

Cuantificando la variación de las formas: aplicaciones de la morfometría geométrica alar de Lepidoptera (Insecta)

Abimel Moreno^{1,2}

¹Museo del Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

²Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), km 11 carretera Panamericana, Altos de Pipe, Edo. Miranda, Venezuela.

Correspondencia: abimoreno16@gmail.com

(Recibido: 24-07-2018 / Aceptado: 15-01-2019)

INTRODUCCIÓN

En biología muchas preguntas están relacionadas con la forma, entre los aspectos que pueden ser abordados mediante el estudio de esta se incluyen: adaptación de estructuras a factores geográficos o condiciones ambientales locales, cambios de la forma durante el desarrollo ontogenético, naturaleza y origen del polimorfismo (dimorfismo sexual y otros polimorfismos dentro de las poblaciones), taxonomía (asignación de individuos a los taxones, diferencias dentro y entre diferentes taxones), enfermedades y diversificación evolutiva (Marcus 1990, Zelditch *et al.* 2004). En este sentido, la existencia de técnicas para describir y comparar formas es fundamental. Inicialmente, la clasificación taxonómica de los organismos y el entendimiento de muchos procesos biológicos, se basaron en la descripción de la morfología (Adams *et al.* 2004). A principios del siglo XX la biología comparada empezó su transición de un campo descriptivo a una ciencia cuantitativa, en la que el análisis morfológico tuvo una similar revolución cuantitativa (Adams *et al.* 2004, Benítez & Püschel 2014).

La morfometría es el estudio cuantitativo de las formas biológicas y su covariación con otras variables (Adams *et al.* 2004, Webster & Sheets 2010). Para Bookstein (1982) es la fusión empírica de la geometría y la biología. Tradicionalmente estuvo basada en la aplicación de análisis estadísticos univariados y multivariados a medidas de grupos de variables como distancias lineales entre dos puntos anatómicos (largo, ancho y alto), proporciones y ángulos (Adams *et al.* 2004, Dujardin 2011); enfoque que en la actualidad se conoce como morfometría tradicional (MT).

Recientemente, avances teóricos y computacionales han cambiado el enfoque de los procedimientos morfométricos al análisis de coordenadas cartesianas de puntos anatómicos (hitos) que definen las formas bajo estudio (Slice 2007, Dujardin 2011). Este nuevo enfoque, denominado morfometría geométrica (MG), requiere de técnicas rigurosas basadas en una teoría matemática coherente capaz de capturar la información geométrica de las formas, ofreciendo análisis robustos, completos y concisos, además de herramientas gráficas para la cuantificación y visualización de la variación morfológica intra e interespecífica (Slice 2007, Benítez & Püschel 2014).

La morfología de las alas de los insectos ha sido ampliamente utilizada en estudios taxonómicos, ecológicos y evolutivos (Hernández *et al.* 2010); estas representan excelentes modelos para el estudio de la variación morfológica por varias razones. Algunas de ellas están relacionadas con los métodos en MG, otras con los diversos problemas que pueden ser abordados mediante el estudio de la morfología de las alas dada su importancia en una gran variedad de aspectos de la vida de los insectos, tales como dispersión, búsqueda de pareja, mecanismos de defensa, búsqueda de alimentos y regulación térmica (Hernández *et al.* 2010). Adicionalmente, el proceso de su desarrollo está bien estudiado y tanto su tamaño como su forma son características de alta plasticidad (Soto *et al.* 2008).

El análisis de la forma del ala de los insectos mediante MG ha sido muy utilizado en especies de importancia médica para la discriminación e identificación de especies (Calle 2008), en estudios de la variabilidad intraespecífica asociada a diferentes condiciones ambientales (Prudhomme *et al.* 2016), estructuración espacial de poblaciones

(Schachter-Broide *et al.* 2004) y filogenia (Soto-Vivas *et al.* 2011). Adicionalmente se ha utilizado como un indicador de estrés ante cambios ambientales mediante estudios de inestabilidad del desarrollo, usando como medida la asimetría fluctuante (Dujardin 2008, Soto *et al.* 2008; Sanzana *et al.* 2013).

En el caso del orden Lepidoptera, a pesar de ser conocido por su gran diversidad en la morfología de las alas, existen pocos estudios de este tipo, los cuales están centrados principalmente en el estudio de la variación intraespecífica (plasticidad fenotípica) y el dimorfismo sexual (Zhong *et al.* 2016). El objetivo de la presente revisión es dar una visión general sobre el uso de la MG en el estudio de las alas de lepidópteros en diferentes contextos; destacando la utilidad de estos métodos en la resolución de problemas en los que la morfología tiene un papel importante. Organización del texto: se presenta una muy breve introducción a la MG (para mayor detalle ver Bookstein 1996, Zelditch 2004, Slice 2007, Toro *et al.* 2010, Klingenberg 2015, Gunz & Mitteroecker 2013), seguida de una discusión sobre la utilidad y ventajas del uso del ala de los insectos en este tipo de estudios, finalmente se presentan y discuten algunos ejemplos de la aplicación de la MG del ala en el estudio de la biología y ecología de lepidópteros.

MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

La MG consiste en la caracterización de las formas en términos de las coordenadas cartesianas de puntos anatómicos de referencia (“*hitos*”). Si una configuración de hitos cubre la mayoría de las partes anatómicas más importantes en una estructura, la posición relativa de los hitos puede proveer una caracterización razonable de la forma de la estructura analizada (Klingenberg 2015). Se reconocen dos enfoques conceptual y estadísticamente separados (Dujardin *et al.* 2014): 1) MG de hitos discretos, basada en la posición relativa de hitos “verdaderos” y 2) MG de contornos, la cual consiste en capturar los contornos de las formas a través de una secuencia de “*pseudo-hitos*”. Los hitos verdaderos son considerados geométrica y/o anatómicamente homólogos. Varios niveles de homología han sido reconocidos con base en la precisión con la que un hito puede ser localizado en cada individuo (hitos tipo I, II y III definidos por Bookstein 1991, citado por Zelditch *et al.* 2004, Dujardin *et al.* 2014).

Un tipo especial de hitos llamados “*semi-hitos deslizantes*”, permiten la caracterización de líneas o contornos entre dos hitos verdaderos; estos difieren de los pseudohitos, los cuales también describen contornos pero no dependen de la presencia de hitos verdaderos (Dujardin *et al.* 2014). Existen una serie de herramientas que permiten analizar

hitos, semihitos y pseudohitos, las cuales difieren en los detalles de cómo la geometría del objeto es representada matemáticamente. No obstante, la mayoría de los métodos transforman los puntos y contornos en “coordenadas de la forma”, las cuales son variables que pueden ser analizadas mediante procedimientos estadísticos convencionales (Lawing & Polly 2010).

