

---

## FILOGENIA DE ESPECIES DEL SUBGÉNERO *Parides* (LEPIDOPTERA: PAPILIONIDAE) BASADA EN SECUENCIAS DEL GEN CITOCROMO OXIDASA I

### Species phylogeny of the Subgenus *Parides* (Lepidoptera: Papilionidae) Based in Sequences of Cytochrome Oxidase I Gene

INGRID MARCELA GUTIÉRREZ R.<sup>1</sup>, M.Sc. (c); GIOVANNY FAGUA<sup>2</sup>, M.Sc.

<sup>1</sup> Maestría en Biotecnología y Biología Molecular Médica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. ingriddna@yahoo.com

<sup>2</sup> Laboratorio de Entomología. Grupo de Sistemática Molecular. Pontificia Universidad Javeriana, carrera 7 # 43-82, edificio Jesús Emilio Ramírez (54). Departamento de Biología. Bogotá, Colombia. Tel.: 57 1 320 83 20 ext. 4081. Fax: 57 1 320 83 20 ext. 4057. fagua@javeriana.edu.co

Correspondencia: Giovanni Fagua, fagua@javeriana.edu.co

Presentado el 19 de abril de 2012, aceptado el 6 de junio de 2012, correcciones el 21 de octubre de 2012.

#### RESUMEN

*Parides* Hübner es el taxón terminal de Troidini, un grupo de mariposas aposemáticas diversificado en el trópico y subtrópico, y modelos de varios complejos miméticos bateianos y mullerianos. Varias de las especies americanas de *Parides* son simpátricas e involucran poblaciones con variaciones intraespecíficas en los patrones de coloración, lo que genera confusiones en la definición del estatus taxonómico, especialmente en Colombia, punto de convergencia de las biotas de Norte y Suramérica. Este trabajo genera una aproximación a la filogenia de este grupo de mariposas y establece una definición más robusta de algunos de los taxones. Para ello se analizaron ejemplares pertenecientes a 15 taxones del subgénero americano *Parides* (*Parides*) como grupo interno y se utilizó como grupo externo especies de otros dos géneros estrechamente relacionados de Troidini. Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de Pascual *et al.* (1997) y DNeasy Kit. Se amplificó el fragmento final del gen Citocromo Oxidasa I (COI) de 476 pb. Para obtener una hipótesis filogenética se realizaron análisis de máxima parsimonia y se evaluó el soporte de cada nodo mediante *Jackknife* y soporte absoluto de Bremer. También se realizó un análisis bayesiano. La hipótesis resultante sugiere que el subgénero *Parides* es un grupo parafilético. Molecularmente se hicieron también válidas una especie y cinco subespecies. Los ejemplares analizados de *Parides* se dividieron en tres grupos principales coincidentes con los grupos *Lysander* (grupo 1) y *Aeneas* (grupos 2 y 3) de Rothschild y Jordan (1906).

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, distribución geográfica, filogenia molecular, mariposas, neotrópico.

## ABSTRACT

*Parides* Hübner is a terminal taxon of Troidini, an aposematic butterfly group that is diverse in the tropics and subtropics, and a model of mullerian and batesian mimetic complexes. Several American species of *Parides* are sympatric and include populations with intraspecific variation in color pattern, thus creating confusion on their taxonomic status, mainly in Colombia where the biota of North and South America converge. This work presents a phylogenetic hypothesis of these butterflies and proposes a more robust definition of some taxa. For this, 15 taxa of the subgenus *Parides* were analyzed as in-group; species of other two genera of Troidini, closer to *Parides*, were used as out-group. DNA was extracted using the Pascual *et al.* (1997) protocol and Quiagen DNAeasy kit. A terminal fragment of Cytochrome Oxidase I gen (476 bp) were amplified. We obtained a phylogenetic approximation using maximum parsimony and evaluated the branch support with Jackknife and absolute Bremer support. We also conducted a bayesian analysis. The resulting phylogenetic hypothesis suggested that *Parides* is a paraphyletic group; the molecular evidence support one species and five subspecies. The analyzed taxa were divided in three principal groups coincident with the *Lysander* (group 1) and *Aeneas* (groups 1 and 2) groups proposed by Rothschild and Jordan (1906).

**Keywords:** Butterflies, geographical distribution, mitochondrial DNA, molecular phylogeny, neotropic.

## INTRODUCCIÓN

Las mariposas del subgénero *Parides* Hübner, 1819 presentan generalmente alas negras con manchas amarillas, rojas o verdes, el cuerpo es negro con manchas rojas, las uñas tarsales son asimétricas y son dimórficas, siendo siempre más conspicuo el macho. Sus larvas se alimentan de plantas tóxicas de la familia Aristolochiaceae (DeVries, 1987). Las hembras presentan un ducto de la *bursae* corto y ancho, que corresponde con el *edeagus* corto y grueso de los machos (Fagua, 1997). Las hembras son muy similares entre especies y forman parte de un importante complejo mimético Müllleriano asociado a otro complejo mimético Batesiano (DeVries, 1987).

*Parides sensu lato* está diversificado en el trópico y el subtrópico y se encuentra dividido en tres subgéneros (*sensu* Miller, 1987): *Panosmia* y *Atrophaneura* del viejo mundo (zona tropical asiática, los Himalayas, el sureste de China y sur de Japón) con 26 especies; y el subgénero *Parides* en el Neotrópico, con 34 especies y 107 subespecies (*sensu* Tyler *et al.*, 1994). En Colombia este subgénero está diversificado en los bosques húmedos de la cuenca Amazónica, la Costa Pacífica y el Magdalena Medio (Fagua, 1997). Fagua (1997) registró para Colombia 17 especies y aceptó 28 subespecies, catalogando como formas otras 20 subespecies debido a su completa simpatria, mientras que Le Crom *et al.* (2002) registran 16 especies y aceptan 38 subespecies, varias de ellas simpátricas. Existe una gran confusión en la identificación de los taxones subespecíficos del subgénero, al utilizar características morfológicas y de coloración, debido a que las especies y subespecies son generalmente simpátricas e incluyen poblaciones con variaciones intraespecíficas en los patrones de coloración. Esto ha generado confusiones en la

definición del estatus taxonómico, especialmente en Colombia, donde convergen especies y poblaciones de Norte y Suramérica (Fagua, 1997).

Una subespecie es una población fenotípicamente diferenciable cuyo rango de distribución no se solapa con el de otras subespecies (Fox, 1955; Frost *et al.*, 1991; Mayr y Ashlock, 2001; Patten y Unitt, 2002) según esto, muchas de las formas descritas como subespecies para Colombia y América no se ajustan a dicha definición. Además, debido a la amplia capacidad de desplazamiento de los papilionidos, es frecuente la generación de híbridos o la distribución clinal de los caracteres empleados como diagnósticos en algunas formas con categoría de subespecie (Sperling y Harrison, 1994). Por ello se hace necesario el análisis de caracteres moleculares que permiten una definición más robusta del estatus taxonómico de los taxones del subgénero *Parides* a partir de diferencias en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), para el caso, generando una hipótesis filogenética que incluyó el mayor número de taxones del grupo *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906), justamente el de mayor número de taxones problemáticos. El uso de regiones del ADN mitocondrial como marcadores moleculares han permitido la obtención de filogenias robustas, la delimitación de especies objetivo y la estimación del flujo de genes (Moritz *et al.*, 1987; Harrison, 1989; Hillis, 1996). Las regiones de los genes mitocondriales COI y COII han sido bien estudiadas en Lepidoptera y existe una base de datos importante de estas secuencias. El gen COI se considera una región que está evolucionando relativamente rápido a nivel nucleotídico (Caterino *et al.*, 2001), por lo que se asume como una excelente herramienta de trabajo para resolver relaciones a nivel de especies y grupos de especies entre Papilionidae (Caterino y Sperling, 1999).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ESPÉCIMENES

Se utilizaron especímenes depositados en las colecciones entomológicas del IAvH (Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia), MPUJ (Museo Javeriano de Historia Natural, Bogotá, Colombia) y la CP LeCrom (Colección Personal de Jean Francois LeCrom, Bogotá, Colombia). Los adultos del subgénero *Parides* se identificaron a nivel de especies y subespecies mediante las claves morfológicas e ilustraciones de Rothschild y Jordan (1906), Tyler *et al.* (1994), Fagua (1997) y Le Crom *et al.* (2002), para posteriormente confrontar estas determinaciones con secuencias del gen mitocondrial COI, de cada espécimen se obtuvo material fotográfico.

