobrinos: Victoria Echávarri, Leonardo Said García, Carlos Raúl Jiménez, Salvador Sánchez, José María Sánchez y Carlos Alonso Sánchez, a quienes les pido que siempre sean íntegros y honestos. Crezcan y vivan libres y felices.



*Somewhere, something incredible is waiting to be known*

Carl Sagan

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN	
1 Genética de poblaciones .....	4
1.1 ¿Qué estudia la Genética de poblaciones? .....	4
1.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	5
1.3 Algunas estimaciones de los efectos de las fuerzas evolutivas en las poblaciones naturales .....	5
1.4 La $G_{ST}$ como medida de la diferenciación genética entre poblaciones.....	8
2 Marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) .....	9
3 Las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> . Estudios morfológicos, poblacionales y filogenéticos .....	18
3.1 Clasificación taxonómica del género <i>Enantia</i> (Hübner, 1819) .....	18
3.2 Las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> .....	19
3.3 Estudios poblacionales del complejo <i>Enantia jethys</i> a través de las aloenzimas .....	24
3.4 El complejo <i>Enantia jethys</i> a través del Código de Barras .....	25
4 Hibridación en poblaciones naturales .....	25
OBJETIVOS	
General .....	28
Específicos .....	28
MATERIAL Y MÉTODOS	
1 Recolecta de especímenes .....	30
2 Extracción de DNA .....	32
3 Amplificación por PCR de los marcadores ISSRs .....	33
4 Lectura de bandas y construcción de matrices de datos .....	35
5 Análisis de datos de ISSRs .....	35
5.1 Medidas de diversidad genética .....	35
5.2 Medidas de diferenciación genética .....	36
5.3 Structure .....	36
5.4 Asilamiento por distancia .....	36
RESULTADOS	
1 Diversidad genética en el complejo <i>E. jethys</i> .....	38
2 Organización de los individuos en un espacio bidimensional (PCoA) de acuerdo a la información genética aportada por los ISSRs .....	41
3 Estructura genética, flujo génico ( $Nm$ ), aislamiento por distancia y resultados de Structure .....	42
4 Individuos “con más de una ancestría” .....	49
DISCUSIÓN	

1 Aspectos generales sobre las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> .....	54
2 Variación genética en las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> .....	55
3 Diferenciación poblacional ( $G_{ST}$ ), flujo génico ( $Nm$ ) y patrones de aislamiento por distancia en las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> .....	58
4 Introgresión por hibridación en las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> .....	60
5 Efecto genético de la presencia de los individuos “con más de una ancestría” en las especies del complejo <i>Enantia jethys</i> .....	63
CONCLUSIONES .....	65
FUENTES CONSULTADAS .....	66
ANEXOS	
1 Hidratación de tejido de abdómenes .....	73
2 Extracción de DNA .....	73
3 Preparación de geles de agarosa .....	74
4 Electroforesis .....	75

## RESUMEN

Se investigó la estructura y variación genética en las especies del complejo *Enantia jethys* (Lepidoptera: Papilionoidea) en cinco localidades de Veracruz, Puebla y Oaxaca en México, utilizando dos marcadores ISSR. Se encontraron niveles de polimorfismo ( $P$ ) altos en poblaciones de la misma especie ( $P$ : *E. mazai* = 92.42, *E. albania* = 96.97, *E. jethys* = 95.45), así como de heterocigosidad ( $H_e$ : *E. m. mazai* = 0.136, *E. albania* = 0.195, *E. jethys* = 0.254). *Enantia m. mazai* es el miembro del complejo *jethys* con mayor diferenciación genética entre subpoblaciones ( $G_{ST} = 0.0535$ ) y *E. jethys* es la especie con mayor flujo de genes entre subpoblaciones ( $Nm = 20.07$ ). Se encontró evidencia de hibridación direccional e introgresión en el grupo. La hibridación involucra siempre a *E. albania* con cualquiera de las otras especies, pero nunca ocurre entre *E. jethys* y *E. mazai*, mientras que en la introgresión, *E. jethys* y *E. mazai* presentan un componente genético de *E. albania*. Además se observa que la presencia de los individuos híbridos puede aumentar (en *E. mazai*) o disminuir (en *E. jethys*) los niveles de diversidad genética.

## ABSTRACT

Genetic structure and variation was analyzed in the *Enantia jethys* species complex (Lepidoptera: Papilionoidea) from five localities in Veracruz, Puebla and Oaxaca, Mexico using two ISSR's markers. There were high polymorphism and heterozygosity levels ( $P$ : *E. mazai* = 92.42, *E. albania* = 96.97, *E. jethys* = 95.45;  $H_e$ : *E. m. mazai* = 0.136, *E. albania* = 0.195, *E. jethys* = 0.254). *Enantia m. mazai* is the member of the complex with the highest genetic differentiation among subpopulations ( $G_{ST} = 0.0535$ ), whereas *E. jethys* has the highest gene flow among subpopulations ( $Nm = 20.07$ ). Evidence of directional hybridization and introgression was found within the group. Hybridization always involves *E. albania* and any other species, but it never occurs between *E. jethys* and *E. mazai*, whereas for introgression, *E. jethys* and *E. mazai* have a genetic component of *E. albania*. In addition it is observed that the presence of the hybrid individuals can increase (in *E. mazai*) or decrease (in *E. jethys*) the levels of genetic diversity.

# INTRODUCCIÓN

# 1 Genética de poblaciones

## 1.1 ¿Qué estudia la Genética de poblaciones?

Para comprender los procesos evolutivos es necesario contar con un conocimiento amplio de la genética de poblaciones (Hedrick, 2011). En el contexto de la genética poblacional, la evolución es el resultado de un cambio progresivo en la composición genética de las poblaciones (Hartl y Clark, 1989).

La genética poblacional involucra el estudio de la variación genética de un gen o grupo de genes en una población o poblaciones (Hedrick, 2011), así como el estudio de ciertos procesos en las poblaciones que hacen que dicha variación genética sea diferencial entre ellas (como la interrupción de flujo génico), lo que se puede definir como la **estructura genética de las poblaciones** (Hamilton, 2009) (Figura 1).

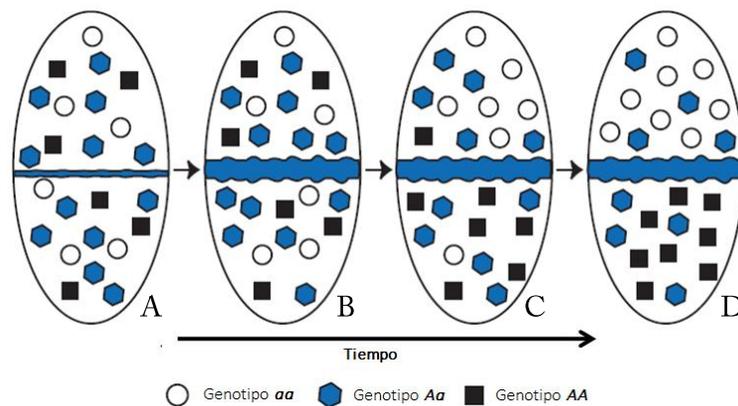


Figura 1. Ejemplo de estructura poblacional (frecuencias alélicas y genotípicas diferenciales) producida por la interrupción de flujo génico debido al surgimiento de una barrera geográfica. En la población A las frecuencias genotípicas son homogéneas en ambos lados de la barrera geográfica. En D se observa una estructura bien definida donde en un lado de la barrera solo hay genotipos **aa** y **Aa**, y del otro lado **AA** y **Aa** (Hamilton, 2009).

La estructura de las poblaciones tiene dos partes principales: la estructura demográfica y la genética, la estructura demográfica está determinada por procesos tales como los nacimientos, muertes, dispersión y sistemas de apareamiento De acuerdo con Slatkin (1994). Por otra parte, la estructura genética está determinada por la estructura

demográfica de la población, pero también por procesos tales como la selección, mutación y recombinación, flujo de genes y deriva génica Slatkin (1994). La estructura poblacional (o diferenciación poblacional) puede ser estimada principalmente a través de los estadísticos  $F$ , introducidos por Sewall Wright en 1951 (Frankham, *et al.*, 2002; Eguiarte, *et al.*, 2010).

## 1.2 El equilibrio de Hardy-Weinberg

En 1908 el matemático Godfrey H. Hardy y el médico Wilhelm Weinberg formularon una relación matemática para predecir el cambio de las frecuencias alélicas a través del tiempo, lo que se conoce como “Ley de Hardy-Weinberg (H-W)” (Hamilton, 2009). Dicha ley postula que a partir de cualquier frecuencia genotípica inicial *i.e.* homocigoto dominante, heterocigoto o heterocigoto recesivo (D, H y R respectivamente), en la siguiente generación podremos observar la relación  $D = p^2$ ,  $H = 2pq$ ,  $R = q^2$  (Eguiarte, 1999; Hedrick, 2011), por lo que la ecuación de H-W es  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias alélicas para un locus con dos alelos (Hamilton, 2009).

El equilibrio de H-W se cumple bajo un conjunto de supuestos: 1) los organismos son diploides, 2) se lleva a cabo la reproducción sexual, 3) no hay solapamiento entre generaciones, 4) los apareamientos son aleatorios, 5) hay unión aleatoria entre gametos, 6) el tamaño de la población es muy grande, 7) no hay migración (no hay flujo génico), 8) no hay mutación, o en caso de haberla, su efecto es muy bajo y 9) la selección natural no actúa sobre la población (Eguiarte, 1999; Hamilton, 2009).

## 1.3 Algunas estimaciones de los efectos de las fuerzas evolutivas en las poblaciones naturales

Si la variación genética es diferencial entre poblaciones éstas reflejarán **estructura genética**. El **flujo génico** es una parte fundamental en la estructura de las poblaciones (Slatkin, 1994), y su estimación puede ser llevada a cabo mediante métodos directos e

indirectos (Aguirre, 2007). Los métodos directos se llevan a cabo con base en observaciones o experimentos que pueden medir el grado de dispersión de gametos y de individuos, así mismo, también se pueden hacer análisis de parentesco que pueden identificar padres y después identificar el patrón de movimiento de los genes. Los métodos indirectos por otro lado, pueden dar estimaciones del nivel promedio de flujo génico que se hace a partir de la interacción de éste con otras fuerzas evolutivas, ello para poder predecir cuánto flujo tuvo que haber para que los patrones que se están observando estén presentes en los datos (Slatkin, 1985; Slatkin, 1994; Aguirre, 2007).

Existen modelos teóricos que suponen que los organismos forman poblaciones discretas que son diferenciadas por mutación y deriva génica: **modelo de islas** (Wright, 1943) o metapoblaciones, o bien, modelos donde la relación entre la distancia geográfica y el flujo génico es inversamente proporcional: **aislamiento por distancia** (Aguirre, 2007).

El modelo de islas infinitas (Figura 2) supone que las subpoblaciones intercambian genes en la misma magnitud y con la misma probabilidad (Wright, 1951; Hedrick, 2011; Aguirre, 2007; Eguiarte, 2010). Las poblaciones pueden considerarse como réplicas y el modelo necesita solo de dos parámetros que son el tamaño poblacional ( $N$ ) y la tasa de migración ( $m$ ). El estimador de la relevancia de la deriva génica es  $1/N$  y el del flujo génico es proporcional a  $m$  (Aguirre, 2007, Eguiarte, 2010). En este modelo de islas se considera un equilibrio entre el flujo génico y la deriva. Si  $Nm$  es mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva, al mismo tiempo impidiendo diferenciación local, en cambio, si  $Nm$  es menor que 1 la deriva está actuando en forma casi independiente en cada población (Slatkin, 1994).

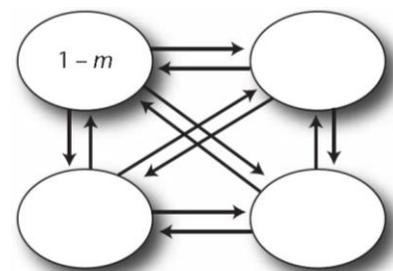


Figura 2. Modelo de islas. Misma tasa de flujo génico entre todas las subpoblaciones. Tomado de Hamilton, 2002.

El modelo de aislamiento por distancia examina la relación del flujo génico entre pares de poblaciones ( $M$ ) con la distancia geográfica (Slatkin, 1993). Bajo este modelo, los valores de  $M$  se estiman a partir de valores de la medida de diferenciación genética  $\theta$  (Weir y Cockerham, 1984) y se aplica una regresión de  $\log_{10}M$  en  $\log_{10}k$  ( $k$ = distancia geográfica) (Figura 3). Para determinar si existe una relación lineal significativa entre el flujo génico y la distancia geográfica entre poblaciones se utiliza comúnmente una prueba de Mantel (1967), debido a que los valores de  $M$  para los diferentes pares de poblaciones no son independientes.

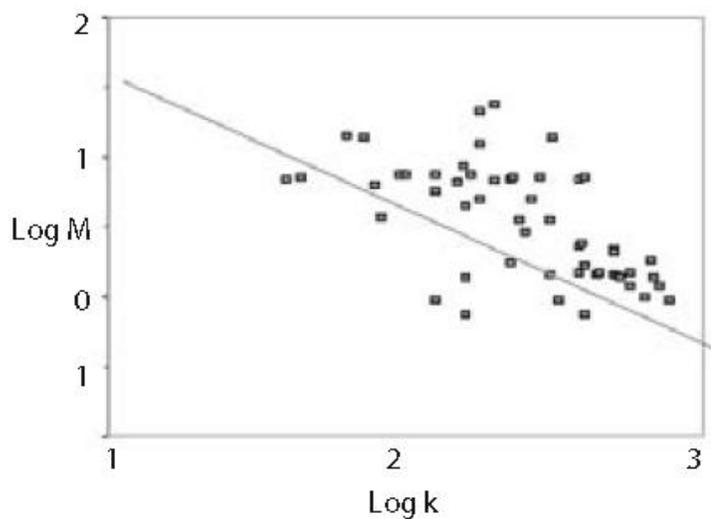


Figura 3. Modelo de aislamiento por distancia. Gráfica entre  $\log_{10}k$  y  $\log_{10}M$ . Tomado de Aguirre, 2007.

#### 1.4 La $G_{ST}$ como medida de la diferenciación entre poblaciones

Los estadísticos  $F$  de Wright (1951) son una medida que permite conocer la estructura poblacional. La  $F_{ST}$  fue originalmente formulada para medir la diferenciación genética de loci bialélicos (Wright, 1969), luego se generalizó para utilizarla con múltiples alelos en un locus, es decir, la  $G_{ST}$  (Nei, 1973). La  $F_{ST}$  y la  $G_{ST}$  pueden considerarse como estimadores equivalentes (Whitlock, 2011)

Esta medida de la diferenciación genética en términos de  $H_S$  se puede definir como

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Donde  $H_S$  y  $H_T$  son las medidas (del conjunto de loci) de las diversidades intrapoblacional y total respectivamente (Franco e Hidalgo, 2003; Whitlock, 2011).

Con dos poblaciones y dos alelos, el rango de valores que puede alcanzar las  $G_{ST}$  es de 0 a 1. Los valores cercanos a 0 indican que no hay diferencias en las frecuencias alélicas entre dos poblaciones; es decir, no hay diferenciación genética y valores iguales o cercanos a 1 indican que en cada población se han fijado alelos diferentes, es decir, existe una alta estructura poblacional (Kane, 2011).

De acuerdo con Wright (1978) y Hartl y Clark (1997), si el valor de  $G_{ST}$  obtenido va de 0.00 a 0.05 indica una ligera diferenciación genética, si va de 0.05 a 0.15 indica una diferenciación genética moderada y si va de 0.15 a 0.25 (y hasta 1) se sugiere una alta diferenciación genética.

## 2 Marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)

Los “acercamientos” moleculares y morfológicos para el estudio de la genética de poblaciones en los grupos biológicos tienen ventajas y también limitaciones. Los datos moleculares tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación (Rentarías, 2007). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

Los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) son marcadores moleculares dominantes mediante los cuales es posible evaluar la variación entre las regiones microsatélite (secuencias repetidas en tándem) en el genoma, particularmente en el nuclear (González y Aguirre, 2007). Los ISSRs son amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante un *primer* de secuencia complementaria a un microsatélite (Figura 4) (Bornet y Branchard, 2001). Una vez que dos microsatélites con orientación invertida están a una distancia amplificable, el *primer* complementario a ellos da paso a la amplificación del segmento de DNA que se encuentra entre ambos, así, se genera un patrón específico para cada individuo en base al polimorfismo detectado con la ausencia o presencia de los productos de amplificación (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Desde los años noventa estos marcadores han sido utilizados (Bornet y Branchard, 2001; Rentarías, 2007). Su uso en estudios de variación poblacional en especies silvestres es relativamente reciente (Rentarías, 2007).

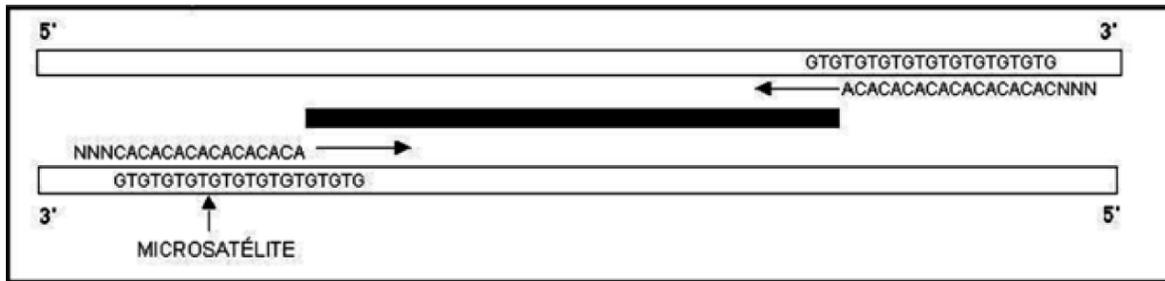


Figura 4. Amplificación con un primer (CA)<sub>n</sub> anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras. Se amplifica el segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélite en orientación invertida (González y Aguirre, 2007).

