



Variación geográfica de la microbiota en cuatro especies del género *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) en Colombia

Nicolás Luna Niño

**Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Bogotá, Colombia
2021**

Variación geográfica de la microbiota en cuatro especies del género *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) en Colombia

Nicolás Luna Niño

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de:

Biólogo

Director

Juan David Ramírez Ph.D

Co-director

Camilo Salazar Ph.D

**Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Universidad del Rosario
Bogotá, Colombia
2021**

Variación geográfica de la microbiota en cuatro especies del género *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) en Colombia

Nicolás Luna¹, Giovanni Herrera¹, Marina Muñoz¹, Melissa Herrera², Anya Brown³, Emily Khazan³, Camilo Salazar², Juan David Ramírez^{1*}

¹Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

²Grupo de Genética Evolutiva, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

³University of Florida, USA.

*Corresponding author: juand.ramirez@urosario.edu.co

ABSTRACT

Estudios en las mariposas del género de *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae) han permitido entender los mecanismos que promueven la especiación y adaptación en el neotrópico. Análisis de la microbiota en estos insectos reportan variaciones interespecíficas e intraespecíficas, las cuales no están asociadas directamente a la depredación de polen. Además, se desconoce si los ecosistemas geográficos donde cohabitan mariposas con diferentes anillos miméticos afectan la microbiota de estos individuos. Este estudio utilizó *amplicon-based sequencing* del gen ARNr-16S en 66 muestras que corresponden a 4 especies de distintas regiones biogeográficas de Colombia: *Heliconius clysonymus* (n = 4), *Heliconius erato* (n = 24), *Heliconius melpomene* (n = 19) y *Heliconius cydno* (n = 19). La microbiota de *Heliconius* está dominada por los géneros *Commensalibacter*, *Enterococcus*, *Spiroplasma* y *Orbus*, donde sus abundancias difieren entre especies y subespecies, las cuales habitan diferentes provincias biogeográficas de Colombia. También, las agrupaciones de la microbiota por especie no reflejan totalmente sus relaciones filogenéticas. A pesar de la amplia diversidad de especies y subespecies de *Heliconius* en Colombia, este estudio encontró que las abundancias de las comunidades de su microbiota varían a partir de las condiciones ambientales de los ecosistemas en los que habitan y no presentan un patrón especie-específico.

INTRODUCCIÓN

La microbiota es el complejo de microorganismos presentes en un ecosistema, tales como: bacterias, arqueas, hongos, protozoos, helmintos y virus ¹. Estudios de estas comunidades microbianas en animales y en plantas, han revelado asociaciones entre la salud de los individuos y las relaciones bióticas con el ecosistema que habitan ¹⁻³. En el caso de los insectos, se han estudiado las relaciones simbióticas y co-evolutivas entre éstos y las comunidades microbianas, endosimbiontes y parásitos, presentes principalmente en su tracto gastrointestinal ^{4,5}, así como los beneficios generados por estas relaciones, tales como el mejoramiento en la absorción de dietas bajas de nutrientes y la modulación en la digestión del insecto ⁶. Además, estas comunidades pueden afectar la fisiología de estos organismos, el desarrollo de los individuos ^{7,8}, la producción de distintas moléculas para la protección contra patógenos y la aptitud del insecto, distorsionando en algunos casos la proporción de los sexos del hospedero ⁶. También, se ha encontrado que la microbiota puede promover la adaptación a distintos nichos ecológicos ^{9,10}. Sin embargo, esos beneficios varían dependiendo de la estructura y composición de la microbiota, la cual se modifica a partir de las características del hospedero ⁶. Tal es el caso de los Coleópteros, Ortópteros, Dípteros e Himenópteros, donde la dieta ¹¹ y la heterogeneidad del ecosistema en el que habitan estos insectos ¹²⁻¹⁴, influyen en la diversidad y abundancia de la microbiota.

Considerando los beneficios de la interacción microbiota-hospedero, la mayoría de los estudios están enfocados en aquellos insectos que intervienen en las interacciones ecológicas, como los son las pestes ^{15,16} y los polinizadores ¹⁷. No obstante, hay pocas investigaciones en aquellos casos donde el insecto ha desarrollado adaptaciones como la migración ^{18,19}, la hibernación ^{20,21} y el procesamiento de un determinado tipo de dieta ²². Tal es el caso de las mariposas neotropicales del género *Heliconius* (Nymphalidae: Heliconiinae), donde los adultos se alimentan de plantas de los géneros *Palicourea*, *Gurania*, *Psiguria*, *Lantana* y *Psychotria* entre otras, de las cuales predan polen como fuente de aminoácidos y proteínas mientras que favorecen su polinización ²³. Dentro del orden Lepidoptera, *Heliconius* es uno de los pocos géneros que presentan esta adaptación ²³, mientras que la mayoría de taxa del orden, se alimentan parcialmente de sustratos pobres de nitrógeno (como néctar) o incluso no se alimentan en el estadio adulto ²⁴. Esta especialización en la dieta de *Heliconius* ha permitido que estas mariposas sean de las más longevas del orden y a su vez está relacionado a la capacidad de las hembras para producir huevos viables durante toda su vida ²⁵. Además, la

alimentación por polen brinda nitrógeno para la síntesis de compuestos cianogénicos, los cuales son utilizados por estas mariposas como mecanismo de defensa contra depredadores ²⁶.

