

## SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Diferenciación Morfológica y Molecular de *Oleria makrena* (Hewitson) y *Oleria fumata* (Haensch) (Lepidoptera: Ithomiinae)LUZ-M GÓMEZ-P<sup>1</sup>, CARLOS GIRALDO<sup>2</sup>, ANDRÉS LÓPEZ<sup>3</sup>, SANDRA URIBE<sup>4</sup>

Grupo Sistemática Molecular, Univ. Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 64 x Cra. 65 Autopista Norte, A.A. 1027 Medellín, Antioquia, Colombia; <sup>1</sup>lunamigopi@yahoo.com; <sup>2</sup>cegiral0@unalmed.edu.co; <sup>3</sup>andreslop27@yahoo.com; <sup>4</sup>suribe@unal.edu.co

Edited by André V L Freitas - UNICAMP

*Neotropical Entomology* 38(5):616-623 (2009)

Molecular and Morphological Differentiation of *Oleria makrena* (Hewitson) and *Oleria fumata* (Haensch) (Lepidoptera: Ithomiinae)

**ABSTRACT** - *Oleria* (Olerinii tribe) is a genus of great ecological and evolutionary importance among the Ithomiinae (Nymphalidae). Species identification is very complex since most of them are involved in mimicry rings and share large morphological similarities. Ithomiinae specimens collected in the Antioquia Southwest - Colombia, showed confuse wing color pattern generating difficulties to define the presence of one or two species at the sampled region. Collected specimens were studied in detail using male and female genitalia and nucleotide sequences besides traditional character of wing color and venation. *Oleria makrena* (Hewitson) and *Oleria fumata* (Haensch) were registered and the relative utility of each character for species identification was defined. For males, wing color pattern was enough to differentiate both species, and the separation of specimens by this character was congruent with the separation obtained by using genitalia and DNA sequences. However, for females, wing patterns were not enough for the adequate separation or species and genitalia-based characters were necessary. DNA sequences of a short fragment of the mitochondrial gene ND4 allowed for the rapid and precise differentiation of both species, coinciding with the separation using genitalia for both males and females. The analysis of 579 base pairs (bp) indicated 46 nucleotide differences between both species.

**KEY WORDS:** Wing coloration pattern, genitalia, mitochondrial DNA, sympatric species, species differentiation

**RESUMEN**- *Oleria* spp. (tribu Olerinii) es un género de gran interés a nivel ecológico y evolutivo entre los Ithomiinae. La identificación de sus especies con base en caracteres morfológicos puede ser compleja debido a que la mayoría de ellas están involucradas en anillos miméticos y poseen grandes similitudes. En muestreos de mariposas ithomiinae realizados en el Suroeste Antioqueño, Colombia, se encontraron especímenes con patrones alares que dificultaron el registro de una o dos especies en la zona de estudio. Los especímenes se examinaron en detalle incluyendo observaciones de los genitales de machos y hembras y obtención de secuencias nucleotídicas además de los caracteres tradicionales de venación y coloración alar. Se verificó la presencia de *Oleria makrena* (Hewitson) y *Oleria fumata* (Haensch) y se precisó la utilidad de cada uno de los caracteres en la diferenciación de las dos especies. En los machos, la separación de ambas especies pudo realizarse con base en la morfología alar y coincidió con la realizada mediante los genitales y las secuencias de ADN. Sin embargo, en el caso de las hembras los patrones de venación alar fueron confusos y se requirió el uso de los genitales. Las secuencias de la región corta de ADN (gen ND4) usada, permitieron realizar una diferenciación rápida y acertada de las especies que coincidió con la obtenida por los genitales tanto femeninos como masculinos. El análisis del fragmento de 579 pb señaló la existencia de 46 diferencias nucleotídicas entre las dos especies.

**PALABRAS CLAVES:** Coloración alar, genitales, ADN mitocondrial, especie simpátrica, diferenciación de especies

El género *Oleria* (Hübner) que agrupa las especies *O. makrena* (Hewitson) y *O. fumata* (Haensch), objeto del presente estudio, se encuentra ubicado al interior de la tribu Oleriini de la subfamilia Ithomiinae (Fox 1940, Lamas *et al* 2004). Al interior de esta tribu, el género *Oleria* es uno de los más representativos con aproximadamente 51 especies (D'Almeida 1978, Lamas *et al* 2004) la mayoría de las cuales están involucradas en complejos miméticos y se encuentran como poblaciones simpátricas (Gallusser *et al* 2004, Whinnett *et al* 2005, Constantino L M com. pers.) constituyendo un grupo de gran importancia ecológica y evolutiva (Brown 1991, Beccaloni & Gaston 1995, Brown & Hutchings 1997, Brown & Freitas 2000).

Estudios previos realizados en Colombia indican que *O. makrena* y *O. fumata* ocurren en simpatria y son morfológicamente muy similares, exhibiendo patrones contradictorios en relación con la morfología alar, ya que la mayoría de las hembras colectadas en campo exhiben fenotipo de *O. makrena*, mientras que los machos exhiben fenotipo mixto entre *O. makrena* y *O. fumata* (García-Robledo *et al* 2002, Constantino L M com. pers.). Al respecto, algunos especialistas han sugerido que es posible separar claramente ambas especies con base en diferencias morfológicas alares como la forma del margen interno en el ápice del ala posterior, ya que es redondeada para *O. makrena* y trapezoidal para *O. fumata* (Willmott K, com. pers.) (Fig 1). Sin embargo, otros especialistas proponen la búsqueda de caracteres adicionales mediante la revisión taxonómica y estudios detallados de ambas especies (García-Robledo *et al* 2002).