El enfoque más común en la literatura es el uso de hitos discretos alineados mediante un Análisis Generalizado de Procrustes (AGP). El objetivo del AGP es eliminar la información no inherente a la forma (localización, escala y orientación), buscando la correspondencia de hitos homólogos entre las múltiples configuraciones y una configuración promedio o consenso, de manera que sólo queden las diferencias que no pueden ser removidas, sin importar el alineamiento que se haga entre configuraciones (Zelditch *et al.* 2004, Klingenberg 2015). Este procedimiento se lleva a cabo en tres pasos. En primer lugar, se escalan todas las configuraciones a un mismo tamaño. La medida de tamaño utilizada es el tamaño centroide, la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias entre los hitos y su centro de gravedad (el centroide, definido por los promedios de las coordenadas). Seguidamente se trasladan las configuraciones a un centro de gravedad común, y finalmente se rotan para minimizar la suma de las desviaciones al cuadrado entre hitos homólogos.

Luego del AGP, las coordenadas alineadas, llamadas coordenadas de Procrustes, describen la localización de cada espécimen en un espacio curvo conocido como el espacio de la forma de Kendall (para una descripción más detallada de los espacios morfométricos ver Zelditch *et al.* 2004). El espacio de Kendall para un número particular de hitos es un espacio multidimensional en el cual cada forma posible está representada por un punto y las distancias entre puntos son las distancias de Procrustes (la raíz cuadrada de la sumatoria de las desviaciones al cuadrado entre hitos homólogos) (Zelditch *et al.* 2004). Es un espacio complejo, sin embargo, la mayoría de los análisis no se llevan a cabo en él, ya que es posible aproximar localmente el espacio de Kendall por un espacio tangente lineal, en el cual se pueden realizar cualquier tipo de análisis estadísticos multivariados (Klingenberg 2015).

¿POR QUÉ EL ALA DE LOS INSECTOS COMO OBJETO DE ESTUDIO?: VENTAJAS DE SU USO EN MG

Las alas de los insectos son consideradas un objeto de estudio sumamente atractivo. En Pterygota, comportamientos relacionados con la reproducción, la localización de sitios de oviposición y alimentación, así como la evasión de depredadores son dependientes de la eficiencia y

habilidad en el vuelo (Breauker *et al.* 2010; Hernández *et al.* 2010). Es de esperarse por ende que el diseño de la morfología funcional del vuelo en insectos alados se encuentre bajo fuertes presiones selectivas. De manera que el estudio de la variabilidad encontrada en la forma de estas estructuras puede proveer información sobre relación entre dicha variación y limitaciones funcionales o filogenéticas (Ferreira 2014).

Genéticamente, el ala exhibe una alta heredabilidad en la naturaleza, siendo su tamaño generalmente asociado con el tamaño del cuerpo y la conformación con la habilidad de vuelo (Obando 2011). El estrés ambiental puede afectar la expresión del genoma, especialmente en las alas, las cuales exhiben un grado de variabilidad considerable a nivel intra e interespecífico (Bai *et al.* 2015). En este sentido, las alas representan excelentes modelos para el estudio de procesos genéticos y del desarrollo, que, en conjunto con procesos ecológicos y evolutivos, moldean las variaciones morfológicas observadas en las poblaciones naturales (Bai *et al.* 2015). En la morfología del ala, tanto la conformación como el tamaño pueden ser usados como indicadores de cambios cuando está expuesta a diferentes condiciones ambientales (Hernández, 2010).

Por otra parte, las alas constituyen estructuras ideales para el análisis morfogeométrico. Los puntos donde las venas se encuentran con el borde del ala y las intersecciones entre venas (Fig. 1) representan hitos anatómicos que satisfacen los mejores criterios de escogencia (Breuker *et al.* 2010, Obando 2011). Dadas las características del desarrollo del ala, estos puntos satisfacen el criterio de homología, además pueden ser fácilmente localizados en distintos especímenes, disminuyendo el error del observador en el proceso de digitalización. Al ser el ala una estructura plana, todos los hitos yacen en un mismo plano y en la mayoría de los casos, se cuenta con un buen número de hitos que pueden ser escogidos, de manera que la configuración diseñada provea una cobertura adecuada de la forma del ala.

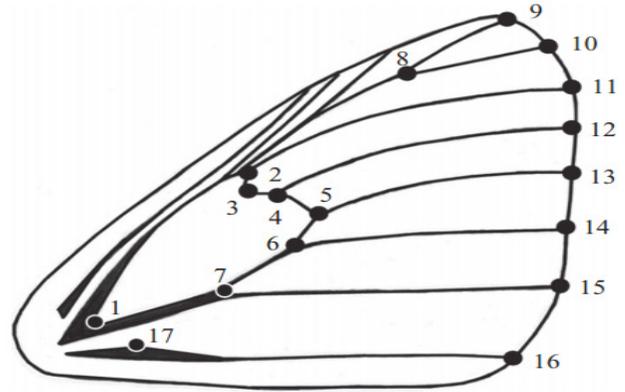


Figura 1. Posición de 17 hitos anatómicos en el ala derecha de *Auca coctei* (Nymphalidae) (Sanzana *et al.* 2013).

MG EN ALAS DE LEPIDOPTERA

La figura 2 muestra las familias que han sido objeto de estudio en este tipo de trabajos. De 15 familias, sólo cuatro corresponden a mariposas (Nymphalidae, Pieridae, Papilionidae y Lycaenidae), siendo la familia Nymphalidae la más estudiada. En el caso de las polillas, se ha estudiado un mayor número de familias. En relación a los aspectos metodológicos, sólo cinco trabajos utilizaron el enfoque de contornos (Albutra *et al.* 2012, Jones *et al.* 2013; Pecháček *et al.* 2014, Chávez & Cruz, 2016, Zhong *et al.* 2016), el resto utilizaron MG de hitos discretos. En todos los casos se utilizó como método de superposición el AGP.

La mayor parte de estos trabajos están enfocados en ciertos aspectos ecológicos y evolutivos (Fig. 3), e incluyen el uso de la asimetría fluctuante como medida de la inestabilidad del desarrollo ante el estrés ambiental (Hoffmann *et al.* 2002, Habel *et al.* 2012a, Habel *et al.* 2012b, Benítez *et al.* 2015, Juhász *et al.* 2016), el estudio de la variabilidad fenotípica intraespecífica asociada a diversos factores bióticos y abióticos, como el dimorfismo sexual (Zahiri *et al.*

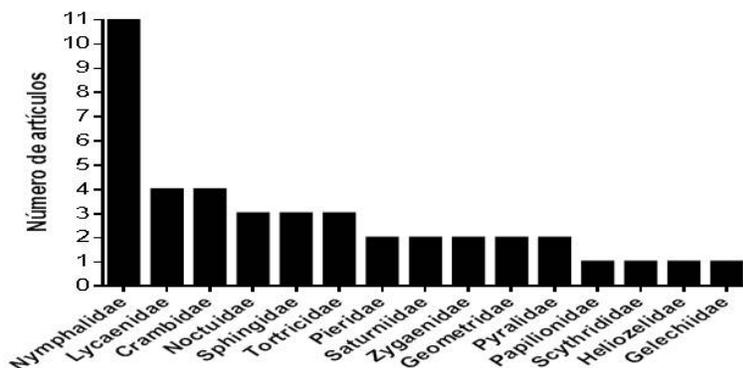


Figura 2. Número de artículos publicados por familia.