La microbiota de individuos adultos de *Heliconius* presenta pocos miembros pertenecientes a los phyla Firmicutes y Proteobacteria, donde predominan los géneros *Bacillus*, *Enterococcus* y *Orbus* ^{22,27,28}. También se han encontrado algunos eucariotas como Saccharomycetes ²⁹ y Trypanosomatidae ²². Sin embargo, la dominancia de estos taxa varía entre individuos de una misma especie e incluso entre especies ^{28,29}, y se desconoce si la variación en la misma ocurre por factores que han sido propuestos como determinantes de la estructura y composición de la microbiota en insectos, como la distribución geográfica y el ambiente en el que habita los hospederos ^{30,31}. En *Heliconius*, se ha encontrado bacterias y parásitos que pueden afectar los mecanismos de protección contra patógenos ^{22,28}, diferencias en la composición de la microbiota entre larva y adulto ²⁷ y bacterias probablemente asociadas al procesamiento del polen ^{22,29}, como el género *Orbus*, que también se han reportado en la microbiota de otros insectos polinizadores ^{29,32}. Por otro lado, la composición de la microbiota de estas mariposas es conservada entre las especies y se agrupan filogenéticamente respecto al resto de miembros de Heliconiinae (*Euides*, *Dione* y *Agraulis*) los cuales no se alimentan de polen ²². Además, esta agrupación no parece estar asociada a su adaptación, debido a que *H. aoede*, es la única especie que no presenta esta característica y su microbiota es similar al resto de especies de *Heliconius* a comparación de los demás de géneros de Heliconiine ²². Por lo tanto, se ha sugerido que otros rasgos, aún sin determinar, deben estar influenciando las diferencias entre *Heliconius* y los demás géneros de la subfamilia. Lo anterior, contrasta con las fuertes asociaciones a la dieta (nectivoría y frugívora) y la microbiota que se han encontrado en otras mariposas ^{22,29}, donde además se observó una fuerte señal filogenética en la microbiota respecto a diferentes familias de Lepidoptera (polillas y mariposas), lo cual puede deberse a las necesidades dietarias u otros aspectos de los nichos en los que habitan estas mariposas en lugar de procesos de coevolución ²².

A pesar de que exista una variación en la dominancia de la microbiota entre especies de *Heliconius* en comunidades locales, variación de esta entre estadios de desarrollo y filosisimbiosis, aún se desconoce si la distribución geográfica y las condiciones específicas de los diferentes nichos ambientales que habitan estos organismos contribuyen a moldear sus comunidades bacterianas. Por lo tanto, el objetivo este estudio fue caracterizar las comunidades de bacterias y arqueas de individuos adultos de 4 especies (9 subespecies) de *Heliconius* colectadas en tres regiones geográficas de Colombia: Andes, Pacífico y Amazonia.

MÉTODOS

Muestreo de *Heliconius*

Se utilizaron 66 individuos de 4 especies de *Heliconius* (*H. melpomene* n = 19, *H. erato* n = 24, *H. cydno*, n = 19 y *H. clysonymus* n = 4) (Tabla S1), los cuales fueron colectados entre los años 2016 y 2018 en Colombia (Figura 1, Tabla S1) mediante capturas activas con red entomológica. Las muestras fueron almacenadas en DMSO y las alas guardadas en sobres de parafina como vouchers en la colección de artrópodos de la Universidad del Rosario (CAUR#229).

Extracción de ADN, amplificación de la región V4 del gen ARNr 16S y secuenciación

El ADN de cada muestra, conjunto del tórax y abdomen, fue extraído por medio del kit DNAeasy PowerSoil (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se utilizaron los primers 515F 5'-GAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 806R 5'-CCGGACTACHVGGGTWTCTA AT-3' para amplificar la región hipervariable V4 del SSU del ARNr-16S, región que permite discriminar géneros de bacterias y arqueas, mediante las condiciones de PCR establecidas por Li *et al.*, (2015). Las muestras positivas para el marcador ARNr-16S fueron secuenciadas por medio de *amplicon-based sequencing* mediante la plataforma de Illumina NovaSeq 6000 con lecturas paired-end de 250 bp para cada una de las muestras a una profundidad mínima esperada de 100.000 X.

Control de calidad y generación de ASVs

Para determinar la calidad de los datos de secuenciación de cada una de las muestras, se utilizó la herramienta FastQC versión 0.11.7³⁴ y MultiQC versión 1.6³⁵ donde se consideró un *Phred quality score* mayor o igual a 30. Posteriormente, los datos que cumplían con el umbral de calidad se procesaron mediante la versión 1.16 del pipeline de DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*)³⁶, donde se alinearon, compararon y analizaron cada una de las muestras generando las diferentes secuencias únicas o *amplicon sequencing variants* (ASVs). A cada uno de los ASVs se les asignó un grupo taxonómico mediante la comparación con la base de datos SILVA versión 132³⁷.

Composición de la microbiota de *Heliconius* por especie y región geográfica

Se filtraron de las tablas de abundancia y taxonomía los ASVs correspondientes a mitocondria, cloroplasto y eucariota mediante el paquete phyloseq³⁸ en la versión 4.0.2 del software informático R³⁹. Posteriormente, se identificaron las 10 ASVs más abundantes por especie y por geografía, teniendo presente las provincias biogeográficas delimitadas por Morrone (2014)

que ocurren dentro de las tres grandes regiones estudiadas (Amazonia, Andes y Pacífico). Esto se realizó a partir de las abundancias relativas de los ASVs y de la información de cada una de las muestras por medio de los paquetes de phyloseq³⁸, microbiome⁴¹ y fantaxtic⁴². Se elaboraron curvas de rarefacción y heatmaps para comparar la diversidad y abundancia de los ASVs por especie y geografía. Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de Dunn-test con el método de Benjamini-Hochberg⁴³, para establecer si existían diferencias significativas entre las abundancias de cada ASV para los dos factores analizados.

Análisis de diversidad alfa y beta

Para cuantificar la diversidad alfa de las ASVs, se calculó los índices de Shannon-Wiener (diversidad específica) y Simpson (dominancia de especies) por especie y región geográfica usando phyloseq³⁸ y microbiome⁴¹. Las diferencias entre los grupos de cada categoría respecto a la diversidad alfa fueron evaluadas mediante por medio de la prueba Kruskal-Wallis con post-hoc Dunn-test con el método de Benjamini-Hochberg⁴³.

Las diferencias de la microbiota entre especies, subespecies y entre regiones geográficas (diversidad beta) fueron evaluadas por coordenadas principales (PCoA), mientras que la presencia de agrupaciones dentro de estas categorías se evaluó con un análisis discriminante de componentes principales (DAPC). Ambos análisis fueron obtenidos a partir de las distancias de Bray-Curtis de las abundancias relativas de los ASVs. La significancia estadística de las agrupaciones por geografía y por especie se estableció por la comparación entre el valor del estadístico R obtenido con el Analysis of similarities (ANOSIM), con la distribución nula de este estadístico obtenida por permutación.

