



UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

INSTITUTO DE ENTOMOLOGÍA



Tesis: “Variación espacial de la forma corporal en escarabajos del género *Ceroglossus* (Coleoptera: Carabidae) en una zona de alta diversidad cromática de la Araucanía Andina, sur de Chile”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
ENTOMOLOGÍA

Por:

Fabián Ramírez Ibarra

Director/a de Tesis

Carlos Muñoz

Ramírez

Co-Director/a de Tesis

SANTIAGO – CHILE

Mayo 2024

INSTITUTO DE ENTOMOLOGÍA UMCE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa al Instituto de Entomología que la Tesis de Magíster presentada por el candidato,

Fabián Patricio Ramírez Ibarra

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias con Mención en Entomología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 31, de mes Mayo del año 2024

Director de Tesis:

Carlos P. Muñoz Ramírez

Calificación:

Firma:

Comisión evaluadora de Tesis:

Nombre

Cristian Villagra

Calificación:

Firma:

Nombre

Hugo Benítez

Calificación:

Firma:



IDENTIFICACIÓN DE TESIS/INVESTIGACIÓN

Título de la tesis: Variación espacial de la forma corporal en escarabajos del género *Ceroglossus* (Coleoptera: Carabidae) en la zona de la Araucanía Andina, sur de Chile.

Fecha: 31 de Mayo del 2024

Facultad: Ciencias

Departamento: Instituto de Entomología.

Programa: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Grado: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Profesor Director de Tesis: Carlos Muñoz Ramírez

Profesor Co-Director de Tesis:

AUTORIZACIÓN

Se autoriza la reproducción total o parcial de este trabajo de investigación para fines académicos por cualquier medio o procedimiento, siempre que se haga la referencia bibliográfica que acredite el presente trabajo y sus autores/as, y a su vez el alojamiento de éstos en el repositorio institucional SIBUMCE del sistema de bibliotecas UMCE.

Fabián Ramírez Ibarra

Santiago de Chile, de Mayo, 2024.

DEDICATORIA

“Es extraño que sólo las personas extraordinarias hagan descubrimientos que luego aparecen de manera fácil y sencilla” – Georg Lichtenberg (1742-1799).

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi padre Patricio Marcelo Ramírez Benavides, aunque no esté físicamente conmigo, vive siempre en mis memorias y habita en mis recuerdos para poder seguir motivándome y hacer las cosas que más amo. A mi familia, por haberme dado la oportunidad de formarme como investigador en esta prestigiosa universidad y haber sido mi apoyo durante todo este tiempo.

A mi pareja por estar ahí conmigo incluso en los momentos más turbulentos. Esta tesis no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían, te lo agradezco muchísimo amor.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al laboratorio del Dr. Hugo Benítez por ayudarme a entender mejor la metodología y análisis de Morfometría Geométrica, al Dr. Paul Bitton por acogerme y ayudarme en mi pasantía en Canadá y también por ayudarme a entender el concepto de Color y como esto se puede cuantificar, y a mi profesor de tesis Carlos Muños Ramírez, por ayudarme y apoyarme en este gran desafío, en donde me guío, enseñó y motivo a terminar esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. FORMULACIÓN GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS.....	15
V. CAPÍTULO 1: Revisión Bibliográfica del modelo de estudio y sobre los procesos microevolutivos que podrían estar involucrados en sus diferencias cromáticas.....	16
Aspectos teóricos sobre los procesos de Selección Natural	16
1) Los escarabajos del género <i>Ceroglossus</i> (Coleoptera: Carabidae)	18
2. El color en los <i>Ceroglossus</i> : Origen y mecanismos que pueden influir en la variación geográfica de la coloración.	23
3. Estado del arte sobre la Morfometría Geométrica.....	25
VI. CAPÍTULO 2: Variación espacial de la forma corporal en escarabajos del género <i>Ceroglossus</i> (Coleoptera: Carabidae) en una zona de alta diversidad cromática de la Araucanía Andina, sur de Chile.	26
VII. RESUMEN	26
VIII. INTRODUCCIÓN	27
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	30
1) Área de estudio	30
2) Métodos de colecta.....	32
3) Obtención y Análisis de datos.....	33
XI. DISCUSIÓN.	42
XII. CONCLUSIÓN.....	44
XIII. REFERENCIAS.....	45
XIV. Anexos	53

RESUMEN

Para explicar la existencia de elevada variabilidad fenotípica (*e.g.* variación de color) y sobre todo cuando esta variación ocurre de forma estructurada geográficamente (por ejemplo, los morfotipos geográficos), se han propuesto dos hipótesis principales:

i) La existencia de una fuerte selección natural a nivel local (adaptación local), y ii) La existencia de barreras no selectivas (*e.g.* geográficas) que impedirían el flujo génico. Estos mecanismos podrían generar y mantener una alta diversidad a nivel regional explicando la mantención de diferentes fenotipos, aunque la importancia relativa de ellos debe ser evaluada con herramientas cuantitativas y rigor estadístico. Los escarabajos del género *Ceroglossus*, que habitan bosques del centro y sur de Chile, son un excelente modelo de estudio para poner a prueba estas hipótesis, debido a que poseen una extraordinaria diversidad fenotípica caracterizada por la existencia de decenas de razas geográficas de distinto color. Además, las especies de *Ceroglossus* poseen defensas químicas y colores llamativos, que en conjunto usarían para alejar a potenciales depredadores (aposematismo), lo que sugeriría un posible rol de la selección natural (y la adaptación local) en su diversificación fenotípica. En este estudio se pretende analizar la variación fenotípica (forma general del cuerpo) de *Ceroglossus chilensis* (Eschscholtz, 1829) (Coleoptera: Carabidae) a través de la distribución de dos subespecies con distribución adyacente con el objetivo de evaluar el rol de potenciales barreras a la dispersión. La selección natural juega un rol en la mantención de las diferencias en color entre dos subespecies o razas geográficas. Para realizar este estudio, se analizaron ejemplares de *Ceroglossus chilensis* en áreas de la Araucanía Andina, donde confluyen dos subespecies o razas que difieren en color y se realizaron análisis morfológicos (morfometría geométrica) para evaluar si existen diferencias entre un carácter que está presumiblemente bajo selección divergente (color) y otro que no (forma).

Palabras clave: *Ceroglossus chilensis*, Morfometría Geométrica, Alometría, Color.

ABSTRACT

To explain the existence of high phenotypic variability (e.g. color variation) and especially when this variation occurs in a geographically structured way (e.g. geographic morphotypes), two main hypotheses have been proposed:

(i) The existence of strong natural selection at the local level (local adaptation), and (ii) The existence of non-selective barriers (e.g. geographic) that would impede gene flow. These mechanisms could generate and maintain high diversity at the regional level if different phenotypes are selected in different localities. The beetles of the genus *Ceroglossus*, which inhabit forests in central and southern Chile, are an excellent study model to test these two hypotheses, because they possess an extraordinary phenotypic diversity characterized by the existence of dozens of geographic races of different colors. In addition, *Ceroglossus* species possess chemical defenses, which they would use to ward off potential predators, making them aposematic species, i.e., species with chemical defenses that warn their predators of this condition by means of striking colors, which would suggest a possible role of natural selection in their phenotypic diversification. This study aims to analyze the phenotypic variation (general body shape) of *Ceroglossus chilensis* (Eschscholtz, 1829) (Coleoptera: Carabidae) across the distribution of two subspecies with adjacent distribution in order to assess whether natural selection (as opposed to barriers to dispersal) is playing a role in maintaining the differences in color of the two subspecies. To carry out this project, specimens of *Ceroglossus chilensis* were analyzed in areas of the Andean Araucania, where two subspecies or races that differ in the color of the dorsal area converge, and morphological analyses (geometric morphometry) were carried out to evaluate if there are differences between a character that is presumably under divergent selection (color) and another that is not (morphology).

Key words: *Ceroglossus chilensis*, Geometric Morphometry, Allometry, Color.

I. FORMULACIÓN GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

Los cambios evolutivos son el resultado de una variedad de procesos como el flujo génico, la deriva génica, la mutación y, predominantemente, por la selección natural (Futuyma, 1979).

La selección natural incide en el cambio de frecuencia de los genes gracias a la reproducción diferencial entre los individuos que presentan alelos distintos, y está determinada por la aptitud de los individuos, que se define como su éxito reproductivo o capacidad de legar alelos a la siguiente generación. De esta manera la recombinación de los alelos que se da en la reproducción sexual determina la variabilidad fenotípica de la población (Audesirk *et al.* 1997).

En biología evolutiva se habla de selección dependiente de la frecuencia cuando la eficacia biológica de una determinada estrategia (e.g., rasgos morfológicos, conductuales, u otros, y/o combinaciones de ellos) varía con la frecuencia relativa de otras estrategias en la población (Heino *et al.* 1998). La selección dependiente de la frecuencia puede ser negativa cuando la aptitud del fenotipo aumenta al verse más escasos y es positiva cuando la aptitud del fenotipo aumenta cuando se vuelve más común, es decir, la selección dependiente de la frecuencia va a ocasionar una variabilidad morfológica.

La comprensión de la variación morfológica intraespecífica tiene importancia ecológica-evolutiva, específicamente si es de naturaleza clinal y de micro y meso escala geográfica (Johanesson *et al.* 1993). Sobre la base de observaciones a micro y mesoescala espacial, manipulaciones experimentales o traslado de individuos a distintas condiciones ambientales, se ha podido demostrar que estas diferencias son mantenidas por procesos selectivos (Achituv & Mizrahi, 1987, Johanesson *et al.* 1993).

Cuando las poblaciones pierden tamaño, la probabilidad de que ocurran cambios en las frecuencias de los alelos por azar aumenta, lo que se conoce como deriva genética. En otras palabras, “para permanecer en equilibrio, la población debe ser tan grande que los sucesos fortuitos no tengan impacto en su composición genética general” (Audesirk *et al.* 1997), la deriva genética también se da por medio de un cuello de botella genético, que es un evento que reduce el tamaño de la población y que puede ser ajeno a las fuerzas de la

selección natural. Si tiene lugar por el establecimiento de una nueva población aislada a partir de una existente, se conoce como efecto fundador (Lawrence, Valcarce & Nuño, 2003; The McGraw Hill Companies, 2003).

En el modelo de estudio corresponde al Coleóptero del género *Ceroglossus*, serían idóneos para estudiar los procesos mencionados anteriormente debido a que los *Ceroglossus* presentan morfotipos definidos y que estarían bajo selección, además este género posee una alta variación de morfotipos intraespecífica en distancias geográficas cortas.

En esta investigación se trabajarán con poblaciones de *Ceroglossus*. Los *Ceroglossus* son conocidos como “peorros” debido a que su estrategia de defensa consiste en la expulsión de un líquido maloliente. Este líquido proviene de las glándulas anales y está compuesto por ácido butírico junto a otros compuestos fétidos (Xu *et al.* 2019). Esto, sumado a una elevada diversidad de colores metálicos y llamativos, que se encuentran formado subespecies o morfotipos geográficos, sugiere la existencia de aposematismo (Jiroux. 2006; Muñoz Ramírez *et al.* 2016).

Los *Ceroglossus chilensis* poseen una elevada diversidad de colores metálicos y llamativos, que se encuentran formado subespecies o morfotipos geográficos, sugiere la existencia de aposematismo (Jiroux. 2006; Muñoz Ramírez *et al.* 2016).

El color es un rasgo rico en información sobre el fenotipo y adecuación biológica de los organismos por lo que son fuente de datos sobre la ecología y evolución de distintos grupos y de fenómenos naturales como el camuflaje, mimetismo, polinización, señalización, atracción de pareja, infección por patógenos y termorregulación, entre otros (Cuthill *et al.*, 2017; Lui & Nizet, 2009; Clegg & Durbin, 2000; Smith & Goldberg, 2015; Smith *et al.*, 2016; Bechel, Rivard & Sánchez Azofeifa, 2002; Lev-Yadun, *et al.*, 2004; Pérez-De la Fuente, *et al.*, 2012; Stevens, Lown & Wood, 2014; Chiao *et al.*, 2011; Brady *et al.*, 2015; Troscianko *et al.*, 2016).

En el caso de los *Ceroglossus*, el color es mayoritariamente del tipo estructural, formado por una estructura de multicapas en la superficie cuticular dorsal del insecto (Luna *et al.* 2010).

Existe una enorme variación de colores en *Ceroglossus*, la que se estructura geográficamente.