En cuanto a la disponibilidad de caracteres diferentes a los de la morfología alar para la identificación de especies

del género *Oleria*, existen pocos estudios relevantes. Esta carencia puede relacionarse con el gran número de especies, la alta frecuencia de mimetismo y la variación geográfica y morfológica que dificultan el establecimiento de los límites taxonómicos entre especies (Brown 1977a, 1977b, Strauss 1990). En este sentido, hasta la fecha en la cual se realizó la revisión para el presente estudio, solo se encontraron disponibles y publicados gráficos de genitales para unas pocas especies de *Oleria*, que no incluían *O. makrena* y *O. fumata*, no se obtuvo en la literatura existente una descripción detallada de las estructuras, ni de las diferencias en los genitales para especies al interior del género (Bauman 1985, Brabant 1995, Brevignon & Lamas 1993).

La inclusión de secuencias de un segmento de ADN como elemento a comparar entre los especímenes del estudio, se relaciona con la potencial utilidad de dichas secuencias para diferenciar especies al interior de complejos o especies morfológicamente iguales (Sperling 2003, Avise 2004). El uso de genes mitocondriales en taxonomía y sistemática de insectos se deriva de las altas tasas de sustitución nucleotídica de dichas secuencias que permiten estudiar las relaciones evolutivas a diferentes niveles taxonómicos pero principalmente a nivel de especie (Batuecas *et al* 1988, Yu *et al* 1999). En algunos casos bien documentados, secuencias de ADN mitocondrial se han utilizado con éxito para complementar la identificación y delimitación de especies en Lepidoptera incluyendo algunas del género *Oleria* (Kruse & Sperling 2001, Wahlberg *et al* 2003a, 2003b, Whinnett *et al* 2005). En el caso particular del gen ND4 este se considera un marcador adecuado para evidenciar especies crípticas, morfológicamente similares o estrechamente relacionadas (Simon *et al* 1994, Gorrochotegui-escalante *et al* 2000, Uribe *et al* 2001).

Este documento presenta los resultados de un estudio detallado de especímenes con morfología alar presuntiva de *O. makrena* y *O. fumata*, colectados en el suroeste de Antioquia-Colombia, pero con los mismos patrones confusos descritos anteriormente para machos y hembras. Además de examinar la venación y coloración alar, se realizó una observación y registro detallados de la variación en los genitales y se obtuvieron secuencias de ADN mitocondrial (gen ND4), en un intento por definir la presencia de las dos especies en el área de estudio, precisar la utilidad de los genitales y caracteres moleculares en la identificación de cada especie, además de evaluar de forma comparativa su relación con los patrones de morfología alar encontrados.

## Material y Métodos

Se colectaron 144 especímenes entre Julio de 2004 y Enero de 2005 en los municipios de Venecia, Fredonia, Jardín y Ciudad Bolívar (Suroeste Antioqueño-Colombia), 93 hembras y 51 machos. La colección se efectuó mediante red entomológica, posteriormente los especímenes se depositaron individualmente en sobres de papel parafinado, marcados con fecha y lugar de colecta, y se transportaron al laboratorio para ser procesados. A cada ejemplar se le removió el segundo par de patas el cual fue depositado en un vial marcado con el código del ejemplar y almacenado a -80°C para procesarlo

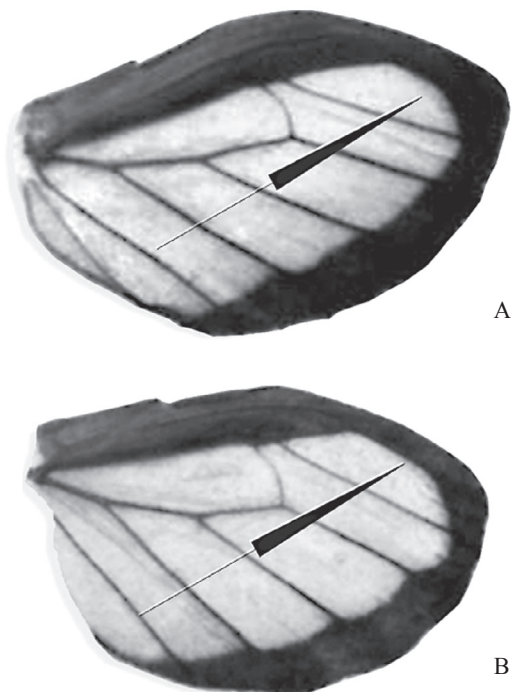


Fig 1 Margen apical interna del ala posterior diagnóstica para *Oleria makrena* y *Oleria fumata*. A. *O. makrena*; B. *O. fumata*.

posteriormente mediante la metodología molecular. Para la verificación del género se utilizó la clave de la subfamilia Ithomiinae (Fox 1940) basada en la distribución de las venas del ala posterior para ambos sexos y la forma y presencia o ausencia de pelos androconiales en machos. Para ello, se aclararon las alas mediante un protocolo estándar (Algarín & Álvarez 2002).