La probabilidad de encontrar polimorfismos en este tipo de marcadores se debe a que la tasa de mutación en los microsatélites es más alta que en otros tipos de DNA (Zietkiewicz, *et al.*, 1994; Pradeep, *et al.*, 2002). La variabilidad en los ISSR's se puede deber a 1) las mutaciones en el lugar de unión a los *primers*, estos son eventos que pueden generar polimorfismos de presencia o ausencia en la amplificación, 2) los polimorfismos que se encuentran varían con la naturaleza del *primer*, dependiendo de si es anclado o no anclado (*i.e.* si posee nucleótidos adicionales en el extremo 3' o 5' o bien, posee "solo" la secuencia del motivo repetido complementario al microsatélite) (Pradeep *et al.*, 2002).

Como otros marcadores, los ISSRs cuentan con ventajas y desventajas (Bornet y Branchard 2001; Rentarías, 2007). Entre las ventajas de los ISSRs es que tienen un gran número de bandas polimórficas, además, es una técnica altamente repetible (Rentarías, 2007) y de rápida implementación (Dávila *et al.*, 2007). Entre sus desventajas se puede mencionar que las bandas producidas por esta técnica se interpretan como marcadores dominantes, es decir, no es posible conocer el número de individuos heterocigotos. La presencia de una banda significa un individuo heterocigoto u homocigoto dominante y la ausencia de una banda significa un individuo homocigoto recesivo (Rentarías, 2007). Por esta razón no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigotos de los homocigotos dominantes (como  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ ; Wright, 1965).

El uso de los ISSRs se ha extendido en varios tipos de estudios (Dávila *et al.*, 2007), por ejemplo, para la identificación de especies con morfología muy similar (Luque *et al.*, 2002). En el caso específico de los lepidópteros, el uso de estos marcadores ha sido más común en Heterocera (Roux, *et al.*, 2007; Radjabi *et al.*, 2012; Luque *et al.*, 2009 por mencionar algunos) que en Rhopalocera (Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014) (Tabla 1).

Los ISSRs también pueden ser utilizados para la identificación de paternidad y maternidad, mapeo génico, evaluación de diversidad para usos de conservación, subdivisión genética en poblaciones, e identificación de hibridación e introgresión (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000; Pradeep *et al.*, 2002; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2009). Debido a la utilidad de los ISSRs, éstos son marcadores útiles para realizar estudios de variación y estructuración genética, y son ampliamente utilizados en la genética de poblaciones (Luque *et al.*, 2002; Rentarúa, 2007; Machkour-M'Rabet, *et al.*, 2009; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014).

Tabla 1. Algunos estimadores de la variabilidad y diferenciación genética en Lepidoptera a través de los marcadores moleculares ISSRs. % de P = porcentaje de Polimorfismo,  $G_{ST}$  y  $F_{ST}$  = estimadores de diferenciación poblacional,  $Nm$  = flujo génico. H = Heterocera (lepidópteros nocturnos), R = Ropalocera (mariposas diurnas).

Especie	# de loci	% de P	$G_{ST}$	$F_{ST}$	$Nm$	R o H	Familia	Región	Referencia
<i>Samia ricini</i>	-	-	-	-	-	Heterocera	Saturniidae	Tailandia, India y Japón	Wongsorn <i>et al.</i> , 2015
<i>Athetis lepigone</i>	183	95.08	0.0747	-	6.1911	Heterocera	Noctuidae	China	Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>Hyles euphorbiae</i>	28	100	-	-	-	Heterocera	Sphingidae	Norte de África, Europa y Arabia Saudita	Hundsdoerfer <i>et al.</i> , 2005
<i>Bombyx mori</i>	81	77.77	-	-	-	Heterocera	Bombycidae	Irán	Radjabi <i>et al.</i> , 2012
<i>Plutella xylostella</i>	188	100	0.238	-	1.278 - 6.214	Heterocera	Plutellidae	América, Europa, Asia, África y Australia	Roux <i>et al.</i> , 2005
<i>Diarsia brunnea</i>	60	100	0.0075	-	66.07	Heterocera	Noctuidae	Francia	Luque <i>et al.</i> , 2009
<i>Baronia brevicornis</i>	66	100	0.2	-	2.01	Ropalocera	Papilionidae	México	Machkour <i>et al.</i> , 2014
<i>Plutella xylostella</i>	230	62.17 - 86.96	0.0858	-	5.3277	Heterocera	Plutellidae	China	Yang <i>et al.</i> , 2015
<i>Lymantria dispar</i>	102	-	-	0.2543	1.477	Heterocera	Lymantriidae	China	Chen <i>et al.</i> , 2013
<i>Chrysodeixis includens</i>	247	100	-	0.021	23.197	Heterocera	Noctuidae	Brasil	Palma <i>et al.</i> , 2015
<i>Antheraea assamensis</i>	-	30 - 90	-	0.36	-	Heterocera	Saturniidae	India	Singh <i>et al.</i> , 2011
<i>Plutella xylostella</i>	395	89.11	-	-	8.3399	Heterocera	Plutellidae	China	Xun <i>et al.</i> , 2012
<i>Conogethes punctiferalis</i>	211	99	0.053 - 0.2966	-	8.8724	Heterocera	Crambidae	China	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>Antheraea mylitta</i>	-	76.12	0.314	-	1.091	Heterocera	Saturniidae	India	Srivastava <i>et al.</i> , 2009

### 3 Las especies del complejo *Enantia jethys*. Estudios morfológicos, poblacionales y filogenéticos.

#### 3.1 Clasificación taxonómica del género *Enantia* (Hübner, 1819)

El orden Lepidoptera es considerado uno de los órdenes más diversos entre los insectos con aproximadamente 155 mil especies descritas, aunque se estima que existen entre 255 mil a medio millón de especies en el grupo (Llorente-Bousquets *et al.*, 2014).

Uno de los subórdenes de Lepidoptera es Glossata, en el cual se encuentran la gran mayoría de los lepidópteros (Van Niurenken *et al.*, 2011). Este suborden incluye a más de 40 superfamilias, una de ellas es Papilionoidea con siete familias (Van Niurenken *et al.*, 2011) (Figura 5). La familia Pieridae cuenta con cuatro subfamilias; la subfamilia Dismorphiinae a su vez, se subdivide en dos tribus: Leptidini (con un solo género) y Dismorphiini, con seis géneros, incluido *Enantia* (Llorente-Bousquets, 1984) (Figura 5).

*Enantia* es un género de origen neotropical que se compone por las siguientes nueve especies: *E. albania* (Bates, 1864), *E. aloikea* (Brévignon, 1993), *E. citrinella* (Felder & Felder, 1861), *E. clarissa* (Weymer, 1895), *E. jethys* (Boisduval, 1836), *E. limnorina* (Felder & Felder, 1865), *E. lina* (Herbst, 1792), *E. melite* (Linnaeus, 1736) y *E. mazai* (Llorente-Bousquets, 1984) (Lamas, 2004).

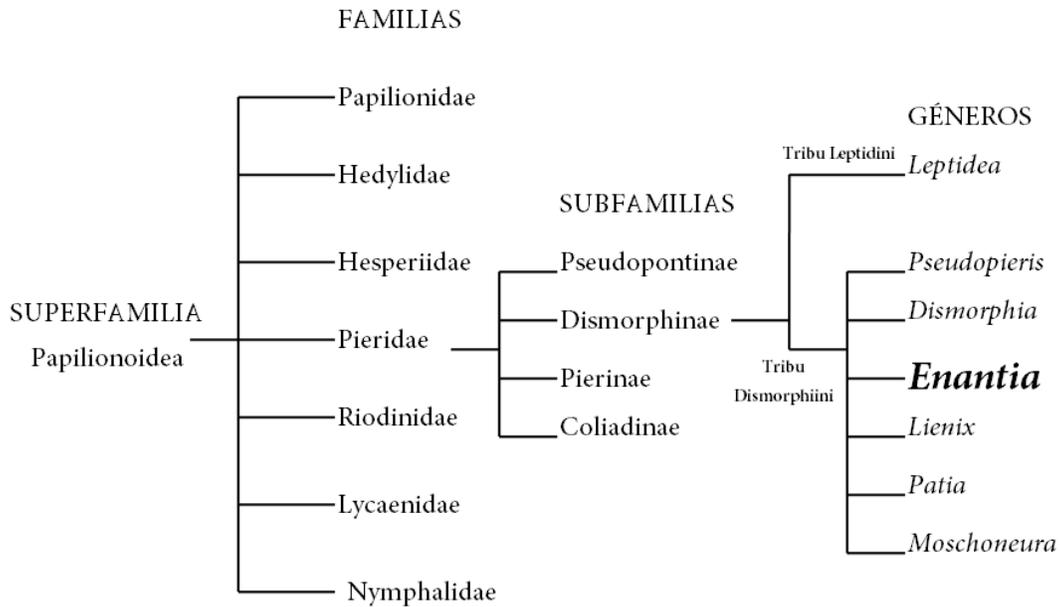


Figura 5. Posición taxonómica del género *Enantia* sin intentar reflejar relaciones filogenéticas entre grupos (basado en Llorente-Bousquets, 1984 y Van Niurenken *et al.*, 2011).

### 3.2 Las especies del complejo *Enantia jethys*

Un complejo de especies es un grupo de entidades taxonómicas relacionadas de las cuales su taxonomía es confusa (Mayr y Ashlok, 1991). Por más de un siglo, han existido numerosos debates sobre la identificación de las especies que hoy se consideran como el complejo *E. jethys*.

Por mencionar algunos casos de desacuerdo en las especies del complejo *Enantia jethys*, Godman & Salvin (1889) consideraron para México a las especies *E. jethys* y *E. albania* posiblemente confundiendo a *E. mazai* con *E. jethys* (Llorente-Bousquets, 1984). Brown (1944) consideró para México sólo una especie altamente variable. Estas identificaciones se basaron en los patrones de pigmentación alar de estas especies.

Llorente-Bousquets (1984) considera para México a las especies *E. albania*, *E. jethys* y *E. mazai*, ésta última con dos subespecies: *E. m. mazai* y *E. m. diazi* (Llorente-Bousquets, 1984). Las principales características morfológicas actuales para definir estas especies, además de los patrones de coloración alar, son también la morfología de los genitales y la estructura de los huevecillos (Llorente-Bousquets, 1984) (Tabla 2, Figura 6).

Tabla 2. Características y distribución de las especies del complejo *Enantia jethys* en México. Llorente-Bousquets, 1984.

Especie o subespecie (Llorente-Bousquets, 1984)	Distribución	Altitud	Color de los huevecillos	Tamaño promedio de envergadura alar	
				Hembras	Machos
<i>Enantia albania</i>	Vertiente del Golfo	De los 0 a los 1300 msnm	Morado	44 mm	45 mm
<i>Enantia jethys</i>	Vertiente del Golfo	De los 1000 a los 1800 msnm	Lila	46 mm	47 mm
<i>Enantia m. mazai</i>	Vertiente del Golfo	De los 0 a los 2000 msnm	Verde pálido	46 mm	47 mm
<i>Enantia m. diazi</i>	Vertiente del Pacífico	-	-	-	-

Los machos de las especies del complejo *E. jethys* presentan un patrón de coloración alar variable, mientras que los patrones de pigmentación de las hembras son menos variables entre ellas (Figura 6). Los ejemplares más melánicos suelen encontrarse en las épocas húmedas y templadas del año, mientras que en las épocas frías y secas se suelen encontrar ejemplares con tonalidades más claras (Llorente-Bousquets, 1984).

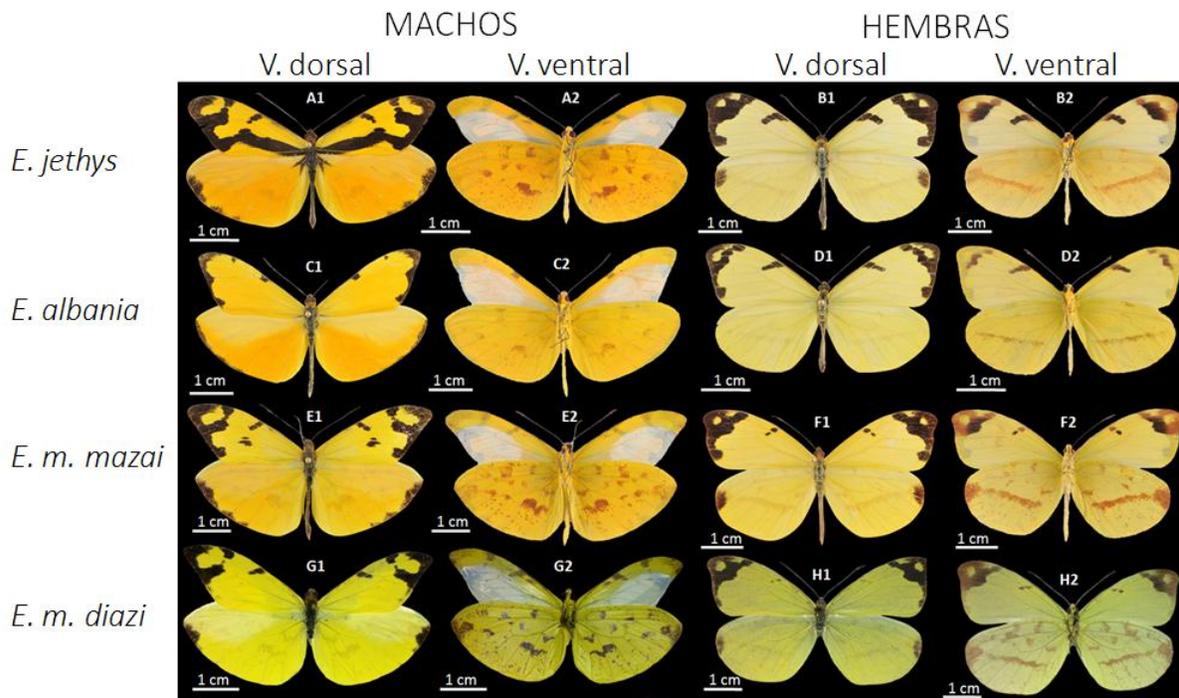


Figura 6. Patrones de coloración alar de las especies del complejo jethys. 1 y 2 = Vista dorsal y ventral respectivamente. A: Ejemplar macho de *Enantia jethys*. B: Ejemplar hembra de *Enantia jethys*. C: *Enantia albania* macho, D: *Enantia albania* hembra. E: *Enantia mazai mazai* macho. F: *Enantia mazai mazai* hembra. G: *Enantia mazai diazi* macho. H: *Enantia mazai diazi* hembra.

*Enantia jethys* y *E. mazai* se encuentran exclusivamente en México, mientras que *E. albania* es de distribución más amplia, ocurriendo desde el centro de México hasta Ecuador (Lamas, 2004). Las subespecies de *E. mazai* descritas por Llorente-Bousquets (1984) no se traslapan geográficamente, ya que mientras *E. m. mazai* se distribuye en la vertiente del Golfo de México al igual que *E. albania* y *E. jethys*, *E. m. diazi* se distribuye en la vertiente del Pacífico (Figuras 7 - 9)

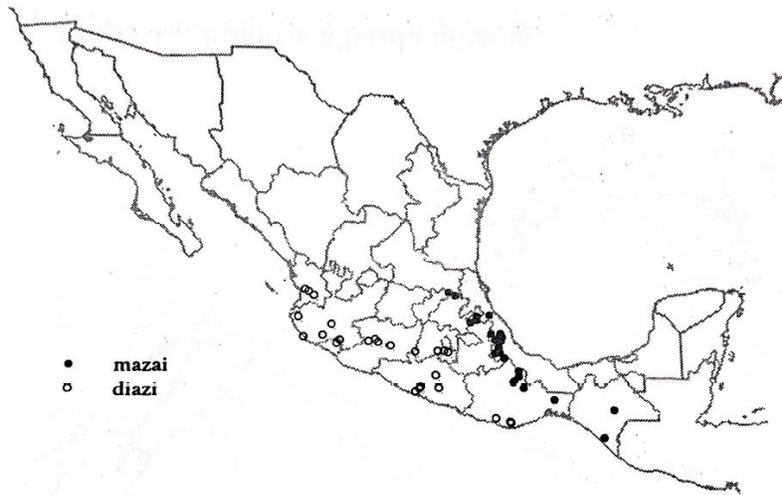


Figura 7. Mapa de distribución de *E. mazai mazai* y *E. mazai diazi*. Se observa que *E. mazai mazai* se distribuye a lo largo de la vertiente del Golfo y *E. mazai diazi* por la vertiente del Pacífico. Tomado de Llorente-Bousquets y colaboradores (1997).

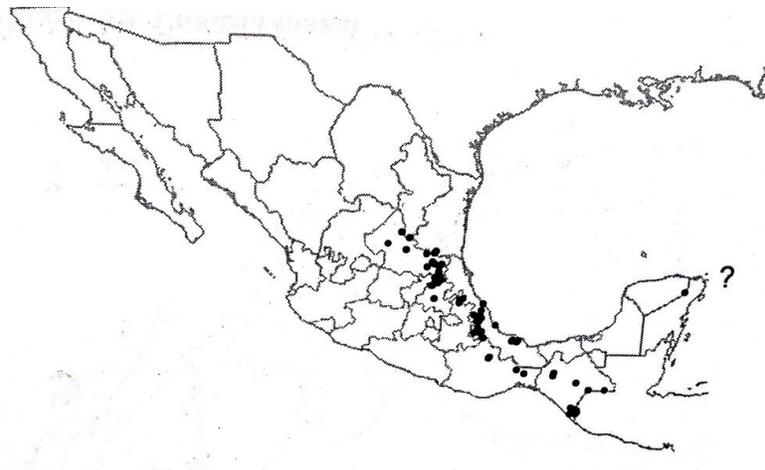


Figura 8. Mapa de distribución de *E. albania*. Tomado de Llorente-Bousquets y colaboradores, 1997.



