

Introgresión genética y especiación de *Heliconius hecalesia* (Hewitson [1854]) (Lepidoptera: Heliconiinae) en zonas de hibridación en el occidente de Colombia*


Luis Miguel Constantino¹ & Sandra Constantino²


Resumen

Objetivo: aclarar el estatus taxonómico de *Heliconius gynaesia* y *H. longarena* dentro del grupo de “*hecalesia*” y conocer la delimitación genética y geográfica de las subespecies. **Metodología:** se realizaron observaciones directas en campo en las áreas de distribución de las diferentes subespecies de *H. hecalesia* en Colombia. Para comparar los diferentes morfotipos se realizaron cruces genéticos en condiciones de invernadero entre las poblaciones de *H. hecalesia hecalesia* del Magdalena medio, con las poblaciones de *H. hecalesia longarena* de la región del Chocó biogeográfico en el occidente de Colombia. **Resultado:** se presentan y discuten los cruces genéticos de los diferentes fenotipos obtenidos de un mismo cruce parental y retrocruce, del cual fue posible reconstruir las formas *gynaesia* y *ernestus*, que son consistentes con el patrón de coloración a los especímenes tipo. Todos los fenotipos estudiados están involucrados en un nuevo complejo mimético con *Tithorea tarricina* y *Neruda godmani*, el cual es descrito en este artículo. El aislamiento reproductivo de las poblaciones del suroccidente de Colombia que se manifiesta mediante esterilidad híbrida e inviabilidad en los cruces artificiales, proporciona una fuerte evidencia y soporte para el reconocimiento de *H. longarena n. comb* como una buena especie como parte de este estudio. Se coloca a *H. hecalesia gynaesia* en sinonimia **n. syn** con *H. longarena* por tratarse de un híbrido natural.

Palabras clave. hibridación, introgresión, esterilidad híbrida, especiación, *Heliconius*, Colombia

* FR: 14-VII-2020. FA: 6-IX-2020

¹ Museo Entomológico Marcial Benavides, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia. e-mail: luismiguel.constantino@cafedecolombia.com  orcid.org/0000-0001-8117-5803 **Google Scholar**

² Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Biología, Bogotá. e-mail: sconstan@javeriana.edu.co  orcid.org/0000-0003-1352-5386 **Google Scholar**



CÓMO CITAR:

CONSTANTINO, L.M. & CONSTANTINO, S., 2020.- Introgresión genética y especiación de *Heliconius hecalesia* (Hewitson [1854]) (Lepidoptera: Heliconiinae) en zonas de hibridación en el occidente de Colombia. *Bol. Cient. MusHist. Nat. U. de Caldas*, 24 (2): 206-230. <https://doi.org/10.17151/bccm.2020.24.2.14>.



Genetic introgression and speciation of *Heliconius hecalesia* (Hewitson [1854]) (Lepidoptera: Heliconiinae) in hybridization areas in western Colombia

Abstract

Objective: to clarify the taxonomic status of *Heliconius gynaesia* and *H. longarena* within the "*hecalesia*" group and to know the genetic and geographical delimitation of the subspecies. **Methodology:** direct observations were made in the field in the distribution areas of the different subspecies of *H. hecalesia* in Colombia. To compare the different morphotypes, genetic crossings were carried out in greenhouse conditions between the populations of *H. hecalesia hecalesia* from the middle Magdalena river, with the populations of *H. hecalesia longarena* from the Choco biogeographic region in western Colombia. **Result:** the genetic crosses of the different phenotypes obtained from the same parental crossing and backcrosses are illustrated and discussed, of which it was possible to reconstruct the *gynaesia* and *ernestus* forms, which are consistent with the pattern of coloration to the type specimens. All the phenotypes studied are involved in a new mimetic complex with *Tithorea tarricina* and *Neruda godmani*, which is described in this article. The reproductive isolation of the populations of southwestern Colombia that is manifested by hybrid sterility and unfeasibility in artificial crosses, provides strong evidence and support for the recognition of *H. longarena n. comb* as a good species as part of this study. *H. gynaesia* is placed in synonymy **n. syn** with *H. longarena* because it is a natural hybrid.

Key words. hybridization, introgression, hybrid sterility, speciation, *Heliconius*, Colombia.

INTRODUCCIÓN

El género *Heliconius* es uno de los grupos de mariposas más estudiados a nivel de sistemática, genética, biología, coevolución, especiación, mimetismo y ecología de poblaciones (Brown, 1981; Mallet y Gilbert, 1995; Jiggins, Naisbit, Coe y Mallet, 2001; Rosser, Kozak, Phillimore y Mallet, 2015). Los análisis filogenéticos del género *Heliconius* basados solo en ADN son contradictorios en cuanto al número de especies y relaciones filogenéticas. Por ejemplo, Lamas (2004) indica que hay 40 especies, Rosser et al., (2015) registran 42 sp., y Kozak et al. (2015) reportan 45 sp., ya que incluyen a *Neruda godmani*, *N. aoede*, *N. metharme* y *Laparus doris* dentro del género *Heliconius*, a pesar de que estas presentan características morfológicas y venación alar diferentes (Figura 1). Sobre este aspecto, los biólogos moleculares y taxónomos siempre se ven enfrentados al dilema de cómo definir, interpretar o reconocer una buena especie, la cual varía o depende de los diferentes puntos de vista o corriente filosófica y científica.

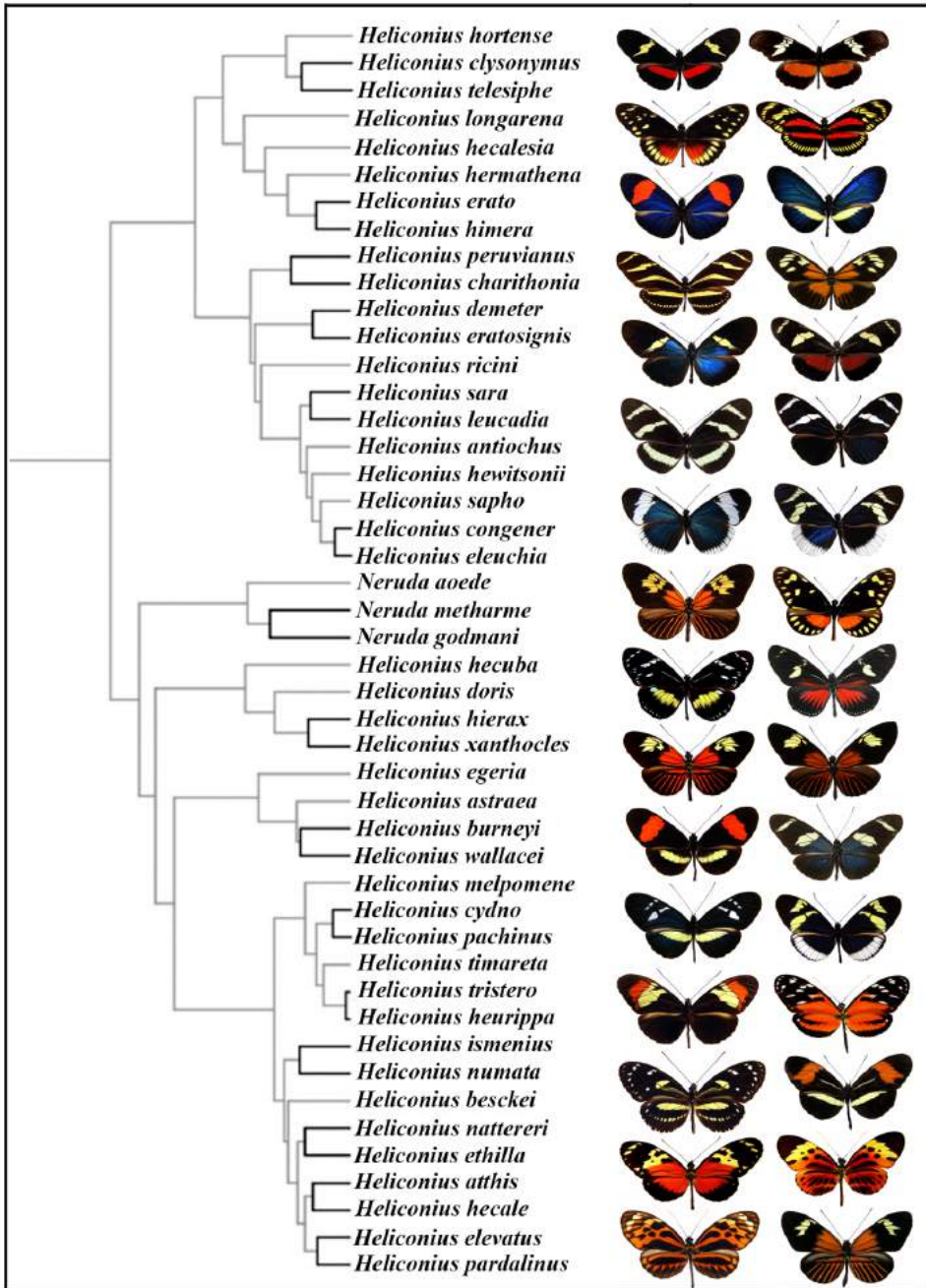


Figura 1. Análisis filogenético actualizado del género *Heliconius* (adaptado de Kozak et al. 2015).

De acuerdo a Dobzhansky (1937) y Mayr (1942) la especie biológica es un grupo o población natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines. El asumir una especie como biológica, implica evolutivamente asumir que es una población reproductivamente aislada, por lo que constituye un linaje evolutivo separado y que es reforzado por una serie de barreras que pueden ser de carácter geográfico o biológico. Sin embargo cuando las barreras geográficas son débiles y permiten el encuentro y la hibridación entre dos poblaciones para que individuos viables y fértiles puedan surgir por segregación en la F2 y las generaciones subsecuentes, entonces nuevos sistemas adaptativos que sean capaces de colonizar nuevos nichos podrían surgir rápidamente en este escenario (Mallet, 1993; Naisbit, Jiggins, Linares y Mallet, 2002).