El análisis filogenético incluyó 30 especímenes (Tabla 1 y Tabla 2); el grupo interno lo conformaron 15 taxones de *Parides* de los que se obtuvieron secuencias, 12 de Colombia (25 especímenes de los cuales se extrajo ADN y se pudo amplificar exitosamente el fragmento mitocondrial de comparación, (Tabla 2), y tres de Brasil (*P. bunichus*, *P. neophilus* y *P. panthonus jaguarae*) cuyas secuencias se obtuvieron del GenBank (Silva-Brandão *et al.*, 2005). Las secuencias de las especies del grupo externo, *Atrophaneura alcinous* y *Pachliopta neptunus*, también se obtuvieron del GenBank (Fig. 1; Tablas 1 y 2).

Para la obtención de las secuencias se extrajeron las tres patas de un costado de cada espécimen o cualquier pata(s) si no las presentaban. En ejemplares antiguos (más de diez años de colecta) se realizó extracción del tórax. Patas o tórax se depositaron por espécimen en tubos estériles de 1,5 ml debidamente marcados y se almacenaron a -20 °C para evitar la degradación del ADN.

Taxones	Localidad	n.º. GenBank
<i>Byasa (Atrophaneura) alcinous</i> (Klug, 1836)	Okura, Japón	AF170876
<i>Losaria (Pachliopta) neptunus</i> (Guérin-Méneville, 1840)	Malasia	AF044023
<i>Parides bunicus</i> (Hübner, 1821)	Santa Maria, RS, Brasil	AY804366
<i>Parides neophilus</i> (Geyer, 1837)	Campinas, SP, Brasil	AY804373
<i>Parides panthonus jaguarae</i> (Foetterle, 1902)	Belo Horizonte, MG, Brasil	AY804376

Tabla 1: Taxones de Troidini con localidad y número de acceso al GenBank.

Especie y ubicación	Colección
<i>Parides aeneas bolivar</i> (Hewitson, 1850) Colombia, Meta, San Martín.	MPUJ
<i>Parides anchises serapis</i> (Boisduval, 1836) Colombia, Atlántico, Piojo, Cerro La Vieja (espécimen 1). Barranquilla (espécimen 2)	MPUJ
<i>Parides anchises alyattes</i> (Felder y Felder, 1861) Colombia, Tolima, Armero, Guayabal, Vereda Santo Domingo, Buenavista (espécimenes 1 y 2)	MPUJ
<i>Parides chabrias chabrias</i> (Hewitson, 1852) Colombia, Amazonas, Leticia	MPUJ
<i>Parides childrenae childrenae</i> (Gray, 1832) Colombia, Chocó (espécimenes 1 y 2)	MPUJ
<i>Parides eurimedes arriphus</i> (Boisduval, 1836) Colombia, Casanare, Aguazul, Vereda El Salitre, finca Brisas del Llano (espécimen 1) Colombia, Chocó (espécimenes 2 y 3)	MPUJ
<i>Parides erithalion yaminahua</i> (Pischedda y Racheli, 1987) Colombia, Caquetá, San Vicente del Caguán, PNN Picachos	MPUJ
<i>Parides iphidamas</i> (Fabricius, 1793) Colombia, Santander, Barichara, Cuenca Cabrera (espécimen 1) Guajira, Maicao, Zona Comercial (espécimen 2)	MPUJ
<i>Parides lycimenes erythrus</i> (Rotschchild y Jordan 1906) Colombia, Cundinamarca, La Vega, Laureles, Parque Ecológico Vegaterapia (espécimen 1). Chocó (espécimenes 2 y 3)	MPUJ
<i>Parides lysander lysander</i> (Cramer, 1776) Colombia, Meta, San Martín, finca Tocancipá (espécimen 2). Vichada, PNN Tuparro, Mata de monte, Trampa pitfall de dosel (espécimen 1)	Le Crom
<i>Parides lysander brissonius</i> (Hübner, 1819) Colombia, Meta, San Martín, finca Tocancipa	MPUJ
<i>Parides phosphorus gratianus</i> (Bates, 1861) Colombia, Caquetá, San Vicente del Caguán, PNN Picachos	MPUJ
<i>Parides sesostris tarquinus</i> (Boisduval, 1836) Colombia, Chocó (espécimenes 1 y 2)	Le Crom
<i>Parides vertumnus bogotanus</i> Felder (1864) Colombia, Cundinamarca, municipio La Vega, laguna del Tabacal (espécimen 1). Amazonas, Leticia, Comunidad Indígena Zaragoza (espécimen 2)	MPUJ

Tabla 2: Espécimenes del subgénero *Parides* seleccionados para el análisis filogenético depositados en las colecciones entomológicas nacionales: IAvH (Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia), MPUJ (Museo Javeriano de Historia Natural, Bogotá, Colombia) y la colección LeCrom (Colección Personal de Jean Francois LeCrom, Bogotá, Colombia).

