



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Discriminación de las subespecies de  
*Protographium epidaus* (Doubleday, 1846)  
(Lepidoptera: Papilionidae) mediante técnicas de  
morfometría geométrica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Eduardo Nuple Juárez



DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Omar Ávalos Hernández

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

**A mi madre Angélica Juárez Martínez, que gracias a ella aprendí a ser fuerte, a continuar cuando todo parece estar en contra y a esforzarme cada día más.**

**A mi padre †Benito Nuple Victoriano por enseñarme a ver el mundo desde diferentes perspectivas y tener curiosidad por todo lo que me rodea.**

# **AGRADECIMIENTOS**

**A mis hermanos Francisco, Erick y Yuly por apoyarme anímica y económicamente.**

**A mi novia Nancy Vianey, gracias por tantas aventuras que llevamos juntos, buenos y malos momentos en los que nos hemos apoyado.**

**A mis amigos Alejandro, Anayeli, Jessy y Blanca que han estado conmigo para hacer más ligero este viaje por la carrera.**

**Al M. en C. Moisés Armando Luis, por prestarme sus instalaciones para realizar mi tesis, por explicarme varias veces las dudas que tuve y por brindarme la confianza al estar en su cubículo.**

**Al Dr. Omar Ávalos y la M. en C. Marysol Trujano por sus explicaciones, consejos, pero sobre todo su gran paciencia en toda mi travesía del taller y la tesis.**

**Al M. en C. Uri Omar García Vázquez, a la M. en C. Cirene Gutiérrez Blando y al M. en C. Enrique González Soriano por su tiempo y sus comentarios para mejorar mi proyecto de tesis.**

**A los doctores Gerardo Vázquez Nin, Olga Echeverría y Luisa Escobar, a las maestras Silvia y Ernestina, además de mis amigos del Laboratorio de Microscopía electrónica de Transmisión. Gracias por su apoyo y aceptación en sus proyectos de trabajo.**

**A la Dra. Rosario Ortiz Hernández, por su apoyo académico y laboral, ya que siempre me apoyó más allá de sus posibilidades.**

**A la UNAM y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN-202415), por el apoyo como parte de mi proceso de titulación.**

## ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
3	ANTECEDENTES	6
4	OBJETIVOS	14
5	MÉTODOS	14
6	RESULTADOS	22
7	DISCUSIÓN	35
8	PERSPECTIVAS	38
9	CONCLUSIÓN	39
10	LITERATURA CITADA	40
11	ANEXO	50

## LISTA DE FIGURAS

1	Mapa de distribución de las tres subespecies de <i>Protographium epidaus</i> en México	7
2	<i>P. epidaus epidaus</i> macho de Catemaco, Veracruz.	8
3	<i>P. epidaus tepicus</i> macho de Mazatlán, Sinaloa.	9
4	<i>P. epidaus fenochionis</i> macho de Cintalapa, Chiapas.	10
5	Plantillas de captura de marcas.	17
6	Modelos de distribución geográfica y distribución morfológica de las poblaciones	21
7	Variación de la forma del ala anterior en un PCA	22
8	Variación de la forma del ala posterior en un PCA.	23
9	Variación de la forma del ocelo en un PCA.	23
10	Gradilla de deformación del ala anterior.	25
11	Gradilla de deformación del ala posterior.	26
12	Gradilla de deformación del ocelo.	27
13	Variación de la forma a partir de las dos primeras variables canónicas del ala posterior	28
14	Variación de la forma a partir de las dos primeras variables canónicas del ala posterior	29
15	Variación de la forma a partir de las dos primeras variables canónicas del ocelo	29
16	Puntos de distribución de los ejemplares utilizados en los análisis, clasificados <i>a priori</i> .	32
17	Distribución de las tres subespecies a partir de los ejemplares reclasificados	32

## RESUMEN

El concepto de subespecie fue desarrollado para ordenar la variación geográfica por debajo del nivel de especie, la cual tiene su aplicación y contenido teórico dentro del concepto biológico de especie de Mayr. Las subespecies se caracterizan por ser conjuntos de poblaciones con una congruencia entre la distribución geográfica y un carácter reconocible, independiente a otros conjuntos de la especie. Los caracteres morfológicos utilizados para reconocer a las subespecies en mariposas son el patrón de bandeo y la coloración de las alas, sin embargo, no siempre se cuantifica la variación, lo que conlleva a descripciones precipitadas. Las subespecies de *Protographium epidaus* no están bien definidas, debido a que no se ha corroborado si existe un aislamiento geográfico o zonas de contacto entre estas, así como una forma independiente relacionada a un área de distribución particular. Se discriminó a las subespecies de *Protographium epidaus* a partir de un análisis morfométrico de los patrones de coloración alar y de distribución geográfica. La diferencia en las formas de las tres subespecies de *P. epidaus* radica en un cambio del grosor y del largo de las bandas del ala anterior y posterior. La relación entre los resultados del análisis discriminante, análisis de componentes principales y la prueba de Mantel, reconoce un solapamiento entre la distribución geográfica de las subespecies *P. e. fenochionis* y *P. e. tepicus*, además de no presentar una forma particular en cada subespecie, por lo que esta última, no se sustenta como subespecie. Por ello, se consideran como subespecies válidas a *P. e. epidaus* presente en el Atlántico y a *P. e. fenochionis* presente en el Pacífico, mientras que *P. e. tepicus* se considera como una forma extrema de *P. e. fenochionis*, de las cuales, algunas son más similares a *P. e. epidaus*.

## INTRODUCCIÓN

El concepto de subespecie fue desarrollado para ordenar la variación geográfica por debajo del nivel de especie, la especiación y para refinar la distinción taxonómica con un enfoque evolutivo. En el siglo XX se definió a una subespecie, o raza geográfica, como "una subdivisión geográfica de una especie, que difiere taxonómica y genéticamente de otras subdivisiones de la especie" (Mayr, 1982). Sin embargo, el concepto ha variado al considerar a las subespecies como poblaciones que representan linajes parcialmente aislados y a subdivisiones ecológicas (Rothschild y Jordan, 1895; Monroe, 1982; Zink, 2004; Mallet, 2007; Braby *et al.*, 2012).

La identificación de las subespecies se complicó con la modificación y diversificación del concepto de especie, ya que dependiendo del concepto que se utilice, las subespecies son válidas o no. El concepto de subespecie presenta similitudes prácticas con el Concepto Evolutivo de Especie (CEE) (Wiley, 1978), el Concepto Filogenético de Especie (CFE) (Cracraft, 1983) y el Concepto de Linaje General de Especie (CLGE) (de Queiroz, 1998). Esto se debe a que en los tres conceptos se reconoce a las especies como linajes y se ha interpretado que, al considerar a las subespecies como especies incipientes, también reconocen linajes. Además el CFE reconoce a las especies a partir de un carácter fijo diagnosticable, lo que es un criterio para reconocer a las subespecies, además de su distribución independiente a otras subespecies. Por otro lado, las subespecies tienen su aplicación y contenido teórico dentro del concepto biológico de especie (CBE) de Mayr (1982), en el que una especie se reconoce como poblaciones que se reproducen o tienen el potencial de poder reproducirse entre ellas. Por lo que las subespecies sí se pueden reproducir entre ellas pero presentan cambios a nivel poblacional, en su mayoría morfológicos, que indican adaptaciones locales y se infiere tienen una base genética. Dado que el concepto de subespecie surgió bajo los preceptos teóricos del CBE de Mayr (1982), es este el que se aplicará en este trabajo.

Existen problemas con el reconocimiento de las subespecies al intentar describir el proceso por el cual se ha originado la variación intraespecífica (Mayr, 1982; Vane, 2003; Manier, 2004). Las poblaciones morfológicamente distintas se han clasificado como subespecies de acuerdo con dos criterios: el aislamiento geográfico (alopátridas), con lo que las poblaciones aisladas acumulan variaciones y se pueden agrupar a partir de una barrera geográfica (Wilson y Brown, 1953; Mayr, 1982; O'Brien y Mayr, 1991; Moritz, 2002), y el aislamiento ecológico (parapátridas), con subconjuntos poblacionales formados por presiones ambientales, distribuidos de forma continua dentro de la distribución total de la especie, las cuales son capaces de cruzarse en zonas de contacto (Braby *et al.*, 2012). De esta forma, la descripción de subespecies se vuelve subjetiva al no explicar los criterios necesarios para separar los subconjuntos parapátridos. Por último, en el caso de las subespecies reconocidas como razas geográficas, en su mayoría carece de un buen muestreo, lo que ocasiona descripciones de nuevas subespecies a partir de pocos ejemplares, desconocimiento del total de su distribución y con base en variaciones individuales (Mayr, 1982).

Los caracteres morfológicos utilizados para reconocer a las subespecies en mariposas, en aquellos grupos que se asume una distribución aislada, son el patrón de bandeo y la coloración de las alas, en particular en los machos (Llorente, 1986; Llorente, 1988; Llorente *et al.* 1992; Acosta, 2008; Dottax, 2011; Hernández *et al.* 2012; Yakovlev, 2012). En otros casos se consideran datos morfométricos de los genitales masculinos (Constantino *et al.*, 2012). Trabajos recientes conjuntan las diferencias morfológicas de las alas con las áreas de distribución y diferencias ecológicas (Vargas *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios no realizan un estudio estadístico para cuantificar el porcentaje de diferencia entre las subespecies, solamente se basan en la propuesta por Amadon (1949), en el que por lo menos el 75% de una subespecie presenta una forma independiente del resto de las subespecies. En el 2008, Tofilski comienza a utilizar la morfometría geométrica (Bookstein, 1997) para la identificación de subespecies en poblaciones de *Apis mellifera*. Estas técnicas permiten el uso de estadísticos multivariados y la visualización directa de la forma al separar los efectos del tamaño, además de utilizar puntos homólogos para una



evaluación y descripción más completas en las diferencias de las formas (Adams *et al.*, 2004). Actualmente se ha ampliado el uso de métodos y disciplinas múltiples para distinguir subespecies, como la morfometría tradicional, la morfometría geométrica, la biogeografía y la filogeografía, en grupos como mariposas, serpientes, aves y mamíferos (Manier, 2004; Mulcahy, 2008; Miguel *et al.*, 2010; Sanzana *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015; Chazot *et al.*, 2016).

Se han propuesto diferentes soluciones ante la problemática del concepto de subespecies. Una opción es que el concepto sea abandonado debido a que no se reconoce como un taxón natural, al tener una identificación arbitraria, subjetiva y con base en muy pocos caracteres (Wilson y Brown, 1953). Otra opción plantea el desuso de subespecies parapátridas, debido a problemas como la determinación del patrón de variación clinal, la falta de límites claros, la falta de estados de carácter únicos y que las poblaciones con frecuencia reflejan diferentes componentes de la diversidad genética (Mayr, 1982; Braby *et al.*, 2012). Sin embargo, la necesidad de ordenar la variación infraespecífica requiere el uso de esta categoría y métodos de delimitación.

La importancia actual que tienen las subespecies es su uso en la conservación de la biodiversidad (Mainer, 2004; Zink, 2004), debido a su reconocimiento y aceptación como unidades apropiadas de conservación para especies amenazadas (Mulcahy, 2008; Braby *et al.*, 2012); por ello, es importante poder reconocerlas y delimitarlas. El uso de las subespecies es recomendado por varios biólogos evolutivos y de la conservación en grupos como mamíferos, aves, reptiles e insectos (Gavin *et al.* 1999; Pasquet 1999; Haig *et al.* 2004; Funk *et al.*, 2007; Braby *et al.*, 2012), a pesar de las limitaciones y su mala identificación (Mayr, 1982; Montanucci, 1992; Manier, 2004; Zink 2004).

*Protographium epidaus* (Doubleday, 1846) pertenece a la familia Papilionidae y presenta tres subespecies: *P. epidaus epidaus* (Doubleday, 1846), *P. epidaus fenochionis* (Godman y Salvin, 1868) y *P. epidaus tepicus* (Rotschild y Jordan, 1906). La determinación de los ejemplares de *P. epidaus* a nivel de subespecie es complicada y frecuentemente se basa

solo en la ubicación geográfica de recolecta del ejemplar. Esto ocasiona que existan diferentes patrones de coloración en una misma subespecie, como ocurre en *P. e. tepicus*, es decir, no hay una forma tipo clara para cada subespecie y no hay estudios que corroboren la validez de las subespecies de este taxón. Por lo tanto, es importante realizar estudios en los que se evalúe la correlación entre la distribución geográfica con la estructura de la forma.

La distribución de las subespecies de *P. epidaus* no está definida, debido a que no se ha corroborado si existe aislamiento geográfico o zonas de contacto entre estas. En un inicio se describió a *P. e. tepicus* restringida al estado de Jalisco, en la región de Nueva Galicia, lo que la separaba de *P. e. fenochionis*, que se describió en los estados de Guerrero y Oaxaca. Estas dos subespecies estarían separadas por la Depresión del Balsas. Posteriormente se amplió la distribución de *P. e. tepicus* a los estados de Colima, Michoacán, Morelos, Nayarit y Sinaloa (Llorente *et al.*, 1997). Con la ampliación de su distribución surgió confusión con la determinación o incluso la existencia de las subespecies *P. e. fenochionis* y *P. e. tepicus*, ya que se ha reportado la presencia de ambas subespecies en regiones solapadas. Además de que no se ha probado la presencia de la barrera geográfica en la depresión del Balsas, lo que apoyaría la hipótesis de que son subespecies independientes.

Por ello se busca, en primer lugar, caracterizar los patrones alares de las tres subespecies de *P. epidaus* mediante técnicas de morfometría geométrica, para posteriormente discriminar y validar estas subespecies con base en sus diferencias fenotípicas y la congruencia de éstas con la distribución geográfica.

## Antecedentes

### Modelo de estudio: *Protographium epidaus*

*Protographium epidaus* se ubica dentro de la familia Papilionidae, subfamilia Papilioninae, tribu Leptocircini (Vargas-Fernández *et al.*, 2016). La especie se identifica por presentar antenas negras, ocasionalmente café en el ápice de los flagelómeros; escamas negras en la cabeza y tórax, la tibia y tarso son de color verde pálido; las espuelas media y posterior de la tibia son amplias y casi tan largas como la tibia, una es interna y otra externa. En el ala anterior, las escamas negras son dentadas, hacia los márgenes se vuelven más angostas; las escamas blancas son estrechas, curvadas y separadas entre ellas, lo que da una apariencia al ala de ser transparente, mientras que en la parte anterior del ala son más abundantes; presenta una banda transparente entre el margen distal y la celda discal con escamas negras, más abundantes que en la banda homóloga postdiscal de *Protographium agesilaus*, además de presentar una mancha costal blanca; también todas las bandas son más delgadas en comparación con *P. agesilaus*, la banda cuatro y seis son vestigiales, mientras que la banda cinco se extiende desde la vena cubital 2 o el borde del margen.

Su distribución abarca desde las costas de México hasta el noroeste de Costa Rica (Doubleday, 1846; Llorente *et al.*, 1997). En etapa larvaria se alimenta de especies de los géneros *Annona* (Linneaus, 1753) y *Rollinia* (Saint-Hilaire, 1825) (Annonaceae), donde destacan los frutos de plantas cultivadas de *A. cherimola* (chirimoya) (Hamilton *et al.*, 1994). Con la distribución conocida en México, según la identificación de los ejemplares de la colección del MZFC (Fig. 1), se separa a la especie en tres subespecies: (1) *P. epidaus epidaus* en la vertiente del Atlántico, donde la barrera geográfica de la Sierra Madre del Sur la separa casi totalmente del resto, con zonas de contacto en Chiapas y Guerrero, (2) *P. epidaus fenoehionis* en la vertiente sur del Pacífico y (3) *P. epidaus tepicus* en la vertiente norte del Pacífico, separadas por la barrera geográfica formada por la cuenca del Balsas y con una zona de contacto al noroeste de Michoacán.