Es decir, hay mayor variación entre áreas geográficas distintas que dentro de la misma área geográfica, para la mayoría de las especies. Por ejemplo, en la zona de la cordillera de Nahuelbuta, hay especies cuyos morfotipos son rojos, mientras que en la zona de Malancahuello, a pocos kilómetros, poseen morfotipos azules y verdes. Okamoto *et al.* (2001) sugirieron que existe convergencia evolutiva en el color de algunas especies en simpatria, lo que fue confirmado posteriormente por Muñoz Ramírez *et al.* (2016) mediante análisis filogenéticos y cuantificación del color mediante espectrofotometría, hipotetizándose que este patrón de convergencia se debería a mimetismo Mulleriano.

En esta investigación se trabajará con una metodología de Morfometría Geométrica (MG). Como afirma Villalobos & Benítez (2020) que la morfometría geométrica es una herramienta que permite evaluar las variaciones morfológicas con factores subyacentes, lo que permite detectar mínimos cambios de variación morfológica.

En biometría la definición del concepto de “forma” se ha modificado y precisado. El estadístico David G. propone la definición fundamental sobre la que se basa la morfometría geométrica (Kendall, 1977): “Forma es toda la información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación de un objeto”.

La forma resultante en la MG, puede entregar importante información, como la adaptación a las presiones ambientales y reproductivas (Kaliontzopoulou *et al.* 2010; Weaver & Gunz, 2018), así como también los rasgos que son más bien de carácter plesiomórficos y que permiten estimar grado de similitud entre individuos de distintos grupos o localidades (Fernández Mazuecos *et al.* 2013; Kaliontzopoulou *et al.* 2010). Esto hace que la MG sea una herramienta útil y sencilla para evaluar similitudes y diferencias de carácter morfológico y ecológico entre individuos, grupos de la misma especie, entre especies distintas, poblaciones, etc. (Benítez & Püschel, 2014; Toro Ibacache *et al.* 2010) y permite realizar estudios de delimitación de especie y variaciones interespecíficas (Zuñiga Reinoso & Benítez, 2015).

El método más difundido para estudiar la alometría en morfología geométrica es la regresión multivariada de la forma sobre el tamaño del centroide (p. ej., Monteiro, 1999; Rosas &

Bastir, 2002; Drake & Klingenberg, 2008; Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2011; Weisensee & Jantz, 2011; Klingenberg *et al.*, 2012; Ponssa & Candiotti, 2012; Mitteroecker *et al.*, 2013; Murta-Fonseca & Fernandes, 2016). Dado que el tamaño y la forma están lógicamente separados, el análisis de regresión multivariables puede probar si existe una asociación estadística entre ellos y, de ser así, proporciona una caracterización de la alometría como el cambio de forma esperado por unidad de aumento en la variable de tamaño.

Con respecto a los antecedentes teóricos dados, se formuló la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se relaciona la morfología y el color en los *Ceroglossus chilensis* colectados en las localidades de la Araucanía Andina en los veranos 2021 y 2022?, en la cual, se formuló que las diferencias en colores entre poblaciones adyacentes son mantenidas por selección positiva dependiente de la frecuencia. Cuando ya existen dos fenotipos distintos en áreas distintas, la selección afecta más fuertemente a los individuos que migran, es decir, hay una fuerte selección natural en favor de colores locales (fenotipo de mayor frecuencia) y una fuerte selección en contra de los colores inmigrantes (fenotipos de menor frecuencia). Como el blanco de la selección es el color, el análisis de otros caracteres fenotípicos no relacionados con el color, como por ejemplo los caracteres morfológicos, debería resultar en diferencias no significativas entre razas de distinto color y también que la diferenciación de color entre poblaciones adyacentes es mantenida porque existen barreras no selectivas que impiden el flujo génico y por ende la homogeneización de las diferencias fenotípicas, aunque el tipo de barrera no pueda ser determinado, la existencia de por barreras no selectivas debieran tener un efecto en todo el genoma, y por lo tanto, las diferencias también deberían observarse en otros caracteres fenotípicos (e.g. morfometría geométrica), por el cual, se busca investigar los mecanismos que explican la notable diferencia de color entre poblaciones adyacentes de *Ceroglossus chilensis*.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el extremo sur de Sudamérica, en los bosques de *Nothofagus* (fig. 2) existe un género endémico de Carabidae llamado *Ceroglossus* (fig. 1) y que está constituido por ocho especies, en general las especies de *Ceroglossus*. Este género de Coleóptero presenta una elevada diversidad de colores metálicos y llamativos (fig. 1), que se encuentran formado subespecies o morfotipos geográficos (fig 3 y 4), que siguiere la existencia de aposematismo (Jiroux, 2006; Muñoz Ramírez *et al.* 2016).

Existe una gran variedad de colores en los *Ceroglossus*, la que se estructuran geográficamente, es decir, hay una mayor variación entre áreas geográficas distintas que dentro de la misma área geográfica, para la mayoría de las especies (fig. 5).

En la cual se planteó el objetivo de investigar los mecanismos que explican la notable diferencia de color entre poblaciones adyacentes de *Ceroglossus chilensis*.

La problemática que sustenta ésta investigación, radica principalmente en las localidades de la Araucanía Andina, cercanas a las comunas de Curacautín y Lonquimay durante los veranos del año 2021 y 2022 (fig. 5 y tabla 1); considerando los antecedentes previamente expuestos se identifica el siguiente problema: Existen *Ceroglossus chilensis* que presentan coloraciones diferentes coexistiendo en la misma zona geográfica, siendo la misma especie.

Es por lo anterior, que la relevancia radica en las comunas cercanas debido a la diversidad de colores presentes a una distancia no tan lejana. Por tanto, este tipo de investigación podría aportar en la relación de la forma y color en *Ceroglossus chilensis*, aportar si podría existir la diferenciación de color entre las poblaciones por la existencia de barreras no selectivas y en usar las metodologías y softwares necesarios para aportar aún más en las futuras investigaciones relacionadas con la morfometría geométrica (variación de la forma).

En biometría la definición del concepto de “forma” se ha modificado y precisado. El estadístico David G. propone la definición fundamental sobre la que se basa la morfometría geométrica (Kendall, 1977): “Forma es toda la información geométrica que

resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación de un objeto”.

La aplicación de la estadística multivariada al estudio de la covariación de la forma con sus factores casuales dio un gran paso con el uso de datos multidimensionales que logran capturar la geometría de la estructura del objeto, por ello, el análisis con morfometría geométrica permite realizar interpretaciones de alto significado biológico, de las diferencias entre individuos, poblaciones, etc. (Toro Ibacache *et al.*, 2010), es decir, la forma resultante en la morfometría geométrica, puede entregar importante información, como la adaptación a las presiones ambientales y reproductivas (Kaliontzopoulou *et al.*, 2010; Weaver & Gunz, 2018), así como también los rasgos que son más bien de carácter plesiomórficos y que permiten estimar grado de similitud entre individuos de distintos grupos o localidades (Fernández Mazuecos *et al.*, 2013; Kaliontzopoulou *et al.*, 2010).

La morfometría geométrica se utiliza para determinar la “forma pura” en un individuo o estructura, mediante puntos discretos en el espacio y bien definidos llamados Landmarks (Zelditch *et al.*, 2004). Al realizar este tipo de análisis no se ve afectado el tamaño del individuo, así como tampoco por su rotación ni escala, por lo que la forma del objeto en estudio no se describe en términos de sus dimensiones, sino que de la relación espacial entre sus partes (Toro Ibacache *et al.*, 2010; Zelditch *et al.*, 2004). Lo último permite realizar estudios de delimitación de especie y variaciones interespecíficas (Zúñiga Reinoso & Benítez, 2015).

Para finalizar y en base a todos los antecedentes presentados, se desprende la siguiente pregunta de investigación, ¿Cuál es la relación que existe entre la morfología y el color en los *Ceroglossus chilensis* colectados en las localidades de la Araucanía Andina en los veranos 2021 y 2022?

III. HIPÓTESIS

H1: Las diferencias en colores entre poblaciones adyacentes son mantenidas por selección positiva dependiente de la frecuencia. Cuando ya existen dos fenotipos distintos en áreas distintas, la selección afecta más fuertemente a los individuos que migran, es decir, hay una fuerte selección natural en favor de colores locales (fenotipo de mayor frecuencia) y una fuerte selección en contra de los colores inmigrantes (fenotipos de menor frecuencia).

Predicción: Como el blanco de la selección es el color, el análisis de otros caracteres fenotípicos no relacionados con el color, debería resultar en diferencias no significativas entre razas de distinto color.

H2: La diferenciación de color entre poblaciones adyacentes es mantenidas porque existen barreras no selectivas que impiden el flujo génico y por ende la homogeneización de las diferencias fenotípicas.

Predicción: Aunque el tipo de barrera no pueda ser determinado, las existencias de barreras no selectivas debieran tener un efecto en todo el genoma, y, por lo tanto, las diferencias también deberían observarse en otros caracteres fenotípicos (e.g. morfometría geométrica).

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Investigar los mecanismos que explican la notable diferencia de color entre poblaciones adyacentes de *Ceroglossus chilensis*.

2. Objetivos específicos

- Cuantificar la morfología mediante morfometría geometría.
- Evaluar concordancia entre color y morfometría para inferir los procesos eco-evolutivos subyacentes.

V. CAPÍTULO 1: Revisión Bibliográfica del modelo de estudio y sobre los procesos microevolutivos que podrían estar involucrados en sus diferencias cromáticas.

Aspectos teóricos sobre los procesos de Selección Natural

- Variación morfológica intraespecífica

La comprensión de la variación morfológica intraespecífica tiene importancia ecológica-evolutiva, específicamente si es de naturaleza clinal y de micro y meso escala geográfica (Johanesson *et al.* 1993). Sobre la base de observaciones a micro y mesoescala espacial, manipulaciones experimentales o traslado de individuos a distintas condiciones ambientales, se ha podido demostrar que estas diferencias son mantenidas por procesos selectivos (Achituv & Mizrahi, 1987, Johanesson *et al.* 1993), o por modulaciones ambientales (Foster, 1979; Foster, 1980; Lively, 1986; Yund, 1991; West *et al.* 1993; De Wolf *et al.* 1997; Bertness *et al.* 1998; Sarda *et al.* 1998; Leonard *et al.* 1999). En consecuencia, para una adecuada interpretación ecológica o evolutiva de la diferenciación morfológica intraespecífica, es necesario estudiar sus componentes genéticos y ambientales. El modelo de estudio presenta una alta variación fenotípica a nivel de especie y entre las poblaciones en los lugares adyacentes.

- Selección Natural y Plasticidad Fenotípica

Los cambios evolutivos son el resultado de una variedad de procesos como el flujo génico, la deriva génica, la mutación y, predominantemente, por la selección natural (Futuyma, 1979). La selección natural puede entenderse como la correlación entre la variación en el fenotipo y la variación en el éxito reproductivo, es decir, en el número de descendientes que un individuo logra aportar durante toda su vida a la siguiente generación (Lewontin, 1970). La única condición para que la selección natural ocurra es la presencia de variación entre los individuos para un carácter en particular, por lo que, si un carácter no varía entre los individuos, entonces no podrá correlacionarse con las diferencias en el éxito reproductivo y, en consecuencia, el carácter no podrá ser sujeto de selección natural (Arnold, 1981).

La selección natural se define como el proceso que se da en una población de entidades biológicas cuando se cumplen las tres condiciones siguientes: (1) variación fenotípica entre los individuos de una población; (2) eficacia biológica diferencial asociada a la variación y (3) la herencia de la variación genética subyacente que permita la transcripción de los fenotipos seleccionados a la siguiente generación.

La selección natural incide en el cambio de frecuencia de los genes gracias a la reproducción diferencial entre los individuos que presentan alelos distintos, y está determinada por la aptitud de los individuos, que se define como su éxito reproductivo o capacidad de legar alelos a la siguiente generación. De esta manera la recombinación de los alelos que se da en la reproducción sexual determina la variabilidad fenotípica de la población (Audesirk *et al.* 1997).

En biología evolutiva se habla de selección dependiente de la frecuencia cuando la eficacia biológica de una determinada estrategia (e.g., rasgos morfológicos, conductuales, u otros, y/o combinaciones de ellos) varía con la frecuencia relativa de otras estrategias en la población (Heino *et al.* 1998). La selección dependiente de la frecuencia puede ser negativa cuando la aptitud del fenotipo aumenta al verse más escasos y es positiva cuando la aptitud del fenotipo aumenta cuando se vuelve más común.

Existen varios procesos que pueden explicar la variación geográfica del color, incluyendo la plasticidad fenotípica, selección natural o deriva genética. La plasticidad fenotípica es definida como la propiedad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Pigliucci, 2001), es decir, es la propiedad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales.