Correspondencia entre la microbiota y las relaciones filogenéticas de las especies de *Heliconius*

Con el fin de establecer la correspondencia entre las agrupaciones de la microbiota y las relaciones filogenéticas de las especies estudiadas, se elaboró un filograma en ape⁴⁴ para estas últimas, a partir de las distancias genéticas estimadas por Máxima verosimilitud (ML) obtenidas de la filogenia más actual para el género⁴⁵ y un dendrograma con las distancias de Bray-Curtis de la microbiota de cada especie generado con dendextend⁴⁶. Se visualizó la correspondencia entre las agrupaciones del dendrograma y del filograma mediante phytools⁴⁷.

RESULTADOS

Control de calidad de las lecturas de los ASVs

Todas las lecturas de las muestras secuenciadas tuvieron un nivel de calidad (*Phred quality score*) mayor a 30, además, las secuencias presentaron entre 90.000 y 190.000 reads por muestra (Tabla S2), y a partir de estos reads, se obtuvieron 9.239 ASVs asignados, de los cuales 802 corresponden a cloroplastos, mitocondria y eucariotas, siendo estas lecturas excluidas del estudio. De los ASVs restantes, 8.437, corresponden a 51 phyla y 796 géneros de bacterias y arqueas presentes en las mariposas. Por otro lado, el análisis de rerefacción mostró que la secuenciación por *amplicon-based sequencing* permitió obtener toda la diversidad de ASVs de las muestras, siendo *Heliconius cydno* la especie con mayor diversidad de géneros (Figura S1).

Composición de la microbiota de *Heliconius* por especie y geografía

De los 51 phyla encontrados, Proteobacteria, Firmicutes, Tenericutes y Bacteroidetes fueron los grupos taxonómicos predominantes entre las mariposas muestreadas (Figura 2), donde Proteobacteria fue el phylum más abundante (~ 60%), tanto por especie (Figura 2A) como por geografía (Figura 2B), seguido de Firmicutes (~ 20%) y Tenericutes (~ 10%). En el caso de los géneros, se encontró predominancia de *Commensalibacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Spiroplasma* y *Orbus* (Figura 2), y a diferencia de los phyla, la abundancia de estos géneros varía dependiendo de la especie (Figura 2C y 3A) o de la provincia biogeográfica de la muestra (Figura 2D y 3B).

Respecto a las especies, *Heliconius erato* no presenta géneros con alta abundancia relativa en su microbiota, mientras que en *Heliconius cydno* los géneros *Commensalibacter* y *Enterococcus* presentan los mayores porcentajes de abundancia (Figura 3A). Las diferencias en las abundancias fueron significativas solo para *Spiroplasma*, *Enterococcus*, *Cedecea*, *Candidatus-Kinetoplastibacterium* y *Lactobacillus* entre las especies de *Heliconius* (Figura 3A). *Spiroplasma* presentó variaciones en *H. cydno* respecto a *H. erato* y *H. melpomene* (Dunn-test, $p < 0,001$), de igual manera, la abundancia relativa de *Cedecea* resultó significativamente diferente entre *H. cydno* con *H. erato* y *H. melpomene* (Dunn-test, $p < 0,05$). Por otro lado, *Lactobacillus* varió en *H. clysonymus* respecto a demás especies (Dunn-test, $p < 0,001$), y las abundancias de *Enterococcus* y *Candidatus-Kinetoplastibacterium* difirieron significativamente entre *H. cydno* - *H. melpomene* (Dunn-test, $p < 0,05$). Para las provincias biogeográficas (Figura 3B), el género *Orbus* tuvo la mayor abundancia relativa en la provincia

de Chocó-Darién, mientras que, en las demás provincias: Cauca, Imerí y Magdalena, *Commensalibacter* presentó las mayores abundancias relativas (Figura 3B).

Al comparar las abundancias de los géneros por provincia, el género *Commensalibacter* no presentó diferencias significativas entre las provincias (Figura 3B). Respecto a las abundancias de los géneros: *Spiroplasma*, *Wolbachia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Candidatus-Kinetoplastibacterium*, *Lactobacillus* y *Cedecea* variaban significativamente al comparar las provincias del Cauca y Chocó-Darién con Imerí y Magdalena (Dunn-test, $p < 0,05$). Además, *Klebsiella* y *Orbus* fueron los únicos géneros que presentaron diferencias significativas en las provincias del Cauca y Magdalena (Dunn-test, $p < 0,05$) (Figura 3B).

Diversidad en la microbiota por especies/subespecies de *Heliconius* y geografía.

Tanto para las especies, subespecies como para las provincias biogeográficas, se encontró una baja diversidad de arqueas y bacterias con 4 phyla dominantes: Proteobacteria, Firmicutes, Tenericutes y Bacteroidetes (Figura 2A y Figura 4A). También se encontró diferencias significativas entre los índices de diversidad alfa (Shannon-Wiener y Simpson). En el caso de las especies, solo los índices de diversidad alfa de *H. clysonymus* y *H. melpomene* fueron significativamente diferentes (Dunn-test, $p < 0,01$; Figura 4A), donde *H. melpomene* es la especie con mayor valor en el índice de Shannon-Wiener (Figura 4A). No obstante, esta significancia podría deberse al bajo número de individuos analizados para *H. clysonymus*, y de igual manera, este efecto ocurrió para las subespecies de *Heliconius* (Figura S3A). El análisis de las provincias biogeográficas reveló que Imerí presentó la mayor diversidad alfa en todos los índices de diversidad estimados (Figura 4B), pero solo fue significativa cuando se comparó con la provincia del Cauca en el índice de Shannon-Wiener (Dunn-test, $p < 0,05$).

Por otro lado, en los análisis de la diversidad beta con distancias de Bray-Curtis, la microbiota de *Heliconius* no se distribuyó aleatoriamente por especie o región geográfica (Figura 2S). En estas mariposas el factor especie explica el 36% de la variación de la similitud de la microbiota (ANOSIM $R = 0,3628$, $p = 0,000999$, perm = 1000), donde la microbiota de los individuos de *H. melpomene* se agruparon parcialmente con los de *H. erato*, mientras que las muestras de *H. clysonymus* y *H. cydno* formaron un grupo independiente, aunque la microbiota de algunos individuos de esta última especie se ubicaron cerca a los individuos de *H. erato* (Figura 2SA). Respecto a la geografía, este factor explica el 24% de la variación (ANOSIM $R = 0,2412$, $p = 0,000999$, perm = 1000), donde los individuos provenientes tanto de las provincias del

Magdalena como de Imerí formaron un grupo con menos varianza que el conformado por los individuos del Cauca y del Chocó-Darién (Figura 2SB).