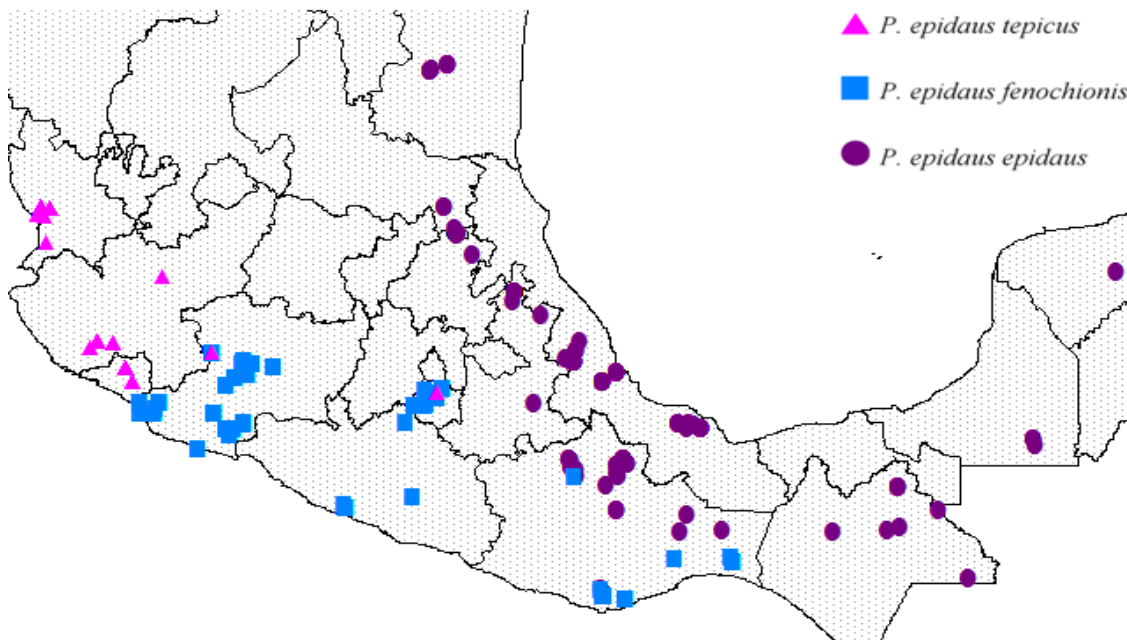


Figura 1. Mapa de distribución de las tres subespecies de *Protographium epidaus* en México. Datos obtenidos de la Colección del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM (MZFC-M)

Las diferencias morfológicas con los que se reconocen las subespecies son los patrones de coloración alar propuestos por Rothschild y Jordan en 1906, con diferencias en el grosor y largo de las bandas, las tonalidades del color de las alas, los cuales van de blancas, amarillas a verdes. Las tonalidades de coloración no se consideraron en este trabajo debido a que no hay categorías claras en la identificación de esta característica, lo que la hace difícil de comparar e interpretar.

#### *Protographium epidaus epidaus*

Diagnosis: Segunda banda del ala anterior es la mitad de gruesa o menor del ancho del espacio intermedio entre ésta y la tercera banda; la quinta banda no se une a la banda marginal, termina en la vena  $M_2$  o no llega a tocarla. Tercera banda del ala anterior es vestigial o puede llegar más allá de la celda discal. En el ala posterior, la mancha roja anal está bordeada con blanco en la parte anterior; la banda negra distal no es mayor a la

distancia entre SC+R<sub>1</sub> y RS, ni del tamaño de la media luna submarginal blanco-verdoso (Fig. 2).

Hábitat: Habita en el bosque de coníferas, bosque mesófilo de montaña, bosque tropical caducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, selva alta perennifolia y selva media subperennifolia.

Distribución: México: Campeche, Chiapas, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán; Guatemala; Honduras; Nicaragua (Figura 1).

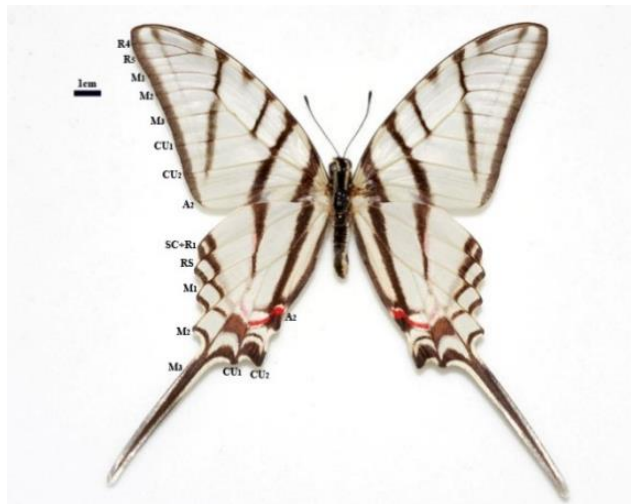


Figura 2. *P. e. epidaus* macho de Catemaco, Veracruz. Fuente: <http://www.butterfliesofamerica.com>

#### *Protographium epidaus tepicus*

Diagnosis: Primera y segunda banda del ala anterior, más ancha que en *P. e. epidaus*, quinta banda continúa hasta banda marginal, forma un ángulo con el margen del ala. Ala posterior más larga y estrecha de manera anterior que en *P. e. epidaus*, la segunda banda es amplia en el margen costal y se adelgaza hacia el margen anal más allá de la celda discal a diferencia de *P. e. epidaus*; la banda sub basal es más delgada que el espacio de la celda

discal. Borde blanco de la mancha roja es más delgado; banda negra entre RS y M<sub>1</sub> es largo, manchas submarginales blanco verdosas más largas que en *P. e. epidaus* (Fig. 3).

Hábitat: Se encuentra en el bosque mesófilo de montaña, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, selva alta o media subcaducifolia y subperenifolia, selva baja caducifolia.

Distribución: Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit y Sinaloa (Fig. 1).

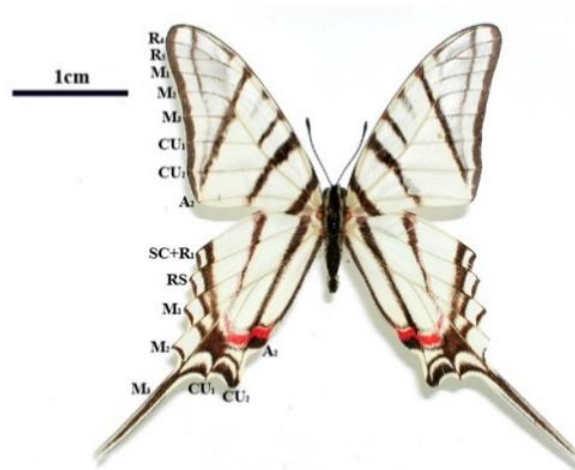


Figura 3. *P. e. tepicus* macho de Mazatlán, Sinaloa. Fuente: <http://www.butterfliesofamerica.com>

#### *Protographium epidaus fenochionis*

Quinta banda del ala anterior se extiende a banda marginal. Primer y segunda banda de ala posterior, amplias arriba y abajo; la banda media siempre llega hasta zona distal negra, más prolongada que en las otras subespecies: mancha roja anal sin borde blanco en porción anterior o con un borde muy pequeño, las manchas rojas son más largas que otras subespecies (Fig. 4).

Hábitat: Se distribuye en el bosque mesófilo de montaña, bosque tropical perenifolio, bosque tropical subcaducifolio, selva baja caducifolia.

Distribución: Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos y Oaxaca (Fig. 1).

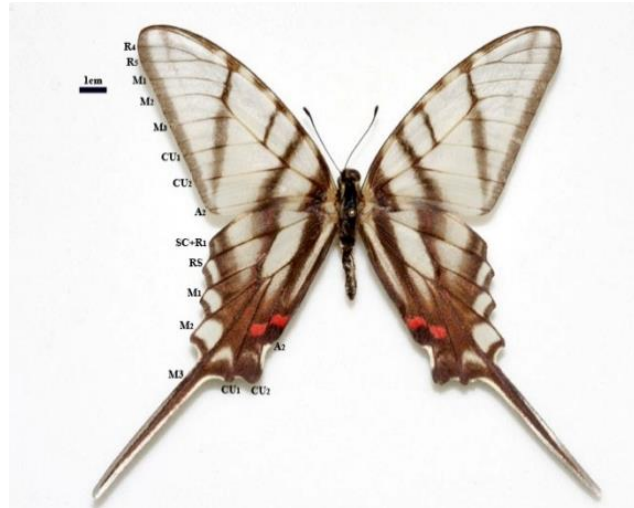


Figura 4. *P. e. fenochionis* macho de Cintalapa, Chiapas. Fuente: <http://www.butterfliesofamerica.com>

### Morfometría geométrica

La morfometría geométrica es una herramienta para analizar la forma particular de un grupo o comparar entre grupos (Marcus, 1990). En la morfometría tradicional se utilizan mediciones de distancia lineal, enumeraciones, radios y ángulos (Adams *et al.*, 2004), mientras que la morfometría geométrica analiza la forma, independientemente de aquellos componentes que no definen la geometría intrínseca del objeto, con lo que captura la geometría de las estructuras morfológicas de interés y conserva esta información a través de los análisis, esto se conoce como “forma pura” (Kendall, 1977). Además es una herramienta fácil y práctica para aplicarla con los insectos, al permitir utilizar las características de las alas, debido a su facilidad de manejo respecto a otras partes del cuerpo y una identificación precisa de puntos homólogos basados en la venación alar (dos Reis *et al.*, 2002; Manier, 2004; Tofilski, 2008; Kitthawee y Rungsri, 2011).

Los métodos de morfometría geométrica basados en marcas (o *landmarks* en inglés), es una manera de capturar la geometría de la estructura, los cuales corresponden a un conjunto de marcas representativas de una forma. Comienzan con la obtención de coordenadas bi o

tridimensionales de marcas biológicamente definibles, que son las que describen su posición en el espacio (Bookstein, 1997). Posteriormente, se realizan distintos métodos de análisis que básicamente siguen tres pasos: la obtención de los datos, la obtención de la información que describe la forma pura y análisis exploratorios y confirmatorios de covariación de la forma con factores causales (Toro-Ibacache *et al.*, 2010).

Para la definición adecuada de un conjunto de marcas o mapa de homologías, la selección de marcas idealmente debe hacerse bajo los siguientes criterios (Bookstein, 1997; Zelditch *et al.* 2004):

- **Homología:** son estructuras cuyas semejanzas son el resultado de haber sido derivadas a partir de una estructura ancestral común (Gilbert, 2003). Se requiere además que las marcas sean discretas, es decir, deben ser claramente diferenciables de las estructuras que lo rodean. Estas características permiten que cualquier interpretación de la variación observada pueda tener sentido biológico.
- **Consistencia en la posición relativa:** las formas en estudio no deben diferir radicalmente en la posición de las marcas, que ocurre en casos donde puede existir superposición, transposición o bien desaparición de marcas, lo que altera por completo la configuración y genera problemas con el álgebra del análisis.
- **Cobertura adecuada de la forma:** las marcas deben “recrear” la forma en estudio. Una cantidad insuficiente de marcas puede llevar a la pérdida de información valiosa, mientras que una cantidad exagerada de marcas lleva a resultados estadísticamente poco confiables si el tamaño de la muestra es insuficiente. El tamaño de la muestra empíricamente debiera ser tres (Monteiro *et al.*, 2002) o cuatro veces la cantidad de marcas (Bookstein, 1996).
- **Repetibilidad:** a fin de evitar un efecto significativo del error del observador, es importante que la marca sea de fácil localización y que esté lo más claramente



definida. Si sólo un punto o un subconjunto de puntos cercanos del mapa de homologías tiene un problema relacionado con su repetibilidad los resultados finales estarán afectados por error sesgado.

- **Coplanaridad:** el análisis y colocación de marcas tiene que ser en fotografías del mismo plano y posición.

El criterio de homología se encuentra altamente relacionado con las características anatómicas, funcionales y evolutivas de la estructura donde se situará una marca. La tipología de las marcas se basa tanto en la localización definida de los puntos, como en la explicación que pueden entregar respecto a un fenómeno morfológico (Bookstein, 1997; Zelditch *et al.* 2004). Por lo cual, las marcas se pueden clasificar en:

- **Marcas tipo 1:** Las cuales corresponden a marcas localizadas en la intersección de tres estructuras, centros de estructuras muy pequeñas o intersecciones de curvas. Este tipo de marca permite observar de manera más precisa el efecto de procesos biológicos como el crecimiento, ya que la marca va a cambiar su posición de acuerdo a lo que esté sucediendo en cualquier parte alrededor de él, debido a que siempre va a estar rodeado de tejidos. Es el tipo de marca que debiera predominar al diseñar un mapa de homologías. Un ejemplo de estas marcas son las intersecciones de las venas alares de los insectos.
- **Marcas tipo 2:** corresponden a marcas ubicadas en curvaturas máximas, donde existe aplicación de fuerzas biomecánicas como las cúspides de los molares o la parte más prominente de una tuberosidad donde se inserta algún músculo. El ápice del ala de los insectos representa una marca de este tipo.
- **Marcas tipo 3:** corresponden a marcas extremas cuya definición está dada por estructuras distantes. Gran parte de las marcas usadas en morfometría tradicional corresponden a este tipo: diámetros, largos máximos y algunos constructos

geométricos. Este tipo de marca se asocia comúnmente al tamaño, por lo que la información referente a la forma pura del organismo es bastante escasa. Su presencia en un mapa de homologías debe ser bien explicada y considerada en el momento de interpretar los resultados.

- **Pseudo-marcas:** corresponden a constructos definidos por términos matemáticos y anatómicos, como puntos tangentes a una curva. Dependiendo de las estructuras y relaciones que describen una pseudomarca, puede equivaler a una marca tipo 3.
  
- **Semi-marcas:** corresponden a puntos localizados en una curva de acuerdo a la posición de otras marcas o estructuras, y que pueden desplazarse levemente en ella (Bookstein, 1997). Como las marcas tipo 3 y pseudo-marcas, la información que puede obtenerse de ellos es menor, y debe considerarse como parte de un todo. Se utilizan para el análisis de formas carentes de marcas homólogas.

## **OBJETIVOS**

### **General:**

- Evaluar la posible congruencia entre la variación del patrón alar y la distribución geográfica de *Protographium epidaus*, para probar la existencia de subespecies de este taxón.

### **Particulares:**

- Identificar los caracteres del patrón de coloración alar diagnóstico de las subespecies reconocidas.
- Actualizar la distribución geográfica de cada subespecie a partir de su forma promedio.
- Cuantificar la variación del patrón de coloración alar de cada subespecie mediante morfometría geométrica.
- Determinar la congruencia entre las subespecies reconocidas, la variación morfológica y la distribución geográfica.