De acuerdo con el origen de las especies o especiación, la evolución simpátrica de las especies o poblaciones que viven en la misma región geográfica, al igual que la evolución alopátrica en poblaciones que están físicamente separadas, requiere de un flujo limitado de genes, lo que se conoce como introgresión o movimiento de genes de una especie al *pool* de genes de otra especie mediante retrocruces repetitivos.

Si por el contrario, las poblaciones están fuertemente aisladas tanto por barreras precigóticas como postcigóticas, los híbridos serán en su mayoría infértiles lo cual puede dar lugar a dos escenarios distintos: (1) los híbridos pueden llegar a ser fértiles y estabilizarse genéticamente a través de aloploidía y habitar en ambientes intermedios entre las poblaciones parentales, (2) o bien pueden cruzarse con algunos de los parentales e ir modificando las poblaciones a través de introgresión o flujo genético en zonas de hibridación. Por lo tanto, se espera que ocurran los resultados de la hibridación natural con rapidez, debido al efecto de la combinación de genomas de diferentes linajes lo cual puede asemejarse a si ocurriese una mutación a gran escala en la cual muchos genomas únicos son producidos simultáneamente (Mallet, 2007; Shapiro, Leducq y Mallet, 2016). Quizás la mejor forma de entender la genética y ecología de la especiación es estudiando los casos intermedios. La mayoría de los estudios con mariposas del género *Heliconius* se han realizado en zonas de hibridación natural donde los híbridos son abundantes (Jiggins, Mcmillan, Neukirchen y Mallet, 1996). Las especies de mariposas del género *Heliconius* han sido estudiadas como excelentes modelos para el estudio del origen de especies o especiación, debido a que estos insectos presentan una alta diversificación de patrones de coloración alar de una misma especie y presentan subespecies geográficas aisladas con patrones de color bien definidos que forman anillos miméticos mullerianos entre grupos taxonómicos distintos (Brower, 1996; Turner, 1977; Brown, 1981; Mallet y Gilbert, 1995; Muñoz-Ortiz, 2004). En años recientes varios estudios han documentado la formación de híbridos naturales entre diferentes razas geográficas y especies incipientes de *Heliconius* en zonas de hibridación que ocurren con el encuentro entre dos poblaciones geográficas, y que se da frecuentemente en los pasajes bajos y cañones hidrográficos presentes en

las cordilleras andinas que permiten el flujo genético y encuentro entre dos o más poblaciones (Brown y Benson, 1975, Hendry 2009; Mallet y Barton, 1989, Mallet y Gilbert, 1995; Linares, 1996; Jiggins et al., 1996; Jiggins y Mcmillan, 1997; Constantino y Salazar, 1998; Mallet 2007; Jiggins y Mallet, 2000; Jiggins et al., 2001; Salazar et al., 2005; Mavarez et al., 2006; Arias et al., 2008; Jiggins, Salazar, Linares y Mavarez, 2008), siendo la especiación un tema “misterioso”, controvertido y refutado por algunos autores (Hendry 2009; Brower, 2011).

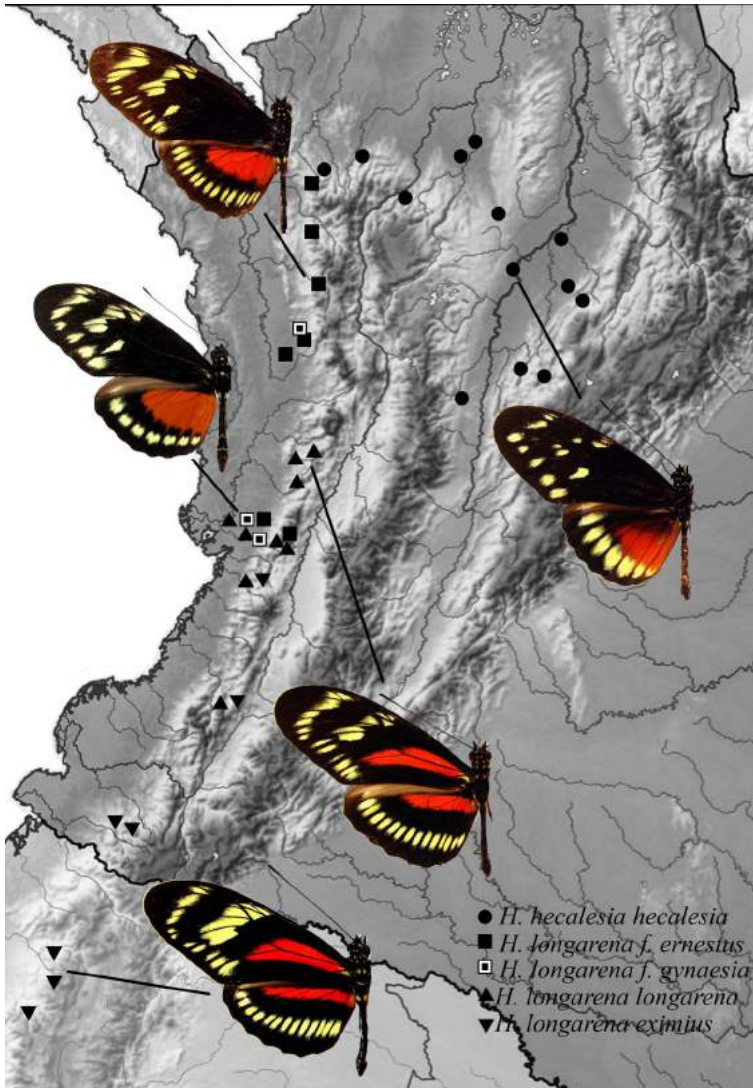


Figura 2. Poblaciones de *Heliconius hecalesia* y *H. longarena* mostrando la distribución de las diferentes subespecies en Colombia y Ecuador.

Estas zonas de hibridación natural son probablemente mantenidas por la selección mimética, dependiente de la frecuencia contra patrones de coloración raros o poco frecuentes (Sheppard, Turner, Brown, Benson y Singer, 1985; Mallet y Barton, 1989). La extraordinaria diversidad de razas geográficas miméticas de *Heliconius*, y el hecho de que están estrechamente relacionadas, los pares de especies casi siempre muestran patrones de color alar divergentes que indican que la introgresión fue un factor importante en su radiación, y la variación genética que imparte en las especies es variable en todo el genoma (Turner, 1977; Gilbert, 2003; Edelman et al., 2019).

Igualmente, la especiación en mariposas también se puede dar por divergencia ecológica y geográfica entre dos especies crípticas simpátricas que cohabitan la misma región pero que se reproducen y alimentan de plantas hospederas diferentes (Rosser et al., 2019); por la estratificación vertical a nivel de dosel y sotobosque que permiten el aislamiento reproductivo entre dos poblaciones para evitar la competencia intraespecífica por la misma planta hospedera (Willmott, Constantino y Hall, 2001) y por diferencias en el número de cromosomas en especies crípticas o hermanas que pueden causar el aislamiento reproductivo de una población, siendo las especies del género *Philaethria* el mejor ejemplo de variación en el número de cromosomas (Brown, Emmel, Eliazar y Suomalainen, 1992; Constantino y Salazar, 2010). Por consiguiente, el estudio de la biología y genética de las poblaciones es una herramienta fundamental para entender estos procesos de especiación en los seres vivos.

En contraste, las relaciones filogenéticas de las mariposas y polillas entre los diferentes clados (grupo de organismos que se cree que han evolucionado a partir de un ancestro común, de acuerdo con los principios de la cladística) han sido controversiales aun en los días de hoy sin ningún consenso. Sin embargo, todavía para muchos grupos de organismos, aún no es factible generar grandes cantidades de datos de secuencia de ADN a partir de una variedad de regiones de genes. En Lepidoptera, por ejemplo, ha sido un reto para descubrir marcadores moleculares que sean lo suficientemente universales para amplificar regiones de genes que son de amplia utilidad filogenética en la resolución de todos los niveles taxonómicos jerárquicos, de especie a superfamilias (Wahlberg et al., 2005). La utilización del fragmento “barcode” para la identificación molecular de especies es un tema de discusión y controversia (Ebach y Holdrege, 2005; Constantino, 2016). Sus detractores afirman que es un método simplista y reduccionista que no refleja la diversidad innata de las entidades biológicas, como lo hace la morfología y además que no podría identificar especies en poblaciones genéticas complejas (Elias et al., 2007; Dasmahapatra, Elías, Hill, Hoffman y Mallet, 2010; Giraldo, 2015).

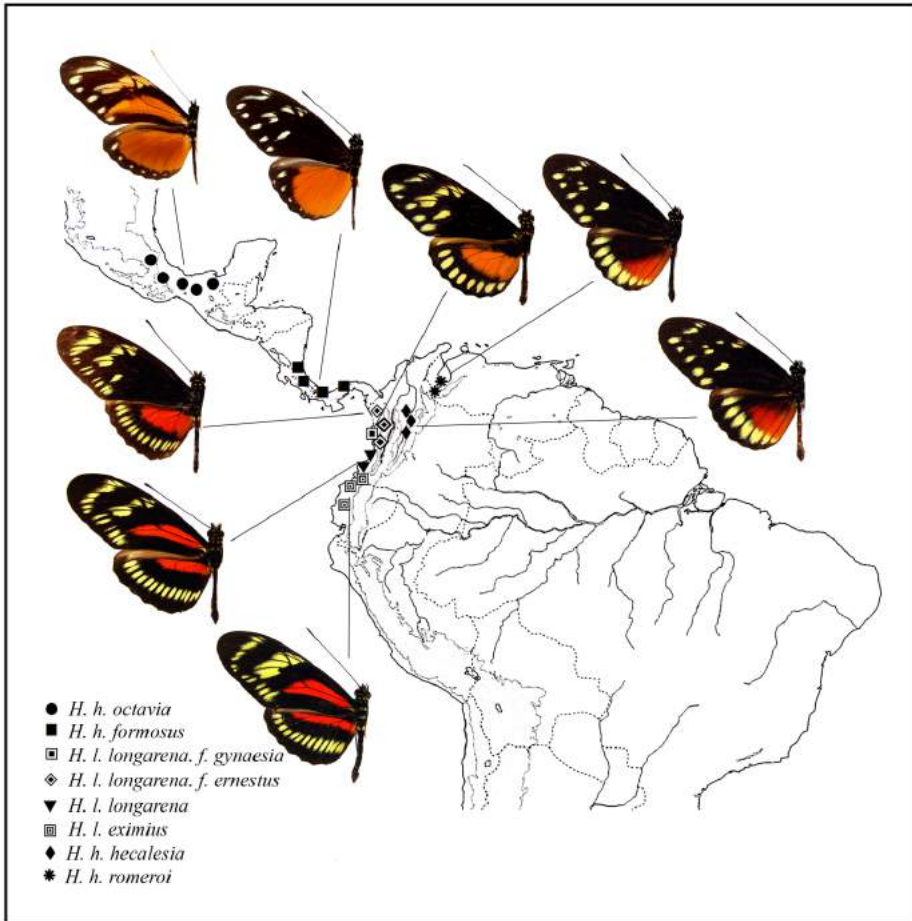


Figura 3. Mapa de distribución de las subespecies de *Heliconius hecalesia* y *Heliconius longarena* en la región neotropical, mostrando los sitios de colecta.