La totalidad de los especímenes se estudió en términos de patrones de coloración alar, armadura genital de machos y morfología de la placa presente en el extremo distal del abdomen de las hembras, este último señalado como un posible carácter diagnóstico entre *O. makrena* y *O. fumata* (K Willmott, com. pers.). Para describir y dimensionar la variabilidad entre los especímenes, se utilizaron libros, guías de campo especializadas (Lewis 1975, De Vries 1987, García-Robledo et al 2002) y fotografías de las especies de *Oleria*, de la página Web del especialista en mención, donde se detalla la coloración los patrones alares.

Para la observación de los genitales se aclaró el extremo distal del abdomen sumergiéndolo en KOH al 8% durante 24h; posteriormente, se realizó la extracción de la armadura genital en los machos mediante pinzas y estiletos entomológicos. Tanto los abdómenes de las hembras como las armaduras genitales de los machos se almacenaron en glicerina hasta su observación. La visualización se realizó mediante un estereomicroscopio Olympus SZ60 a 36,3x. Para precisar los caracteres diagnósticos, según recomendaciones del especialista, los genitales de machos se dispusieron tanto en vista lateral como dorsal y para las hembras los abdómenes se observaron en vista lateral y ventral, adicionalmente se realizó un registro fotográfico de las estructuras mediante el uso de una cámara digital (Kodak Easyshare DX4900). Por último, el especialista proporcionó las ilustraciones (no publicadas) para genitales masculinos y femeninos de *O. makrena* y *O. fumata*, para la comparación de los caracteres genitales tanto en machos como en hembras.

Para la comparación a nivel de secuencias nucleotídicas se seleccionaron 10 especímenes, correspondiendo a cinco de cada grupo separado claramente de acuerdo a los criterios descritos anteriormente. La extracción de ADN a partir de las dos patas se realizó para cada ejemplar mediante un buffer de macerado (Collins et al 1990 modificado por Uribe 1999). El ADN obtenido se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril y se trató con 1 µl de RNAsa de Fermentas® (10 mg/ml, durante 1h a 37°C). La verificación de la extracción se realizó en gel de agarosa con bromuro de etidio al 0.8%.

La amplificación del gen ND4 se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un Termociclador PTC 100 (MJ Research). El perfil térmico utilizado fue: 94°C durante 3 min, 35 ciclos de 93°C durante 30 segundos, 48°C durante 1 min, 70°C durante 1 min y un paso final de extensión de 72°C durante 10 min. El volumen de la reacción fue de 50 µl empleando un 1 µl de ADN molde. Los reactivos de mezcla de reacción (Fermentas®), se utilizaron en las siguientes cantidades y concentraciones: 5 µl de buffer 10x, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.1 µl de dNTPs (1mM), 0.3 µl de taq polimerasa (500U) y 0.3 µl de cada primer (50 µM) y agua ultrapura estéril ajustada al volumen final de la reacción. Los oligonucleótidos o cebadores utilizados para la PCR fueron: N4BF(5'-GCGGGTACCTAATTCGTACTCATGGTAATG-3')

ND4AMR(5'-GCGCCGCGGGGGGCTTCAACATGAGCCTT-3'). La verificación de la amplificación del ADN se realizó en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%. Los geles se visualizaron en cámara de U.V. y analizaron mediante el programa BioDocAnalyze de BIOMETRA®.

Para obtener las secuencias de ADN, los productos de PCR se purificaron previamente usando Wizard® PCR Preps. El ADN fue secuenciado en ambos sentidos de la cadena, utilizando un secuenciador 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), (MACROGEN Inc). Las secuencias generadas se depositaron en el Genbank y los números de acceso son: DQ656409 DQ656410, DQ656411, DQ656412 DQ656413, DQ656403, DQ656380, DQ656386, DQ656387, DQ656390.

La edición, alineamiento y comparación de las secuencias nucleotídicas se realizó con el programa Bioedit, versión 7.0.4 (Hall 2005). Los porcentajes de bases nucleotídicas en cada secuencia y la divergencia entre las secuencias se estimaron en el programa Arlequín versión 2.0.0 (Excoffier 2005). La variabilidad de las secuencias para los ejemplares se definió básicamente en términos de número de diferencias nucleotídicas y agrupaciones de secuencias y se compararon con las separaciones obtenidas previamente con base en genitales y morfología alar. Adicionalmente se construyó un dendrograma de Neighbor Joining (NJ) para verificar las agrupaciones con base en distancias genéticas derivadas de las secuencias, para lo cual se utilizó el programa PAUP versión 4.0b10 para Macintosh (Swofford 2002) y se asumió el criterio de distancias (mínima evolución) con el modelo Hasegawa-Kishino-Yano 1985 (HKY85), el cual incorpora una frecuencia no homogénea de bases y un estimado del radio de transiciones/transversiones (Hasegawa et al 1985). Para constatar la solidez de las agrupaciones se realizó una búsqueda heurística y remuestreo por Bootstrap con 1000 réplicas y algoritmo TBR. A partir de la base de datos del Genbank se seleccionaron *Coreana raphaelis* (Oberthür) (Lepidoptera: Lycaenidae, número de acceso NC\_007976.1) y *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae, número de acceso NC\_002355.1) como secuencias de referencia.

## Resultados y Discusión

De acuerdo con los patrones de coloración del margen interno del extremo apical del ala posterior, todas las hembras exhibieron morfología presuntiva de *O. makrena*, mientras que en los machos, 45 exhibieron patrones correspondientes con *O. fumata* y seis con *O. makrena*.