La plasticidad puede ser evolutiva o adaptativa, dependiendo de si el cambio es reversible o irreversible, si es reversible se denomina aclimatación al medio y si es irreversible se denomina plasticidad fenotípica propiamente dicha (Piersma & Drent, 2003).

La plasticidad será adaptativa en la medida en que, por término medio, los organismos plásticos sean más exitosos en sobrevivir y reproducirse que organismos no plásticos, en

una población que vive en un ambiente variable, en el modelo de estudio (*Ceroglossus*), el término de plasticidad fenotípica es poco probable debido a que los caracteres no son sensibles al cambio ambiental.

Cuando las poblaciones pierden tamaño, la probabilidad de que ocurran cambios en las frecuencias de los alelos por azar aumenta, lo que se conoce como deriva genética. En otras palabras, “para permanecer en equilibrio, la población debe ser tan grande que los sucesos fortuitos no tengan impacto en su composición genética general” (Audesirk *et al.* 1997).

La deriva genética también se da por medio de un cuello de botella genético, que es un evento que reduce el tamaño de la población y que puede ser ajeno a las fuerzas de la selección natural. Si tiene lugar por el establecimiento de una nueva población aislada a partir de una existente, se conoce como efecto fundador (Lawrence, Valcarce & Nuño, 2003; The McGraw Hill Companies, 2003).

En los *Ceroglossus* no se podría descartar la hipótesis de la deriva genética, debido a que la homogenización de las diferencias fenotípicas del color es mantenida entre las poblaciones adyacentes.

1) Los escarabajos del género *Ceroglossus* (Coleoptera: Carabidae)

Ceroglossus (Fig. 1) es un género de escarabajos endémicos de los bosques de *Nothofagus* del extremo sur de Sudamérica (Fig. 2) y está constituido por ocho especies: *C. chilensis* (Eschscholtz, 1829), *C. darwini* (Hope, 1837), *C. speciosus* (Gerstaecker, 1858), *C. magellanicus* (Géhin, 1885), *C. buqueti* (Laporte, 1834), *C. suturalis* (Fabricius, 1775), *C. ochsenii* (Germain, 1895) y *C. guerini* (Germain, 1895) (Jiroux 2006). De ellas *C. chilensis* presenta 26 subespecies distribuidas entre la Región del Maule y el extremo sur de la Región de Aysén (Fig. 3 y 4), y áreas argentinas adyacentes, suelen habitar en los bosques y pueden observarse caminando en el piso del bosque durante el día y la noche, aunque serían de preferencia nocturnos (Jiroux, 2006). En cuanto a su alimentación, tanto adultos como todos los estados larvarios, son principalmente depredadores (carnívoros) y se alimentan de lombrices y larvas de insectos en general (Jiroux, 2006). Además, Joseph (1931) y Ruíz (1936) señalan que los adultos de *C. chilensis* depredan desde insectos

(larvas), lombrices de tierra, carroña de vertebrados pequeños, hasta frutos silvestres maduros (e.g. maqui y frutillas silvestres).

En general para las especies de *Ceroglossus*, el ciclo de desarrollo dura aproximadamente tres meses (Jiroux, 2006).

El dimorfismo sexual es poco notorio y se puede evidenciar en variaciones en la forma del pronoto, élitros y abdomen, como resultado de competencia intrasexual (Benítez *et al.* 2010b). Los machos presentan quillas (carenas) en los segmentos antenales 6, 7 y 8. Los tarsos del primer par de patas están ensanchados y el ápice de los élitros es redondeado (Ruiz 1936, Jiroux 2006). Dorsalmente los élitros están esculpidos y presentan los ángulos humerales pronunciados. En las hembras, el pronoto es más ancho, y más largo comparado con los machos y lleva una pequeña línea longitudinal en la línea media (Ruiz 1936); el abdomen es más grande lo que se interpreta como una adaptación para la producción de huevos (Benítez *et al.* 2010a) y los élitros son más aguzados en el ápice.

Los *Ceroglossus* son conocidos como “peorros” debido a que su estrategia de defensa consiste en la expulsión de un líquido maloliente. Este líquido proviene de las glándulas anales y está compuesto por ácido butírico junto a otros compuestos fétidos (Xu *et al.* 2019). Esto, sumado a una elevada diversidad de colores metálicos y llamativos, que se encuentran formado subespecies o morfotipos geográficos, sugiere la existencia de aposematismo (Jiroux. 2006; Muñoz Ramírez *et al.* 2016).

Figura 1. Ejemplo de variación del color en *Ceroglossus chilensis*. Ramírez, F (2022). Variación del color en *Ceroglossus* recolectados en la zona Araucanía Andina, sur de Chile.



Figura 2. *Bosque Templado de Chile. Ramírez, F. (2022).* Fotografía de uno de los sectores en donde se puede apreciar el tipo de bosque templado característico de la zona Araucanía Andina, sur de Chile.



Figura 3. Distribución de algunas subespecies (parte norte) de *Ceroglossus chilensis*. Extraído de Jiroux (2006). Los colores simbolizan las ubicaciones de las subespecies de *Ceroglossus chilensis* y los lugares coloridos en el mapa simbolizan la distribución de las subespecies.



Figura 4. Distribución de algunas subespecies (parte sur) de *Ceroglossus chilensis*. Extraído de Jiroux (2006). Los colores simbolizan las subespecies de *Ceroglossus chilensis* y los lugares coloridos en el mapa corresponden la distribución de las subespecies.



2. El color en los *Ceroglossus*: Origen y mecanismos que pueden influir en la variación geográfica de la coloración.

El color es un rasgo rico en información sobre el fenotipo y adecuación biológica de los organismos por lo que son fuente de datos sobre la ecología y evolución de distintos grupos y de fenómenos naturales como el camuflaje, mimetismo, polinización, señalización, atracción de pareja, infección por patógenos y termorregulación, entre otros (Cuthill *et al.*, 2017; Lui & Nizet, 2009; Clegg & Durbin, 2000; Smith & Goldberg, 2015; Smith *et al.*, 2016; Bechel, Rivard & Sánchez Azofeifa, 2002; Lev-Yadun, *et al.*, 2004; Pérez-

De la Fuente, *et al.*, 2012; Stevens, Lown & Wood, 2014; Chiao *et al.*, 2011; Brady *et al.*, 2015; Troscianko *et al.*, 2016).

El color es omnipresente en el mundo biológico y su origen responde a dos tipos de mecanismos: por absorción (basado en pigmentos) o por modulación estructural (M. Srinivasarao, 1999). Todos los colores (con la excepción de la bioluminiscencia) en animales son producidos por alguno de estos dos mecanismos primarios, o por una combinación de estos. Los colores pigmentarios se producen por la depositación de pigmentos que interactúan con la luz a nivel molecular para absorber ciertas longitudes de onda y reflejar otras. La pigmentación en la clase insecta es un rasgo muy variable, que posee diferencias especulares entre especies, entre poblaciones de la misma especie y entre individuos dentro de una población. Existe diversidad en cuanto a para qué se utilizan y cómo estos colores se organizan en patrones. La pigmentación posee una función en la comunicación visual, ya sea entre miembros de la misma especie o especies diferentes y en procesos fisiológicos como la termorregulación, la foto-protección y la resistencia a la desecación (True, JR., 2003).

Por otro lado, los colores estructurales son producidos por la interacción física entre la luz y la variación a escala nanométrica en los tejidos tegumentarios de algunos animales (Fox, D. & Vevers, G., 1960; Fox, D., 1976; M., Srinivasarao., 1999; Vukusic, P. & Sambles, J., 2003; Prum, R., 2006; Bagnara *et al.*, 2007; Kinoshita *et al.*, 2008; Mäthger *et al.*, 2009; Seago *et al.*, 2009; Shawkey *et al.*, 2009). También es bien conocido que el color estructural puede generar colores iridiscentes, que son aquellos que cambian su coloración dependiendo del ángulo de incidencia de la luz .

En el caso de los *Ceroglossus*, el color es mayoritariamente del tipo estructural, formado por una estructura de multicapas en la superficie cuticular dorsal del insecto (Luna et al. 2010).

Existe una enorme variación de colores en *Ceroglossus*, la que se estructura geográficamente. Es decir, hay mayor variación entre áreas geográficas distintas que dentro de la misma área geográfica, para la mayoría de las especies. Por ejemplo, en la zona de la cordillera de Nahuelbuta, hay especies cuyos morfotipos son rojos, mientras que en la zona de Malancahuello, a pocos kilómetros, poseen morfotipos azules y verdes. Okamoto *et al.*

(2001) sugirieron que existe convergencia evolutiva en el color de algunas especies en simpatria, lo que fue confirmado posteriormente por Muñoz Ramírez *et al.* (2016) mediante análisis filogenéticos y cuantificación del color mediante espectrofotometría, hipotetizándose que este patrón de convergencia se debería a mimetismo Mulleriano.

En el mimetismo mülleriano (Müller, 1879), dos o más especies aposemáticas (es decir, tóxicas y de color llamativos) convergen fenotípicamente a causa de presiones selectivas impuestas por sus depredadores, Müller (1879) lo explica de la siguiente manera, “Los depredadores aprenden a evitar un determinado color de presa ya que estas son generalmente tóxicas o de mal sabor, pero para aprender a distinguir entre presas primero deben consumir un determinado número de ellas antes de adquirir el aprendizaje. Al haber más de una especie aposemática, similares en morfología y color, el número de presas necesarias para el aprendizaje del depredador se distribuye entre todas las especies y, por lo tanto, para cada especie mimética el número de muertes percapita (por especie) es menor”.

3. Estado del arte sobre la Morfometría Geométrica

En biometría la definición del concepto de “forma” se ha modificado y precisado. El estadístico David G. propone la definición fundamental sobre la que se basa la morfometría geométrica (Kendall, 1977): “Forma es toda la información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación de un objeto”.

La forma resultante en la MG, puede entregar importante información, como la adaptación a las presiones ambientales y reproductivas (Kaliontzopoulou *et al.* 2010; Weaver & Gunz, 2018), así como también los rasgos que son más bien de carácter plesiomórficos y que permiten estimar grado de similitud entre individuos de distintos grupos o localidades (Fernández Mazuecos *et al.* 2013; Kaliontzopoulou *et al.* 2010). Esto hace que la MG sea una herramienta útil y sencilla para evaluar similitudes y diferencias de carácter morfológico y ecológico entre individuos, grupos de la misma especie, entre especies distintas, poblaciones, etc. (Benítez & Püschel, 2014; Toro Ibacache *et al.* 2010) y permite realizar estudios de delimitación de especie

y variaciones interespecíficas (Zuñiga Reinoso & Benítez, 2015).

El método más difundido para estudiar la alometría en morfología geométrica es la regresión multivariada de la forma sobre el tamaño del centroide (p. ej., Monteiro, 1999; Rosas & Bastir, 2002; Drake & Klingenberg, 2008; Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2011; Weisensee & Jantz, 2011; Klingenberg *et al.*, 2012; Ponssa & Candiotti, 2012; Mitteroecker *et al.*, 2013; Murta-Fonseca & Fernandes, 2016). Dado que el tamaño y la forma están lógicamente separados, el análisis de regresión multivariada puede probar si existe una asociación estadística entre ellos y, de ser así, proporciona una caracterización de la alometría como el cambio de forma esperado por unidad de aumento en la variable de tamaño. La alometría es el estudio de las variaciones de las dimensiones anatómicas y fisiológicas en los seres vivos en tanto se correlacionan; esto permite aproximarse a la comprensión de los organismos como un todo y no como la suma de sus partes. (Sánchez *et al.*, 2020).

VI. CAPÍTULO 2: Variación espacial de la forma corporal en escarabajos del género *Ceroglossus* (Coleoptera: Carabidae) en una zona de alta diversidad cromática de la Araucanía Andina, sur de Chile.

