

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis morfométrico del edeago y alas en poblaciones naturales de *Drosophila amaguana* y *D. neoamaguana* provenientes de Río Guango y Laguna de Papallacta provincia de Napo, Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

DANIEL AUGUSTO ROMERO DUEÑAS

Quito, 2018

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Daniel Augusto Romero Dueñas ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Violeta Rafael
Directora de la Disertación

Quito, 9 de febrero de 2017

A mi madre,

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por permitirme realizar mi trabajo de disertación y por financiar el proyecto.

A la Doctora Violeta Rafael, por sus valorables consejos y enseñanzas. Por darme la confianza y la paciencia para lograr culminar mi carrera.

A la Doctora Doris Vela por permitirme trabajar en el laboratorio, por aportarme con sugerencias valiosas y por ayudarme a agilizar los procesos para culminar mi trabajo de disertación.

A la Doctora María Fernanda Checa, por sus meritorios comentarios muy objetivos y por su apoyo para finalizar este trabajo.

A la Licenciada Soledad Santillán por sus apreciables consejos y por su apoyo incondicional en esta investigación.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética Evolutiva, a Ana Peñafiel, Ana Manzano, Jorge Vela, Nicolas Castillo y mucha gente que cursó por el laboratorio y ayudaron en esta investigación. Por su apoyo consejos e incentivo para continuar con mi carrera.

A mi familia, a mis padres y hermanos por ser las personas que formaron mi personalidad y me impulsaron a conseguir todas mis metas. Y a mi abuela por su amor.

A Carlos Carrión, Julio Cesar Carrión y Jhael Ortega, por haber realizado las capturas en Julio 2016 y también por realizar una parte de las placas analizadas.

A mis amigos que a lo largo de la carrera vieron mis logros y errores, mientras me apoyaron a seguir.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Población de Estudio	3
3.2 Evolución del Edeago	4
3.3 Evolución de las Alas	6
3.4 Morfometría	7
4. OBJETIVOS.....	9
4.1 Objetivo General.....	9
4.2 Objetivos Específicos	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1 Área de Estudio.....	10
5.2 Metodología de Muestreo	10
5.3 Fase de Laboratorio	11
5.3.1 Edeago.....	11
5.3.2 Alas.....	11
5.4 Análisis Morfométricos	11
5.4.1 Edeago.....	12
5.4.2 Alas.....	13
5.5 Análisis Estadístico.....	13
5.5.1 Análisis de Tamaño.....	13
5.5.2 Análisis de Conformación.....	14
5.5.3 Efecto Alométrico	14
6. RESULTADOS.....	15
6.1 Análisis Interespecíficos	15
6.1.1 Análisis del Tamaño del Edeago y Ala	15
6.1.2 Análisis de la Conformación del Edeago y el Ala	16
6.1.3 Análisis Alométrico.....	16
6.2 Análisis Intraespecíficos: Morfotipos de <i>Drosophila Neoamaguana</i>	16
6.2.1 Análisis del Tamaño	16
6.2.2 Análisis de la Conformación del Edeago y el Ala	17
6.2.3 Análisis Alométrico.....	18
7. DISCUSIÓN.....	19
7.1 Estudio Interespecífico.....	19
7.1.1 Descripción Comparativa.....	19
7.1.2 Variación Interespecífica del Tamaño del Edeago y el Ala.....	20
7.1.3 Variación Interespecífica de la Conformación del Edeago y las Alas	22
7.2 Estudio Intraespecífico de los Morfotipos de <i>Drosophila Neoamaguana</i>	23
7.2.1 Variación Intraespecíficas del Tamaño del Edeago y el Ala	23
7.2.2 Variación Intraespecíficas de la Conformación del Edeago y el Ala.....	25
8. CONCLUSIONES	27
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
10. FIGURAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Ecuador y las zonas de captura	36
Figura 2. Digitalización de pseudolandmarks en el contorno del edeago.....	37
Figura 3. Digitalización de landmarks del ala de <i>D. neoamaguana</i>	38
Figura 4. Variación interespecífica del tamaño del edeago y el ala	39
Figura 5. Diferencia de la conformación del edeago y el ala	40
Figura 6. Variación interespecífica de la conformación del edeago y el ala	41
Figura 7. Variación intraespecífica del tamaño del edeago y el ala	42
Figura 8. Diferencia de la conformación del edeago y el ala	43
Figura 9. Variación intraespecífica de la conformación del edeago y del ala	44
Figura 10. Árbol Neighbor-joining de la conformación del edeago y las alas	45
Figura 11. Análisis alométrico de la conformación del edeago y las alas	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de individuos capturados de <i>D. amaguana</i> y <i>D. neoamaguana</i> para los análisis morfométricos.....	48
Tabla 2.- Media (\bar{x}), desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) del tamaño del edeago (sqrA) y el ala (CS) de <i>D. amaguana</i> y <i>D. neoamaguana</i>	49
Tabla 3. Significación de la media del tamaño.....	50
Tabla 4. Reclasificación validada del edeago y las alas de las especies y morfotipos.....	51
Tabla 5. Significación estadística de las distancias de Mahalanobis.....	52

1. RESUMEN

La familia Drosophilidae es un claro ejemplo de diversificación y adaptación, no solo por su alto número de especies (3950) y su distribución cosmopolita, sino también por su rápida radiación. Estas características hacen de Drosophilidae un modelo muy interesante para estudios en genética evolutiva. El objetivo del presente estudio fue analizar la variación morfológica inter e intraespecífica del edeago y las alas de *Drosophila amaguana* y *D. neoamaguana*.

Para ello se realizó un análisis elíptico de Fourier en el edeago, y en el caso de las alas se usó la metodología de landmarks. Se trabajó con poblaciones naturales de *Drosophila amaguana* (alrededores Laguna de Papallacta y Río Guango) y de *D. neoamaguana* (Río Guango) provenientes de la provincia de Napo. Se analizaron 173 fotografías del edeago y 124 del ala de *D. amaguana* y de *D. neoamaguana*. Los resultados de este estudio permitieron discriminar a *D. amaguana* de *D. neoamaguana*. El tamaño del edeago varió significativamente ($P < 0.01$) entre las dos especies, mientras que en las alas el tamaño no presentó diferencias significativas ($P > 0.5$). *Drosophila neoamaguana* presentó variación morfológica en el edeago por lo que se le clasificó en 4 morfotipos. En los análisis intraespecíficos no se obtuvo diferencias significativas, ni en el tamaño ni en la conformación, entre los edeaos de algunos morfotipos ($P > 0.05$), lo cual permitió identificar dos grupos: grupo I, formado por los individuos de los morfotipos 2 y 4, mientras que, el grupo II lo conformaron los morfotipos 1 y 5. En las alas se encontró diferencias significativas únicamente entre el tamaño de los morfotipos 1 y 4 ($P = 0.039$), mientras que entre el resto de morfotipos no se encontró diferencias significativas ni en el tamaño ni en la conformación alar ($P > 0.05$). Estos resultados estarían indicando que la población de *D. neoamaguana* proveniente de Río Guango presenta mayor variación morfológica en el edeago, lo que podría sugerir que esta población se encuentra expuesta a un tipo de factor evolutivo. Para consolidar estos resultados se realizarán cruces intraespecíficos y análisis moleculares.

Palabras clave: Ala, *Drosophila*, Edeago, Genitalia, Morfometría.

2. ABSTRACT

The Drosophilidae family is a clear example of diversification and adaptation, not only because of its high number of species (3950) and its cosmopolitan distribution, but also because of its rapid radiation. These characteristics make Drosophilidae a very interesting model for studies in evolutionary genetics. The objective of this study was to analyze the interspecific and intraspecific morphological variation of the edeago and wings of *Drosophila amaguana* and *D. neoamaguana*.

For this, was performed an elliptical Fourier analysis for the edeago and in the case of the wings, was used the landmarks methodology. The work was made with natural populations of *Drosophila amaguana* (around Papallacta lagoon and Guango river) and *D. neoamaguana* (Guango river) from the province of Napo. 176 photographs of the edeago and 124 of the wing of *D. amaguana* and *D. neoamaguana* were analyzed. The results of this study allowed to discriminate *D. amaguana* from *D. neoamaguana*. The size of the edeago varies significantly ($P < 0.01$) between the two species, while in the wings there were no significant differences ($P > 0.5$). *D. neoamaguana* presented morphological variation in the edeago, so it was classified into 4 morphotypes. In the intraspecific analysis, were not found significant differences ($P > 0.5$) or size or conformation between of the many edeago morphotypes, this allowed the identification of two groups: (i) group I, formed by the individuals of morphs 2 and 4, while (ii) group two was formed by morphs 1 and 5. In the wings, significant differences were found only between the size of morphotypes 1 and 4 ($P = 0.039$), while among the rest of the morphotypes no significant differences were found in the size or in the wings conformation ($P > 0.05$). These results would indicate that in the population of *D. neoamaguana* from Río Guango it is the one that presents the greatest morphological variation of the edeago, which could suggest that in this population its exposed to some type of evolutionary factor. To consolidate these results, intraspecific crosses and molecular analyzes will be carried out.

Key words: Wing, *Drosophila*, Edeago, Genitalia, Morphometry.

3. INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo existen dificultades en el momento de delimitar el concepto de especie, y en particular el de especie morfológica, más que nada porque este concepto ha perdido soporte en los últimos años (Mayr, 1970). Dicho concepto propone “Las poblaciones naturales consideradas como especies son morfológicamente distintas. Las diferenciaciones morfológicas son, pues, el criterio decisivo de la categoría de especie. En consecuencia, toda población natural que sea morfológicamente distinta debe reconocerse como especie separada”. Sin embargo, se han reportado poblaciones simpátricas que morfológicamente son muy parecidas, pero que presentan cierto grado de aislamiento reproductivo. En *Drosophila*, la mayoría de complejos de especies contienen grupos de especies gemelas (Patterson y Stone, 1952). Un ejemplo claro es el de *D. pseudoobscura*, que Dobzhansky y Epling (1944) dividieron en dos razas por tener cierto grado de aislamiento reproductivo, por coexistir en amplias regiones sin cruzarse y por tener características cromosómicas con algunas diferencias, estas razas fueron elevadas al rango de especie.

3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El género *Drosophila* es un organismo modelo, esto se debe a que es uno de los más diversos dentro de la familia Drosophilidae (3950 especies) y se divide en 6 subgéneros (Robe, Valente, Budnik y Loreto, 2005). La mayoría de las especies de *Drosophila* fueron identificadas por el análisis de su genitalia como es el caso del grupo *Drosophila repleta*, que incluye más de 100 especies neotropicales, donde el carácter más importante en el diagnóstico taxonómico fue el edeago (Vilela, 1983; Franco, Soto, Sene y Manfrin, 2008).

En este estudio se trabajó con dos especies gemelas: *Drosophila amaguana* (Vela y Rafael, 2004), descubierta en el Volcán Pasochoa, (Provincia de Pichincha), Ecuador y *D. neoamaguana* (Ramos y Rafael, 2017) encontrada en Cosanga, cordillera de los Guacamayos, (Provincia de Napo), Ecuador. Estas especies fueron ubicadas en el grupo *D. mesophragmatica* (Vela y Rafael, 2004) debido a sus caracteres morfológicos como: color pardo; arista con 7 a 8 ramas; mesonoto polinoso y con bandas longitudinales; tergitos con bandas transversales interrumpidas en la línea media dorsal y expandida difusamente hacia los ángulos laterales (Brncic y Santibañez, 1957). Sin embargo, la morfología externa e interna de la genitalia de *D. amaguana* y *D. neoamaguana* tienen ciertas particularidades

que no tiene el resto de las especies del grupo *D. mesophragmatica*, los machos de las dos especies presentan el surestilo con dientes primarios y además dientes secundarios, mientras que las hembras poseen una espermateca pequeña no quitinizada y de forma semicircular (Vela y Rafael, 2004; Ramos y Rafael 2017). En el último año, se realizó un estudio filogenético que agrupó a *D. amaguana*, *D. neoamaguana* y *D. cashapamba* en un clado diferente al resto de especies del grupo *D. mesophragmatica*, por lo que no está claro las relaciones evolutivas de este trío de especies (Figuro, 2017). Este trabajo pretende dilucidar las diferencias morfológicas a nivel de la genitalia y las alas de *D. amaguana*, y *D. neoamaguana* para lograr comprender de mejor manera el grado de aislamiento mecánico que puede existir entre y dentro de cada especie.