Al examinar los genitales de las hembras se encontraron dos patrones que permitieron asociarlas a los dos taxones citados, nueve ejemplares correspondiendo a *O. makrena* y 84 a *O. fumata*. La diferencia entre las dos especies se aprecia a nivel del octavo esternito abdominal, que es conspicuo para *O. fumata* mientras que en *O. makrena* es delgado y menos notorio; la diferencia pudo visualizarse tanto en vista lateral como ventral (Fig 2). Estas observaciones permiten concluir que la morfología alar de las hembras no discrimina las especies *O. makrena* y *O. fumata*, mientras que los genitales permiten hacerlo con gran precisión; no se encontró variación en este carácter al interior de los grupos de hembras que

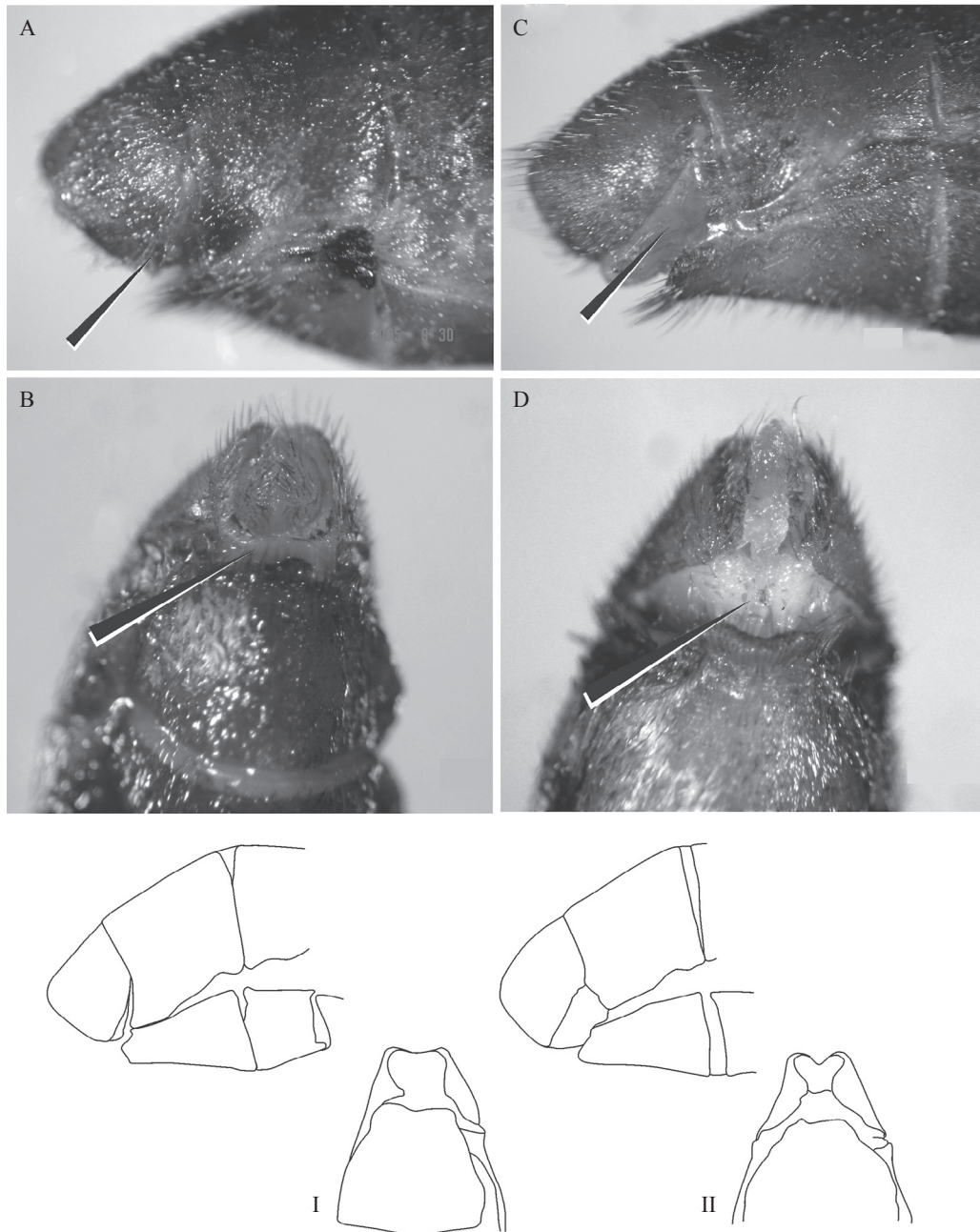


Fig 2 Fotografías de los genitales externos de hembras y diagramas de genitales externos de hembras (fuente diagramas: K Willmott, datos sin publicar) A. vista lateral *Oleria makrena*. B. vista ventral *O. makrena*. C. vista lateral *Oleria fumata*. D. vista ventral *O. makrena*. I. *O. Makrena*; II. *O. fumata*.

correspondieron a cada especie.

Al realizar el análisis de las estructuras genitales para los machos, igualmente se encontraron dos grupos morfológicos, que al compararse con los gráficos de las especies suministradas por el especialista correspondieron a *O. fumata* (45 especímenes) y *O. makrena* (seis especímenes). A diferencia de las hembras, las agrupaciones obtenidas con base en la morfología del ala posterior de los machos correspondieron a las obtenidas con base en genitales.