VII. RESUMEN

Para explicar la existencia de elevada variabilidad fenotípica (*e.g.* variación de color) y sobre todo cuando esta variación ocurre de forma estructurada geográficamente (por ejemplo, los morfotipos geográficos), se han propuesto dos hipótesis principales:

i) La existencia de una fuerte selección natural a nivel local (adaptación local), y ii) La existencia de barreras no selectivas (*e.g.* geográficas) que impedirían el flujo génico. Estos mecanismos podrían generar y mantener una alta diversidad a nivel regional explicando la mantención de diferentes fenotipos, aunque la importancia relativa de ellos debe ser evaluada con herramientas cuantitativas y rigor estadístico. Los escarabajos del género *Ceroglossus*, que habitan bosques del centro y sur de Chile, son un excelente modelo de estudio para poner a prueba estas hipótesis, debido a que poseen una extraordinaria diversidad fenotípica caracterizada por la existencia de decenas de razas geográficas de distinto color. Además, las

especies de *Ceroglossus* poseen defensas químicas y colores llamativos, que en conjunto usarían para alejar a potenciales depredadores (aposematismo), lo que sugeriría un posible rol de la selección natural (y la adaptación local) en su diversificación fenotípica. En este estudio se pretende analizar la variación fenotípica (forma general del cuerpo) de *Ceroglossus chilensis* (Eschscholtz, 1829) (Coleoptera: Carabidae) a través de la distribución de dos subespecies con distribución adyacente con el objetivo de evaluar el rol de potenciales barreras a la dispersión o la selección natural juega un rol en la mantención de las diferencias en color entre dos subespecies o razas geográficas. Para realizar este estudio, se analizaron ejemplares de *Ceroglossus chilensis* en áreas de la Araucanía Andina, donde confluyen dos subespecies o razas que difieren en color y se realizaron análisis morfológicos (morfometría geométrica) para evaluar si existen diferencias entre un carácter que está presumiblemente bajo selección divergente (color) y otro que no (forma).

Palabras claves: Barreras ecológicas, Flujo génico, Morfometría geométrica, Landmarks, Selección positiva dependiente de la frecuencia.

VIII. INTRODUCCIÓN

El polimorfismo genético para el patrón y/o el color es una característica común de muchas especies, especialmente de invertebrados (Majerus, 1998) y en algunos mamíferos pequeños (Nachman *et al.* 2003). Ha sido objeto de considerable interés y debate el cómo se pueden mantener altos niveles de variación genética en las poblaciones naturales. (Hedrick *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1977; Wright, 1978; Hedrick, 1986, 2006). Un posible mecanismo resulta de la forma en que los depredadores localizan y atacan a presas variables. Por ejemplo, la depredación de las formas más comunes, un proceso conocido como selección apóstata (Clarke, 1962; Allen, 1988), conduce a una selección negativa dependiente de la frecuencia que favorece a las formas menos comunes. Otro mecanismo es la depredación sobre formas poco comunes. Por ejemplo, la teoría de Müller sobre el color de advertencia y el mimetismo, que se basa en el siguiente argumento: en dos especies desagradables que comparten un hábitat, si son diferentes, los depredadores deben comer una cierta cantidad de cada una para aprender

que son desagradables, mientras que, si son idénticos, los miembros de ambas especies se benefician al compartir el costo de la educación de los depredadores (Müller, 1879; Joron & Mallet, 1998; Ruxton *et al.* 2004). Esto genera una selección por semejanza entre especies desagradables dentro de una comunidad (mimetismo mülleriano) y selección positiva dependiente de la frecuencia (selección purificadora) dentro de una especie, porque en ambos casos las formas comunes se benefician de la protección, mientras que las variantes raras sufren una mayor depredación per cápita.

La varianza de los tres primeros componentes principales resulta con un 59,56% (ver anexo 1) correspondiente de la forma total de los *Ceroglossus*.

Por otro lado, la acción de barreras puede también causar divergencia entre caracteres fenotípicos con base genética entre las poblaciones aisladas. Petit & Excoffier (2009) definen el concepto de flujo genético como el movimiento de genes entre poblaciones por procesos de dispersión. Es una fuerza evolutiva que representa una de las mayores fuentes de variación genética en las poblaciones. El flujo genético tiene un efecto principalmente unificador, debido a que la existencia de éste favorece la homogenización de las frecuencias alélicas entre poblaciones que se encuentran geográficamente separadas (Futuyma, 1979). Sin embargo, al separarse las poblaciones por barreras al flujo génico, éstas comienzan a diferenciarse por el proceso de deriva genética. Es decir, por la extinción aleatoria de alelos en ambas poblaciones (Futuyma, 1979). Mayr (1963) dice que cuando hay una aparición de una barrera que promueva la separación espacial de los linajes divergentes es esencial para el proceso de diferenciación y aparición de nuevos fenotipos y nuevas especies. Sin embargo, resulta difícil distinguir entre éstos dos potenciales mecanismos (selección y deriva) ya que ambos pueden resultar en diferentes fenotipos en áreas adyacentes.

El género *Ceroglossus*, contiene escarabajos que se presentan como un muy buen modelo para evaluar estas hipótesis. Dentro de este género existen especies como la especie *C. chilensis*, que presentan una gran variedad de fenotipos adyacentes, a modo de razas geográficas, las cuales se encuentran estructuradas geográficamente (Okamoto, *et al.* 2001). Las distintas especies del género *Ceroglossus* son similares en la coloración de los élitros encontrándose en simpatria (Okamoto *et al.*, 2001). Tal convergencia de fenotipos dentro de *Ceroglossus*, ha sido

evaluada empíricamente apoyando la hipótesis de mimetismo Mülleriano (Muñoz-Ramírez *et al.*, 2016). Por un lado, considerando las coloraciones conspicuas de los élitros, junto con la capacidad de liberar compuestos ácidos ante una amenaza (Xu *et al.*, 2019), *Ceroglossus* podría coincidir con la definición clásica de especie aposemática y su convergencia con otras especies como mimetismo propuesta por Müller (1879), donde las especies que se defienden y son desagradables para un depredador se benefician cuando presentan aspecto similar, y el comportamiento del receptor cambia por una señal o indicación que supone un verdadero costo en el fitness; un receptor que no sigue esta advertencia recibirá un castigo (Jaime, 2017). *Ceroglossus chilensis* posee variaciones de color en lugares específicos, por ejemplo, en el lugar de Malancahuello se observaron *Ceroglossus* de diferentes colores como azules, verdes y rojizos en donde áreas geográficas cercanas, como aparentemente estos colores no se mezclan entre sí. Es entonces donde se pueden plantear las hipótesis de selección natural o deriva génica en este caso en particular, ya que, hay sospechas de selección dado el mimetismo o aposematismo, pero tampoco se puede descartar la deriva si existieran barreras al flujo génico. En el caso de los *Ceroglossus* la divergencia de color entre distintas poblaciones se pudo generar por alguno de los mecanismos antes mencionados. Por una parte, barreras geográficas pueden cortar el flujo génico. y causar divergencia a nivel genómico. Esto implica que las poblaciones puedan experimentar divergencia en múltiples caracteres fenotípicos al ser un proceso que cesa el flujo de todos los genes. Por ejemplo, esto podría explicar un cambio morfológico en conjunto con cambios de color. Por otro lado, si no existen barreras implicaría que los cambios en color ocurren a pesar del flujo génico. Esto causaría la escasa divergencia en otros caracteres fenotípicos no relacionados con el color, y puede dar sustento a una hipótesis de adaptación local donde la fuerte selección es la causante de la divergencia en dicho carácter. Este estudio tiene por objetivo evaluar estas hipótesis por medio de la cuantificación de la forma corporal morfometría geométrica en *Ceroglossus*. Diferencias significativas en la forma corporal de distintas razas cromáticas indicaría barreras al flujo génico en concordancia con la hipótesis de aislamiento geográfico, mientras que la falta de diferenciación en la forma corporal entre razas cromáticas apoya la hipótesis de un rol adaptativo del color.

Para alcanzar este objetivo se trabajará con la metodología de la Morfometría Geométrica,

analizando su forma de las muestras recolectadas en la región de la Araucanía, Chile.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Área de estudio

Las colectas de *Ceroglossus* se realizaron en varias localidades de la Araucanía Andina, cercanas a las comunas de Curacautín y Lonquimay durante los veranos del año 2021 y 2022. (Fig. 5 y Tabla 1), debido a que en esos lugares presentan varios fenotipos entre áreas próximas entre sí.

Esta región presenta características predominantes de clima templado oceánico lluvioso que se localiza en la Cordillera de la Costa, y en la precordillera andina, presentando características de mayor continentalidad debido a su relativo alejamiento del mar. Esto provoca un mayor contraste en las temperaturas encontrándose mínimas de 2°C y máximas de 23°C en los meses más calurosos.

La vegetación que presenta la región está condicionada por las precipitaciones; es de tipo boscoso densa y abundante.

Figura 5: *Mapas satelital de la Región de la Araucanía, Chile.* Lugares enumerados en donde se colectaron las muestras. Prados del Negro (1), Sector Córdova (2), Salto de la Princesa (3). Malancahuello 6 (4), Malancahuello 7 (5), Puente Curacautín (6), Lonquimay 1 (7), Lonquimay Noroeste (8), Camping Dos Volcanes (9), Salto del Indio (10), Puente Dilo cerca de Termas Malleco (11), Termas Malleco (12), Tolhuaca 3b (13), Camping Amanecer del Río (14), Camino a Centro Ski (15).

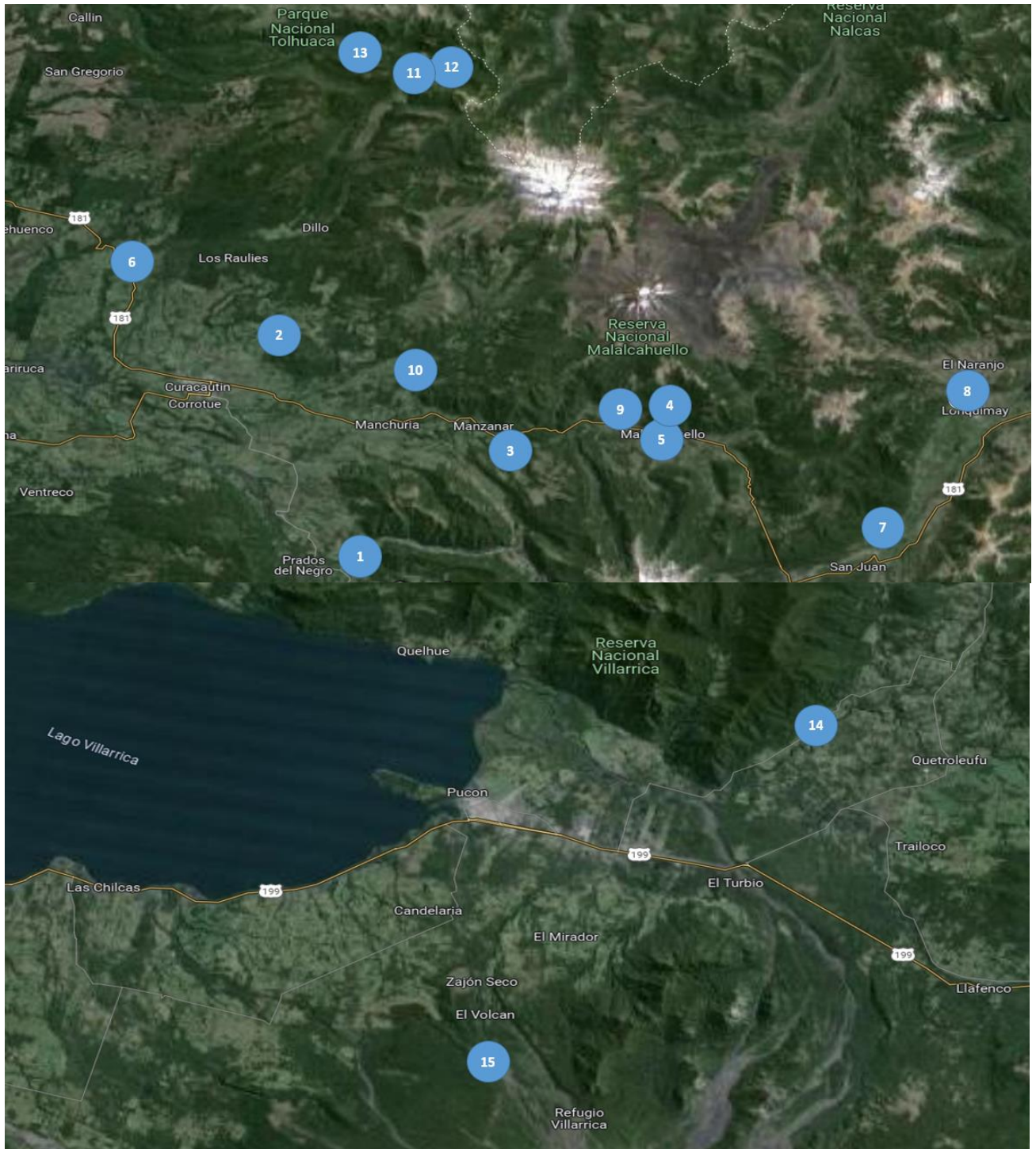


Tabla 1. Localidades y números de especímenes capturados en este estudio. Lugares de colecta de *Ceroglossus chilensis* con una totalidad de 143 especímenes colectados.