Con estos antecedentes, se plantean dos preguntas: ¿Qué tan diferente es la morfología del edeago y el ala de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*? y ¿Cuál de las dos especies tienen mayor variación morfológica (morfotipos) en el edeago y el ala? Para responder a estas preguntas se utilizarán métodos morfométricos; esta metodología ha sido ampliamente utilizada, no solo en estudios taxonómicos y evolutivos, sino también en otros tipos de estudios como: desarrollo de enfermedades o lesiones, biología del desarrollo, ecología, biogeografía, entre otros. Por otra parte, una variación en la forma de cualquier parte del cuerpo, puede indicar, diferentes funciones realizadas por la misma estructura (Swiderski, Sheets, Fink, 2004).

Este análisis ayudará a comprender de mejor manera como cambios en la morfología del órgano reproductor de algunos géneros, como *Drosophila*, puede ser una barrera de aislamiento entre especies y poblaciones de la misma especie, igualmente un criterio muy importante para determinar una especie es el aislamiento en la reproducción, esta barrera puede provocar cierto grado de diferenciación morfológica, por lo que el aislamiento reproductivo es un mecanismo muy importante en el momento de generar una separación entre o dentro de la especie, lo que podría establecer un proceso evolutivo (Mayr 1970).

3.2 EVOLUCIÓN DEL EDEAGO

En los diferentes taxones de insectos existen ciertas estructuras anatómicas que son muy importantes para la identificación de las especies, entre ellas destaca la genitalia. Esta estructura permite reconocer a las especies y agruparlas en diferentes categorías como

género, subgénero y en clados muy abundantes y diversas como *Drosophila* existen grupos de especies (Rafael y Suyo, 1978; Salazar y Villalobos, 2016; Soto et al., 2006; Vilela, 1983).

La genitalia es una modificación de los dos últimos segmentos abdominales de *Drosophila* y está formada por el arco genital, surestilo, hipandrio, apodema y edeago (Vilela, 1983), cada una de estas estructuras difieren en forma y tamaño (Soto et al., 2006). Existen numerosos estudios que resaltan la importancia de la genitalia en la identificación taxonómica y en análisis filogenéticos (Throckmorton, 1962; Rafael y Suyo, 1978; Figuero, 2017).

El edeago es un órgano que tiene una evolución y divergencia más rápida que otras estructuras morfológicas, y puede ser muy útil en el momento de observar los eventos evolutivos, como la selección sexual (Arnqvist, 1997; Rafael y Suyo 1978; Zeng, Liu, Stam, Kao, Mercer, Laurie, 2000; Franco et al., 2008; Salazar y Villalobos, 2016).

Por lo general, el tamaño de la genitalia en los insectos no es alométrica, por este motivo es irrelevante el tamaño del individuo con el tamaño de su genitalia, es decir el edeago no varía, aunque las demás estructuras cambien. Existen estudios que indican que la forma y el tamaño del edeago evolucionaron independientemente, por lo tanto no afectaría una variación del tamaño en la forma de esta estructura. Por otra parte, también se sabe que un cambio de la morfología del edeago se relaciona con el éxito de apareamiento, la transferencia de esperma y la viabilidad de la población; por esta razón un análisis morfométrico del edeago puede brindarnos mucha información de las variaciones en las poblaciones biológicas (Soto et al., 2006; Soto et al., 2008).

Se han propuesto tres hipótesis para explicar la evolución y divergencia de la genitalia, estas son: la hipótesis de la llave y la cerradura, la pleiotrópica y la de selección sexual (Arnqvist, 1997).

La hipótesis de la llave y la cerradura es un concepto muy antiguo y común en la biología, esta hipótesis fue propuesta en la era predarwiniana (Dufour, 1844, tomado de Mayr, 1970), sin embargo, esta teoría sigue vigente como una explicación válida para la evolución de la genitalia. De acuerdo con esta teoría la genitalia es específica en cada especie, por lo tanto la genitalia masculina habría evolucionado para ser específicos,

invariables, únicos y para adaptarse adecuadamente a la genitalia de la hembra (Arnqvist, 1997).

La hipótesis pleiotrópica dice que la genitalia es el resultado indirecto de la evolución genética de caracteres correlacionados (Arnqvist, 1997). Mayr (1970) sostiene “que el verdadero significado de las diferencias en la genitalia estaría en relación con su estructura compleja, puesto que; serían el resultado del subproducto pleiotrópico de muchos genes”. Todo cambio en la constitución genética de una especie puede traducirse en una modificación en la estructura de la genitalia, y esto a su vez puede descompensar la función básica de transferencia de los gametos. Sin embargo, estas estructuras son menos vulnerables a la influencia de la selección natural, que los componentes del fenotipo externo.

La última hipótesis sostiene que la genitalia está involucrada en los eventos reproductivos, la selección sexual puede ser responsable de la evolución y la diversificación de la genitalia (Arnqvist, 1997). *Drosophila serata*, por ejemplo, usa un sistema de feromonas basadas en hidrocarburos cuticulares durante la elección de la pareja esto provoca que los machos y hembras con mayores cantidades de hidrocarburos cuticulares sean seleccionados a favor y logren pasar esta característica a la siguiente generación (Chenoweth y Blows, 2003).

3.3 EVOLUCIÓN DE LAS ALAS

Al igual que la genitalia existen otras estructuras que pueden afectar el “fitness” de un genotipo, por ejemplo las alas, esta estructura se relaciona con la presión selectiva local, principalmente las influencias ambientales (Cavicchi, Giorgi, Vanna, Guerra, 1991; Houle, Mezey, Galpern, Carter, 2003).

Por otra parte, debido a la configuración morfológica de las alas, estas presentan intersecciones entre las venas que proporcionan puntos de referencia los cuales se pueden ubicar con precisión, por este motivo la variación de la forma es fácil de cuantificar con los métodos basados en puntos de referencia, como los métodos morfométricos (Shimmi1, et al., 2017).

Las alas de los insectos cumplen varios tipos de funciones, la principal función es el vuelo, sin embargo también funcionan como órgano de los sentidos y en el cortejo emitiendo sonidos mediante vibraciones (Hoikkala y Crossley, 2000; Houle et al., 2003). Igualmente las alas de *Drosophila* son bastante fáciles para medir y manipular porque son bidimensionales, transparentes y relativamente resistentes. Como resultado de esto las alas de Drosophilidae son ampliamente utilizadas para estudios de genética del desarrollo, morfometría, evolución, etc. (Houle et al., 2003; Shimmi1 et al., 2017).

3.4 MORFOMETRÍA

La morfometría actual o morfometría cuantitativa nace como solución al problema que tenían los biólogos en el momento de hacer comparaciones morfológicas de forma robusta y congruente. Esto se debe a que los estudios cuantitativos producen imágenes o descripciones detalladas las cuales tiene un nivel de exactitud elevado en comparación a la morfología tradicional, la cual era muy abstracta y subjetiva. En consecuencia, la morfometría tiene una mayor relación con la estadística que con la biología, ya que es una rama del análisis matemático de formas, donde los datos están ligados a operaciones matemáticas más que a conceptos biológicos, de hecho, el primer trabajo de morfometría fue un modelo geométrico el cual tenía como objetivo solucionar un problema en la alineación de planchas metálicas (Swiderski et al., 2004). Sin embargo, en los últimos diez años la morfometría ha sido una herramienta muy importante en estudios biológicos.

En la actualidad existen varios estudios centrados en la morfometría del edeago en *Drosophila* (Vilela, 1983; Arnqvist, 1997; Soto, 2006); esto se debe a que el edeago es una estructura muy informativa en estudios de evolución, sistemática y taxonomía. (Arnqvist, 1997; Franco et al., 2008; Soto et al., 2006).

En septiembre del 2015 Manzano y Rafael (comunicación personal, 2017) realizaron capturas de *Drosophila* en Río Guango (Napo), donde se encontraron variaciones en la morfología del edeago de *D. neoamaguana*. Estos hallazgos plantearon la necesidad de un estudio con soporte estadístico, como son los métodos morfométricos. En el presente estudio se analizarán las diferencias morfológicas interespecíficas e intraespecíficas de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. Para visualizarlo es necesario aplicar una metodología ampliamente utilizada como es la morfometría; esta herramienta permite analizar la variación y

transformación morfológica, mediante una base matemática sólida la cual transforma la imagen observada en vectores o coordenadas que pueden ser analizadas estadísticamente (Swiderski, et al., 2004). Estos resultados ayudan a dilucidar el grado de aislamiento mecánico que existe entre *D. amaguana* y *D. neoamaguana* basándose en las variaciones morfológicas del edeago y el ala.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la variación morfológica interespecífica e intraespecífica del edeago y las alas de *Drosophila amaguana* y *D. neoamaguana*, mediante métodos morfométricos, para comprender, en parte, el grado de aislamiento mecánico de las dos especies.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la variabilidad morfológica del edeago y las alas de *Drosophila amaguana* y *D. neoamaguana*.
- Determinar la existencia de diferentes morfotipos de acuerdo a la estructura del edeago, esto permitirá ver en cuál de las dos especies podría estar actuando un evento evolutivo.
- Determinar en cuál de las dos especies existe mayor variación morfológica del edeago y las alas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las capturas se realizaron en las localidades de “Río Guango” (S 00° 22 54 W 78° 09 44.9, a 2650 msnm) y “Laguna de Papallacta” (S 00° 22 54.7 W 78° 09 44. 9, a 3450 msnm) provincia de Napo (Figura 1). El sector de Río Guango es parte de un bosque montano pluvial o bosque nublado, y se caracteriza por tener una vegetación que puede llegar a medir hasta 25 metros y una densidad muy fuerte del soto bosque. Este ecosistema se extiende de los 2000 hasta los 3000 msnm, con una temperatura promedio de 22 °C y una precipitación anual de 2600mm (Ministerio del Ambiente, 2012).

El otro lugar de muestreo se encuentra en las cercanías de la laguna de Papallacta, este es un bosque montano alto, y se caracteriza por tener un dosel de 10 a 15 metros, con abundantes briofitas y epífitas. Este ecosistema va desde los de 3000 a 3700 msnm, con una temperatura media de 17°C y una precipitación anual de 1400 mm (Ministerio del Ambiente, 2012).

5.2 METODOLOGÍA DE MUESTREO

La primera colecta fue realizada en el mes de julio del 2016 y la segunda en el mes de marzo del 2017.

Para el trapeo se usó botellas recicladas de plástico de 500 ml. En las cuales se colocó banano previamente fermentado con levadura activada (*Saccharomyces cerevisiae*). Las trampas fueron atadas en el bosque a un metro de altura desde el suelo.

Las drosófilas vivas que se encontraron dentro de las trampas fueron capturadas con la ayuda de un aspirador entomológico, luego se colocaron en tubos con medio de cultivo, simultáneamente se retiró los cebos y se trasladaron tanto los tubos como los cebos, en varios coolers, al laboratorio de genética evolutiva de la PUCE manteniendo temperaturas similares al lugar de captura. Con las hembras se fundaron isoclonas. Mientras que los cebos fueron preservados en el laboratorio hasta que los huevos puestos en el campo logren cumplir su ciclo de vida. Tanto las isoclonas como los cebos se mantuvieron a una temperatura de 17 °C

y una humedad estable en la cámara fría. Sin embargo, para este trabajo se tomó en cuenta únicamente los individuos capturados en el campo, ya que en las isolíneas no se encontró ni *D. amaguana* ni *D. neoamaguana*.

5.3 FASE DE LABORATORIO

Se separaron los individuos machos pertenecientes a *D. amaguana* y *D. neoamaguana*, se reconoció a las dos especies por la presencia de dientes primarios y también dientes secundarios en el surestilo del arco genital.

5.3.1 EDEAGO

Para la obtención de la genitalia se extrajo los 2 últimos segmentos abdominales, posteriormente se colocó en tubos eppendorf conteniendo KOH y fueron hervidas por 12 minutos, inmediatamente se realizaron microdisecciones para obtener el arco genital, hipandrio y edeago y luego fueron colocadas en placas escavadas conteniendo glicerol.

Para reconocer a los individuos de *D. amaguana* se utilizó la descripción de Vela y Rafael (2004), mientras que para *D. neoamaguana* se trabajó con la descripción de Ramos y Rafael (2017).

5.3.2 ALAS

Con la ayuda de alfileres entomológicos se extrajo cuidadosamente el ala derecha de cada individuo procurando no romper las venas alares ni el tórax, posteriormente se colocaron las alas en portaobjetos y fueron fijadas con Permount.

Las fotografías de las estructuras se realizaron en un microscopio Zeiss Discovery V8, al cual se le incorporó una cámara Zeiss.

5.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Se usó el programa Clic, este programa facilita la digitalización de las imágenes, los análisis estadísticos y la presentación de los datos.