2006, Mozaffarian *et al.* 2007a, Mozaffarian *et al.* 2007b, Breuker *et al.* 2007, Oliveira 2008, Breuker *et al.* 2010, Hernández *et al.* 2010, Khiaban *et al.* 2010, Benítez *et al.* 2015, Jorge *et al.* 2011, Khaghaninia *et al.* 2011, Obando 2011, Albutra *et al.* 2012, Garzón 2012, Habel *et al.* 2012a, Habel *et al.* 2012b, Sanzana *et al.* 2013, Jones *et al.* 2013, Bereczki *et al.* 2014, Berns 2014, Khaghaninia *et al.* 2014, Jeratthitikul *et al.* 2014, Pecháček *et al.* 2014, Bai *et al.* 2015, Ferreira *et al.* 2015, Torres *et al.* 2015, Juhász *et al.* 2016), la caracterización de la variación morfológica dentro de un taxón específico y sus implicaciones ecológicas (Céspedes *et al.* 2014, Zhong *et al.* 2016) y el estudio de patrones filogeográficos (Dincă *et al.* 2011, Von Reumont *et al.* 2011).

Un pequeño número de trabajos se centran en la delimitación de taxones (Roggero & Passerin 2005, Mutanen *et al.* 2007, Nath & Devi 2009, Knurek 2010, Barão *et al.* 2014, Cañas-Hoyos *et al.* 2014, Ferreira 2014, Jeratthitikul *et al.* 2014, Chávez & Cruz 2015, Pzrzybytowicz *et al.* 2015). En las siguientes secciones se presentan los distintos usos que se la ha dado a la MG alar de lepidópteros.

INESTABILIDAD DEL DESARROLLO Y ASIMETRÍA

La Estabilidad del Desarrollo (ED) hace referencia a las capacidades intrínsecas de un individuo para resistir perturbaciones durante su desarrollo, se define como la capacidad de un organismo para producir un fenotipo predeterminado por un diseño corporal adaptativo que ha sido modelado por condiciones genéticas y ambientales específicas (Benítez & Parra, 2011, Benítez & Püschel 2014, Benítez *et al.* 2015). Por el contrario, la tendencia de un sistema de desarrollo a producir cambios morfológicos en respuesta a perturbaciones aleatorias se denomina Inestabilidad del Desarrollo (ID) o Ruido del Desarrollo (RD) (Benítez & Parra 2011, Benítez *et al.* 2015). Estos conceptos han sido utilizados para evaluar la respuesta fenotípica ante el estrés ambiental, siendo la Asimetría Fluctuante (AF) la medida más utilizada para estimar la ID (Benítez & Püschel 2014, Benítez *et al.* 2015).

El principio subyacente en el uso de la AF como medida de la ID es que los lados de un organismo con simetría bilateral pueden ser vistos como réplicas independientes de un mismo desarrollo, es decir, los factores determinantes del desarrollo del lado I y D son idénticos, de esta manera, es esperable que en condiciones ideales exista una simetría perfecta (Benítez & Parra 2011, Benítez & Püschel 2014, Benítez *et al.* 2015). No obstante, los procesos del desarrollo no son enteramente determinísticos, por el contrario, tienen un componente inherente de variación aleatoria,

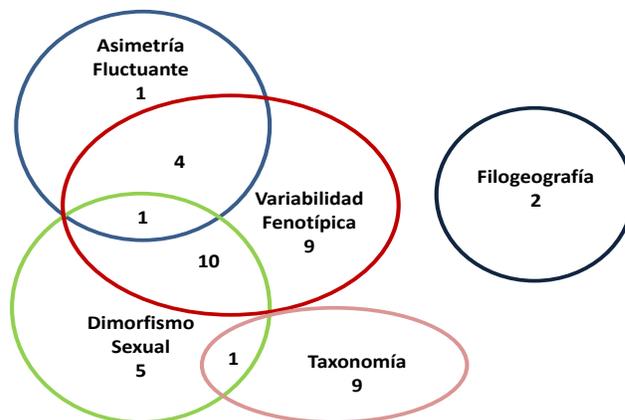


Figura 3. Número de artículos publicados por tópico entre los años 2002 y 2016. De una búsqueda en Google Académico con la combinación de palabras clave “*geometric morphometrics moths and butterflies wings*”, se obtuvieron 32 artículos sobre MG en alas de lepidópteros. Con base en lo obtenido en la primera búsqueda se utilizaron adicionalmente las siguientes combinaciones de palabras clave: “*geometric morphometrics fluctuating asymmetry Lepidoptera*”, “*geometric morphometrics phenotypic plasticity Lepidoptera*”, “*geometric morphometrics species delimitation Lepidoptera*” y “*shape variation Lepidoptera*”, obteniéndose 10 artículos adicionales.

por lo que la expresión de una característica morfológica que se espera, en promedio, sea expresada de cierta manera, bajo el control de un genoma particular, bajo condiciones ambientales particulares y para el lado del cuerpo en cuestión, puede sufrir desviaciones en mayor o menor grado respecto a lo esperado (Klingerberg 2015).

Las desviaciones antes mencionadas, por lo general, ocurren diferencialmente en cada lado del cuerpo, dando lugar a cierto grado de asimetría. La tendencia de las diferencias I-D a estar desviadas de cero se conoce como Asimetría Direccional (AD) (Fig. 4b), el desarrollo diferencial de una característica morfológica sobre los lados I y D; el componente aleatorio o residual de la asimetría es la AF (Fig. 4), la cual hace referencia a pequeñas desviaciones de un “fenotipo ideal” respecto al desarrollo simétrico de características morfológicas (Swaddle 2003, Klingenberg 2015).

En relación a los aspectos metodológicos involucrados en el estudio de la asimetría, cabe destacar que las alas son estructuras con simetría coincidente, es decir, están presentes como dos copias separadas, una a cada lado del cuerpo. En este contexto, las herramientas de MG son empleadas de una manera bastante sencilla, se refleja la configuración de hitos de uno de los lados de manera que las configuraciones coincidan, manifestándose la asimetría como las diferencias en las configuraciones de las copias izquierda

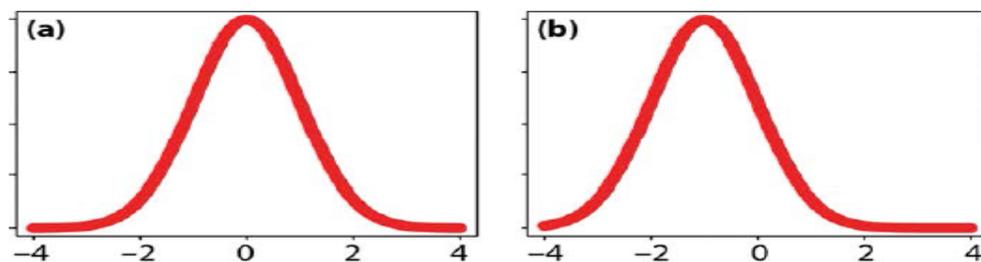


Figura 4. Distribuciones de frecuencia de las diferencias I-D para: a) Asimetría fluctuante “pura”, las diferencias I-D siguen una distribución en forma de campana con media cero. b) Asimetría direccional y asimetría fluctuante, las diferencias I-D están distribuidas alrededor de una media diferente de cero, indicando asimetría direccional. La dispersión de las diferencias I-D individuales alrededor de esta media es la asimetría fluctuante. Las unidades en los ejes son arbitrarias (Klingenberg 2015).

y derecha (Klingenberg & McIntyre 1998; Klingenberg 2015). Las diferencias son puestas a prueba mediante un ANOVA de Procrustes (Klingenberg & McIntyre 1998); el modelo considera la identidad de los especímenes como un factor de efectos aleatorios y a los lados (I-D) como un factor de efectos fijos. Los efectos principales del primero denotan la variación individual, mientras que los efectos principales del factor “lado” expresan AD. Por su parte, la interacción “lado x espécimen” serviría como una medida de AF, esto es, las desviaciones de cada asimetría individual del promedio total de asimetría en la forma bajo estudio (Klingenberg & McIntyre 1998).