## **HIPÓTESIS:**

Si existen tres subespecies de *Protographium epidaus* registradas en la literatura, las cuales son reconocibles por los patrones de coloración alar y cada una se distribuye en un área geográfica independiente, entonces en un análisis cuantitativo de la forma alar, las subespecies reconocidas formarán grupos discretos y estos grupos tendrán congruencia con la distribución geográfica.

## **MÉTODO:**

### *Material revisado*

Se revisaron 269 ejemplares de *P. epidaus* disponibles en la Colección del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM (MZFC). Para el análisis de morfometría se seleccionaron 158 ejemplares, de los cuales 48 son *P. e. epidaus*, 78 *P. e. fenochionis* y 32 *P. e. tepicus* (Anexo 1). Todos los ejemplares presentaron al menos un ala completa totalmente extendida. Se utilizó el ala izquierda para estandarizar el estudio, pero en tres casos fue necesario utilizar el ala derecha, ya que solo presentaba esta ala completa, así que

se invirtió la imagen con el programa PhotoshopCS5 (Adobe, 2010) para editar la imagen. Se consideró todo el rango de distribución geográfica de cada subespecie para tomar la muestra. Se realizó un sexado de los ejemplares de manera visual con el extremo del abdomen, para saber si presentan dimorfismo sexual; al no identificarse diferencias evidentes entre los sexos en las características a utilizar, se trató a ambos sexos de forma indistinta. La clasificación anterior al análisis de los ejemplares de la colección se hizo por los expertos del grupo, esto con base en las descripciones de las subespecies de Rothschild y Jordan (1906) y su distribución geográfica mostrada en Llorente-Bousquets *et al.* (1997).

#### *Análisis de morfometría*

Se tomaron fotografías de la parte dorsal de los individuos de cada subespecie a 55cm de distancia entre cada ejemplar y la cámara, con una cámara digital Nikon D700 con una lente de 105mm y se utilizó un flash macro Speedotron. En cada imagen se agregó una escala milimétrica.

Se analizaron tres partes del ala de forma independiente con el fin de disminuir la variación ocasionada en la forma del montaje en cada mariposa: ala anterior, ala posterior y ocelo. Para describir los patrones alares, se utilizaron marcas, que son puntos anatómicos homólogos, y semimarcas, que son puntos que se utilizan para describir un contorno (Cuadro 1). Para colocar las marcas se consideraron los caracteres utilizados en la descripción original de Rothschild y Jordan (1906) y puntos homólogos fácilmente distinguibles. Se utilizaron nueve marcas en el ala anterior, 16 marcas en el ala posterior y ocho semimarcas en el ocelo (Fig. 5).

Cuadro 1. Ubicación de marcas y semimarcas en las tres subespecies.

Grupo de caracteres	Tipo de marca	Número de marca	Posición anatómica
Ala anterior	Tipo 1	1	Inserción del ala
		2	Extremo vena Sc
		3 y 4	Grosor de la banda 2 sobre celda discal
		5 y 6	Grosor de la banda 3 sobre celda discal
Ala anterior	Tipo 1	7 y 8	Largo de la banda 5
		9	Extremo de la vena A <sub>2</sub>
Ala posterior	Tipo 1	1	Inserción del ala
		2	Extremo de vena Sc+R <sub>1</sub>
		3	Extremo de vena Cu <sub>1</sub>
		4 y 5	Ancho de la banda dos sobre vena Sc+R <sub>1</sub>
		6 y 7	Ancho de banda dos sobre vena M <sub>1</sub>
		8	Largo de banda dos
		9 y 10	Borde anterior de la banda submarginal entre venas M <sub>2</sub> y Cu <sub>1</sub>
11-16	Grosor de la lúnula y grosor de la banda submarginal entre M <sub>1</sub> y M <sub>2</sub>		
Ocelo	Semimarcas	1-8	Borde blanco sobre mancha anal roja

Para el ocelo las semimarcas se localizan en el grosor del borde blanco de la parte anterior de las manchas anales rojas (Fig. 5C). Las marcas se digitalizaron con el programa tpsDig2 (Rohlf, 2004) para describir la variación de la forma. Para el uso de semimarcas, se utilizó previamente el programa MakeFan6 (Sheets, 2002) con el que se colocó un círculo de 16 líneas en el ocelo para describir el contorno. Para el nombre de las venas y regiones de las alas, se utilizó la descripción hecha por Howe en 1975 (Fig. 2-4).

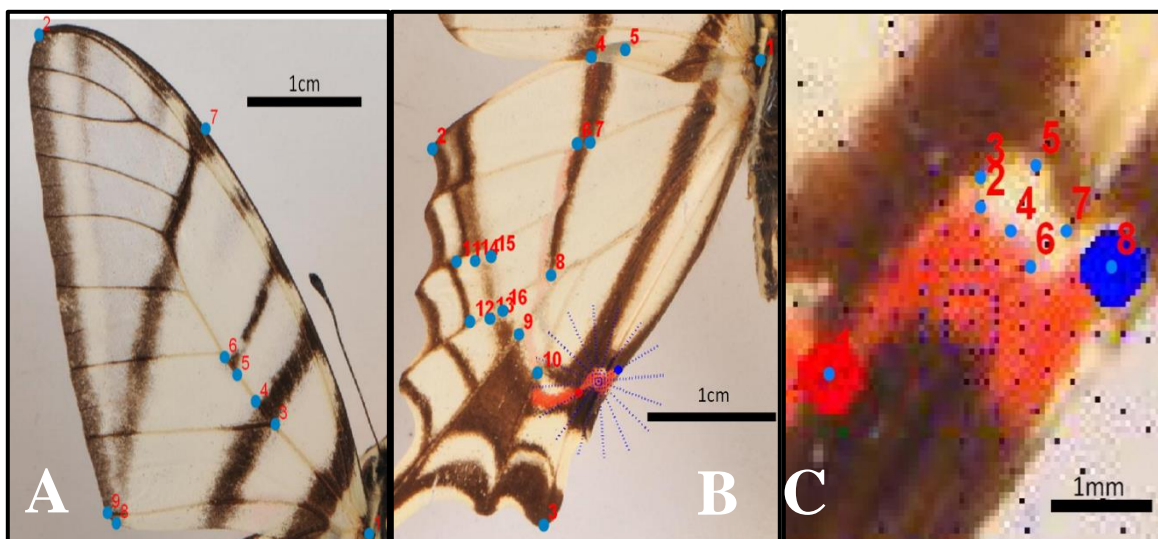


Figura 5. Plantillas de captura de marcas. A) ala anterior vista dorsal, B) ala posterior vista dorsal y C) ocelo en el ala posterior

#### *Análisis estadístico*

Para sobreponer las marcas y eliminar la información de tamaño, rotación y posición original de las coordenadas cartesianas, se ingresaron al programa CoordGen (Sheets, 2002). Se empleó el método generalizado ortogonal de Procrustes (Torcida y Pérez, 2012) para su superposición procrustes y obtención de una matriz con las variables de deformación (*partial warps*), que se utilizó para realizar los análisis de componentes principales (PCA), análisis de variables canónicas (CVA) y análisis discriminante. El PCA se realizó con el programa PCAGen (Sheets, 2002), para calcular las deformaciones relativas respecto a la configuración consenso (*relative warps*), también se realizó un diagrama a partir de los PCA scores para conocer si hay un solapamiento en la forma de las subespecies. El CVA se realizó con el programa CVAGen (Sheets, 2002) para maximizar las diferencias en la forma de los organismos de cada subespecie y se graficaron con los CVA scores. Por último, el análisis discriminante se realizó con el programa Statistica (Statsoft, 2010) para ver cómo y cuáles individuos, a partir del grupo *a priori* en que se clasificaron por su distribución geográfica asumida, se reclasifican en un grupo *a posteriori* a partir de la matriz de clasificación, con la forma promedio de cada grupo. Si las

subespecies son unidades diferenciadas por su fenotipo entonces en el análisis se observarán tres grupos bien definidos, cada uno con una forma promedio. Por otro lado si se encuentra que hay un solapamiento en la distribución de la forma de los individuos, entonces las muestras de estas subespecies no son distinguibles por su morfología, con estos caracteres utilizados.

Para determinar si las diferencias en la forma de las subespecies eran significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (Statsoft, 2010) con el programa Statistica (Statsoft, 2010) a partir de los *partial warps* de la primera variable canónica (VC) del CVA. Esto debido a que los datos no cumplen con los supuestos de normalidad y por lo menos una subespecie presenta poco muestreo. Un resultado significativo con el análisis *post hoc* entre uno o más grupos, indica que dichos grupos se pueden reconocer por el conjunto de caracteres analizados. Sí existen diferencias morfológicas, entonces existe la posibilidad de que sean dos subespecies. Si estos patrones morfológicos son congruentes con la distribución geográfica, entonces pueden proponerse la existencia de subespecies.

Para conocer si la distancia en el espacio morfológico está correlacionada con la distancia geográfica, se realizaron dos análisis de Mantel (Mantel, 1967) con el programa R (R Core Team, 2016) con el paquete “vegan” (Jari *et al.*, 2016). El primer análisis se realizó dentro de cada subespecie, se probó la correlación entre la distancia en el espacio morfológico y la distancia geográfica dentro del mismo grupo. Para cada par de ejemplares se calculó la distancia geográfica con la hipotenusa entre el par de coordenadas geográficas, así como la distancia morfológica a partir de las coordenadas en los ejes de las variables canónicas medida como la distancia de Mahalanobis (Cuadras, 1989). Una correlación significativa indica que hay un gradiente geográfico en la forma en ese grupo, es decir, los extremos morfológicos están en los extremos geográficos, los cuales podrían ser la zona de contacto con otra subespecie. Los ejemplares en la zona de contacto pueden ser los más similares o los más distintos ala subespecie contigua. Por otro lado, una correlación no significativa nos dice que este grupo no presenta un patrón espacial en la forma, por lo que los ejemplares más cercanos a la zona de contacto pueden ser o no similares al grupo vecino.

Para probar la existencia de congruencia de la forma y el espacio geográfico entre dos supuestas subespecies, se realizó un segundo análisis de Mantel (Mantel, 1967) que comparó a dos subespecies entre sí. En éste análisis se buscó una posible correlación entre la distancia del espacio morfológico y la distancia geográfica entre dos subespecies, a partir de comparaciones pareadas entre individuos de subespecies distintas. Fue necesario realizar un ajuste a las matrices de distancias geográficas y distancias morfológicas, para tener el mismo número de individuos en cada matriz y contar con una matriz cuadrada entre los pares de subespecies. Dado que *P. e. tepicus* es la subespecie con menos ejemplares en comparación a las otras dos subespecies, se seleccionaron ejemplares al azar de las otras subespecies hasta igualar el tamaño de la matriz de *P. e. tepicus*. Primero los ejemplares se separaron en subespecies, después se ordenaron de menor a mayor distancia morfológica de cada ejemplar al centroide. A continuación, para abarcar toda la variación morfológica, la lista de individuos ordenada se dividió en cinco partes iguales para el caso de *P. e. epidaus* y en 10 partes iguales para el caso de *P. e. fenochionis*, de cada sección se seleccionaron la misma cantidad de individuos, hasta igualar el tamaño de muestra con el de *P. e. tepicus*. De esta forma se tiene la misma cantidad de ejemplares cercanos y alejados del centroide morfológico. Una correlación significativa indica que los individuos cercanos geográficamente, aquellos en la zona de contacto, son más similares entre sí, lo que sugiere que se trata de una sola subespecie con un gradiente morfológico de extremo a extremo de su distribución; mientras que una correlación no significativa, es decir, los individuos en la zona de contacto son los más distintos entre sí, sugeriría que son dos subespecies y que no se mezclan en la zona de contacto. Por último, si no hay correlación entre la forma y el espacio geográfico, entonces los individuos de ambas subespecies en la zona de contacto pueden ser o no similares a la otra subespecie. Aún sin la correlación entre la forma y espacio geográfico, las subespecies pueden ser válidas si presentan diferencias morfológicas y éstas están restringidas a una zona geográfica.



### *Criterios para distinguir a las subespecies*

A partir de los dos criterios propuestos por Mayr (1982) de una distribución aislada y una diferencia poblacional, se consideró el identificar una diferencia significativa en la forma del patrón de bandeo. Si la prueba de Kruskal-Wallis muestra diferencias significativas en algún conjunto de caracteres y el análisis discriminante agrupa con los mismos conjuntos de caracteres, se considera que ambos grupos tienen formas independientes, que es la primera condición para que sean consideradas como subespecies. Además de tener formas independientes, se considera la distribución de estas formas en el espacio geográfico. Si dos grupos con diferencias morfológicas tienen una distribución alopátrida o parapátrida (con una zona de contacto), entonces cumplen con segunda condición para ser subespecies válidas. Si dos grupos cumplen con ambas condiciones (morfología y distribución geográfica distintas) entonces la prueba de Mantel entre subespecies permite definir si son subespecies válidas o un solo grupo con un gradiente morfológico. La prueba de Mantel arroja tres resultados posibles, que se denominaron como Tipos de distribución (Fig. 6). Una distribución tipo 1 indica una correlación significativa positiva entre la forma y la distribución geográfica, lo que indica que existen dos formas extremas, con posibles formas intermedias en las zonas de contacto; si dos grupos presentan este patrón, se consideran una sola subespecie con ejemplares de morfología intermedia en la zona de contacto. En la distribución tipo 2, existe una correlación significativa negativa, con los ejemplares más distintos morfológicamente en las zonas de contacto, mientras que los ejemplares en los extremos de la distribución geográfica son muy parecidos; este tipo de distribución valida la existencia de dos subespecies fácilmente identificables, incluso en la zona de contacto. Por último, una distribución tipo 3, es aquella en la que no existe una correlación entre la forma y el espacio geográfico, esta distribución también valida a las subespecies y las zonas de contacto tendrán individuos similares y distintos.

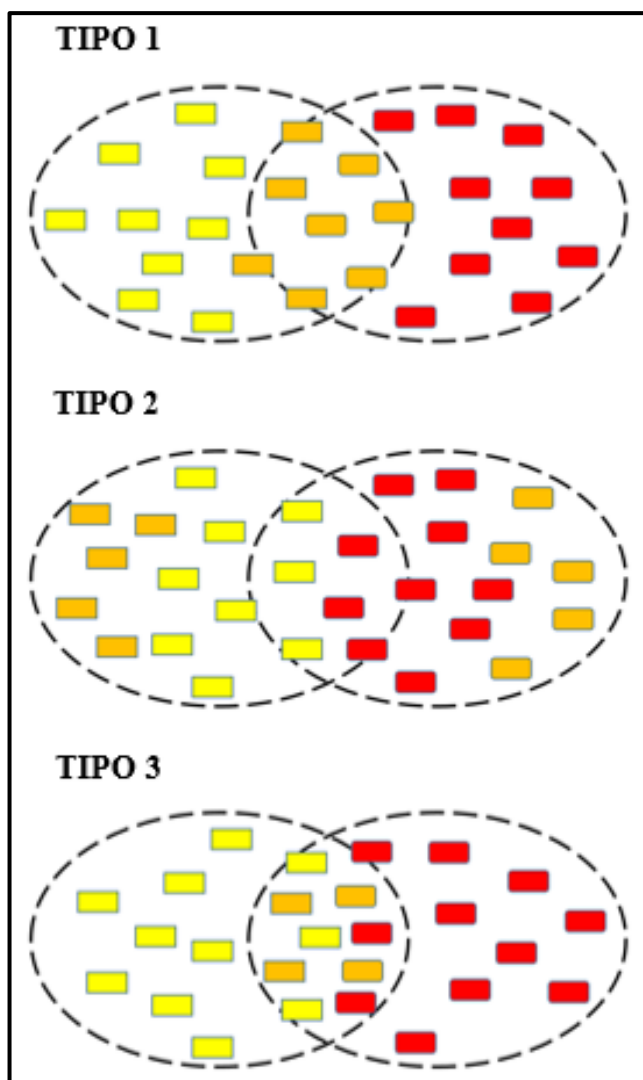


Figura 6. Modelos de distribución geográfica y distribución morfológica de las poblaciones.