A nivel de la armadura genital de los machos, se encontraron diferencias importantes entre las dos especies.

Entre estas las siguientes: 1) el proceso distal de la valva en *O. makrena* es bifurcado por el contrario en *O. fumata* exhibe terminación puntiaguda; adicionalmente para esta última, las valvas son más elongadas, 2) el uncus, es más curvo y grueso en *O. makrena*, que en *O. fumata* y 3) el subuncus, es conspicuo en *O. makrena* en relación a *O. Fumata* (Fig 3).

En cuanto a los patrones de coloración alar, se observó gran variación en machos y hembras de ambas especies, en particular en la banda que atraviesa la celda discal del ala anterior. Los machos de *O. fumata* no presentaron dicha banda, mientras que en las hembras de ambas especies y en los machos de *O. makrena*

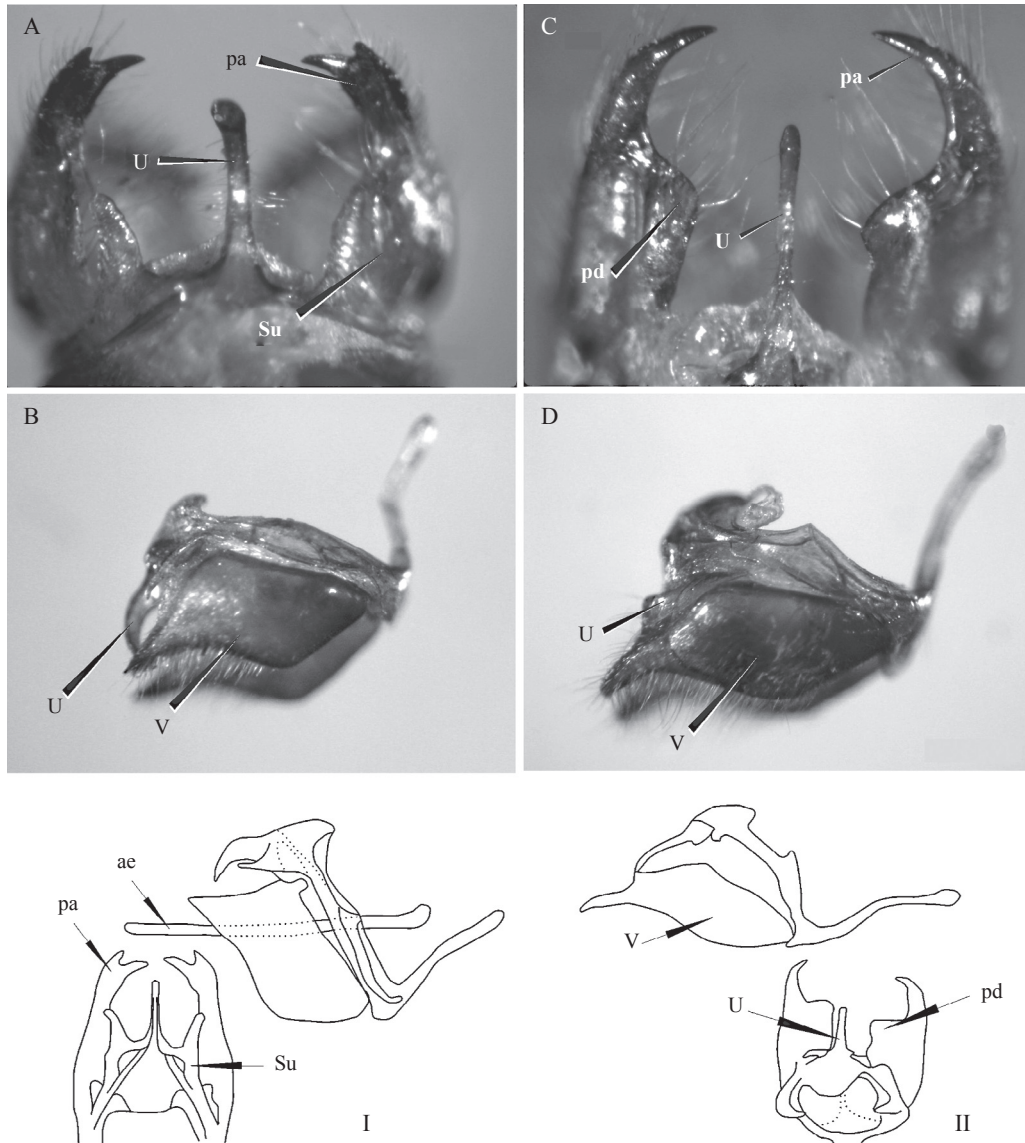


Fig 3 Fotografías de los genitales de macho y diagramas los genitales de macho. (Fuente de los diagramas: K. Willmott, datos sin publicar). A. Vista dorsal *Oleria makrena*. B. Vista lateral *O. makrena*. C. Vista dorsal *Oleria fumata*. D. vista lateral *O. fumata*. I. *O. makrena*. II. *O. fumata*. Ae: edeago; pa: proceso distal de la valva; pd: proceso dorsal de la valva; Su: subuncus; U: uncus; V: valva. Terminología según Peña & Lamas (2005).

la intensidad de la misma fue variable. Además de la variación en la banda del ala posterior, se observaron diferencias sutiles entre las dos especies en cuanto a la forma del borde interno del ala anterior, cual es poco sinuosa en *O. makrena* y más quebrada en *O. fumata* (Fig 4). De acuerdo con estos patrones, bien valdría la pena realizar un estudio morfométrico detallado y con un mayor número de especímenes que permita esclarecer a profundidad la variabilidad y consecuente utilidad de los patrones alares para separar las dos especies, particularmente en el caso de las hembras.