La AF ha sido ampliamente utilizada como medida de inestabilidad del desarrollo, no obstante existe una creciente evidencia de que esta no es un indicador consistente de estrés (Juhász *et al.* 2016). Existe una gran cantidad de factores genéticos y ambientales que pueden incrementar el ruido en el desarrollo y la asimetría, y claramente no existe una relación directa entre asimetría, genética y estrés ambiental; la asimetría en una característica puede resultar de factores diferentes a los que causan asimetría en otra característica (Swaddle 2003). Si bien la MG ha resultado una herramienta poderosa en la detección de AF en lepidópteros, los resultados obtenidos no son esclarecedores respecto a su relación con factores ambientales estresantes.

Por ejemplo, Juhász *et al.* (2016) no encontraron evidencia de que una mayor variabilidad en factores climáticos produzca mayores niveles de AF en las alas de la mariposa *Melitaea athalia* Rottentburg (Nymphalidae). De manera similar, el grado de aislamiento de una población, no parece tener efectos sobre el grado de AF observado en las alas de *Parnassius apollo* Linnaeus (Papilionidae) (Habel 2012a). Así mismo, Hoffman *et al.* (2002) no encontraron un aumento de la AF en grupos de *Helicoverpa punctigera* Wallengren (Noctuidae) sometidos a estrés por bajas temperaturas y aplicación de pesticida. En contraste, existen diferencias en los niveles de AF encontrados en

el ala anterior de la polilla Neotropical *Macaria mirthae* Parra & Hausmann (Geometridae) asociada a dos hospederos diferentes (Benítez *et al.* 2015). Esta polilla es nativa del norte de Chile y se alimenta preferencialmente de la fabácea *Acacia macrarantha* Willd (Fabaceae), observándose un cambio de hospedero hacia la especie introducida *Leucaena leucocephala* De Wit (Fabaceae). Los niveles de AF encontrados resultaron mayores en las poblaciones que se alimentan de la especie exótica, lo cual sugiere la menor calidad de *L. leucocephala* como hospedero para el desarrollo larval de la especie (Benítez *et al.* 2015).

VARIABILIDAD FENOTÍPICA

La variación morfológica es un tema de interés en ecología y evolución. Las diferencias fenotípicas de los organismos son consideradas como una respuesta a cambios ambientales interactuando con la variabilidad genética (Obando 2011). Dentro de los aspectos estudiados mediante la MG alar de lepidópteros, el estudio de la variabilidad fenotípica ha recibido una atención considerable en comparación con otro tipo de estudios, proporcionando evidencia sobre una variabilidad morfológica intraespecífica en respuesta a diferencias en diversos factores bióticos y abióticos (Khaghaninia *et al.* 2014). La MG ha sido de gran utilidad en detectar y describir cuantitativamente esta variación morfológica presente en poblaciones, así como indagar sobre el origen, la naturaleza y los factores que alteran los patrones de dicha variabilidad.

Se han encontrado diferencias en la forma y tamaño del ala entre poblaciones de la misma especie atribuidas a factores ambientales como la latitud, altitud, temperatura y la velocidad del viento. Sanzana *et al.* (2013) encontraron una correlación negativa entre la tamaño centroide (TC) del ala de *Auca coctei* Guérin (Nymphalidae) y la latitud; al estar relacionado el tamaño del ala con el tamaño del animal, puede decirse que se presenta en el caso de esta

especie un situación inversa a lo establecido por la ley de Bergmann en homeotermos. La altitud resultó ser la única variable que afectó significativamente las variables morfo-métricas del ala de *Tecia solanivora* Povolny (Gelechiidae) (Hernández *et al.* 2010), estando asociadas las polillas de mayor tamaño a mayores altitudes. De manera similar, Juhász *et al.* (2016) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y el TC en *M. athalia*.

Khaghaninia *et al.* (2014) describieron diferencias morfométricas estacionales en las alas de *Cydia pomonella* Linnaeus (Tortricidae). Las alas anteriores son más cortas y estrechas y las posteriores largas y amplias en la forma de invierno en comparación con la forma de verano, estas diferencias resultaron más conspicuas en hembras, las cuales, en esta especie, al parecer son más efectivas en la dispersión. Según estos autores, la conformación del ala encontrada en la forma de invierno es más adecuada para el vuelo en condiciones extremas. En relación a este último punto, las alas de *C. pomonella* en regiones con altas velocidades del viento presentó una forma similar a la descrita anteriormente (Khaghaninia *et al.* 2011).

Bai *et al.* (2015) evaluaron la variación de la forma del ala en 15 poblaciones de *Pieris rapae* Linnaeus (Pieridae) en relación con la heterogeneidad ambiental presente en las montañas Qinling (China). Un análisis de variantes canónicas dividió a las poblaciones en dos grandes grupos, un grupo sur y un grupo norte, representando las montañas Qinling el límite entre ambos, lo cual demuestra el papel de estas montañas como una barrera que ha causado una fragmentación intraespecífica. Adicionalmente, un análisis de agrupamientos (“cluster”) dividió a las poblaciones en cuatro grupos, los cuales son consistentes con los cuatro tipos de ambiente principales en la zona. Las diferencias en la forma del ala mostraron una alta correlación con la distancia geográfica, mientras más pequeña la distancia entre poblaciones, menores diferencias entre estas. De manera similar, Mozaffarian *et al.* (2007b), encontraron una correlación entre las distancias morfológicas y geográficas en las poblaciones iraníes de *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Pyrilidae).

Otro factor cuyo efecto sobre la morfometría alar ha sido estudiado es la planta hospedera. Las hembras de *Neoleucinodes elegantalis* Gueneé (Crambidae) presentaron diferencias en la conformación del ala en relación a sus dietas con solanáceas silvestres y cultivadas (Obando 2011). Khiaban *et al.* (2010) encontraron diferencias en la forma y el tamaño del ala anterior de *Helicoverpa armigera* Hübner (Noctuidae) entre poblaciones asociadas con tomate, algodón, maíz y garbanzo.