El análisis taxonómico de un pequeño fragmento de secuencia de ADN basado en un solo gen puede ser riesgoso y poco informativo en particular con especies estrechamente relacionadas (Mallet y Willmott, 2003). Esto plantea dificultades por dos razones. En primer lugar, los polimorfismos ancestrales pueden persistir durante millones de generaciones después de la especiación. En segundo lugar, los genes pueden introgresar entre especies estrechamente relacionadas. En la actualidad hay excelentes ejemplos de secuencias idénticas o casi idénticas en especies relacionadas de animales y plantas bien estudiadas (Mallet y Willmott, 2003).

Por lo anterior, es importante realizar estudios biológicos y genéticos que son más informativos y confiables en poblaciones taxonómicas complejas. En este trabajo se documenta un nuevo caso de especiación en mariposas del género *Heliconius* con la especie *Heliconius hecalesia* Hewitson, 1854. *H. hecalesia* presenta seis subespecies biogeográficamente bien diferenciadas y aisladas en Centro América y el norte de Suramérica (Brown y Benson, 1975; Lamas, 2004) (Fig. 3) a saber: *H. hecalesia hecalesia* Hewitson, 1854 se distribuye en el valle del río Magdalena en Colombia, *H. hecalesia longarena* Hewitson, 1875, en el occidente de Colombia (Chocó biogeográfico), *H. hecalesia formosus* H. W. Bates, 1866 en Panamá, y Costa Rica, *H. hecalesia octavia* H. W. Bates, 1866 en el sur de México hasta Nicaragua, *H. hecalesia romeroi* K. S. Brown & F. Fernández, 1985 en Venezuela, *H. hecalesia gynaesia* Hewitson, 1875 de origen desconocido, y *H. hecalesia eximius* Stichel, 1923 del occidente de Colombia y Ecuador. Otra subespecie, *H. hecalesia ernestus* K. S. Brown & Benson, 1975 del Occidente de Colombia fue recientemente sinonimizada con *H. hecalesia longarena* por tratarse de una forma de híbrido natural (Lamas, 2004).

De todas las subespecies de *H. hecalesia*, la menos conocida y más rara es *H. hecalesia gynaesia*, que se creía extinta, y no había vuelto a ser reportada desde su descripción original en 1875, cuando el naturalista inglés William Chapman Hewitson la describió por primera vez como una nueva especie (*Heliconia gynaesia*) a partir de un solo ejemplar tipo sin datos de localidad, el cual se encuentra depositado en el Museo de Historia Natural en Londres (Fig. 4). Este taxón aparece ilustrado en Brown y Benson (1975) y Ackery y Smiles (1976) como una subespecie válida geográficamente aislada, la cual presenta un fenotipo de coloración y patrón muy peculiar y único similar al de su co-modelo mimético mulleriano, la mariposa *Tithorea tarricina* y *Neruda godmani* (Fig. 7). Igualmente figura en la lista de Lamas (2004) como una subespecie válida de *H. hecalesia* sin especificación de su origen biogeográfico ni localidad tipo. Con relación a su origen biogeográfico desconocido, Brown y Benson (1975) plantearon la hipótesis de que *H. hecalesia gynaesia* podría provenir del norte del Chocó al occidente de Colombia ya que su co-modelo mimético, *Neruda godmani*, también ocurre en esta región; sin embargo no pudieron probar la hipótesis, porque nunca se pudo coleccionar un ejemplar en estado silvestre de *H. hecalesia gynaesia*. Recientemente, Neukirchen (1991) encontró por primera vez una zona de hibridación natural de *H. hecalesia longarena* en el bajo río Calima y Bajo San Juan, en el sur del Chocó, en donde pudo coleccionar varios morfotipos de *H. hecalesia gynaesia*. Con base en este hallazgo, Neukirchen (1991) propuso la creación de la especie *H. longarena*, separándola de *H. hecalesia* y reclasificó a *H. hecalesia gynaesia* como subespecie de *H. longarena*, sin ninguna sustentación científica.



Figura 4. Holotipo de *Heliconius hecalesia gynaesia*, con su etiqueta, que se encuentra depositado en el Museo de Historia Natural de Londres y que corresponde por su patrón y coloración con los ejemplares de las figuras 5E y 5G reproducidos en condiciones de invernadero en Colombia. Foto cortesía del Museo de Historia Natural, Londres.

Por tal razón y con el fin de comprobar el estatus taxonómico de *H. hecalesia gynaesia*, se realizaron cruces artificiales entre *H. hecalesia hecalesia* y *H. hecalesia longarena* bajo condiciones de invernadero en el presente trabajo, lográndose obtener varios morfotipos en la segunda generación del retrocruce parental, entre los cuales se obtuvieron las formas *gynaesia* y *ernestus* que concuerdan por su patrón de coloración con los ejemplares tipo depositados en el Museo de Historia Natural en Londres.

Materiales y métodos

Zona de estudio

En la tabla 1 y en la Fig. 2 se relacionan las poblaciones de *Heliconius hecalesia* y *H. longarena* estudiadas en el presente trabajo.

Tabla 1. Poblaciones de *Heliconius hecalesia* y *H. longarena* estudiadas en Colombia y Ecuador.

Depto.	Localidades	Altitud (m.s.n.m)	Subespecies
Boyacá	Muzo, Otanche	800	<i>H. hecalesia hecalesia</i>
Caldas	PNN Selva de Florencia, Samaná	1100	<i>H. hecalesia hecalesia</i>
Santander	Rios Cimitarra y Carare	950	<i>H. hecalesia hecalesia</i>
Antioquia	PNN Paramillo, Anorí, Río Samaná	900	<i>H. hecalesia hecalesia</i>
Antioquia	Segovia, El Bagre, Valdivia, Pto Berrio, Río Porce, Río Nechi, Murindó	100-1000	<i>H. hecalesia hecalesia</i>
Antioquia	Río Sucio, Mutatá *	1100	<i>H. b. hecalesia</i> , <i>H. longarena f. ernstus</i>
Chocó	La Troje, Tutunendó, Río Cabi*, Quibdó, Cerro Torrá, Quibdó, Río Atrato, San José del Palmar, Bajo Río San Juan, Palestina*	100-1200	<i>H. longarena f. ernstus</i> <i>H. longarena f. gynaesia</i>
Valle	Playa Rica, Río Garrapatas, La Cristalina, Río Bravo*, Bajo Río Calima*, Alto Río Anchicayá	100-1300	<i>H. longarena longarena</i> , <i>H. longarena f. ernstus</i> <i>H. longarena f. gynaesia</i>
Cauca	Reserva de Tambito, Crr. Munchique	800	<i>H. longarena longarena</i>
Nariño	Reserva La Planada, Altaquer, Río Nambi	900	<i>H. longarena eximius</i>
Ecuador	Palenque, Santo Domingo, Quevedo	800	<i>H. longarena eximius</i>

* zonas de hibridación natural

Cruces interespecíficos entre las poblaciones de *Heliconius hecalesia*

Para determinar las frecuencias alélicas de los diferentes fenotipos, se realizaron cruces interespecíficos y retrocruces del material de *H. hecalesia hecalesia*, *H. hecalesia longarena* y *H. hecalesia eximius* obtenidos de las localidades de Mutatá y Anorí Antioquia; Bajo Calima, Valle y río Nambí, Nariño respectivamente. Los cruces entre las diferentes poblaciones se realizaron bajo condiciones de invernadero en jaulas entomológicas de 4 m de largo x 3 m de ancho x 2 m de alto, construidas con tubos de PVC y forradas con tela muselina blanca, provistas con plántulas de *Passiflora gracillima* (Passifloraceae) como planta huésped para la oviposición y alimentación de las larvas y plántulas de *Lantana camara* (Verbenaceae) como planta nectarífera para los adultos. Adicionalmente, se dispusieron bebederos en platos plásticos de color rojo con una esponja amarilla impregnada con una solución azucarada del 10%. Los experimentos se realizaron en la localidad de Chinchiná, Caldas, ubicada a 1380 msnm, con una temperatura promedio de 21,8°C y una precipitación de 2556 mm al año.

Análisis de Chi-Cuadrado para las frecuencias fenotípicas de los cruces genéticos

Para determinar si los datos de las frecuencias fenotípicas de los diferentes cruces genéticos están de acuerdo con las proporciones mendelianas, se realizó una prueba de hipótesis de Chi-cuadrado, utilizando la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(\text{Valor observado} - \text{Valor esperado})^2}{(\text{Valor esperado})}$$

Grados de libertad (gl): n-1 donde n es el número de clases fenotípicas. Los datos se analizaron mediante una prueba t con un nivel de significancia de 0,05.