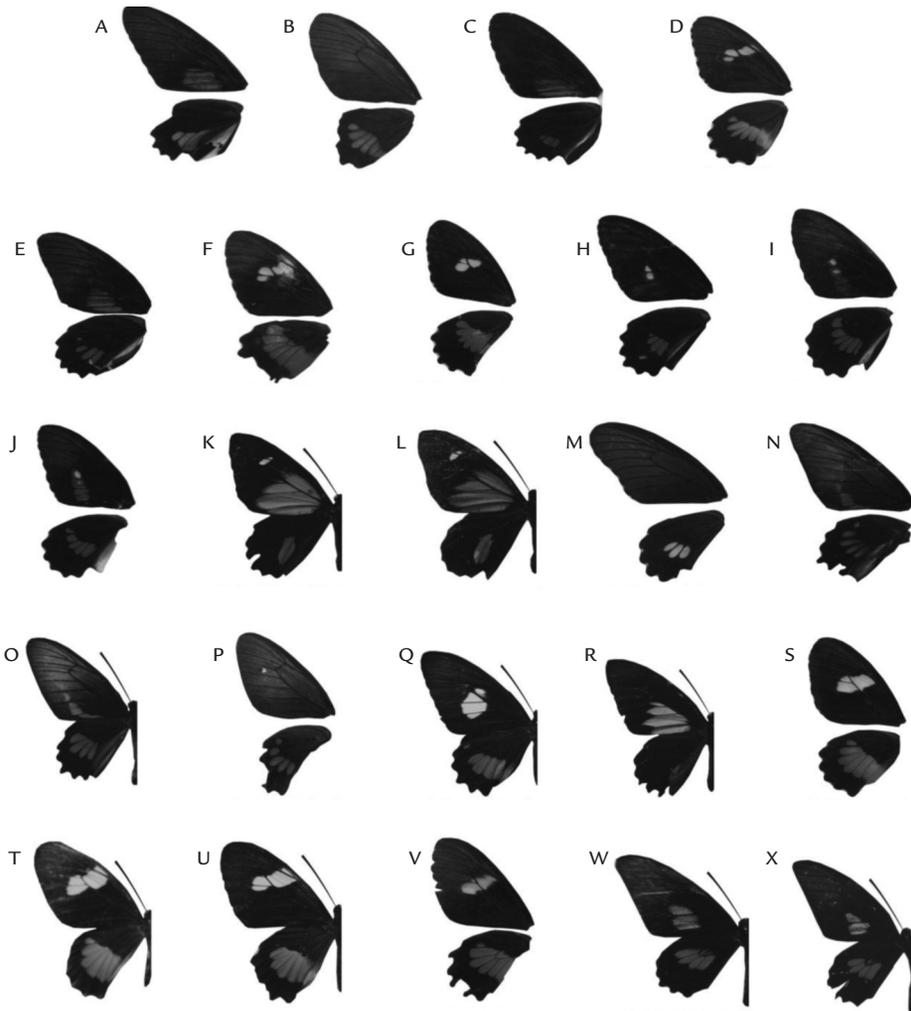


Figura 1. Especímenes utilizados en el estudio. A. *P. vertumnus bogotanus* macho. B. *P. v. bogotanus* hembra. C. *P. erithalion yaminahua* macho. D. *P. iphidamas* hembra. E. *P. phosphorus gratianus* macho. F. *P. iphidamas* hembra. G. *P. anchises alyattes* hembra. H. *P. a. alyattes* macho. I. *P. anchises serapis* macho 1. J. *P. a. serapis* macho 2. K. *P. c. childrenae* macho 1. L. *P. c. childrenae* macho 2. M. *P. aeneas bolivar* hembra. N. *P. lysander brissonius* macho. O. *P. l. lysander* macho. P. *P. l. lysander* hembra. Q. *P. sesostris tarquinus* hembra. R. *P. s. tarquinus* macho. S. *P. lycimenes erythrus* hembra 1. T. *P. l. erythrus* hembra 2. U. *Parides lycimenes erythrus* macho. V. *P. eurimedes arriphus* hembra. W. *P. e. arriphus* macho 1. X. *P. e. arriphus* macho 2.

#### EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN

La extracción de ADN de los especímenes se realizó utilizando *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen QIAamp) para los ejemplares con más de un año de colecta y el protocolo de Pascual *et al.* (1997) para los ejemplares menores a un año de colectado. Al protocolo de Pascual *et al.* (1997) se le incluyó una fase previa de maceración de los tejidos con nitrógeno líquido.

El ADN obtenido se preservó a -4 °C para luego realizar las amplificaciones de los fragmentos definidos por PCR. Se amplificó el fragmento final de 476 pb del gen COI, utilizando los primers Jerry (CAACATTTATTTTGATTTTTGG) y Mila (GCTAATCCAGTGAATAATGG), Caterino y Sperling, 1999; Caterino *et al.*, 2001, por presentar una mayor tasa de variación (Lumpley y Sperling, 2010). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador empleando calor de arranque; se inició con una denaturación a 95 °C por 5 min; seguido por 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 47 °C, 1 min 30 segs a 72 °C y una extensión final 10 min a 72 °C. Una vez amplificadas todas las muestras, se almacenaron a -4 °C, hasta su posterior traslado a la fase de purificación y secuenciación (efectuado directamente en ambos sentidos de la doble cadena) realizada por MACROGEN Ltda.

### ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias nucleotídicas se alinearon manualmente con el programa BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 2005), utilizando como referencia a la secuencia de COI de *Drosophila yakuba*, por estar la molécula de ADN mitocondrial de esta especie completamente secuenciada (Clary y Wolstenholme, 1985); se compararon ambos sentidos de la doble cadena para cada muestra (espécimen) y todas las secuencias se analizaron por medio de POY 3.0.11 (Wheeler *et al.*, 2003). Los gaps no se observaron como entidades, pero se tomaron como indels (eventos de inserción/delección) para optimizar el alineamiento (Wheeler, 1996).

Para el análisis filogenético se analizó primero la matriz de datos completa mediante PAUP 4.0q (Swofford, 1999). Por medio del programa MODELTESTS 3.06 (Posada y Crandall, 1998), se determinó el modelo de evolución al que mejor se ajustaba al gen, la proporción de transición/transversión, la proporción de sitios invariables y el modelo de sustitución que mejor se ajustaba a los datos obtenidos. Se utilizó máxima parsimonia (MP) utilizando caracteres moleculares. Los análisis de MP se ejecutaron por medio de *Tree Analysis using New Technology*; TNT 1.1 (Goloboff *et al.* 2008), empleando los siguientes parámetros: búsqueda heurística, TBR *branch-swapping* para obtener los árboles más parsimoniosos, adición de 500 réplicas y un *ratchet* de 200 iteraciones; los caracteres multiestado fueron tratados como polimorfismos y todos con pesos diferentes, los *gaps* fueron contados como datos faltantes. El índice de consistencia (IC) y el índice de retención (IR) fueron calculados en Winclada 1.00.08 (Nixon, 1999-2002). De igual manera, con TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) se determinó el grado de soporte o la robustez de las ramas empleando: soporte por análisis de *Jackknife* (Felsenstein, 2004) y el soporte absoluto de Bremer (Felsenstein, 2004). Los valores del soporte se definieron como: “soporte débil” valores de Bremer de 1-6 (correspondiendo a valores de *Jackknife* 3 % - 40 %), “soporte moderado” con valores entre 6-16 (valores de *Jackknife* 41 % - 70 %), “soporte bueno” con valores entre 17-22 (valores de *Jackknife* 71 % - 88 %) y “soporte fuerte” con valores > 22 (valores de *Jackknife* 89 % - 100 %). Por medio de PAUP 4.0q (Swofford 1999), se determinó el número de sitios constantes, sitios variables no informativos y el número de sitios informativos de parsimonia.

Se realizaron análisis Bayesianos con el programa MrBayes 3.1 (Ronquist *et al.*, 2005), utilizando el modelo de evolución obtenido para el gen; se corrieron simulaciones de seis cadenas simultáneas para  $1,0 \times 10^6$  generaciones, el muestreo de los árboles se realizó sobre 250 ciclos. Se descartaron los primeros 1000 árboles como “calientes”. Los

valores de probabilidad posterior (PP) se definieron como: “débil” valores entre 53 % - 61 %, “bueno” con valores entre 65 % - 95 % y “fuerte” con valores > 97 %.

## RESULTADOS

### REVISIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS ESPÉCIMENES

Se revisaron 403 ejemplares del subgénero *Parides* en las colecciones visitadas. Desafortunadamente, la mayoría fueron colectados hace más de 20 años, constituyéndose en material antiguo para conservar ADN en buen estado. Para la extracción se seleccionaron 137 especímenes colectados después de 1996; de estos se logró obtener ADN de 130, pero solo en 80 se pudo amplificar el fragmento de estudio. Una vez alineadas las 80 muestras, se decidió incluir en el análisis solo a 25, dado que las 55 restantes presentaron un bajo porcentaje de coincidencia nucleotídica (< 80 %) al alinearlas respecto a la secuencia de referencia (COI de *Drosophila yakuba*, Clary y Wolstenholme, 1985), evento consecuencia del mal estado de conservación de su ADN.

Como se comentó, al método de extracción de ADN de Pascual *et al.*, 1997, se adicionó la maceración de los tejidos en nitrógeno líquido, previo a su paso al buffer de lisis, evento que facilitó la rotura adecuada de los tejidos, en muy poco tiempo, y que aumentó la cantidad obtenida de ADN. Se evidenció que el fragmento amplifica dependiendo de la especie. Es decir, se presentaron especies con una alta cantidad de ADN en donde el marcador molecular funcionó perfectamente, mientras que en otros casos, como en *Parides neophilus*, la muestra no amplificó, a pesar de realizar diferentes pruebas de amplificación (cambios en la temperatura de anillamiento, en el volumen del buffer de la polimerasa, el cloruro de magnesio, la concentración de la polimerasa y el volumen final de la reacción). En otros casos las señales de amplificación fueron nulas o bajas (*P. sesostris*, *P. childrenae* y *P. eurimedes*), lo que puede corresponder a que el ADN de algunas especies de *Parides* podría presentar una mutación en la zona de complementariedad con los primers (alelo-específicos), ocasionando una disminución o pérdida de especificidad de los primers hacia la secuencia complementaria.

### ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se analizaron las bases y posiciones de 695 pb del gen COI (695 caracteres), incluyendo nucleótidos y *gaps*; 161 caracteres fueron constantes, 56 caracteres variables no informativos de parsimonia y 476 caracteres informativos de parsimonia. Los análisis filogenéticos se determinaron bajo el modelo de evolución simple de Jukes-Cantor, GTR + G (*General Time-Reversible model*; Rodríguez *et al.*, 1990), con distribución gamma y sin proporción de sitios invariables. El promedio de A+T fue de 56,16 % (26,10 % A, 30,06 % T) mayor que el promedio de G+C de 43,83 % (19,89 % G, 23,94 % C). La proporción de transición/transversión fue de 0,816, lo que corresponde a una saturación de transición en las secuencias analizadas; se observó que la proporción de sustitución de C-T fue sustancialmente más alta que otro tipo de sustitución.

### MÁXIMA PARSIMONIA

El análisis de máxima parsimonia produjo dos árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 3236 (IC = 0,5, IR = 0,31), cuyo consenso estricto dio un árbol con una

longitud de 3240 y los mismos índices de consistencia y retención (Fig. 2). En los dos árboles y el consenso se encontró una baja homoplasia (IC = 0.5) y la parafilia del subgénero *Parides*. El árbol de consenso estricto mostró menor resolución por colapsar el clado en donde se encuentran las subespecies *P. anchises alyattes*, *P. anchises serapis* y *P. erithalion yaminahua*, mostrando relaciones inciertas entre estas (Fig. 2). Asimismo, el árbol reveló que los nodos de las ramas basales están pobremente resueltos, presentando soporte de *Jackknife* débil y moderado (3 % - 47 %) y soporte de Bremer débil (1-6); por el contrario, los nodos de las ramas terminales estuvieron bien soportados por *Jackknife* (71 % - 100 %) y Bremer (17-32).

Las relaciones de *Parides* con el grupo externo, *Atrophaneura alcinous* y *Pachliopta neptunus*, no fueron claramente resueltas. *A. alcinous* resultó externa a las *Parides americanas*, evento coherente con lo propuesto por Miller, 1987, mientras que las *Parides* estudiadas se agregaron en una rama bien soportada por *Jackknife* pero no por Bremer (Fig. 2). Sin embargo *P. neptunus*, grupo hermano de los Troidini neotropicales *sensu* Miller (1987), se asoció con *P. lysander lysander* dentro del grupo interno, con soporte de *Jackknife* moderado y soporte de Bremer débil. *P. bunichus* resultó la especie basal de las *Parides americanas*, con soporte de *Jackknife* fuerte y de Bremer bajo, coincidiendo con los resultados de Silva-Brandão *et al.* (2005). *P. bunichus* fue incluida dentro del grupo *Ascanius* por Rothschild y Jordan (1906).

La posición de *P. neophilus* como hermano de las *Parides* restantes (Fig. 2) no es coherente con estudios previos, aunque se resalta que su soporte de Bremer fue débil. Es importante anotar que las secuencias de los taxones obtenidas del GenBank se separaron de los taxones cuyas secuencias se obtuvieron del trabajo de laboratorio, lo anterior puede deberse a los indels introducidos en las secuencias durante el alineamiento. Sin embargo *P. panthonus jaguarae*, una secuencia obtenida del GenBank, se agrupó en el clado que incluyó a las *Parides* pero con valores de Bremer y *Jackknife* débiles.

Los taxones restantes de *Parides* se dividieron en tres grupos (1,2,3) y cuatro subgrupos (A, B, C, D; Fig. 2). El grupo 1, subgrupo A, incluyó a las especies de *Parides* con manchas marginales rosadas en el ala posterior, mientras que los subgrupos B, C y D incluyeron a las especies con manchas marginales blancas en el ala posterior. Este agrupamiento coincide con la propuesta por Rothschild y Jordan, 1906, para quienes los taxones con manchas marginales rosadas en el ala posterior conforman el grupo *Lysander*, mientras que los taxones con dichas manchas blancas conforman el grupo *Aeneas*. En este sentido, los resultados moleculares soportan el arreglo de Rothschild y Jordan (1906), aunque con las excepciones de *P. chabrias chabrias*, *P. vertumnus bogotanus* ejemplar 2 y *P. eurimedes arriphus* ejemplar 3.

Todos los ejemplares de *P. sesostris tarquinius* (soporte de *Jackknife* y Bremer fuertes) y *P. iphidamas* (soporte de *Jackknife* fuerte y soporte de Bremer moderado) conformaron grupos monofiléticos (Fig. 2). Las subespecies restantes con más de un espécimen en el análisis presentaron grupos parafiléticos como *P. childrenae childrenae*, *P. vertumnus bogotanus* 1 y *P. eurimedes arriphus* 3, con soportes de *Jackknife* y Bremer fuertes. Adicionalmente, como ejemplares hermanos se encontró a las dos *P. l. lysander* (soportes de *Jackknife* y Bremer fuertes), los dos *P. eurimedes arriphus* (*Jackknife* fuerte y Bremer bueno), los ejemplares 1 y 3 de *P. lycimenes erythrus* (*Jackknife* y Bremer fuertes) y los dos *P. anchises alyattes* (*Jackknife* y Bremer fuertes).

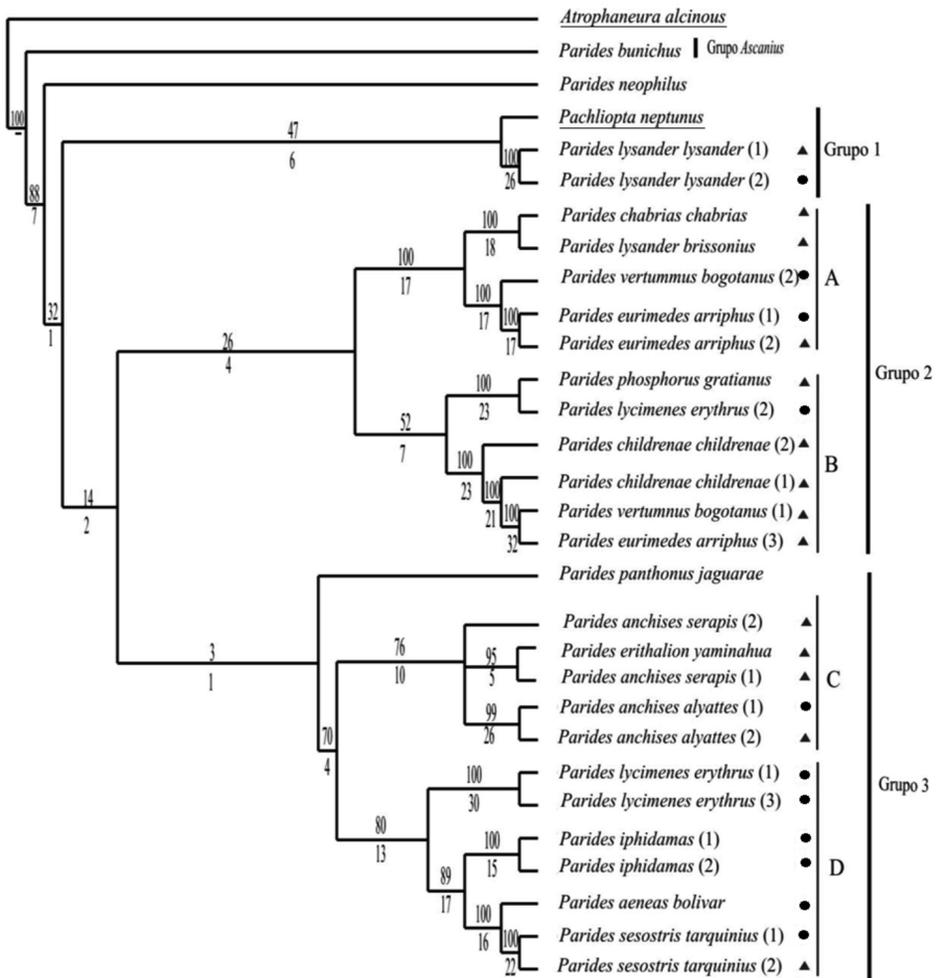


Figura 2. Árbol de consenso estricto de las especies de *Parides* (*Parides*) según análisis de máxima parsimonia, utilizando secuencias nucleotídicas de COI. Longitud 3240. IC=0.5. IR=0.31. Los números de las ramas indican valores de soporte de *Jackknife* (encima del nodo) y de Bremer (debajo del nodo). Los triángulos indican que el espécimen es macho, los círculos indican que el espécimen es hembra. Las especies del grupo externo se muestran subrayadas.