### *Mapa de distribución*

Se realizaron dos mapas con el programa ArcView (ESRI, 1998), con los 158 ejemplares, para comparar el cambio o corroboración de la distribución geográfica de los tres grupos. El primer mapa se consideró la clasificación original de los ejemplares de la colección, mientras que el segundo mapa considera los grupos formados por el análisis discriminante (Anexo 1).

## RESULTADOS

### Análisis de componentes principales

En el PCA para el ala anterior (Fig. 7) se forman dos grupos aunque los límites se solapan. El primer grupo de izquierda a derecha está formado por individuos de *P. e. epidaus*, el cual parece separarse de las otras dos subespecies respecto al componente principal (CP)1. Del ala posterior (Fig. 8) se formaron dos grupos independientes pero que incluyen ejemplares de las tres subespecies; en el grupo de la derecha agrupa a la mayoría de los ejemplares de *P. e. epidaus* y a la izquierda está compuesto en su mayoría por ejemplares de *P. e. fenochionis*. Por último, con el ocelo (Fig. 9) no se forma ningún grupo independiente; sin embargo, se aprecia que *P. e. fenochionis* presenta menos variación respecto al CP2 en comparación a las otras subespecies. Para el ala anterior y posterior, la varianza explicada es alta, mientras que en ocelo es baja, por lo que para esta estructura, no hay un patrón en la forma de alguna de las tres subespecies, debido a lo cual la variación no puede reducirse a dos dimensiones.

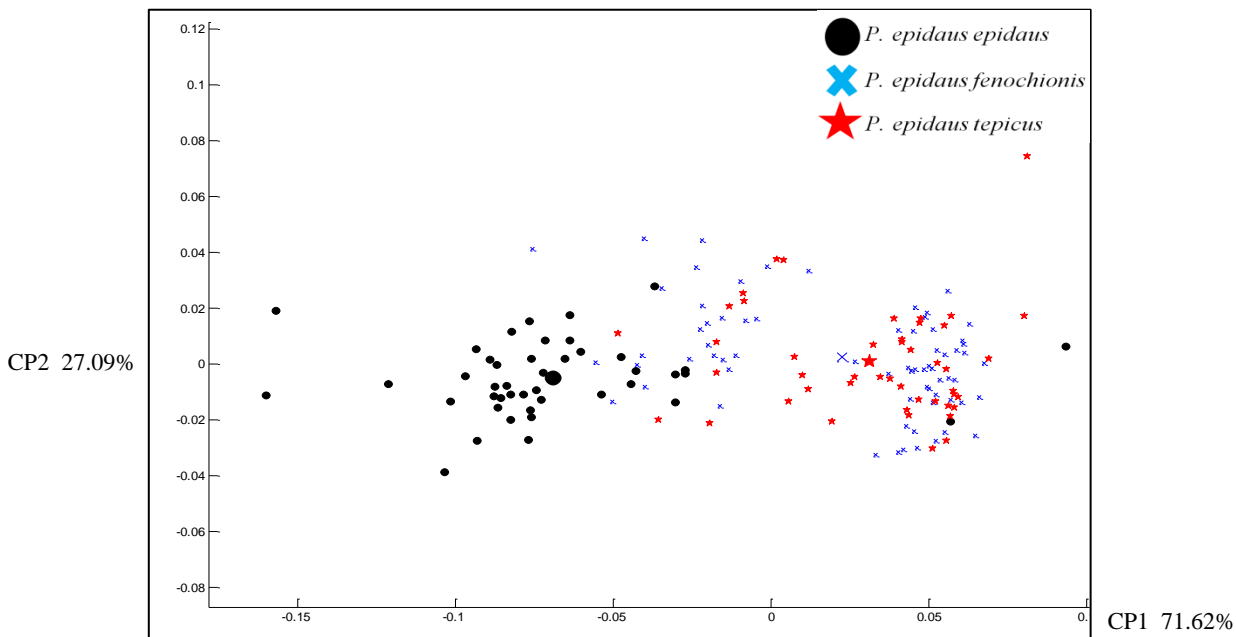


Figura 7. Variación de la forma del ala anterior en un PCA. El punto de mayor tamaño de cada símbolo indica la forma promedio de cada subespecie.

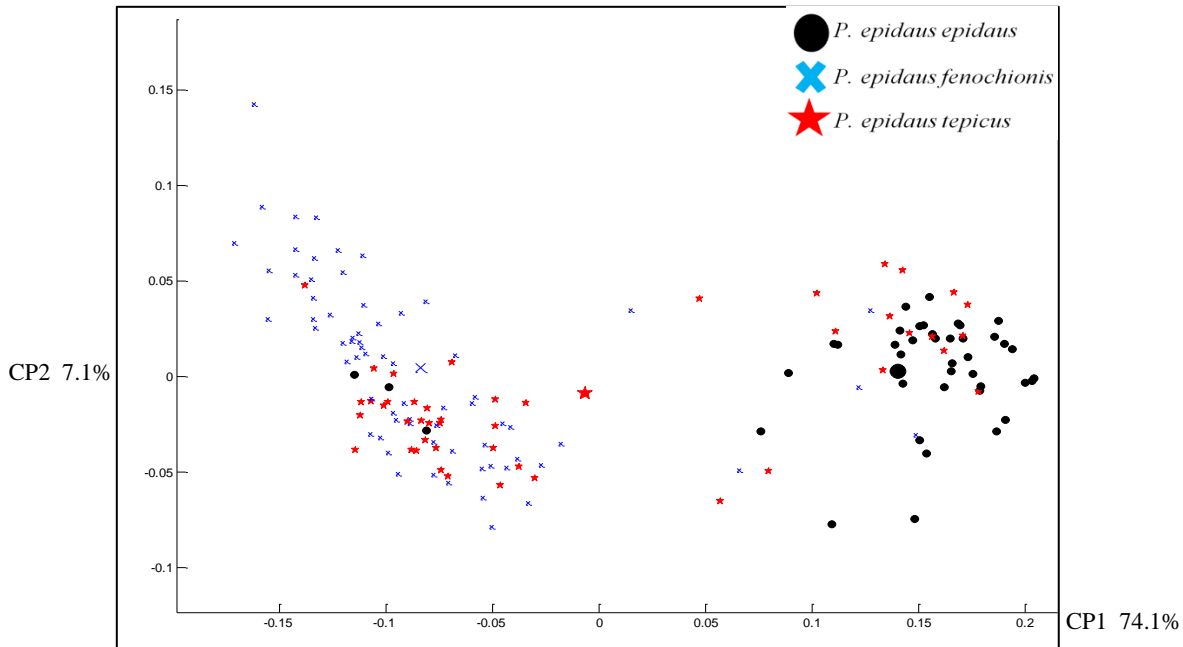


Figura 8. Variación de la forma del ala posterior en un PCA. El punto de mayor tamaño de cada símbolo indica la forma promedio de cada subespecie.

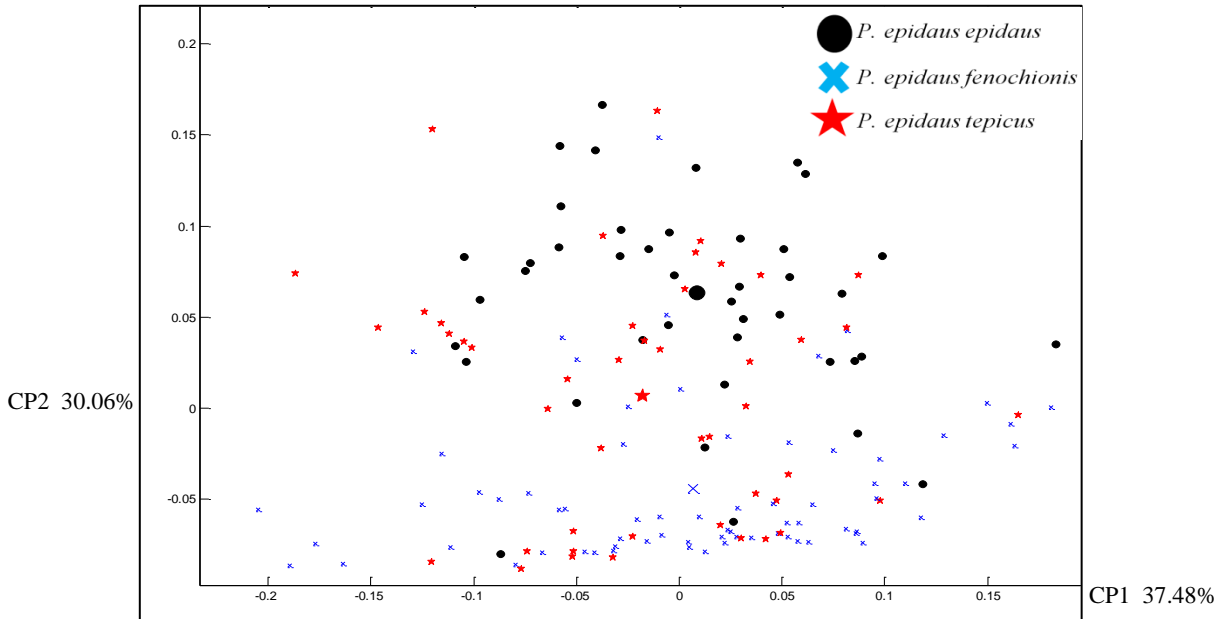


Figura 9. Variación de la forma del ocelo en un PCA. El punto de mayor tamaño de cada símbolo indica la forma promedio de cada subespecie.

### Análisis de variables canónicas

La gradilla de deformación del ala anterior muestra que las modificaciones, a partir de la forma promedio, se concentran en las marcas relacionadas con el tamaño y grosor de las bandas 2 y 3. En *P. e. epidaus* (Fig. 10) la deformación muestra que las bandas están más juntas, en tanto que en *P. e. fenoehionis* y *P. e. tepicus* la celda discal es más angosta en el primer caso y más amplia en el segundo. Las deformaciones en el ala posterior (Fig. 11) se concentran en el largo y ancho de la banda 2 y en el grosor de la banda submarginal. La mayor modificación a partir de la forma promedio la presenta *P. e. epidaus* donde parece que la energía de torsión se refleja en un contacto entre ambas bandas. La deformación del ocelo (Fig. 12) muestra poca variación entre la forma de las tres subespecies. Además que la forma promedio de *P. e. tepicus* es casi idéntica a la forma promedio general, lo que concuerda con el PCA.

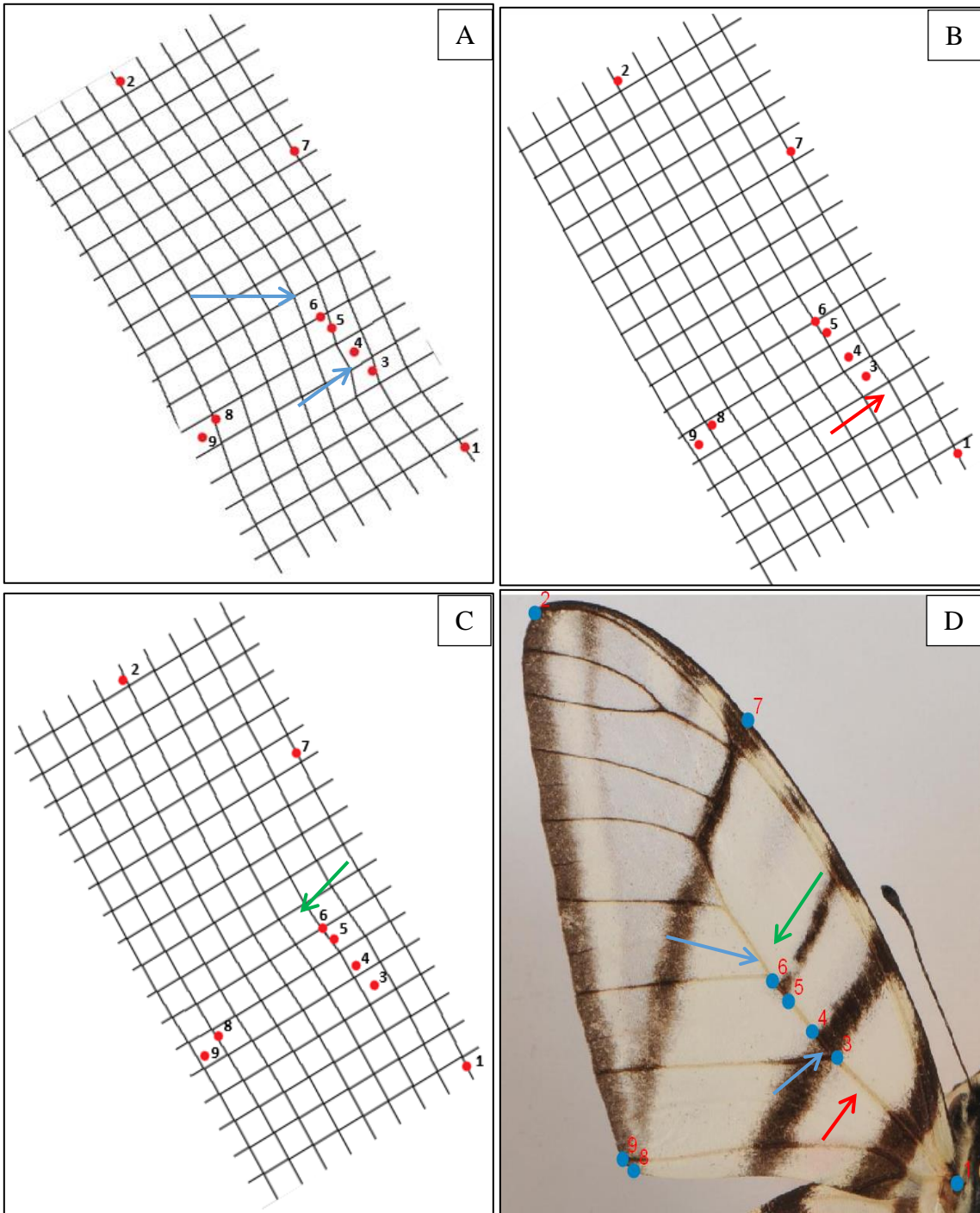


Figura 10. Gradilla de deformación del ala anterior. **A)** *P. e. epidaus*, **B)** *P. e. fenochionis*, **C)** *P. e. tepicus* y **D)** ejemplo de marcas en *P. e. fenochionis*.