Número de localidad	Código de localización	Nombre del lugar	Latitud	Longitud	Elevación	N <i>Ceroglossus</i>
1	Con 1	Prados del Negro	-38.5507	-71.7834	714	23
2	Coo	Sector Cordova	-38.4041	-71.8345	706	12
3	Man1	Salto de la Princesa	-38.4758	-71.6802	796	18
4	Mal6	Malancahuello 6	-38.4589	-71.5758	1089	1
5	Mal7b	Malancahuello 7	-38.4656	-71.5792	1053	5
6	PC	Puente Curacautín	-38.3553	-71.9329	616	1
7	Lon1	Lonquimay 1	-38.5344	-71.4335	951	9
8	Lon 2	Lonquimay Noroeste	-38.4466	-71.3782	1030	2
9	DV	Camping Dos Volcanes	-38.4570	-71.6010	1018	2
10	SI	Salto del Indio	-38.4321	-71.7434	720	8
11	PD	Puente Dillo cerca de Termas Malleco	-38.2366	-71.7371	1104	2
12	TT	Termas Malleco	-38.2343	-71.7265	1189	10
13	Tol3b	Tolhuaca 3b	-38.2212	-71.7795	978	31
14	CAR	Camping Amanecer del Río	-39.2497	-71.8671	323	15
15	PVN	Camino a Centro Ski	-39.3555	-71.9709	855	3
					Total	143

2) Métodos de colecta

Por cada sitio de estudio se utilizaron entre 12 a 20 trampas barber ubicadas cada 5 m, las cuales se dispusieron en línea recta siempre que fue posible. Además, para complementar la recolección de ejemplares también se realizó colecta directa revisando debajo de troncos caídos. A las trampas se les aplicó unos 20 ml de vinagre de manzana como atrayente y fueron revisadas y retiradas luego de 1-2 días de su instalación.

Los ejemplares capturados fueron conservados en alcohol al 95% en el laboratorio de ecología molecular de insectos de la UMCE.

3) Obtención y Análisis de datos

- Cuantificación morfológica

Para la cuantificación morfológica se realizaron análisis de Morfometría Geométrica (MG). La MG es el estudio de la covariación de la forma con factores geométricos subyacentes, y se utiliza para determinar la “forma pura” en un individuo o estructura, mediante puntos discretos en el espacio y bien definidos (Landmarks) (Zelditch *et al.*, 2004).

Se tomaron fotografías de cada individuo con una cámara Cannon EOS Rebel T6. Las fotografías fueron tomadas a los especímenes ventralmente por el personal del Dr. Hugo Benítez en el laboratorio de ecología y morfometría evolutiva de la Universidad Católica del Maule. Las fotografías se transformaron a un formato TPS mediante el software TPSutil v1.78 e importadas al software TpsDig v2.31 (Rohlf. 2013) donde fueron colocados los distintos hitos o landmarks. Se utilizaron 26 landmarks (fig. 6, tabla 2) de la vista ventral (Juache *et al.* 2018, Benítez *et al.* 2013). Una vez obtenidas las coordenadas cartesianas para todos los landmarks, la información de la forma fue extraída mediante un Análisis de superposición de Procrustes (Rohlf & Slice 1990). Luego se ordenaron los datos bajo las matrices de covarianzas las cuales permitieron realizar los análisis multivariados siguientes.

Figura 6. *Ceroglossus chilensis*. Indicación de los 26 landmarks en la vista ventral.

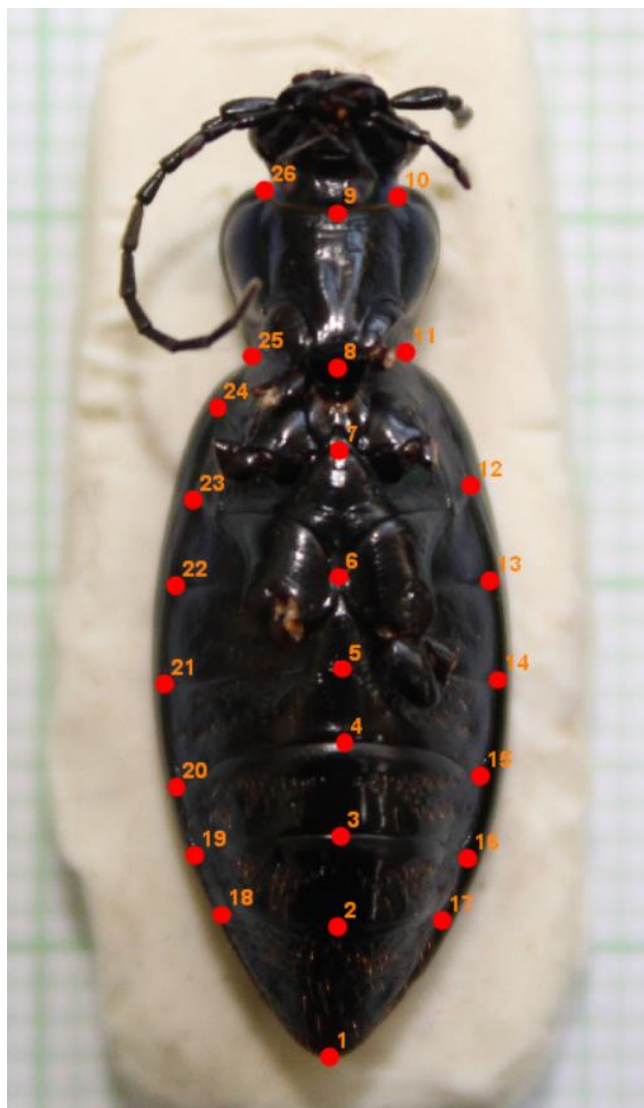


Tabla 2. Descripción anatómica de los 26 landmarks (vista ventral) en la forma de *Ceroglossus chilensis*.

Número del Landmark	Ubicación anatómica
1	Pigidio
2	Punto medio del 6to segmento abdominal
3	Punto medio del 5to segmento abdominal

4	Punto medio del 4to segmento abdominal
5	Punto medio del 5to segmento abdominal
6	Punto medio de Metatórax
7	Punto medio inferior de Mesatórax
8	Punto medio superior de Mesatórax
9	Punto medio del Protórax
10	Vértice derecho del epímero pronotal
11	Vértice derecho de la carina pronotal
12	Vértice lateral derecho del Metatórax
13	Vértice lateral derecho del 2do segmento abdominal
14	Vértice lateral derecho del 3er segmento abdominal
15	Vértice lateral derecho del 4to segmento abdominal
16	Vértice lateral derecho del 5to segmento abdominal
17	Vértice lateral derecho del sexto segmento abdominal
18	Vértice lateral izquierdo del 6to segmento abdominal
19	Vértice lateral izquierdo del 5to segmento abdominal
20	Vértice lateral izquierdo del 4to segmento abdominal
21	Vértice lateral izquierdo del 3er segmento abdominal
22	Vértice lateral izquierdo del 2do segmento abdominal
23	Vértice lateral izquierdo de Metatórax

24	Episterno izquierdo mesoesternal
25	Vértice izquierdo de la carina pronotal
26	Vértice izquierdo del epímero pronotal

Se identificaron y clasificaron la variación individual de la forma y su representación gráfica mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP). Para evaluar si existen diferencias significativas de poblaciones en diferentes lugares geográficos se realizaron análisis de permutaciones aleatorias entre grupos (Collyer & Adams 2018). Se entiende como al tamaño geométrico al tamaño del centroide que son las diferentes distancias que hay al colocar los landmarks y la forma corporal se entiende al tamaño que corresponde a la escala o magnitud de los especímenes) para saber si las muestras presentan un cambio morfológico independiente del color que presentan, se realizó una regresión multivariada donde la variable independiente fue el tamaño del centroide (variable que homologiza el tamaño basado en landmarks) y la variable dependiente la forma mediante las coordenadas de Procrustes. Los análisis morfométricos se llevaron cabo en el software MorphoJ 1.07a (Klingenberg 2011) y utilizando los paquetes morfométricos geomorph.

El software MorphoJ 1.07a dice Klingenberg (2011) que es el enfoque más extendido en morfometría geométrica es representar cada espécimen mediante las posiciones relativas de puntos de referencia morfológicas que pueden ubicarse con precisión y establecer una correspondencia uno a uno entre todos los especímenes incluidos en el análisis, además el programa realiza un seguimiento automático de propiedades como la simetría y dimensionalidad de las configuraciones de puntos de referencia y ajusta los análisis según sea necesario. El software MorphoJ implementa la gama estándar de técnicas multivariadas que se utilizan ampliamente en morfometría geométrica.

Dryden & Mardia (1998) definen la forma como toda información geométrica sobre una configuración de puntos de referencia excepto su tamaño, posición y orientación.

La forma se extrae mediante un procedimiento llamado superposición de Procrustes, que elimina la variación en tamaño, posición y orientación de los datos sobre las coordenadas de los puntos de referencias, y que es el núcleo de la morfometría geométrica (Goodall, 1991; Bookstein, 1996; Dryden & Mardia, 1998; Zelditch *et al.*, 2004). MorphoJ importó datos de puntos de referencia desde archivos TPS.

En los datos exportados como archivos de texto delimitados por tabulaciones, se importaron informaciones adicionales en forma de datos categóricos como “clasificadores”, y las variables continuas se incluyeron como “covariables” y fueron disponibles para visualizar resultados y fueron disponibles para el análisis morfométrico, además el programa proporcionó varios tipos de resultados gráficos, incluidos diagramas de dispersión. Se usó el gráfico de dispersión de las puntuaciones de los componentes principales.

X. RESULTADOS

a) Componentes Principales

Fig. 7. Gráfica de los primeros dos componentes principales que muestra la variación de los organismos utilizados clasificados por color, puntos azules (AZ) = Cc Azul, puntos morados (MO) = Cc Morado, puntos rojos (RJ) = Cc rojos, puntos calipsos (VA) = Cc Azules con verdes, puntos verdes (VD) = Cc verdes, puntos anaranjados (VR) = Cc Rojos con verde.