La varianza en la forma y tamaño del ala y su relación con factores bióticos ha recibido una menor atención. Breuker

et al. (2007) encontraron que la relación entre la forma del ala y la dispersión es específica del sexo en *Melitaea cinxia* Linnaeus (Nymphalidae), solo en las hembras se presentaron diferencias en los individuos que se dispersaban y los que no. Jones *et al.* (2013) encontraron una variación considerable en la forma del ala de distintos morfotipos de *Heliconius numata* Cramer (Nymphalidae), una especie que mimetiza los patrones de coloración de varias especies del género *Melinaea* Hübner (Nymphalidae). Las diferencias observadas fueron más conspicuas entre los morfotipos f. *silvana* y f. *elegans*, observándose un paralelismo con las diferencias observadas entre las respectivas especies de *Melinaea* que estos morfotipos imitan, sugiriendo una posible variación en la forma asociada al mimetismo (Jones *et al.* 2013).

Estudios sobre la variabilidad fenotípica se ha realizado también a nivel interespecífico. Zhong *et al.* (2016) cuantificaron la variación en tamaño y forma del ala posterior en 76 especies de Saturniidae distantemente relacionadas. La forma del ala posterior en Saturniidae es altamente variable y tiene implicaciones en la ecología de las especies, especialmente en la interacción depredador-presa. En el estudio se incluyeron 52 géneros en 5 subfamilias con un amplio rango geográfico. Se distinguieron seis grupos morfológicos que no siguen las relaciones filogenéticas de las especies, lo que sugiere una evolución convergente en la forma del ala posterior; estos grupos se presentaron en un gradiente que va desde alas relativamente pequeñas y redondeadas hasta alas grandes con colas largas y delgadas. Se cree que estas colas tienen una función anti-depredadores, al parecer estas colas largas hacen parecer al individuo de mayor tamaño ante el mecanismo de ecolocación de los murciélagos (Janzen 1984, citado por Zhong *et al.* 2016).

Por su parte, Céspedes *et al.* (2014) indagaron sobre la correspondencia entre la forma del ala y los comportamientos de vuelo observados en 21 especies de Haeterini (Nymphalidae, Satyrinae). En las especies incluidas en el análisis estuvieron representados los cinco géneros de la tribu, los cuales presentan diferencias en la altura y comportamiento del vuelo; cuatro géneros planean cerca del suelo y un género aletea muy por encima del nivel del suelo. Se encontró una segregación entre “planeadoras” y “no planeadoras”, siendo los patrones de variación observados congruentes con la aerodinámica de animales en “efecto suelo”.

DIMORFISMO SEXUAL

Las diferencias en caracteres morfológicos entre sexos es un fenómeno común dentro del reino animal, siendo uno de los aspectos más conspicuos el tamaño corporal (Bení-

tez 2013). En insectos, por lo general las hembras son más grandes que los machos, lo cual les da ventajas adaptativas como una mayor fecundidad y mejor cuidado parental. No obstante, en algunos casos los machos son más largos pero tienen menor masa relativa (Benítez 2013). Por otra parte, es muy frecuente que las diferencias entre sexos no sean tan obvias o los individuos sean muy pequeños, lo cual implica que la determinación del dimorfismo sexual en grupos de insectos requiere de técnicas de medida mucho más complejas, como es el caso de la MG (Benítez 2013). Diferencias en la morfología del ala entre sexos de una misma especie, puede ser un reflejo de diferencias en la capacidad de vuelo, lo cual podría tener mucho significado, por ejemplo, en el monitoreo y control de especies plaga (Albutra *et al.* 2012).

Se han detectado diferencias entre sexos en la conformación del ala de las especies *Auca coctei*, *Tecia solanivora*, *Cydia pomonella*, *Neoleucinodes elegantalis*, *Tongeia fischeri* Eversmann (Lycaenidae), *Heliconius numata*, *Heliconius erato* Linnaeus (Nymphalidae), *Chilo suppressalis* Walker (Crambidae), *Melitaea cinxia*, *Danaus plexippus* Linnaeus (Nymphalidae), *Schirpophaga innotata* Walker (Crambidae), *Ectomyelois ceratoniae*, *Dryas iulia* Fabricius (Nymphalidae); también en siete especies de esfingidos, en varios taxones dentro de Haeterini y dentro de los géneros *Hamadryas* Hübner (Nymphalidae) y *Synneuria* Mabille (Geometridae) (Zahiri *et al.* 2006, Breuker *et al.* 2007, Mozaffarian *et al.* 2007, Oliveira 2008, Hernández *et al.* 2010, Benítez *et al.* 2011, Jorge *et al.* 2011, Obando 2011, Albutra *et al.* 2012, Garzón 2012, Jones *et al.* 2013, Sanzana *et al.* 2013, Berns 2014, Céspedes *et al.* 2014, Jeratthitikul *et al.* 2014, Khaghaninia *et al.* 2014, Ferreira *et al.* 2015, Torres *et al.* 2015). Por su parte, los resultados en relación al dimorfismo sexual en el tamaño del ala no son tan homogéneos; Benítez *et al.* (2011) y Jorge *et al.* (2011) no detectaron diferencias entre hembras y machos en el tamaño de las alas de *H. erato* y *Synneuria* sp., respectivamente.

Una de las aplicaciones más espectaculares de la MG es la visualización de las formas y la localización de los cambios que sufre entre individuos o grupos. En este contexto, Ferreira (2015) describió las diferencias en la forma de las alas entre sexos de siete especies de esfingidos; indicando que la forma del ala anterior de los machos tiende a ser más recta y larga con ápices triangulares, mientras que el ala posterior tiende a ser más amplia y corta; observándose un patrón opuesto en hembras. Este autor señala que la forma de las alas anteriores en machos está asociada a un vuelo rápido con poca capacidad de maniobra y la de las hembras con una alta maniobrabilidad y poca velocidad. El patrón opuesto en las alas posteriores de ambos sexos

podría ser una compensación que les confiere velocidad a las hembras y maniobrabilidad a los machos (Ferreira 2015). De manera similar Oliveira (2008) señaló que el ala de los machos de *Dryas iulia alcionea* tiene una forma aerodinámicamente diseñada para un vuelo rápido en línea recta, mientras que las hembras poseen alas diseñadas para el revoloteo.

TAXONOMÍA

Una de las necesidades primarias en entomología es la distinción de especies, especialmente de especies crípticas (Dujardin 2008). Muchas de las preguntas relacionadas con procesos de especiación y diversificación, manejo de poblaciones y conservación de especies dependen de una designación taxonómica precisa a nivel de especies (Knurek 2010, Barão *et al.* 2014). En muchos casos los caracteres morfológicos utilizados para la delimitación de especies, por sí solos, no son suficientes en ciertos grupos taxonómicos (Barão *et al.* 2014). En el caso de Lepidoptera, frecuentemente especies muy cercanas presentan caracteres morfológicos muy similares, haciendo difícil su identificación (Roggero & Passerin 2005, Mutanen *et al.* 2007, Knurek 2010, Barão *et al.* 2014).

Adicionalmente, puede existir una gran variación morfológica dentro de grupos de especies (Prieto *et al.* 2011) y los caracteres usados en las descripciones a veces son variables continuas que pueden representar clinas geográficas, y por tanto existir solapamiento en los valores de estos caracteres entre diferentes especies, lo que dificulta la distinción entre variaciones intra e interespecíficas (Barão *et al.* 2014). En este sentido, los trabajos de MG alar reflejan la capacidad de estas técnicas para caracterizar la variación morfológica y detectar evidencia sutil de especies biológicas que pueden causar problemas cuando sólo se toman en cuenta los caracteres tradicionalmente utilizados en la taxonomía de estos grupos.