Los análisis morfométricos se realizaron en los distintos módulos del software Collecting Landmarks for Identification and Characterization v98 (CLIC) (Dujardin y Slice 2007). Se aplicaron dos diferentes enfoques geométricos: (i) morfometría de contornos (outline) para el edeago (Figura 2) y (ii) morfometría basada en landmarks para las alas (Figura 3). Los pasos básicos de los análisis morfométricos son: 1) la digitalización de datos en el módulo COO v98, 2) la extracción de las variables forma y tamaño, lo cual utiliza técnicas distintas para cada enfoque y 3) la discriminación de grupos mediante las variables de formas.

5.4.1 EDEAGO

Se digitalizó un promedio de 170-180 pseudolandmarks alrededor del contorno exterior del edeago (Figura 2). En esta metodología los puntos no son equidistantes y no presentan el mismo número entre los individuos (Dujardin, Kaba, Solano, Dupraz, McCoy y Jaramillo, 2014). En las partes que presentan curvas muy marcadas, la cantidad de puntos es mayor (Rohlf, 1990).

Este análisis procura relacionar la imagen digitalizada con un número sucesivo de ciclos en los cuales una elipse se acerca a la imagen digital, esto se logra mediante la descomposición de la suma de senos y funciones de coseno, llamados armónicos (Franco et al., 2008). Las variables indican diferencias en la forma como una desviación de la configuración promedio de puntos de referencia (Dujardin et al., 2014).

Los armónicos recrean la forma, el número de armónicos determinará el grado de fidelidad de la forma extraída en comparación con la forma original (Krieger, 2010). El análisis del tamaño se realizó en el módulo FOG v98. Este software normaliza los contornos mediante los coeficientes de Fourier normalizados (NEF) por la superposición de Procrusters (Dujardin y Slice 2007).

En la digitalización de la imagen se tomó en cuenta solo el edeago sin incluir el apodema del edeago, el gonopodio y la paráfisis. Se obtuvieron las imágenes del edeago en

posición lateral, esta posición es útil al momento de capturar la estructura de forma bidimensional (Soto et al., 2008).

5.4.2 ALAS

Las alas se analizaron mediante landmarks (FIGURA 3), se digitalizaron 15 puntos de referencia ubicados en las intersecciones entre las venas y en los márgenes.

Los puntos fueron sometidos al Análisis Generalizado de Procrustes (GPA), lo que reduce la diferencia entre los landmarks (Zelditch, Swiderski, Sheets, Fink, 2004). Para lograr esto el centroide de cada configuración de puntos se traslada al origen, se escalan las configuraciones y se rotan las configuraciones (Rohlf y Slice, 1990; Dujardin y Slice, 2007).

El GPA (Análisis Generalizado de Procrustes) genera coordenadas, estas permiten visualizar la diferencia entre configuraciones y realizar los análisis multivariados (Zelditch et al., 2004). El tamaño alar se estimó con el tamaño del centroide (CS), el cual es la raíz cuadrada de la suma de las distancias elevadas al cuadrado entre el centro de la configuración de cada landmark (Bookstein, 1990).

Tanto para el edeago como para las alas se realizó una reclasificación validada, esta consiste en tomar un individuo al azar y relacionarlo con el resto de individuos, para obtener un porcentaje el cual demuestra cómo cada individuo se ajusta a la forma promedio del morfotipo en el que fue ubicada (Dujardin y Slice, 2007).

Para medir el error en la réplica de los contornos y los landmarks (error de muestreo), se realizó dos digitalizaciones, del edeago y las alas, de 50 individuos al azar. Con este análisis podemos observar que tan confiable son las digitalizaciones que realizamos.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.5.1 ANÁLISIS DE TAMAÑO

Se obtuvo la desviación estándar (SD), la media (\bar{x}), y la varianza (σ^2) del edeago y las alas. Se obtuvo la significación estadística mediante la prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) en el software VAR v98.

5.5.2 ANÁLISIS DE CONFORMACIÓN

Para el contorno del edeago, las variables NEF fueron examinadas por el análisis de componentes principales (PCA). Este análisis relaciona la variación entre los individuos. Los componentes de PCA con la mayor representación de la varianza, fueron usados en el análisis discriminante (DA) (Zelditch et al., 2004; Strauss, 2010). Se obtuvo las distancias de Mahalanobis (D2), cuya significación estadística se calculó gracias a una prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos).

Las distancias de Mahalanobis fueron utilizadas para construir el árbol *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). También para el análisis de forma se realizó la reclasificación validada. Esta metodología se basa en relacionar un individuo al azar (desconocido) y estimar la distancia de Mahalanobis, esto permite estimar al grupo al que pertenece (Strauss, 2010). Estos análisis fueron realizados en el módulo PAD v98 y COV v98.

5.5.3 EFECTO ALOMÉTRICO

Finalmente se evaluó la contribución del tamaño para cambios en la conformación del edeago y las alas. Esto se logró mediante una regresión, donde la variable independiente fue el tamaño y la dependiente fue la forma (Dujardin y Slice, 2007; Dujardin et al., 2014). La significación estadística se realizó gracias a la prueba de t de Student para muestras independientes. El efecto alométrico se analizó en el módulo COV v98.

6. RESULTADOS

En total se analizaron 173 placas de la genitalia masculina, 92 individuos de *D. amaguana* y 81 de *D. neoamaguana*. Se agrupó a *D. neoamaguana* en cuatro morfotipos, basados en variaciones morfológicas; el morfotipo uno presentó 26 individuos, el morfotipo dos 6 individuos, el morfotipo cuatro 33 individuos y el morfotipo cinco 16 con individuos. Debido a la exposición que presentaron las alas existe un daño por manipulación, por este motivo no se trabajó con el número total de individuos; en *D. amaguana*, se analizaron un total de 68 placas de alas, mientras que en *D. neoamaguana* se examinó un total de 58 alas, en este caso no se trabajó con el morfotipo dos ya que no existía ningún ala en buenas condiciones. Sin embargo se realizó 24 placas del ala del morfotipo uno, 17 placas del morfotipo cuatro y 15 placas del morfotipo cinco (Tabla 1).

El error de muestreo del edeago fue 1%, siendo los índices de repetitividad 0.99 para *D. amaguana* y 0.989 para *D. neoamaguana*; mientras que para alas el error de muestreo fue de 1%, con un índice de repetitividad de 0.99 para *D. amaguana*, pero un valor más alto para *D. neoamaguana* 44%, con un índice de repetitividad de 0.56.

6.1 ANÁLISIS INTERESPECÍFICOS

6.1.1 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DEL EDEAGO Y ALA

Se encontraron diferencias altamente significativas en el tamaño del edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana* ($P < 0,01$). El tamaño del edeago de *D. amaguana* (0.20 ± 0.014 mm) es más pequeño que el de *D. neoamaguana* (0.27 ± 0.056 mm) (Tabla 2). *Drosophila amaguana* presentó un tamaño más estable (Figura 4), una varianza significativamente menor (0.00019 mm) a la que presentó *D. neoamaguana* (0.00318 mm) ($P < 0.01$) (Tabla 2).

El tamaño alar no fue significativamente diferente entre *D. amaguana* (6.25 ± 0.423 mm) y *D. neoamaguana* (6.27 ± 0.274 mm) ($P = 0.758$). Contrario a lo que se observó en la varianza, *D. amaguana* (0.179 mm) presentó varianza significativamente mayor a la de *D. neoamaguana* (0.075 mm) ($P = 0.003$) (Tabla 3).

6.1.2 ANÁLISIS DE LA CONFORMACIÓN DEL EDEAGO Y EL ALA

Se encontraron diferencias en la forma del edeago de *D. amaguana* que tiene un edeago robusto y con una curvatura en la parte dorsodistal (Figura 2a), mientras que el edeago de *D. neoamaguana* es delgado sin curvatura dorsodistal (Figura 2b).

El análisis discriminante (DA) mostró que existe una clara diferencia en la conformación del edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*, no hubo solapamiento entre las dos especies. La distancia de Mahalanobis entre especies fue de 52.70, la cual fue significativa ($P < 0.001$).

La conformación alar mostró pequeñas diferencias entre las dos especies, principalmente en los landmarks 3, 6, 12, 13, 14 y 15 (Figura 5). En el DA se observa que las dos especies presentan diferencias, las cuales no son muy claras debido al solapamiento de algunos individuos (Figura 6). Esto se refleja en la distancia de Mahalanobis (4.10), la cual fue significativa ($P < 0.001$).

El porcentaje de reclasificación de la conformación del edeago entre especies fue del 100%; mientras que en las alas este porcentaje disminuyó, siendo posible clasificar correctamente el 98% de alas de *D. amaguana* y el 92% de *D. neoamaguana* (Tabla 4).

6.1.3 ANÁLISIS ALOMÉTRICO

Se obtuvo un coeficiente de determinación de 70% para el edeago, esto propone que el cambio en el tamaño influencia en un 70% al cambio en la forma, este coeficiente fue altamente significativo ($P < 0.01$). Mientras que, para las alas se observó que no existe ninguna influencia del tamaño en la forma, el coeficiente de determinación fue 0%

6.2 ANÁLISIS INTRAESPECÍFICO: MORFOTIPOS DE *Drosophila neoamaguana*

6.2.1 ANÁLISIS DEL TAMAÑO

Se obtuvo diferencias altamente significativas entre el tamaño del edeago de algunos morfotipos de *D. neoamaguana* ($P < 0.01$), sin embargo no se encontró diferencias entre el

tamaño del edeago del morfotipo 2 y del morfotipo 4 ($P=0.154$) y tampoco en el tamaño del edeago del morfotipo 1 y el morfotipo 5 ($P=0.077$) (Tabla 3).

El tamaño del edeago permitió identificar dos grupos, grupo I, formado por los individuos de los morfotipos 2 y 4, los que presentan edeago pequeño (0.22 ± 0.012 mm y 0.21 ± 0.016 mm, respectivamente) y el grupo II, que integran los individuos de los morfotipos 1 y 5 (Figura 7), que presentaron edeago significativamente más grandes que los del grupo I (0.32 ± 0.017 y 0.33 ± 0.019) (P entre 0.000 y 0.1540). En cuanto a la varianza se encontró diferencias significativas únicamente entre los morfotipos 4 y 5 ($P=0.048$), mientras que el resto de morfotipos no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$).

En las alas no se observaron diferencias significativas entre los tres morfotipos ($P>0.05$), sin embargo, el morfotipo 4 presentó los individuos más grandes, mientras que el morfotipo 1 los individuos más pequeños, contrario a lo observado en el edeago (Figura 7). En cuanto a la varianza se observó el mismo patrón ya que no existieron diferencias significativas entre los morfotipos de *D. neoamaguana*.

6.2.2 ANÁLISIS DE LA CONFORMACION DEL EDEAGO Y EL ALA

El morfotipo uno presenta un edeago delgado, de punta bífida, alargada hacia el lado dorsal. Espolón subapical puntiagudo y recto, seguido por un estrechamiento (Figura 2).

El morfotipo dos presenta el edeago sin alargamiento, el espolón es muy puntiagudo, delgado y quitinizado. En la base del espolón existe un estrechamiento y con proceso dorsal apenas perceptible (Figura 8). La base del edeago es ligeramente curva (A. Peñafiel, comunicación personal, 25 de octubre del 2017).

El morfotipo cuatro posee una genitalia con el edeago quitinizado, parte distal ligeramente curvada hacia el lado dorsal (Figura 8). Con un ligero estrechamiento subapical y proceso dorsal apenas perceptible (A. Peñafiel, comunicación personal, 25 de octubre del 2017).

El morfotipo cinco presentó un edeago quitinizado y delgado, punta bífida, alargada hacia el lado dorsal. Dos espolones subapicales, puntiagudos y quitinizados, seguidos de dos

estrangulaciones (Figura 8). Base del edeago curvo y delgado; con proceso dorsal (A. Peñafiel, comunicación personal, 25 de octubre del 2017).

Los análisis de forma agruparon a los morfotipos en los dos grupos señalados anteriormente, donde la forma del edeago del grupo I (morfotipos 2 y 4) presentaron una conformación del edeago robusta y con la parte distal recta; mientras que el edeago del grupo II (morfotipos 1 y 5) son más delgados y con la parte distal ligeramente curva hacia el lado dorsal, sin embargo, cada morfotipo tiene una morfología particular (Figura 8).

En el análisis discriminante se observó que estos dos grupos están bien diferenciados. El CV1 representa el 83% de la variación total, mientras que el CV2 representa 0% (Figura 9), el primer eje diferencia los grupos I y II, mientras que el segundo diferencia la variación dentro de cada grupo. El DA de las alas mostró el mismo patrón que en el edeago, pero al no tener representantes del morfotipo 2, se separó el morfotipo 4 de los morfotipos 1 y 5 (Figura 9). El CV1 y el CV2 explican el 76% y 24% de la variación total, respectivamente. Las distancias de Mahalanobis mostraron significación entre los grupos I y II (P entre 0,119 y 0,078) (Tabla 5).