Para evaluar las diferencias de los especímenes en términos moleculares se dispuso de 579 pares de bases (posiciones 3778-4357 de la secuencia de referencia *B. mori*). Al comparar las secuencias tanto de machos como de hembras se encontraron dos grupos de secuencias diferenciadas

por 46 cambios nucleotídicos. Estos correspondieron a los mismos grupos obtenidos cuando los especímenes se separaron usando genitales masculinos y femeninos, pero no a los encontrados cuando se usó el patrón de las alas, particularmente en las hembras.

Las diferencias nucleotídicas encontradas entre los dos grupos corresponden a un porcentaje de divergencia de 7.994%. Aunque para el género *Oleria* no se conocen valores de divergencias genéticas entre especies con el mismo gen, se han reportado valores de divergencia entre subespecies de *O. onega* (Hewitson) con el gen COI del orden de 6.40% (Whinnett et al 2005). Así mismo, el valor calculado es equivalente a los encontrados entre diferentes especies al interior de un mismo género en otros Lepidoptera (Davies & Birmingham 2002, Hebert et al 2004, Weller et al 2004,

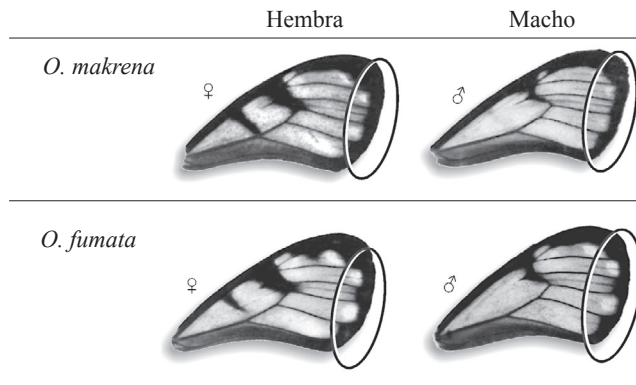


Fig 4 Patrones de coloración del ala anterior. Arriba, *Oleria makrena* ♀ y ♂. Abajo, *Oleria fumata* ♀ y ♂.

Silva-Brandão *et al* 2008).

La proporción de adenina-timina fue alta en las secuencias de las dos especies, como es característico en los insectos (Huang *et al* 2001, Nardi *et al* 2003). Para *O. fumata* la adenina varió entre 50.95% y 51.30% y la timina entre 32.99% y 33.16%. Para *O. makrena* los porcentajes

fueron de 50.95% para adenina y de 33.51% para timina. Los porcentajes de adenina encontrados en estas especies corresponden con los encontrados en Lepidoptera, al interior de Nymphalidae, incluyendo Ithomiinae (Wahlberg *et al* 2003a, Mallarino *et al* 2005, Whinnett *et al* 2005).

El dendrograma obtenido por NJ mostró agrupaciones diferenciadas correspondientes a *O. makrena* y *O. fumata*, ambas correspondiendo a los grupos separados por los genitales. Se obtuvieron valores de bootstrap altamente significativos, indicando confiabilidad en las agrupaciones presentadas (Fig 5).

Los análisis comparativos entre los caracteres usados permitieron, con base en la correlación entre los genitales y las secuencias nucleotídicas, registrar la presencia de las dos especies en el área de estudio y separarlas con un alto grado de confiabilidad. El uso de secuencias de ADN mitocondrial para complementar la identificación de especies sería de gran utilidad, y en especial si solo se requiere de un par de patas para acceder al ADN con calidad para amplificar y secuenciar. Por lo anterior son deseables los estudios con adecuado número de especímenes y representatividad geográfica del rango de las especies, para validar el uso de este fragmento como posible marcador de especie.