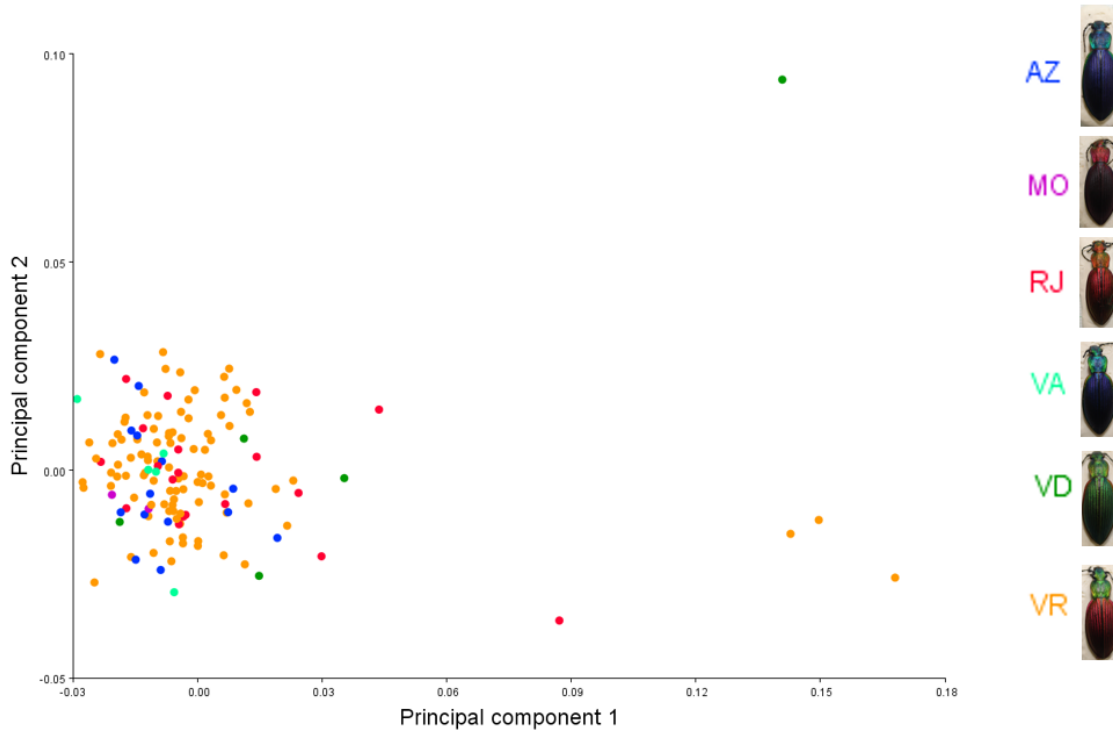
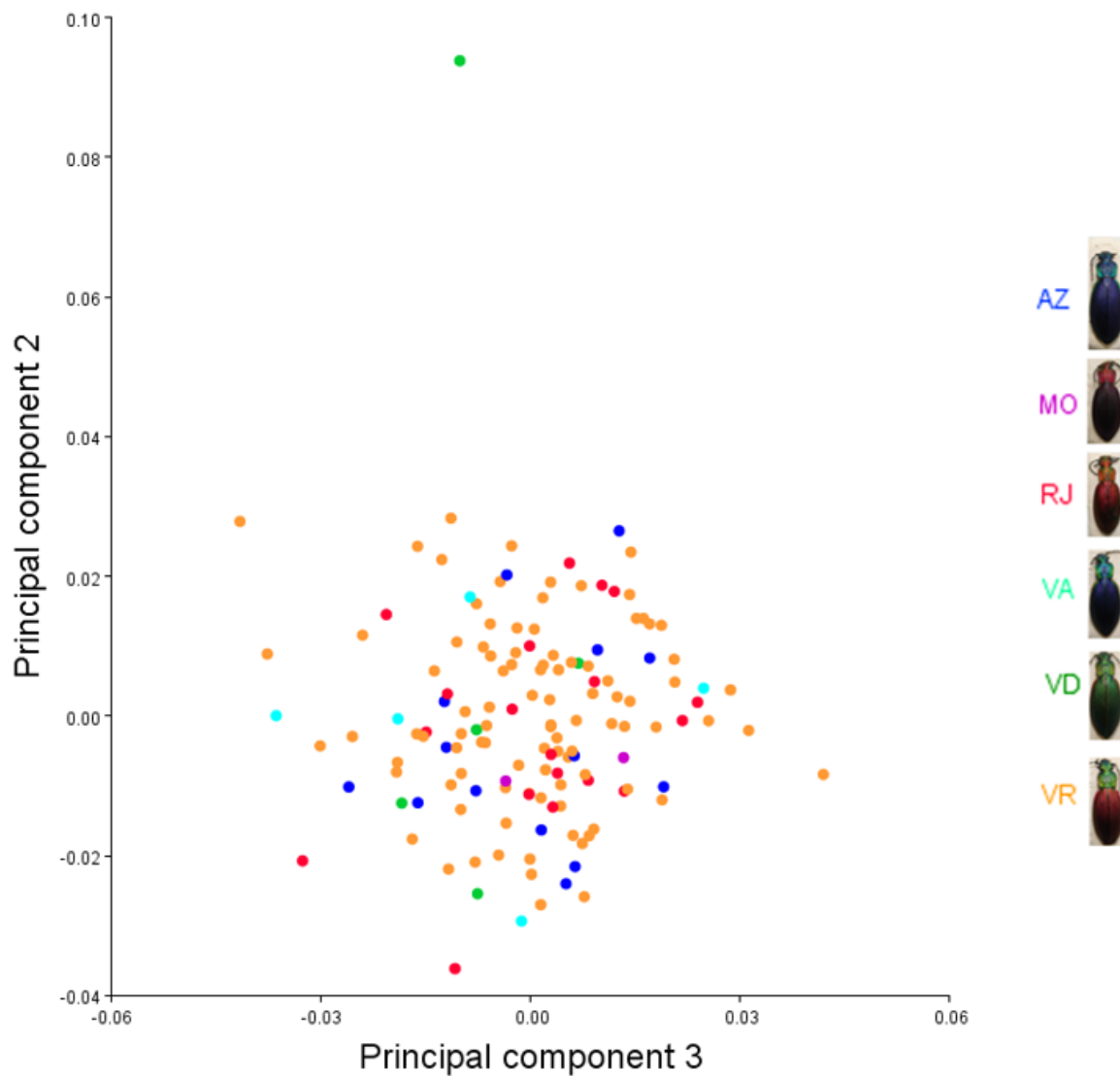


Fig. 8. Gráfica de los componentes principales 2 y 3 que muestra la variación de los organismos utilizados clasificados por color, puntos azules (AZ) = Cc Azul, puntos morados (MO) = Cc Morado, puntos rojos (RJ) = Cc rojos, puntos calipsos (VA) = Cc Azules con verdes, puntos verdes (VD) = Cc verdes, puntos anaranjados (VR) = Cc Rojos con verde.



El análisis de componentes principales (PCA) es un método estadístico que permite simplificar la complejidad de espacios muestrales con muchas dimensiones a la vez que conserva su información.

Los ejes verticales y horizontales corresponden a los componentes principales que son las dimensiones que se comparan entre sí (anexo 1).

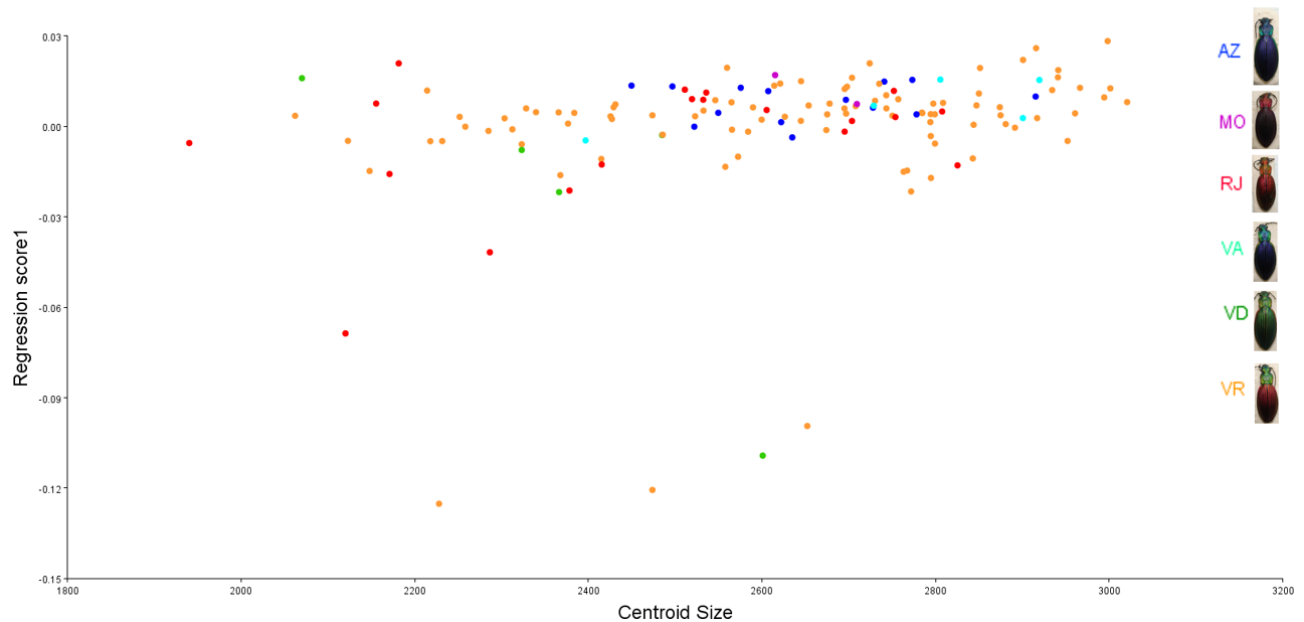
Se mostró la alometría de las muestras fotografiadas ventralmente bajo el uso del programa MorphoJ (fig. 7 y 8), en la cual se observan comparaciones con los componentes principales PC2 y PC1; y los componentes principales PC2 y PC3.

En la fig. 7 y 8, existe una sobreposición en las muestras, esto quiere decir que esos colores poseen una morfología similar, su forma promedio.

Estos resultados de los análisis multivariados pueden ser interpretados y visualizados directamente como deformaciones de la forma de los *Ceroglossus*, en donde el Análisis de Componentes Principales (ACP) se puede apreciar la variación de los datos, en donde el componente principal 1 muestra la variación corporal entre los *Ceroglossus* de distintos colores y entre el mismo color, en lo cual resulta con un 59,56%.

b) Alometría

Fig. 9. Gráfica de alometría de los organismos utilizados clasificados por color, puntos azules (AZ) = Cc Azul, puntos morados (MO) = Cc Morado, puntos rojos (RJ) = Cc rojos, puntos calipsos (VA) = Cc Azules con verdes, puntos verdes (VD) = Cc verdes, puntos anaranjados (VR) = Cc Rojos con verde.



La influencia del tamaño sobre aspectos de la forma se puede apreciar en que las mayorías de las muestras comparten directamente horizontal una línea de forma (regression score), es decir, que su forma no cambia en las muestras, lo que cambia es el tamaño de su centroide (tamaño corporal) de las diferentes muestras.

La representación de una regresión multivariada (fig. 9) en la forma de los *Ceroglossus* en donde la variable dependiente (Regression Score1) es la forma, la variable independiente es el tamaño de centro (centroide), en donde se puede apreciar que los valores de la forma (Regression score1) comparte directamente horizontal una línea, por lo tanto, la varianza de forma no es alta, en la cual presenta un 1,71% de alometría.

Las muestras de color azul (AZ) poseen aproximadamente un rango 2400 – 2900 de centroide, lo que conlleva a no presentar una alta diferencia en su forma, pero si se observa una diferencia a nivel de su tamaño corporal.

Las muestras de color morado (MO) poseen aproximadamente un rango de 2600 – 2700 de centroide, esto quiere decir que el tamaño corporal no cambio mucho.

Las muestras de color rojo (RJ) poseen aproximadamente un rango de 1900 – 2800 de centroide, las muestras de color Rojo, poseen un tamaño corporal variado (pequeñas y grandes), esto podría significar que en las muestras exista una diferencia entre los sexos.

Las muestras de color celestes (VA) poseen aproximadamente un rango 2400 - 2900 de centroide, su tamaño corporal es variable en comparación con las muestras de color morada, pero su tamaño corporal es similar a las muestras de color azules.

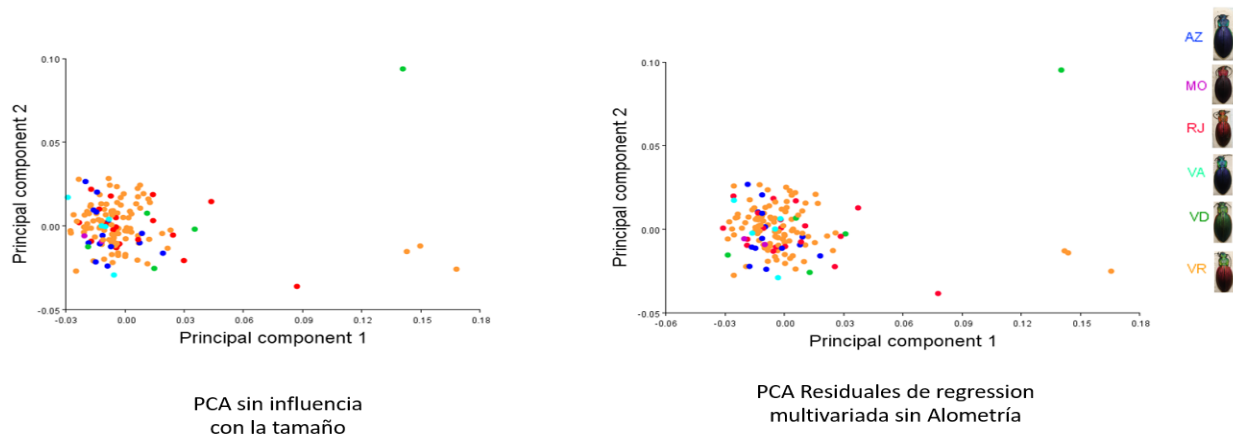
Las muestras de color verde (VD) poseen aproximadamente un rango de 2100 – 2600 de centroide, es decir, que el tamaño corporal de las muestras de color verde no son tan variadas en comparación como las muestras de los otros colores ya descritas anteriormente.

Las muestras de color anaranjado (VR) poseen aproximadamente un rango de 2100 – 3100 de centroide, esto quiere decir que las muestras anaranjadas poseen una gran variedad de tamaño en comparación con las demás muestras.