Por ejemplo, la MG del contorno del ala permitió la validación de las especies *Heliozela resplendella* Stainton y *Heliozela hammoniella* Sorhagen (Heliozelidae), cuya taxonomía había sido inestable por un largo tiempo, llegando a ser consideradas una única especie (Mutanen *et al.* 2007). Las relaciones inferidas a partir de la variación en la forma del ala de poblaciones de *Tongeia fischeri* reflejaron su clasificación en subespecies, concordando estos resultados con estudios moleculares previos (Jeratthitikul *et al.* 2014). El poder discriminante de la MG también ha sido utilizado para establecer sinonimias entre especies controversiales; Barão *et al.* (2014) mediante un enfoque taxonómico integrativo en donde se incluyó MG de hitos discretos de las alas de *Philaethria pygmalion* Röber y *Phi-*

laethria wernickei Fruhstorfer (Nymphalidae) concluyeron que estas especies no pueden ser delimitadas y propusieron su sinonimia (Barão *et al.* 2014).

Roggero & Passerin (2005) cuantificaron la variación morfológica del ala de dos poblaciones del grupo “*Scythris obscurella*” (Scythrididae) (una en los Valles de Aosta y otra en los Alpes Marítimos, Francia), lográndose la separación de dos especies (Fig. 5). Este grupo comprende unas 10 especies, cuya apariencia uniforme dificulta la asignación de individuos a las diferentes especies que lo conforman, siendo el examen de los genitales el método más confiable para su identificación (Roggero & Passerin 2005).

Resulta interesante resaltar el hecho de que a partir del examen de los genitales, se determinó que todos los individuos de los Alpes Marítimos correspondían a *S. cuspidella*, mientras que en la muestra del Valle de Aosta la gran mayoría pertenecían a la especie *S. speyeri* y unos pocos a *S. cuspidella*. Estos últimos corresponden a los especímenes agrupados en el grupo de los Alpes Marítimos en la Figura 5, lo cual es indicativo de la confiabilidad del ala como carácter en la identificación de estas especies, siempre que se empleen herramientas capaces de capturar de manera precisa la variación en la forma, como es el caso de la MG.

La MG también ha resultado una herramienta promisoriosa en el manejo de plagas, donde una identificación correcta es primordial. Cañas-Hoyos *et al.* (2014) caracterizaron la variación en la conformación del ala, logrando la distinción de las razas de la plaga principal del maíz *Spodoptera frugiperda* Smith (Noctuidae) (raza del maíz y raza del arroz). Estas ya habían sido caracterizadas por medio de marcadores moleculares, no obstante no presentan

diferencias morfológicas evidentes. Según estos autores, la relevancia en su correcta identificación, radica en la observación de aislamiento reproductivo y diferencias en la susceptibilidad al control químico y biológico, lo que sugiere un proceso de especiación vía asociación planta-huésped. Por su parte, la MG de hitos discretos en el ala anterior del taladrador Europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (Crambidae), permitió una muy buena discriminación entre esta especie y otras tres especies con la cual es frecuentemente confundida en campo, pudiendo ser utilizados los datos de la clasificación en un software de identificación automatizada (Przybytowicz *et al.* 2015).

Otro grupo que ha recibido atención en relación a la cuantificación de la variación en la morfología del ala es la familia Sphingidae. Ferreira (2014) caracterizó los patrones de variación morfológica dentro de esta familia, encontrando que la conformación del ala posterior resulta un carácter excelente en la discriminación entre subfamilias y tribus. Por su parte, el contorno del ala de los esfingidos *Pseudosphinx tetrio* Linnaeus, *Agrius cingulata* Fabricius, *Cocytius duponchel* Poey, *Pachylia ficus* Linnaeus, *Manduca rustica* Fabricius y *Protambulix strigilis* Linnaeus también resultó ser excelente en la discriminación de estas especies (Chávez & Cruz 2015), aunque el número de individuos por especie incluidos en el análisis fue bastante bajo.

A pesar de la utilidad reflejada en los ejemplos anteriores, es importante resaltar que no existe un criterio riguroso para atribuir las diferencias observadas a un proceso de especiación o a un proceso adaptativo local que no involucra especiación. Según Dujardin (2008), si bien no existe un criterio métrico que marque la diferencia entre especies,

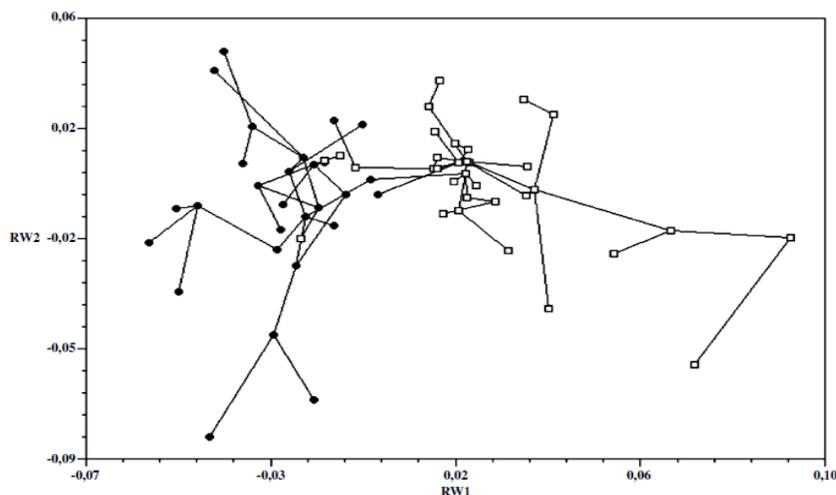


Figura 5. Resultado del análisis de componentes principales realizado sobre las variables de conformación del ala (Relative warps analysis) de dos poblaciones de *S. obscurella*. Círculos negros: población de los Alpes marítimos. Cuadros blancos: población de los Valles de Aosta (Roggero & Passerin 2005).

es importante considerar algunas ideas, ninguna de las cuales resulta completamente en la solución del problema.

Una de estas consideraciones es la magnitud de las diferencias; el grado de las diferencias interespecíficas es mucho mayor en relación a las diferencias intraespecíficas correspondientes, incluso de aquellas observadas en poblaciones a través de un rango geográfico amplio. Cuando existen diferencias consistentes, libres de efecto alométrico, es indicativo de que hay diferencias no atribuibles al tamaño, lo cual no es común en poblaciones de la misma especie, a menos que existan diferencias ecológicas importantes. Otro punto importante es la localización anatómica de las diferencias, aquellas diferencias ubicadas en regiones anatómicas que representen barreras mecánicas reproductivas, como en el caso de los genitales, tienen más significado evolutivo que cualquier otra. Finalmente, el hecho de que los grupos comparados sean simpátricos o alopátricos puede proveer información adicional.

Finalmente, otro uso que se le ha dado a la MG, aún menos extendido que los casos anteriores, es como herramienta auxiliar en la reconstrucción de la historia filogeográfica de varias especies. Mediante un enfoque que combina la MG con análisis moleculares se han descrito patrones filogeográficos complejos de las especies *Polyommatus celina* Austaut, *Polyommatus icarus* Rottemburg (Lycaenidae) (Dincă *et al.* 2011) y del complejo de especies *Zygaena transalpina* (Zygaenidae) (Von Reumont *et al.* 2011).