Figura 9. Distribución de *E. jethys*. Tomado de Llorente-Bousquets y colaboradores, 1997.

Este complejo de mariposas se encuentra principalmente en el bosque mesófilo de montaña, aunque también sus especies suelen estar asociadas a la selva alta perennifolia y la selva mediana subperennifolia (Llorente-Bousquets, 1984). Las larvas de todas las especies del complejo *E. jethys* están asociadas a plantas del género *Inga* para su alimentación. Estas plantas también se utilizan para la oviposición. Los adultos, obtienen alimento de otras plantas de la familia de las compuestas (Llorente-Bousquets, 1984).

La especie más variable tanto geográfica como morfológicamente (patrones de pigmentación alar) es *E. mazai*. Las poblaciones del Pacífico (*E. m. diazi*) son menos variables y menos melánicas, probablemente debido a que es una vertiente más seca en comparación con la del Golfo (Llorente-Bousquets, 1984).

Llorente-Bousquets (1984) describió a *E. mazai* como la especie con más posibilidades de colonización y esperaba un mínimo de flujo génico entre estas poblaciones con las de la otra vertiente, pensando en la posibilidad de que algunos ejemplares tuvieran la capacidad de atravesar la barrera del Istmo de Tehuantepec. Por otro lado, Hernández y colaboradores (2008), mencionan que *E. m. diazi* es de hábitos más exclusivos a una sola

localidad en un estudio en Malinalco, estado de México, (lo que puede ser evidencia de poca capacidad de vuelo para volar largas distancias) en donde, de 12 localidades muestreadas *E. m. diazi* fue exclusiva de una sola localidad. *Enantia m. diazi* se distribuye en varios puntos de la vertiente del Pacífico en México (Figura 7), sin embargo, con base en lo reportado por Hernández y colaboradores (2008), el intercambio de este taxón entre localidades parece ser muy poco frecuente.

### 3.3 Estudios poblacionales del complejo *Enantia jethys* a través de las aloenzimas

Debido a sus hábitos alimenticios estrechamente ligados a *Inga spp* y a que son mariposas con poca capacidad de vuelo para atravesar grandes distancias (Llorente-Bousquets, 1984), las especies del complejo *E. jethys* se pueden considerar con poca vagilidad. Lo anterior podría tener impacto en la estructura de las poblaciones de éstas mariposas; por ejemplo, los machos de las especies de este complejo muestran un comportamiento territorial, lo que de acuerdo con Castañeda (1996), puede causar diferenciación entre subpoblaciones.

Castañeda (1996), investigó la estructura y variación genética del complejo *E. jethys* a través del uso de aloenzimas. Sus resultados respaldaron la propuesta de Llorente-Bousquets (1984), de que el complejo está compuesto por *E. albania*, *E. jethys* y las subespecies *E. m. mazai* y *E. m. diazi*. Sin embargo, las preguntas persistieron debido a que *E. m. mazai* y *E. m. diazi* reflejaron estructura genética alta ( $F_{ST} = 0.132$ ). También, a través de un análisis UPGMA con datos de distancia genética (en un rango de 0.191 a .466), las poblaciones del Pacífico y del Golfo se separaron en dos grupos distintos.

### 3.4 El complejo *Enantia jethys* a través del código de barras

Para conocer por cuántas especies está compuesto el complejo *E. jethys*, Jasso-Martínez (2014) y Jasso-Martínez *et al.* (2016) estudiaron al grupo a través del marcador molecular de la Citocromo C Oxidasa I (COI). Con base en la evidencia encontrado en los trabajos mencionados, se reportó que el complejo *E. jethys* está compuesto por las especies *E. albania*, *E. jethys* y *E. mazai* y *E. sp nov*, esta última con la morfología previamente descrita para la especie *E. albania*, lo que posiblemente corresponde a una especie críptica en el grupo.

Este nuevo taxón en el complejo se recuperó como grupo hermano de *E. mazai* y cuenta con una distancia genética superior a 3% respecto a todas las otras especies en el grupo. En cuanto a *E. mazai*, no se encontró evidencia que apoyara la hipótesis de la existencia de las dos subespecies, ya que se recuperó a *E. m. mazai* y *E. m. diazi* como un solo grupo.

Estos resultados dejaron abierta la pregunta sobre la naturaleza de *E. m. mazai* y *E. m. diazi* y abrieron algunas otras interrogantes tales como ¿Existe una especie no reportada y críptica en el complejo *jethys*? ¿Hay hibridación en el grupo?

### 4. Hibridación en poblaciones naturales

Se considera como híbridos a aquellos individuos producto de poblaciones genéticamente distintas con combinaciones alélicas nuevas (Harrison, 1990; Harrison, 1993; Rhymer & Simberloff, 1996; Roman & Darling, 2007). Los individuos de las poblaciones no híbridas que dan origen a los híbridos, deben ser distinguibles con base en al menos un carácter heredable independientemente de su estatus taxonómico (Harrison, 1990; González, 2007; Harrison & Larson, 2014)

La hibridación puede ser más fácilmente detectada cuando poblaciones que originalmente se encontraban separadas geográficamente, vuelven a tener un segundo contacto (Mallet, 2005). Las poblaciones naturales donde haya individuos consecuencia de eventos de hibridación, así como individuos de ambas formas progenitoras, se conoce como *zona híbrida* (Arnold, 1997).

Un efecto de la hibridación es la introgresión (hibridación introgresiva), esto es el flujo de genes interespecíficos luego de eventos de hibridación y retrocruzamiento (Rhymer & Simberloff, 1996). Se incorporan alelos de una entidad (especie) a otra diferente (Anderson & Hubricht, 1938; Anderson, 1949). Existen estudios que han mostrado que varias especies de animales estrechamente relacionadas comparten una historia de hibridación introgresiva (Good *et al.*, 2008).

La hibridación es relativamente común en varios grupos biológicos, principalmente en plantas (Mallet, 2005), aunque también hay varios casos conocidos en animales (Mallet, 2005; González, 2007). En los insectos, la hibridación ha sido investigada en algunos ordenes como Orthoptera (Kohlmann & Shaw, 1991; Orr, 1996), Hymenoptera (Shoemaker *et al.*, 1996) y Lepidoptera (Cianchi *et al.*, 2003; Hundsdoerfer, 2005; Rougerie *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2014).

En Lepidoptera, de acuerdo con Sperling (1990) y Cianchi y colaboradores (2003), la hibridación en el género *Papilio* es relativamente común. Este fenómeno también ha sido ampliamente estudiado en lepidópteros del género *Heliconius* (lista no exhaustiva: Jiggins *et al.*, 1996; Kronforst *et al.*, 2006; Mallet *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2014).

La hibridación no necesariamente conduce a la introgresión (Kronforst *et al.*, 2006). En mariposas del género *Heliconius* se ha reportado selección en contra de los híbridos (Mallet & Barton 1989; Mallet 1993). Esto coincide con lo reportado por Arnold *et al.*, (1999), que en las poblaciones naturales la hibridación puede no tener un efecto en la

historia evolutiva de las especies y de los híbridos, debido a que éstos tienen pocas probabilidades de producir genotipos con un *fitness* alto.

Se han documentado casos de completa sustitución de genomas de un taxón a otro con una historia de hibridación, como por ejemplo en genomas citoplasmáticos (González, 2007), lo que se conoce como *captura citoplasmática* (Rieseberg & Soltis, 1991; Rieseberg *et al.*, 1996). Este fenómeno también ocurre en animales con el genoma mitocondrial, lo que a su vez se conoce como *captura mitocondrial* (Good *et al.*, 2008; Bryson *et al.*, 2014).

De acuerdo con Harrison y Larson (2014), los límites entre especies en simpatría son semipermeables (permitiendo el flujo génico), y pueden no ser uniformes en espacio, tiempo o a través del genoma, lo que potencialmente puede facilitar la hibridación e introgresión.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar los niveles de variación y diferenciación genética a nivel intra e interespecífico de las especies del complejo *Enantia jethys* provenientes de poblaciones en simpatría a través de ISSR's.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la diversidad genética a nivel intra e interespecífico de las especies del complejo *E. jethys* provenientes de sitios donde las especies de este complejo conviven en simpatría a través de los marcadores ISSRs.
- Conocer los niveles de diferenciación genética y flujo génico entre las especies del complejo *E. jethys* y entre las localidades muestreadas.
- Evaluar los niveles de hibridación entre las especies del complejo *E. jethys* a través de los ISSRs.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Recolección de especímenes

Se recolectaron un total de 355 ejemplares de las especies del complejo *E. jethys* (Tabla 3). *Enantia jethys*, *E. albania* y *E. m. mazai* se encuentran en simpatría en los tres sitios de recolección de Veracruz, en tanto que *E. m. diazi* se encuentra en la vertiente del Pacífico en el estado de Oaxaca (Tabla 3, Figura 10).

Tabla 3. Localidades de recolección de ejemplares de las especies del complejo *jethys*. Abr. = abreviación del nombre de las localidades, CG = Coordenadas Geográficas, nc = ejemplares colectados, na = ejemplares analizados. Los cuatro ejemplares faltantes no tuvieron éxito en la PCR. Las coordenadas se muestran en formato decimal.

Estado	Localidad	Abr.	CG	Altitud (msnm)	Especies							
					<i>E. albania</i>		<i>E. jethys</i>		<i>E. m. mazai</i>		<i>E. m. diazi</i>	
					nc	na	nc	na	nc	na	nc	na
Veracruz	Colonia Álvaro Obregón	CAO	19.41, -96.97	1196	33	33	36	36	41	40	-	-
	Camino Cascada Texolo	CCT	19.41, -96.99	1257	15	15	37	37	51	50	-	-
	Finca Mariposa	FM	19.38, -96.99	1233	27	27	50	50	37	36	-	-
Puebla	Puebla	PUEB	20.25, -97.89	840	1	1	0	0	14	14	-	-
Oaxaca	Oaxaca	OAX	15.89, -96.37	800	-	-	-	-	-	-	13	12
<b>Total [nc = 355, na = 351]</b>					<b>76</b>	<b>76</b>	<b>123</b>	<b>123</b>	<b>143</b>	<b>140</b>	<b>13</b>	<b>12</b>

En el campo, a cada ejemplar -de los recolectados en Veracruz- se le retiró el abdomen y se conservaron en alcohol absoluto a temperatura ambiente durante los 4 días de recolección, posteriormente se les almacenó a 4°C. Los abdomenes de los ejemplares de Puebla y Oaxaca se recolectaron de individuos previamente montados en cajas entomológicas (recolectados en 2014) y se reservaron también en alcohol absoluto a 4°C.

Todos los ejemplares están depositados en la Colección del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, UNAM (MZFC-UNAM). La identificación morfológica de los ejemplares se realizó con base en sus patrones de coloración alar.

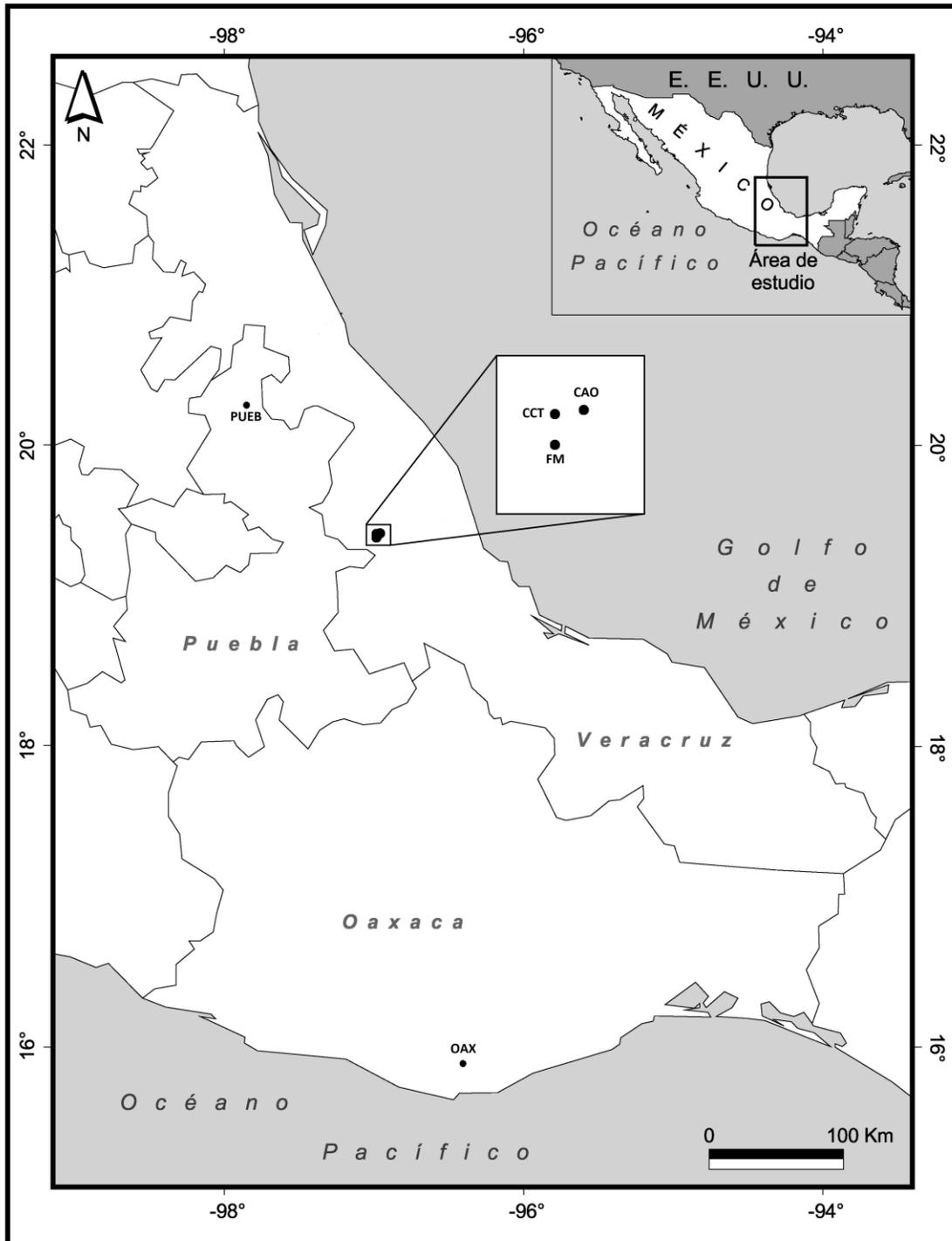


Figura 10. Sitios de muestreo de los ejemplares del complejo *E. jethys*. Tres sitios en Veracruz, uno Puebla y uno de Oaxaca.

## 2. Extracción de DNA

Para todos los individuos, el DNA fue extraído de aproximadamente la tercera parte del abdomen, específicamente de la parte anterior, que se une directamente al tórax.

Previo a la extracción de DNA, cada muestra fue rehidratada en agua ddH<sub>2</sub>O durante una hora. En la extracción de DNA se utilizó un kit comercial “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” de PROMEGA y la extracción se hizo con base en el protocolo para extracción de tejidos animales del fabricante. La integridad del DNA se visualizó a través de electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución buffer TAE 1X. Las electroforesis corrieron por 30 minutos a 150 V (Figura 11). Las muestras de DNA extraído fueron almacenadas a -20°C para su posterior uso en la amplificación.

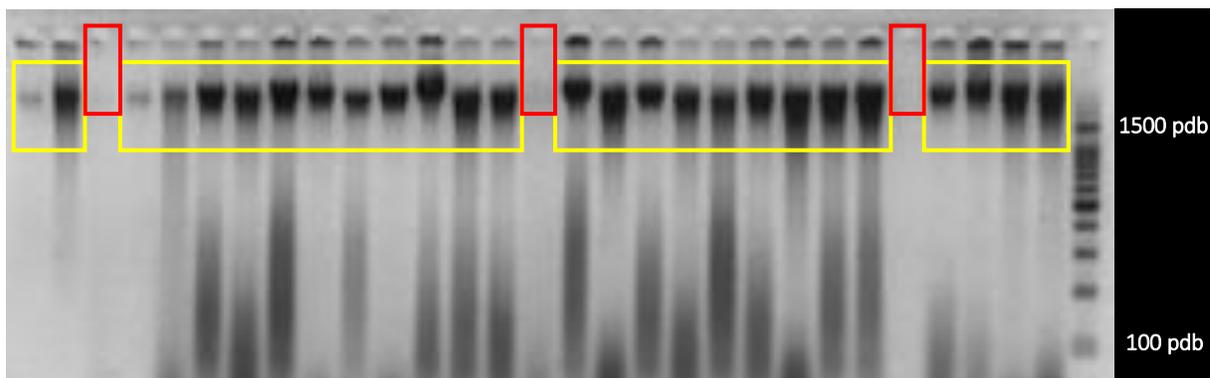


Figura 11. Visualización de la integridad del DNA extraído. Resaltadas en recuadros amarillos se observan las muestras positivas y en recuadros rojos las muestras negativas. Para las muestras negativas se repitió el proceso de extracción y aproximadamente el 90% de ellas resultaron positivas la segunda vez de aplicar el método.

### 3. Amplificación por PCR de los marcadores ISSR

Se probaron 24 marcadores ISSR de los cuales fueron seleccionados dos para este estudio (Tabla 4). Para dicha selección se tomaron en cuenta características tales como número y resolución de bandas, polimorfismo alto y patrones de bandeo característicos y diferentes entre especies (Figuras 12 y 13).