La reclasificación validada de la conformación del edeago permitió clasificar correctamente el 61% de los edeagos del morfotipo 1, 50% del morfotipo 2, 72% del morfotipo 4 y 50% del morfotipo 5. La conformación alar permitió clasificar correctamente al 54% de las alas del morfotipo 1, 58% del morfotipo 4, 46% del morfotipo 5 (Tabla 4).

El árbol fenético construido en base al contorno del edeago muestra que *D. amaguana* es el taxón más diferente. Los morfotipos de *D. neoamaguana* se dividieron en dos clados, que corresponde a los grupos I y II, formados por los morfotipos 2 y 4 y, los morfotipos 1 y 5. El árbol basado en la conformación alar mostró el mismo patrón que el del edeago (Figura 10).

6.2.3 ANÁLISIS ALOMÉTRICO

El coeficiente de determinación que se obtuvo para los morfotipos del edeago fue de 72% este resultado propone que un cambio en el tamaño influye a un cambio en la forma. Mientras que para las alas el coeficiente de determinación fue 11% (Figura 11).

7. DISCUSIÓN

Existen estudios, donde analizaron estructuras de *Drosophila*, la genitalia masculina, las alas e inclusive de la pigmentación abdominal, para explicar fenómenos evolutivos en las poblaciones de este género (Carreira et al., 2006; Soto, 2008; Prieto y Polanco, 2009). En los resultados se encontró diferencias significativas inter e intra específicos, en el tamaño y en la conformación del edeago y el ala; por lo que se podría suponer que en las poblaciones estudiadas existe cierto grado de aislamiento mecánico.

Se encontró un error de muestreo del 1% tanto para el edeago como para las alas de *D. amaguana*, y *D. neoamaguana*. Sin embargo, en los análisis intraespecíficos de *D. neoamaguana* se encontró un error de muestreo del 5% en el edeago y de 44% en las alas, el porcentaje tan alto para las alas puede ser debido a que algunas de las alas con las que se realizó este análisis estaban conservadas en alcohol y esto pudo afectar en la pigmentación de las venas alares y al ancho de las venas, siendo más complicado replicar los puntos colocados (landmarks).

7.1 ESTUDIOS INTERESPECÍFICOS

7.1.1 DESCRIPCIÓN COMPARATIVA

En el edeago encontramos diferencias significativas en tamaño y forma, lo que se ve reforzado en otros estudios realizados con este género (Soto, 2008; Franco et al., 2008). El edeago de *D. amaguana* posee dos proyecciones, un proceso dorsal, en forma de gancho y el espolón más corto y robusto en la zona sub apical (Vela y Rafael, 2004), mientras que el edeago de *D. neoamaguana* presenta un proceso dorsal no prominente y un espolón alargado y puntiagudo en la zona subapical. En el nacimiento de los espolones existe un estrechamiento (a modo de cuello o silla de montar), y que está ausente en *D. amaguana* (Ramos y Rafael, 2017).

En el presente trabajo no se registraron diferencias morfológicas entre las alas de los individuos analizados, pese a que en otras especies de este género sí se ha registrado diferencias en la forma de las alas, como en *D. buzzatii* y *D. koepferae* (Carreira et al., 2006). Las alas de *D. amaguana* tiene una longitud de 5.5 mm, una pigmentación ligeramente oscura y el cruce dM-Cu más oscuro (Vela y Rafael, 2004), mientras que *D. neoamaguana*

presenta unas alas color marrón amarillento, dM-Cu y R-N y son ligeramente sombreadas (Ramos y Rafael 2017).

El género *Drosophila* posee una gran capacidad de adaptación, lo cual ha favorecido a la colonización de la mayoría de hábitats. En los Andes Sudamericanos este género está representado por varios grupos de especies, uno de ellos es el grupo *D. mesophragmatica*, Este grupo se encuentra en hábitats como; bosques andinos y valles interandinos (Brcic y Santibañez, 1957; Vela y Rafael, 2004; Tamayo, 2015; Ramos y Rafael 2017). Dentro del grupo *D. mesophragmatica* encontramos a *D. amaguana* y *D. neoamaguana* (Vela y Rafael, 2004). Sin embargo, en un estudio sobre filogenia molecular del grupo *D. mesophragmatica* Figuero (2017) ubica a estas dos especies en un clado diferente al grupo *D. mesophragmatica*.

7.1.2 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO DEL EDEAGO Y EL ALA

Tanto en *D. amaguana* y *D. neoamaguana* se analizó el tamaño por medio de dos variables obtenidas mediante morfometría geométrica, el tamaño del centroide (CS) y la variación de la raíz cuadrada de la superficie (SqrA), en este análisis se encontraron diferencias significativas en el tamaño del edeago, pero no se encontraron diferencias en el tamaño de las alas. En general las principales causas de las diferencias de tamaño están relacionadas con la fisiología de los organismos y la heterogeneidad del ambiente (Dujardin, et al., 1997; Dujardin et al., 2007). Existen estudios que muestran que el tamaño también puede ser afectado por la nutrición o el nivel de salud de los adultos (Steinwascher, 1984; Catalá, 1989; Zheng et al., 2015).

En el presente trabajo no se logró medir la influencia del ambiente, ya que no existen estudios ecológicos que nos permitan dilucidar el nicho que explota cada especie, sin embargo se puede mencionar que la morfología del edeago de *D. amaguana* es estable, a pesar de vivir en dos localidades diferente separadas por al menos 50 km; lo cual hace suponer que en las poblaciones de *D. amaguana* el ambiente no es el principal factor que afecta a cambios en la morfología del ala y el edeago.

Mientras que *D. neoamaguana*, de la población de Rio Guango, presentó una morfología heterogénea a nivel del edeago. Sin embargo, existen trabajos que muestran que en el ambiente pueden existir algunos factores que estén influenciando cambios en la morfología del edeago, un ejemplo bastante claro es la variación morfológica que presentaron *D. buzzatii* y *D. koepferae* y sus híbridos en presencia de varios tipos de sustratos (Carreira et al., 2006). Además de esto se ha documentado que el medio de cultivo tiene efectos en el fenotipo de moscas cactofílicas como pueden ser el largo de tórax (Fanara, Fontdevila, Hasson, 1999; Fanara, Mensch, Folguera, Hasson, 2004), el patrón de venación y el tamaño del ala (Soto et al., 2006), el tiempo de desarrollo (Fanara et al., 1999), y la viabilidad larvaria (Fanara et al., 1999, Fanara y Hasson, 2001).

El tamaño del ala de *Drosophila* es un carácter muy variable fenotípicamente y se debe a que esta estructura puede sufrir cambios drásticos provocados por diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto, la reproducción en diferentes ambientes, como puede ser el sustrato del cual se alimentan las drosófilas, podrían imponer presiones selectivas sobre el acervo genético de la población, manteniendo la variación genética y a un genotipo y fenotipo estable (Carreira et al., 2006).

Los análisis del tamaño del ala de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*, no muestran diferencias significativas. La homogeneidad en la morfología del ala puede ser provocado debido a limitaciones ontogénicas de esta estructura, ya que parte del desarrollo del ala de *Drosophila* pasa por la determinación del eje distal-proximal mediante la expresión de varios genes, algunos de ellos de altos niveles jerárquicos en la cascada regulatoria, esto podría provocar un cambio entre la tasa de crecimiento de líneas celulares que crecen en paralelo (Williams, Paddock y Carroll, 1993; Couso, Bishop y Arias, 1994; Villano y Katz, 1995; Campbell y Tomlinson, 1998).

Existen evidencias de que rasgos relacionados con el tamaño corporal, como la longitud del ala, están bajo selección natural, además este carácter puede determinar el éxito reproductivo en ciertas especies. Pese a esto el ala en *Drosophila* es una estructura modelo en estudios evolutivos y tiene un notable potencial para evolucionar bajo selección (Carreira et al., 2006).

7.1.3 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN DEL EDEAGO Y LAS ALAS

Con estos resultados podemos evidenciar la heterogeneidad tanto del edeago como de las alas de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*, ya que se encontró diferencias significativas en la conformación de estas dos estructuras. Esto podría ser provocado por barreras en el flujo génico o microambientales (Carreira et al., 2006; Soto, 2008).

La genitalia masculina presenta una tasa de evolución rápida, además de esto, se ha observado que esta estructura puede ser muy útil a nivel taxonómico e inclusive se ha generado filogenias en base a este carácter (Throckmorton, 1962). La genitalia posee un desarrollo canalizado, lo cual se refiere a la capacidad que tiene un genotipo para mantener estable su fenotipo pese a cambios en su entorno (Franco et al., 2008; Zeng, et al., 2000).

Tidon-Sklorz y Sene (2001) propone que las especies del grupo *D. serido* tienen un parecido morfológico y que este puede atribuirse a su reciente ancestro común y a la ausencia de presiones ambientales y ecológicas que promuevan la diferenciación morfológica, debido a la semejanza entre los hábitats en los que se encuentran las especies de este grupo. Además, la variación en la morfología del edeago de *Drosophila* es similar entre especies cercanas (Soto, 2008).

En el análisis de la conformación del edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana* se obtuvo diferencias significativas ($P < 0.01$); la conformación del edeago podría ser producto de una divergencia inicial la cual puede ser explicada por uno de los postulados de la evolución del edeago. Sin embargo, se conoce muy poco del valor adaptivo de la variación en la morfología del edeago, por lo que no se puede adelantar cuál es el proceso evolutivo que rige este cambio. De todas maneras, se pueden proponer hipótesis que se ajusten a los resultados obtenidos; como la hipótesis de la pleiotropía, la cual propone que un cambio en la morfología está controlado por varios genes y al modificar uno de estos genes se modificará la forma de la genitalia, si este cambio tiene un valor adaptativo, ya sea ecológico o sexual, puede fijarse en la población y generar divergencia (Soto, 2008).

En el caso de las alas el análisis discriminante muestra solapamiento entre las dos especies y la reclasificación validada fue más baja que la del edeago, esto puede ser debido

a que las alas son un carácter que está sujeto a varios factores ambientales y a restricciones del desarrollo (Fanara et., al 2001, 2004; Carreira et al., 2006). Sin embargo, si existió diferencias significativas entre la conformación alar de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*, esto se ve reflejado en el en el valor de la distancias de Mahalanobi (4.10; $P < 0.001$)

Por otra parte, la forma y el tamaño del edeago fueron significativamente correlacionados, esto sugiere que factores que afectan al tamaño pueden afectar directa o indirectamente a la conformación del edeago (Carreira et al., 2006). Al presentar alometría el edeago puede tener cambios en la conformación que se expliquen a partir de cambios en el tamaño de esta estructura (Soto, 2008).

7.2 ESTUDIO INTRAESPECÍFICO DE LOS MORFOTIPOS DE *Drosophila neoamaguana*

Para este análisis se trabajó con *D. neoamaguana*, debido a que esta especie presentó morfotipos en el edeago, lo cual facilita el análisis del edeago y el ala, mientras que *D. amaguana* no presentó mayor variación morfológica por lo que no es oportuno realizar el análisis intraespecífico de esta especie.

7.2.1 VARIACIÓN INTRAESPECÍFICAS DEL TAMAÑO DEL EDEAGO Y EL ALA

El tamaño del edeago de *D. neoamaguana* muestra dos tendencias, una es un edeago pequeño, similar al tamaño del edeago de *D. amaguana*, mientras que la otra tendencia es tener un edeago más grande, y no existen morfotipos intermedios.

Soto (2008) al analizar los edeagos del complejo *D. buttzati* encuentra la existencia de dos grupos sin una morfología completamente intermedia, y lo atribuye al componente genético de una población en proceso de hibridación, este resultado morfológico depende de las múltiples interacciones de genes responsables del desarrollo del edeago y la combinación específica que resulta de la herencia de los dos genomas distintos.

Drosophila neoamaguana se encontró únicamente en la localidad de “Río Guango” (2650msnm), por lo cual, se supone que no existe efecto de la geografía, por este motivo la diferenciación morfológica puede no estar correlacionada con la distancia entre las

localidades ya que estas especies presentan zonas de interacción, y las causas deberían buscarse en procesos que no dependan del flujo génico, como podría ser la selección natural o la selección sexual dentro de cada población, esto puede promover la divergencia (Soto, 2008).

Existe un mayor grado de diferenciación morfológico en poblaciones simpátricas en comparación a poblaciones alopátricas. Estas diferencias pueden deberse también a eventos históricos donde existió barreras que impidieron el flujo de genes, y que se remarcan en poblaciones que tienen zonas de interacción, sin embargo este tipo de impedimento no se encuentran en todas las poblaciones naturales de *Drosophila*, esto se debe a un amplio flujo de genes entre las poblaciones o debido a una divergencia reciente (Soto, 2008). Este es un ejemplo muy común en la naturaleza, el gorgojo (*Calandra oryzae*) presentan dos poblaciones que pese a coexistir en el mismo lugar no se cruzan y sus diferencias morfológicas son más conspicuas que poblaciones que viven en diferentes localidades (Mayr, 1970).