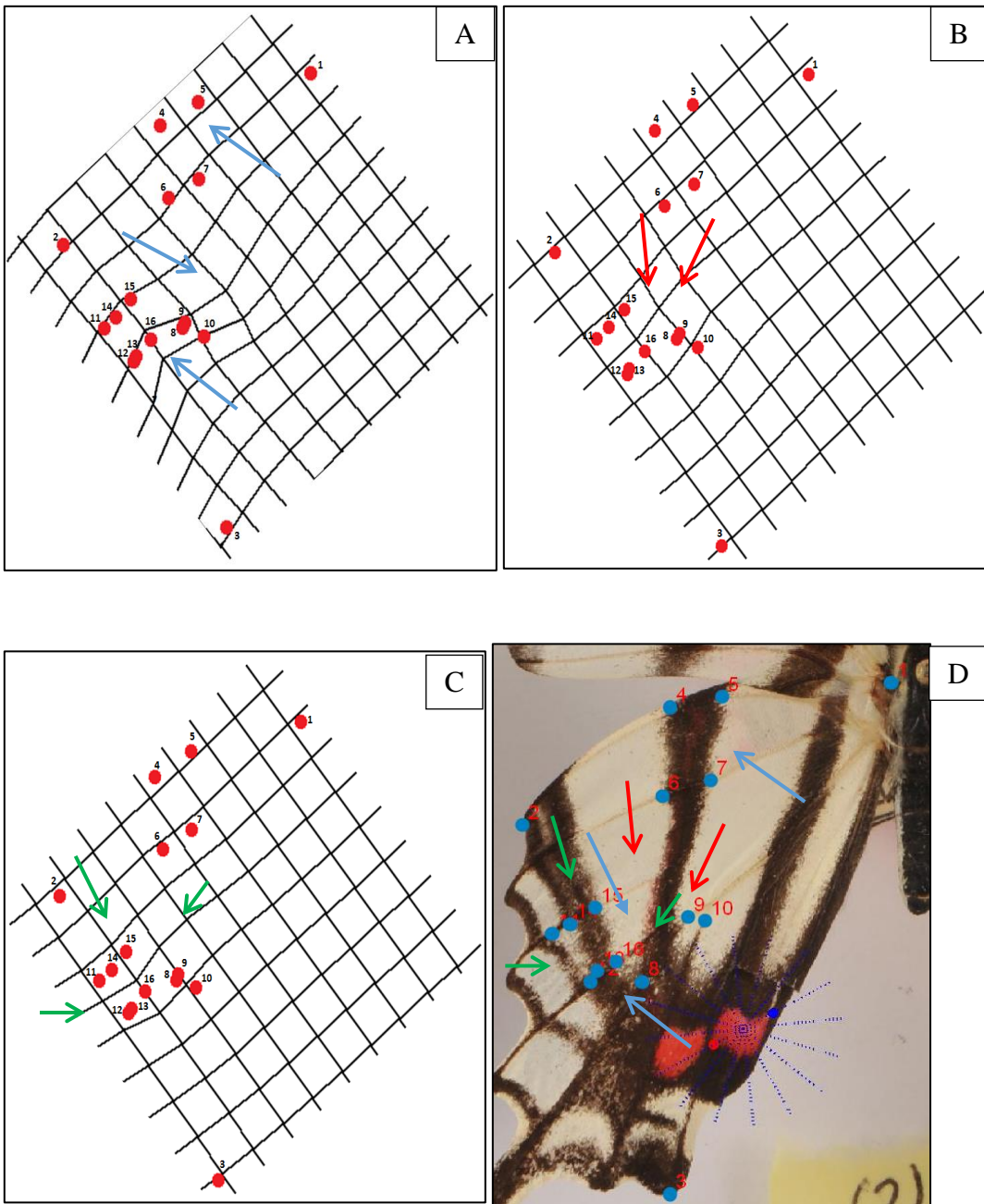


Figura 11. Gradilla de deformación del ala posterior. **A)** *P. e. epidaus*, **B)** *P. e. fenochionis*, **C)** *P. e. tepicus* y **D)** ejemplo de marcas en *P. e. fenochionis*.

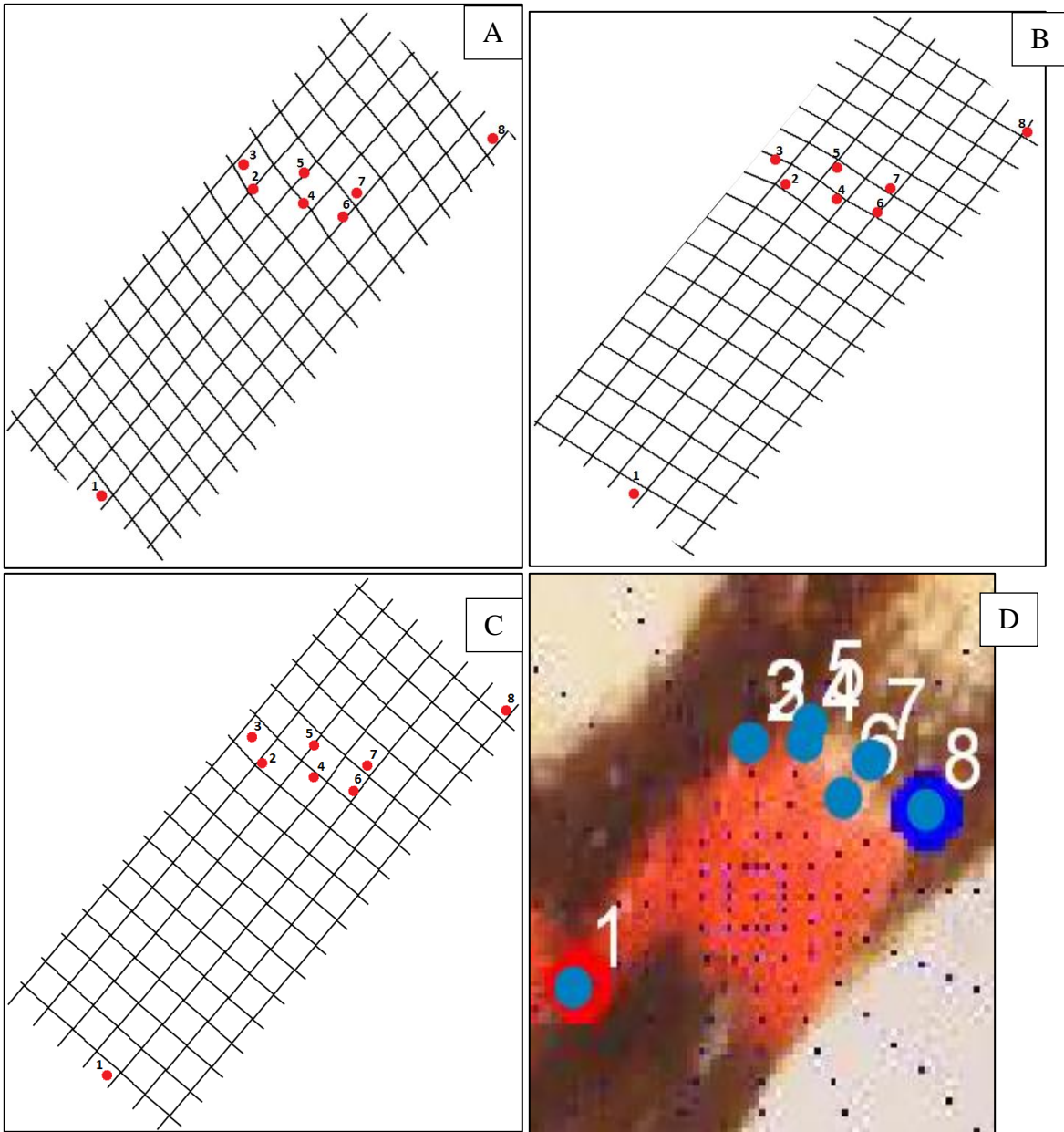


Figura 12. Gradilla de deformación del ocelo. **A)** *P. e. epidaus*, **B)** *P. e. fenochionis*, **C)** *P. e. tepicus* y **D)** ejemplo de marcas en *P. e. fenochionis*.



El CVA para el ala anterior (Fig. 13) muestra una distribución solapada de los ejemplares de las tres subespecies pero *P. e. epidaus* se separa con respecto a la VC1, no así respecto a la VC2. En el ala posterior (Fig. 14) es la estructura con el que agrupan de manera independiente las tres subespecies, con una mezcla entre individuos de *P. e. fenochionis* y *P. e. tepicus*. La distribución en el ocelo no muestra diferencias morfológicas respecto a la VC2; sin embargo, con respecto a la VC1, el ocelo es un carácter informativo que permite separar a *P. e. fenochionis* del resto de las subespecies.

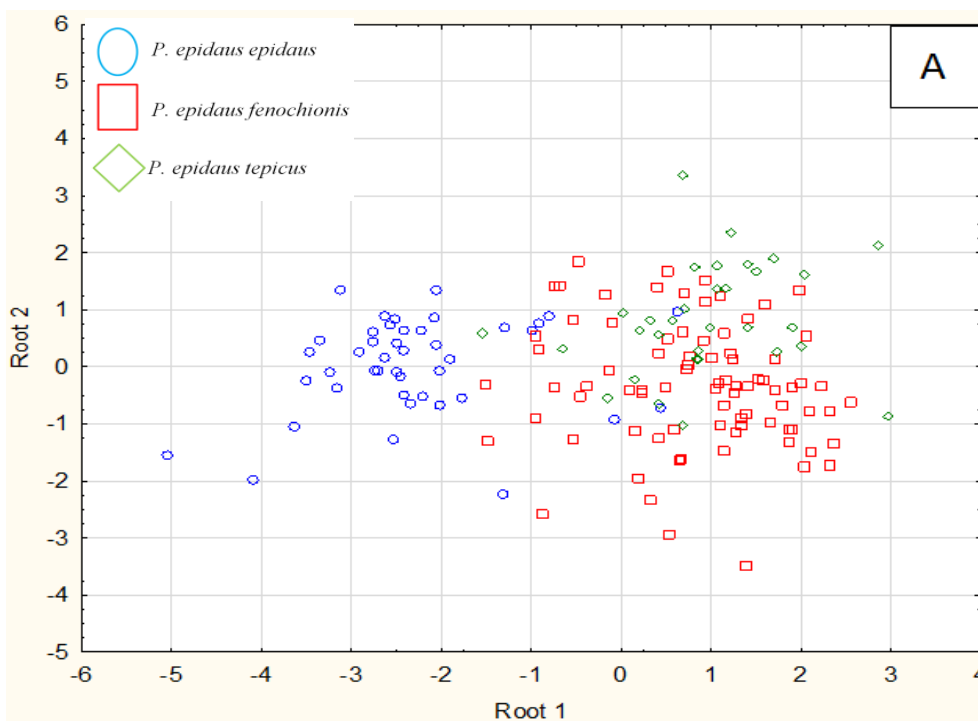


Figura 13. Variación de la forma a partir de las dos primeras variables canónicas del ala anterior.

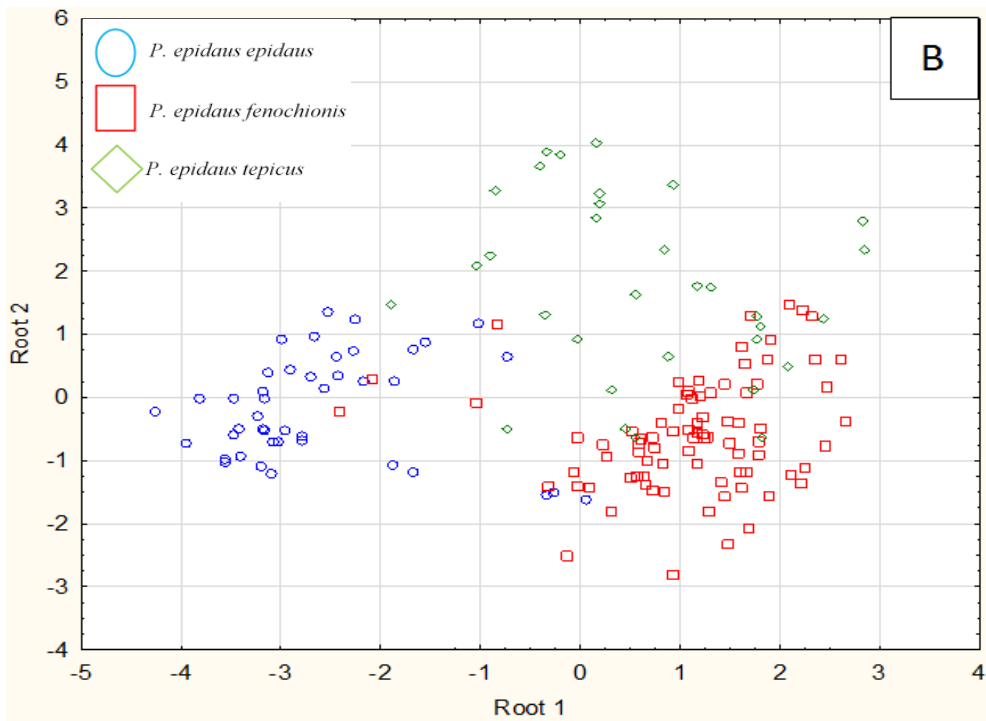


Figura 14. Variación de la forma a partir de las dos primeras variables canónicas del ala posterior.

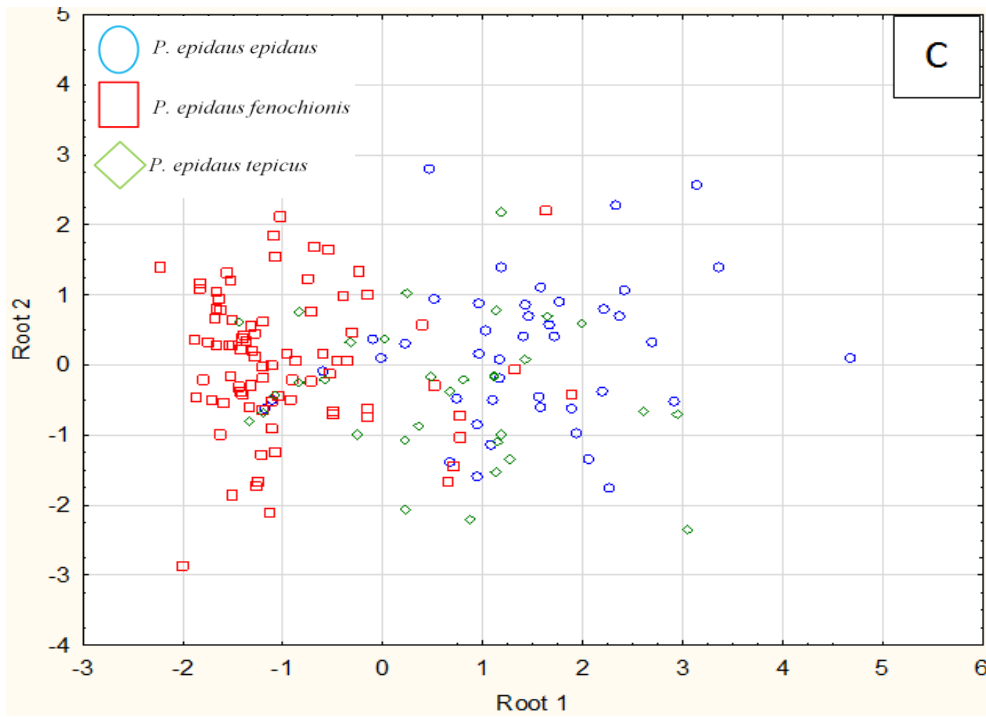


Figura 15. Variación de la forma a partir de las dos primeras variables canónicas del ocelo.