Para esto se estimaron las frecuencias alélicas y fenotípicas de los genes que probablemente codifican para los seis patrones de coloración alar que presentan las poblaciones de *H. hecalesia* (banda naranja/ausencia de banda naranja en las alas posteriores, banda roja/ausencia de banda roja en las alas anteriores, mancha amarilla del ala anterior ubicada en el área postmedial entre las venas Cu_1 y Cu_2 / ausencia de la mancha amarilla, manchas o rayas submarginales amarillas / ausencia de manchas o rayas submarginales amarillas, forma negra/ forma normal, rojo parcial sin mancha postmedial/ rojo completo en ambas alas. Los cruces parentales entre las poblaciones de Mutatá, Calima y Ñambí se mantuvieron durante 35 días, durante el cual se obtuvieron posturas y larvas criadas en recipientes plásticos provistos de hojas de *Passiflora gracillima* hasta obtener los adultos vírgenes híbridos heterocigotos de primera generación F1 (forma *ernestus*). Luego, se hizo un retrocruce de un parental híbrido heterocigoto (forma *ernestus*) macho virgen con los genotipos paternos vírgenes de *hecalesia* (Mutatá), *longarena* (río Calima) y *eximius* (río Ñambi) de forma separada en jaulas independientes hasta obtener la generación F2, donde hubo segregación de la banda naranja del ala posterior, la banda roja del ala anterior, la mancha amarilla del ala anterior ubicada en el área media entre las venas Cu_1 y Cu_2 , y las manchas submarginales amarillas en las alas posteriores y anteriores. Los adultos obtenidos de la generación F2 se preservaron como material *voucher*, extendidos y fotografiados.

Estudio del complejo mimético *Tithorea tarricina*

Para el análisis de las frecuencias de los diferentes fenotipos estudiados y los complejos miméticos involucrados en cada sitio (Mutatá, Bajo Calima y río Ñambi) se seleccionaron estaciones de muestreos, ubicadas en transectos de 1 km de longitud, dentro de los bosques, donde se hicieron avistamientos visuales y recolección de especímenes *voucher*, a paso normal, con jama entomológica. Para que los datos entre cada sitio pudieran ser comparables entre sí, se hicieron censos de avistamiento entre las 8:00 y 14:00 horas, en días soleados, durante los meses de junio, julio y agosto de 2016. Se invirtieron un total de 30 horas/hombre/día de esfuerzo de trabajo en cada sitio para un total de 90 horas de avistamiento y censos de mariposas, en unidades paisajísticas similares (bosque muy húmedo premontano bajo, en buen estado de

conservación). Se utilizó el índice F para determinar las frecuencias de los diferentes fenotipos involucrados en los anillos miméticos según la metodología propuesta por Mallet y Gilbert (1995).

Para la consulta y comparación de material museológico de *Heliconius hecalesia* de Colombia y Ecuador, se examinaron varias colecciones y los acrónimos citados en el texto se listan a continuación:

CMD: Colección Massimo Demaio, Bolonia, Italia <http://WWW.heliconius.net>

NHM: Museo de Historia Natural, Londres, Inglaterra.

IiAVH: Instituto de investigaciones Alexander von Humboldt (col. E.W.Schmidt-Mumm), Villa de Leiva, Boyacá.

ICN-MHN: Instituto de Ciencias Naturales, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

ME-FLG: Museo Entomológico “Francisco Luis Gallego”, Universidad Nacional sede Medellín.

MEMB: Museo Entomológico “Marcial Benavides”, Cenicafe, Chinchiná, Caldas.

MHN-UC: Museo de Historia Natural-Universidad de Caldas, Manizales.

MPUJ: Museo Entomológico Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

CEUN: Colección Entomológica, Universidad de Nariño, Pasto.

MUSENUV: Colección del Museo de Entomología de la Universidad del Valle, Cali.

CUA: Colección Universidad de Antioquia, Medellín.

CCP: Colección Carlos Prieto, Cali.

CFC: Colección Familia Constantino, Cali, Valle.

CJS: Colección Julián Salazar, Manizales, Caldas.

CGR: Colección Gabriel Rodríguez, Mitú, Vaupés

CDA: Colección David Acosta, Bogotá.

Resultados y Discusión

El análisis del patrón de coloración alar de los diferentes morfotipos obtenidos del cruce parental, indican que la mancha del ala anterior ubicada en el área postmedial entre las venas Cu1 y Cu2 es un carácter diagnóstico heredado de *H. hecalesia hecalesia* y no de *H. hecalesia longarena*, por lo tanto se desvirtúa el planteamiento propuesto por Neukirchen (1991) de que *H. hecalesia gynaesia* es una subespecie de *H. longarena*. Igualmente se lograron obtener varios fenotipos idénticos a *H. hecalesia gynaesia* que concuerdan con el patrón alar del holotipo depositado en el Museo de Historia Natural de Londres (Figs. 4 y 5E-G) y por comparación con material de *H. hecalesia gynaesia* colectados recientemente en el occidente de Colombia que reposan en la colección personal de Massimo Demaio en Italia (Fig. 6). A continuación se describen los cruces artificiales entre *H. hecalesia hecalesia*, *H. hecalesia longarena* y *H. hecalesia eximius* y los diferentes fenotipos obtenidos de una misma camada de cría.

a.- Evidencia de polimorfismo y frecuencia de los fenotipos obtenidos de Mutatá

El cruce de *H. becalesia becalesia* (Aa= alelo para color naranja) con *H. becalesia longarena* (Bb= alelo para color rojo) en la zona de hibridación en Rio Sucio, Mutatá produjo una progenie de 20 individuos constituida genéticamente de individuos heterocigotos (AaBb) conteniendo ambos alelomorfos del padre y la madre (forma *ernestus* Fig. 5C) en la primera generación filial F1. En la segunda generación filial F2, producto del retrocruce de individuos heterocigotos *becalesia* x *longarena* produjo 32 individuos constituidos genéticamente por una relación fenotípica de 8 individuos portadores del carácter genitor ABB F1, 13 individuos portadores del carácter genitor ABb F1, 6 individuos portadores del carácter genitor Abb F1, 1 individuo portador del carácter genitor aBB, 3 individuos portadores del carácter genitor aBb F1 y 1 individuo portador del carácter genitor abb F1 (Tabla 2, Fig. 5).

Tabla 2. Frecuencia de los diferentes fenotipos obtenidos del cruce *H. becalesia becalesia* x *H. becalesia longarena* de Mutatá, Antioquia, bajo condiciones de invernadero (24°C, 80 % HR)n= 52 individuos.

Generación	Cruce ♂ x ♀	Color y patrón alar	Proporción de fenotipos obtenidos	Número de individuos
Parental (P)	Aa x Bb	naranja x rojo		
F1		banda naranja x rojo con mancha postmedial	Aa Bb Heterocigoto	20
Parental (P)	AA : Aa : aa x BB : Bb : bb	banda naranja x rojo		
F2		banda naranja con mancha postmedial	3ABB	8
F2		banda roja y naranja con mancha postmedial	6ABb	13
F2		banda roja completa sin mancha postmedial	3Abb	6
F2		banda naranja sin mancha postmedial	1aBB	1
F2		banda roja ausente en alas anteriores sin mancha postmedial	2aBb	3
F2		forma negra	1abb	1
Total				32

Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, debido al flujo genético (introgresión) por hibridación que existe entre las poblaciones del Magdalena Medio y el norte del Chocó, a través del corredor biológico en zonas boscosas entre los ríos Nechí, Anorí, Parque Nacional Natural Paramillo y el Urabá antioqueño, en Rio Sucio, Mutatá donde se encuentran ambas poblaciones y se cruzan produciendo híbridos naturales en el punto de encuentro (Fig. 2). En la tabla 2 se

relaciona la descendencia donde se obtuvieron seis fenotipos, dependiendo de que exista dominancia completa en ambos *loci* o sólo en uno de ellos. La segregación fenotípica de la descendencia y su correspondencia con la segregación genotípica, en cada caso, son las que se indican en la tabla 2 con una proporción de 3:6:3:1:2:1 individuos.

b.- Evidencia de polimorfismo y frecuencia de los fenotipos obtenidos del Bajo río Calima

El cruce de *H. hecalesia longarena f. ernestus* (Aa= alelo para color naranja) con *H. hecalesia longarena* (Bb= alelo para color rojo) en la zona de hibridación del Bajo río Calima (Palestina) produjo una progenie de 32 individuos constituida genéticamente de individuos heterocigotos (AaBb) conteniendo ambos alelomorfos del padre y la madre (forma *ernestus* Fig. 5C) en la primera generación filial F1. En la segunda generación filial F2, producto del retrocruce de individuos heterocigotos *hecalesia* x *longarena* produjo 57 individuos constituidos genéticamente por una relación fenotípica de 13 individuos portadores del carácter genitor ABB F1, 32 individuos portadores del carácter genitor ABb F1, 8 individuos portadores del carácter genitor Abb F1, 2 individuos portadores del carácter genitor aBB, 1 individuo portador del carácter genitor aBb F1 y 1 individuo portador del carácter genitor abb F1 (Tabla 3, Fig. 5).

Tabla 3. Frecuencia de los diferentes fenotipos obtenidos del cruce *H. hecalesia longarena f. ernestus* x *H. h. longarena* (Bajo Calima) bajo condiciones de invernadero (24°C, 80 % HR) n= 89 individuos.