Las mismas agrupaciones se mantienen y se discriminan cuando se realizó el análisis de PCA acoplado a una función discriminante (DAPC) tanto para las especies (Figura 4C) como para las provincias (Figura 4D). Al evaluar el nivel de agrupación de la microbiota por subespecie (Figura S3) se confirmó el efecto que la geografía tiene sobre las abundancias de los distintos géneros de bacterias en estas poblaciones (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). Se observaron tres grupos, uno de ellos formado por *H. c. cydnides* y *H. clysonymus*, otro por *H. c. weymeri*, *H. e. chestertoniii* y *H. e. venus* y el último integrado por *H. m. martinae* y *H. e. guarica* junto con *H. m. vicina* y *H. e. reductimacula*.

Correspondencia entre la similitud en microbiota y la filogenia de las especies de *Heliconius*

A partir de las agrupaciones de la diversidad beta, se realizó el análisis de correspondencia entre las relaciones filogenéticas y las similitudes de la microbiota de las especies *Heliconius*, visualizadas mediante un filograma y un dendrograma respectivamente (Figura 5). De ello, se obtuvo incongruencias entre las agrupaciones, donde *H. melpomene* se agrupa con *H. erato* en el dendrograma, mientras que en el filograma estas especies se agrupan con *H. cydno* y *H. clysonymus*, respectivamente (Figura 5), es decir, la microbiota no recupera las relaciones filogenéticas, sino que presenta una señal consistente con la estructuración geográfica anteriormente mencionada.

DISCUSIÓN

Los análisis de la microbiota en insectos permiten entender las interacciones y características que presentan las comunidades de microorganismos con sus hospederos ⁴⁸, además de comprender cuáles factores ambientales y ecológicos modulan la diversidad y riqueza de estas comunidades. Estudios en Lepidoptera han encontrado ciertos grupos taxonómicos asociados a la digestión de diferentes tipos de alimento, al desarrollo de los individuos y a la adaptación de diferentes nichos ecológicos ⁴⁹, además la diversidad y abundancia de estos microorganismos varía dependiendo de la dieta, edad y hábitat del insecto ^{29,49}, factores claves para el control y conservación de estos individuos. En el caso de *Heliconius*, su microbiota presentó una baja diversidad y una dominancia de los phyla Proteobacteria, Firmicutes, Tenericutes y Bacteroidetes. Esto es consistente con lo encontrado en estudios previos desarrollados con mariposas silvestres y en cautiverio, donde examinaron la microbiota principalmente en una única localidad ^{22,27-29}. Además, en insectos, se ha reportado que la estructura y composición

de la microbiota es dominando principalmente por los mismos phyla, especialmente por Proteobacteria y Firmicutes⁴⁸, por ejemplo, en *Orchelimum vulgare* (Ortoptera: Tettigoniidae), *Ruspolia differens* (Ortoptera: Tettigoniidae) y *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) presentan baja diversidad de algunas familias de estos phyla como Enterobacteriaceae, familia involucrada en los procesos de degradación de alimentos ricos en proteínas y en azúcares^{50,51}. Por otro lado, en individuos del orden Lepidoptera, su microbiota presenta los mismos phyla, los cuales influyen la digestión, el desarrollo, la defensa contra patógenos y la reproducción de estos individuos^{29,52}.

La composición de la microbiota de *Heliconius*, está determinada principalmente por los géneros *Spiroplasma*, *Wolbachia*, *Orbus*, *Candidatus-Kinetoplastibacterium*, *Commensalibacter* y *Enterococcus* (Figura 2). Los géneros *Spiroplasma* y *Wolbachia* abarcan bacterias asociadas a la microbiota de las plantas y de artrópodos, principalmente de insectos^{53,54}, en su mayoría son simbioses facultativos de la microbiota intestinal de estos animales, además intervienen en el comportamiento, en la inmunidad del individuo y en los procesos de degradación de la sacarosa a glucosa⁵⁴⁻⁵⁶. Sin embargo, se ha encontrado especies de estos dos géneros con capacidad de afectar la proporción de los sexos en insectos^{57,58} y de causar incompatibilidad citoplasmática, que en algunos casos puede llevar a especiación⁵⁹. Dentro de las *Heliconius*, se ha reportado la presencia y variación de estos géneros en las especies que han sido estudiadas^{22,28}. En este caso estas bacterias están presentes en algunos individuos de *H. erato* y *H. melpomene* y en algunos individuos de *H. cydno* y *H. clysonymus*, además presentan mayor abundancia en *H. melpomene* que en *H. cydno* y entre *H. e. venus* y *H. e. chestertonii*²³, especies ampliamente estudiadas desde el punto de vista de los mecanismos que promueven su especiación^{23,60}. No obstante, se desconoce la función de estas bacterias dentro de su microbiota, las cuales pueden estar presentes en los gametos de estas mariposas causando algún efecto en el aislamiento reproductivo entre especies o poblaciones geográficas de la misma especie, por lo tanto, se requieren más estudios para determinar sus roles en las *Heliconius*.

Los género *Orbus*, *Commensalibacter* y *Enterococcus* presentan abundancias relativas $\geq 15\%$, $\geq 25\%$ y $\geq 10\%$ respectivamente (Figura 3) en las especies de *Heliconius* estudiadas, las cuales han sido reportadas previamente^{22,28}. Estas bacterias son abundantes en la microbiota de insectos (i.e. Dípteros, Himenópteros y Lepidópteros) que tienen dietas ricas en proteínas³² o en carbohidratos para el caso de *Commensalibacter* y *Enterococcus*^{61,62}. Además, estas bacterias permiten la digestión de estas moléculas en su hospedero^{63,64} y contribuyen en disminuir la infección por parásitos⁶⁴⁻⁶⁶. En este caso, la abundancia de estos géneros varía

entre las especies evaluadas, por lo que posiblemente las condiciones ambientales de los ecosistemas en los que habita *Heliconius*, podría afectar la presencia de estas comunidades bacterianas, las cuales pueden estar contribuyendo a la digestión de los complejos proteicos provenientes del polen o de los carbohidratos derivados del néctar, independientemente de la planta de la que se alimenten.