### Análisis discriminante

La reclasificación de los organismos con el análisis discriminante muestra que para el ala anterior, al igual que en la VC1 (Fig. 13), la clasificación *a priori* de *P. e. epidaus* es congruente con la clasificación *a posteriori* con solo cuatro ejemplares reclasificados en *P. e. fenochionis* (Cuadro 2), mientras que *P. e. tepicus* es el peor reclasificado a partir del grupo *a priori* con solo un 34% clasificado *a posteriori* como ese grupo. Por lo que el conjunto de marcas utilizado en el ala anterior es útil para reconocer a *P. e. epidaus* del resto de las subespecies, pero no distingue claramente entre *P. e. fenochionis* y *P. e. tepicus*.

Cuadro 2. Matriz de clasificación. Los números resaltados en rojo en el porcentaje de reclasificación, indican a la subespecie con menor congruencia entre la clasificación *a priori* y *a posteriori*.

Estructura	Subespecie Clasificación original	% de ejemplares reclasificados correctamente	Reclasificados como		
			<i>P. e. epidaus</i>	<i>P. e. fenochionis</i>	<i>P. e. tepicus</i>
Ala anterior	<i>P. e. epidaus</i>	90.7	39	4	0
	<i>P. e. fenochionis</i>	80.7	4	67	12
	<i>P. e. tepicus</i>	34.4	1	20	11
	Total	74	44	91	23
Ala posterior	<i>P. e. epidaus</i>	88.4	38	4	1
	<i>P. e. fenochionis</i>	90.4	3	75	5
	<i>P. e. tepicus</i>	62.5	1	11	20
	Total	84.2	42	90	26
Ocelo	<i>P. e. epidaus</i>	74.4	32	6	5
	<i>P. e. fenochionis</i>	90.4	3	75	5
	<i>P. e. tepicus</i>	31.3	11	11	10
	Total	74	46	92	20

Los caracteres del ala posterior y el ocelo aparentan estar correlacionados, debido a que clasifican el mismo número de ejemplares *a posteriori* que los clasificados *a priori*, como

con *P. e. fenoehionis*. Sin embargo, no se trata de los mismos ejemplares reclasificados en cada grupo, es decir, cada carácter clasifica independiente del otro. Por otro lado, *P. e. tepicus* tiene un gran número de ejemplares reclasificados en las otras dos subespecies con el ala anterior y el ocelo, mientras que con el ala posterior, el 62% se reclasificó congruentemente con la clasificación *a priori*. Por lo tanto, es posible reconocer a *P. e. fenoehionis* con ambos conjuntos de marcas (ala posterior y ocelo), mientras que no hay estructura que identifique inequívocamente a *P. e. tepicus*.

#### Diferencias en la forma alar

A partir de los grupos *a priori*, el análisis de Kruskal-Wallis muestra que hay diferencias significativas entre *P. e. epidaus* y *P. e. fenoehionis* con los tres grupos de caracteres ( $p < 0.01$ ), por lo que se pueden reconocer a partir de su forma. Mientras que *P. e. epidaus* y *P. e. tepicus* se pueden reconocer con los caracteres del ala anterior ( $p = 0.022$ ) y del ala posterior ( $p = 0.013$ ), así que el patrón de bandeo en ambas alas ayuda a su diferenciación. En el caso de *P. e. fenoehionis* y *P. e. tepicus* se pueden reconocer con los caracteres del ala posterior y el ocelo ( $p < 0.01$ ).

#### Modificaciones a la distribución geográfica

Al comparar la distribución de los ejemplares reclasificados del grupo *a priori* (Fig. 16) con la distribución *a posteriori* (Fig. 17) con los caracteres del ala anterior y del ala posterior, se encuentra que no hay congruencia de un patrón alar independiente con una distribución aislada. La primera diferencia es que la distribución de la forma de *P. e. fenoehionis* se amplía hasta Nayarit, mientras que la distribución de la forma de *P. e. epidaus* se solapa con la de *P. e. fenoehionis* en Campeche, Jalisco, Morelos y Veracruz. Además existen datos extremos de la forma de *P. e. fenoehionis* en San Luis Potosí y de la forma *P. e. tepicus* en Oaxaca.

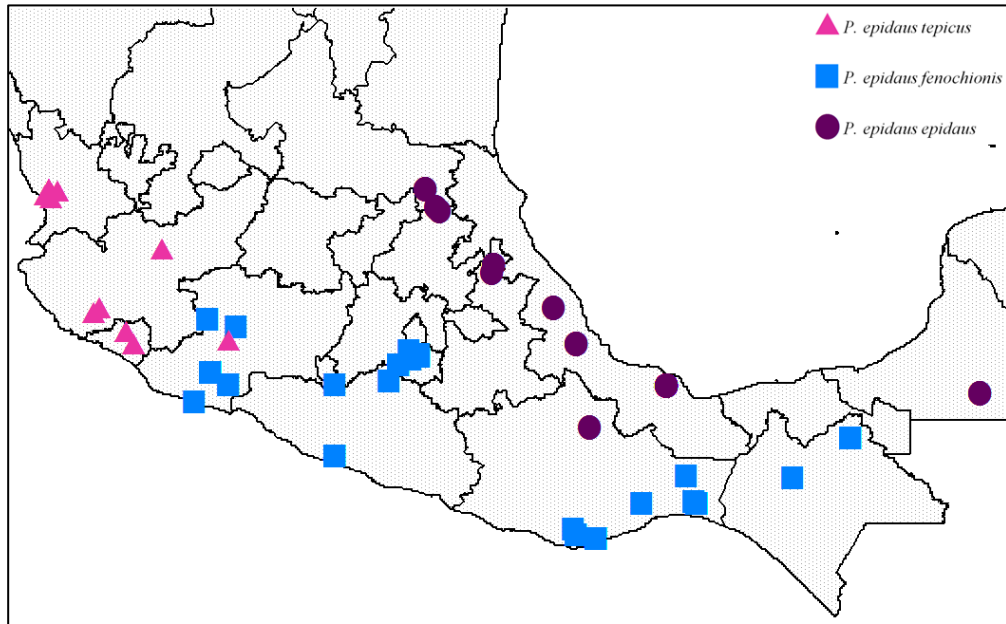


Figura 16. Puntos de distribución de las ejemplares utilizados en los análisis, clasificados *a priori*.

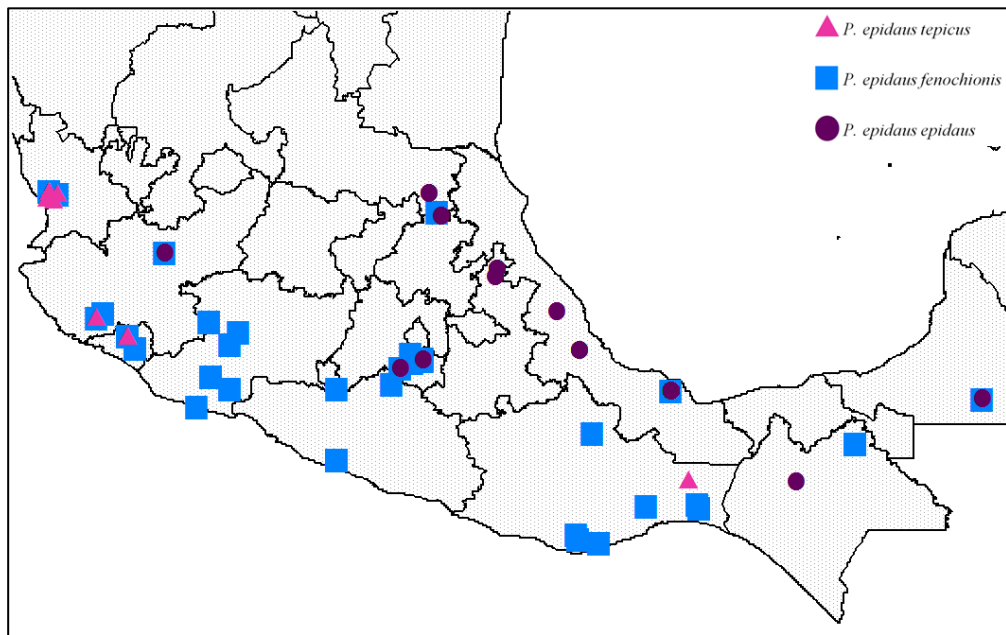


Figura 17. Distribución de las tres subespecies a partir de los ejemplares reclasificados

### Prueba de Mantel

El primer análisis de Mantel muestra que hay una correlación entre el espacio geográfico y el espacio morfométrico para *P. e. fenochionis* con los caracteres del ala anterior y del ala posterior (Cuadro 3), mientras que en *P. e. epidaus* y *P. e. tepicus* sólo hay dicha correlación con los caracteres del ala posterior. Por lo tanto, en estos grupos y caracteres, el cambio en la forma está relacionado con factores con un gradiente geográfico.

Cuadro 3. Correlación entre distancia geográfica y distancia morfométrica con prueba de Mantel. Valores entre paréntesis es el valor de *p*.

Carácter	Valor de correlación					
	<i>P. e. epidaus</i>	<i>P. e. fenochionis</i>	<i>P. e. tepicus</i>	<i>P. e. epidaus x P. e. fenochionis</i>	<i>P. e. epidaus x P. e. tepicus</i>	<i>P. e. fenochionis x P. e. tepicus</i>
Ala anterior	0.15 (0.082)	0.17 (0.001)	0.04 (0.249)	-0.04 (0.671)	0.53 (0.001)	0.12 (0.078)
Ala posterior	0.17 (0.043)	0.17 (0.001)	1 (0.001)	0.002 (0.448)	0.42 (0.004)	0.1 (0.161)
Ocelo	-0.07 (0.771)	0.03 (0.151)	0.06 (0.18)	-0.26 (0.994)	-0.16 (0.913)	-0.1 (0.885)

A partir del análisis de Kruskal-Wallis y la segunda parte del análisis de Mantel, *P. e. epidaus* y *P. e. tepicus* muestra una distribución tipo 1 (Fig. 6), ya que hay diferencias significativas en la forma, así como una correlación positiva con la forma del ala anterior y posterior respecto la distribución geográfica, por lo que a pesar de ser dos grupos independientes, la variación que tiene el grupo de *P. e. tepicus* es amplia, que incluso llega a parecerse a la forma de *P. e. epidaus*. Para el caso de *P. e. epidaus* con *P. e. fenochionis*, presentan una distribución tipo 3 ya que tienen una forma independiente pero no hay una correlación entre la forma y su distribución geográfica. Debido a que *P. e. epidaus* y *P. e. fenochionis* son diferentes en los tres conjuntos de marcas, estos dos grupos pueden reconocerse fácilmente incluso en las zonas de contacto (Fig. 17), por lo que se deben considerar subespecies válidas. Mientras que *P. e. fenochionis* con *P. e. tepicus* también presentan una distribución tipo 3, pueden reconocerse con los caracteres del ala posterior y el ocelo incluso en zonas de contacto, podrían ser subespecies válidas, sin embargo, al no

observase una diferencia en la distribución geográfica (Fig. 17), se considera como una sola subespecie.

Por lo tanto se reconocen como subespecies válidas a *P. e. epidaus* y *P. e. fenochionis*, mientras que *P. e. tepicus* se considera parte de *P. e. fenochionis* debido a que presentan una distribución solapada. Estas subespecies se caracterizan porque en *P. e. epidaus* la quinta banda del ala anterior no se une a la banda marginal, termina en la vena  $M_2$  o no llega a tocarla, la segunda banda negra del ala posterior no es mayor a la distancia entre  $SC_2$  y  $R_1$ , y se distribuye en las provincias biogeográficas del Golfo de México (Morrone *et al.*, 2002). Mientras que en *P. e. fenochionis*, la quinta banda del ala anterior se extiende hasta la banda marginal, la segunda banda del ala posterior es más ancha y siempre llega hasta la banda submarginal, que también es de mayor grosor que en *P. e. epidaus*, y se distribuye en las provincias biogeográficas de la Costa del Pacífico mexicano, la Cuenca del Balsas y la Sierra Madre del Sur. Los ejemplares identificados previamente como *P. e. tepicus* presentan una forma con variación amplia que va desde la forma de *P. e. fenochionis* y con formas similares a *P. e. epidaus* en el estado de Nayarit.

## **DISCUSIÓN**

### Identificación de subespecies a partir de la forma

La variación en la forma alar de *P. epidaus* es claramente observada en las subespecies de *P. e. epidaus* y *P. e. fenochionis* con el uso de morfometría geométrica. Las diferencias son notorias en la mayoría de los ejemplares con relación a su distribución geográfica, con excepción de las zonas de contacto de Chiapas, Morelos y sur de Veracruz. Estas diferencias se presentaron en el largo de la banda cinco del ala anterior, así como en el grosor y largo de la banda dos del ala posterior, que concuerdan con las descripciones originales (Godman y Salvin, 1868; Rothschild y Jordan, 1906); además, aquí se aporta información nueva para diferenciar a ambas subespecies con la banda submarginal del ala posterior, característica propuesta en este trabajo.

El conjunto de caracteres para el ocelo no fue informativo con los análisis morfométricos. A pesar de que la prueba de Kruskal-Wallis indica que se puede reconocer a los tres grupos, pero la poca variación que presenta, hace difícil su uso para clasificar individuos a alguno de estos grupos. Dicha variación no se recupera con la gradilla de deformación, ya que las formas promedio de los tres grupos, son cercanas a la forma promedio general de la especie. Por ello la forma del ocelo no parece un carácter útil para clasificar a nivel subespecífico o incluso a nivel específico como se ha comprobado en grupos de Nymphalidae, donde se ha demostrado su covariación respecto a otras estructuras (Breuker *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2012; Sanzana *et al.*, 2013).

### Correlación de la forma con la distribución

Una tendencia que se ha realizado con la clasificación de ejemplares a nivel de subespecie es la identificación a partir de su distribución o de su forma, en lugar de la congruencia entre ambos criterios. La hipótesis de que un cambio en la distribución ocasionará una forma particular que reconozca a una subdivisión de la especie (Llorente, 1988) no siempre se cumple, debido a que los cambios en la forma también son causados por presiones ecológicas en un mismo sitio, lo que ocasiona que una misma forma se presente en dos regiones diferentes con condiciones ambientales similares (Blackenhorn y Demont, 2004); o viceversa, que dos formas distintas estén en un mismo sitio con condiciones ambientales



muy variables. Por ello, en algunos lugares, la variación climática genera mayor variación dentro de una misma subespecie y ocasiona formas extremas como en el caso de los ejemplares de *P. e. fenochionis* en Nayarit.

La barrera biogeográfica de la Depresión del Balsas no se sustenta con estos grupos, debido a la ampliación del área de distribución de *P. e. fenochionis*. En la distribución que presentan Llorente *et al.* (1997) para las subespecies de *P. epidaus* ubican a cada subespecie delimitada por las provincias biogeográficas, la del Golfo de México para *P. e. epidaus*, y la Costa del Pacífico Mexicano en la región Oaxaca-Guerrero para *P. e. fenochionis* y la parte norte de la Costa del Pacífico Mexicano en la región de Nueva Galicia para *P. e. tepicus*. Este patrón de distribución se ha propuesto para otros grupos de mariposas como *Consul electra*, *Dismorphia amphiona*, *Pereute charops*, *Diaethria asteria*, *Lieinix nemesis*, *Heliochroma crocea*, entre otros (Halffter, 1976; Llorente, 1983; Llorente, 1988; Llorente *et al.*, 1992; Llorente y Luis, 1992; Luis *et al.*, 1996; Morrone *et al.*, 2002). Dichos trabajos plantean la hipótesis de una división geográfica entre las regiones de Nueva Galicia y Oaxaca-Guerrero, que es causada por un cambio en el clima y de las comunidades vegetales en la depresión del Balsas, lo que provoca que sean escasos los ejemplares en la Depresión del Balsas. La presencia de esta disyunción ocasionaría un patrón de distribución en islas (Llorente *et al.*, 1992; Llorente y Escalante, 1992; Llorente y Luis, 1992) lo que reforzaría la hipótesis de dos subespecies en el Atlántico para *P. epidaus*. Sin embargo, estos trabajos consideran que hacen falta estudios que lo corroboren esta hipótesis ante una baja cantidad de muestreos, además que no mostraron la distribución y abundancia de formas intermedias.