Generación	Cruce ♂ x ♀	Color y patrón alar	Proporción de fenotipos obtenidos	Número de individuos
Parental (P)	Aa x Bb	naranja x rojo		
F1		banda naranja x rojo con mancha postmedial	Aa Bb Heterocigoto	32
Parental (P)	AA : Aa : aa x BB : Bb : bb	banda naranja x rojo		
F2		banda naranja con mancha postmedial	3ABB	13
F2		banda roja con naranja y mancha postmedial	6ABb	32
F2		banda roja completo sin mancha postmedial	3Abb	8
F2		banda naranja sin mancha postmedial	1aBB	2
F2		banda roja ausente en alas ant. sin mancha postmedial	2aBb	1
F2		forma negra	1abb	1
Total				57

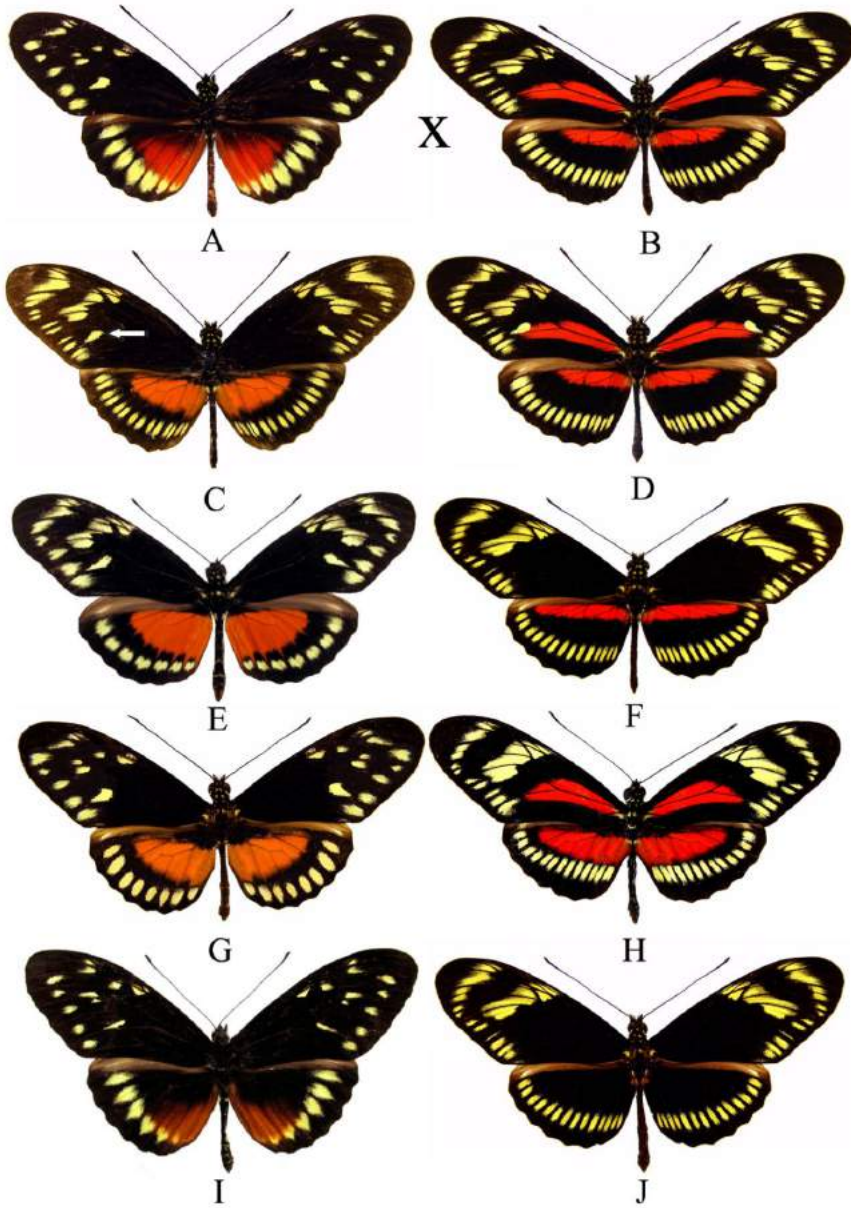


Figura 5.

Cruce parental de *H. hecalesia hecalesia* x *H. longarena longarena*. **A.** *H. hecalesia hecalesia* **B.** *H. longarena longarena* **C-J.** fenotipos del retrocruce F2 obtenidos **C.** *H. longarena* f. *ernestus* (la flecha señala la mancha postmedial entre las venas Cu1 y Cu2, carácter heredado de *H. h. hecalesia*) **D.** *H. longarena* f. hyb. **E.** *H. longarena* f. *gynaesia* hyb **F.** *H. longarena* f. hyb. **G.** *H. longarena* f. hyb. **H.** *H. longarena* f. hyb. **I.** *H. h. hecalesia hecalesia* f. hyb. **J.** *H. longarena* f. negra hyb.

Las frecuencias génicas y genotípicas en el bajo río Calima se mantienen constantes de una generación a otra, debido al flujo genético por hibridación (introgresión) que existe entre las poblaciones del norte del Chocó con las poblaciones del bajo río Calima y San Juan a través del corredor río Atrato donde ocurre otra zona de hibridación natural, en este caso con las formas *ernestus* y *gynaesia* conteniendo la mancha amarilla en el ala anterior entre las venas Cu1 y Cu2, un carácter diagnóstico heredado de *H. hecalesia hecalesia*. En la tabla 3 se relaciona la descendencia donde se obtuvieron seis fenotipos dependiendo de que exista dominancia completa en ambos *loci* o sólo en uno de ellos. La segregación fenotípica de la descendencia y su correspondencia con la segregación genotípica, en cada caso, son las que se indican en la tabla 3 con una proporción de 3:6:3:1:2:1 individuos.

c.- Evidencia de esterilidad híbrida e inviabilidad en los cruces artificiales de Mutatá x río Nambí

El cruce de *H. hecalesia hecalesia* de Mutatá (Aa= alelo para color naranja) con *H. hecalesia eximius* del río Nambí (Bb= alelo para color rojo) produjo una progenie de 43 individuos constituida genéticamente de individuos heterocigotos (AaBb) conteniendo ambos alelomorfos del padre y la madre (forma *ernestus* Fig.5C) en la primera generación filial F1. En la segunda generación filial F2, producto del retrocruce de individuos heterocigotos *hecalesia* x *longarena eximius* produjo posturas infértiles. La esterilidad híbrida e inviabilidad en los cruces artificiales, proporciona una fuerte evidencia y soporte para el reconocimiento de *H. longarena* como una buena especie como parte de este estudio (Tabla 4).

Estos resultados de esterilidad híbrida de las poblaciones de *H. longarena longarena* y *H. longarena eximius* del sur y norte del Ecuador corroboran la hipótesis planteada por Neukirchen (1991) de que *H. longarena* es una buena especie, sin embargo se desvirtúa el planteamiento propuesto por este mismo autor de que *H. hecalesia gynaesia* es una subespecie de *H. longarena*, ya que se trata de un híbrido natural de *H. longarena*, que imita el patrón de coloración de la mariposa *Neruda godmani* (Figura 7D). Por consiguiente, se coloca a *H. gynaesia* en sinonimia (**nuevo sinónimo**) con *H. longarena*, ya que de acuerdo con las normas del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN), los híbridos no son taxones válidos (Art 45.1), pues los niveles por debajo de subespecie no son contemplados por el código, dado que proporcionar nombres científicos a cualquier variación fenotípica, práctica frecuente en algunos grupos (lepidóptera, coleópteros), se considera de nula utilidad científica. Por otra parte, se logró aclarar en este trabajo el origen biogeográfico de *H. longarena gynaesia*, como proveniente del refugio del Chocó, Colombia, el cual era desconocido para este taxón (Lamas, 2004). Los patrones de color de los diferentes fenotipos obtenidos en los cruces parentales fueron independientemente del sexo (no hubo dimorfismo sexual entre los diferentes fenotipos estudiados en la generación F1) y la proporción de sexos obtenidos macho: hembra se mantuvo 1:1 durante todo el ciclo biológico de las progenies, pero en la generación F2 no se presentaron progenies debido a la esterilidad híbrida.

Tabla 4. Frecuencia de los diferentes fenotipos obtenidos del cruce *H. hecalesia hecalesia* x *H. hecalesia eximius* (río Nambí) bajo condiciones de invernadero (24°C, 80 % HR) n= 43 individuos en F1 y 0 individuos en F2.

Generación	Cruce ♂ x ♀	Color y patrón alar	Proporción de fenotipos obtenidos	Número de individuos
Parental (P)	Aa x Bb	banda naranja x rojo		
F1		banda naranja x rojo con mancha postmedial	Aa Bb Heterocigoto	43*
Parental (P)	AA : Aa : aa x BB : Bb : bb	banda naranja x rojo	0	0
F2		banda naranja con mancha postmedial	0	0
		banda roja con naranja y mancha postmedial	0	0
		banda roja completo sin mancha postmedial	0	0
		banda naranja sin mancha postmedial	0	0
		banda roja ausente en alas ant. sin mancha postmedial	0	0
		forma negra	0	0
Total				0*

* Híbridos estériles

Tabla 5. Prueba de Chi-cuadrado para la proporción de fenotipos (3:6:3:1:2:1) obtenidos en el cruce *H. hecalesia hecalesia* x *H. hecalesia longarena* de Mutatá, Antioquia, bajo condiciones de invernadero (24°C, 80 % HR) n= 32 individuos.

Valores observados	Valores esperados
8 indiv. con banda naranja con mancha postmedial	(3/16)(32) = 6
13 indiv. con banda roja y naranja con mancha postmedial	(6/16)(32) = 12
6 indiv. con banda roja completa sin mancha postmedial	(3/16)(32) = 6
1 indiv. con banda naranja sin mancha postmedial	(1/16)(32) = 2
3 indiv. con banda roja ausente en las alas ant. y sin mancha postmedial	(2/16)(32) = 4
1 indiv. de forma negra	(1/16)(32) = 2
32 total individuos	32 total individuos

Aplicando la ecuación:

$$X^2 = \frac{(8-6)^2}{6} + \frac{(13-12)^2}{12} + \frac{(6-6)^2}{6} + \frac{(1-2)^2}{2} + \frac{(3-4)^2}{4} + \frac{(1-2)^2}{2} = 1,99$$

El valor calculado de Chi-cuadrado para Mutatá no es mayor a 2, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula H_0 y se concluye con un $\alpha = 0,05$ que los resultados son los

mismos que los esperados, por lo que se acepta la hipótesis de que los datos se ajustan a una distribución fenotípica de 3:6:3:1:2:1 (g.l= 5; P< 0,001).

Tabla 6. Prueba de Chi-cuadrado para la proporción de fenotipos (3:6:3:1:2:1) obtenidos en del cruce *H. hecalesia longarena* f. *ernestus* x *H. h. longarena* (Bajo Calima) bajo condiciones de invernadero (24°C, 80 % HR) n= 57 individuos.