En el caso de *Candidatus-Kinetoplastibacterium*, bacterias endosimbióticas que infectan tripanosomátidos de los géneros *Angomonas* y *Strigomonas*⁶⁷, y que además, sintetizan numerosos compuestos esenciales como vitaminas, aminoácidos y lípidos, los cuales causan una modificación en la estructura celular del hospedero^{67,68}. No se han descrito hasta ahora este género bacteriano en *Heliconius*, sin embargo, se ha reportado la presencia de tripanosomátidos en ellas²², lo cual deja abierta la posibilidad de que en las especies y subespecies también se este dando dicha interacción entre estos eucariotas y las especies pertenecientes a este género bacteriano.

Las agrupaciones de la microbiota obtenidas del análisis discriminante de componentes principales (DAPC) a partir de las zonas geográficas, muestran una estructuración geográfica la cual presenta diferencias en las abundancias relativas entre las muestras del oriente (Provincias del Magdalena – Imerí) y del occidente de los Andes (Provincias del Cauca-Chocó/Darién; Figura 4D). Adicionalmente, dentro de las principales agrupaciones se observaron dos patrones contrastantes. El primero, consiste en la presencia de los dos grandes grupos mencionados que puede deberse al mayor valor de diversidad en la microbiota encontrada en la región Amazónica respecto a la región Pacífica (Figura 2 y Figura 4), y el segundo, toma en cuenta los pares de especies comiméticas de las subespecies de *Heliconius* provenientes de distintas zonas geográficas con diferentes condiciones ambientales.

En el primer caso, las regiones del occidente y oriente de los Andes presentan diferencias en temperatura, humedad y porcentaje de O₂, entre otras variables, las cuales no limitan la presencia de los distintos géneros bacterianos encontrados, pero parecen tener un efecto modulador en su abundancia relativa. En particular, la provincia Chocó-Darién (región del pacífico) se caracteriza por ser la región con la mayor tasa de precipitación del mundo (7000 mm)⁶⁹ donde presenta ecosistemas de bosque tropical húmedo con alta riqueza de flora y fauna^{70,71}. Por otro lado, la provincia de Imerí (región Amazonica)⁴⁰, presenta una de las mayores estacionalidades en precipitación y está conformada por bosques inundables, selvas mixtas de

bosques y sabanas que son surcadas por ríos de aguas blancas y negras ⁷⁰, donde se encuentra la mayor biodiversidad de fauna y flora del mundo ⁷².

Las condiciones climáticas de estas dos grandes regiones también pueden estar determinando la similitud de la microbiota en las zonas geográficas divididas por la cordillera de los Andes ⁷³, donde la abundancia relativa de los miembros de la microbiota de las especies provenientes de la provincia del Cauca fueron similares a las muestras de la provincia de Chocó-Darién, mientras que las de Imerí se asemejan a las del Valle del Magdalena (vertiente occidental de la cordillera oriental). Esta última presenta alta diversidad la cual está en parte asociada a la amplia heterogeneidad de hábitats y a los cambios abruptos de las condiciones climáticas ^{74,75}.

A pesar del afecto geográfico sobre la microbiota de *Heliconius*, la digestión de las diferentes fuentes de polen no está asociada a la estructuración de las regiones, aunque exista variación en la diversidad y abundancia de las plantas de las que alimenta *Heliconius*, las cuales están presentes en ambos nichos ambientales. Por ejemplo, el género *Psychotria* es el segundo más diverso en especies en las dos regiones ²³ y el género *Psiguria* presenta especies que ocurren a ambos lados de los Andes ⁷⁶. Es así como lo encontrado en este estudio es consistente con estudios previos ²², donde no fue posible encontrar relación directa entre la predación del polen y la microbiota. Además, este patrón se ha reportado en otros insectos, donde la heterogeneidad de los ecosistemas en los que habitan afecta la composición de la microbiota ⁴⁸. Por ejemplo, la microbiota de *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) varía a partir de las distancias geográficas entre las poblaciones ⁷⁷, también en Dípteros, el origen y la localidad geográfica en el que habitan modifican las comunidades de microorganismos ^{78,79}. De igual manera, las diferentes condiciones abióticas sobre los nutrientes ambientales alteran la microbiota de distintas especies de grillos de una misma localidad ⁵¹.

En el segundo caso, consiste en los pares de especies comiméticas de *H. erato* y *H. melpomene* provenientes de la provincia del Magdalena, los cuales se encuentran a diferentes altitudes y a lados opuestos de la cordillera oriental, donde no presentan diferencias en las abundancias relativas de la microbiota dentro de las subespecies y entre las especies (Figura 2 y Figura S4). Por otro lado, las subespecies de *H. cydno* del Norte y del Sur de la provincia del Cauca, localizadas en las estribaciones de las cordilleras central y occidental y, a lados opuestos del Valle del río Cauca presentan diferencias en las abundancias de los géneros de su microbiota, sin embargo, son similares con las especies con las que cohabitan, *H. clysonymus* en el Norte y *H. erato* en el Sur. Es posible que las condiciones ambientales, anteriormente mencionadas,

estén impactando las comunidades de bacterias presentes en las mariposas que cohabitan un mismo nicho ecológico, por lo que únicamente se presenta diferencias en las abundancias de los géneros bacterianos para las especies y subespecies que están localizadas en zonas con distintas altitudes en cada una de las tres cordilleras o entre ellas. Por ejemplo, *H. chestertonii*, anteriormente clasificado como *H. e. chestertonii*²³, el cual está presente en la cordillera occidental (~1700 masn) y *H. e. venus* ubicado en el Pacífico (~41 masn) habitan los extremos de un gradiente ambiental entre bosque seco para la primera y húmedo para la segunda^{80,81}, los cuales podrían estar generando las diferencias encontradas entre las dos especies. No obstante, se requiere de más estudios para determinar que variable o característica ambiental pueda estar generando este patrón geográfico en la microbiota de las *Heliconius*.