La mayoría de las ramas terminales se encontraron bien soportadas con soportes de *Jackknife* y Bremer buenos y fuertes; aunque para el clado de *P. anchises serapis* 1 y *P. erithalion yaminahua* el soporte de Bremer fue débil (5), lo que se relacionó con que la rama que soporta a este clado se colapsó. Además, los nodos de las ramas de los grupos 1, 2 y 3 presentaron soportes débiles, y los nodos de las ramas de los cuatro subgrupos presentaron valores de Bremer débil moderado, por lo que las relaciones entre los grupos o subgrupos no fueron robustas.

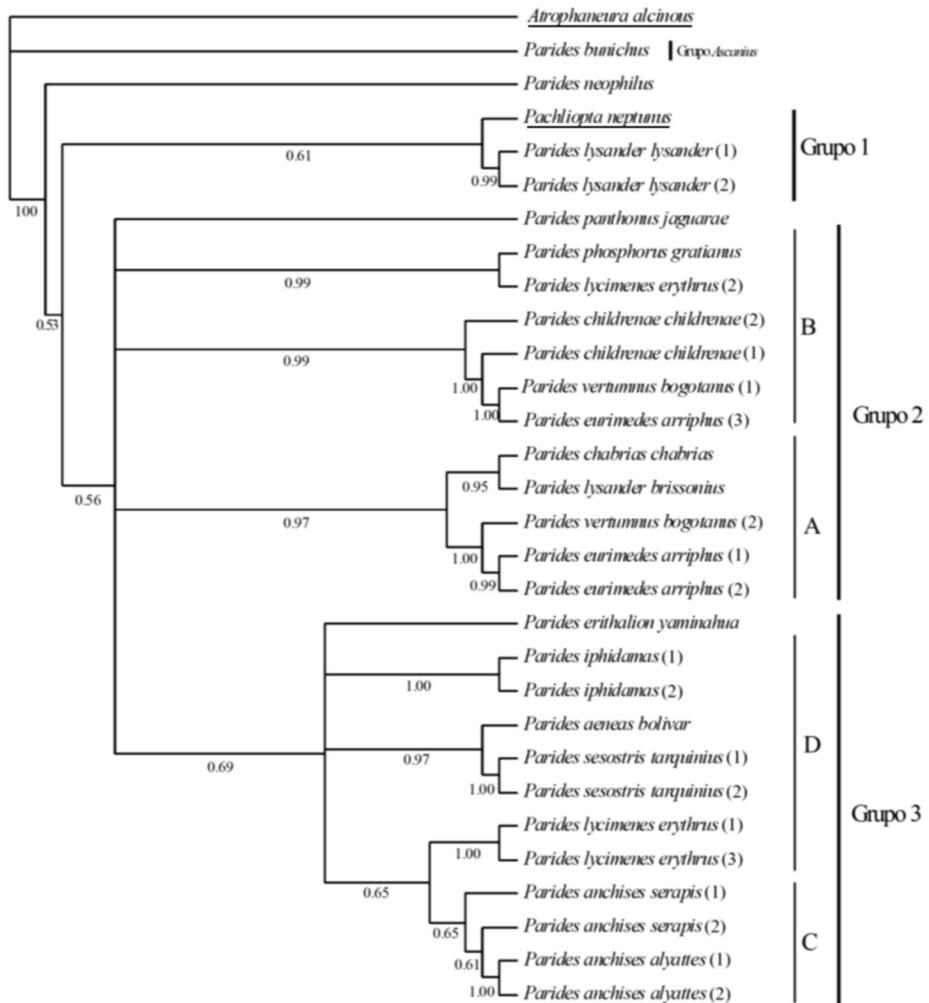


Figura 3. Árbol filogenético según análisis Bayesiano. Los valores de las ramas indican la probabilidad posterior Bayesiana. Las especies del grupo externo se muestran subrayadas.

### ANÁLISIS BAYESIANO

El análisis Bayesiano obtuvo un árbol de consenso estricto (Fig. 3) de 43.228 árboles restantes; la topología del árbol al incorporar el modelo de evolución GTR+G, con distribución gamma fue heterogénea, respecto de lo obtenido según análisis de Máxima Parsimonia (MP). El promedio de probabilidad posterior (PP) para la inferencia filogenética fue de 87 %. El árbol Bayesiano presentó diez ramas colapsadas con una PP del 90 %. Ocho (de 22) nodos del grupo interno presentaron una PP de 1,0, 14 nodos y estuvieron soportados con un nivel de significancia de > 0,9 (7 nodos) y > 0,5 (7 nodos). Las relaciones del clado *Parides* con el grupo externo en los dos análisis presentó coincidencia con una PP fuerte (100 %) para *Atrophaneura alcinous* y una PP moderada (61 %) para *Pachliopta neptunus*. *P. bunichus* estuvo por fuera del grupo y *P. neophilus* pre-

sentó la misma ubicación en el árbol que en MP y con una PP fuerte (100 %), comparado con el soporte de Bremer débil (7) de MP, por lo que la asignación de este taxón en el árbol puede ser precisa. *P. panthonus jaguarae* presentó colapso de su rama con una PP indeterminada, indicando relaciones confusas con los restantes taxones de *Parides*. Los grupos 1 y 3 establecidos en MP se encontraron claramente definidos en este análisis; sin embargo los subgrupos presentaron colapso en algunas de sus ramas y diferente distribución de los clados y de los taxones, por lo que las relaciones entre los taxones terminales variaron. Los clados que se modificaron en análisis Bayesiano con respecto a MP, correspondieron a los clados con soportes de Bremer débil a moderado. Así mismo, los nodos de las ramas basales del árbol de MP que presentaron soportes de *Jackknife* y de Bremer débiles correspondieron en análisis Bayesiano con las ramas con PP débil (53-56 %) y a las ramas que se colapsaron. El análisis Bayesiano, al igual que el de MP, estableció los dos grupos principales de *Parides* en buena parte coincidentes con los grupos *Lysander* y *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906), debido a que las relaciones de los taxones terminales en gran parte no se modificaron.

#### DETERMINACIÓN DE LOS TAXONES DE ESPECIE Y SUBESPECIE DE *Parides* EN COLOMBIA

Se analizaron 12 especies y 13 subespecies de *Parides* en Colombia (Tabla 2), que mostraron correspondencia respecto a la designación específica y subespecífica morfológicamente, propuesta en principio por Rothschild y Jordan (1906) y luego por Tyler *et al.*, (1994), Fagua (1997) y Le Crom *et al.*, (2002). El análisis de distribución geográfica de *Parides* en Colombia propuesta por Tyler *et al.*, (1994) y Fagua (1997), plantean a las subespecies de acuerdo a sus distribuciones alopátricas o simpátricas, respectivamente. Lo anterior fue un factor importante en la validación de los taxones analizados a nivel de especie y subespecie de *Parides*. Además, esta delimitación fue coherente con el concepto de especie filogenético de Nixon y Wheeler (1990), quienes la definen como una detectable pequeña unidad de población monofilética, por lo que la monofilia que presentaron varios de los taxones con más de un individuo en el análisis de MP permitió hacer válido a una especie y cinco subespecies de *Parides*, para el caso: *P. iphidamas*, *P. anchises alyattes*, *P. eurimedes arriphus*, *P. lycimenes erythrus*, *P. lysander lysander* y *P. sesostris tarquinus*.