Los ejemplares clasificados como *P. e. epidaus* o *P. e. fenochionis* que no se ubican en su área de distribución esperada podrían tratarse de formas intermedias entre ambas subespecies. Estas formas intermedias podrían presentar un menor grosor de las bandas pero el mismo largo que en alguna de las dos subespecies o viceversa, los cuales corresponden a los puntos más alejados de la forma promedio del CVA. Con base en el concepto de subespecie, se esperaría que las formas intermedias o la presencia de ambas formas en una sola localidad ocurrieran solo en las zonas de contacto (Bedoya y Murillo,

2011). Sin embargo, las posibles formas intermedias se ubican en los estados de Campeche, Jalisco, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz, por lo cual no solo se presentarían en las zonas de contacto. Un caso similar ocurre en el grupo de *Papilio machaon* o el caso de *Prepona deiphile*, donde hay subespecies definidas aun cuando la distribución de la forma no es del todo congruente con la distribución geográfica (Llorente *et al.*, 1992; Dupuis y Sperling, 2015).

El cambio en el patrón alar en *P. epidaus* en las dos subespecies se debe al cambio en la cantidad de melanina, lo que ocasiona que las bandas disminuyan o aumenten su grosor. En particular en las subespecies de *P. epidaus* podría relacionarse con la termorregulación (Kingsolver y Wiemasz, 1991) o protección contra radiación ultravioleta (Gunn, 1998), ya que parece concordar con la regla de Gloger (Gloger, 1833; Zhenget *al.*, 2015) al haber una disminución en la cantidad de melanina a una mayor latitud, como ocurre en Nayarit con *P. e. fenochionis*. Además es probable que también se cumple la regla inversa de Bergman (Blackenhorn y Demont, 2004) en ambas subespecies, a pesar de que no se consideró el tamaño en este análisis, a ojo se aprecia que los ejemplares de menor tamaño están en San Luis Potosí y Nayarit, en comparación con los ejemplares del sur de México. De ser así, estas subespecies se soportan aún más, debido a que sus variaciones serían reflejo de adaptaciones locales, además de presentar una gran plasticidad fenotípica (Stern, 2000). Para probar estas reglas ecológicas se debería correlacionar el tamaño con la latitud y con la temperatura media de los sitios de recolecta.

#### Importancia de la continuidad en el uso de la categoría subespecífica

La importancia que se le da a las subespecies es su uso en la conservación de la biodiversidad (Zink, 2004). Por un lado, las subespecies reflejan componentes evolutivos infraespecíficos debido a la congruencia de la distribución geográfica con cambios morfológicos con base genética (Mulcahy, 2008); por otra parte, se considera que las subespecies, en particular en aves, son unidades apropiadas de conservación para especies amenazadas, ya que reflejarían unidades evolutivas independientes por debajo del nivel de especie, similar a lo que se considera como una especie con el CFE, CEE o el CLGE (Gavinet *al.* 1999; Pasquet 1999; Haiget *al.* 2004; Funk *et al.*, 2007; Braby *et al.*, 2012).

Por otra parte, las nuevas herramientas encuentran que las diferencias morfológicas en las subespecies no reflejan cambios genéticos, en particular con el uso de DNAm y aloenzimas (Sheppard *et al.*, 2002; Proshek *et al.*, 2015), además de que forman grupos parafiléticos (Willmott y Hall, 2013), lo que indica que las subespecies no cumplen con su función como unidades genéticas estables con potencial evolutivo (Wilson y Brown, 1953; Zink, 1989; Ball y Avise, 1992; Zink *et al.*, 2000; Zink, 2004; Patten, 2010; Braby *et al.*, 2012). Pese a ello, las subespecies sí ayudan a entender la variación debajo del nivel de especie, independientemente de las bases genéticas de dicha variación (Aldrich *et al.*, 2007; Donegan y Avedaño, 2009; Angelier *et al.*, 2011; Campo-Moreno, 2012; Gómez-Garcés *et al.*, 2012). Los cambios morfológicos presentados por *P. epidaus*, tienen una estructura espacial definida y parecen reflejar adaptaciones locales, por lo que es una manera fácil y económica de poder identificar zonas prioritarias de conservación.

Las subespecies también son útiles como subunidades geográficas en la estimación de los patrones históricos de la divergencia entre las poblaciones (Phillimore y Owens, 2006; Braby *et al.*, 2012). Esto se nota en la distribución geográfica de las dos subespecies de *P. epidaus*, la cual coincide con la distribución en el Pacífico de *P. agesilaus fortis* y *P. thyastes occidentalis*, así como la distribución en el Atlántico de *P. agesilaus neosilaus* y *P. thyastes marchandii* (Hamilton *et al.*, 1994), lo que representa un patrón de dispersión neotropical típico con penetración media (Halfpeter, 1976). En consecuencia, para el estudio de patrones históricos a menor escala, se pueden utilizar las subespecies en diferentes especies, en lugar de estudios a nivel de Género.

## **PERSPECTIVAS**

Es recomendable considerar un estudio que englobe la variación que pueda existir en *P. epidaus* a lo largo de México a Nicaragua, ya que puede existir más de dos subespecies en ese rango amplio de distribución. Se sugieren estudios que expliquen a qué se debe la variación en la cantidad de melanina, ya que ambas subespecies ocupan diferentes ambientes pero pueden mantener el patrón de bandeo, así como lo que ocurre en Nayarit, donde se presenta la forma promedio de *P. e. fenochionis* y una forma menos melanizada.

## CONCLUSIONES

- Se encontró que los análisis morfométricos permiten un reconocimiento cuantitativo a los análisis tradicionales, con las que se reconocieron las formas de *P. e. epidaus* y *P. e. fenochionis*.
- Las diferencias que identifican a cada subespecie radican en el grosor y longitud de las bandas del ala anterior y posterior, mientras que el ocelo no es útil para discriminar entre las dos subespecies debido a la gran cantidad de variación que presenta.
- El análisis morfométrico indica que las diferencias morfológicas se basan principalmente en el largo de la quinta banda del ala anterior, en el largo y ancho de la segunda banda del ala posterior y el grosor de la banda submarginal del ala posterior.
- A partir de los análisis morfométricos y el mapa de distribución con los ejemplares reclasificados y bajo el concepto biológico de especie, *P. epidaus* presenta sólo dos subespecies: *P. e. epidaus* en el Atlántico y *P. e. fenochionis* en la vertiente del Pacífico; con formas intermedias en las zonas de contacto.
- Se encontró que *P. e. tepicus* no es diagnosticable con los caracteres utilizados, asimismo su área de distribución se sobrepone con *P. e. fenochionis*, por lo que se considera una forma extrema de *P. e. fenochionis*.
- El concepto de subespecie tiene que basarse en la congruencia de la distribución geográfica y la variación morfológica.

## LITERATURA CITADA

- Acosta, B. (2008). Una nueva subespecie de *Euchloe belemia* (Esper, 1800) de la isla de Gran Canaria, Islas Canarias, España (Lepidoptera: Pieridae). *Revista de lepidopterología* 36: 173-182.
- Adams, D., Rohlf, F. y Slice, D. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the "revolution". *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Adobe. (2010). Photoshop CS5 extended. Adobe Systems Incorporated.
- Aldrich, B., Maghirang, E., Dowell, F. y Kambhampati, S. (2007). Identification of termite species and subspecies of the genus *Zootermopsis* using near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Insect Science* 7: 1-7.
- Amadon, D. (1949). The Seventy-Five Per Cent Rule for Subspecies. *Cooper Ornithological Society* 51: 250-258.
- Angelier, F., Ballentine, B., Holberton, R., Marra, P. y Greenberg, R. (2011). What drives variation in the corticosterone stress response between subspecies? A common garden experiment of swamp sparrows (*Melospiza georgiana*). *Journal of Evolutionary Biology* 24: 1274-1283.
- Bai, Y., Bin, L., Xu, S. y Wang, G. (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 Society* 98: 162-169.
- Bedoya, M. y Murillo, E. (2011). Evidencia morfológica de hibridación entre las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Passeriformes: Thraupidae) en Colombia. *Revista de Biología Tropical* 60: 75-85.
- Blackenhorn, W y Demont, M. (2004). Bergmann and converse Bergmann latitudinal clines in arthropods: Two ends of a continuum? *Integrative and Comparative Biology* 44: 413-424.
- Bookstein, F. (1996). Combining the tools of geometric morphometrics. En: Marcus, L., Corti, M., Loy, A., Naylor, G. y Slice, D. *Advances in morphometrics*. New York, Plenum Press. Pp. 131-51.

- Bookstein, F. (1997). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press. Estados Unidos.
- Braby, M., Eastwood, R. y Murray, N. (2012). The subspecies concept in butterflies: has its application in taxonomy and conservation biology outlived its usefulness? *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 699-716.
- Breuker, C., Gibbs, M., Van-Dyck, H., Brakefield, P., Klingenberg, C. y Van-Dongen, S. (2007). Integration of Wings and their Eyespots in the Speckled Wood Butterfly *Pararge aegeria*. *Journal of Experimental Zoology* 308: 454-463.
- Brower, A. y Jeansonne, M. (2004). Geographical populations and “subspecies” of New World Monarch Butterflies (Nymphalidae) share a recent origin and are not phylogenetically distinct. *Entomological Society of America* 97: 519-523.
- Campo-Moreno, R. (2012) ¿Es necesario identificar correctamente y a nivel de subespecie los aislados del grupo *Streptococcus bovis*? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30: 173-174.
- Constantino, L., Salazar, J. y Rodríguez, G. (2012). Estudio sobre el género *Ancyluris* Hübner 1819 en Colombia y descripción de nuevos taxa (Lepidóptera: Riodinidae). *Boletín científico museo de historia natural* 16: 209-235.
- Cracraft, J. (1983). Species concept and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- Cuadras, C. (1989). Distancias estadísticas. *Estadística Española* 119: 295-378.
- de Queiroz, K. (1998). The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. En: Howard, D., Berlocher, S., *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University. Oxford Press. Pp. 57-75.
- Donegan, T. y Avedaño, J. (2009). A new subspecies of mountain tanager in the *Anisognathus lacrymosus* complex from the Yariguíes Mountains of Colombia. *Bulletin of the British Ornithologists* 130:13-32
- dos Reis, S., Duarte, L., Monteiro, L. y Von-Zuben, F. (2002). Geographic Variation in cranial morphology in *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) II. Geographic units, Morphological discontinuities, and sampling gaps. *Journal of Mammalogy* 83: 345-353.

- Dottax, M. (2011). Nueva subespecie de *Memphis aureola* Bates, 1866 de México (Lepidoptera: Nymphalidae: Charaxinae). Boletín científico del Museo de Historia Natural 15: 160-167.
- Doubleday, E. (1846-1850). The Genera of Diurnal Lepidoptera: Their generic characters, a notice of their habits and transformation, and a catalogue of the species of each genus. Editado por: Doubleday, E. y Westwood, J. Londres. Longman, Brown, Green and Longmans. Volumen 1. Pp. 250.
- Dupuis, J. y Sperling, F. (2015). Repeated reticulate evolution in North American *Papilio Machaon* group swallowtail butterflies. Plos one 10: 1-26
- Eastwood, R. y Hughes, J. (2003). Phylogeography of the rare myrmecophagous butterfly *Acrodipsas cuprea* (Lepidoptera: Lycaenidae) from pinned museum specimens. Australian Journal of Zoology 51: 331-340.
- Eastwood, R., Pierce, N., Kitching, R. y Hughes, M. (2006). Do ants enhance diversification in lycaenid butterflies? Phylogenetic evidence from a model myrmecophile, *Jalmenus evagoras*. Evolution 60: 315-327.
- Ellers, J. y Boggs, C. (2002). The evolution of wing color in *Colias* butterflies: heritability, sex linkage, and population divergence. Evolution 56: 836-840.
- ESRI. (1998). ArcView GIS. Versión 3.1
- Fitzpatrick, J. (2010). Subspecies are for convenience. Ornithological Monographs 67: 54-61.
- Funk, W., Mullins, T. y Haig, S. (2007). Conservation genetics of snowy plovers (*Charadrius alexandrinus*) in the Western Hemisphere: population genetic structure and delineation of subspecies. Conservation genetic 8: 1287-1309.
- Gavin, T., Sherman, P., Yensen, E. y May, B. (1999). Population genetic structure of the northern Idaho ground squirrel (*Spermophilus brunneus brunneus*). Journal of Mammalogy 80: 156-168.
- Gilbert, S. (2003). Biología del Desarrollo. 7ª ed. Buenos Aires, Médica Panamericana.
- Gloger, C. (1833). Das abändern der vögeldurcheinfluss des klimas. Breslau, Alemania.

- Godman, C. y Salvin, O. (1968). On some new Species of Diurnal Lepidoptera from South America. *The Annals and Magazine of Natural History* 2: 150.
- Gómez-Garcés, J., Gil, Y., Burillo, A., Wilhelmi, I. y Palomo, M. (2012). Cuadros clínicos asociados a bacteriemia causada por las nuevas especies incluidas en el antiguo grupo *Streptococcus bovis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30: 175-179.
- Gunn, A. (1998). The determination of larval phase coloration in the African armyworm, *Spodoptera exempta* and its consequences for thermoregulation and protection from UV light. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 125-133.
- Haig, S., Beever, E., Chambers, S., Draheim, H., Dugger, B., Dunham, S., Elliott-Smith, S., Fontaine, J., Kesler, D., Knaus, B., Lopes, I., Loschl, P., Mullins, T. y Sheffield, L. (2006). Taxonomic Considerations in Listing Subspecies Under the U.S. Endangered Species Act. *Conservation Biology* 20: 1584-1594.
- Haig, S., Mullins, T. y Forsman, E. (2004). Subspecific relationships and genetic structure in the spotted owl. *Conservation Genetics* 5: 683-705.
- Halffter, G. (1976). Distribución de los insectos en la zona de transición Mexicana: Relaciones con la entomofauna de Norteamérica. *Folia Entomológica Mexicana* 35: 1-62.
- Halffter, G. y Morrone, J. (2017). An analytical review of Halffter's Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa* 4226: 1-46.
- Hamilton, A., Keith, S. y Kent, H. (1994). Swallowtail butterflies of the Americas: A study in Biological Dynamics, Ecological Diversity, Biosystematics, and Conservation. Scientific Publishers, Estados Unidos.
- Hernández, F., Serna, F., Vergara, E., Lamas, G. y González, J. (2012). New records of giant butterfly-moths (Lepidoptera: Castniidae) from Colombia with general notes on natural history. *Revista colombiana de entomología* 38: 162-163.
- Howe, W. (1975). *The butterflies of North America*. Doubleday and Company Inc. Nueva York, Estados Unidos.