La incongruencia entre las agrupaciones obtenidas por la similitud de las comunidades de la microbiota y la filogenia de las especies (Figura 5), sugiere que no existe efecto de la ancestría en la composición de las comunidades de bacterias y arqueas para el género *Heliconius*. Este resultado ha sido reportado previamente en este género²² donde factores ecológicos, climáticos y metabólicos podrían explicar las agrupaciones y la composición de la microbiota encontrada. A diferencia de lo anterior, en otros insectos se ha reportado una alta filosisimbiosis, asociación entre la microbiota y las relaciones filogenéticas del hospedero, la cual no varía a partir de su dieta o de la zona geográfica en la que se encuentre^{82,83}.

En conclusión, la microbiota de *Heliconius* presenta baja diversidad y dominancia de diferentes géneros de bacterias, entre ellos *Enterococcus*, *Orbus*, *Commensalibacter*, *Spiroplasma* y *Wolbachia*, los cuales podrían modular la infección de patógenos e intervenir en la metabolización de compuestos ricos en carbohidratos y proteínas. Además, las abundancias de estas comunidades varían dependiendo de la geografía y de las condiciones ambientales de los ecosistemas en los que habitan, los cuales podrían afectar la asociación de la microbiota con las relaciones filogenéticas de *Heliconius*. Otros análisis metagenómicos y metabolómicos como *shotgun sequencing* junto con datos cuantitativos de los nichos ecológicos de las poblaciones de *Heliconius*, podrían ayudar a comprender cuáles condiciones estructuran geográficamente la microbiota de estos insectos y determinar las funciones de los géneros encontrados. También, a futuro se debería analizar el patrón geográfico en la composición de otros microorganismos, particularmente en eucariotas, y ampliar el estudio a otras especies de *Heliconius* y zonas geográficas de Colombia para evaluar si se mantienen los patrones observados.

REFERENCIAS

1. Marchesi, J. R. & Ravel, J. The vocabulary of microbiome research : a proposal. *Microbiome* 1–3 (2015) doi:10.1186/s40168-015-0094-5.
2. Pascoe, E. L., Hauffe, H. C., Marchesi, J. R. & Perkins, S. E. Network analysis of gut microbiota literature: an overview of the research landscape in non-human animal studies. *ISME J.* **11**, 2644–2651 (2017).
3. Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T. & Singh, B. K. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 607–621 (2020).
4. Wang, Y. & Rozen, D. E. Gut Microbiota Colonization and Transmission in the Burying Beetle *Nicrophorus vespilloides* throughout Development. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, (2017).
5. Mao, M. & Bennett, G. M. Symbiont replacements reset the co-evolutionary relationship between insects and their heritable bacteria. *ISME J.* **14**, 1384–1395 (2020).
6. Engel, P. & Moran, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 699–735 (2013).
7. Wang, Y., Gilbreath, T. M., Kikutla, P., Yan, G. & Xu, J. Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* **6**, 1–9 (2011).
8. Anderson, K. E. *et al.* The queen’ s gut refines with age : longevity phenotypes in a social insect model. *Microbiome* **6**, 1–16 (2018).
9. Santos-Garcia, D., Mestre-Rincon, N., Zchori-Fein, E. & Morin, S. Inside out: microbiota dynamics during host-plant adaptation of whiteflies. *ISME J.* **14**, 847–856 (2020).
10. Chu, C.-C., Spencer, J. L., Curzi, M. J., Zavala, J. A. & Seufferheld, M. J. Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 11917–11922 (2013).
11. Kim, J. M. *et al.* Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two Cerambycidae species (Coleoptera). *J. Microbiol.* **55**, 21–30 (2017).
12. Huang, S. & Zhang, H. The Impact of Environmental Heterogeneity and Life Stage on the Hindgut Microbiota of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS One* **8**, e57169 (2013).

13. Rocha, M. R., Barbosa dos Santos, L. M., Paulo Vicente, A. C. & Maciel-de-Freitas, R. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 577–587 (2016).
14. Ferguson, L. V. *et al.* Seasonal shifts in the insect gut microbiome are concurrent with changes in cold tolerance and immunity. *Funct. Ecol.* **32**, 2357–2368 (2018).
15. Chen, B. *et al.* Gut microbiota metabolic potential correlates with body size between mulberry-feeding lepidopteran pest species. *Pest Manag. Sci.* **76**, 1313–1323 (2020).
16. Shukla, S. P. & Beran, F. Gut microbiota degrades toxic isothiocyanates in a flea beetle pest. *Mol. Ecol.* **29**, 4692–4705 (2020).
17. Prado, A., Marolleau, B., Vaissière, B. E., Barret, M. & Torres-Cortes, G. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Sci. Rep.* **10**, 3575 (2020).
18. Schilder, R. J. & Stewart, H. Parasitic gut infection in *Libellula pulchella* causes functional and molecular resemblance of dragonfly flight muscle to skeletal muscle of obese vertebrates. *J. Exp. Biol.* **222**, 1–10 (2019).
19. Feldhaar, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically. *Ecol. Entomol.* **36**, 533–543 (2011).
20. Kešnerová, L. *et al.* Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME J* **14**, 801–814 (2020).
21. Bosmans, L. *et al.* Hibernation Leads to Altered Gut Communities in Bumblebee Queens (*Bombus terrestris*). *Insects* **9**, 1–14 (2018).
22. Hammer, T. J., Dickerson, J. C., McMillan, W. O. & Fierer, N. Heliconius butterflies host characteristic and phylogenetically structured adult-stage microbiomes. *Appl. Environ. Microbiol.* (2020) doi:10.1128/AEM.02007-20.
23. Jiggins, C. D. *The Ecology and Evolution of Heliconius Butterflies*. (2017). doi:10.1093/acprof:oso/9780199566570.001.0001.
24. Scoble, M. J. *The Lepidoptera: Form, Function and Diversity*. (Oxford University Press, 1995). doi:https://doi.org/10.1093/aesa/88.4.590.
25. Young, F. J. & Montgomery, S. H. Pollen feeding in Heliconius butterflies: the singular evolution of an adaptive suite. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **287**, 20201304 (2020).
26. Opitz, S. E. W. & Müller, C. Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* **19**, 117–154 (2009).