Tabla 4. Marcadores ISSR utilizados en el presente estudio. % de GC = Porcentaje de Guanina y Citosina. Tm = temperatura de fusión, Ta = Temperatura de alineamiento. En el caso de marcador (AG)<sub>8</sub>Y, Y = C o T.

Marcador (5' -> 3')	% de GC	Tm (°C)	Ta (°C)
(GA) <sub>8</sub> C	52.9	56	54
(AG) <sub>8</sub> Y	50	57.6	56

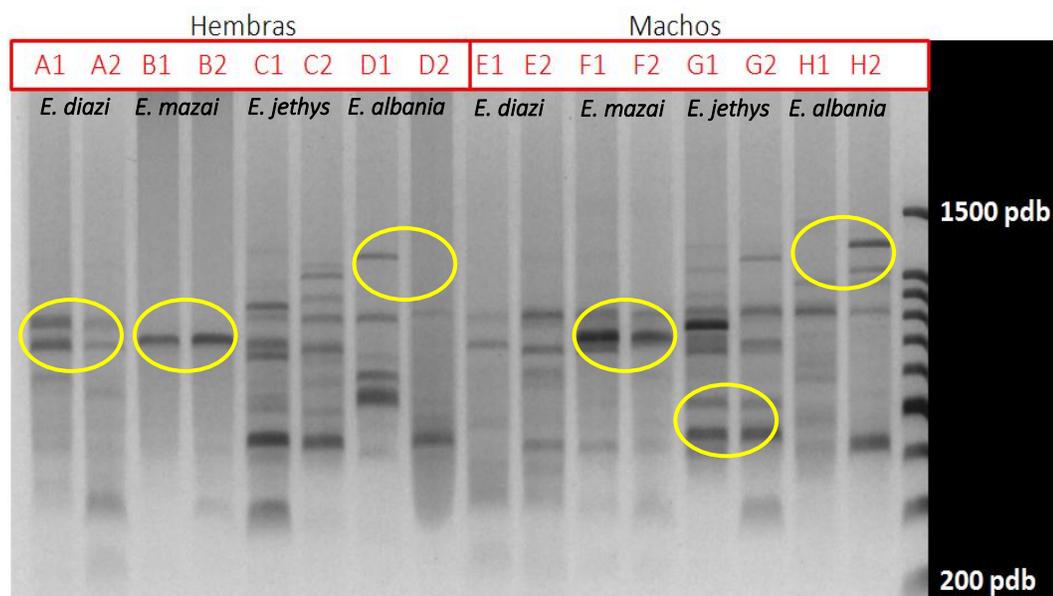


Figura 12. Patrones de bandeo con el marcador (GA)<sub>8</sub>C. A y E = *E. m. diazi*, B y F = *E. m. mazai*, C y G = *E. jethys*, D y H = *E. albania*. En círculos amarillos se señalan los patrones de bandeo más característicos de cada especie.

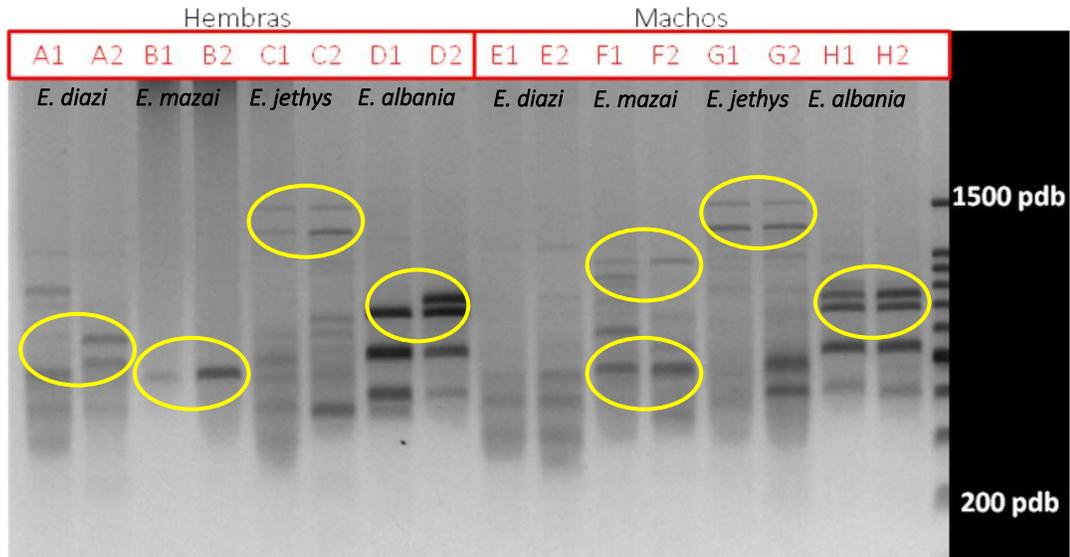


Figura 13. Patrones de bandeo con el marcador  $(AG)_8Y$ . A y E = *E. m. diazi*, B y F = *E. m. mazai*, C y G = *E. jethys*, D y H = *E. albania*. En círculos amarillos se señalan los patrones de bandeo más característicos de cada especie.

La amplificación por PCR se realizó con un volumen de reacción de 15  $\mu$ l [8.9  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O, 1.5  $\mu$ l de Buffer (Promega), 0.3  $\mu$ l de dNTPs (Promega), 0.25  $\mu$ l de GoTaq® Flexi DNA Polymerase, 1.8  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2  $\mu$ l de DNA y 0.3  $\mu$ l del marcador específico (Integrated DNA Technologies®)].

La PCR se llevó a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) de acuerdo al siguiente ciclo: desnaturalización inicial 94°C por 4 min, seguidos de 39 ciclos constituidos por: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, temperatura de alineamiento de 54°C a 56°C dependiendo del marcador utilizado (Tabla 4), temperatura de extensión de 72°C por 2 minutos y finalmente una extensión final a 72°C durante 10 min.

Los productos amplificados se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución Buffer TAE 1X (Promega). Para observar la longitud de los fragmentos separados se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). La migración en los geles se realizó en celdas horizontales de electroforesis (Sub Cell™ Bio-

Rad) a un voltaje constante de 110 V durante 2 horas. Cada pozo en el gel fue llenado con 1.5  $\mu\text{l}$  de DNA amplificado, 1.5  $\mu\text{l}$  de ddH<sub>2</sub>O y 0.8  $\mu\text{l}$  de colorante (Gel Red™ – Química Valaner). Finalmente, cada gel fue visualizado y digitalizado usando el sistema de PhotoDoc-it UVP®

#### 4. Lectura de bandas y construcción de matrices de datos (ISSR's)

La lectura de las bandas de cada uno de los dos marcadores moleculares utilizados se realizó de forma manual. Se realizó una matriz binaria con base en la presencia (1) y ausencia (0) de las bandas observadas en los individuos, donde cada banda representa un locus diferente.

Los nombres de las etiquetas de cada ejemplar aportan la siguiente información: número de muestra, sexo y localidad de la que proviene. Ejemplos: 1) **45MCAO** = #45, Macho, localidad CAO (Veracruz). 2) **125HCCT** = #125, Hembra, localidad CCT (Veracruz).

### 5. Análisis de datos ISSR

#### 5.1 Medidas de diversidad genética

Para conocer la diversidad genética en el complejo *E. jethys* tanto interespecíficamente como entre las localidades se estimó el número de bandas totales ( $B_T$ ), bandas polimórficas ( $B_P$ ) y bandas privadas ( $B_{PRIV}$ ), así como el porcentaje de polimorfismo ( $P$ ). Se trabajó bajo el supuesto del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para la estimación de la heterocigosis total ( $H_T$ ), la heretocigosis esperada ( $H_e$ ) y la diversidad genética de Nei ( $h$ ). Lo anterior se calculó con el programa PopGen 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) y en GeneAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006). Se realizaron análisis de coordenadas principales (PCoA) en GeneAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) para observar el arreglo bidimensional de los individuos de acuerdo a la información genética que aportan los ISSRs.

## 5.2 Medidas de diferenciación genética

Mediante el coeficiente de diferenciación  $G_{ST}$  (Nei, 1973) se estimó el nivel de diferenciación genética entre especies y entre localidades a través del software Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Se estimaron los niveles de flujo génico ( $Nm$ ) entre especies, así también se hizo entre todas las localidades en Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Así mismo, para saber si existe diferenciación genética a nivel de especies y de localidades se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA;  $P \leq 0.05$ ) en GeneAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006).

## 5.3 Structure

Para los mismos datos, se implementó un modelo de agrupamiento bayesiano en Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007). Al implementar este tipo de análisis de puede inferir un número óptimo de agrupaciones (K) (Pritchard *et al.*, 2000). En este trabajo se investigó el valor del K óptimo desde 1 hasta 5 con corridas independientes con un máximo de 100000 pasos de burnin y 100000 pasos de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Se utilizó el modelo de ancestría “*No Admixture Model*” el cual considera a cada individuo como miembro discreto de su propio grupo K a diferencia del “*Admixture Model*” el cual considera que cada individuo contiene una fracción del genoma de los diferentes grupos K.

## 5.4 Aislamiento por distancia

Se realizó un análisis de aislamiento por distancia para observar la relación entre el flujo génico entre pares de localidades con la distancia geográfica aplicando una regresión de  $\log_{10} Nm$  (flujo génico) vs  $\log_{10} km$  (distancia geográfica en km entre pares de localidades por especie) (Slatkin, 1993). Para comparar la matriz de distancia genética con la matriz de distancia geográfica se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967;  $P \leq 0.05$ ) con 9999 repeticiones aleatorias en el programa GeneAlex 6.501 (Peakall y Smouse, 2006).

# RESULTADOS

## 1 Diversidad genética en el complejo *E. jethys*

Del total de ejemplares recolectados (355), 351 amplificaron exitosamente para los marcadores ISSR utilizados, teniendo un porcentaje de éxito del 98.87%. Cada uno de los dos marcadores utilizados mostró 33 bandas teniendo en total 66 bandas (loci) analizables. El marcador (AG)<sub>8</sub>Y fue el que mostró patrones de bandeo más característicos entre especies. A nivel de especie, *E. albania* cuenta con una banda privada mientras que *E. jethys* tiene dos (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de diversidad genética en las especies del complejo *jethys*. N = número de individuos, B<sub>T</sub> = bandas totales en cada especie, B<sub>P</sub> = número de bandas polimórficas y B<sub>PRIV</sub> = bandas privadas.

Especie	N	B <sub>T</sub>	B <sub>P</sub>	B <sub>PRIV</sub>
<i>E. albania</i>	76	64	64	1
<i>E. jethys</i>	123	63	63	2
<i>E. m. mazai</i>	140	61	61	0
<i>E. m. diazi</i>	12	42	40	0

En cuanto a otros parámetros de diversidad, tales como el porcentaje de polimorfismo, a nivel de especie sin hacer distinción de las localidades, se obtuvieron niveles superiores al 95 % para *E. albania* y *E. jethys* (Tabla 6). El valor de heterocigosis esperada ( $H_e$ ) a nivel de especies fue en promedio de 0.188 ( $\pm$  0.009 DS) (Tabla 6). Por último, el valor promedio del índice de diversidad genética de Nei ( $h$ ) fue de 0.2052 ( $\pm$  0.11 D.S) (Tabla 6). La prueba de ANOVA nos indica que los valores de  $H_e$  entre las tres especies (*E. albania*, *E. jethys* y *E. mazai*) presentan una diferencia significativa (ANOVA:  $F = 13.86$ ,  $DF = 2$ ,  $P = .000$ ). La prueba de comparaciones múltiples (Newmans-Keuls) indica que los tres valores se diferencian uno de los otros.

Tabla 6. Parámetros de diversidad genética en las especies del complejo jethys tomando en cuenta todas las localidades. % de  $P$  = Porcentaje de polimorfismo,  $H_T$  = heterocigosis total,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $h$  = diversidad genética de Nei.

Especie	% de $P$	$H_e$	$h$
<i>E. albania</i>	96.97	0.195 ( $\pm$ 0.016)	0.1949 ( $\pm$ 0.13)
<i>E. jethys</i>	95.45	0.254 ( $\pm$ 0.017)	0.2540 ( $\pm$ 0.14)
<i>E. m. mazai</i>	92.42	0.136 ( $\pm$ 0.014)	0.1362 ( $\pm$ 0.11)
<i>E. m. diazi</i>	60.61	0.169 ( $\pm$ 0.022)	0.1688 ( $\pm$ 0.17)
<b>Promedio</b>	<b>86.36 (<math>\pm</math> 8.64)</b>	<b>0.188 (<math>\pm</math> 0.009)</b>	<b>0.2052 (<math>\pm</math> 0.11)</b>
$H_T$		<b>0.2110 (<math>\pm</math> 0.0172)</b>	

También se calcularon parámetros de diversidad genética en cada una de las localidades por cada una de las especies del complejo jethys (Tabla 7-9). *Enantia jethys* es la especie que en todos los casos cuenta con los valores más altos en la medición de los parámetros de diversidad (Tabla 8), mientras que *E. m. mazai* cuenta con los valores de diversidad genética más bajos (Tabla 9).

Tabla 7. Parámetros de diversidad genética de *Enantia albania* en cada una de las localidades. PUEBLA no se contempló porque en esta localidad, esta morfoespecie está solo representada por un solo individuo. % de  $P$  = Porcentaje de polimorfismo,  $H_T$  = heterocigosis total,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $h$  = diversidad genética de Nei. CAO = Colonia Álvaro Obregón, CCT = Camino Cascada Texolo, FM = Finca Mariposa

<i>Enantia albania</i>		% de $P$	$H_e$	$h$
VERACRUZ	CAO	90.63	0.199 ( $\pm$ 0.019)	0.1988 ( $\pm$ 0.1529)
	CCT	90.63	0.203 ( $\pm$ 0.017)	0.2029 ( $\pm$ 0.1333)
	FM	95.31	0.188 ( $\pm$ 0.016)	0.1876 ( $\pm$ 0.1316)
<b>Promedio</b>		<b>92.19 (<math>\pm</math> 1.56)</b>	<b>0.196 (<math>\pm</math> 0.010)</b>	<b>0.2014 (<math>\pm</math> 0.1301)</b>
$H_T$			<b>0.2022 (<math>\pm</math> 0.0163)</b>	

Tabla 8. Parámetros de diversidad genética de *Enantia jethys* en cada una de las localidades. % de *P* = Porcentaje de polimorfismo,  $H_T$  = heterocigosis total,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $h$  = diversidad genética de Nei. CAO = Colonia Álvaro Obregón, CCT = Camino Cascada Texolo, FM = Finca Mariposa

<i>Enantia jethys</i>		% de <i>P</i>	$H_e$	$h$
VERACRUZ	CAO	98.41	0.253 ( $\pm$ 0.018)	0.2414 ( $\pm$ 0.1465)
	CCT	98.41	0.280 ( $\pm$ 0.018)	0.2674 ( $\pm$ 0.1488)
	FM	95.24	0.253 ( $\pm$ 0.018)	0.2415 ( $\pm$ 0.1460)
<b>Promedio</b>		<b>97.35 (<math>\pm</math> 1.06)</b>	<b>0.262 (<math>\pm</math> 0.010)</b>	<b>0.2556 (<math>\pm</math> 0.1409)</b>
$H_T$		<b>0.2563 (<math>\pm</math> 0.0198)</b>		

Tabla 9. Parámetros de diversidad genética de *Enantia m. mazai* en cada una de las localidades. % de *P* = Porcentaje de polimorfismo,  $H_T$  = heterocigosis total,  $H_e$  = heterocigosis esperada y  $h$  = diversidad genética de Nei. CAO = Colonia Álvaro Obregón, CCT = Camino Cascada Texolo, FM = Finca Mariposa

<i>Enantia m. mazai</i>		% de <i>P</i>	$H_e$	$h$
VERACRUZ	CAO	91.80	0.153 ( $\pm$ 0.014)	0.1410 ( $\pm$ 0.1128)
	CCT	95.08	0.129 ( $\pm$ 0.013)	0.1190 ( $\pm$ 0.1017)
	FM	83.61	0.140 ( $\pm$ 0.017)	0.1293 ( $\pm$ 0.1299)
	PUEBLA	65.57	0.179 ( $\pm$ 0.023)	0.1657 ( $\pm$ 0.1776)
<b>Promedio</b>		<b>84.02 (<math>\pm</math> 6.60)</b>	<b>0.150 (<math>\pm</math> 0.009)</b>	<b>0.1383 (<math>\pm</math> 0.1143)</b>
$H_T$		<b>0.1466 (<math>\pm</math> 0.0161)</b>		

## 2 Organización de los individuos en un espacio bidimensional (PCoA) de acuerdo a la información genética aportada por los ISSRs

A continuación se muestran los análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de especie (Figura 14). Este tipo de análisis permiten apreciar la organización de los individuos en un espacio bidimensional de acuerdo a la información genética aportada por los ISSR's.

De manera general, se puede observar que los individuos de la misma especie se agrupan con ellos mismos (Figura 14) por lo que tenemos tres grupos diferenciados (azul, rojo y verde en la figura 14). Al mismo tiempo tenemos una zona de superposición en el centro. Si observamos la misma figura, la mayoría de los representantes de *E. m. diazi* (cruces verdes) se encuentran más cercanos a *E. albania* (rombos azules) y al mismo tiempo, cercanos hacia la zona de superposición de todas las especies.