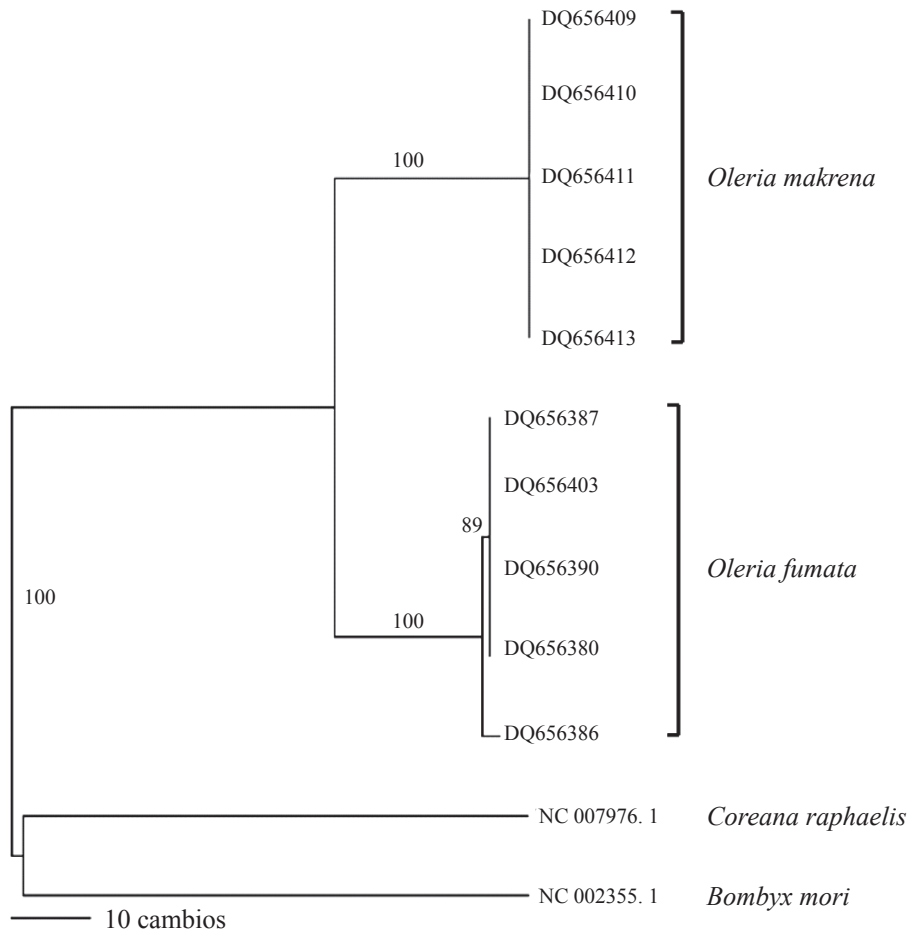


Fig 5 Dendrograma NJ con base en el fragmento de ADN mitocondrial ND4,; modelo HKY85 y algoritmo TBR. Valores de Bootstrap (1000 réplicas) indicados en la parte superior de los brazos. Las secuencias se agruparon correspondientemente a los grupos separados por los genitales.

## Agradecimientos

Agradecemos al especialista Keith Willmott por la confirmación de la identificación de las especies y por permitir el uso de sus diagramas y demás aportes. Al especialista André V Lucci Freitas y a Eduar Bejarano por sus aportes en los aspectos morfológicos y moleculares del trabajo. A Eduardo Amat por sus aportes en la edición del resumen en inglés y de figuras. A la Dirección de investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín DIME quien financió la investigación. A la Federación Nacional de Cafeteros y en especial al ingeniero Santiago Prado quien diseñó los sistemas de muestreo e identificó las fincas de interés. Al personal y dueños de las fincas cafeteras, La Luisa, El Limón, La Echavarría, La Palma, Montenegro, Don Anibal, Terranova, El Vergel, Los Alpes y San Pablo.

## Referencias

- Algarin C, Alvarez F (2002) Explorando las alas de las mariposas. *Bol Sist Mol* 2: 1-6.
- Avisé J C (2004) Molecular markers, natural history and evolution. Second edition, Sunderland, Sinauer Associates Inc. publishers, 684p.
- Batuecas B, Garesse R, Calleja M, Valverde J R, Marco R (1988) Genome organization of *Artemia* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 16: 6515-6528.
- Bauman H (1985) Über einige Arten um *Oleria makrena* (Hewitson, 1854) (Lepidoptera, Ithomiidae). *Entomofauna* 6: 105-116.
- Beccaloni G W, Gaston K J (1994) Predicting the species richness of neotropical forest butterflies: Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) as indicators. *Biol Conservat* 71: 77-86.
- Brabant R (1995) Introduction a l'étude des Ithomiidae. (Rhopalocères sud-américains). *Lambillionea* 12: 1-65.
- Brevignon C, Lamas G (1993) The genera *Hyposcada* Godman & Salvin, 1879 and *Oleria* Hubner, 1816 in French Guiana. Description of five new subspecies (Lepidoptera: Nymphalidae: Ithomiinae). *Bull Soc Sci Nat* 80: 27-31.
- Brown Jr K S (1977a) Centros de evolução, refúgios quaternários e conservação de patrimônios genéticos na região neotropical: padrões de diferenciação em Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Amazonica* 7: 75-137.
- Brown Jr K S (1977b) Geographical patterns of evolution in neotropical Lepidoptera: differentiation of the species of *Melinaea* and *Mechanitis* (Nymphalidae, Ithomiinae). *Syst Entomol* 2: 161-197.
- Brown Jr K S (1991) Conservation of neotropical environments insects as indicators, p.349-404. In *The conservation of insects and their habitats*. Royal Entomology Society Symposium XV, Academic Press, London, 450p.
- Brown Jr K S, Freitas A V L (2000) Atlantic forest butterflies: indicators for landscape conservation. *Biotropica* 32: 934-956.
- Brown Jr K S, Hutchings R W (1997) Disturbance, fragmentation and the dynamics of diversity in Amazonian forest butterflies, p.91-110. In Laurance W F, Bierregaard Jr R O (eds) *Tropical Forest Remnants. Ecology, management, and conservation of fragmented communities*. Chicago, The University of Chicago press, 632p.
- Collins F H, Porter C H, Cope S E (1990) Comparisons of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *A. hermsi*. *Am J Trop Med Hyg* 42: 417-423.
- D'almeida F R F (1978) *Catálogo dos Ithomiidae americanos (Lepidoptera)*. Curitiba, Universidad de Federal do Paraná, 405p.
- Davies N, Bermingham E (2002) The historical biogeography of two Caribbean butterflies (Lepidoptera: Heliconiidae) as inferred from genetic variation at multiple loci. *Evolution* 56: 573-589.
- DeVries P (1987) *The butterflies of Costa Rica and their natural history. Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae*. Nueva Jersey, Princeton University Press, 327p.
- Excoffier L (2005) Arlequin a software for population genetics. Versión 2.0.0. University of Geneva, Geneva.
- Fox R M (1940) A Generic review of the Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Trans Am Entomol Soc* 64: 161-207.
- Gallusser S, Guadagnuolo R, Rahier M (2004) Genetic (RAPD) diversity between *Oleria onega agarista* and *Oleria onega* ssp. (Ithomiinae, Nymphalidae, Lepidoptera) in north-eastern Perú. *Genética* 121: 65-74
- García-Robledo C, Constantino L M, Heredia M D, Kattan G (2002) *Guía de campo. Mariposas comunes de la cordillera central de Colombia*. Cali, Programa de Colombia de Wildlife Conservation Society, 130p.
- Gorochotegui-Escalante N, Muñoz M, Fernández-Salas I, Beaty B J, Black W C IV (2000) Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 62: 200-209.
- Hall T (2005) Bioedit biological sequence alignment editor. Version 7.0.4. Ibis Therapeutics, Carlsbad.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22: 160-174.
- Hebert P D, Penton E H, Burns J M, Janzen D H, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptus fuligator*. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am* 101: 14812-14817.
- Huang Y C, Li W F, Lu W, Chen Y J, Zhang Y-P (2001) Mitochondrial DNA ND4 sequence variation and phylogeny of five species of Bostrychidae (Coleoptera). *Acta Entomol Sin* 44: 494-500.
- Kruse J J, Sperling F A H (2001) Molecular phylogeny within and between species of the *Archips argyrospila* complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann Entomol Soc Am* 94: 166-173.
- Lamas G, Callaghan C J, Casagrande M M, Mielke O H H, Pyrcz T W, Robbins R K, Vilorio A L (2004) Checklist, part 4a Hesperoidea-Papilionoidea p.439. *Atlas of neotropical*