## DISCUSIÓN

#### ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Este análisis incluye el mayor número de taxones de *Parides* del grupo *Aeneas* de Rothschild y Jordan, 1906, del cual se analizaron 12 especies y 13 subespecies reconocidas para Colombia por Tyler *et al.*, 1994, Fagua, 1997 y Le Crom *et al.*, 2002. Con base en los resultados de Máxima Parsimonia (MP) y análisis Bayesiano, el subgénero *Parides* es parafilético, siendo esto no consecuente con la propuesta de Hancock (1983) quien propone a *Parides* como un grupo monofilético.

Según el análisis de Máxima Parsimonia, *Atrophaneura alcinous* fue corroborada como parte del grupo externo del subgénero *Parides*, evento que apoyaría el planteamiento propuesto por Munroe, 1961, y seguido por Miller, 1987, en dividir a *Parides* en las especies del Viejo Mundo (*Atrophaneura*) y las del Neotrópico (*Parides*). Por su parte, *Parides* se dividiría en tres grupos (Fig. 2), que coinciden en buena parte con los grupos *Ascanius*,

*Lysander* y *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906), quienes ubicaron a las *Parides americanas* en la subsección A "Aristolochia-Swallowtail" equivalente a las actuales Troidini Americanas. Estos grupos corresponderían a mariposas que presentan series submarginales de manchas rojas en el ala posterior (Hancock, 1983).

Dentro de las *Parides* (*Parides*) analizadas, la ubicación basal de *P. bunichus* corrobora lo propuesto por Rothschild y Jordan, 1906, Tyler *et al.*, 1994 y Silva-Brandão *et al.*, 2005, quienes ubican a esta especie en el grupo *Ascanius*, que retiene gran número de caracteres primitivos y tiene una distribución disyunta en América (México y Sur de Brasil). Adicionalmente, este trabajo corrobora en buena parte a la división de *Parides* de Rothschild y Jordan, 1906, hecha con base en análisis morfológicos.

La topología general obtenida del subgénero *Parides* fue diferente según análisis de MP y Bayesiano, excepto para la ubicación de *P. neophilus* que se mantuvo estable en los dos análisis como grupo hermano del resto de las especies de *Parides* (Fig. 2, Fig. 3). Sin embargo las topologías coincidieron en incluir a la mayoría de los taxones estudiados dentro de los grupos *Lysander* y *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906). El grupo *Lysander* incluyó a los taxones *P. lysander lysander*, *P. lysander brissonius*, *P. chabrias chabrias*, *P. vertumnus bogotanus 2* y *P. eurimedes arriphus*, que son mariposas con manchas marginales rosadas en el ala posterior y palpos labiales negros.

De estas solamente *P. chabrias chabrias* y *P. vertumnus bogotanus 2* corresponden al grupo *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906). Esta ubicación posiblemente se deba a que *chabrias* pertenecen a un grupo de especies más amplio que incluye a *Parides haneli*, *P. quadratus*, *P. pizarro*, *P. vercingetorix* y *P. klagesiesi*, de las que no se obtuvo ADN, lo que posibilita la vinculación de *P. chabrias chabrias* a cualquier rama. Respecto de *P. vertumnus bogotanus 2*, su ubicación puede ser explicada porque la hembra analizada puede corresponder a una forma geográfica no coincidente, o a que la designación taxonómica de los especímenes femeninos de esta subespecie, muy raras en colecciones, es incorrecta, característica que presentan algunas de las hembras de *Parides* (Fagua, 1997).

Las especies del grupo *Aeneas* pertenecerían al grupo de divergencia más reciente de *Parides* según análisis de MP e inferencia Bayesiana; estas incluyen a las mariposas con manchas marginales blancas en el ala posterior. No obstante, dentro de este grupo se incluyeron el ejemplar 3 de *P. eurimedes arriphus* y *P. panthonus jaguarae*, subespecies del grupo *Lysander* según Rothschild y Jordan (1906). La inclusión de estas dos en el grupo *Aeneas* puede ser simplemente una asignación azarosa dado el bajo porcentaje de coincidencia de la secuencia de *P. eurimedes arriphus* respecto del COI de *Drosophila yakuba*, y dados los soportes de *Jackknife* y Bremer débiles y PP débil de *P. panthonus jaguarae*. Este resultado contrasta con lo propuesto por Silva-Brandão *et al.* (2005), que designan a *P. panthonus jaguarae* como taxón hermano de *P. lysander* y relacionado con *P. eurimedes*, *P. zacythus* y *P. neophilus*. En el grupo 1 (Fig. 2) la primera divergencia corresponde al clado de *Pachliopta neptunus* y *P. lysander lysander*, ubicación que se mantuvo en los análisis de MP y Bayesiano, aunque con valores de Bremer y de PP débiles, por lo que la asignación como rama de divergencia basal de *Parides* debe tomarse como poco precisa. De igual manera, la ubicación de *Pachliopta neptunus* dentro de este grupo puede ser simplemente un artefacto debido a la no inclusión en el presente análisis de especímenes de *Cressida* y *Euryades*, taxones hermanos de *Pachliopta* (*sensu* Miller, 1987), lo que estaría respaldado por los soportes moderados de *Jackknife* y Bremer y la PP débil. Las relaciones entre los dos ejem-

plares de *P. lysander lysander*, fuertemente soportados, es consecuente con que, morfológicamente, corresponderían a macho y hembra de la misma subespecie.

El Grupo 2 (Fig. 2) presentó soportes débiles de *Jackknife* y de Bremer en su rama basal, lo que indica que las relaciones entre los subgrupos que lo integran (A y B) son imprecisas, evento evidenciado en análisis Bayesiano en donde las ramas que soportan cada subgrupo se colapsaron con PP fuertes. Referente al subgrupo A, sus ramas internas estuvieron bien soportadas y presentaron valores de *Jackknife* fuertes; este grupo incluyó dos clados (*P. chabrias chabrias* + *P. lysander brissonius*) y (*P. vertumnus bogotanus* 2+ (*P. eurimedes arriphus* 1 + *P. eurimedes arriphus* 2)).

El subgrupo B integrado por las subespecies *P. phosphorus gratianus*, *P. lycimenes erythrus*, *P. childrenae childrenae*, *P. vertumnus bogotanus* 1 y *P. eurimedes arriphus* 3 presentó diferente topología en los análisis de MP e inferencia Bayesiana, por lo que las relaciones de sus taxones terminales pueden ser ambiguas. Esto posiblemente se deba a que la rama interna que soporta este subgrupo mostró un valor de *Jackknife* moderado y soporte de Bremer débil; además, en análisis Bayesiano los clados (*P. phosphorus gratianus* + *P. lycimenes erythrus*) y (*P. childrenae childrenae* 1 + (*P. childrenae childrenae* 2 + (*P. vertumnus bogotanus* + *P. eurimedes mycale*))) se encontraron separados debido a que sus ramas se colapsaron con una PP de 99 %.