La variación del tamaño de origen génico se puede atribuir al fenómeno de la asimilación genética, este proceso favorece a un carácter fenotípico. Inicialmente el cambio en la morfología se produce en respuesta al medio ambiente, sin embargo se convierte en un carácter genotípico estable mediante la selección, de modo que es independiente a influencias ambientales (Waddington, 1953).

En las alas no se encontró la misma tendencia ya que en este caso no hubo ningún tipo de patrón. No se encontró diferencias significativas entre los morfotipos de *D. neoamaguana*. Estos resultados proponen que las alas de *D. neoamaguana* tienen más factores que la regulan. Se ha propuesto que la composición genética del tamaño y la conformación alar involucran factores génicos con efectos dominantes y de epistasis (Gilchrist y Partridge, 1999). Además, existe evidencia de que aspectos del ala (tamaño y forma) de algunas especies de *Drosophila* son blanco de selección natural (Gilchrist et al. 2004; Soto et al., 2008).

7.2.2 VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN DEL EDEAGO Y EL ALA

En el edeago de *D. neoamaguana* los morfotipos formaron dos grupos significativamente diferentes (grupo I y II descritos en los resultados). Esta diferencia en la conformación del edeago es importante ya que puede generar aislamiento, además individuos con un fenotipo “raro o externo” pueden desencadenar procesos microevolutivos (Soto, 2008).

La conformación del edeago presentó el porcentaje de reclasificación con el rango más amplio, esto puede ser debido a que el edeago es un carácter muy variable en la conformación, además está sujeto a una divergencia más rápida y a selección sexual. El porcentaje de reclasificación obtenido para las alas tiene menor variación y un porcentaje más bajo, en otras palabras, las alas son más parecidas entre sí que los edeaos, esto puede ser debido a que las alas presentan menos factores que afecten la forma (Carreira et al., 2006; Soto, 2008)

La divergencia evolutiva en la morfología de la genitalia masculina representa una de las características más importantes en animales con fecundación interna (Arnqvist 1998), por este motivo la genitalia masculina provee caracteres taxonómicos útiles para distinguir entre organismos a nivel de especie donde ningún otro rasgo morfológico es válido (Eberhard 1985), sin embargo, las diferencias que presentan las poblaciones proponen la posibilidad de un proceso de divergencia morfológica no muy acentuado entre las mismas (Soto, 2008).

El edeago es un órgano que está involucrado en el acoplamiento mecánico de la cópula, por lo que un cambio en la conformación de esta estructura podría impedir el acoplamiento de los genitales (Soto, 2008).

En las alas no se obtuvo el mismo patrón de agrupación que en el edeago, ya que en este caso no existió la conformación de grupos ni diferencias significativas entre los morfotipos de *D. neoamaguana*.

Los estudios de la morfología alar han demostrado que los compartimentos principales del ala pueden actuar como unidades independientes de la selección, esto está relacionado su vez con la adaptación del tamaño y la forma del ala (Carreira et al., 2006). Al no encontrar diferencias significativas en la conformación alar de *D. neoamaguana*, podemos suponer que no existen presiones selectivas, tan fuertes como en el edeago, que actúen en las alas. También se ha observado que la forma está sujeta a restricciones de desarrollo más fuertes que para el tamaño y que los factores que afectan al tamaño son diferentes a los que afectan a la conformación del ala (Soto, 2008; Carreira et al., 2006).

8. CONCLUSIONES

- Existen diferencias morfológicas significativas entre el edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. Por lo que se supone que no puede existir cruces entre las dos especies.
- El edeago de *D. neoamaguana* presenta mayor variación en la forma y el tamaño, por lo tanto esta especie es más interesante para estudios de aislamiento y evolución.
- Existe la presencia de dos morfotipos de edeaos en la población de *D. neoamaguana*, esto supone la existencia de cierto grado de aislamiento mecánico.
- Las alas son un caracter más conservado que el edeago dentro del género *Drosophila*.
- Es importante conocer la ecología de estas especies, para procurar comprender de mejor manera cual es el factor que está generando variaciones morfológicas.
- Es necesario completar este estudio con otros análisis como cruces interespecíficos e intraespecíficos y análisis moleculares.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnqvist, G. (1997). The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60 (3), 65–379.
- Arnqvist, G. y Thornhill, R. (1998). Evolution of animal genitalia: patterns of phenotypic and genotypic variation and condition dependence of genital and non-genital morphology in water strider (Heteroptera: Gerridae: Insecta). *Genetics Research*, 71(3), 193-212.
- Ayala, F. J., y Coluzzi, M. (2005). Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (1), 6535-6542.
- Baechli, G., Vilela, C., Andersson, S. y Saura, A. (2004). The *Drosophila* (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. Boston: Brill.
- Brcic, D. y Santibañez, K. (1957). The mesophragmatica group of species of *Drosophila*. *Evolution*, 11 (3), 300-310.
- Bookstein, F. (1990). Higher-Order Features of Shape Change for Landmark Data. En: Proceeding of the Michigan morphometrics of Workshop. (Rohlf, J. & Bookstein, F., eds.). pp. 237-250. The University of Michigan Museum of Zoology. Special Publication No. 2. Ann Arbor-Michigan.
- Campbell, G. y Tomlinson, A. (1998). The roles of the homeobox genes *aristaless* and *Distalless* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development*, 125(22), 4483-4493.
- Carreira V. P., Soto I. M., Fanara J. J. y Hasson, E. (2006). Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *Journal of Evolutionary Biology*, 9 (1), 1275-1282.
- Catalá, S.S. (1989). Relaciones entre consumo de sangre y ovogenesis en *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera-Reduviidae). *Chagas* (5), 3–10.

- Cavicchi, S., Giorgi, G., Vanna, N. y Guerra, D. (1991). Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. III. Fourier and centroid analysis of wing shape and relationship between shape variation and fitness. *Journal of Evolutionary Biology*, 4(1), 141-159.
- Chippindale, A. K., Gibson, J. R. y Rice, W. R. (2001). Negative genetic correlation for adult fitness between sexes reveals ontogenetic conflict in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1671-1675.
- Chenoweth, S., Blows, M. 2003. Signal trait sexual dimorphism and mutual sexual selection in *Drosophila serrata*. *Evolution*, 57(10), 2326–2334.
- Couso, J. P., Bishop, S. A. y Arias, A. M. (1994). The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development*, 120(3), 621-636.
- David, J. R., Gibert, P, Pétavy, G. y Moreteau. B. (2002). Variable modes of inheritance of morphometrical traits in hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269 (1487), 127-135.
- Dobzhansky, Th. y Epling, C. (1944) Contribution to the genetics, taxonomy, and ecology of *Drosophila pseudoobscura* and its relatives. *Carnegie Inst. Wash. Publi.*, (554), 1-46
- Dufour, L. (1844). Anatomie generale des Dipteres. *Annuaire de Science Naturelle*, 1 (1), 244–264.
- Dujardin, J. P. y D Slice D. (2007). Geometric morphometrics: Contributions to Medical Entomology. En: M. Tibayrenc (Eds.) *Encyclopedia of Infectious Diseases – Modern Methods* (pp: 435–445). New York: John Wiley and Sons Inc.
- Dujardin, J. P., Bermudez, H. y Schofield, C. J. (1997). The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta tropica*, 66(3), 145-153.

- Dujardin, J., Kaba, D., Solano, P., Dupraz, M., McCoy, K. y Jaramillo, N. (2014). Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies? *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 704-714.
- Eberhard, W. G. (1985). *Sexual selection and animal genitalia*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Fanara, J. J. y Hasson, E. (2001). Oviposition acceptance and fecundity schedule in the cactophilic sibling species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* on their natural hosts. *Evolution*, 55 (1), 2615-2619.
- Fanara, J. J., Fontdevila, A. y Hasson, E. (1999). Oviposition preference, viability, developmental time and body size in the cactophilic sibling species *Drosophila koepferae* and *D. buzzatii* in association to their natural hosts. *Evolutionary Ecology*, 13(1), 173–190.
- Fanara, J. J., Mensch, J., Folguera, G. y Hasson, E. (2004). Developmental time and thorax length differences between the cactophilic species *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae* reared in different natural hosts. *Evolutionary Ecology*, 18 (1), 203-214.
- Fernández Iriarte, P. y Hasson, E. (2000). The role of the use of different host plants in the maintenance of the inversion polymorphism in the cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 54(4), 1295-1302.
- Figuro, L. (2017). *Filogenia molecular de especies ecuatorianas del grupo Drosophila mesophragmatica (Diptera, Drosophilidae)*. Tesis previa a la obtención del título de Magister en Biología de la Conservación. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Franco, F. F., Soto, I. M., Sene, F. M. y Manfrin, M. H. (2008). Phenotypic variation of the aedeagus of *Drosophila serido* Vilela y Sene (Diptera: Drosophilidae). *Neotropical entomology*, 37 (5), 558-563.

- Gilchrist, A. S. y Partridge, L. (2001). The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 86(2), 144-152.
- Gilchrist, G. W., Huey, R. B., Balanyà, J., Pascual, M. y Serra, L. (2004). A time series of evolution in action: a latitudinal cline in wing size in South American *Drosophila subobscura*. *Evolution*, 58(4), 768-780.
- Gilchrist, A., Partridge, P. 1999. A comparison of the genetic basis of wing size divergence in three parallel body size clines of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 153: 1775-1787
- Houle, D., Mezey, J., Galpern, P. y Carter, A. (2003). Automated measurement of *Drosophila* wings. *BMC evolutionary biology*, 3 (1), 25.
- Hoikkala, A., Crossley, S. 2000. Copulatory Courtship in *Drosophila*: Behavior and Songs of *D. birchii* and *D. serrata*. *Journal of Insect Behavior*, Vol. 13 (1).
- Krieger, J.D. 2010. Controlling for Curvature in the Quantification of Leaf Form. En: *Morphometrics for Nonmorphometricians*. (Elewa, A.) pp. 27-71. Minia University. Springer. Minia, Egypt
- Manly, B. (2004). *Multivariate statistical methods: A primer*. Third edition. Illinois: Statistics Texts.
- Mayr, E. (1970). *Population, Species and Evolution*. Hermann: Harvard University Press.
- Patterson, J. T. y Stone, W. S. (1952) *Evolution in the genus Drosophila*. New York: Macmilan
- Rafael, V. y Suyo, T. (1978). Genitalia externa de dos poblaciones de *Drosophila ananassae* y de tres poblaciones de *D. kikkawai*. *Revista Peruana de Entomología*, 21 (1), 83–87.

- Ramos, E.; Rafael, V. (2017). Cinco especies nuevas del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en la provincia de Napo, Ecuador. *Iheringia, Série Zoologia*, 107.
- Robe, J., Valente, S., Budnik, M. y Loreto, E. (2005). Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36 (3) 623–640.
- Rodriguez, C, Fanara, J. J. y Hasson, E. (1999). Inversion polymorphism, longevity, and body size in a natural population of *Drosophila buzzatii*. *Evolution*, 53 (2), 612-620.
- Rohlf, F.J. & Slice, D.E. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40-59.
- Prieto, R. Polanco, M. 2009. Análisis morfométrico de la pigmentación en especies colombianas de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) del grupo repleta. *Revista Colombiana de Entomología* 35 (2): 224-229.
- Salazar, J. y Villalobos, A. (2016). Descriptive morphology of the male genitalia in some neotropical species of the tribe anaeini (Lepidoptera, Charaxidae). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 20 (2), 199-224.
- Shimmi1, O., Matsuda1, S. y Hatakeyama, M. (2017). Insights into the molecular mechanisms underlying diversified wing venation among insects. *Pro. R. Soc. B* (281): 20140264.
- Silva, A., y Sene, F. (1991). Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae). *Revista brasileira de Entomología*, (35), 455-468.
- Soto, I. (2008). *Evolución morfológica asociada al proceso de divergencia entre especies: el cluster Drosophila buzzatii (Diptera, Drosophilidae)*. Tesis previa a la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

- Soto, I., Carreira, V., Fanara, J. y Hasson, E. (2006). Evolution of male genitalia: environmental and genetic factors affect genital morphology in two *Drosophila* sibling species and their hybrids. *BMC Evolutionary Biology*, 7 (1), 77.
- Soto, I., Manfrin, M. y Hasson, E. (2008). Host-dependent phenotypic plasticity of aedeagus morphology in a pair of cactophilic sibling *Drosophila* species of the repleta group (Diptera, Drosophilidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(4), 368-373.
- Steinwascher, K. (1984). Egg Size Variation in *Aedes aegypti*: Relationship to Body Size and Other Variables. *The American Midland Naturalist*, 112 (1), 76-84.
- Strauss, R.E. (2010). Discriminating Groups of Organisms. En: A. Elewa (Eds.). *Morphometrics for Nonmorphometricians*. (pp. 73-91). Minia-Egipt: Springer. Minia.
- Swiderski, M., Sheets, H. y Fink, W. (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists*. Segunda edición. Chennia: Elsevier.
- Tamayo, M. 2015. Diversidad del género *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae), en la estación seca y lluviosa en el Bosque Protector Yanacocha (Quito, Ecuador). Tesis previa a la obtención del título de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Throckmorton, L. (1962). The problem of phylogeny in the Genus *Drosophila*. *Studies of Genetics* (2), 207-344.
- Tidon-Sklorz, R. y Sene, F. (1995). *Drosophila seriema*: a new member of the *Drosophila serido* (Diptera, Drosophilidae) superspecies taxon. *Annals of the Entomological Society of America*, 88, 139-142
- Vela, D. y Rafael, V. (2004). Three new andean species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) of the mesophragmatica group. *Iheringia. Série Zoologia*, 94 (3), 295-299.