27. Hammer, T. J., McMillan, W. O. & Fierer, N. Metamorphosis of a Butterfly-Associated Bacterial Community. *PLoS One* **9**, e86995 (2014).
28. van Schooten, B., Godoy-Vitorino, F., McMillan, W. O. & Papa, R. Conserved microbiota among young *Heliconius* butterfly species. *PeerJ* **6**, e5502 (2018).
29. Ravenscraft, A., Berry, M., Hammer, T., Peay, K. & Boggs, C. Structure and function of the bacterial and fungal gut microbiota of Neotropical butterflies. *Ecol. Monogr.* **89**, e01346 (2019).
30. Pernice, M., Simpson, S. J. & Ponton, F. Towards an integrated understanding of gut microbiota using insects as model systems. *J. Insect Physiol.* (2014)
doi:10.1016/j.jinsphys.2014.05.016.
31. Jordan, H. R. & Tomberlin, J. K. Abiotic and biotic factors regulating inter-kingdom engagement between insects and microbe activity on vertebrate remains. *Insects* **8**, (2017).
32. Donkersley, P., Rhodes, G., Pickup, R. W., Jones, K. C. & Wilson, K. Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecol. Evol.* **8**, 4743–4756 (2018).
33. Li, P., Liang, H., Lin, W.-T., Feng, F. & Luo, L. Microbiota Dynamics Associated with Environmental Conditions and Potential Roles of Cellulolytic Communities in Traditional Chinese Cereal Starter Solid-State Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 5144–5156 (2015).
34. Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (2010).
35. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Källér, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**, 3047–3048 (2016).
36. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
37. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590–D596 (2012).
38. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**, e61217 (2013).
39. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2020).
40. Morrone, J. J. *Biogeographical regionalisation of the Neotropical region*. vol. 3782 (2014).
41. Lahti, L. & Shetty, S. Tools for microbiome analysis in R. Version 2.1.28. (2017).

42. Martijn, G. & Teunisse. Fantaxtic Plots from Phyloseq Data. (2017).
43. Haynes, W. Benjamini–Hochberg Method. in *Encyclopedia of Systems Biology* 78–78 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_1215.
44. Paradis, E. & Schliep, K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**, 526–528 (2019).
45. Kozak, K. R. M. K., Ahlberg, N. I. W., Eild, A. N. F. E. N. & Asmahapatra, K. A. K. D. Multilocus Species Trees Show the Recent Adaptive Radiation of the Mimetic Heliconius Butterflies. *Syst. Biol.* **64**, 505–524 (2015).
46. Galili, T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics* **31**, 3718–3720 (2015).
47. Revell, L. J. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol. Evol.* **3**, 217–223 (2012).
48. Yun, J.-H. *et al.* Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5254–5264 (2014).
49. Paniagua, L. R., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M. & Fatouros, N. E. Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and Impact on the Host. *Front. Microbiol.* **9**, 1–14 (2018).
50. Tagliavia, M., Messina, E., Manachini, B., Cappello, S. & Quatrini, P. The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera : Curculionidae). 1–11 (2014).
51. Muratore, M., Sun, Y. & Prather, C. Environmental Nutrients Alter Bacterial and Fungal Gut Microbiomes in the Common Meadow Katydid, *Orchelimum vulgare*. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
52. González-Serrano, F. *et al.* The Gut Microbiota Composition of the Moth *Brithys crini* Reflects Insect Metamorphosis. *Microb. Ecol.* **79**, 960–970 (2020).
53. Anbutsu, H. & Fukatsu, T. Spiroplasma as a model insect endosymbiont. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**, 144–153 (2011).
54. Bi, J. & Wang, Y. The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts. 846–858 (2020) doi:10.1111/1744-7917.12731.
55. Kautz, S., Rubin, B. E. R. & Moreau, C. S. Bacterial Infections across the Ants: Frequency and Prevalence of *Wolbachia*, *Spiroplasma*, and *Asaia*. *Psyche A J. Entomol.* **2013**, 1–11 (2013).
56. Ballinger, M. J. & Perlman, S. J. The defensive *Spiroplasma*. *Curr. Opin. Insect Sci.*

- 32**, 36–41 (2019).
57. Sanada-Morimura, S., Matsumura, M. & Noda, H. Male Killing Caused by a Spiroplasma Symbiont in the Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J. Hered.* **104**, 821–829 (2013).
 58. Tabata, J. *et al.* Male Killing and Incomplete Inheritance of a Novel Spiroplasma in the Moth *Ostrinia zaguliaevi*. *Microb. Ecol.* **61**, 254–263 (2011).
 59. Telschow, A., Flor, M., Kobayashi, Y., Hammerstein, P. & Werren, J. H. Wolbachia-Induced Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility and Speciation: Mainland-Island Model. *PLoS One* **2**, e701 (2007).
 60. Muñoz, A. G., Salazar, C., Castaño, J., Jiggings, C. D. & Linares, M. Multiple sources of reproductive isolation in a bimodal butterfly hybrid zone. *J. Evol. Biol.* **23**, 1312–1320 (2010).
 61. Crotti, E. *et al.* Acetic Acid Bacteria as Symbionts of Insects. in *Acetic Acid Bacteria* 121–142 (Springer Japan, 2016). doi:10.1007/978-4-431-55933-7_5.
 62. Servin-Garciduenas, L. E., Sanchez-Quinto, A. & Martinez-Romero, E. Draft Genome Sequence of Commensalibacter papalotli MX01, a Symbiont Identified from the Guts of Overwintering Monarch Butterflies. *Genome Announc.* **2**, (2014).
 63. Schmid, R. B., Lehman, R. M., Brözel, V. S. & Lundgren, J. G. An indigenous gut bacterium, enterococcus faecalis (Lactobacillales: Enterococcaceae), increases seed consumption by harpalus pensylvanicus (Coleoptera: Carabidae). *Florida Entomol.* **97**, 575–584 (2014).
 64. Lee, J.-H., Lee, K.-A. & Lee, W.-J. Microbiota, Gut Physiology, and Insect Immunity. in *Advances in Insect Physiology* (ed. Ligoxygakis, P.) 111–138 (2017). doi:10.1016/bs.aiip.2016.11.001.
 65. Chouaia, B. *et al.* Acetic Acid Bacteria Genomes Reveal Functional Traits for Adaptation to Life in Insect Guts. *Genome Biol. Evol.* **6**, 912–920 (2014).
 66. Vilanova, C., Baixeras, J., Latorre, A. & Porcar, M. The Generalist Inside the Specialist: Gut Bacterial Communities of Two Insect Species Feeding on Toxic Plants Are Dominated by Enterococcus sp. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
 67. Alves, J. M. P. *et al.* Genome Evolution and Phylogenomic Analysis of Candidatus Kinetoplastibacterium, the Betaproteobacterial Endosymbionts of Strigomonas and Angomonas. *Genome Biol. Evol.* **5**, 338–350 (2013).
 68. Kostygov, A. Y. *et al.* Novel Trypanosomatid-Bacterium Association: Evolution of Endosymbiosis in Action. *MBio* **7**, (2016).