En el grupo 3 los subgrupos C y D incluyeron a los taxones *P. anchises alyattes*, *P. anchises serapis*, *P. erithalion yaminahua*, *P. lycimenes erythrus*, *P. iphidamas*, *P. aeneas bolivar* y *P. sesostris tarquinius*. Según MP este grupo presentó un soporte de Bremer débil y en análisis Bayesiano cuatro de sus ramas se colapsaron, por lo que las relaciones filogenéticas de la mayor parte de los taxones variaron, lo que demuestra confusas las relaciones entre sus taxones. El grupo C incluyó a los ejemplares de *P. anchises alyattes*, *P. anchises serapis*, *P. erithalion yaminahua*. Las relaciones filogenéticas de *P. anchises serapis* y *P. erithalion yaminahua* no se encontraron totalmente resueltas y en el análisis de MP las ramas que soportan a estas subespecies se colapsaron. Posiblemente la relación entre estas subespecies puede estar relacionada con la secuencia de *P. erithalion yaminahua*, que presentó un alto porcentaje de coincidencia nucleotídica con las secuencias de *P. anchises serapis*, lo que puede mostrar una afinidad genética entre estas subespecies a pesar de que los patrones de genitalia, la coloración y la morfología son diferentes (Fagua, 1997). No obstante, hay que destacar que solo se analizó un espécimen de *P. erithalion yaminahua* y que esta subespecie está restringida al Perú (Tyler *et al.*, 1994), por lo que puede corresponder a una forma o aberración de alguna especie de *P. erithalion* presente en Colombia, lo que debe ser ratificado mediante el análisis de más material de esta subespecie. Referente a los dos especímenes analizados (dos machos) de *P. anchises serapis*, a pesar de provenir de localidades distantes, mostraron igual fenotipo y una fuerte relación filogenética al ubicarse en el árbol dentro de un mismo clado, lo que podría corroborar lo planteado por Fagua (1997), quien la define como una subespecie muy distintiva y poco variable.

En el subgrupo D, que incluye a las subespecies *P. lycimenes erythrus*, *P. iphidamas*, *P. aeneas bolivar* y *P. sesostris tarquinius*, las relaciones entre los taxones no son claras y la rama presentó un valor de Bremer moderado en análisis de MP y en análisis Bayesiano, donde dos de sus clados se colapsaron. Finalmente, el análisis de MP reveló que el grupo 3, parte del *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906), fue el grupo divergencia más temprana dentro de las *Parides* estudiadas.

Varios autores han argumentado que tanto el número de caracteres como el número de taxones en ser muestreados son importantes en la buena estimación de los árboles filogenéticos (Swofford, 1999). En análisis de datos moleculares adicionar taxones a un grupo de genes puede a veces mejorar las inferencias del árbol filogenético, sobre todo en los casos donde el interés es el largo de las ramas (Hillis, 1996); además incrementar los taxones puede mejorar la reconstrucción del estado ancestral de los caracteres, estimar la proporción y los modelos de evolución de las secuencias, y generalmente proporcionan un mejor resumen de la historia evolutiva de un clado (Sanderson *et al.*, 2003).

El alto número de caracteres informativos que presentaron las secuencias, permiten entender porque los dos análisis mostraron topologías semejantes frente a la filogenia de *Parides*. Por consiguiente, se plantea que la hipótesis filogenética obtenida para *Parides* es robusta y con altos valores de *Jackknife*, Bremer y PP de los grupos de taxones terminales, aunque es importante aumentar el número de caracteres a analizar, lo que permitiría incrementar la exactitud (Hillis, 1998) y el soporte (Felsenstein, 2004; Sanderson *et al.*, 2003) de la hipótesis filogenética generada.

El grado de saturación encontrado en COI, correspondió a 0,816, siendo un valor alto, lo que puede deberse a que la gran mayoría de caracteres informativos presentaron cambios rápidos (sinónimos) en la tercera posición de un codón. El resultado de esta saturación se evidenció en las altas probabilidades que se obtuvieron en el análisis Bayesiano, estos modelos altos de probabilidad pueden ser el mejor ajuste de estos caracteres para generar una topología (Monteiro y Pierce, 2000).

#### **DETERMINACIÓN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS TAXONES DE ESPECIE Y SUBESPECIE DE *Parides* EN COLOMBIA**

De los 25 espécimenes analizados de *Parides* en este estudio y comparado con un mayor número de individuos analizados en los trabajos de Tyler *et al.* (1994), Le Crom *et al.* (2002) y especialmente el de Fagua (1997), se ratifica que la validación de varios de los taxones de *Parides* es poco robusta, a pesar de la coincidencia con estudios previos. Lo anterior se complementarían con el análisis genético de un mayor número de espécimenes, primordialmente para la definición de subespecies, porque la mayoría de las subespecies de *Parides* descritas son simpátricas e involucran poblaciones en las cuales se han reconocidos híbridos (Fagua, 1997).

Asimismo, el análisis molecular mostró que en la validación de las especies y subespecies de *Parides* es útil emplear machos y hembras, porque los dos conforman grupos monofiléticos dentro del árbol filogenético según análisis de MP e inferencia Bayesiana, como ocurre con los taxones de *P. lysander lysander*, *P. eurimedes arriphus*, *P. anchises alyattes* y *P. sesostris tarquinius*. Sin embargo, que en *P. lycimenes erythrus* una hembra se haya separado de los restantes ejemplares, puede estar relacionado con lo propuesto por Fagua (1997), quien menciona que varias de las hembras de las subespecies de *Parides* se encuentran taxonómicamente mal asignadas o pueden corresponder a formas geográficas no coincidentes o, incluso, podrían corresponder a híbridos interespecíficos ocasionales. La hipótesis filogenética plantea al subgénero *Parides* como un grupo parafilético y las *Parides* analizadas se dividieron en tres grupos principales coincidentes con los grupos *Lysander* y *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906). Por su parte varias de las relaciones filogenéticas que se describieron como incongruencias, se justifican por el bajo porcentaje

de coincidencia nucleotídica que presentaron algunos especímenes respecto a la secuencia de COI de *Drosophila yakuba*. Aunque también podría ser explicado por el bajo número de especímenes analizados dentro de cada taxón. Se encontró coincidencia frente al análisis morfológico de otros autores y el desarrollado en este trabajo en relación a la designación de taxones de especie y subespecie para el subgénero *Parides*, lo que permite establecer que los dos análisis se complementan, lo que integrado con la distribución geográfica, permite validar los estatus taxonómico de especies y subespecies para este subgénero en Colombia. Con los datos obtenidos los ejemplares soportaron, a nivel molecular, una especie y cinco subespecies, infortunadamente existe muy poco material fresco en colecciones para poder incrementar la muestra y la robustez de un análisis filogenético.

## CONCLUSIONES

El subgénero *Parides* fue recuperado como un grupo parafilético. Las *Parides* analizadas se dividieron en tres grupos principales, coincidentes con los grupos *Ascanius*, *Lysander* y *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906). La ubicación basal de *P. bunichus*, especie del grupo *Ascanius*, corrobora lo propuesto por Tyler *et al.* (1994) y Silva-Brandão *et al.* (2005). El resto de los taxones se distribuyeron en dos grupos y cuatro subgrupos. En el grupo 1, la primera rama divergente incluyó a *Pachliopta neptunus*, un macho y una hembra de *P. l. lysander*. La ubicación de *P. neptunus* dentro de este grupo puede ser un artefacto debido a la no inclusión de especímenes de *Cressida* y *Euryades*, taxones hermanos de *Pachliopta*. La estrecha asociación de macho y hembra de *P. l. lysander* es consecuente con su asignación subespecífica hecha a nivel morfológico.

El subgrupo A del grupo 2 correspondió principalmente al grupo *Lysander* de Rothschild y Jordan (1906) e incluyó a *P. l. lysander*, *P. lysander brissonius* y *P. eurimedes arriphus*. *P. chabrias* y *P. vertumnus bogotanus* 2 que también fueron incluidas en este grupo pero con soportes muy débiles, lo que es coherente con que estos taxones hayan sido incluidos dentro del grupo *Aeneas* por Rothschild y Jordan (1906). El subgrupo B del grupo 2 incluyó a las subespecies *P. phosphorus gratianus*, *P. lycimenes erythrus*, *P. childrenae childrenae*, *P. vertumnus bogotanus* 1 y *P. eurimedes arriphus* 3. Este presentó diferente topología en los análisis de MP e inferencia Bayesiana, por lo que las relaciones de sus taxones terminales pueden ser ambiguas. En este grupo una hembra de *P. lycimenes erythrus* se vinculó a un macho de *P. phosphorus gratianus*, lo que puede estar relacionado con una mala asignación taxonómica de la forma femenina, que podría corresponder a formas geográficas no coincidentes o a algún híbrido interespecífico.