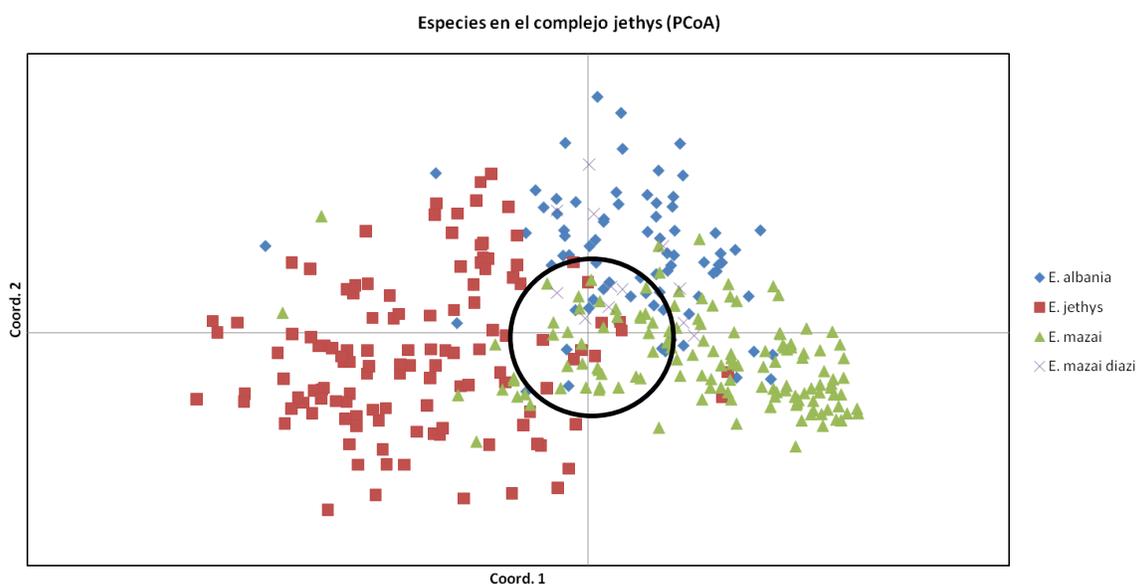


Figura 14. Análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de especie. Rombos azules = *E. albania*, cuadros rojos = *E. jethys*, triángulos verdes = *E. m. mazai* y cruces verdes = *E. m. diazi*. El área rodeada por el círculo corresponde a la zona de superposición en el análisis.

### 3. Estructura genética, flujo génico ( $Nm$ ), aislamiento por distancia y resultados de Structure

El valor de  $G_{ST}$  a nivel interespecífico sin hacer distinción entre localidades fue de 0.1070 (Tabla 10), lo que reveló diferenciación genética. Estos resultados coinciden con los que se obtuvieron en los análisis PCoA. Respecto al flujo génico, se encontró que entre las especies el flujo de genes es de 4.1746 lo cual tiene sentido si se compara con los valores de  $G_{ST}$  obtenidos.

Tabla 10. Comparaciones pareadas de flujo génico ( $Nm$ ) (sobre la diagonal) y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre las especies del complejo jethys. Los valores totales se calcularon tomando en cuenta a todas las especies en conjunto.

	<i>E. albania</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. m. diazi</i>
<i>E. albania</i>	-	11.0953	14.6045	4.1479
<i>E. jethys</i>	0.0431	-	9.4226	4.7449
<i>E. m. mazai</i>	0.0331	0.0504	-	3.8195
<i>E. m. diazi</i>	0.1076	0.0953	0.1158	-
<i>Nm Total</i>				<b>4.1746</b>
<i>G<sub>ST</sub> Total</i>				<b>0.1070</b>

A nivel de especies, la prueba AMOVA mostró estructura genética significativa. Los individuos dentro de cada especie fueron la fuente principal de variabilidad (88%,  $df = 347$ ,  $P = 0.001$ ), por otro lado, el 12% restante de la variabilidad proviene de entre las especies ( $df = 3$ ,  $P = 0.001$ ).

Se calcularon las distancias geográficas entre localidades (Tabla 11) y también la  $Nm$  y la  $G_{ST}$  de cada especie distinguiendo entre localidades (Tablas 12 - 14). En *E. jethys* se encontraron los niveles más bajos de diferenciación poblacional y los valores de flujo génico ( $Nm$ ) más altos (Tabla 13). Por otro lado, *E. m. mazai* cuenta con el valor de diferenciación más alto (Tabla 14).

Tabla 11. Distancia geográfica lineal entre pares de localidades (Km).

Par de localidades	Distancia (km)
CAO – CCT	2.3
CCT – FM	2.7
FM – CAO	3.8
CCT – PUEB	133.8
CAO – PUEB	132.2
FM – PUEB	134.3
FM - OAX	385.6
CAO – OAX	386.8
CCT – OAX	387.4
PUEB - OAX	509.6

Tabla 12. Valores de flujo génico ( $Nm$ ) sobre la diagonal y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre pares de localidades de la especie *Enantia albania*. Los valores totales se calcularon tomando en cuenta a todas las localidades de esta especie en conjunto.

<i>Enantia albania</i>		CAO	CCT	FM
VERACRUZ	CAO	-	19.0570	19.3530
	CCT	0.0256	-	36.6953
	FM	0.0252	0.0134	-
<b><i>Nm Total</i></b>				<b>17.1022</b>
<b><i>G<sub>ST</sub> Total</i></b>				<b>0.0284</b>

Tabla 13. Valores de flujo génico ( $Nm$ ) sobre la diagonal y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre pares de localidades de la especie *Enantia jethys*. Los valores totales se calcularon tomando en cuenta a todas las localidades de esta especie en conjunto.

<i>Enantia jethys</i>		CAO	CCT	FM
VERACRUZ	CAO	-	36.9400	17.4237
	CCT	0.0134	-	34.9124
	FM	0.0279	0.0141	-
<b><i>Nm Total</i></b>				<b>20.0737</b>
<b><i>G<sub>ST</sub> Total</i></b>				<b>0.0243</b>

Tabla 14. Valores de flujo génico ( $Nm$ ) sobre la diagonal y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre pares de localidades de *Enantia m. mazai*. Los valores totales se calcularon tomando en cuenta a todas las localidades de esta especie en conjunto.

<i>Enantia m. mazai</i>		CAO	CCT	FM	PUEBLA
VERACRUZ	CAO	-	41.9240	18.2239	9.7195
	CCT	0.0118	-	20.4534	7.9341
	FM	0.0267	0.0239	-	11.8310
	PUEBLA	0.0489	0.0593	0.0405	-
<b><i>Nm Total</i></b>				<b>8.8412</b>	
<b><i>G<sub>ST</sub> Total</i></b>				<b>0.0535</b>	

Se calcularon también  $Nm$  y  $G_{ST}$  a nivel de localidades donde las especies del complejo conviven en simpatría (localidades veracruzanas). En CCT y FM *E. m. mazai* y *E. albania* presentan mayor flujo génico, por otro lado, en CAO existe mayor flujo de genes entre *E. m. mazai* y *E. jethys*. En cuanto a  $G_{ST}$ , se halló mayor diferenciación entre *E. jethys* y

*E. m. mazai* en las localidades CCT y FM, mientras que en CAO la mayor diferenciación se observa entre *E. albania* y *E. jethys* (Tablas 15 – 17).

Tabla 15. Valores de flujo génico ( $Nm$ ) sobre la diagonal y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre pares de especies del sitio de Veracruz CAO.

CAO	<i>E. albania</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>
<i>E. albania</i>	-	6.9286	8.3000
<i>E. jethys</i>	0.0673	-	10.1938
<i>E. m. mazai</i>	0.0568	0.0468	-
<b><i>Nm Total</i></b>			<b>6.1454</b>
<b><i>G<sub>ST</sub> Total</i></b>			<b>0.0752</b>

Tabla 16. Valores de flujo génico ( $Nm$ ) sobre la diagonal y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre pares de especies del sitio de Veracruz CCT.

CCT	<i>E. albania</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>
<i>E. albania</i>	-	9.0026	11.7083
<i>E. jethys</i>	0.0526	-	5.7035
<i>E. m. mazai</i>	0.0410	0.0806	-
<b><i>Nm Total</i></b>			<b>5.9802</b>
<b><i>G<sub>ST</sub> Total</i></b>			<b>0.0772</b>

Tabla 17 Valores de flujo génico ( $Nm$ ) sobre la diagonal y valores de  $G_{ST}$  (bajo la diagonal) entre pares de especies del sitio de Veracruz FM.

FM	<i>E. albania</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>
<i>E. albania</i>	-	8.4249	9.1061
<i>E. jethys</i>	0.0560	-	6.0162
<i>E. m. mazai</i>	0.0521	0.0767	-
<b><i>Nm Total</i></b>	<b>5.6760</b>		
<b><math>G_{ST}</math> Total</b>	<b>0.0810</b>		

En cuanto a los análisis de aislamiento por distancia, se puede observar que en *E. albania* y *E. jethys* a menor distancia geográfica hay mayor flujo de genes y a mayor distancia menor flujo de genes (Figuras 15 - 17). En estas dos especies, la prueba de Mantel reveló ligera relación negativa y significativa entre la distancia geográfica y el nivel de flujo génico:  $r^2 = 0.009$ ,  $P = 0.001$  y  $r^2 = 0.010$ ,  $P = 0.0001$  respectivamente. En el caso de *E. m. mazai*, la correlación es más sutil, y ésta no es significativa ( $r^2 = 0.003$ ,  $P = 0.209$ ).

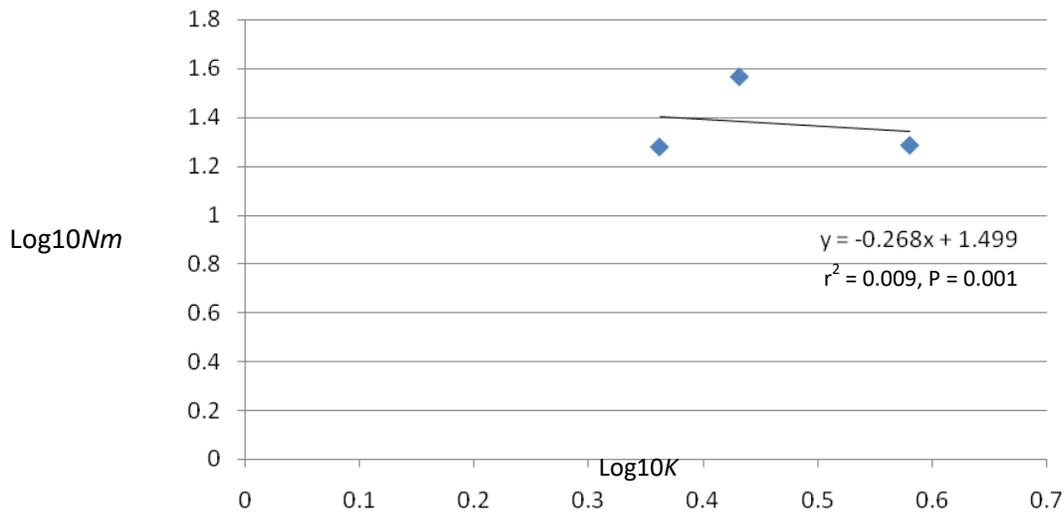


Figura 15. Análisis de aislamiento por distancia.  $K$  = distancia entre pares de poblaciones de *E. albania*. Poblaciones: CAO, CCT y FM.

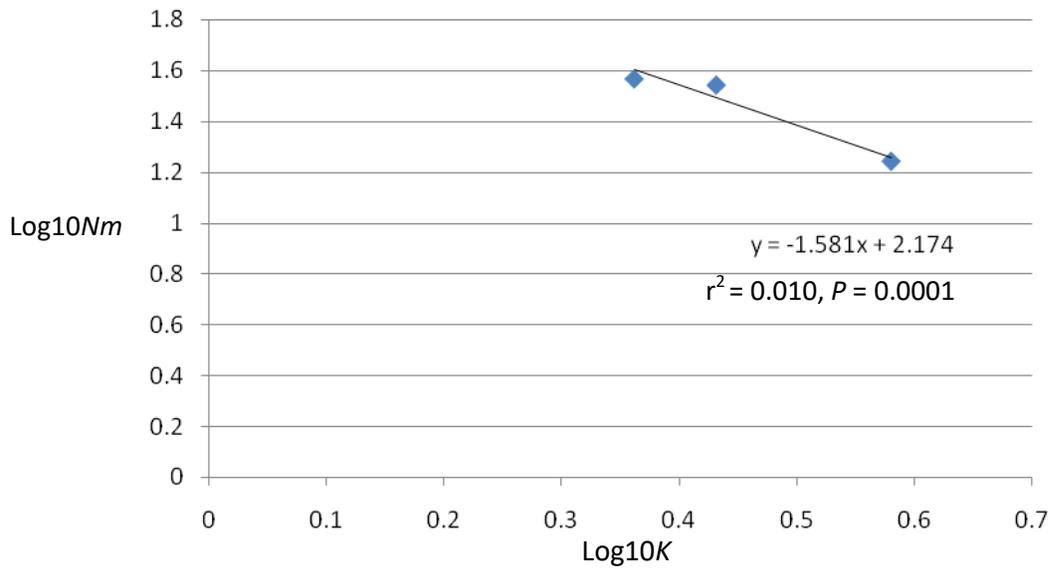


Figura 16. Análisis de asilamiento por distancia.  $K$  = distancia entre pares de poblaciones de *E. jethys*. Poblaciones: CAO, CCT y FM.

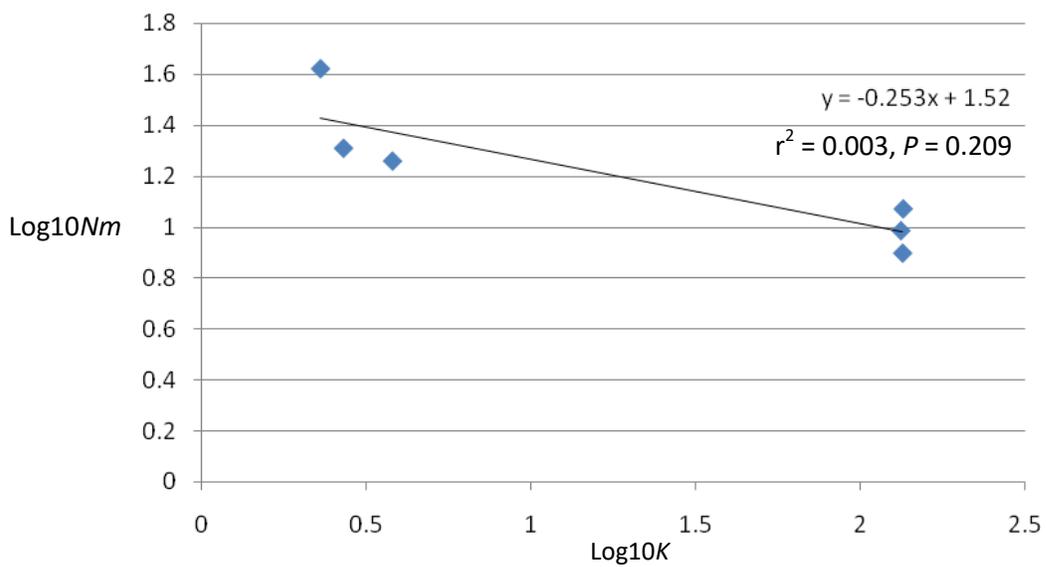


Figura 17. Análisis de asilamiento por distancia.  $K$  = distancia entre pares de poblaciones de *E. m. mazai*. Poblaciones: CAO, CCT, FM y PUEBLA.

Utilizando los ISSR's y un acercamiento bayesiano en el software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007) se definió el número óptimo de grupos (K) que existen en el sistema de estudio. El análisis mostró que K = 3 se ajustó mejor al conjunto de datos sugiriendo que existen tres componentes genéticos y que dichos componentes genéticos coinciden con las morfoespecies analizadas. La representación gráfica obtenida (Figura 18) representa cada nuevo grupo (K) por un color, donde el color azul corresponde a la morfoespecie *E. albania* y *E. m. diazi*, el verde a la morfoespecie *E. jethys* y el rojo a la morfología de *E. m. mazai*.

Teniendo en cuenta que cada barra en el gráfico (Figura 18) corresponde a un individuo, con este análisis podemos saber si el perfil genético de cada individuo corresponde en su totalidad a un mismo grupo K (si la barra completa es de un mismo color), o bien si tiene componentes genéticos de más de un grupo (si la barra se ve de dos o más colores). Ejemplos de individuos con más de un componente genético son señalados en la Figura 18 con flechas. La flecha a la derecha ( $\rightarrow$ ) indica un individuo con más de un componente genético en una proporción mayor o igual ( $\geq$ ) al 10 %. Por otro lado, el individuo señalado con una flecha hacia la izquierda ( $\leftarrow$ ) indica un individuo con un componente genético que no corresponde a su morfoespecie. A estos dos tipos de individuos se les consideró como “individuos con más de una ancestría”.

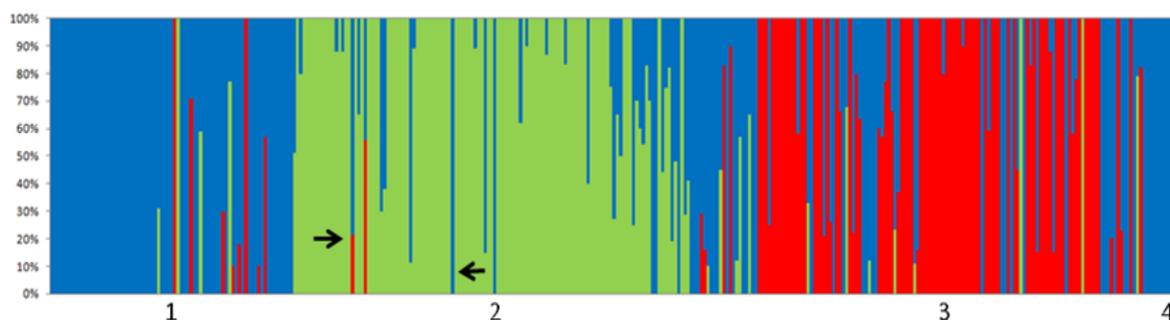


Figura 18. Gráfico de agrupamiento obtenido a través de un modelo bayesiano implementado en STRUCTURE con K = 3. Los grupos K corresponden a los colores azul, verde y rojo. Los número en el gráfico (del 1 al 4 en línea horizontal) corresponden a: 1 = *E. albania*, 2 = *E. jethys*, 3 = *E. m. mazai* y 4 = *E. m. diazi*. Las flechas indican dos ejemplos puntuales de individuos “con más de una ancestría”.

de los 351 individuos analizados, 80 (22.79%) mostraron un perfil genético que cuenta con más de un color, y 40 (11.4%) mostraron un perfil genético diferente en un 100% del perfil genético característico de su morfoespecie, esto dando un total de 34.18% de individuos “con más de una ancestría”.