- Lepidoptera, vol 5A. Gainesville, Association for Tropical Lepidoptera, 439p.
- Lewis H L (1975) *Las mariposas del mundo*. Barcelona, Ediciones Omega, 312p.
- Mallarino R, Bermingham E, Willmott K R, Whinnett A, Jiggins C D (2005) Molecular systematics of the butterfly genus *Ithomia* (Lepidoptera: Ithomiinae): a composite phylogenetic hypothesis based on seven genes. *Mol Phylogenet Evol* 34: 625-644.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F (2003) The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol Biol* 12: 605-611.
- Peña C, Lamas G (2005) Revision of the butterfly genus *Forsterinaria* Gray, 1973 (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae). *Rev Peru Biol* 12: 5-48.
- Silva-Brandão K L, Azeredo-Espin A M L, Freitas A V L (2008) New evidence on the systematic and phylogenetic position of *Parides burchellanus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Mol Ecol Res* 8: 502-511.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651-722.
- Sperling F (2003) Butterfly molecular systematics: from species definitions to higher level phylogenies, p.343-476. In Boggs C L, Watt W B, Ehrlich P R (eds) *Butterflies. Ecology and evolution taking flight*. The University of Chicago Press, Chicago, 739p.
- Strauss R E (1990) Patterns of quantitative variation in lepidopteran wing morphology: The convergent groups Heliconiinae and Ithomiinae (Papilionoidea: Nymphalidae). *Evolution* 44: 86-103.
- Swofford D L (2002) PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4. Sunderland, Sinauer Associates.
- Uribe S I (1999) Population structure and speciation in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from mitochondrial ND4 gene. Tesis de doctorado. PECET-Universidad de Antioquia-Center for Diseases Control (CDC), Medellín, 73p.
- Uribe S I, Lehmann T, Rowton E D, Vélez I D, Porter C (2001) Speciation and population structure in morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol Phylogenet Evol* 18: 84-93.
- Wahlberg N, Oliveira R, Scott J A (2003a) Phylogenetic relationships of *Phyciodes* butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. *Syst Entomol* 28: 257-273.
- Wahlberg N, Weingartner E, Nylin S (2003b) Towards a better understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Mol Phylogenet Evol* 28: 473-484.
- Weller S J, Simmonds R B, Carlson A L (2004) *Empyreuma* species and species limits: evidence, from morphology and molecules (Arctiidae: Arctiinae: Ctenuchini). *J Lepid Soc* 58: 21-32.
- Whinnett A, Zimmermann M, Willmott K, Herrera N, Mallarino R, Simpson F, Joron M, Lamas G, Mallet J (2005) Strikingly variable divergence times inferred across an Amazonian butterfly 'suture zone'. *Proc R Soc London B. Biol Sci* 272: 2525-2533.
- Yu H, Wang W, Fang S, Zhang Y-P, Lin F-J, Geng Z-C (1999) Phylogeny and evolution of the *Drosophila nasuta* subgroup based on mitochondrial ND4 and ND4L gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 13: 556-565.

Received 5/II/07. Accepted 20/III/09.

---