La alometría corresponde a un 2,89%, lo que quiere decir que la alometría es muy baja para ser significativa.

c) Comparación de PCA

Fig. 10. Comparación de las gráficas de PCA sin influencia con el tamaño (1) y PCA de los residuales de la regresión multivariada sin alometría (2) de los organismos utilizados clasificados por color, puntos azules (AZ) = Cc Azul, puntos morados (MO) = Cc Morado, puntos rojos (RJ) = Cc rojos, puntos calipso (VA) = Cc Azules con verdes, puntos verdes (VD) = Cc verdes, puntos anaranjados (VR) = Cc Rojos con verde.



En la fig. 9 se puede observar que las muestras no hay un cambio radical, esto es debido a que hay una sobreposición de las muestras de los diferentes colores, esto es por algunos efectos que son intrínsecos de la forma que separan estos grupos y que directamente no tienen mucho que ver con el tamaño corporal.

XI. DISCUSIÓN.

Okamoto *et al.* (2001) describió que, a pesar de un gran polimorfismo cromático en el género *Ceroglossus*, el color es una característica íntimamente relacionada con la geografía y no es representativo de la especie, Esto supone que factores ecológicos y/o medioambientales son el origen que modela esta diversidad cromática.

Los resultados obtenidos son compatibles con la hipótesis 1 debido a que la completa sobreposición y nula diferenciación de la forma corporal en *Ceroglossus chilensis* apunta a que no serían barreras al flujo génico entre las poblaciones de distinto color que son las responsables de la variación tan categórica de este rasgo. De haber tenido alguna influencia las barreras al flujo génico, se habría esperado que otros rasgos también mostraran algún grado de diferenciación o divergencia, lo que no se apreció en nuestros datos de morfometría.

Los resultados emitidos poseen una posible explicación a una relación depredador-presa, el aposematismo es una adaptación antidepredatoria en la que la convencionalidad de las

señales emitidas favorece la honestidad de las mismas y permite salvaguardar los intereses de la presa al persuadir al depredador de no comérsela y del depredador al evitar ser envenenado o herido de gravedad si intentara consumirla (Summers *et al.*, 2015).

Aunque se pueden invocar otras explicaciones para la variación del color a parte del aposematismo, incluida la selección sexual o natural para ciertos colores en entornos de luz similares, la alta variación de color en áreas cercanas geográficamente con tipos de bosques similares (y, por lo tanto, entornos de luz) sugiere que estos mecanismos son pocos probables para explicar los patrones de estructuración geográfica de colores en *Ceroglossus*, esto conlleva a poseer un porcentaje de alometría que es bajo debido a que las muestras son muy pequeñas, existe algunas muestras que son gran tamaño en comparación con las demás muestras, pero el valor del porcentaje es menor, debido a que no supera un 10% de alometría.

El valor de alometría es baja debido a que existen muestras que poseen formas corporales diferentes y es debido a que los landmarks no fueron exactamente correctamente por la falta de pronotos y abdomen rotos.

Las posibles hipótesis sobre la evolución de este sistema mencionan como potenciales causas a una presión selectiva individual a través de la selección natural (Cott, 1940; Wiklund & Järvi, 1982).

Este trabajo no estuvo exento de limitaciones. Una de éstas limitaciones fue que al momento de realizar el análisis de los datos fue que incorporar el valor de todos los especímenes, sin realizar una separación por sexos (macho y hembra), lo que pudo haber alterado los resultados debido a que el tamaño difiere entre los machos con las hembras, porque en la mayoría de los insectos, los machos son de menor tamaño (Arrow, 1951; Otte & Stayman, 1979; Johnson, 1982; Adams & Greenwood, 1983; Forrest, 1987; Wiklund & Forsberg, 1991).

En los resultados se podrán utilizar a futuro para verificar morfológicamente las diferencias en ambos sexos al utilizar el PCA, además complementar aún más la hipótesis 1 sobre cómo actúa la selección natural en las distintas poblaciones de *Ceroglossus*.

XII. CONCLUSIÓN

Respecto a la forma de los escarabajos, ésta no exhibe diferencias distinguibles entre poblaciones con distinto color. Por el contrario, la variación de la forma de las poblaciones se solapa ampliamente.

Los análisis de morfometría geométrica (alometría y PCA), al no evidenciar divergencia en los caracteres morfométricos, apoyan que el mecanismo que explica la diferencia de color es la selección natural y no la deriva génica.

XIII. REFERENCIAS

1. Adams, J., & Greenwood, P. J. (1983). *Why are males bigger than females in pre-copula pairs of Gammarus pulex?* Behavioral Ecology and Sociobiology. 13: 239 – 241.
2. Achituv, E., & L., Mizrahj. (1987). *Allozyme differences between tidal levels in Tetraclita squamosal Pilsbry from the Red Sea.* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 108: 181 - 189.
3. Allen, J. A. (1988). *Frequency-dependent selection by predators.* Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 319: 465 - 503.
4. Anderson, B., & Jager, M. L. (2020). *Natural selection un mimicry.* Biological Reviews. 2: 291 -304.
5. Arrow, G., J. (1951). *Horned beetles.* Dr. W. Junk. The Hague. Netherland. 154 pp.
6. Arnold, S., J. (1981). *The Microevolution of Feeding Behavior, en Foraging Behavior: Ecological, Ethological and Pscycological Approaches.* A. Kalim y T. Sargent (eds.). Garland Press. N. Y. pp. 409 - 453.
7. Audesirk, T., Audesirk, G., Escoto, M.M.R. & Campo, D.E.V.M. (1997) *Biología la Vida en la Tierra.* Prentice Hall.
8. Bagnara, J. T., Fernández, P. J., & Fujii, K. (2007). *On the blue coloration of vertebrates.* Pigment Cell Res. 20: 14 - 26.
9. Bechel, R., Rivard, B., Sánchez-Azofeifa, A. (2002). *Spectral properties of foliose and crustose lichens based on laboratory experiments.* Remote Sening of Environment. 82: 389 - 396.
10. Benítez, H.A. (2013). *Assessment of patterns of fluctuating asymmetry and sexual dimorphism in carabid body shape.* Neotrop Entomol. 42: 164-169.
11. Benítez, H., M. Vidal, R. Briones & V. Jerez. (2010 a). *Sexual dimorphism and morphological variation in populations of Ceroglossus chilensis (Eschscholtz, 1829) (Coleoptera: Carabidae).* Journal of the Entomological Research Society. 12: 87 - 95.
12. Benítez, H., R. Briones & V. Jerez. (2011). *Intra-population morphological variation of shape and size of the Chilean magnificent beetle, Ceroglossus chilensis in the Baker River Basin, Chilean Patagonia.* Journal of Insect Science. 11:94.

13. Benítez, H. A., Püshel, T., Lemic, D., Cacija, M., Kozina, A. & Bazork, R. (2014). *Ecomorphological variation of the wireworm cephalic capsule: studying the interaction of environment and geometric shape*. PloS One. 9(7). e102059.
14. Benítez, H., V. Jerez & R. Briones (2010 b). Proporción sexual y morfometría para dos poblaciones de *Ceroglossus chilensis* (Eschscholtz, 1829) (Coleoptera: Carabidae) en la Región del Biobío, Chile. *Revista Chilena de Entomología*. 35: 61 - 70.
15. Benítez, H.A., Muñoz-Ramírez, C., Correa, M., Acuña-Rodríguez, I.S., Villalobos-Leiva, A., Contador, T., Velásquez, N.A., Suazo, M.J. (2024). *Breaking the law: Is it correct to use the converse Bergmann rule in Ceroglossus chilensis? An Overview using geometric morphometrics*. *Insects*. 15:97.
16. Bertness, MD., SD., Gaines & SM., Yeah. (1998). *Making mountains out of barnacles: the dynamics of acorn barnacle hummocking*. *Ecology*. 79: 1382 - 1394.
17. Bookstein, F.L. (1996). *Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis*. *Bulletin of Mathematical Biology*. 2: 313 - 365.
18. Chiao, C-C., Wickiser, JK., Allen, JJ., Genter, B., Hanlon, RT., (2011). *Hyperspectral imaging of cuttlefish camouflage indicates good color match in the eyes of fish predators*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(22): 9148-9153.
19. Clarke, B. C. (1962). *Balanced polymorphism and the diversity of sympatric species*. En: *Taxonomy and geography*. D. Nichols (ed): Systematics Association publication No. 4. Pp. 47-70. Oxford University Press, Oxford.
20. Clegg, MT., Durbin, ML., (2000). *Flower color variation: a model for the experimental study of evolution*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 97(13): 7016-7023.
21. Cott, H. (1940). *Adaptative coloration in animals*. London: Methuen.
22. Cuthill, IC., Allen, WL., Arbuckle, K., Caspers, B., Chaplin, B., Hauber, ME., Hill, GE., Jablonski, NG., Jiggins, CD., Kelber, A., et al. (2017). *The biology of color*. *Science*. 357(6350).
23. De Wolf, H., T, Backeljau, R, Medeiros, & R, Verhagen. (1997). *Microgeographical shell*

- variation in Littorina striata, a planktonic developing periwinkle. Marine Biology.*
129:331-342.
24. Drake, AG., Klingenberg, CP., (2008). *The pace of morphological change: historical transformation of skull shape in St. Bernard dogs.* Proc R Soc Lond B Biol. Sci 275:71-76.
 25. Dryden, IL., Mardia KV. (1998). *Statistical shape analysis.* Wiley. Chichester.
 26. Fernández Mazuecos. M., Blanco Pastor, J. L., Gómez, J. M. & Vargas, P. (2013). *Corolla morphology influences diversification rates in bifid toadflaxes (Linaria sect. Versicolores).* Ann. Bot. 122(9): 1705-22.
 27. Forrest, T.G. (1987). *Insect size tactics and developmental strategies.* Oecología (Berl.). 73: 178-184.
 28. Foster, AB., (1979). *Phenotypic plasticity in the reed corals Montastraea annularis (Ellis & Solander) and Siderastrea sidereal (Ellis & Solander).* Journal Experimental. Marine Biology and Ecology. 39:25-54.
 29. Foster, AB., (1980). *Environmental variation in skeletal morphology within and Siderastrea sidereal.* Bulletin of Marine Science. 30:678-709.
 30. Fox, D, L., (1976). *Animal biochromes and structural colors.* Berkeley. CA: University of California Press.
 31. Fox, H. M., & Vevers, G. (1960). *The nature of animal colors.* New York. NY: Macmillan.
 32. Francisco, J., Ayala & Cathryn A. Campbell. (1974). *Frequency-dependent selection.* Department of Genetics. University of California. Davis. California. 5: 115-138.
 33. Futuyma, D., J., (1979). *Evolutionary Biology.* Sinauer. Massachusetts.
 34. Goodall, CR., (1991). *Procrustes methods in the statistical analysis of shape.* Journal of the Royal Statistical Society B. 53: 285-339.
 35. Greenwood , J. J. D. (1983). *The functional bias of frequency-dependent food selection.* Biol. J. Linn. Soc. 23: 177-199.
 36. Hedrick, P. W. (2006). *Genetic polymorphism in heterogeneous environments: the age of genomics.* Annu. Rev. Ecol. Syst. 37:67-93.
 37. Hedrick, P. W., M. E. Ginevan & E. P. Ewing. (1976). *Genetic polymorphism in*

- heterogeneous environments*. Annu. Rev. Ecol. Syst. 7:1-32.
38. Heino, M., Metz, J. A. J. & Kaitala, V. (1998). *The enigma of frequency dependent selection*. Trends Ecol. 13: 367-370.
39. Jaime, G. (2017). *Signals, cues and the nature of mimicry*. Proc. R. Soc. B. Vol. 284: 1 – 9.
40. Jiroux, E. (2006). *Les genre Ceroglossus*. Collection Systématique. Vol 14. Ed. Magallanes. Paris.
41. Johansson, K., B., Johansson & E., Rolan-Alvarez. (1993). *Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail Littorina saxatilis*. Evolution. 47:1770-1787.
42. Johnson, L.K. (1982). *Sexual selection in a brentid weevil*. Evolution. 36: 251-262.
43. Joron, M., & J. L. B. Mallet. (1998). *Diversity in mimicry: paradox or paradigm?* Trends Ecol. Evol. 13:461-466.
44. Joseph, Sh. (1931). *Los Carabus de Temuco*. Collection Systématique. Vol 14. Magallanes.
45. Juache, A., Ordenes, R., Benítez, H.A. (2018). *Quantifying the shape variation of the elytra in Patagonian populations of the ground beetle Ceroglossus chilensis (Coleoptera: Carabidae)*. Zoologischer Anzeiger 274, 123-126.
46. Kaliontzopoulou, A., Carretero, M. A., & Llorente, G. A. (2010). *Intraspecific ecomorphological variation: linear and geometric morphometrics reveal habitat related patterns within Podarcis bocageo wall lizards*. J. Evol. Biol, 23(6): 1234-44.
47. Kendall, D.G. (1977). *Diffusion of shape*. Advances in Applied Probability. Vol. 9 (3). 428-430.
48. Kinoshita, S., Yoshioka, S., & Miyazaji, J., (2008). *Physics of structural colors*. Rep. Prog. Phys. 71, 1-30.
49. Klingenberg, C.P. (2011). *MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics*. Molecular Ecology Resources 11, 353-357.
50. Klingenberg, C.P., Duttke, S., Whelan, S., Kim, M. (2012). *Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves*. J Evol Biol. 25:115-129.