#### 4 Individuos “con más de una ancestría”

Como se mencionó, los individuos representados por más de un grupo (K) o bien por un componente genético distinto al que representa a su morfoespecie (Figura 18), se tomaron en cuenta como “individuos con más de una ancestría”. Del total de individuos analizados, *E. albania* mostró 14.47 % de individuos de este tipo, *E. jethys* un 31.70% y *E. m. mazai* 50% (Figura 19).

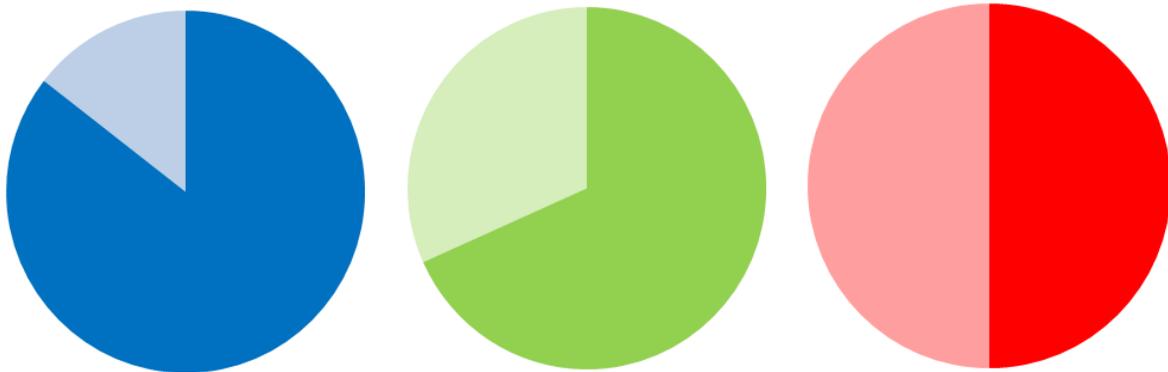


Figura 19. Proporción de individuos “con más de una ancestría” (azul, verde y rojo más claros en las gráficas) en cada una de las morfoespecies. Azul = *E. albania*, verde = *E. jethys*, rojo = *E. m. mazai*.

Todos los individuos de *E. m. diazi* mostraron en su totalidad un componente genético representativo de *E. albania*. Estos individuos no se tomaron en cuenta como “con más de una ancestría” principalmente por el muestreo, el cual fue bastante menor en comparación con las otras especies del complejo *jethys*, y además, es el único integrante del complejo *jethys* que no tienen una distribución simpátrida con las otras especies del grupo. Se necesita más evidencia para definir el estatus de dichos organismos.

Se pudieron observar tres tipos de organismos “con más de una ancestría”: 1) *E. albania* + *E. jethys* + *E. m. mazai*, 2) *E. albania* + *E. jethys*, y 3) *E. albania* + *E. m. mazai*, mostrando que todos los individuos que presentan más de un componente genético, siempre presentan uno que es representativo de *E. albania* (Tabla 18). Por otro lado, nunca se presentaron individuos híbridos con componente genético de *E. jethys* + *E. m. mazai* (Tabla 18).

Tabla 18. Individuos “con más de una ancestría” encontrados en el complejo *jethys*. Total de individuos “con más de una ancestría” = 120. **1CG**, = 1 componente genético diferente a la morfoespecie. **2 o 3 CG** = 2 o 3 componentes genéticos. **E. a** = componente genético total de *E. albania*, **E. j** = componente genético total de *E. jethys*, **E. m** = componente genético total de *E. m. mazai*. **AxJ** = *E. albania* + *E. jethys*, **AxM** = *E. albania* + *E. m. mazai*, **JxM** = *E. jethys* + *E. m. mazai*, **AxJxM** = *E. albania* + *E. jethys* + *E. m. mazai*.

	<i>E. albania</i> (n = 11)						<i>E. jethys</i> (n = 40)						<i>E. mazai</i> (n = 69)					
	1 CG			2 o 3 CG			1 CG			2 o 3 CG			1 CG			2 o 3 CG		
	<i>E. j</i>	<i>E. m</i>	AxJ	AxM	JxM	AxJxM	<i>E. a</i>	<i>E. m</i>	AxJ	AxM	JxM	AxJxM	<i>E. a</i>	<i>E. j</i>	AxJ	AxM	JxM	AxJxM
CAO	-	-	2	-	-	-	-	-	7	2	-	-	10	-	5	5	-	1
CCT	1	1	-	1	-	-	2	-	4	-	-	-	7	-	3	13	-	-
FM	-	1	2	2	-	-	4	-	19	1	-	-	5	2	-	8	-	-
PUE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	1	3	-	-
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>30</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>29</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>29</b>	<b>-</b>	<b>1</b>

Se observa (Tabla 19) que la presencia de los individuos “con más de una ancestría” en la especie *E. albania* no tiene efecto sobre la diversidad de la misma. Esto se infiere debido a que el valor de *h* del total respecto a los individuos “con una ancestría” no cambia: la diferencia de *h* entre individuos con una ancestría y con más de una ancestría no arrojó diferencias significativas al realizar la prueba ANOVA. En *E. jethys* se encontró una ligera pero significativa disminución del valor de *h* en los individuos “con más de una

ancestría”. En *E. m. mazai* se puede observar un importante y significativo aumento del valor de *h* en los individuos “con más de una ancestría”.

Tabla 19. Medidas de diversidad de individuos “con una ancestría”, “con más de una ancestría” y el conjunto de estos (total) para las tres especies en el complejo *jethys*. BT = bandas totales, BR = bandas raras. %P = porcentaje de polimorfismo y *h* = diversidad genética de Nei. Resultados de la prueba ANOVA = ns y s.

	<i>E. albania</i>			<i>E. jethys</i>			<i>E. mazai</i>		
	Total	1 ancestría	+1 ancestría	Total	1 ancestría	+1 ancestría	Total	1 ancestría	+1 ancestría
	n = 76	n = 63	n = 13	n = 123	n = 93	n = 30	n = 140	n = 66	n = 74
<b>BT</b>	64	62	55	63	63	59	61	42	61
<b>BR</b>	6	5	0	3	3	4	14	16	8
<b>%P</b>	97	94	83	95	95	89	92	64	92
<b><i>h</i> ± SD</b>	0.195 ± 0.13	0.193 ± 0.13	0.185 ± 0.13	0.254 ± 0.14	0.263 ± 0.14	0.207 ± 0.15	0.136 ± 0.11	0.071 ± 0.01	0.188 ± 0.14
		No significativo (ns)			Significativo (s)			Significativo (s)	

Se verificó la congruencia de la identificación morfológica respecto a los patrones de bandeo de los ISSR’s y a los agrupamientos en el PCoA tanto de individuos considerados “con una ancestría” como “con más de una ancestría”. Se encontraron algunas incongruencias, es decir, individuos que de acuerdo a la morfología corresponden a una especie y ésta no precisamente corresponde con su identificación a través de estos marcadores moleculares (Tabla 20).

Tabla 20. Revisión de incongruencia en la identificación de especies. ZS = Zona de Sobrelapamiento en el PCoA.

	Muestra	Identificación morfológica	Patrones de bandeo de ISSR's	Posición en PCoA
<b>Con más de una ancestría</b>	45MCAO	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>	ZS
	67MCAO	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
	74HCAO	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. m. mazai</i>
	102MCAO	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
	133MCCT	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
	140MCCT	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	SZ
	156MCCT	<i>E. jethys</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>
	220MFM	<i>E. albania</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. m. mazai</i>
	330MUZ	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
	336MZA1	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	ZS
	340MZA2	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
	<b>Con una ancestría</b>	<b>3MCAO</b>	<b><i>E. albania</i></b>	<b><i>E. jethys</i></b>
65MCAO		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	ZS
69MCAO		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	ZS
103MCAO		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	ZS
117MCCT		<i>E. albania</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. m. mazai</i>
118MCCT		<i>E. albania</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
119MCCT		<i>E. albania</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. albania</i>
129MCCT		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. albania</i>	<i>E. albania</i>
141MCCT		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. albania</i>	ZS
227HFM		<i>E. albania</i>	<i>E. m. mazai</i>	<i>E. m. mazai</i>
230HFM		<i>E. albania</i>	<i>E. mazai</i>	ZS
276MFM		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
300HFM		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	<i>E. jethys</i>
329MAA		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	ZS
337MZA2		<i>E. m. mazai</i>	<i>E. jethys</i>	ZS

# DISCUSIÓN

## 1 Aspectos generales sobre las especies del complejo *Enantia jethys*

Estudios previos sobre el complejo *E. jethys* con base en caracteres morfológicos y moleculares de aloenzimas, apoyaron la existencia de las especies *E. albania*, *E. jethys* y las subespecies *E. m. mazai* y *E. m. diazi* (Llorente-Bousquets, 1984; Castañeda, 1996). Los estudios del complejo *E. jethys* usando COI (Citocromo C Oxidasa I; marcador molecular mitocondrial) (Jasso-Martínez, 2014; Jasso-Martínez *et al.*, 2016) por otra parte, no encontraron evidencias apoyando la hipótesis de las dos subespecies, por lo que se concluyó que el complejo *E. jethys* se conforma por tres especies previamente descritas: *E. albania*, *E. jethys*, y *E. mazai*. También se identificó un taxón adicional como grupo hermano de *E. mazai*, *E. sp nov*, sólo indistinguible morfológicamente de *E. albania*, sugiriendo la existencia de una especie críptica en el grupo.

Aunque existe evidencia que *E. m. mazai* y *E. m. diazi* forman parte de un grupo exclusivo (sensu De Queiroz, 2007) (Jasso-Martínez, 2014; Jasso-Martínez *et al.*, 2016), en la presente investigación ambos integrantes del complejo *E. jethys* se analizaron de manera independiente debido a que *E. m. diazi* es el único miembro del complejo que se encuentra en alopatría con respecto a las otras especies. Lo anterior es importante tomarlo en consideración al estudiar un grupo bajo un enfoque poblacional ya que permite conocer la estructura poblacional y si existe aislamiento genético de las poblaciones debido al factor de distancia geográfica.

Como se ha mencionado, *E. m. mazai* y *E. m. diazi* son un solo linaje evolutivo (Jasso-Martínez *et al.*, 2014; Jasso-Martínez *et al.*, 2016). De acuerdo a la información aportada por los ISSRs, *E. m. diazi* tiene una relación muy estrecha con *E. albania* (resultados del análisis de Structure). Jasso-Martínez (2014) reportó una relación estrecha entre ambos miembros del complejo *jethys* al obtener un grupo de organismos morfológicamente identificados como *E. albania* recuperado consistentemente como grupo hermano de *E. mazai*. Esta relación puede ser explicada como resultado de un

evento de reciente especiación en el grupo, o bien, por medio de eventos de hibridación, mismos que serán desarrollados más adelante.

## 2 Variación genética en las especies del complejo *Enantia jethys*

La utilización de los marcadores moleculares ISSRs para el estudio de la variación poblacional es relativamente reciente (Rentarúa, 2007). El uso de los ISSRs se ha extendido poco a poco (Dávila *et al.*, 2007) y es reconocido como un método efectivo para la resolución de la estructura genética intra e interespecífica (Fang & Roose, 1997; Ge & Sun, 1999; Hundsdoerfer *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2009). Además, los ISSRs se han utilizado en la identificación de especies de lepidópteros morfológicamente similares (Luque *et al.*, 2002). El uso de estos marcadores ha sido más común en lepidópteros nocturnos (lista no exhaustiva: Luque *et al.*, 2002; Roux, *et al.*, 2007; Luque *et al.*, 2009; Radjabi *et al.*, 20012) que en diurnos (Hundsdoerfer & Wink 2005; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014). por lo que la presente investigación es una buena aportación para conocer estos parámetros en mariposas diurnas.

La amplificación de los marcadores ISSRs en el complejo *jethys* fue buena (98.87 % de éxito), teniendo un total de 66 loci analizables con la utilización de dos marcadores. Machkour-M'Rabet y colaboradores (2014) también reportaron 66 loci analizables en la mariposa *Baronia brevicornis*, utilizando tres marcadores. Se ha reportado en mariposas que el *primer* (CA)<sub>10</sub> produce mayor variabilidad en la amplificación (Luque *et al.*, 2002). Este marcador se probó en el complejo *jethys*, pero la amplificación no fue exitosa.

En lepidópteros diurnos y nocturnos se han reportado valores globales de polimorfismo a nivel de especie superiores al 95 % (Roux, *et al.*, 2007; Radjabi *et al.*, 2012; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). Tomando esto como punto de comparación, en las especies del complejo *jethys* se encontraron niveles de polimorfismo

altos ( $\geq 92\%$ ), aunque en *E. m. diazi* el nivel de polimorfismo fue menor en comparación con los otros miembros del complejo. Esto se atribuye al tamaño de muestra (12 individuos) que fue muy bajo. Con el fin de equiparar el tamaño de muestra de cada taxón en el complejo *E. jethys*, se podría hacer un análisis de rarefacción, el cual calcula un número esperado de individuos en cada muestra y reduce el tamaño de muestra mayor para hacerla comparable con las muestras de menor tamaño (Villareal *et al.*, 2006; Kraker-Castañeda y Cobar-Carranza, 2011).

Los ambientes heterogéneos y el intercambio de genes entre poblaciones (migración) probablemente induzcan al mantenimiento de altos niveles de variabilidad genética (*i. e.* polimorfismo y heterocigosidad) (Hedrick *et al.*, 1976; Hedrick, 1986; López *et al.*, 2009). En este sentido, se ha reportado que especies provenientes de poblaciones abiertas (con migración) presentan niveles de polimorfismo altos ( $P = 100\%$ ) (Hundsdoerfer y Wink, 2005) y por otro lado, especies de poblaciones cerradas (sin migración) presentan valores de polimorfismo más bajos ( $P \leq 85\%$ ) (Luque *et al.*, 2009; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014).

De acuerdo con lo anterior, las poblaciones de las especies del complejo *E. jethys* podrían considerarse como poblaciones abiertas, aunque se ha reportado que estas especies tienen capacidad de vuelo limitada (Llorente-Bousquets, 1984). Lo anterior no permite migraciones entre subpoblaciones lejanas, además de ciertos hábitos de los machos, los cuales se muestran territoriales en el lugar de alimentación (Castañeda, 1996). El mantenimiento de niveles de polimorfismo y heterocigosidad altos también se han relacionado a especies con densidad poblacional alta en áreas geográficas restringidas, tal es el caso de la mariposa *Baronia brevicornis* (Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014). Si bien no se han hecho estudios específicos sobre la abundancia y densidad poblacional en las especies del complejo *E. jethys*, se ha observado en el campo que estas especies se distribuyen densamente en sitios restringidos, donde, en el caso específico de este trabajo, se llegaron a recolectar más de 350 ejemplares de las especies del complejo *E. jethys* en el

mismo sitio. Relacionado con lo anterior, se ha reportado que los lepidópteros Papilionoideos suelen ser muy abundantes, tal que llegan a constituir la mitad de la abundancia de especies en algunas áreas de México como la Sierra Nevada (Luna-Reyes y Llorente-Bousquets, 2004).

En cuanto a otras medidas de diversidad genética, tal como la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), en lepidópteros se han reportado valores de 0.099 a 0.233 (Vijayan *et al.*, 2006; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014; Palma *et al.*, 2015). Las especies del complejo *E. jethys* presentan valores de  $H_e$  que se pueden considerar altos (de 0.150 a 0.262). Por otro lado, se han reportado valores de  $H_e$  en diferentes poblaciones de la mariposa *Baronia brevicornis* de 0.18 a 0.25 (Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014), la cual es una mariposa diurna y con poblaciones cerradas, es decir sin migración ya que tienen limitada su capacidad de dispersión. Los valores de  $H_e$  similares entre ésta especie y los de las especies del complejo *E. jethys* también pueden deberse a la densidad poblacional alta.

La diversidad y variación genética en el complejo *E. jethys* ha sido estudiada antes con aloenzimas (Castañeda, 1996). De acuerdo a los datos de dichos marcadores, se reportaron niveles de polimorfismo bajos en *E. jethys* (30 – 40%) y altos en *E. m. diazi* (75 – 100%). En cuanto a la  $H_e$ , en *E. m. diazi* se encontraron niveles  $\leq 0.367$ , en *E. albania*  $\leq 0.161$ , en *E. jethys*  $\leq 0.129$  y en *E. m. mazai*  $\leq 0.157$

Estos resultados (Castañeda, 1996) son comparables en especial en la  $H_e$ , con excepción en lo obtenido para *E. m. diazi*, lo que puede ser debido a las siguientes razones:

**1)** El muestreo, ya que en el estudio del complejo *E. jethys* con base en aloenzimas el muestreo para *E. m. diazi* es más extenso (108 individuos en 4 localidades), y el muestro de *E. jethys* fue más bajo en cuanto a número de individuos (72 individuos con un muestreo heterogéneo en tres localidades: 11, 27 y 34 individuos respectivamente). Además, para la presente investigación, los individuos se recolectaron en Oaxaca, mientras que en la

investigación con aloenzimas se estudiaron individuos de Nayarit. La gran distancia geográfica entre ambos estados (Nayarit y Oaxaca) podría significar diferentes niveles de diversidad genética en las poblaciones que se encuentran ahí. Para profundizar más sobre esto, sería factible estudiar ambas zonas geográficas a través de los mismos marcadores moleculares y con base en un muestreo equivalente.