- Vilela, C. (1983). A Revision of *Drosophila repleta*, species group (Diptera, Drosophilidae). *Sociedade Brasileira de entomología*, (1), 1-114.
- Villano, J. L. y Katz, F. N. (1995). Four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in *Drosophila*. *Development*, 121(9), 2767-2777.
- Waddington, C. H. (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 7 (2), 118-126.
- Weber, K. E. (1990). Selection on wing allometry in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 126(4), 975-989.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. y Carroll, S. B. (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development*, 117(2), 571-584.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. y Fink, W.L. (2004). Geometric Morphometrics for Biologist. 2da Edición. New York y Londres: Academic Press.
- Zeng, Z. B., Liu, J., Stam, L. F., Kao, C. H., Mercer, J. M. y Laurie, C. C. (2000). Genetic architecture of a morphological shape difference between two *Drosophila* species. *Genetics*, 154 (1), 299-310.
- Zheng, M., Zhang, D., Damiens, D., Yamada, H. y Gilles, J. (2015). Standard operating procedures for standardized mass rearing of the dengue and chikungunya vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) - II - Egg storage and hatching. *Parasit & Vectors*, 8 (1), 348.

10.FIGURAS

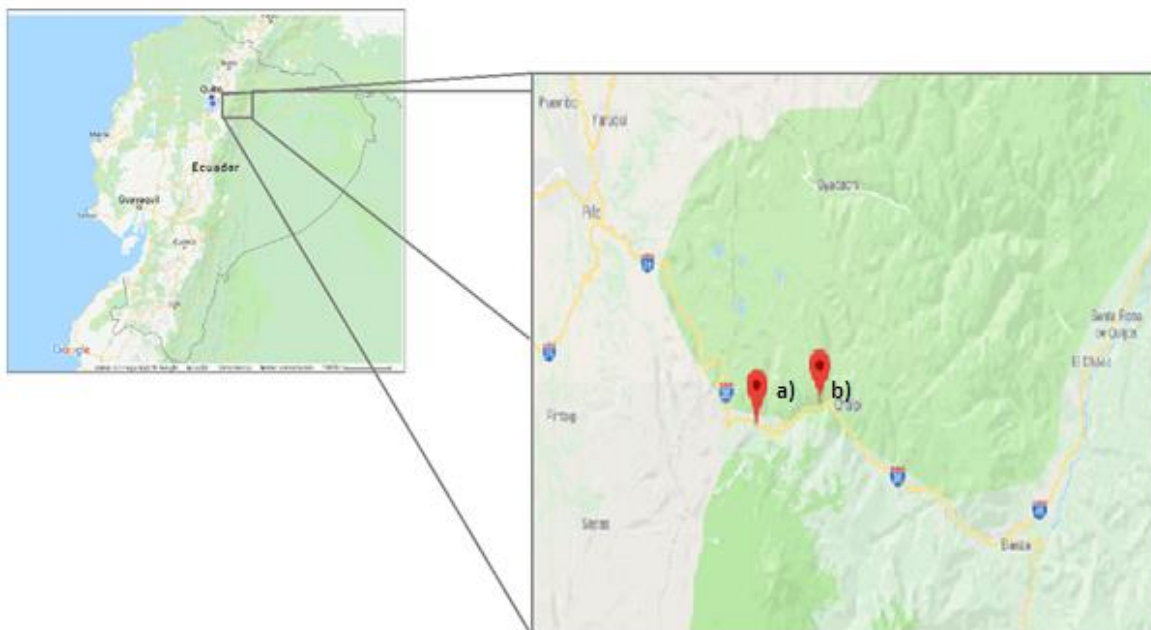


Figura. 1. Mapa del Ecuador y las zonas de captura de *Drosophila amaguana* y *D. neoamaguana*. a) Laguna de Papallacta, b) Río Guango.

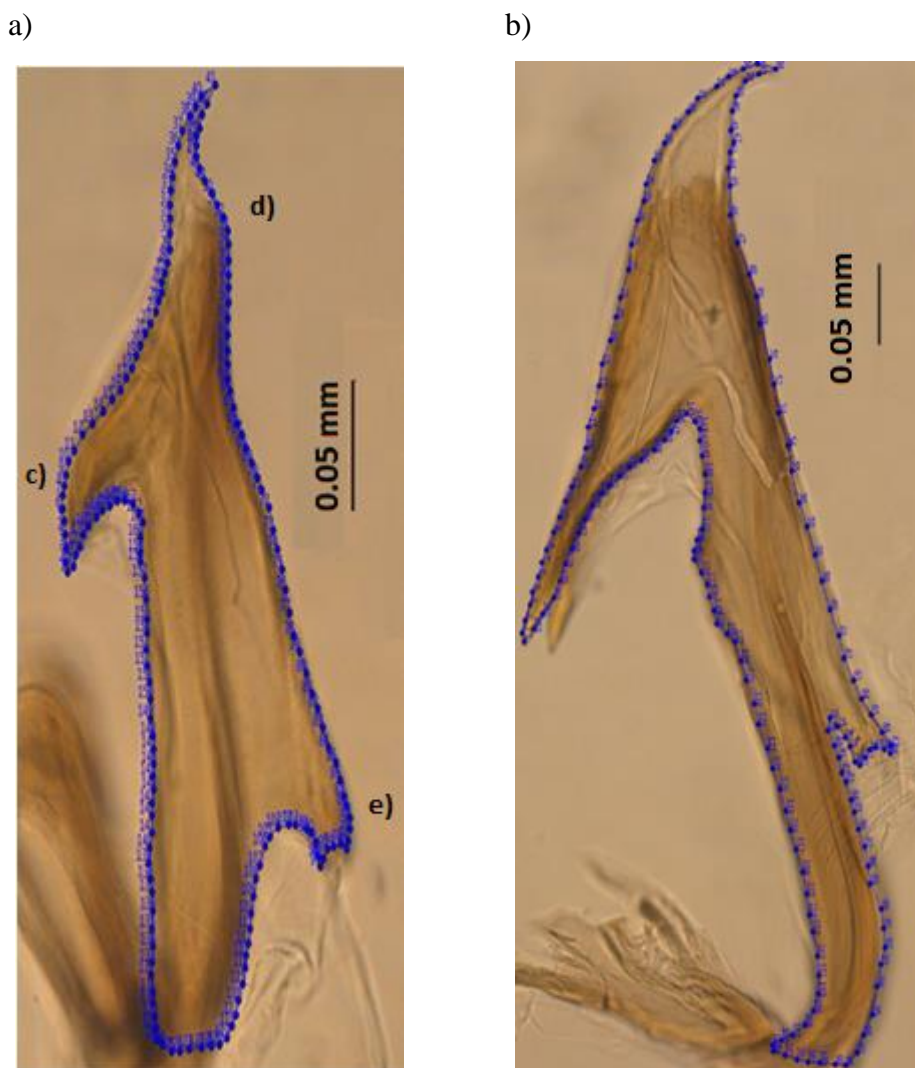


Figura 2. Digitalización de pseudolandmarks en el contorno del eedeago.

(a) Eedeago de *D. amaguana*. (b) Eedeago de *D. neoamaguana*. c) Espolon, d) curvatura dorso distal, e) proceso dorsal. Los puntos azules son los pseudolandmarks digitalizados en el contorno exterior del eedeago. Los pseudolandmarks fueron analizados mediante el análisis Elíptico de Fourier. Esta metodología permite analizar puntos no equidistantes.

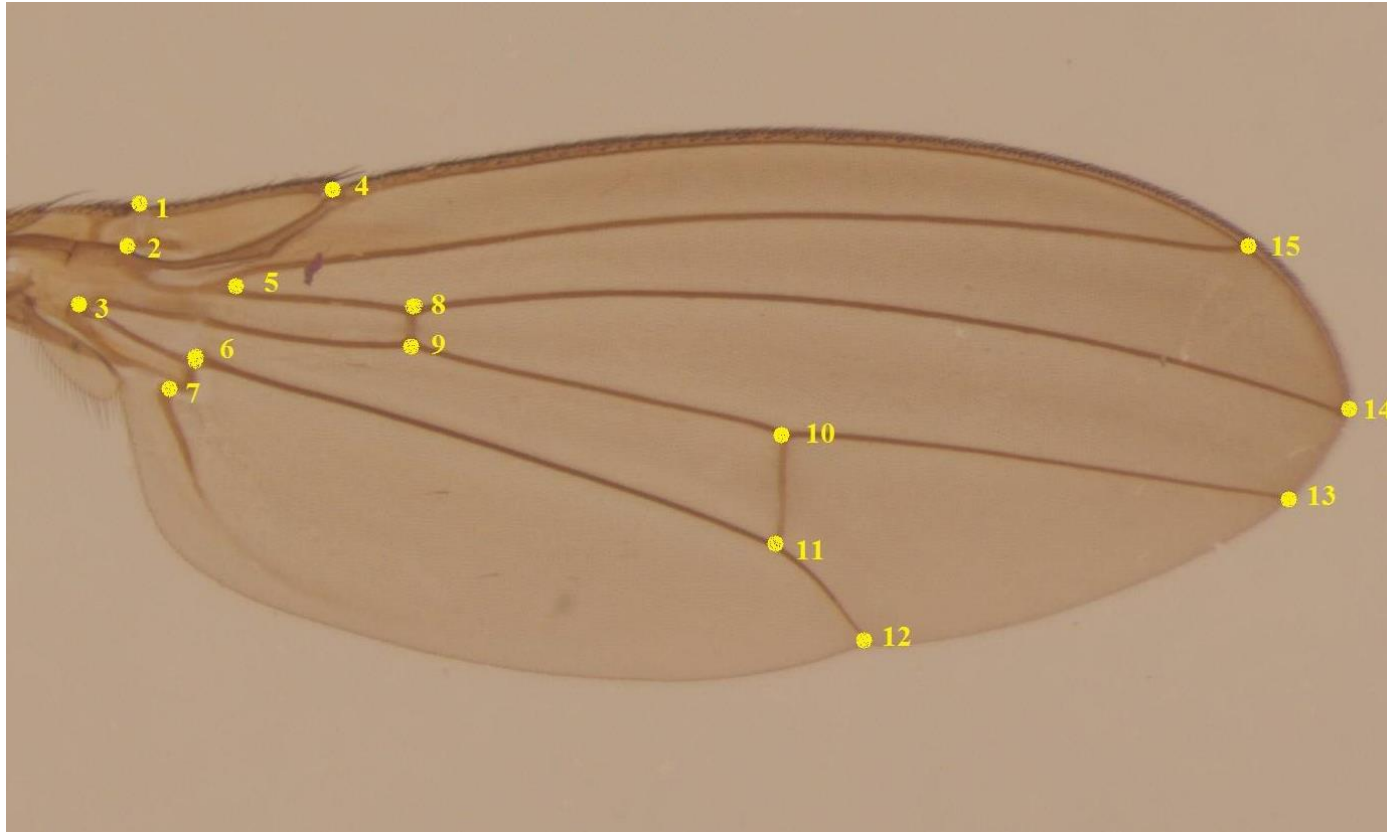


Figura 3. Digitalización de landmarks del ala de *D. neoamaguana*

Los puntos amarillos son los landmarks digitalizados, alado de cada punto hay un número que representa el orden en que fueron colocados los landmarks.