En el grupo 3 los subgrupos C y D incluyeron a los taxones *P. anchises alyattes*, *P. anchises serapis*, *P. erithalion yaminahua*, *P. lycimenes erythrus*, *P. iphidamas*, *P. aeneas bolivar* y *P. sesostris tarquinius*. Estas especies son parte del grupo *Aeneas* de Rothschild y Jordan (1906), y fue el grupo divergencia más temprana dentro de las *Parides* estudiadas.

Un aspecto relevante de este estudio es dejar en claro que se está presentando una filogenia basada en la evidencia de cambio de un gen mitocondrial, por tanto de transferencia materna dentro de parte de las especies que conforman el subgénero. En este sentido, los alcances deben ser proporcionados y hacen parte de la resolución final de la filogenia de este muy interesante grupo de mariposas. No deja de ser interesante, sin

embargo, ver como los resultados coinciden en términos generales con los trabajos morfológicos taxonómicos realizados a principios del siglo XX.

Es conveniente comentar que la filogenia estará definida por el gen que presente una tasa de cambio adecuada al nivel taxonómico que se desea dilucidar. En este caso se analizaron cambios relativamente recientes desde el nivel intragenérico al subespecífico, y en este nivel, una de las mejores herramientas es el gen de la COI, como lo resaltan Caterino y Sperling (1999) y lo corroboran posteriormente Wahlberg y Wheat (2008).

### AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana (proyecto 03099) y a la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN), programa de becas a estudiantes en Entomología, por su apoyo financiero. Este trabajo se basó en la información geográfica y taxonómica obtenida en el proyecto “El género *Parides* Hübner (Lepidoptera Papilionidae) en Colombia” financiado por la Fundación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología del Banco de la República. A Mónica Higuera y Diana Álvarez por su asesoría y orientación durante la realización del proyecto. Al laboratorio de Genética de Poblaciones-Biología Evolutiva y al Grupo Elitros de trabajo en Entomología por su ayuda permanente. Un especial agradecimiento al Dr. Olaf Mielke, a Jean Françoise Le Crom y a Julián Salazar por su significativo apoyo con los especímenes.

### BIBLIOGRAFÍA

CATERINO MS, SPERLING FAH. Papilio Phylogeny Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and II Genes. *Mol Phylogenet Evol.* 1999;11(1):122-137.

CATERINO MS, REED RD, KUO MM, SPERLING FAH. A Partitioned Likelihood Analysis of Swallowtail Butterfly Phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). *Syst Biol.* 2001;50(1):106-127.

CLARY DO, WOLSTENHOLME DR. The mitochondrial-DNA molecule of *Drosophila yakuba* nucleotide-sequence, gene organization, and genetic-code. *J Mol Evol.* 1985;22(3):252-271.

DEVRIES PHJ. The butterflies of Costa Rica and their natural history. Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press. Princeton; 1987. p. 456.

FAGUA G. El género *Parides* Hübner, 1819 (Lepidoptera: Papilionidae) En Colombia. Tesis de Maestría en Biología Sistemática. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Informe final presentado a la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología. Banco de la República. Bogotá; 1997. p. 146.

FELSENSTEIN J. Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts; 2004. p. 580.

FOX EM. On subspecies. *Syst Zool.* 1955;4(2):93-95.

FROST D, KLUGE AG, HILLIS DM. Species in contemporary herpetology: comments on phylogenetic inference and taxonomy. *Herpetol Rev.* 1992;23:46-54.

GOLOBOFF P, FARRIS J, NIXON K. TNT: a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics.* 2008;24(5):774-786.

HALL T. BIOEDIT. Biological sequence alignment editor [programa de ordenador]. version 7.0.5. Computer program; 2005.

HANCOCK DL. Classification of the Papilionidae: a phylogenetic approach. *Smitheria*. 1983;2(1):1-48.

HARRINSON RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol*. 1989;4(1):6-11.

HILLIS DM. Inferring complex phylogenies. *Nature*. 1996;383(6596):130-131.

HILLIS DM. Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias. *Syst Biol*. 1998;47(1):3-8.

LE CROM JF, CONSTANTINO LM, SALAZAR JA. Mariposas de Colombia. Tomo I: Papilionidae. Carlec Ltda, Bogotá; 2002. p. 108.

LUMLEY LM, SPERLING FAH. Integrating morphology and mitochondrial DNA for species delimitation within the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) cryptic species complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Syst Entomol*. 2010;35(3):416-428.

LUNT DH, ZHANG D-X, SZYMURA, HEWITT GM. The insect cytochrome oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol*. 1996;5(3):153-165.

MAYR E, ASHLOCK, PD. Principles of systematic biology. New York, USA: McGraw-Hill; 1991. p. 475.

MILLER JS. Phylogenetic studies in the Papilionidae (Lepidoptera: Papilionidae). *Bull Am Mus Nat Hist*. 1987;186(4):365-512.

MITCHELL SE, COCKBURN AF, SEAWRIGHT JA. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: Complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome*. 1993;36(6):1058-1073.

MONTEIRO A, PIERCE N. Phylogeny of *Bycillus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1a gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*. 2001;18(2):264-281.

MORITZ C, DOWLING TE, BROWN WM. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 1987;18(1):269-292.

MUNROE E. The classification of the Papilionidae (Lepidoptera). *Can Entomol. Supplement*. 1961;17(1):1-51.

NIXON KC. Winclada (BETA). [programa de ordenador] version 0.9.9. Published by the author. Ithaca, NY. 1999.

NIXON KC. WinClada. [programa de ordenador]. ver. 1.0000 Published by the author. Ithaca, NY. 2002.

NIXON KC, WHEELER QD. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*. 1990;6(3):211-223.

PATTEN MA, UNITT P. Diagnosability versus Mean Differences of Sage Sparrow Subspecies. *Auk*. 2002;119(1):26-35.

PASCUAL MJ, BALANYÁ A, TORRE LA, SERRA L. Analysis of the variability of *Drosophila azteca* and *Drosophila thabasca* populations revealed by random amplified polymorphic DNA. *J Zoolog Syst Evol Res*. 1997;35(4):159-164.

POSADA D, CRANDALL K. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998;14(9):817-818.

RONQUIST F., HUELSENBECK JP, VAN DER MARK P. MrBayes [programa de ordenador]. version 3.1. Computer program. 2005.

ROTHSCHILD W, JORDAN K. A revision of the American Papilios. *Novitates Zoology*. 1906;13: 412-752.

SANDERSON MJ, DRISKELL AC, REE RH, EULENSTEIN O, LANGLEY S. Obtaining maximal concatenated phylogenetic data sets from large sequence databases. *Mol Biol Evol*. 2003;20(7):1036-1042.

SILVA-BRANDÃO KL, FREITAS AVL, BROWER AVZ, SOLFERINI VN. Phylogenetic relationships of the New World Troidini swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) based on COI, COII, and EF-1a genes. *Mol Phylogenet Evol*. 2005;36(3):468-483.

SPERLING FAH, HARRISON RG. Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of of swallowtail butterflies. *Evolution*. 1994;48 (2):408-422.

SWOFFORD DL. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony [programa de ordenador]. version 4.0. MODELTEST, version 3.06. Computer program distributed by Sinauer, Sunderland, Massachusetts; 1999.

TYLER HA, BROWN Jr KS, WILSON KH. Swallowtail butterflies of the Americas. Scientific Publishers, Inc. Gainesville; 1994. p. 376.

WAHLBERG N, WHEAT CW. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. *Syst Biol*. 2008;57(2):231-242.

WHEELER WC. Optimization alignment: The end of multiple sequence alignment in phylogenetics?. *Cladistics*. 1996;12(1):1-9.

WHEELER W, GLADSTEIN D, DE LAET J. POY: Phylogeny Reconstruction via Optimization of DNA [programa de ordenador]. Version 3.0.11. Computer program. 2003.