2) Los ISSRs son marcadores moleculares con tasas de cambio rápidas y no implican secuencias codificantes a lo largo del genoma, mientras que las aloenzimas al tener relevancia en el metabolismo implican zonas conservadas en el genoma.

### 3 Diferenciación poblacional ( $G_{ST}$ ), flujo génico ( $Nm$ ) y patrones de aislamiento por distancia en las especies del complejo *Enantia jethys*

El nivel más alto de diferenciación entre miembros del complejo *E. jethys* sin hacer distinción entre localidades fue entre *E. m. diazi* y *E. m. mazai*. Esto puede ser explicado por la distancia geográfica que existe entre las localidades donde ambos miembros del complejo *E. jethys* se distribuyen, ya que no tienen contacto físico. Ppor un lado, en la vertiente del Golfo de México se puede encontrar a *E. m. mazai* y en la vertiente del Pacífico a *E. m. diazi*. Entre las evidencias adicionales sobre el contacto poco probable entre las poblaciones de las dos vertientes del país están 1) la limitada capacidad de vuelo de estas especies y 2) los hábitos territoriales de los machos en sus sitios de alimentación (Llorente-Bousquets-Bousquets, 1985; Castañeda, 1996).

El nivel más alto de diferenciación genética entre subpoblaciones de la misma especie fue encontrado en *E. m. mazai* ( $G_{ST} = 0.0535$ ). Esto puede ser un factor relacionado con la distancia geográfica entre subpoblaciones, ya que para este miembro del complejo *jethys* se muestrearon localidades en Veracruz y Puebla, mientras que para *E. albania* y *E. jethys* se muestrearon solo poblaciones veracruzanas cercanas entre sí.

*Enantia m. mazai* no mostró un patrón de aislamiento por distancia, mientras que *E. albania* y *E. jethys* sí. Castañeda (1996) al estudiar la variación y estructura genética en distintas poblaciones de las especies del complejo *jethys*, encontró que *E. albania* y *E. jethys* no presentaron un patrón de aislamiento por distancia, y por otro lado, *E. m. diazi* y *E. m. mazai* sí mostraron un patrón significativo de aislamiento por distancia. Si el flujo de genes ocurre solo en poblaciones adyacentes y la deriva génica está en equilibrio con el flujo génico, las diferencias entre las poblaciones se incrementan con la distancia (Slatkin, 1993) lo cual se ve reflejado en una relación inversa entre el flujo génico y la distancia entre pares de poblaciones (Hellerberg, 1994).

La clara diferencia entre ambos resultados puede ser explicada también como un efecto del tipo de muestreo para las diferentes especies del complejo. Por un lado, Castañeda (1996) estudió doce poblaciones continuas de *E. albania* en un rango de distribución más amplio que la presente investigación (Veracruz, Puebla, San Luis Potosí e Hidalgo). En relación a lo anterior, en *E. m. mazai* hay solo una población lejana (Puebla) y con un número de muestra bajo (14 individuos). El bajo número de individuos en esta localidad respecto a las demás puede estar reflejando un nivel de flujo génico sesgado entre ambas zonas.

Castañeda (1996) mencionó que era posible que aun cuando las tres especies convivieran en simpatría, no necesariamente debería existir intercambio de genes. En este estudio se encontró que existe o ha existido flujo génico entre las especies del complejo *E. jethys* que se encuentran en simpatría. También se encontró flujo de genes entre poblaciones geográficamente lejanas (*i.e.* *E. albania* y *E. m. diazi*) lo cual también puede deberse a un ancestro polimórfico en común. Entre estos dos miembros del complejo *E. jethys* no solo se encontró flujo génico, si no que aparentemente el perfil genético de *E. m. diazi* es el mismo que *E. albania* (Structure) contrario a lo que se esperaría (*i. e.* que *E. m. diazi* y *E. m. mazai* se agruparan en el mismo grupo genético).

Siguiendo a Slatkin (1985), los valores de flujo génico ( $Nm$ ) calculados a través de métodos indirectos son un valor promedio de los eventos históricos y actuales. En relación a lo anterior, Llorente-Bousquets (1984) mencionó que de todas las especies del complejo *E. albania* es la más cercana a *E. melite* (grupo externo), esto indica que *E. albania* es el grupo hermano de las otras especies consideradas como parte del complejo *E. jethys* (conservando caracteres plesiomórficos con respecto a los de las otras especies) resultado que también fue observado por Jasso-Martínez (2014) y Jasso-Martínez y colaboradores (2016). Una evidencia adicional a lo anterior es la distribución de *E. albania*, especie con distribución que no es exclusiva de México: la podemos encontrar hasta Ecuador (Lamas, 2004).

*Enantia albania* al ingresar a México tomó dos rutas de dispersión por las vertientes del Golfo y el Pacífico (Llorente-Bousquets, 1984). Este tipo de distribución en México se presenta en otras mariposas como *Batus laodamas*, *Parides erithalion*, *Mimoides ilus*, *Troilides torquatus* y *Protographium agesilaus*, por mencionar algunas (Llorente-Bousquets *et al.*, 1997) y en otros grupos de animales como son los mamíferos (Arteaga *et al.*, 2012).

#### **4 Introgresión por hibridación en las especies del complejo *Enantia jethys***

Como se ha mencionado, se considera como híbridos a aquellos individuos producto de poblaciones genéticamente distintas (entre poblaciones de la misma especie o entre especies) con combinaciones alélicas nuevas (Harrison, 1990; Harrison, 1993; Rhymer & Simberloff, 1996; Roman & Darling, 2007). La hibridación además, puede conducir a la introgresión (hibridación introgresiva) (Rhymer & Simberloff, 1996), es decir, a la incorporación de alelos de especie a otra (Anderson & Hubricht, 1938; Anderson, 1949).

Los ISSRs han sido una buena herramienta para estudiar la hibridación en este trabajo. Estos marcadores moleculares se ha utilizado antes para el estudio de eventos en diferentes grupos biológicos (Barilani *et al.*, 2006; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2009; Liu *et al.*,

2014; Sutrowska *et al.*, 2015) incluido el grupo de las mariposas (Hundsdoerfer, 2005). Estos eventos con patrones asimétricos han sido también observados en diferentes grupos biológicos (Burgess *et al.*, 2005; Tagane *et al.*, 20085) y también en mariposas (Deering y Scriber, 2002).

En el estudio de Jasso-Martínez (2014) sobre el complejo *E. jethys* utilizando COI se obtuvieron grupos no monofiléticos y un grupo de individuos morfológicamente identificados como *E. albania* recuperado consistentemente como grupo hermano de *E. mazai*, sugiriendo eventos de introgresión por hibridación entre las especies del complejo, causando posiblemente eventos de captura mitocondrial, tal como se ha observado en algunas especies de animales (Good *et al.*, 2008; Bryson *et al.*, 2014).

Castañeda (1996) reportó la observación de un evento de cruce interespecífica entre *E. m. mazai* y *E. jethys* en Teocelo, Veracruz; sin embargo no se tienen mayores datos sobre la frecuencia de dichos eventos ni sobre la viabilidad de los descendientes. Durante el periodo de recolecta de ejemplares para la presente investigación, se capturó una pareja de mariposas mostrando una cruce interespecífica entre un macho *E. albania* y una hembra *E. m. mazai*.

La incongruencia entre la morfología y los patrones de bandeo de los ISSRs llevaron a sospechar hibridación entre las especies del complejo *jethys*. Se pudo verificar que estas incongruencias ocurren tanto en organismos “con una ancestría” como en “individuos con más de una ancestría” (análisis en Structure).

Es importante mencionar que la mayoría de las incongruencias entre morfología vs patrones de bandeo de ISSR's ocurrieron en *E. m. mazai* y *E. jethys*. Morfológicamente (patrones de coloración de las alas) ambas se pueden diferenciar de acuerdo a la descripción de Llorente-Bousquets (1984). Si solo se tuviera la información de los ISSRs, en algunos casos, ambas especies serían muy difíciles de diferenciar (Figura 20), lo cual es

interesante debido a que, de acuerdo a la información de estos mismos marcadores, la hibridación siempre involucra a *E. albania*.

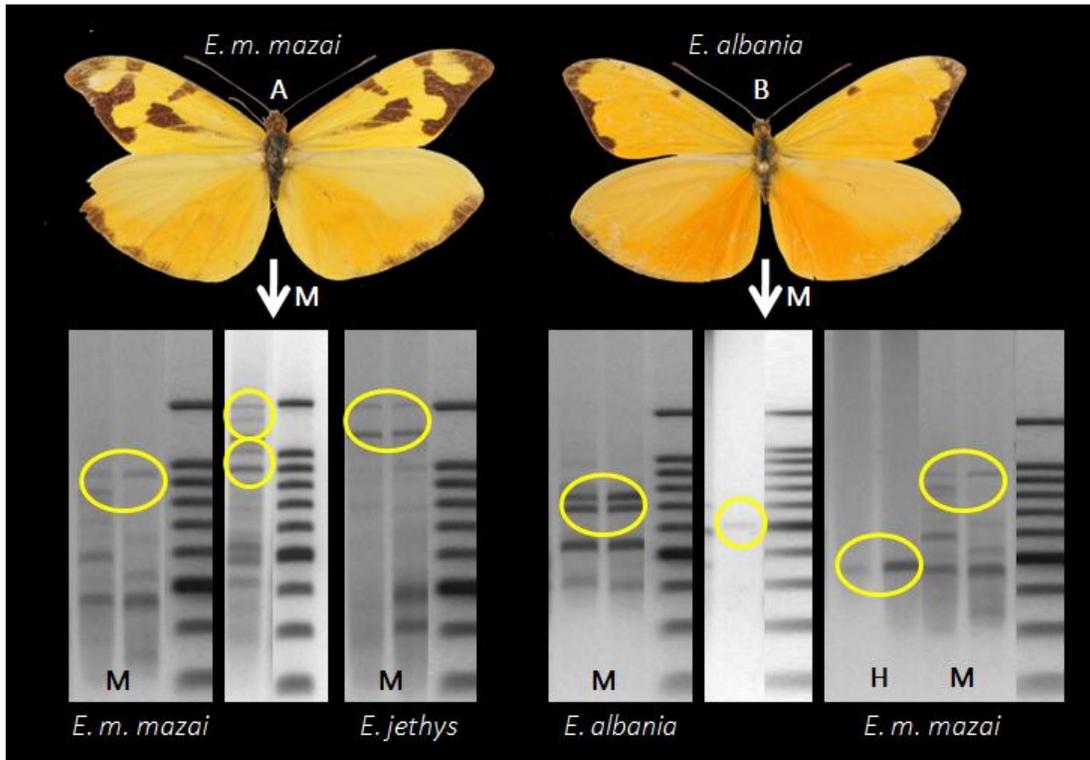


Figura 20. Morfoespecies con patrones de bandeo característicos de otras morfoespecies (geles señalados con flechas). A) macho *E. m. mazai* con patrones de bandeo característicos (enmarcados en color amarillo) de *E. m. mazai* (Izq.) y de *E. jethys* (Der.). B) macho *E. albania* con un patrón de bandeo característico no solo de otra especie (*E. m. mazai*) si no que presenta bandas características de las hembras (gel de la derecha).

Los resultados del enfoque bayesiano fueron la evidencia más contundente sobre la existencia hibridación que conllevó a la introgresión, incorporando alelos de una especie (*E. albania*) a las demás en el complejo (*E. mazai* y *E. jethys*). Respecto a la hibridación por sí misma, las cruza interespecíficas parecen tener direccionalidad: *E. albania* puede hibridar con las otras dos especies, mientras que entre *E. jethys* y *E. m. mazai* no pueden hibridar entre ellas. Lo anterior se ve respaldado también por los niveles de flujo génico, los cuales son mayores entre *E. albania* con las otras especies que entre *E. jethys* y *E. mazai* respectivamente.

## 5 Efecto genético de la presencia de los individuos “con más de una ancestría” en las especies del complejo *Enantia jethys*

En este trabajo se ha observado flujo de genes entre especies. El flujo génico como fuerza evolutiva determina en cierta medida hasta qué grado una población local puede mantenerse como una unidad evolutiva independiente (Slatkin, 1994). Se espera que la entrada de nuevos alelos en una población aumente su diversidad a nivel local. Dado lo anterior, se esperaría que la presencia de individuos “con más de una ancestría” en las especies del complejo *jethys* tenga efectos sobre la diversidad genética de las mismas, es decir, que la diversidad aumente.

Respecto a lo anterior, se observó un cambio significativo en la diversidad genética ( $h$ ) de *E. m. mazai* debido a la presencia de individuos “con más de una ancestría”, es decir, la presencia de estos organismos tiende a aumentar la  $h$  en la especie, además de que es la especie con el mayor porcentaje de individuos “con más de una ancestría” (*i. e.* híbridos). Este aumento de la diversidad genética en *E. mazai* puede ser la explicación de que morfológicamente sea la especie más variable, encontrándose en este trabajo hasta cinco tipos diferentes en los machos (Figura 21). La alta variabilidad morfológica en *E. mazai* ya ha sido reportado anteriormente (Llorente-Bousquets, 1984).

Caso contrario en *E. jethys*. La presencia de organismos “con más de una ancestría” en la morfoespecie parece disminuir la diversidad total de la misma. Esto puede deberse a lo siguiente. De acuerdo a los resultados mostrados, *E. jethys* es la especie más diversa de las especies del complejo *jethys*; los individuos híbridos en la morfoespecie *E. jethys* tenderán a ser menos diversos en combinación con los alelos de las otras especies ya que éstas tienen índices de diversidad más bajos. No así con *E. m. mazai*, ya que esta es la especie menos diversa, en los híbridos de esta morfoespecie la diversidad genética de los organismos “con más de una ancestría” es mayor respecto al otro tipo de organismos (con

una ancestría). Al incorporar alelos del genoma de las otras especies que son más diversas que *E. mazai*, aumenta de manera significativa su diversidad.



Figura 21. Cinco tipos morfológicos diferentes de machos de *E. m. mazai*. Este taxón en el complejo cuenta con el porcentaje más alto de “individuos con más de una ancestría”. Se observó que la presencia de estos individuos aumenta los niveles de  $h$  en el taxón.

## CONCLUSIONES

- Los taxones en el complejo *E. jethys* tienen altos niveles de polimorfismo y  $H_e$ , siendo *E. jethys* la especie con la más alta diversidad.
- *Enantia mazai mazai* es el miembro del complejo con más alta diferenciación genética entre subpoblaciones, mientras que *E. jethys* es la especie con mayor flujo de genes entre subpoblaciones.
- *Enantia albania* y *E. m. diazi* comparten un gran componente genético.
- Existe evidencia de flujo genético interespecífico alto entre las especies del complejo *E. jethys*.
- En *E. albania* y *E. jethys* existe un patrón de aislamiento por distancia.
- Entre las especies del complejo *E. jethys* se observa introgresión por hibridación con un patrón direccional, donde *E. jethys* y *E. mazai* comparten alelos con *E. albania*.
- La presencia de los organismos “con más de una ancestría” tiene efecto sobre las especies del complejo aumentando o disminuyendo su diversidad.

## FUENTES CONSULTADAS

- Aguirre, E. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En *Ecología Molecular-Semarnat-Ine-UNAM-Conabio*, Compiladores: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. INE, UNAM. México.
- Anderson, E. (1949). *Introgressive hybridization*. New York: Wiley and Sons.
- Anderson, E. Hubricht, L. (1938). Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *Am J Bot.* 25: 396-402.
- Arias, C. F., Salazar, C., Rosales, C., Kronforst, M. R., Linares, M., Bermingham, E., & McMillan, W. O. (2014). Phylogeography of *Heliconius cydno* and its closest relatives: disentangling their origin and diversification. *Molecular ecology*, 23(16), 4137-4152.
- Arnold, M.L. (1997). *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Nueva York.
- Arnold, M. L., Bulger, M. R., Burke, J. M., Hempel, A. L., & Williams, J. H. (1999). Natural hybridization: how low can you go and still be important?. *Ecology*, 80(2), 371-381.
- Arteaga, M. C., Piñero, D., Eguiarte, L. E., Gasca, J., & Medellín, R. A. (2012). Genetic structure and diversity of the nine-banded armadillo in Mexico. *Journal of Mammalogy*, 93(2), 547-559.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11, 155 – 165.
- Barilani, M., Sfougaris A., Giannakopoulos A., Mucci, N., Tabarroni C., Randi, E. (2006). Detecting introgressive hybridization in rock partridge populations (*Alectoris graeca*) in Greece through Bayesian Admixture analyses of multilocus genotypes. *Conservation Genetics*. 8: 343-354.
- Bornet, B., Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 209-215.
- Brown, F.M. (1944). Notes on Mexican Butterflies, II, Pieridae. *Journal of the New York Entomological Society*. 52: 99–119.
- Bryson, R. W., Smith, B. T., Nieto-Montes de Oca, A., García-Vázquez, U. O., & Riddle, B. R. (2014). The role of mitochondrial introgression in illuminating the evolutionary history of Nearctic treefrogs. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172(1), 103-116.
- Burgess, K.S., Morgan, M., Deverno, L., Husband, C. (2005). Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance. *Molecular Ecology*. 14, 3471-3483.
- Castañeda, A. (1996). *Estructura genética en el complejo "jethys" (LEPIDOPTERA: PAPILINOIDEA; Enantia) en México*. Tesis para obtener el grado de doctora en Ecología. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chen, F., Shi, J., Luo, Y., Sun, S., Pu, M. (2013). Genetic characterization of the gypsy moth from China (Lepidoptera, Lymantriidae) using Inter Simple Sequence Repeats Markers. *PLoS ONE* 8(8): e73017
- Chen, F., Ahmed, T., Liu, Y., He, K., Wang, Z. (2014). Analysis of genetic diversity among different

- geographic populations of *Athetis lepigone* using ISSR molecular markers. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 17: 793-798.
- Cianchi, R., Ungaro, A., Marini, M., & Bullini, L. (2003). Differential patterns of hybridization and introgression between the swallowtails *Papilio machaon* and *P. hospiton* from Sardinia and Corsica islands (Lepidoptera, Papilionidae). *Molecular Ecology*, 12(6), 1461-1471.
- Dávila, M., Castillo, M., Laurentín, H., (2007). Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Rev. Fac. Agron.* 33:93-111.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), 879-886.
- Deering, M. & Scriber, M. (2002). Field bioassays show heterospecific mating preference asymmetry between hybridizing North American *Papilio* Butterfly species (Lepidoptera: Papilionidae). *Journal of Entomology*. 20: 25-33.
- Eguiarte, L. (1999). Una guía para principiantes en genética de poblaciones. *Evolución biológica*. Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio. 457 p.
- Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheivar, E., González, A., Souza, V. (2010). *Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas*. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, K., (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7, pp. 574-578.
- Fang, D. & Roose, M. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 408-417.
- Franco, T., Hidalgo, R. (2003). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. *Boletín técnico no.8*. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 89 p.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Ge, X.J. & Sun, M. (1999). Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology*. 8, 2061-2069.
- Godman, F. D, and O. Salvin. 1889-1890. *Biologia Centrali Americana*. Zoología, Insecta, Lepidoptera, Rophalocera. Natural History Museum (London). Vol II (text) and Vol. III (images).
- González, A. (2007). Ecología evolutiva de las zonas de hibridación. En *Ecología Molecular-Semarnat-Ine-UNAM-Conabio*, Compiladores: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. INE, UNAM. México.
- González, A. y Aguirre, X. (2007). Inter Simple Sequence Repeats (ISSR's). En *Ecología Molecular-Semarnat-Ine-UNAM-Conabio*, Compiladores: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. INE, UNAM. México.