- Hurst, G. y Jiggins, F. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 1525-1534.
- Jari, O., Guillaume, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E. y Wagner, H. (2016). *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-1. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Kendall, D. (1977). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability* 9: 428-430.
- Kingsolver, J. (1983). Thermoregulation and flight in *Colias* butterflies: elevational patterns and mechanistic limitations. *Ecology* 64: 534-545.
- Kingsolver, J. y Wiernasz, D. (1991). Seasonal polyphenism in wing melanin pattern and thermoregulatory adaptation in *Pieris* butterflies. *The American Naturalist* 137: 816-830.
- Kitthawee, S. y Rungsri, N. (2011). Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species of Thailand. *Science Asia* 37: 308-313.
- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum sistema sexuale digestas*. Laurentii Salvii 2: 536.
- Llorente-Bousquets, J. (1983). Sinopsis sistemática y biogeográfica de los Dismorphiinae de México con especial referencia al Género *Enantia* Hübner (Lepidoptera: Pieridae). *Folia Entomológica Mexicana* 58: 3-206.
- Llorente-Bousquets, J. (1986). Las razas geográficas de *Pereute charops* (Boisduval, 1836) con la descripción de una nueva subespecie. *Anales Instituto de Biología, UNAM* 1: 245-258.
- Llorente-Bousquets, J. (1988). Las poblaciones de *Rhetus arcus* en México con notas sobre las subespecies sudamericanas (Lepidoptera: Lycaenidae, Riodininae). *Anales Instituto de Biología, UNAM* 58: 241-258.

- Llorente-Bousquets, J. y Escalante-Prieto, P. (1992). Insular biogeography of submontane humid forest in Mexico. *Biogeography of Mesoamerica*. The EO Painter Printing, Florida.
- Llorente-Bousquets, J. y Luis-Martínez, A. (1992). Distribución de *Consul electra* con una subespecie nueva de México (Nymphalidae: Charaxinae: Anaeini). *Anales Instituto de Biología, UNAM* 63: 237-247.
- Llorente-Bousquets, J., Luis, A. y Gonzales, L. (1992). Diferenciación de *Prepona deiphile* en mesoamérica y descripción de dos supespecies nuevas (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tropical Lepidoptera* 3: 109-114.
- Llorente-Bousquets, J., Luis-Martínez, A. y González-Cota, L. (1992). Diferenciación de *Prepona deiphile* en Mesoamérica y descripción de dos subespecies nuevas (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tropical Lepidoptera* 3:109-114.
- Llorente-Bousquets, J., Oñate-Ocaña, L., Luis-Martínez, A. y Vargas-Fernández, I. (1997). Papilionidae y Pieridae de México: Distribución geográfica e ilustración. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Primera edición.
- Luis-Martínez, A., Llorente-Bousquets, J. y Vargas-Fernández, I. (1996). Distribución geográfica, estacionalidad y comportamiento de *Diaethria asteria* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tropical Lepidoptera* 7: 39-44.
- Mallet J. (2007). Subspecies, semispecies, superspecies. En: Levin S, ed. *Encyclopedia of biodiversity*, Volumen 5. Londres: Academic Press. Pp. 523-526.
- Manier, M. (2004). Geographic variation in the long-nosed snake, *Rhinocheilus lecontei* (Colubridae): beyond the subspecies debate. *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 65-85.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Marcus, L. (1990). Traditional morphometrics. En: Rohlf, F. y Bookstein, F. *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, Pp. 77-122.
- Mayr, E. (1982). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, Nueva York.

- McVaugh, R. (1961). Euphorbiaceae novae Novo-Galiciana. *Brittonia* 13: 145-205.
- Miguel, I., Baylac, M., Iriando, M., Manzano, C., Garnery, L. y Estonba, A. (2010). Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* 42: 150-161.
- Monroe, B. (1982). A modern concept of the subspecies. *Auk* 99: 608-609.
- Montanucci, R. (1992). Commentary on a proposed taxonomic arrangement for some North American amphibians and reptiles. *Herpetological Review* 23: 9-10.
- Monteiro, L., Diniz-Filho, J., Dos Reis, S. y Araújo, E. (2002). Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution* 56: 563-72.
- Moritz, C. (2002). Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Processes That Sustain It. *Systematic Biology* 51: 238-254.
- Morrone, J., Espinoza, D. y Llorente-Busquets, J. (2002). Mexican biogeographic provinces: Preliminary scheme, general characterizations, and synonymies. *Acta zoológica Mexicana* 85: 83-108.
- Mulcahy, D. (2008). Phylogeography and species boundaries of the western North American Night snake (*Hypsiglenatorquata*): Revisiting the subspecies concept. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1095-1115.
- O'Brien, S. y Mayr, E. (1991). Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science* 251: 1187-1188.
- Oliver, J., Tong, X., Gall, L., Piel, W. y Monteiro, A. (2012). A single origin of Nymphalid butterfly eyespots followed by widespread loss of associated gene expression. *Plos Genetics* 8:1-7.
- Pasquet, R. (1999). Genetic relationships among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. *Theoretical Applied Genetics* 98: 1104-1119.
- Patten, M. y Unitt, P. (2002). Diagnosability versus mean differences of sage sparrow subspecies. *The Auk* 119: 26-35.
- Phillimore, A. y Owens, I. (2006). Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proceedings of the Royal Society B* 273: 1049-1053.

- Phillimore, A., Owens, I., Black, R., Chittock, J., Burke, T. y Clegg, M. (2008). Complex patterns of genetic and phenotypic divergence in an island bird and the consequences for delimiting conservation units. *Molecular Ecology* 17: 2839-2853
- Proshok, B., Dupuis, J., Engberg, A., Davenport, K., Opler, P., Powell J. y Sperling, F. (2015). Genetic evaluation of the evolutionary distinctness of a federally endangered butterfly, Lange's Metalmark. *Evolutionary Biology* 73: 1-15.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Versión 3.3.2. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rohlf, F. (2008). Morphometric software (data acquisition, generalized Procrustes analysis, Multivariate multiple regression of shape into independent variables, Relative warps analysis, Thin-plate spline, utilities). Department of Ecology and Evolution. SUNY at Stony Brook, Nueva York. Disponible en <http://www.life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf, J. (2004). tpsDig, versión 1.40. Disponible en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rothschild, W. y Jordan, K. (1895). A revision of the Papilios of the eastern hemisphere, exclusive of Africa. *Novitates Zoologicae* 2: 167-463.
- Rothschild, W. y Jordan, K. (1906). A revision of the American Papilios. En: Rothschild, W., Harterer, E. y Jordan, K. *Novitates Zoologicae*. Journal of zoology. Londres. Pp. 698-700.
- Rzedowski, J. y McVaugh, R. (1966). La vegetación de la Nueva Galicia. *Ann Arbor* 9:1-127.
- Saint-Hilaire, A. (1825). *Flora Brasiliae meridionalis*. Paris 1: 28-29.
- Sanzana, M., Parra, L., Sepúlveda, E. y Benítez, H. (2013). Latitudinal gradient effect on the wing geometry of *Auca coctei* (Guérin)(Lepidoptera, Nymphalidae). *Revista Brasileira de Entomología* 57:411-416.
- Schmidt, D. y Hughes, J. (2006). Genetic affinities among subspecies of a widespread Australian lycaenid butterfly, *Ogyris amaryllis* (Hewitson). *Australian Journal of Zoology* 54: 429-446.
- Sheets. (2002). Morphometrics Software: IMP6-Integrated Morphometrics Package.

- Shephard, J., Hughes, J. y Zalucki, M. (2002). Genetic differentiation between Australian and North American populations of the monarch butterfly *Danaus plexippus* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae): an exploration using allozyme electrophoresis. *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 437-452.
- StatSoft. (2010). STATISTICA data analysis software system. Edition version 10.
- Stern, D. (2000). Perspective: evolutionary developmental biology and the problem of variation. *Evolution* 54: 1079-1091.
- Tofilski, A. (2008). Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie* 39: 558-563.
- Torcida, S. y Pérez, S. (2012). Análisis de Procrustes y el estudio de la variación Morfológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica* 14: 131-141.
- Toro-Ibacache, M., Manriquez-Soto, G. y Suazo-Galdames, I. (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.
- Vane, R. (2003). Indifferent Philosophy versus Almighty Authority: On consistency, consensus and unitary taxonomy. *Systematics and Biodiversity* 1: 3-11.
- Vargas, R., Ya-Umphun, P., Phumala-Morales, N., Komalamisra, N. y Dujardin J. (2010). Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 580-585.
- Vargas-Fernández, I., Luis, A. y Llorente, J. (2012). Una nueva subespecie de *Heraclides androgeus* (Lepidoptera: Papilionidae) y sus aspectos biogeográficos. *Revista de Biología Tropical* 61: 711-733.
- Vargas-Fernández, I., Llorente-Bousquets, J. y Luis-Martínez, A. (2016). Adiciones a la serie Papilionoidea de México: distribución geográfica e ilustración. Las prensas de Ciencias. México.
- Willey, E. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic zoology* 27: 17-26.
- Willmott, K. y Hall, J. (2013). A new species and two new subspecies of *Adelpha* Hübner, (1819) from the tropical Andes (Nymphalidae: Limenitinae). *Journal of the lepidopterists Society* 67: 241-252.

- Wilson, E. y Brown, W. (1953). The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology* 2: 97-111.
- Winker, K. (2010). Subspecies represent geographically partitioned variation, a gold mine of evolutionary biology, and a challenge for conservation. *Ornithological Monographs* 67: 6-23.
- Yakovlev, R. (2012). Checklist of butterflies (Papilionoidea) of the Mongolian Altai Mountains, including descriptions of new taxa. *Nota Lepidopterológica* 35: 51-96.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, H. y Fink, W. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: A primer*. Elsevier Academic Press.
- Zheng, X., Yang, Q., Hu, Y., Lei, C. y Wang, W. (2015). Latitudinal variation of morphological characteristics in the swallowtail *Sericinus montelus* Gray, 1798 (Lepidoptera: Papilionidae). *Acta Zoologica* 96: 242-252.
- Zink, R. (1989). The study of geographic variation. *The Auk* 106: 157-160.
- Zink, R. (2004). The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London B* 271: 561-564.
- Zink, R., Barrowclough, G., Atwood, J. y Blackwell, R. (2000). Genetics, Taxonomy, and Conservation of the Threatened California Gnatcatcher. *Conservation Biology* 14: 1394-1405.

## ANEXO 1

Datos de los ejemplares utilizados en el análisis de morfometría geométrica. Número de catálogo del MZFC, sexo y localidad del material utilizado en los análisis morfométricos y geográficos.

### *Protographium epidaus epidaus*

- Campeche:

- Ejido nuevo Becal (18.216, -89.833): 2♂ (#243279, #243280).

- Oaxaca:

- San José Chiltepec (17.911, -96.165): 2♂ (#31660, #31668).
- San Martín Soyolapan (17.667, -96.265): 1♀ (#67681).

- Puebla:

- La Ceiba (20.374, -97.842): 4♂ (#67682, #67684, #67685, #67686).
- Tequezquitla (20.25, -97.883): 1♂ (#67668).

- San Luis Potosí:

- Matlapa (21.328, -98.793): 1♂ (#64891).
- Palitla (21.271, -98.751): 1♀ (#64895).

- Veracruz:

- Monte San Marcos (19.659, -96.846): 1♂ (#64403).
- Región de Catemaco (18.375, -94.986): 27 ♂ (#35761, #35765, #35766, #35771, #35783, #35784, #35785, #35793, #35794, #35795, #35803, #35806, #35807, #35808, #35809, #35810, #35811, #35812, #244472, #244478, #244485, #244492, #244500, #244503, #244504, #244508, #244509)
- Santa Rosa (19.05, -96.5): 3♂ (#43890, #43891, #43892).

### *Protographium epidaus fenochionis*

- Chiapas:

- Mirador Sumidero (16.83, -92.92): 1♀ (#57485).

- Palenque (17.49, -91.943): 4♂ (#64876, #64878, #64880, 1 sin No. de catálogo)
- Guerrero:
- Atoyac de Álvarez (17.207, -100.467): 3♂ y 1♀. (#43911, #43912, #43917, #43916).
  - Hacienda Taxco Viejo (18.463, -99.561): 1♂ (#43910).
  - Tlalchapa (18.402, -100.471): 1♂ (sin No. de catálogo).
- Michoacán:
- Los Chorros del Varal (19.495, -102.546): 2♂ (#57645, 1 sin No. de catálogo).
  - Toscano (18.6, -102.516): 9♂ (#224575, 8 sin No. de catálogo).
  - Las Juntas (18.387, -102.223): 2♂ (#224574, 1 sin No. de catálogo).
  - Baden de Neixpa (18.093, -102.757): 1♂ (sin No. de catálogo).
  - Cupatitzio (19.351, -102.063): 1♂ (sin No. de catálogo).
- Morelos:
- Coatlán del Río (18.713, -99.413): 4♂ (#43903, #43904, #43905, 1 sin No. de catálogo).
  - Cuernavaca (18.959, -99.243): 1♂ (#43908).
  - Palmira (18.836, -99.208): 1♂ (#43909).
  - Yauatepec (18.899, -99.057): 3♂ (#43906, #43907, #57712).
- Oaxaca:
- Chimalapas (16.879, -94.671): 1♂ (#43915).
  - El Arrollo (16.463, -94.523): 2♂ (#31641, #31642).
  - Huatulco (15.834, -96.144): 10♂ (#31635, #31637, #31644, #31645, #31649, #31655, #31656, #64875, #64877, #64888).
  - La Soledad (15.984, -96.526): 1♂ (#31631).
  - Loxicha (15.888, -96.472): 3♂ (#64882, #64886, 1 sin No. de catálogo).
  - Presa Benito Juárez (16.425, -95.383): 1♂ (#31647).



- Zipolite (16.403, -94.488): 16♂ (#31636, #31638, #31639, #31640, #31646, #31648, #31650, #31651, #31652, #31653, #31654, #31657, #64883, #64884, #64885, #64887).

*Protographium epidaus tepicus*

- Colima:

- Agua Dulce (19.266, -103.883): 8♂ (#43918, #43919, #43920, #43921, #43922, #43923, #43924, 1 sin No. de catálogo).
- La salada (19.051, -103.757): 2♂ y 1♀. (#52619, #52622, #52620).

- Jalisco:

- Ahuatlán (19.651, -104.312): 2♂ y 1♀ (#43939, #43940, 1 sin No. de catálogo).
- Guadalajara (20.638, -103.301): 2♀ (#43942, 1 sin No. de catálogo).
- La Calera (19.575, -104.416): 2♂. (#43941, 1 sin No. de catálogo).

- Michoacán:

- Parácuaro (19.141, -102.211): 1♂ (sin No. de catálogo).

- Nayarit:

- Mecatán (21.515, -105.114): 1♂ (#43945).
- Jumatán (21.618, -105.031): 2♂ y 1♀ (#43944, 43943, 1 sin No. de catálogo).
- El Palillo (21.646, -105.165): 19 ♂ y 2♀ (#43926, #43927, #43928, #43930, #43931, #43933, #43934, #43935, #43936, #43937, #43938, #43929, 9 sin No. de catálogo).
- Singayta (21.553, -105.218): 2♂ (#43946, 1 sin No. de catálogo).