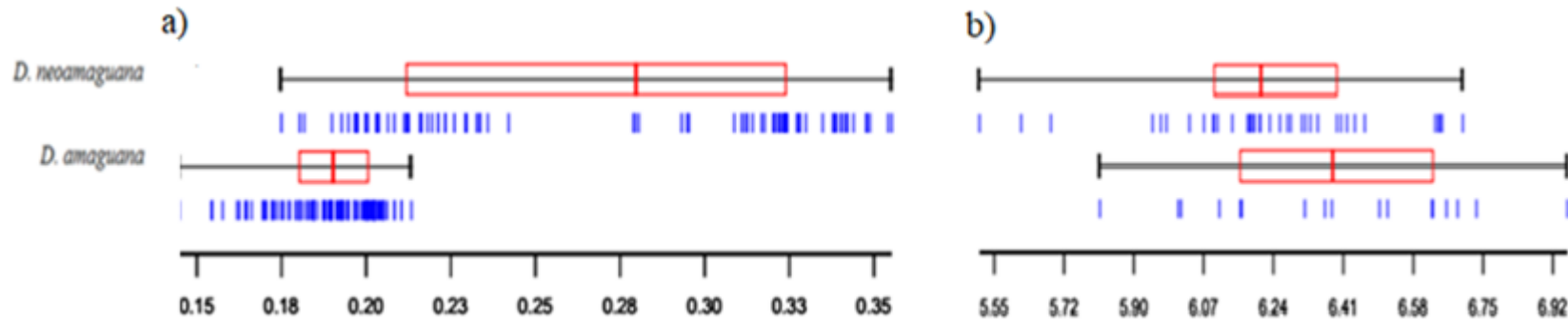


Figura 4. Variación interespecífica del tamaño del edeago y el ala.

(a) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) del edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. b) Variación del tamaño centroide (CS) del ala de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. La línea roja que divide la caja, representa la mediana y los extremos los cuartiles 25% y 75%. Las líneas azules verticales representan los individuos incluidos en el análisis. Se observa la diversidad de tamaños que estos presentan en el rango de cada especie. Los valores máximos y mínimos, se indica con las líneas negras verticales. La escala está en milímetros.

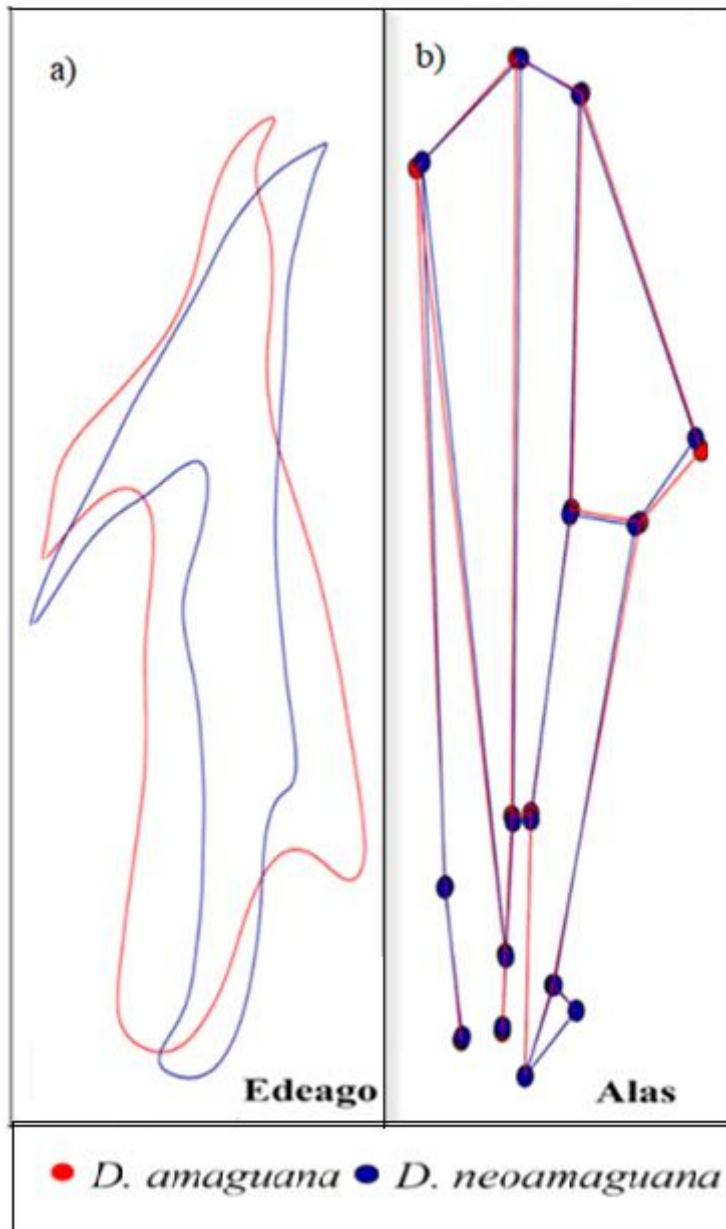


Figura 5. Diferencia de la conformación del edeago y el ala

(a) Forma de los contornos de los edeagos de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. (b) Forma alar de las especies *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. La forma fue representada por 27 armónicos, cuyo poder es del 0.99.

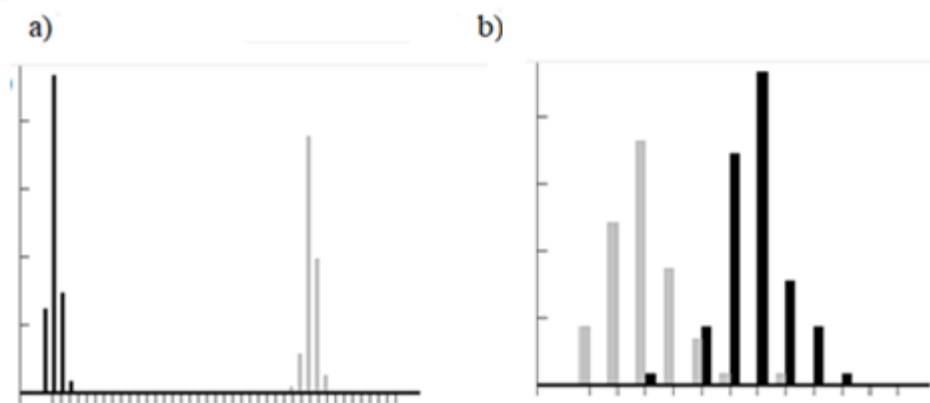


Figura 6. Variación interespecífica de la conformación del edeago y el ala

a) Análisis discriminante de la conformación del edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. (b) Análisis discriminante de la conformación alar de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. El color negro representa a *D. amaguana* y el color gris a *D. neoamaguana*.

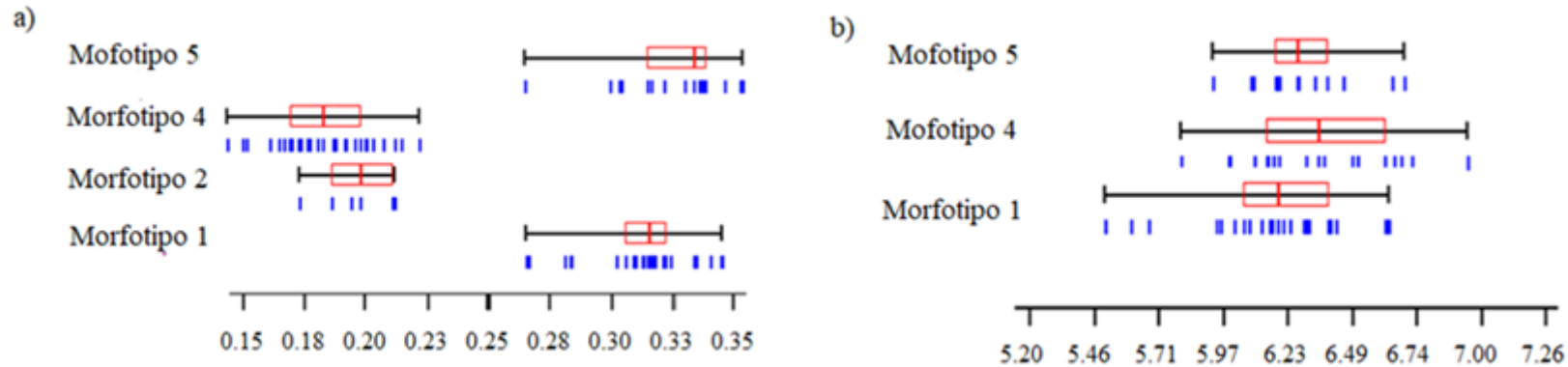


Figura 7. Variación intraespecífica del tamaño del edeago y el ala de *Drosophila neoamaguana*.

(a) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) del edeago de *D. neoamaguana*. (b) Variación del tamaño centroide (CS) del ala de *D. neoamaguana*. La línea roja que divide la caja, representa la mediana y los extremos los cuartiles 25% y 75%. Las líneas azules verticales representan los individuos incluidos en el análisis. Se observa la diversidad de tamaños que estos presentan en el rango de cada morfotipo. Los valores máximos y mínimos, se indica con las líneas negras verticales. La escala está en milímetros.

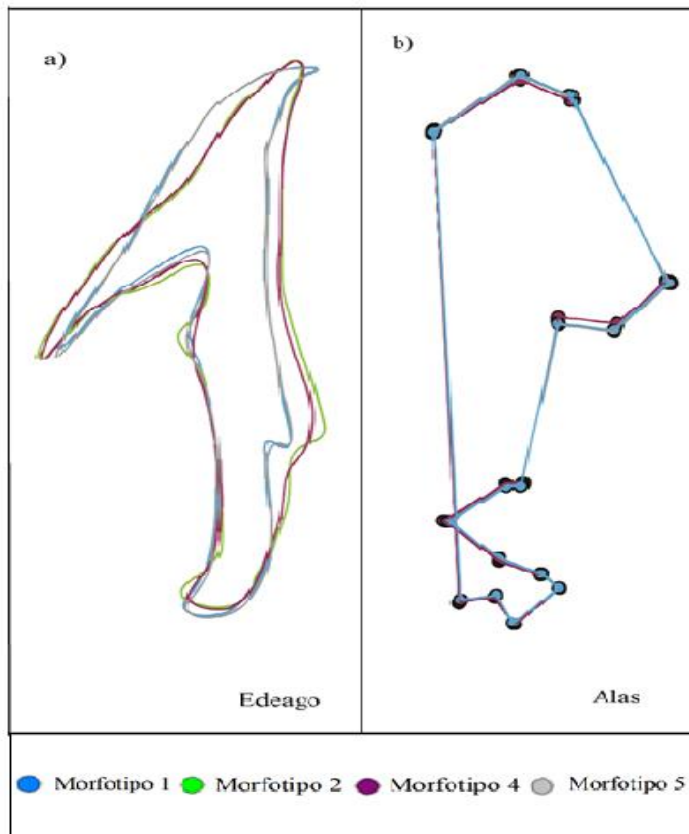


Figura 8. Diferencia de la conformación del edeago y el ala.

a) Forma de los contornos de los edeagos en los diferentes morfotipos de *D. neoamaguana*. Forma alar de los morfotipos de *D. neoamaguana*. La forma del edeago fue representada por 29 armónicas, cuyo poder es del 99.3.