- Good, J. M., Hird, S., Reid, N., Demboski, J. R., Stepan, S. J., MARTIN-NIMS, T. R., & Sullivan, J. (2008). Ancient hybridization and mitochondrial capture between two species of chipmunks. *Molecular Ecology*, 17(5), 1313-1327.
- Hamilton, M. (2009). *Population Genetics*. Editorial Wiley-Blackwell.
- Harrison, R.G. (1990). *Hybrid zones: window on evolutionary process*. In: Futuyma, D. Antonovics, J. editors. Oxford surveys in evolutionary biology. Vol 7. New York: Oxford University Press. P. 69 – 128.
- Harrison, R. G. (1993). *Hybrid zones and the evolutionary process*. New York: Oxford University Press.
- Harrison, R. G. & Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809.
- Hartl, D., Clark, A. (1989). *Principles of Population Genetics*. Segunda Edición. Editorial Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick, P. W., Ginevan, M. E., & Ewing, E. P. (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1-32.
- Hedrick, P. W. (1986). Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annual review of ecology and systematics*, 535-566.
- Hedrick, P. (2011). *Genetics of Populations*. Jones and Barlett Publishers, LLC. United States of America.
- Hellerberg, M. E. (1994). Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution*. 48: 1829-1854.
- Hernández-Mejía, C., Llorente-Bousquets Bousquets, JE., Vargas-Fernández I. Luis-Martínez, A. (2008). Las mariposas (Hesperoidea y Papilinoidea) de Malinalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 79: 117 – 130.
- Hoffmann, C. (1940). Catálogo sistemático y zoogeográfico de los lepidópteros mexicanos. Primera Parte. Papilionoidea. *Anales del Instituto de Biología*, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología. No. 11.
- Hundsdoerfer A, Wink M (2005). New source of genetic polymorphisms in Lepidoptera. *Z Naturforsch*. 60:618–624.
- Hundsdoerfer, A. K., Kitching, I. J., & Wink, M. (2005). The phylogeny of the Hyles euphorbiae complex (Lepidoptera: Sphingidae): molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints. *Organisms Diversity & Evolution*, 5(3), 173-198.
- Jasso-Martínez, JM. (2014). *Estudio genético del complejo jethys (LEPIDOPTERA: PAPILIONOIDEA; Enantia) a través del Código de Barras*. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jasso-Martínez, JM, Castañeda-Sortibrán A.N., Pozo C., García-Sandoval R., Prado B.R., Luis-Martínez A., Llorente-Bousquets-Bousquets J., & Rodríguez-Arnaiz R. (2016). The Enantia jethys complex (Lepidoptera: Pieridae): insights from COI confirm the species complex and reveal a new potential cryptic species. *Southwestern Entomologist*. Vol. 41, No. 4.
- Jiggins, C. D., McMillan, W. O., Neukirchen, W., & Mallet, J. (1996). What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. himera* (Lepidoptera:

- Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 59(3), 221-242.
- Kohlmann, B. y D. Shaw. (1991). The effect of a partial barrier on the movement of a hybrid zone. *Evolution* 45:1606-1617.
- Kraker, C., & Cobar, A. J. (2011). Uso de rarefacción para comparación de la riqueza de especies: el caso de las aves de sotobosque en la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá, Guatemala. *Naturaleza y Desarrollo*, 9(1), 62-70.
- Kronforst, M. R., Young, L. G., Blume, L. M., & Gilbert, L. E. (2006). Multilocus analyses of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. *Evolution*, 60(6), 1254-1268.
- Lamas, G. (2004). *Atlas of Neotropical Lepidoptera, Checklist: Part 4A, Hesperioidea – Papilionoidea*. Association for Tropical Lepidoptera, Scientific Publishers, Gainesville, Florida, 439 pp.
- Liu, T., Chen, Y., Chao, L., Wang, S., Wu, W., Dai, S., Wang, F., Fan, Q., Zhou, R. (2014). Extensive Hybridization and Introgression between *Melastoma candidum* and *M. sanguineum*. *PLoS ONE*. 9(S): e96680.
- Llorente-Bousquets, J.E. (1984). Sinopsis, Sistemática y Biogeografía de los Dismorphiinae de México con especial referencia al género *Enantia* Huebner (Lepidoptera: Pieridae). *Folia Entomológica Mexicana*. No. 58:3-206
- Llorente-Bousquets, J. (1997). *Papilionidae y Pieridae de México: distribución geográfica e ilustración*. UNAM.
- Llorente-Bousquets J.E., Castro J. (2007). Estudios de sistemática de Dismorphiini (Lepidoptera: Pieridae) I: Morfología de huevos y su importancia taxonómica. *Zoología*. Vol XXXI. No. 118.
- Llorente-Bousquets, J., Vargas-Fernández, I., Luis-Martínez, A., Trujano-Ortega, M., Hernández-Mejía, B. C., & Warren, A. D. (2014). Biodiversidad de Lepidoptera en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 353-371.
- López Romero, G., Santacruz Varela, A., Muñoz Orozco, A., Castillo González, F., Córdova Téllez, L., & Vaquera Huerta, H. (2009). Perfil isoenzimático de maíces nativos del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. II. Variación dentro de grupos. *Revista fitotecnica mexicana*, 32(3), 177-188.
- Luna-Reyes, M. y Llorente-Bousquets, J.E. (2004). Papilionoidea (Lepidoptera: Rophalocera) de la Sierra Nevada, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 20(2): 79-102.
- Luque, C. Legal, L., Staudter, H., Gers, C., Wink, M. (2002). Brief report ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*. 136: 251–253.
- Luque C, Legal L, Machkour-M'Rabet S, Winterton P, Gers C, Wink M (2009) Apparent influences of host plant distribution on the structure and the genetic variability of local populations of the Purple Clay (*Diarsia brunnea*). *Biochem Syst Ecol* 37:6–15
- Machkour, S., Hénaut, Y., Charruau P., Gevrey, M., Winterton, P., Legal, L. (2009). Between introgression events and fragmentation, islands are the last refuge for the American crocodile in Caribbean Mexico. *Marine Biology*. 156: 1321-1333.
- Machkour, S. Leberger, R. (2014). Population structure and genetic diversity of the only extant Baroninae swallowtail butterfly, *Baronia brevicornis*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Conservation*. 18:385–396.

- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in ecology & evolution*, 20(5), 229-237.
- Mallet, J., Beltrán, M., Neukirchen, W., & Linares, M. (2007). Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 28.
- Mallet, J., and N. H. Barton. 1989. Strong natural selection in a warning color hybrid zone. *Evolution* 43:421–431
- Mayr E., Ashlok P. D. (1991). *Principles of Systematic Zoology*. Segunda Edición. McGraw Hill, Inc. USA.
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 221: 40-42
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 70: 3321-3323.
- Nieuwerkerken EJ van, Kaila L, Kitching IJ, Kristensen NP, Lees DC, Minet J, Mitter C, Mutanen M, Regier JC, Simonsen TJ, Wahlberg N, Yen S-H, Zahiri R, Adamski D, Baixeras J, Bartsch D, Bengtsson BÅ, Brown JW, Bucheli SR, Davis DR, De Prins J, De Prins W, Epstein ME, Gentili-Poole P, Gielis C, Hättenschwiler P, Hausmann A, Holloway JD, Kallies A, Karsholt O, Kawahara AY, Koster SJC, Kozlov M, Lafontaine JD, Lamas G, Landry J-F, Lee S, Nuss M, Park K-T, Penz C, Rota J, Schintlmeister A, Schmidt BC, Sohn J-C, Solis MA, Tarmann GM, Warren AD, Weller S, Yakovlev RV, Zolotuhin VV, Zwick A. (2011). Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang Z. -Q. (Ed.), *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 3148: 212-22
- Orr, M.R. (1996). Life-history adaptation and reproductive isolation in a grasshopper hybrid zone. *Evolution* 50:704-716.
- Palma J, Maebe K, Guedes JVC, Smagghe G (2015) Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an Important Soybean Defoliator in Brazil. *PLoS ONE*. 10(3): e0121260
- Peakall, R. y Smouse, E. (2006). GeneA1Ex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, pp. 288-295.
- Pradeep R., Sarla N. y Siddiq E.A. (2002). Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17
- Pritchard, K., Stephens, M. y Donnelly, J. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp. 945–959.
- Radjabi R, Sarafrazi A, Tarang A, Kamali K, Tirgari S. (2012). Intraspecific biodiversity of iranian local races of silkworm *Bombyx mori* by ISSR (inter-simple sequence repeat) molecular marker. *World J Zoo.l* 7:17–22.
- Tagane, S, Hiramatsu, M., Okubo, H. (2008). Hybridization and asymmetric introgression between *Rhododendron ericarpum* and *R. indicum* on Yakushima Island, southwest Japan. *Journal of Plant Research*. 121: 387-395.
- Rentaría, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En *Ecología Molecular-Semarnat-Ine-UNAM-Conabio*, Compiladores: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. INE, UNAM. México.

- Rieseberg, L.H. y D.E. Soltis. (1991). Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5:65-84.
- Rieseberg, L.H., J. Whitton y C.R. Linder. (1996). Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. *Acta Botanica of the Netherlands* 45:243-262.
- Rhymer JM, & Simberlov, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst.* 27:83–109.
- Roman, J. & Darling, J. (2007). Paradox lost: genetics diversity and the success of aquatic invasions. *TRENDS in Ecology and Evolution.* Vol. 22 No. 9.
- Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D, Legal L (2007). ISSR-PCR: tool for population identification and genetic structure of *Plutella xylostella*. *Mol Phylogenet Evol.* 43(1):240–250.
- Simpson J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 60:73-76.
- Singh YT, Mazumdar-Leighton S, Saikia M, Pant P, Kashung S, *et al.* (2012) Genetic Variation within Native Populations of Endemic Silkmoth *Antheraea assamensis* (Helfer) from Northeast India Indicates Need for In Situ Conservation. *PLoS ONE* 7(11): e49972.
- Shoemaker, D., K.G. Ross y M.L. Arnold. (1996). Genetic structure and evolution of a fire ant hybrid zone. *Evolution* 50:1958-1976.
- Shukla, A. (2009). *Population Genetics*. Discovery Publishing House.
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure. En *Ecological Genetics*, Editado por L. Real. Princeton.
- Srivastava, A. K., Kar, P. K., Sinha, R., Sinha, M. K., & Vijayaprakash, N. B. (2009). Assessment of Genetic Diversity in Different Populations of Raily Ecorace of Indian Tasar Silkworm, *Antheraea Mylitta Drury* Using ISSR Markers. *International Journal of Industrial Entomology*, 19(2), 249-253.
- Sutkowska, A., Pasierbinski, A., Baba, W., Warzecha, T., Mitka, J. (2015). Additivity of ISSR markers in natural hybrids of related forest species *Bromus benekenii* and *B. ramosus* (Poaceae). *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica.* 57(1): 82-94.
- Vijaya, k., Anuradha, H. J., Nair, C. V., Pradeep, A.R., Awasthi, A.K., Saratchandra, B., Rahman, S.A.S., Singh, K.C., Chakraborti, R., Raje Urs, S. (2006). Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science.* 6 (1), 30.
- Villarreal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., ... & Umaña, A. M. (2006). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. *Manual de Métodos Para el Desarrollo de Inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia*, 185-226.

- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Whitlock, M. (2011).  $G'_{ST}$  and  $D$  do not replace  $F_{ST}$ . *Molecular Ecology*. 20, 1083 – 1091.
- Wolfe A., 2000. ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- Wongsorn D., Saksirirat, W., Sirimungkararat, S., Urairong, H. (2015). Screening for eri silkworm (*Samia ricini* Donovan) ecoraces using morphological characters, growth, yields, and ISSR marker. *Songklanakarin J. Sci. Technolo.* 37 (5), 499-505.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15:323-354.
- Wright S., (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420
- Wright, S. (1969). Evolution and Genetics of Populations, Vol. 2. *The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Xun, Z., JiaQiang, Y., QingJun, W., JianHong, L., ShaoLi, W., ZhaoJiang, G., ... & FengShan, Y. (2012). Genetic diversity of different geographical populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from China based on ISSR analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 55(8), 981-987.
- Yeh, C., Yang, R. y Boyle, J. (1999). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129, pp.157.
- Ying, Z., Jing, L., ZhenYing, W., & KangLai, H. (2010). Genetic diversity of *Conogethes punctiferalis* (Guenée)(Lepidoptera: Crambidae) populations from different geographic regions in China. *Acta Entomologica Sinica*, 53(9), 1022-1029.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. y Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

# ANEXOS

## 1 Hidratación de tejido de abdómenes

- En tubos de 1.5 microlitros agregar 600 microlitros de agua ultrapura
- Cortar un tercio del abdomen previamente reservado en alcohol (de la parte donde el abdomen se une al tórax) y colocar la muestra en el tubo con agua.
- Dejar que el tejido se hidrate por 1 hora

## 2 Extracción de DNA

- En tubos eppendorf nuevos agregar 120 microlitros al 0.5 M de “EDTA solution”(pH 8.0) y 500 microlitros de “Solution nuclei lysis”.
- Reservar 20 minutos en el congelador y después mezclar en el vórtex por 20 segundos.
- Agregar a cada tubo el tejido que fue rehidratado.
- A cada tubo añadir 18 microlitros de proteinasa K.
- Dejar incubar toda la noche.
- A cada tubo agregar 2.5 microlitros de “RNAsa solution” y meclar invirtiendo los tubos de 2 a 3 veces.
- Incubar las muestras por 20 minutos a 37° C.
- Dejar enfriar las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 200 microlitros de “Protein precipitation solution” y agitar en el vórtex por 20 segundos.
- Enfriar en el congelador por 5 minutos.
- Centrifugar por 4 minutos a 13 mil revoluciones por minuto (rpm) a 17° C.
- Remover sobrenadante y transferirlo a nuevo tubo junto con 600 microlitros de isopropanol.

- Mezclar el contenido invirtiendo los tubos de 2 a 3 veces.
- Centrifugar por 1 minutos a 13 mil rpm a 26° C.
- Decantar el sobrenadante y desecharlo.
- Al pelle agregar 600 microlitros de alcohol al 70% y mezclar.
- Centrifugar por 1 minuto a 13 mil rpm y eliminar sobrenadante.
- Dejar secar el nuevo pellet hasta que se evapore el alcohol restante (en caso de que lo haya) por 40 minutos.
- Agregar 100 microlitros de “DNA rehidratation solution”.
- Incubar a 65° C por 1 hora.
- Almacenar DNA de 2 a 8 ° C (en el congelador).

Nota: Para verificar que la extracción haya sido exitosa se hicieron pruebas de electroforesis para todas las muestras (geles al 1%)

### 3 Preparación de geles de agarosa

#### Geles grandes (160 ml)

- Verificación de extracción de DNA (1%) = 1.6 gr de agarosa + 4 ml de TAE + 156 ml de agua destilada
- Lectura de bandas de la amplificación para los ISSR's (2%) = 3.2 gr de agarosa + 4 ml de TAE + 156 ml de agua destilada

#### Geles chicos (90 ml)

- Verificación de extracción de DNA (1%) = .90 gr de agarosa + 2.25 ml de TAE + 87.75 ml de agua destilada

- Lectura de bandas de la amplificación para los ISSR's (2%) = 1.80 gr de agarosa + 2.25 ml de TAE + 87.75 ml de agua destilada

#### 4 Electroforesis (ISSR's)

El DNA extraído fue de alta concentración por lo que se tuvo que diluir cada muestra de los productos amplificados en agua ultrapura

- Cargar cada pozo del gel con 3 microlitros de la muestra con los productos amplificados (1.5 microlitros de DNA + 1.5 microlitos de agua ultrapura) + 0.8 microlitros de colorante
- Dejar correr las muestras por 2 horas con 15 minutos a 110 V

**Colorante:** Cada 500 microlitros de colorante contienen 20 microlitros de Gel Red.