Valores observados	Valores esperados
13 indiv. con banda naranja con mancha postmedial	(3/16)(57) = 10,6
32 indiv. con banda roja y naranja con mancha postmedial	(6/16)(57) = 21,3
8 indiv. con banda roja completa sin mancha postmedial	(3/16)(57) = 10,6
2 indiv. con banda naranja sin mancha postmedial	(1/16)(57) = 3,5
1 indiv. con banda roja ausente en las alas ant. y sin mancha postmedial	(2/16)(57) = 7,1
1 indiv. de forma negra	(1/16)(57) = 3,5
57 total individuos	57 total individuos

Aplicando la ecuación:

$$\chi^2 = \frac{(13-10,6)^2}{10,6} + \frac{(32-21,3)^2}{21,3} + \frac{(8-10,6)^2}{10,6} + \frac{(2-3,5)^2}{3,5} + \frac{(1-7,1)^2}{7,1} + \frac{(1-3,5)^2}{3,5} = 14,2$$

El valor calculado de Chi-cuadrado para la población del Bajo Calima es mayor de 3,56, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula H_0 y se concluye con un $\alpha = 0.05$ que los resultados de las frecuencias observadas difieren significativamente de las esperadas, por lo que no se acepta la hipótesis de que los datos se ajustan a una distribución fenotípica de 3:6:3:1:2:1 (g.l= 5; P= 0,082).

Descripción del complejo mimético *Tithorea tarricina*

La mayoría de mariposas de la subfamilia Heliconiinae exhiben coloración aposemática o de advertencia, con manchas de color amarillo, rojo o anaranjado sobre fondo negro. Su toxicidad se debe a la capacidad de las larvas de incorporar en sus tejidos glucósidos cianogénicos y otros metabolitos obtenidos de las plantas de las que se alimentan (familia Passifloraceae), los cuales traspasan a los adultos cuando empupan (Brown, 1981). En los cruces obtenidos se encontraron varias formas miméticas relacionadas con otras especies y subfamilias diferentes como es el caso de la mariposa *Tithorea tarricina hecalesina* (Ithomiinae) que es una especie que se encuentra volando junto con *H. hecalesia hecalesia* y *Neruda godmani* en el río Magdalena y adoptan un mismo patrón de coloración alar. Igual acontece con los ithomiinos *Napeogenes peridia peridia* y *Callithomia hezia tridactyla*. En el Chocó *Tithorea tarricina parola* vuela simpatricamente con *Neruda godmani* (Heliconiinae), *Napeogenes stella opacella* (Ithomiinae), *Eresia ithomioides quintilla* (Melitaeinae), *Chetone ithomia* (Arctiidae, Pericopinae) y *Zegara personata* (Castnidae) (Fig. 7).

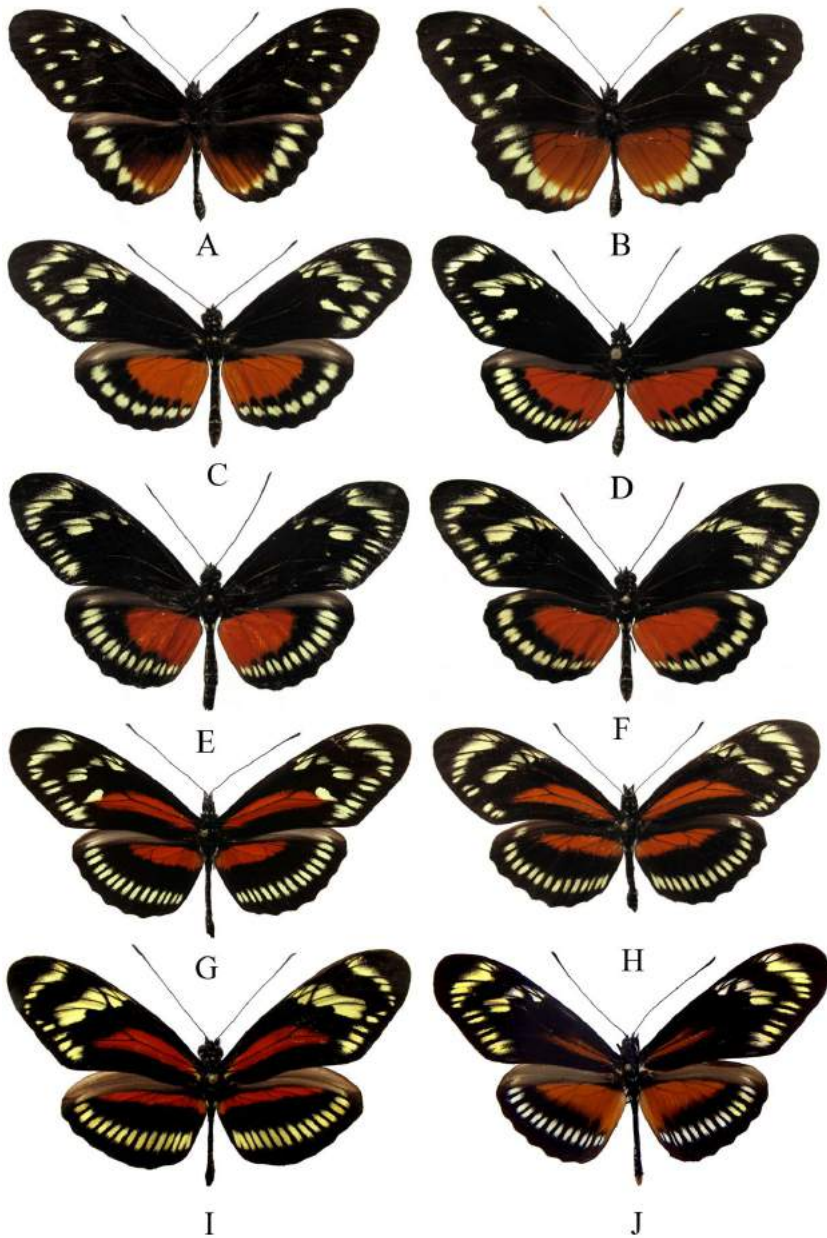


Figura 6.

Formas puras e híbridos naturales de *Heliconius becalesia* de Colombia. **A.** *Heliconius becalesia becalesia* (Otanche, Boyacá), **B.** *H. becalesia becalesia* (Otanche, Boyacá). **C.** *H. becalesia gynaesia* hyb. (río San Juan, Chocó), **D.** *H. longarena* hyb. **E.** *H. longarena* f. *ernestus* hyb. **F.** *H. longarena* f. *ernestus* x *gynaesia* hyb (Chocó) **G.** *H. longarena* hyb. **H.** *H. longarena longarena*. **I.** *H. longarena eximius* **J.** *H. longarena* hyb f. blanca. Colección de Massimo Demaiò, Bolonia (Italia). <http://WWW.heliconius.net>

El patrón *Tithorea tarricina* descrito en este estudio por primera vez se considera como otro ejemplo de mimetismo de tipo mulleriano y batesiano en el cual las especies involucradas en el complejo mimético adoptan un mismo patrón de coloración aposemática o de advertencia hacia sus depredadores, tal como sucede con otras especies de mariposas en las subfamilias Heliconiinae e Ithomiinae (Mallet, 1999). En este estudio se pudo observar que las diferencias en la frecuencia de expresión de los fenotipos de color naranja en las alas posteriores estuvieron correlacionadas con la presencia o ausencia de sus co-modelos miméticos en las zonas de origen de los pies parentales (Tabla 7, Fig. 7).

Estos resultados concuerdan con otros estudios similares realizados con otras especies de *Heliconius* en el occidente de Colombia (Constantino y Salazar, 1998; Muñoz-Ortiz, 2004; Constantino, Gil y Corredor 2005; Merchán, Jiggins y Linares 2005; Constantino, 2006).

Tabla 7. Relación y frecuencia fenotípica de los complejos miméticos mullerianos observados en tres sitios diferentes de Colombia mediante censos y muestreos de campo.

Especie	Mutató	Bajo Calima	Río Nambí	Total	F*
	(1)	(2)	(3)		
<i>Heliconius hecalesia hecalesia</i>	5	0	0	5	1.00
<i>Heliconius longarena f. ernestus</i>	3	6	0	9	1.66
<i>Heliconius longarena f. gynaesia</i>	0	2	0	2	2.00
<i>Heliconius longarena longarena</i>	4	10	0	14	1.71
<i>Heliconius longarena eximius</i>	0	0	8	8	3.00
<i>Neruda godmani</i>	5	7	6	18	2.05
<i>Tithorea tarricina hecalesina</i>	17	0	0	17	1.00
<i>Tithorea tarricina parola</i>	0	21	16	37	2.43
<i>Napeogenes peridia peridia</i>	25	0	0	25	1.00
<i>Napeogenes stella opacella</i>	0	12	33	45	2.51
<i>Callithomia hezia tridactyla</i>	31	0	0	31	1.00

Índice F* (especies) = 1 x (proporción en 1) + 2 x (proporción en 2) + 3 x (proporción en 3) según Mallet & Gilbert, 1995.