51. Klingenberg, C.P., Monteiro, L.R. (2005). *Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications*. Systematic Biology. Vol. 54. 678-688.
52. Lawrence , E., Valcarce, R.C. & Nuño, F.J.E. (2003) *Diccionario Akal de términos biológicos*. Akal.
53. Leonard, GH., MD., Bertness & PO., Yund, (1999). *Crab predation, waterborne cues, and inducible defenses in the blue mussel, Mytilus edulis*. Ecology. 80:1-14.
54. Lev-Yudin, S., Dafni, A., Flaishman, MA., Indar, M., Izhaki, I., J̇Katzir, G., Ne'eman, G., (2004). *Plant coloration undermines herbivorous insect camouflage*. BioEssays. 26(10): 1126-1130.
55. Lewontin, R., C., (1970). *The Units of Seleccition*. en Am. Rev. Ecol. Syst. 1:1-18.
56. Lively, CM., (1986). *Predator-induced Shell dimorphism in the acorn barnacle Chthamalus anisopoma*. Evolution. 40:232-242.
57. M. Srinivasarao. (1999). *Nano-Optics in the Biological World: Beetles, Butterflies, Birds, and Moths*. Chemical Reviews. Vol. 99, pp. 1935-1961.
58. Majerus, M. E. N., (1998). *Melanism-evolution in action*. Oxford University Press, Oxford.
59. Mähger, L. M., Denton, E. J., Marshall, N. J., & Hantol, R. T., (2009). *Mechanisms and behavioral functions of structural colouration in cephalopods*. J, R, Doc. 6, S149-S163.
60. Mitteroecker, P., Gunz, P., Windhager, S., Schaefer, K., (2013). *A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology*. Hystrix. 24:59-66.
61. Monteiro, LR., (1999). *Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape*. Syst Biol. 48:192-199.
62. Müller, F. (1879). *Ituna and Thyridia: a remarkable case of mimicry in butterflies*. Trans. Entomol. Soc. Lond. 1879: XX-XXIX.
63. Muñoz Ramírez, C. P., Bitton, P. P., Doucet, S. M., & Knowles L. L. (2016). *Mimics here and there, but not everywhere: Müllerian mimicry in Ceroglossus ground beetles?* Biology Letters. 12(9), 20160429.
64. Murta-Fonseca, RA., Fernandes, DS. (2016). *The skull of Hydrodynastes gigas (Duméril,*

- Bibron & Duméril, 1854) (Serpentes: Dipsadidae) as a model of snake ontogenetic allometry inferred by geometric morphometrics. Zoomorphol (Berl).*
65. Nachman, M. W., H. E., Hoekstra, & S. L. D'Agostino. (2003). *The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:5268-5273.*
 66. Okamoto, M., Kashiwai, N., Su, Z. H., & Osawa, S. (2001). *Sympatric convergence of the color pattern in the Chilean Ceroglossus ground beetles inferred from sequence comparisons of the mitochondrial ND5 gene. Journal of Molecular Evolution, 53(4), 530-538.*
 67. Otte, D. & K, Stayman. (1979). *Beetle horns: some patterns in assortative mating in two meloid beetles. Evolution. 39: 1123-1131.*
 68. Pérez-De la Fuente, R., Relclòs, X., Peñalver, E., Speranza, M., Wierzchos, J., Ascaso, C., Engel, MS., (2012). *Early evolution and ecology of camouflage in insects. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 109(52): 21414-21419.*
 69. Pigliucci, M., (2001). *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. Baltimore: The John Hopkins University Press.*
 70. Piersma, T., Drent, J., (2003). *Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. Trends in Ecology & Evolution. 1;18(5):228-33.*
 71. Ponssa, ML., Candiotti, MFV. (2012). *Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the Leptodactylus focus group (Anura: Leptodactylidae). Zoomorphol (Berl). 131:349-362.*
 72. Prum, R. O., (2006). *Anatomy, physics, and evolution of avian structural colors. In Bird coloration. Vol. 1 (eds G. E. Hill., & K. J. McGraw). Mechanisms and measurements. Pp. 295-355. Cambridge. MA: Harvard University Press.*
 73. Rodríguez-Mendoza, R., Muñoz, M., Saborido-Rey, F. (2011). *Ontogenetic allometry of the bluemouth, Helicolenus dactylopterus dactulopterus (Teleostei: Scorpaenidae), in the Northeast Atlantic and Mediterranean based on geometric morphometrics. Hydrobiología. 670:5-22.*

74. Rohlf, F.J. (2013). *TPSdig*, v. 2.17. State University at Stony Brook., NY.
75. Rohlf, F.J., Slice, D. (1990). *Extensions of the Procrustes methods for the optimal superimposition of landmarks*. Systematic Zoology 39, 40-59.
76. Rosas, A., Bastir, M. (2002). *Thin-plate spline analysis of allometry and sexual dimorphism in the human craniofacial complex*. Am J Phys Antropol. 117:236-245.
77. Ruiz, F. (1936). *Los Ceroglossus de Chile (Col. Carabidae)*. Revista Chilena de Historia Natural. 40: 381-425.
78. Ruxton, G. D., T. N. Sherratt, & M. P. Speed. (2004). *Avoiding attack*. Oxford University Press, Oxford.
79. Sánchez, G., Faustino, Gutiérrez, S. & José, L. (2020). *La alometría, una ley de potencias ubicua en la estructura de los seres vivos*. Inter disciplina. 8(20), 11-22.
80. Sarda, F., C., Bas, Mi., Roldan, C., Pla, & J., Lleonart. (1998). *Enzymatic and morphometric analyses in Mediterranean populations of the ose shrimp, Aristeus antennatus (Risso, 1816)*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 221:131-144.
81. Seago, A. E., Brady, P., Vignneron, J. P., & Schultz, T. D., (2009). *Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (Coleoptera)*. J. R. Soc. Interface 6. S165-S184.
82. Shawkey, M. D., Morehouse, N. I., & Vukusic, P., (2009). *A protean palette: color materials and mixing in birds and butterflies*. J. R. Soc. 6. S221-S231.
83. Smith, D, Goldberg, D,. (2015). *Tempo and mode of flower color evolution*. American Journal of Botany.
84. Smith, KR., Cadena, V., Endler, JA., Kearney, MR., Porter, WP., Stuart-Fox, D., (2016). *Color change for thermoregulation versus camouflage in free-ranging lizards*. American Naturalist. 188(6): 668-678.
85. Stevens, M., Lown, AE., Wood, LE., (2014). *Color change and camouflage in juvenilen shore crabs (Carcinus maenas)*. Frontiers in Ecology and Evolution. 2:14.
86. Summers, K., Speed, M. P., Blount, J. D. & Stuckert, A. M. M. (2015). *Are aposematic signals honest?*. A review. Journal of Evolutionary Biologu. 28, 1583-1599.
87. Troscianko, J., Stevens, M., (2016). *Image calibration and analysus toolbox-a free*

- software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. Methods in Ecology and Evolution. 6(11): 1320-1331.*
88. The McGraw-Hill Companies (2003) *McGraw-Hill dictionary of bioscience*. McGraw-Hill Professional.
89. Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G. & Suazo Galadames, I. (2010). *Geometric morphometry and the biologic shapes study: form the descriptive morphology to the quantitative morphology*. *Int. J. Morphol.* 28(4): 977-90.
90. True, JR., (2003). *Insect melanism: the molecules matter*. *Trans. Ecol. Evol.* 18. 640-7.
91. Villalobos, Leiva, Amado & Benítez, Hugo, A., (2020). *Morfometría Geométrica y sus Nuevas Aplicaciones en Ecología y Biología Evolutiva. Parte 2*. *International Journal of Morphology*, 38(6), 1818-1836.
92. Vukusic, P., & Sambles, J. R. (2003). *Photonic structures in biology*. *Nature*. 424. 852-855.
93. Weaver, T. D., & Gunz, P. (2018). *Using geometric morphometric visualizations of directional selection gradients to investigate morphological differentiation*. *Evolution*, 72(4): 838-50.
94. Weisensee, KE & Jantz, RL. (2011). *Secular change in craniofacial morphology of the Portuguese using geometric morphometrics*. *Am J Phys Antropol.* 145:548-559.
95. West, JM., CD, Harvell & Am, Walls. (1993). *Morphological plasticity in a gorgonian coral (Briareum asbestinum) over a depth cline*. *Marine Ecology. Progress Series.* 94:61-69.
96. Wiklund, C & J. Forsberg. (1991). *Sexual size dimorphism in relation to female polygamy and protandry in butterflies: a comparative study of Swedish Pieridae and Satyridae*. *Oikos.* 60: 373-381.
97. Wiklund, C & Järvi, T. (1982). *Survival of distasteful insects after being attacked by naive birds: A reappraisal of the theory of aposematic coloration evolving through individual selection*. *Evolution.* 35(5), 998-1002.
98. Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations vol. 4. Variability within and among natural populations*. Univ. of Chicago Press, Chicago, Il.
99. Xu, S., Errabeli, R., Will, K., Arias, E., & Attygalle, A. B. (2019). *3-Methyl-1-(methylthio)-2-butene: a component in the foul-smelling defensive secretion of two Ceroglossus*

species (Coleoptera: Carabidae). Chemoecology, 29(4), 171–178.

100. Yund, Po., (1991). *Natural selection on hydroid colony morphology by intraspecific competition*. Evolution. 45:1564-1573.

Zúñiga Reinoso, Á. & Benítez, H. A. (2015). *The overrated use the morphological cryptic species concept: An example with Nyctelia darkbeetles (Coleoptera:Tenebrionidae) using geometric morphometrics*. Zool. Anz. 255:47-53.

XIV. Anexos

Anexo 1. **Efecto de la varianza en cada dimensión.**

Principal Component Analysis: PCA: CovMatrix, Color Ubicacion, Procrustes coordinates

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	0.00088556	40.025	40.025
2.	0.00023756	10.737	50.762
3.	0.00019478	8.803	59.565
4.	0.00013314	6.017	65.583
5.	0.00011214	5.069	70.651
6.	0.00008588	3.882	74.533
7.	0.00006592	2.980	77.512
8.	0.00005204	2.352	79.865
9.	0.00004726	2.136	82.001
10.	0.00004250	1.921	83.921
11.	0.00003701	1.673	85.594
12.	0.00002862	1.293	86.888
13.	0.00002685	1.214	88.101
14.	0.00002275	1.028	89.129
15.	0.00002069	0.935	90.064
16.	0.00001915	0.865	90.930
17.	0.00001858	0.840	91.769
18.	0.00001766	0.798	92.568
19.	0.00001420	0.642	93.210
20.	0.00001279	0.578	93.788
21.	0.00001195	0.540	94.328
22.	0.00001122	0.507	94.835
23.	0.00000972	0.439	95.274
24.	0.00000937	0.423	95.698
25.	0.00000868	0.392	96.090
26.	0.00000840	0.380	96.470
27.	0.00000786	0.355	96.825
28.	0.00000684	0.309	97.134
29.	0.00000675	0.305	97.439
30.	0.00000623	0.281	97.721
31.	0.00000534	0.241	97.962
32.	0.00000503	0.227	98.189
33.	0.00000462	0.209	98.398
34.	0.00000446	0.202	98.599
35.	0.00000408	0.184	98.784
36.	0.00000350	0.158	98.942
37.	0.00000338	0.153	99.095
38.	0.00000297	0.134	99.229
39.	0.00000286	0.129	99.358
40.	0.00000260	0.117	99.476
41.	0.00000224	0.101	99.577
42.	0.00000210	0.095	99.672
43.	0.00000169	0.076	99.748
44.	0.00000160	0.073	99.821
45.	0.00000142	0.064	99.885
46.	0.00000096	0.043	99.928
47.	0.00000089	0.040	99.968
48.	0.00000070	0.032	100.000