CONCLUSIONES

La MG resulta una herramienta sumamente eficiente, precisa y económica para la cuantificación de la variación morfológica, pudiendo detectar diferencias muy sutiles entre las formas bajo estudio, resultando de gran utilidad en las ciencias biológicas donde muchas de las preguntas están relacionadas con la forma.

A pesar del avance en el desarrollo de estas herramientas en los últimos años, en el caso de la morfología alar de Lepidoptera, el uso de estas aún no han adquirido popularidad en estudios taxonómicos, recibiendo una mayor atención el estudio de la variabilidad fenotípica asociada a diferentes factores, incluido el dimorfismo sexual.

El valor potencial de la MG del ala para abordar preguntas relacionadas con la taxonomía y ecología de lepidópteros se evidencia claramente en la bibliografía consultada.

REFERENCIAS

Adams D., J. Rohlf & D. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71: 5–16.

- Albutra Q. B., M. A. Torres & C. G. Demayo. 2012. Outline and landmark based geometric morphometric analysis in describing sexual dimorphism in wings of the white stem borer (*Schirpophaga innotata* Walker). *International Journal of Bioflux Society* 4: 5–13.
- Bai Y., L. Bin Ma, S. Xu & G. Wang. 2015. A geometric morphometric study of the wing shapes of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) from the Qinling Mountains and adjacent regions: An environmental and distance-based consideration. *Florida Entomologist* 98: 163–169.
- Barão K. R., G. L. Gonçalves, O. H. Mielke, M. R. Kronforst & G. R. Moreira. 2014. Species boundaries in *Philaethria* butterflies: an integrative taxonomic analysis based on genitalia ultrastructure, wing geometric morphometrics, DNA sequences, and amplified fragment length polymorphisms. *Zoological Journal of the Linnean Society* 170: 690–709.
- Benítez H. A. & L. E. Parra. 2011. Asimetría fluctuante: una herramienta morfo-funcional para medir estabilidad del desarrollo. *International Journal of Morphology* 29: 1459–1469.
- Benítez H. A., L. E. Parra, E. Sepúlveda & M. J. Sanzana. 2011. Geometrics perspectives of sexual dimorphisms in the wing shape of Lepidoptera: the case of *Synneuria* sp. (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of the Entomological Research Society* 13: 53–60.
- Benítez H. A. & T. A. Püschel. 2014. Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology* 32: 998–1008.
- Benítez H., H. Vargas & T. Püschel. 2015. Left-right asymmetry and morphological consequences of a host shift in the oligophagous neotropical moth *Macaria mirthae* (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Insect Conservation* 19: 589–598.
- Berezcki J., J. Toth, G. Sramko & Z. Varga. 2014. Multilevel studies on the two phenological forms for Large Blue (*Maculinea arion*) (Lepidoptera: Lycaenidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 52: 32–43.
- Berns A. 2014. A geometric morphometric analysis of wing shape variation in monarch butterflies *Danaus plexippus*. The University of Michigan. [Tesis de Maestría].
- Bookstein F. L. 1982. Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 451–70.
- Breuker C. J., P. M. Brakefield & M. Gibbs. 2007. The association between wing morphology and dispersal is sex-specific in the glanville fritillary butterfly *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 104: 445–452.
- Breuker C. J., M. Gibbs, S. Van Dongen, T. Merckx & H. Van Dyck. 2010. The use of geometric morphometrics in studying butterfly wings in an evolutionary ecological context. Pp.: 271–287. In: Elewa, A. M. T. (ed.). *Morphometrics for Non-morphometricians*. Springer Verlag.
- Calle D. A., M. L. Quiñones, H. F. Erazo & N. Jaramillo. 2008. Discriminación de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomédica* 28: 371–385.
- Cañas-Hoyos N., E. J. Márquez & C. I. Saldamando-Benjumea. 2014. Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

- Noctuidae) corn and rice strains from Central Colombia: a wing morphometric approach. *Annals of the Entomological Society of America* 107: 575–581.
- Céspedes A., C. M. Penz & P. J. De Vries. 2014. Cruising the rain forest floor: butterfly wing shape evolution and gliding in ground effect. *Journal of Animal Ecology* 84: 808–816.
- Chávez B. & D. Cruz. 2016. Valor taxonómico del ala en seis especies de esfingidos (Lepidoptera: Sphingidae). *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 4: 99–104.
- Dincă V., L. Dapporto & R. Vila. 2011. A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* common blue butterflies. *Molecular Ecology* 20: 3921–3935.
- Dujardin J. P. 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 875–890.
- Dujardin J. P. 2011. Modern morphometrics of medically important insects. Pp.: 473–501. In: Tibayrenc, M. (ed.). *Genetics and evolution on infectious disease*. Amsterdam: Elsevier.
- Dujardin J. P., D. Kaba, P. Solano, M. Dupraz, K. D. McCoy & N. Jaramillo-O. 2014. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies?. *Infection, Genetics and Evolution* 28: 704–714.
- Ferreira W. 2014. Padrões de variação morfológica nas asas de Sphingidae (Lepidoptera: Bombycoidea): efeitos alométricos, filogenéticos e dimorfismo sexual. Brasília: Universidad de Brasília, 67 pp. [Tesis de Maestría].
- Ferreira W., N. Ferreira, D. Vieira, A. Aires & I. Rezende. 2015. Sexual dimorphism and allometric effects associated with the wing shape of seven moth species of Sphingidae (Lepidoptera: Bombycoidea). *Journal of Insect Science* 15: 107–115.
- Garzón I. 2012. Phylogenetic relationships and character evolution of the Neotropical butterfly genus *Hamadryas* (Nymphalidae: Biblidinae). University of New Orleans, 111 pp. [Tesis de Doctorado].
- Gunz P. & P. Mitteroecker. 2013. Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Italian Journal of Zoology* 24: 103–109.
- Habel J. C., M. Reuter, C. Drees & J. Pfaender. 2012a. Does isolation affect phenotypic variability and fluctuating asymmetry in the endangered Red Apollo? *Journal of Insect Conservation* 16: 571–579.
- Habel J. C., J. O. Engler, D. Rödder & T. Schmitt. 2012b. Contrasting genetic and morphologic responses on recent population decline in two burnet moths (Lepidoptera, Zygaenidae). *Conservation Genetics* 13: 1293–1304.
- Hernández N., A. R. Barragán, S. Dupas, J. Silvain & O. Dangles. 2010. Wing shape variations in an invasive moth are related to sexual dimorphism and altitude. *Bulletin of Entomological Research* 100: 529–541.
- Hoffmann A., E. Collins E. & R. Woods. 2002. Wing shape and wing size as indicators of environmental stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparing shifts in means, variances, and asymmetries. *Environmental Entomology* 31: 965–971.
- Jones R. T., Y. Le Poul, A. C. Whibley, C. Mérot, R. H. French-Constant & M. Joron. 2013. Wing shape variation associated with mimicry in butterflies. *Evolution* 67: 2323–2334.
- Jorge L., P. Cordeiro-Estrela, L. B. Klaczko, G. R. Moreira & A. V. L. Freitas. 2011. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 765–774.
- Juhász E., Z. Végvári, J. P. Tóth, K. Pecsénye & Z. Varga. 2016. Climate-induced changes in the phenotypic plasticity of the Heath Fritillary *Melitaea atharia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 113: 104–112.
- Jeratthitikul E., M. Yago & T. Hikida. 2014. Sexual dimorphism and intraspecific variation in wing size and shape of *Tongeia fischeri* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Entomological Science* 17: 342–352.
- Khaghaninia S., S. A. Mohammadi, A. M. Sarafrazi, K. Iranine & R. Zahiri. 2011. Geometric morphometrics study on geographic dimorphism of codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera, Tortricidae) from North West of Iran. *Vestnik Zooloġii* 45: 20–28.
- Khaghaninia S., S. A. Mohammadi, A. M. Sarafrazi, K. Iranine, E. Ebrahimi & R. Zahiri. 2014. An analysis of seasonal dimorphism in codling moths, *Cydia pomonella*, from Iran using geometric morphometrics. *Bulletin of Insectology* 67: 43–50.
- Khiaban N. G. M. Z., K. H. Irani, M. S. Hejazi, S. A. Mohammadi & N. Sokhandan. 2010. A geometric morphometric study of the host populations of the Pod Borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in some parts of Iran. *Munis Entomology & Zoology* 5: 140–147.
- Klingenberg C. y G. S. McIntyre. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52: 1363–1375.
- Klingenberg C. P. 2015. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods and applications. *Symmetry* 7: 843–934.
- Knurek E. 2007. Taxonomic and population status of the Clayton's Cooper butterfly (*Lycaena dorcas claytoni*). The University of Maine. [Tesis de Maestría].
- Lawing A. M. & D. P. Polly. 2010. Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology* 280: 1–7.
- Marcus L. F. 1990. Traditional morphometrics. In: Rohlf, F. J. & F. L. Bookstein (eds.) Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. Ann Arbor, University of Michigan Museum of Zoology Special Publication 2.
- Mozaffarian F., A. Sarafrazi & G. Nouri. 2007a. Sexual dimorphism in the wing shape and size of the Carob Moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 26: 61–73.
- Mozaffarian F., A. Sarafrazi, G. Nouri & A. Ariana. 2007b. Morphological variation among Iranian populations of the Carob Moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller 1839) (Lepidoptera: Pyralidae). *Zoology in the Middle East* 41: 81–91.