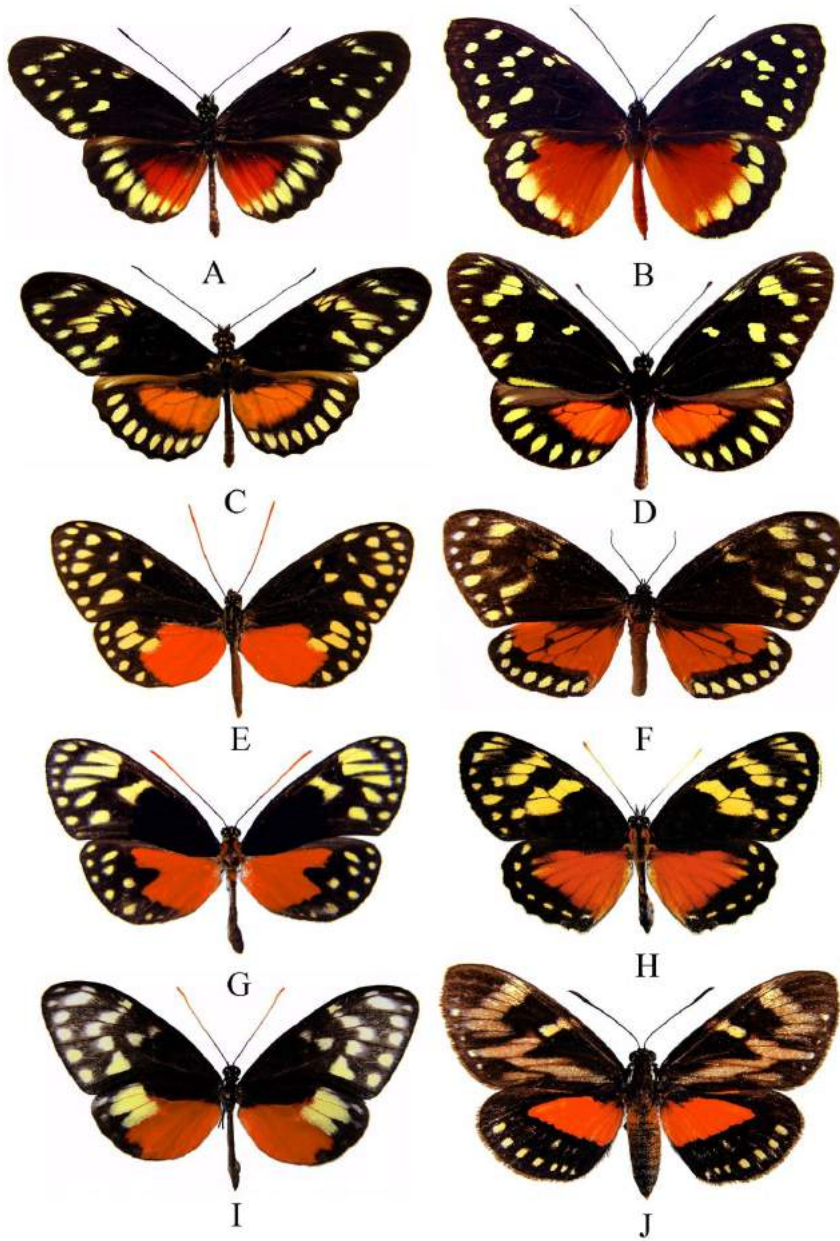


Figura 7.

Anillo mimético mulleriano y batesiano de *Heliconius hecalesia* con el patrón de coloración *Tithorea tarricina* **A.** *H. hecalesia hecalesia* **B.** *Tithorea tarricina*. **C.** *H. hecalesia longarena* f. *gynaesia* **D.** *Neruda godmani* **E.** *Napeogenes peridia peridia* **F.** *Chetone ithomia* (Arctiidae:Pericopinae) **G.** *Napeogenes stella opacella* **H.** *Eresia ithomioides quintilla* **I.** *Callithomia hezia tridactyla*. **J.** *Zegara personata* (Castniidae).

Conclusiones

La esterilidad híbrida e inviabilidad en los cruces artificiales entre *H. hecalesia hecalesia* y *H. hecalesia longarena*, proporciona una fuerte evidencia y soporte para el reconocimiento de *H. longarena n. comb.* como una buena especie como parte de este estudio, ya que se cumple la regla de Haldane que afirma que cuando en la descendencia de dos especies animales diferentes, uno de los dos sexos no aparece, es raro o es estéril, este siempre es el sexo heterocigótico (Naisbit, Jiggins, Linares y Mallet., 2002). Este fenómeno de especiación por hibridación ha sido documentado en la naturaleza para varios animales. Los híbridos interespecíficos se producen regularmente en las mariposas del género *Eueides* y *Heliconius* de forma natural para un 26-29% de las especies (ej. *H. erato*, *H. himera*, *H. cydno*, *H. melpomene*) (Mallet et al., 2007). Cuando se presenta un aislamiento reproductivo posterior al apareamiento, los híbridos resultan estériles. Una forma de probarlo es haciendo retrocruces (cruzamientos recíprocos), en este caso tomando un híbrido macho de la generación F1 y cruzándolo con la especie parental hembra tal como se hizo en este estudio con *H. hecalesia* y *H. longarena*. Estos casos de esterilidad híbrida son un buen ejemplo de especiación por hibridación en zonas de contacto de dos poblaciones interespecíficas el cual ha sido bien documentado para otras especies de *Heliconius* (Barton y Hewitt, 1989; Mallet, 1993; Jiggins, et al., 1996; Jiggins y Mallet, 2000; Jiggins et al., 2001; Naisbit et al., 2002; Gilbert, 2003; Mavárez et al., 2006; Kronforst, Young, Blume y Gilbert 2006; Mallet et al., 2007; Martin et al., 2013, The *Heliconius* Genome, 2012 y Edelman et al., 2019) y en otros grupos de animales (Stebbins, 1958).

Igualmente, en este estudio se sinonimiza a *H. hecalesia gynaesia n. syn.* con *H. longarena*, ya que se trata de un híbrido natural y no una subespecie válida, sustentado a partir de los estudios de hibridación artificial realizados entre las poblaciones de *H. hecalesia hecalesia* del Magdalena medio con las poblaciones de *H. longarena longarena* y *H. longarena eximius* del occidente de Colombia y Ecuador (Chocó Biogeográfico). También se rechaza el planteamiento propuesto por Neukirchen (1991) de clasificar a *H. hecalesia gynaesia* como subespecie de *H. longarena* ya que en este estudio se pudo demostrar que la mancha amarilla del ala anterior ubicada en el área postmedial entre las venas Cu_1 y Cu_2 expresada en los fenotipos *gynaesia* y *ernestus* son un carácter diagnóstico heredado de *H. hecalesia hecalesia* y no de *H. hecalesia longarena*, mientras que el fenotipo *eximius* es un carácter heredado de *H. longarena*.

En este estudio se pudo aclarar el estatus taxonómico y el origen biogeográfico de *H. hecalesia gynaesia*, proveniente del Chocó biogeográfico en Colombia donde se corrobora la hipótesis propuesta por Brown y Benson (1975). Los resultados de este estudio sugieren que en la costa pacífica colombiana existen al menos cuatro zonas de hibridación entre *H. hecalesia hecalesia* y *H. hecalesia longarena*, ya que se han podido recolectar híbridos naturales iguales a los obtenidos en los cruces artificiales en el

presente trabajo (Fig.6). Una de estas zonas de hibridación en el occidente de Colombia fue documentada recientemente por Neukirchen (1991) en el bajo río Calima, Valle en la desembocadura al río San Juan en los límites con el departamento del Chocó, cerca de la localidad de Palestina. Las otras zonas de hibridación en el occidente de Colombia se encuentran en Mutatá, Antioquia, río Bravo, Valle y río Cabí, afluente del río Atrato cerca de Quibdó, Chocó.

Se describe y se documenta por primera vez el nuevo patrón mimético *Tithorea tarricina* en el cual están involucradas varias especies pertenecientes a diferentes familias de mariposas diurnas que adoptan el patrón de color de *T. tarricina* y *Neruda godmani* que vuelan en la misma región en las zonas de hibridación de *H. hecalesia*.

Se demuestra una vez más que los estudios de hibridación artificial son una herramienta útil de la genética de poblaciones para esclarecer el origen biogeográfico y el estatus taxonómico de taxones raros o poco conocidos. Estos estudios de genética de poblaciones realizados en campo con poblaciones silvestres sustentan la hipótesis de la especiación y origen de nuevas especies en zonas de hibridación entre dos poblaciones simpátricas, donde no existe aislamiento geográfico y se presenta un continuo flujo de genes. Sin embargo en las poblaciones de *H. longarena longarena* y *H. longarena eximius* del sur de Colombia y norte de Ecuador (aisladas geográficamente) de las poblaciones del Magdalena medio donde existe un aislamiento reproductivo, hay mayor probabilidad que se presenten eventos de especiación y esterilidad híbrida producto del aislamiento reproductivo de las poblaciones interespecíficas.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda de Massimo Demaio, Bolonia (Italia) por facilitar nuevo material de híbridos naturales de *Heliconius hecalesia gynaesia* del occidente de Colombia para comparación, a Kirby Wolfe, InBio (Costa Rica) por la revisión de textos, a Blanca Huertas, Museo de Historia Natural, Londres, (Inglaterra) por información acerca del material tipo de *H. hecalesia gynaesia*, a James Mallet, Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, (USA) por el suministro de literatura, a Jorge González, Texas A & M University (USA), por la identificación de los castnidos, a Gerardo Lamas, Museo de Historia Natural, Universidad Mayor de San Marcos (Perú) por los comentarios, a Julián Salazar, Museo de Historia Natural, Universidad de Caldas (Colombia) por suministrar datos de colecta y a Carlos M. López, (Chinchiná, Colombia) por la consecución de material vegetativo de *Passiflora gracillima* de Quibdó, Chocó para el mantenimiento y cuidado del pie de cría de *H. hecalesia* en invernadero.