69. Palomino-Ángel, S., Anaya-Acevedo, J. A. & Botero, B. A. Evaluation of 3B42V7 and IMERG daily-precipitation products for a very high-precipitation region in northwestern South America. *Atmos. Res.* **217**, 37–48 (2019).
70. Morrone, J. J. *Biogeografía de América Latina y el Caribe*. (Zaragoza, 2001).
71. LONDOÑO-MURCIA, M. C., TELLEZ-VALDÉS, O. & SÁNCHEZ-CORDERO, V. Environmental heterogeneity of World Wildlife Fund for Nature ecoregions and implications for conservation in Neotropical biodiversity hotspots. *Environ. Conserv.* **37**, 116–127 (2010).
72. Ruiz Rodríguez, S. L. *et al. Diversidad biológica y cultural del sur de la Amazonia colombiana - Diagnóstico*. (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Corpoamazonia, Instituto Sinchi, Parques Nacionales Naturales, 2007).
73. Killeen, T. J., Douglas, M., Consiglio, T., Jørgensen, P. M. & Mejia, J. Dry spots and wet spots in the Andean hotspot. *J. Biogeogr.* **34**, 1357–1373 (2007).
74. López, C. E. Landscapes variability and the early peopling of the inter-Andean Magdalena Valley, Colombia (South America). *Quat. Int.* (2020) doi:10.1016/j.quaint.2020.10.012.
75. Kattan, G. H., Franco, P., Rojas, V. & Morales, G. Biological diversification in a complex region: a spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *J. Biogeogr.* **31**, 1829–1839 (2004).
76. Steele, P. R. Taxonomic Revision of the Neotropical Genus *Psiguria* (Cucurbitaceae). *Syst. Bot.* **35**, 341–357 (2010).
77. Kieran, T. J. *et al.* Regional biogeography of microbiota composition in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. *Parasit. Vectors* **12**, 1–13 (2019).
78. Koskinioti, P. *et al.* The effects of geographic origin and antibiotic treatment on the gut symbiotic communities of *Bactrocera oleae* populations. *Entomol. Exp. Appl.* 1–12 (2019) doi:10.1111/eea.12764.
79. Seabourn, P., Spafford, H. & Yoneishi, N. The *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) microbiome varies spatially and with Ascogregarine infection. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **14**, 1–21 (2020).
80. Palacios-Mayoral, V. D., Palacios-Mosquera, L. & Jiménez-Ortega, A. M. Diversidad de mariposas diurnas (Lepidoptera: Papilionoidea) asociadas con tres hábitats en el corregimiento de Pacurita, municipio de Quibdó, Chocó, Colombia. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* **42**, 237 (2018).

81. Muñoz, A. G., Baxter, S. W., Linares, M. & Jiggins, C. D. Deep mitochondrial divergence within a *Heliconius* butterfly species is not explained by cryptic speciation or endosymbiotic bacteria. *BMC Evol. Biol.* **11**, 358 (2011).
82. Brooks, A. W., Kohl, K. D., Brucker, R. M., van Opstal, E. J. & Bordenstein, S. R. Phylosymbiosis: Relationships and Functional Effects of Microbial Communities across Host Evolutionary History. *PLOS Biol.* **14**, e2000225 (2016).
83. Tinker, K. A. & Ottesen, E. A. Phylosymbiosis across Deeply Diverging Lineages of Omnivorous Cockroaches (Order Blattodea). *Appl. Environ. Microbiol.* **86**, (2020).

Leyendas de las figuras y tablas:

Figura 1. Mapa geográfico de las muestras recolectadas de 4 especies del género *Heliconius*: *H. melpomene*, *H. erato*, *H. clysonimus* y *H. cydno*, provenientes de distintas provincias biogeográficas de Colombia.

Figura 2. Abundancias relativas de los phyla y géneros más abundantes en la microbiota de *Heliconius*. Abundancias de los phyla A partir de las especies de *Heliconius* (A) y a las provincias biogeográficas de las muestras (B). Abundancias de los géneros respecto a las especies de *Heliconius* (C) y sus provincias biogeográficas (D).

Figura 3. Diferencias en los porcentajes de abundancia de los géneros de ASVs más comunes. Heatmap correspondiente al porcentaje de los ASVs más abundantes en entre las especies de *Heliconius* (A) y sus provincias biogeográficas (B).

Figura 4. Diversidad alfa y beta de la microbiota de *Heliconius* y sus provincias biogeográficas. Índices de diversidad alfa (Shannon-Wiener y Simpson) para cada una de las especies de *Heliconius* (A) y sus provincias biogeográficas (B). Las medianas de cada índice fueron analizadas con un Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn-test con el método de Benjamini-Hochberg (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$). Análisis discriminante de componentes principales (DPCA) a partir de la similitud de la microbiota entre las especies de *Heliconius* (C) y las provincias biogeográficas (D).

Figura 5. Correspondencia entre las relaciones filogenéticas y las similitudes de la microbiota de las especies de *Heliconius*.

Figura S1. Curvas de rarefacción para todos los individuos muestreados (A) y para cada especies de *Heliconius* (B).

Figura S2. Análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de las similitudes de la microbiota de las especies de *Heliconius* (A) y de las provincias biogeográficas de las muestras (B).

Figura S3. Diversidad alfa y beta de la microbiota de las subespecies de *Heliconius*. Índices de diversidad alfa (Shannon-Wiener y Simpson) para cada subespecie de *Heliconius* (**A**). Análisis de coordenadas principales (PCoA) (**B**) y Análisis discriminante de componentes principales (DPCA) (**C**) a partir de la similitud de la microbiota de las subespecies *Heliconius*.

Figura S4. Abundancias relativas de los géneros más abundantes en la microbiota de las subespecies de *Heliconius*.