- Mutanen N., J. Itämies & L. Kaila. 2007. *Heliozela resplendella* (Stainton, 1851) and *H. hammoniella* Sorhagen, 1885: two valid species distinguishable in the genitalia of both sexes and life histories (Heliozelidae). *Nota Lepidopterologica* 30: 79–92.
- Nath R. & D. Devi. 2009. Venation pattern and shape variation in wing of *Antheraea assamensis* (Lepidoptera: Saturniidae) of Assam, India. *International Journal of Tropical Insect Science* 29: 70–78.
- Obando V. 2011. Variabilidad morfológica de *Neoleucinodes elegantalis* (Gueneé): perforador de fruto de solanáceas de importancia económica. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. 80 pp. [Tesis de Maestría].
- Oliveira N. 2008. Variação sazonal de tamanho, morfometria e comportamento de acasalamento em *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) e suas implicações na evolução do dimorfismo sexual. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. [Tesis de Doctorado].
- Pecháček P., D. Stella, P. Keil & K. Kleisner. 2014. Environmental effects on the shape variation of male ultraviolet patterns in the Brimstone butterfly (*Gonepteryx rhamni*, Pieridae, Lepidoptera). *Naturwissenschaften* 101: 1055–1063.
- Prieto C., E. Micó & E. Galante. 2011. Molecules, wing pattern and distribution: an approach to species delimitation in the “*Ioxurina* group” (Lepidoptera: Lycaenidae: *Penaincisalia*). *Neotropical Entomology* 40: 553–559.
- Prudhomme J., C. Cassan, M. Hide, C. Toty, N. Rahola, B. Vergnes, J. P. Dujardin, B. Alten, D. Sereno & A. L. Bañuls. 2016. Ecology and morphological variations in wings of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae) in the region of Roquedur (Gard, France): a geometric morphometrics approach. *Parasites and Vectors* 9: 578–590.
- Pzrzybytowicz L., M. Pniak & A. Tofilski. 2015. Semiautomatic identification of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 109: 195–199.
- Roggero A. & P. Passerin. 2005. Geometric morphometric analysis of wings variation of two populations of *Scythris obscurella* species-group: geographic or interspecific differences? (Lepidoptera: Scythrididae). *SHILAP Revista de Lepidopterología* 130: 101–112.
- Sanzana M. J., L. E. Parra, E. Sepúlveda-Zúñiga & H. Benítez. 2013. Latitudinal gradient effect on the wing geometry of *Auca coctei* (Guerín) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 57: 411–416.
- Schachter-Broide, J., J. P. Dujardin, U. Kitron & R. E. Gürtler. 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from Northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *Journal of Medical Entomology* 41: 643–649.
- Slice D. 2007. Geometric morphometrics. *Annual Review of Anthropology* 36: 261–281.
- Soto I. M., V. P. Carreira, E. M. Soto & E. Hasson. 2008. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 598–609.
- Soto-Vivas A., J. Liria & E. De Luna. 2011. Morfometría geométrica y filogenia en Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoologica Mexicana* 27: 87–102.
- Swaddle J. P. 2003. Fluctuating asymmetry, animal behavior, and evolution. *Advances in the Study of Behavior* 32: 169–205.
- Toro B., G. Manriquez & I. Suazo. 2010. Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology* 28: 977–990.
- Torres M., M. A. Rodríguez, B. Lavandero & E. Fuentes-Contreras. 2015. Body mass and wing geometric morphology of the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) according to sex, location and host plant in the region of Maule, Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 42: 397–406.
- Von Reumont B., J. F. Struwe, J. Schwarzer & B. Misof. 2011. Phylogeography of the burnet moth *Zygaena transalpina* complex: molecular and morphometric differentiation suggests glacial refugia in Southern France, Western France and micro-refugia within the Alps. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 50: 38–50.
- Webster M. & D. Sheets. 2010. A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. Pp.: 163–168. In: *Quantitative methods in palaeobiology. Paleontological Society short course*. October 30th 2010.
- Zahiri R., A. Zarafrazi, L. Salehi & G. J. Kunkel. 2006. A geometric morphometric study on the populations of Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) in Northern Iran. *Zoology in the Middle East* 38: 70–84.
- Zelditch M. L., D. L. Swiderski, D. Sheets & W. L. Fink. 2012. *Geometric morphometrics for biologists. A Primer*. London: Elsevier, 443 pp.
- Zhong M., G. Hill, J. P. Gómez, D. Plotkin, J. R. Barber & A. Y. Kawahara. 2016. Quantifying wing shape and size of saturniid moths with geometric morphometrics. *Journal of the Lepidopterists' Society* 70: 99–107.