Referencias

- Ackery, P.R. y Smiles, R. (1976). An illustrated list of the type-specimens of the Heliconiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) in the British Museum (Natural History) *Bulletin of the British Museum of Natural History*, 32 (5), 173-214 + 39 pls.
- Arias, C.F., Muñoz, A.G., Jiggins, C.D., Mavarez, J., Bermingham, E. y Linares, M. (2008) A bimodal hybrid zone provides evidence for incipient speciation in *Heliconius* butterflies. *Molecular Ecology*, 17, 4699-4712.
- Audesirk, T. y Audesirk, G. (1996). El origen de las especies. Pp. 46-58. En: Audesirk, T. & Audesirk, G. (Ed). Evolución y ecología. Cuarta Edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México. 407 p.
- Barton, N.H. y Hewitt, G.M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341, 497-503.
- Brower, A.V. (1996). A new mimetic species of *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae), from southeastern Colombia revealed by cladistic analysis of mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 116, 317-332.
- Brower, A.V. (2011). Hybrid speciation in *Heliconius* butterflies? A review and critique of the evidence. *Genetica*, 139, 589-609.
- Brown, K.S. y Benson, W. (1975). West Colombian biogeography. Notes on *Heliconius hecalesia* and *H. sapho* (Nymphalidae). *Journal of the lepidopterists' Society*, 29 (4), 199-212.
- Brown, K.S. (1975). Geographical patterns of evolution in Neotropical Lepidoptera. Systematics and derivation of known and new Heliconiini (Nymphalidae: Nymphalinae). *Journal of Entomology* (B), 44 (3), 201-242.
- Brown, K.S. (1981). The biology of *Heliconius* and related genera. *Ann. Rev. Entomol.*, 26, 427-456.
- Brown, K.S., Emmel, T.C., Eliazar, P.J. y Suomalainen, E. (1992). Evolutionary patterns in chromosome numbers in Neotropical Lepidoptera. I. Chromosomes of the Heliconiini. *Hereditas*, 117, 109-125.
- Constantino, L.M. y Salazar, J. (1998). Natural hybridization of *Heliconius cydno* Doubleday from Western Colombia (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. Caldas*, 2, 41-45.
- Constantino, L.M., Gil, Z.N. y Corredor, G. (2005). Estudio del polimorfismo cromático en *Laparus doris obscurus* y determinación de la frecuencia fenotípica mediante cruzamientos intraespecíficos de tres poblaciones en el departamento del Valle y Caldas, Colombia (Nymphalidae: Heliconiinae). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Universidad de Caldas*, 9, 222-237.
- Constantino, L.M. y Salazar, J.A. (2010). A review of the *Philaethria dido* species complex (Lepidoptera, Nymphalidae: Heliconiinae) and description of three new sibling species from Colombia and Venezuela. *Zootaxa*, 2720, 1- 27.
- Constantino, L.M. (2006). Redescubrimiento de *Heliconius weymeri submarginatus*, 98 años después de su aparente extinción y estudio de su complejo mimético con *Heliconius hecubaerispus* en el occidente de Colombia. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Universidad de Caldas*, 10, 138-197.
- Constantino, L.M. (2016). *Análisis morfológicos, moleculares y biogeográficos en la validación de nuevas especies y resolución de problemas taxonómicos en Lepidoptera*. Memorias 43 Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen. Manizales, 43, 209-228.
- Dasmahapatra, K.K., Elias, M., Hill, R.I., Hoffman, J. y Mallet, J. (2010). Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. *Molecular Ecology Resources*, 10, 264-273.
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Ebach, M.C. y Holdrege, C. (2005). DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434, 697-697.
- Edelman, N.B., Frandsen, P.B., Miyagi, M., Clavijo, B., Davey, J., Dikow, R.B., García-Accinelli, G., Van Belleghem, S.M., Patterson, N., Neafsey, D. E., Challis, R., Kumar, S., Moreira, G.R.P., Salazar, C., Chouteau, M., Counterman, B.A., Papa, R., Blaxter, M., Reed, R.D., ... Mallet, J. (2019). Genomic architecture and introgression shape a butterfly radiation. *Science*, 366 (6465), 594-599.
- Elias, M., Hill, R.I., Willmott, K.R., Dasmahapatra, K.K., Brower, A. V., Mallet, J. y Jiggins, C.D. (2007). Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274 (1627), 2881-2889.
- Gilbert, L.E. (2003). Adaptive novelty through introgression in *Heliconius* wing patterns: evidence for a shared genetic "toolbox" from synthetic hybrid zones and a theory of diversification. *Ecology and Evolution Taking Flight: Butterflies as Model Systems*. Edited by: Boggs C.L., Chicago: University of Chicago Press. 281-318.
- Giraldo, C.E. (2015). *La taxonomía integrativa en la resolución de problemas taxonómicos complejos en insectos: un caso de estudio en mariposas diurnas neotropicales*. Libro de Memorias, 42 Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Medellín, 42, 142-162.
- Hendry, A.P. (2009). Speciation. *Nature*, 458, 162-164.
- Jiggins, C.D., McMillan, W.O., Neukirchen, W. y Mallet, J. (1996). What can hybrid zones tell us about speciation? The case of *Heliconius erato* and *H. bimera* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol J Linn Soc.*, 59, 221-242.
- Jiggins, C.D. y McMillan, W.O. (1997). The genetics basis of an adaptive radiation: warning colour in two *Heliconius* species. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 264, 1167-1175.
- Jiggins, C.D. y Mallet, J. (2000). Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends Ecol Evol.*, 15, 250-255.
- Jiggins, C.D., Naisbit, R.E., Coe, R.L. y Mallet, J. (2001). Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature*, 411, 302-305.
- Jiggins, C.D., Salazar, C., Linares, M. y Mavarez, J. (2008). Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. Speciation special issue of *Phil. Trans. Royal Soc.*, 363, 3047-3054.
- Kozak, K.M., Wahlberg, N., Neild, A.F., Dasmahapatra, K.K., Mallet, J. y Jiggins, C.D. (2015). Multilocus species trees show the recent adaptive radiation of the mimetic *Heliconius* butterflies. *Systematic Biology* 64, 505-524.
- Kronforst, M.R., Young, L.G., Blume, L. M. y Gilbert, L.E. (2006). Multilocus analysis of admixture and introgression among hybridizing *Heliconius* butterflies. *Evolution*, 60, 1254-1268.
- Lamas, G. (2004). *Heliconiinae* pp. 261-274. In: Lamas, G. (Ed.). *Atlas of Neotropical Lepidoptera*, Check list: Part 4A, Hesperoidea-Papilionoidea. Association for Tropical Lepidoptera, Gainesville. 439 pp.
- Linares, M. (1996). The genetics of the mimetic coloration in the butterfly *Heliconius cydno weymeri*. *Heredity*, 87, 142-149.
- Mallet, J. y Barton, N. H. (1989). Strong natural selection in a warning colour hybrid zone. *Evolution*, 43, 421-431.

- Mallet, J. (1993). *Speciation, radiation, and color pattern evolution in Heliconius butterflies: evidence from hybrid zones. Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Edited by: Harrison R.G. New York: Oxford University Press, 226-260.
- Mallet, J. (1995). A species definition for the Modern Synthesis. *Tree*, 10, 294-298.
- Mallet, J. y Gilbert, L.E., 1995.- Why are there so many mimicry rings? Correlations between habitat, behaviour and mimicry in *Heliconius* butterflies. *Biol J Linn Soc.*, 55, 159-180.
- Mallet, J. (1999). Causes and consequences of a lack of coevolution in Müllerian mimicry. *Evolutionary Ecology*, 13, 777-806.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. Reviews. *Nature*, 446, 279-283.
- Mallet, J. (2013). *Species, concept of*. Encyclopedia of Biodiversity. Volume 6, 679-691.
- Mallet, J. y Willmott, K. (2003). Taxonomy: renaissance or Tower of Babel? *Trends Ecol. Evol.*, 18, 57-59.
- Mallet, J., Beltran, M., Neukirchen, W. y Linares, M. (2007). Natural hybridization in Heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 1-16.
- Martin, S.H., Dasmahapatra, K.K., Nadeau, N.J., Salazar, C., Walters, J.R., Simpson, F., Blaxter, M., Manica, A., Mallet, J. y Jiggins, C.D. (2013). Genome-wide evidence for speciation with gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Research*, 23, 1817-1828.
- Mavarez, J., Salazar, C. A., Bermingham, E., Salcedo, C., Jiggins, C. D. y Linares, M. (2006). Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. *Nature*, 441(15), 868-871.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Merchan, A., Jiggins, C. y Linares, M. (2005). A narrow *Heliconius cydno* (Nymphalidae; Heliconiini) hybrid zone with differences in morph sex ratios. *Biotropica*, 37 (1), 119-128.
- Muñoz-Ortiz, A. (2004). Evidencia de la especiación incipiente entre *Heliconius erato venus* y *Heliconius erato chesteronii*. Tesis de Maestría. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Bogotá, 81 p.
- Naisbit, R.E., Jiggins, C.D., Linares, M. y Mallet, J. (2002). Hybrid sterility, Haldane's rule, and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. *Genetics*, 161, 1517-1526.
- Neukirchen, W. (1991). Polymorphie und systematik von *Heliconius longarena* Hewitson (Lepidoptera: Nymphalidae). *Entomologische Zeitschrift*, 101 (3), 33-52.
- Rosser, N., Kozak, K.M., Phillimore, A.B. y Mallet, J. (2015). Extensive range overlap between heliconiine sister species: evidence for sympatric speciation in butterflies? *BMC Evolutionary Biology*, 15, 125.
- Rosser, N., Freitas, A., Huertas, B., Joron, M., Lamas, G., Merot, C., Simpson, F., Willmott, K.R., Mallet, J. y Dasmahapatra, K. (2019). Cryptic speciation associated with geographic and ecological divergence in two Amazonian *Heliconius* butterflies. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186, 233-249.
- Salazar, C.A., Jiggins, C.D., Arias, C.F., Tobler, A., Bermingham, E. y Linares, M. (2005). Hybrid incompatibility is consistent with a hybrid origin of *Heliconius heurippa* Hewitson from its close relatives *Heliconius cydno* Doubleday and *Heliconius melpomene* Linnaeus. *J Evol Biol.*, 18, 247-256.
- Shapiro, B.J., Leducq, J.B. y Mallet, J. (2016). What is speciation? *Plos Genetics*, 12 (3), e1005860.
- Sheppard, P.M., Turner, J.R.G., Brown, K.S., Benson, W.W. y Singer, M.C. (1985). Genetics and the evolution of Mullerian mimicry in *Heliconius* butterflies. *Phil. Trans. R. Lond. B.*, 308, 433-610.
- Stebbins, G.L. (1958). The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Advances in Genetics*, 9, 147-215.
- The *Heliconius* Genome Consortium. (2012). Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, 487 (7405), 94-98.
- Turner, J.R.G. (1977). Butterfly mimicry: the genetical evolution of an adaptation. *Evolutionary biology* 10, 163-206.
- Wahlberg, N., Braby, M., Brower, A., Lee, R., Nylin, S., Pierce, N., Sperling, F., Vila, R., Warren, A. y Zakharov, E. (2005). Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proc Roy Soc Lond.*, 272, 1577-1586.
- Willmott, K.R., Constantino, L.M., y Hall, J.P.W. (2001). A review of *Colobura* (Lepidoptera: Nymphalidae) with comments on larval and adult ecology and description of a sibling species. *Annals of the Entomological Society of America*, 94 (2), 185-196.