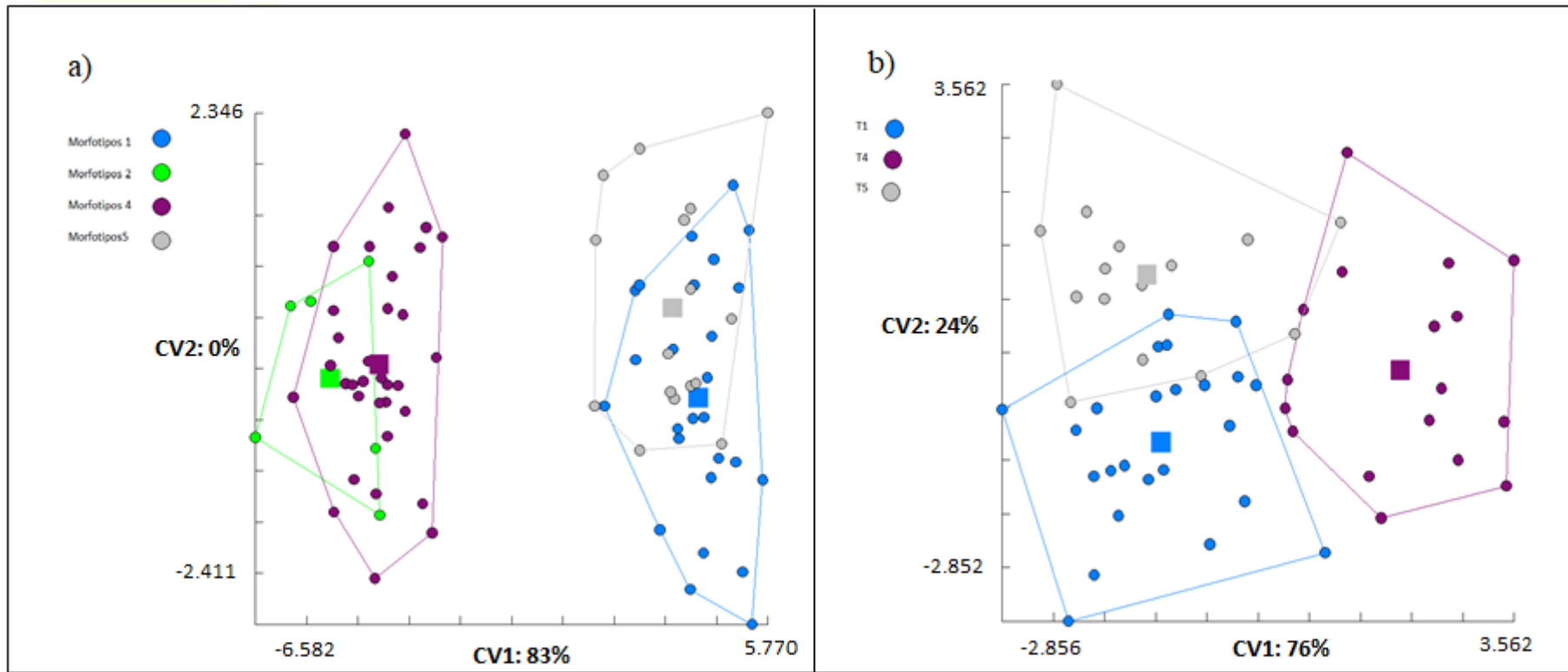


Figura 9. Variación intraespecífica de la conformación del eedeago y del ala de *Drosophila neoamaguana*.

a) Análisis discriminante de la conformación del eedeago de los morfotipos de *D. neoamaguana*. b) Análisis discriminante de la conformación alar de los morfotipos *D. neoamaguana*. En los ejes se indica el porcentaje de contribución a la variación total que cada uno presenta. El cuadrado de cada polígono representa el centroide de la distribución de cada grupo.

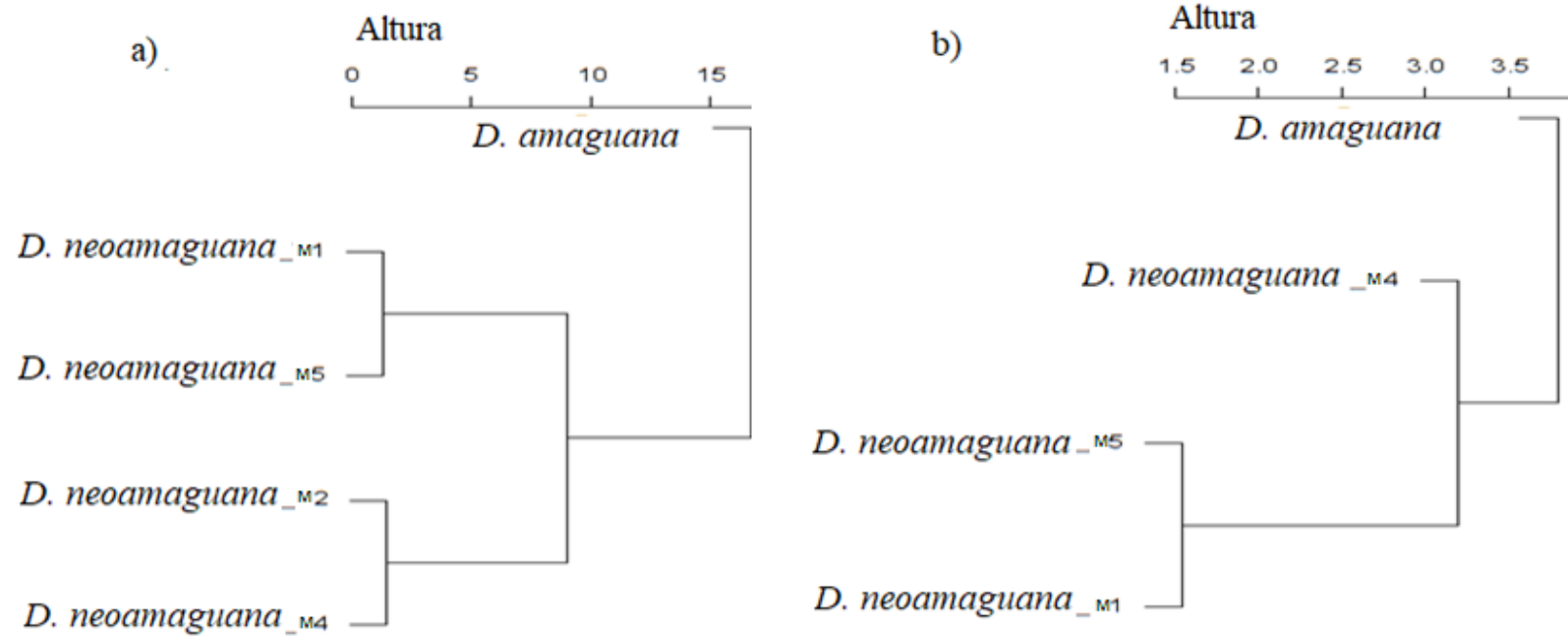


Figura 10. Árbol Neighbor-joining de la conformación del edeago y las alas.

a) Árbol obtenido de la conformación del contorno del edeago de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. b) Árbol obtenido mediante el análisis de las alas de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*. Los árboles se construyeron basados en las distancias fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis.

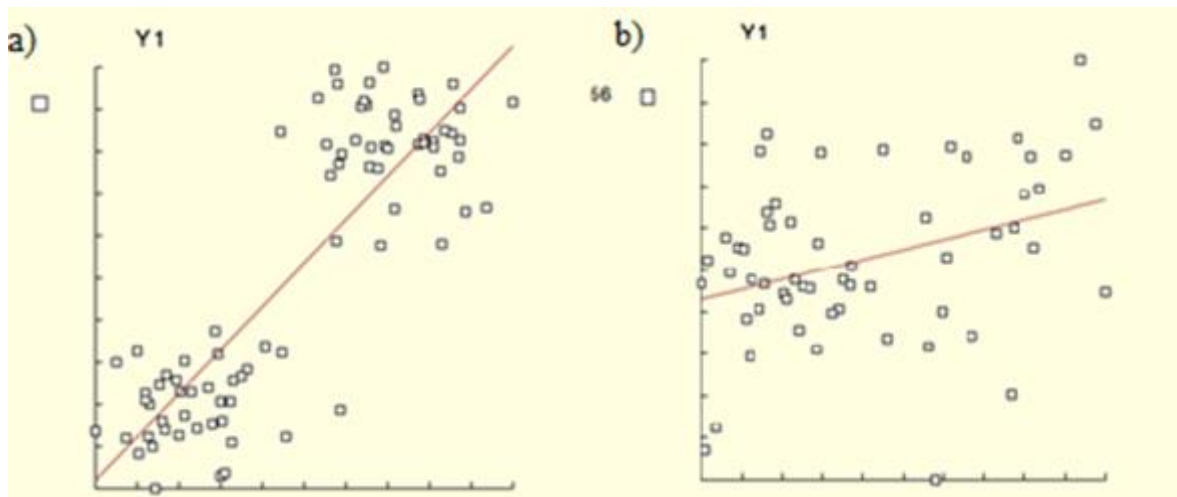


Figura 11. Análisis alométrico la conformación del edeago y las alas

- a) Influencia del tamaño en la conformación del edeago de *D. neoamaguana*. b) Influencia del tamaño en la conformación del ala de *D. neoamagu*

10. TABLAS

Tabla 1. Número de individuos capturados de *D. amaguana* y *D. neoamaguana* para los análisis morfométricos.

Las capturas de los individuos con los que se trabajó en este estudio se realizaron en el mes de julio del 2016 y en el mes de marzo del 2017.

Especies	Morfotipo	Localidad	Número de eдеagos analizados	Número de alas analizadas	Total de individuos
<i>D. amaguana</i>		Río Guango y Laguna de Papallacta	91	68	91
<i>D. neoamaguana</i>	M1	Río Guango	26	24	26
	M2	Río Guango	6	-	6
	M4	Río Guango	33	17	33
	M5	Río Guango	16	15	16
<i>TOTAL</i>			173	124	173

Nota: En las alas no se tomó en cuenta el morfotipo 2, por que el número de individuos no fue suficiente (3 individuos).

Tabla 2.- Media (\bar{x}), desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) del tamaño del edeago (sqrA) y el ala (CS) de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*.

Especie	Morfortipos	Aedeago		Alas	
		$\bar{x}\pm SD$	σ^2	$x\pm SD$	σ^2
<i>D. amaguana</i>	-	0.20 \pm 0.014	0.00019	6.25 \pm 0.423	0.17897
<i>D. neoamaguana</i>	M1	0.32 \pm 0.017	0.00030	6.19 \pm 0.28	0.08222
	M2	0.22 \pm 0.012	0.00015	-	-
	M4	0.21 \pm 0.016	0.00025	6.36 \pm 0.287	0.00036
	M5	0.33 \pm 0.019	0.00036	6.29 \pm 0.207	0.08222

Tabla 3. Significación de la media del tamaño.

Relaciones estadísticas del tamaño de los edeagos de *D. amaguana* y los morfotipos de *D. neoamaguana*. (b) Relaciones estadísticas del tamaño de las alas de *D. amaguana* y los morfotipos de *D. neoamaguana*.

a)

	<i>D. amaguana</i>	<i>D. neoamaguana M1</i>	<i>D. neoamaguana M2</i>	<i>D. neoamaguana M4</i>	<i>D. neoamaguana M5</i>
<i>D. amaguana</i>	0				
<i>D. neoamaguana M1</i>	0.0000	0			
<i>D. neoamaguana M2</i>	0.0000	0.0000	0		
<i>D. neoamaguana M4</i>	0.0000	0.0000	0.154	0	
<i>D. neoamaguana M5</i>	0.0000	0.077	0.0000	0.0000	0

b)

	<i>D. neoamaguana M1</i>	<i>D. neoamaguana M4</i>	<i>D. neoamaguana M5</i>
<i>D. neoamaguana M1</i>	0		
<i>D. neoamaguana M4</i>	0.039	0	
<i>D. neoamaguana M5</i>	0.307	0.245	0

Tabla 3. Reclasificación validada del eedeago y las alas las especies y morfotipos de *D. amaguana* y *D. neoamaguana*.

Especies	Morfotipos	Eedeago		Ala	
		Reclasificación Validada		Reclasificación Validada	
<i>D. amaguana</i>	-	100%	92/92	98%	67 / 68
<i>D. neoamaguana</i>	M1	61%	16 / 26	54%	21 / 24
	M2	66%	4 / 6		
	M4	72%	24 / 33	58%	15 / 19
	M5	43%	7 / 16	46%	12/ 13
	Total	83%	143/173	93%	115/124

Tabla 5. Significación estadística de las distancias de Mahalanobis

a) Diferencias significativas entre las distancias de Mahalanobis del edeago y (b) las alas dentro de los morfotipos de *D. neoamaguana*.

a)

	<i>D. amaguana</i>	<i>D. neoamaguana</i> M1	<i>D. neoamaguana</i> M2	<i>D. neoamaguana</i> M4	<i>D. neoamaguana</i> M5
<i>D. amaguana</i>	0	-	-	-	
<i>D. neoamaguana M1</i>	0.000	0			
<i>D. neoamaguana M2</i>	0.000	0.000	0		
<i>D. neoamaguana M4</i>	0.000	0.000	0.119	0	
<i>D. neoamaguana M5</i>	0.000	0.078	0.000	0.000	0

b)

	<i>D. amaguana</i>	<i>D. neoamaguana</i> M1	<i>D. neoamaguana</i> M4	<i>D. neoamaguana</i> M5
<i>D. amaguana</i>	0			
<i>D. neoamaguana M1</i>	0.0000	0		
<i>D. neoamaguana M4</i>	0.0000	3.34	0	
<i>D. neoamaguana M5</i>	0.0000	1.85	3.52	0

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN**

Yo, Daniel Augusto Romero Dueñas, CI 1723068563 autor del trabajo de graduación titulado: “Análisis morfométrico del edeago y alas en poblaciones naturales de *Drosophila amaguana* y *D. neoamaguana* provenientes de Río Guango y Laguna de Papallacta provincia de Napo, Ecuador”, previa a la obtención del grado académico LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 9 de Febrero de 2018

Sr. Daniel Romero

1723068563